



# LA MICROSCOPIE

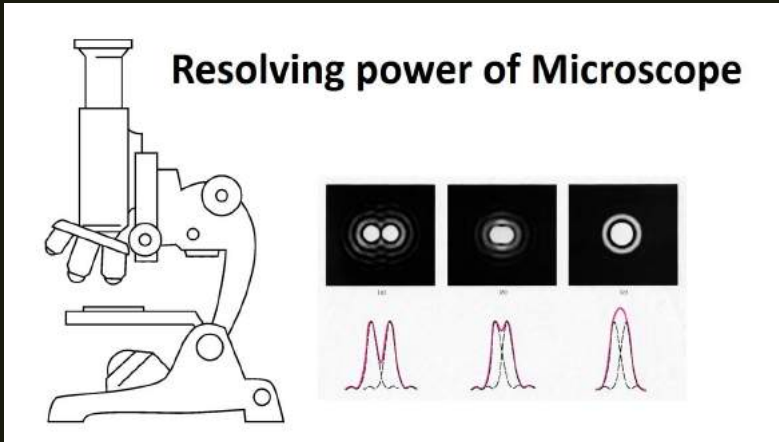
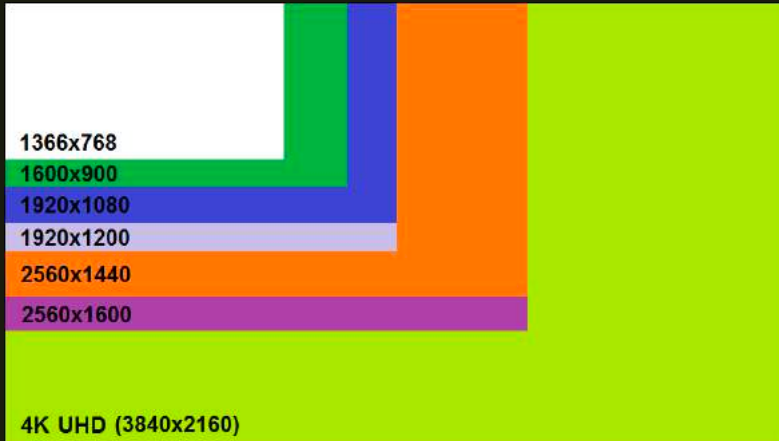
*un cours hyper méga intéressant ☺*





# A. LA MICROSCOPIE OPTIQUE/PHOTONIQUE





# 1- La limite de résolution



- La taille du plus petit point que l'on peut réussir à observer en étant capable de le distinguer du point d'à côté. ++
- La résolution de l'œil est de 0,2 millimètres, soit 200 micromètres
- Tandis que la résolution de la microscopie optique est de 0,2 micromètres (200 nm)

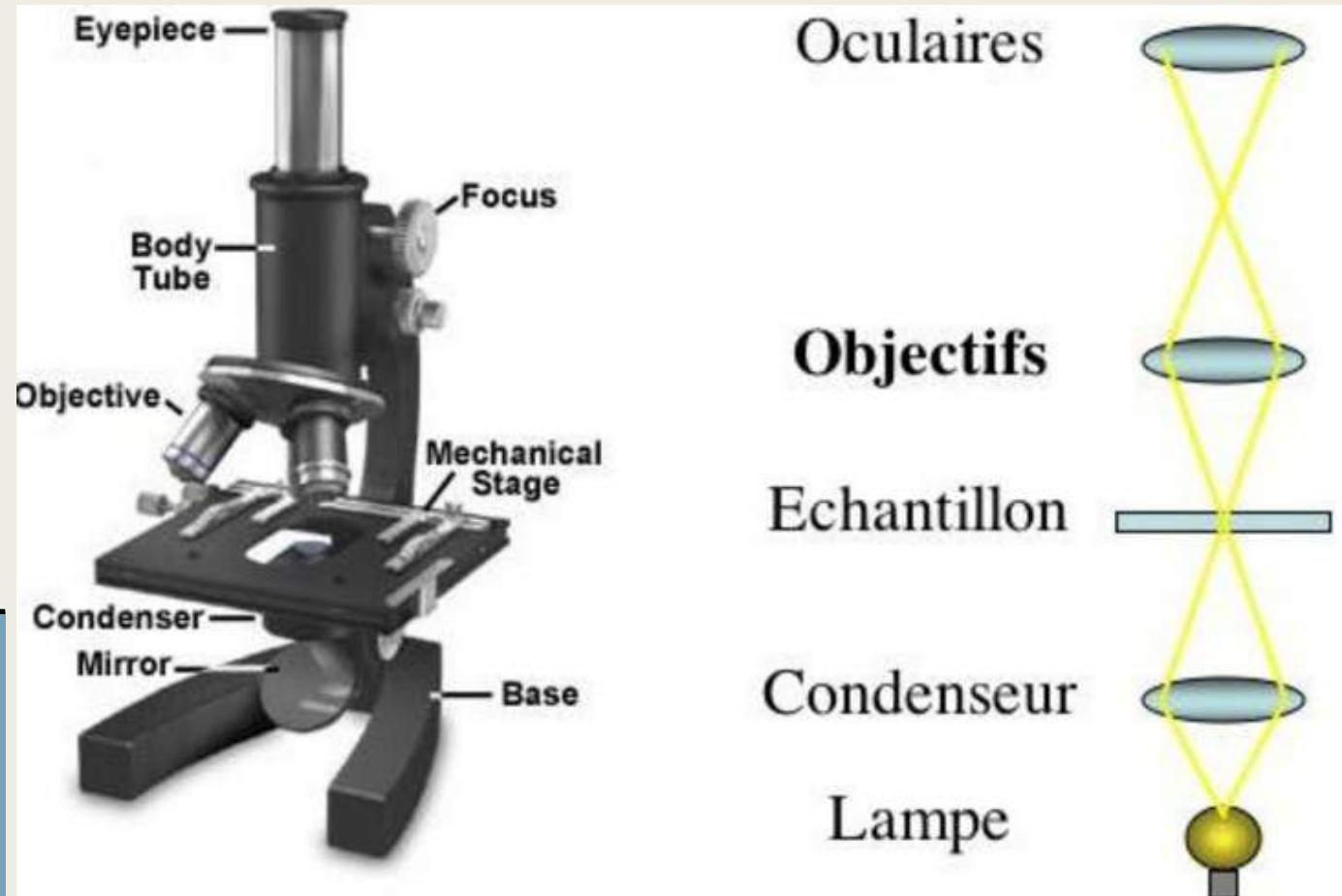


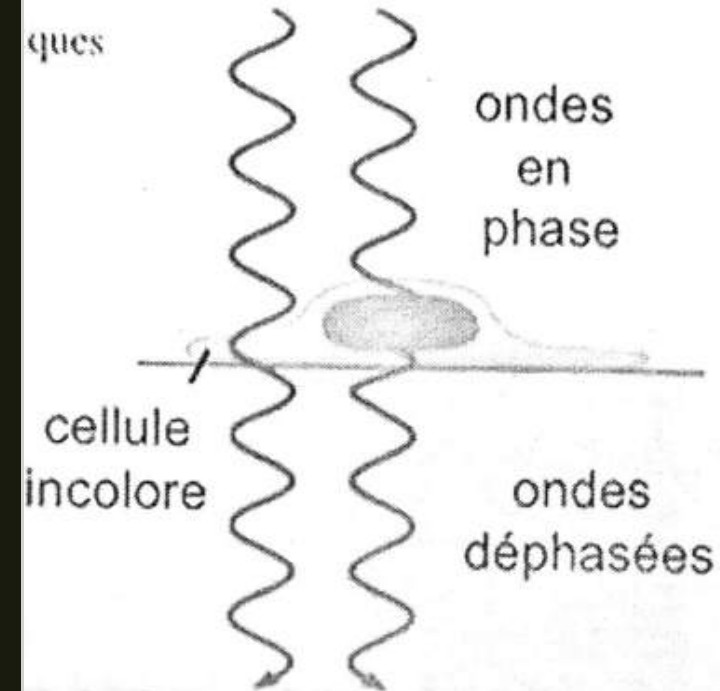
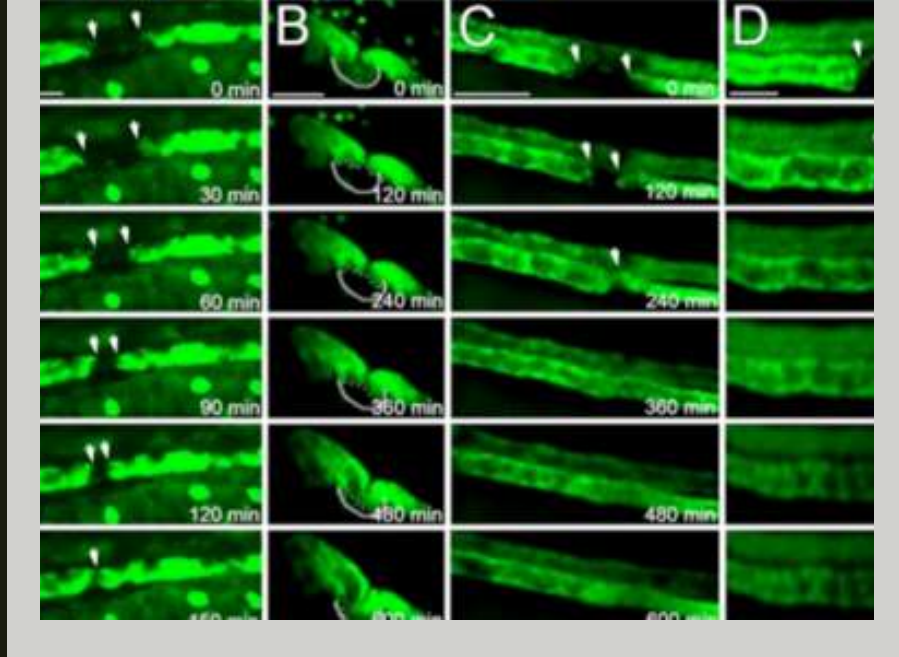
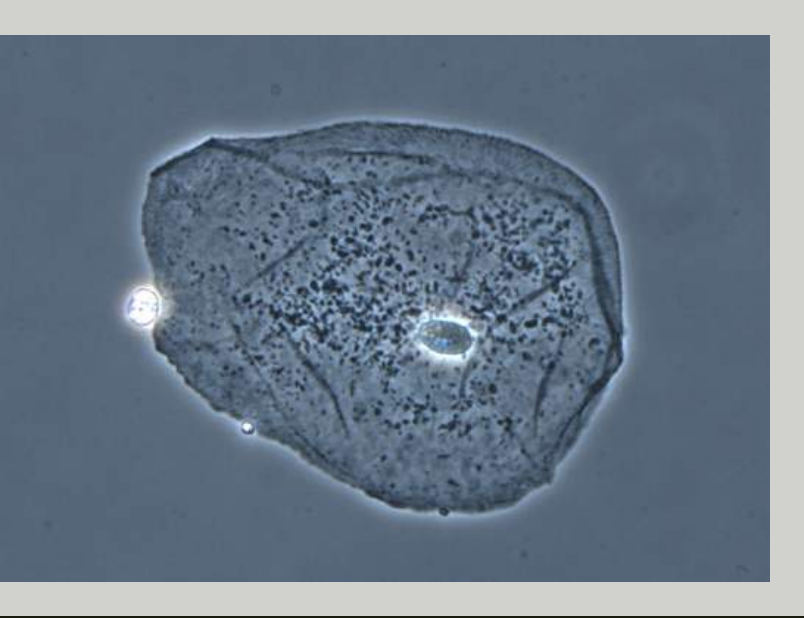


## 2- Le microscope optique conventionnel

Préparation d'un échantillon pour microscopie optique:

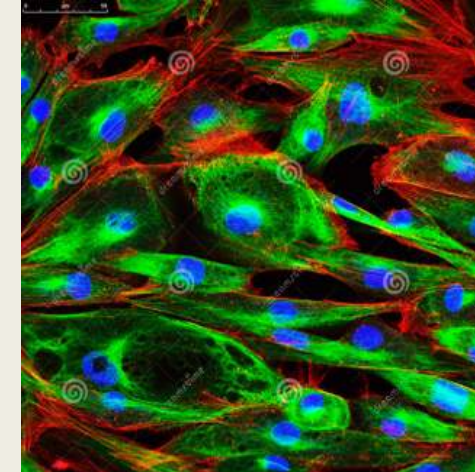
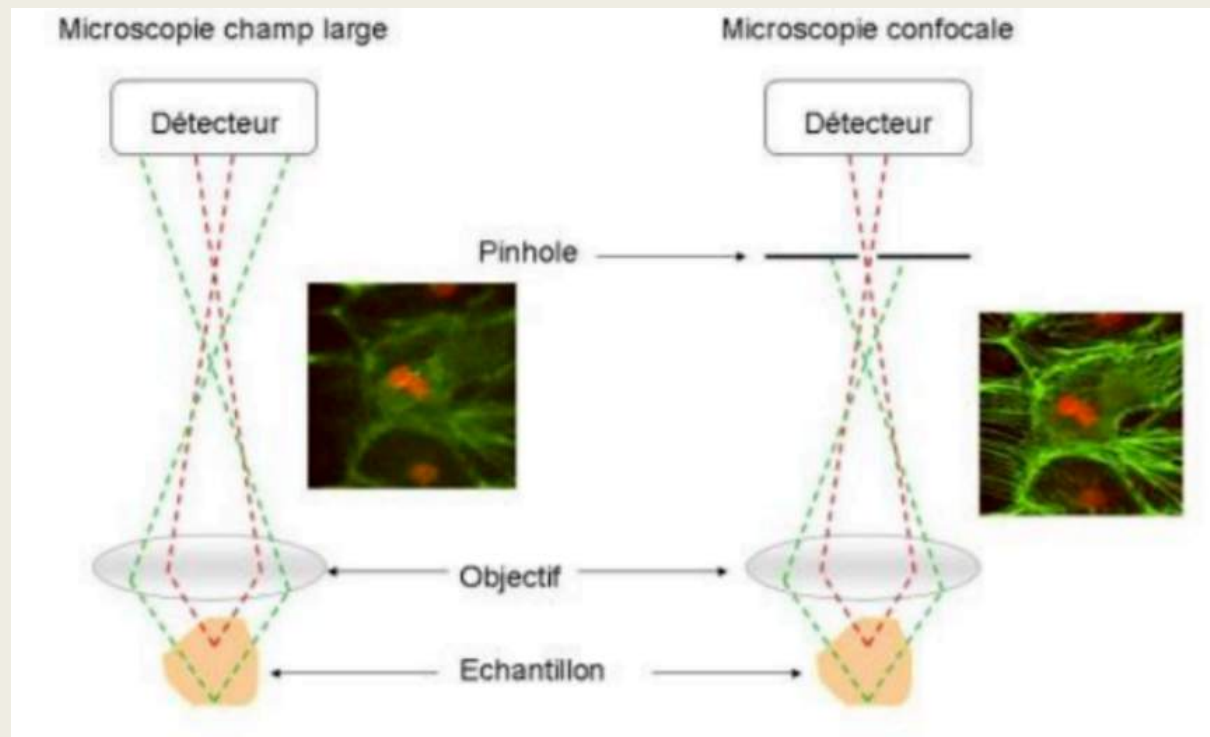
- **Fragmentation** du tissu
- **Fixation** : avec du glutaraldéhyde, formaldéhyde (pour stabiliser les liaisons chimiques, mais cela tue la cellule)
- **Rigidification** : inclusion de l'échantillon en résine/paraffine pour le couper
- **Coupe** (de l'ordre de quelques microns)
- **Coloration** : afin de pouvoir voir les cellules, car celles-ci sont naturellement transparentes.





### 3. La microscopie à contraste de phase

- Permet d'observer des cellules vivantes
- Microscope va amplifier le déphasage de la lumière
- Meilleure résolution ++

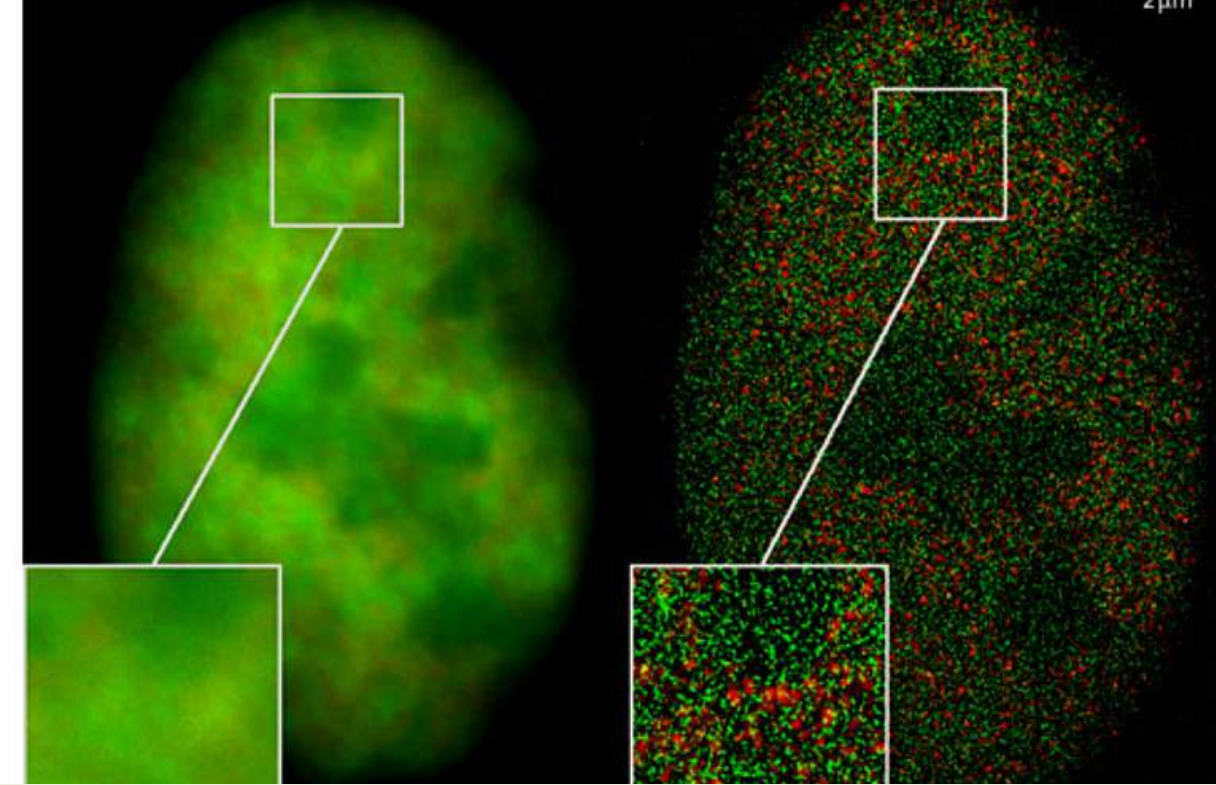


## 4-Le microscope confocal

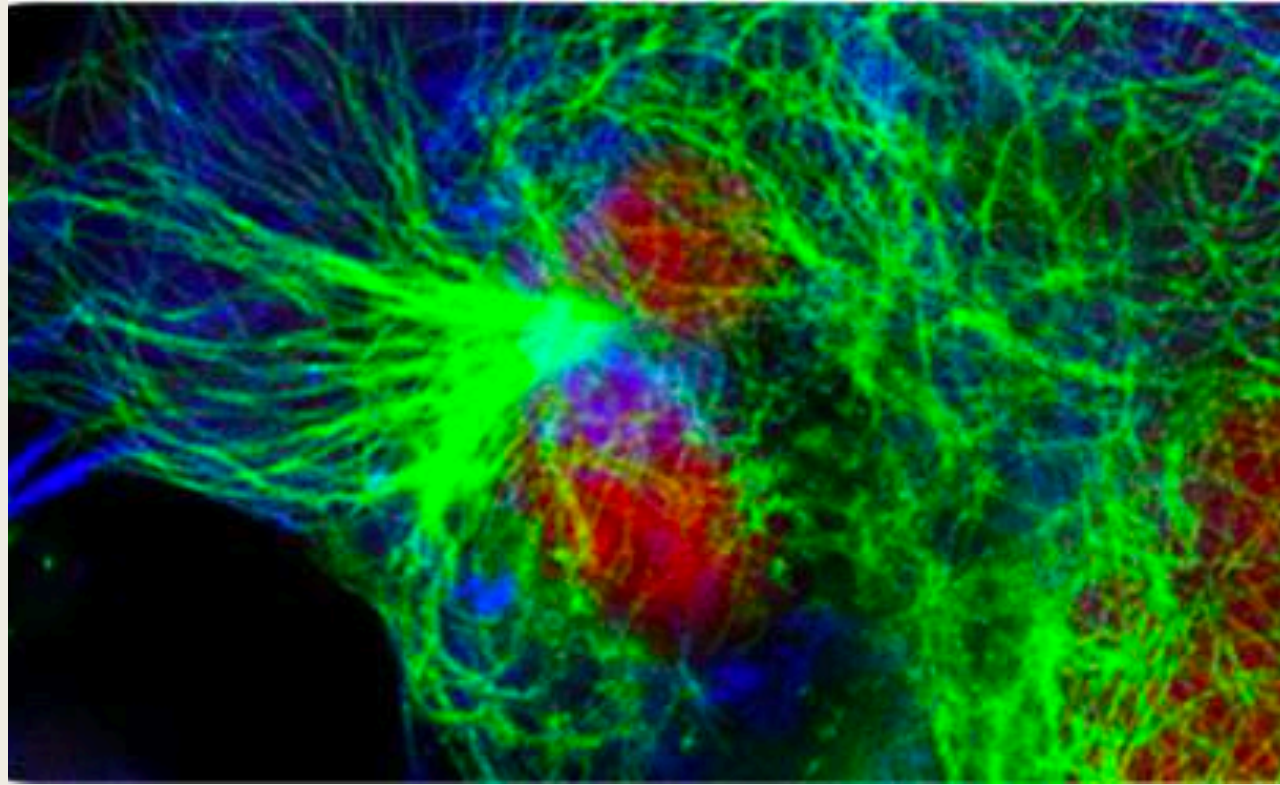


- Focalise les rayons sur **UN SEUL** plan de l'échantillon.
- Travailler sur des échantillons ayant une certaine épaisseur





Gunkel et al. 200

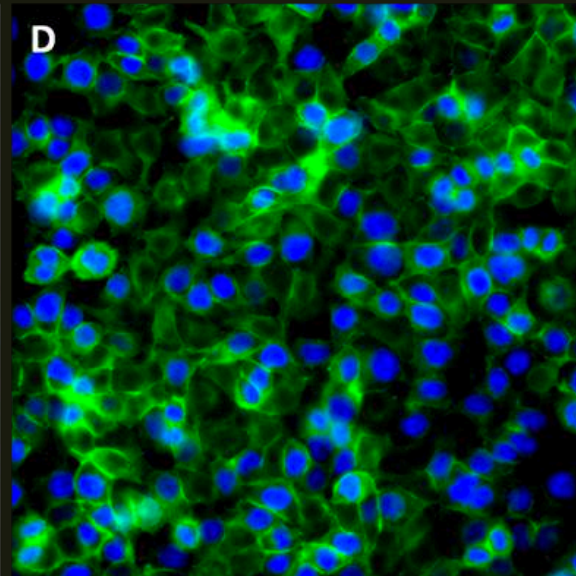
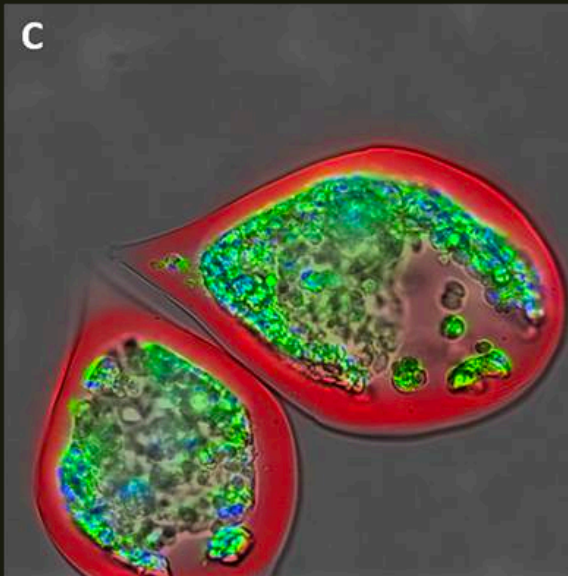
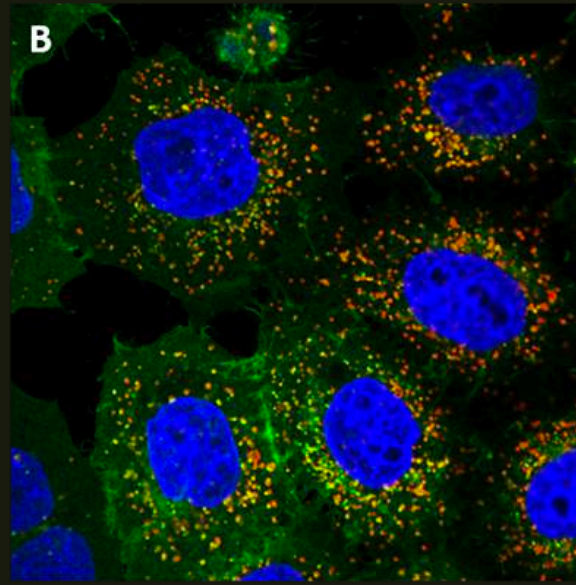
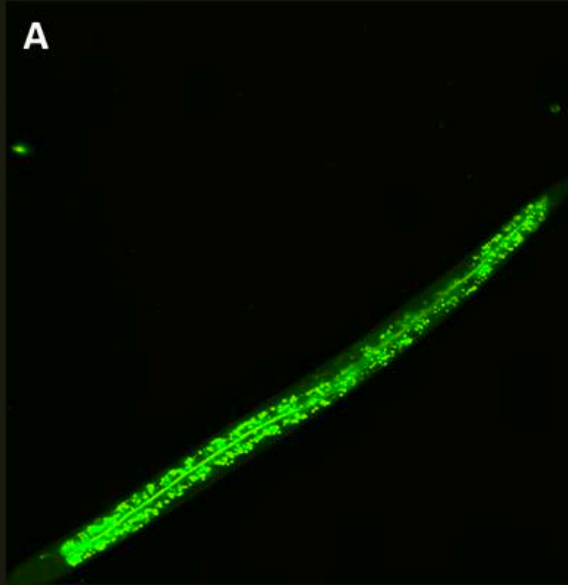


## 5- Le microscope à super-résolution



Il peut y avoir des molécules pas très catholiques.

- Permet de **diminuer la limite de résolution ++**
- Excitation de molécules fluorescentes **séquentiellement**
- Superposition informatique d'images



## 6- LE MICROSCOPE À FLUORESCENCE





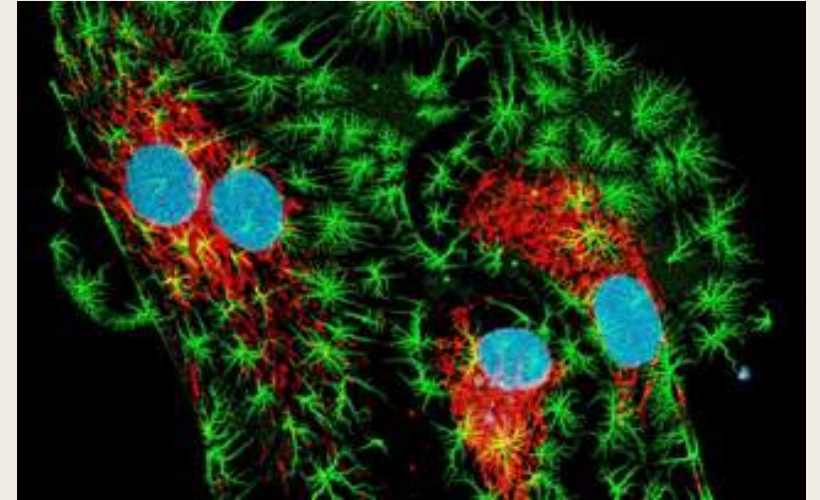
## a) Principe de fluorescence

- Molécule fluorescente= FLUOROCHROME ++

- Absorbe la lumière et la restitue

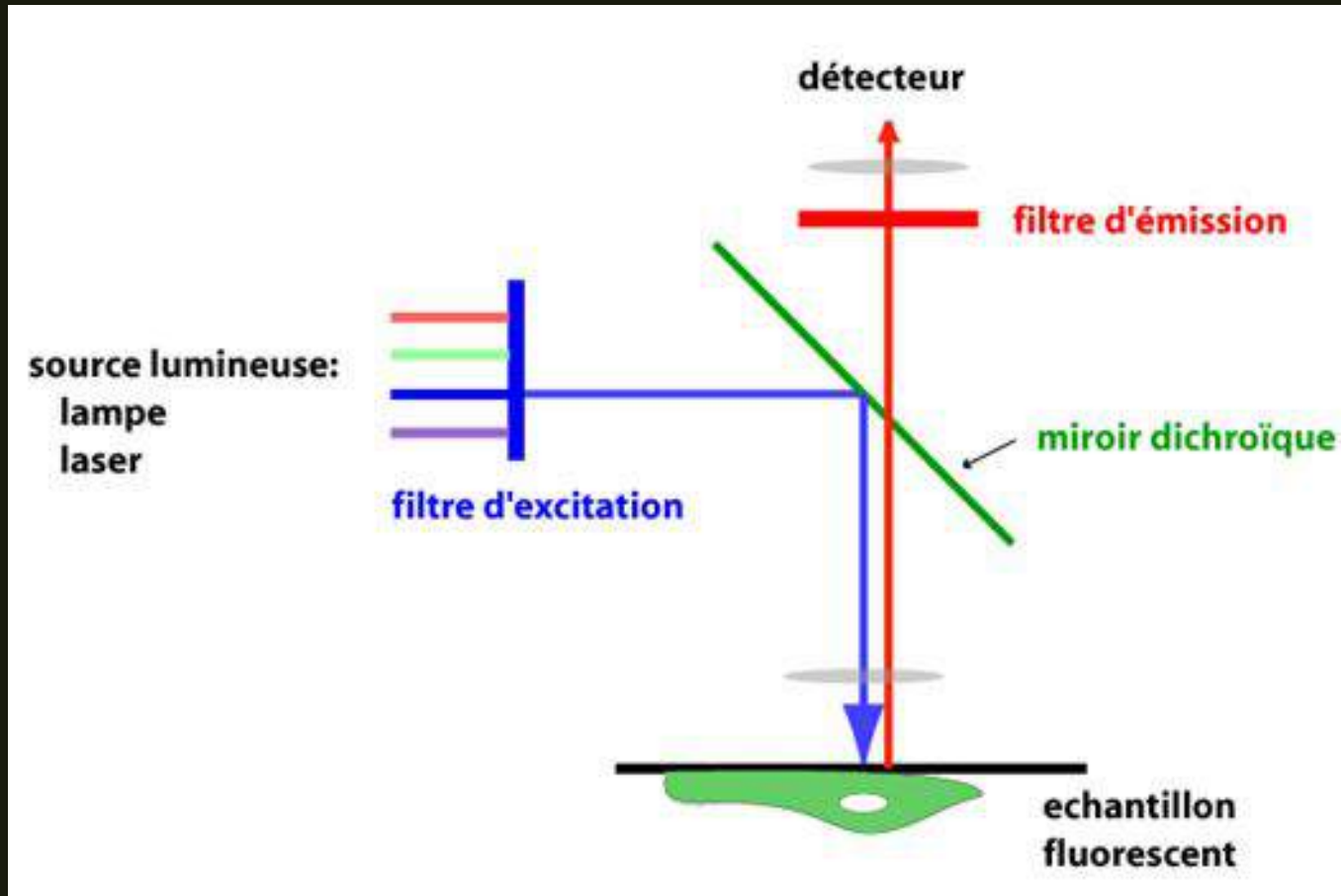
- Important →

Énergie d'Excitation > Énergie d'émission  
 $\lambda$  d'excitation <  $\lambda$  d'émission



Permettra de LOCALISER des molécules spécifiques dans une cellule qui pourra être fixée OU vivante. +++

## b) Fonctionnement du microscope à fluorescence



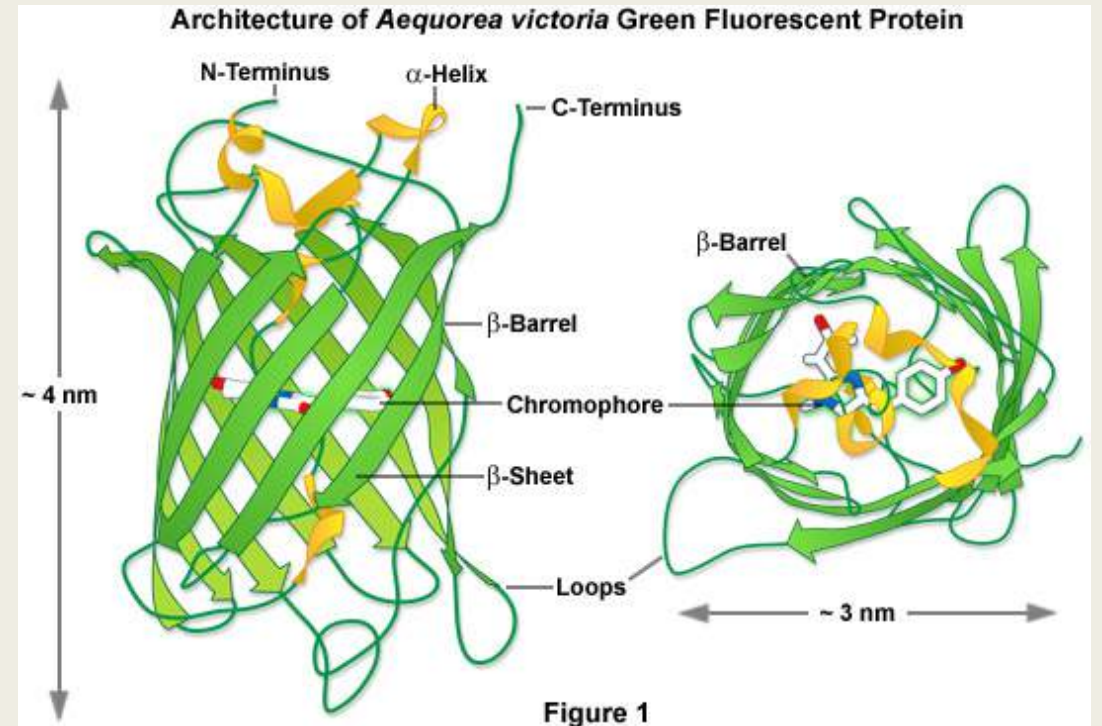
Lumière blanche → 1<sup>er</sup> **FILTRE** sélectionnant une longueur d'onde → **RÉFLEXION** par miroir dichroïque → **EXCITATION** des fluorochromes → **ÉMISSION** de lumière par les fluorochromes → **TRAVERSÉE** de la lumière à travers le miroir dichroïque → 2<sup>ème</sup> **FILTRE** → **OBSERVATION**



## c) La Fluorescence naturelle : la GFP


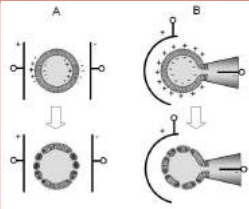


- GFP est une protéine naturelle fluorescente
- Spectre d'excitation dans le bleu et d'émission dans le vert
- Marqueur universel et non toxique



## d) Introduction des molécules fluorescentes dans la cellule

### ■ 4 techniques différentes :

1- La micro-injection		<p>On va utiliser une <u>micropipette</u> pour injecter le fluorochrome.</p> <p>Peu utilisée car on doit le faire individuellement pour chaque cellule (<i>relou un peu</i>) ☹</p>
2- L'électroporation		<p>Méthode invasive faisant des petits trous dans la membrane plasmique grâce à un champs électrique permettant aux fluorochromes de rentrer.</p> <p>On peut traiter plusieurs cellules en même temps. ☺</p>
3- Vectorisation par vésicule		<p>Méthode la plus naturelle car utilise l'<u>endocytose</u> ++</p> <p>On va mettre les fluorochromes dans des vésicules que la cellule va <u>endocyter</u> (absorber)</p>
4- Exprimer un gène codant pour une protéine fluorescente directement		<p>Technique sophistiquée, permettant à la cellule d'exprimer directement les fluorochromes en lui faisant exprimer un gène qui code pour des fluorochromes via une <b>expression artificielle</b> de ce gène.</p>



## e) Utilisation et interprétation de la fluorescence

- On crée, par exemple un gène hybride GFP-X qui donnera une protéine GFP-X
- On va comme cela pouvoir tracer la protéine X dans la cellule



Situation d'exemple: on observe une fluorescence au niveau de la membrane: qu'en déduit-on ?

« La fluorescence provient de la membrane plasmique, donc logiquement on démontre que la protéine X s'exprime au niveau de la membrane ! ».





« La fluorescence provient de la membrane plasmique, donc logiquement on suggère que la protéine X s'exprime au niveau de la membrane ! ».



# SUGGÉRER ≠ DÉMONTRER

Démontrer revient à affirmer que le résultat obtenu est la seule interprétation possible.

Dire « je DÉMONTRE que la protéine X est membranaire » est FAUX.

Il peut exister une autre interprétation : on a créé une protéine hybride GFP-X et on peut admettre que la protéine GFP-X va avoir une localisation différente de la protéine X normale ! Ce changement de localisation après hybridation reste RARE mais il est existant et ne peut être négligé.

Il est donc obligatoire d'employer ici le terme SUGGÉRER plutôt que DÉMONTRER : « je SUGGÈRE que la protéine X est membranaire » est VRAI.

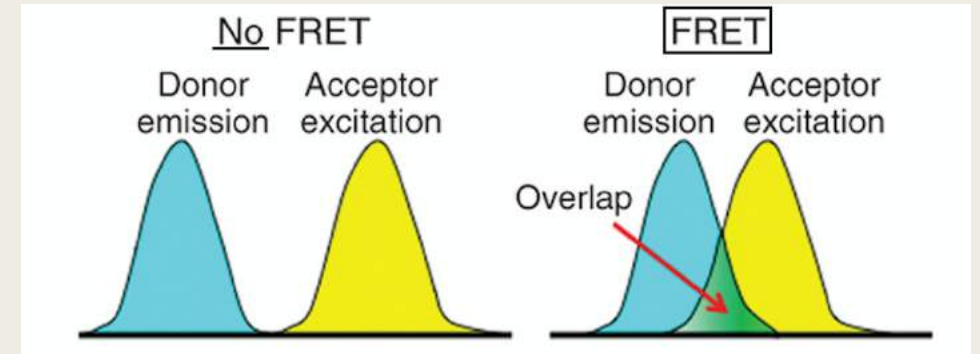
*En revanche, il existe des manipulations plus poussées qui pourraient nous aider à DÉMONTRER que la protéine X est bel et bien membranaire, non détaillées ici ...*





## f) Application de la fluorescence (FRET, FRAP, FLIP)

### i) Le FRET



- Un transfert d'énergie entre 2 molécules fluorescentes permettant de vérifier la proximité de 2 protéines ou même de vérifier la conformation d'une seule protéine.

Excitation d'un fluorochrome (BFP) → Émission d'un photon (bleu) → Photon bleu est absorbé par le 2<sup>ème</sup> fluorochrome (GFP) → Émission d'un photon (vert) qui sera observé au microscope.

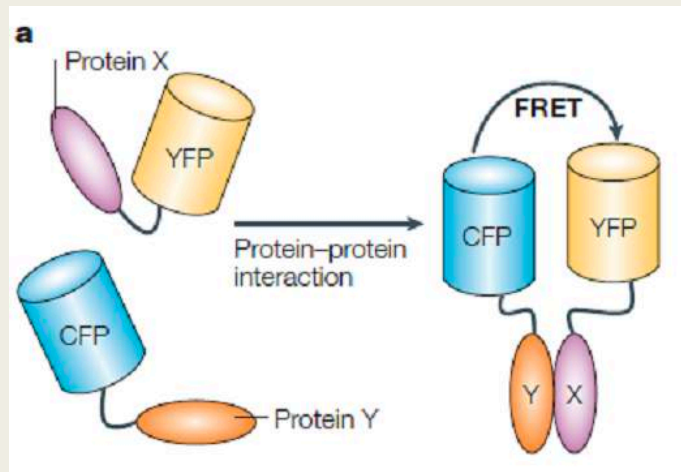
2 conditions pour que le FRET fonctionne :

- 1- Le spectre d'émission (donc la longueur d'onde du photon) du premier fluorochrome doit recouvrir le spectre d'absorption du 2<sup>ème</sup> fluorochrome.
- 2- Les 2 molécules doivent se situer à une distance inférieure à 10nm.

# FRET INTERmoléculaire vs FRET INTRAmoléculaire

## FRET INTERmoléculaire:

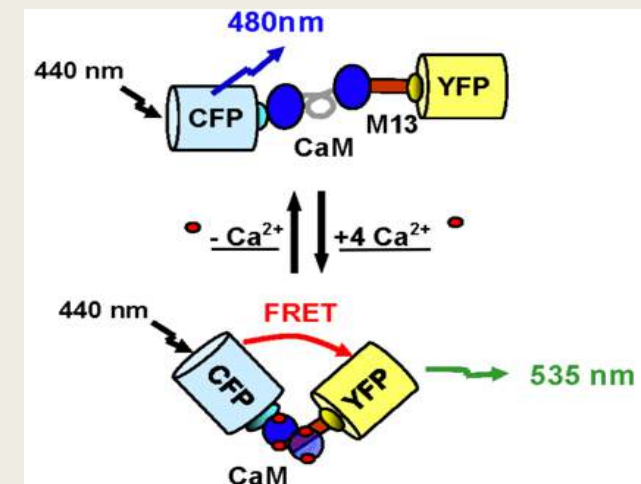
- Vérifie l'interaction, la proximité entre 2 protéines !



**VS**

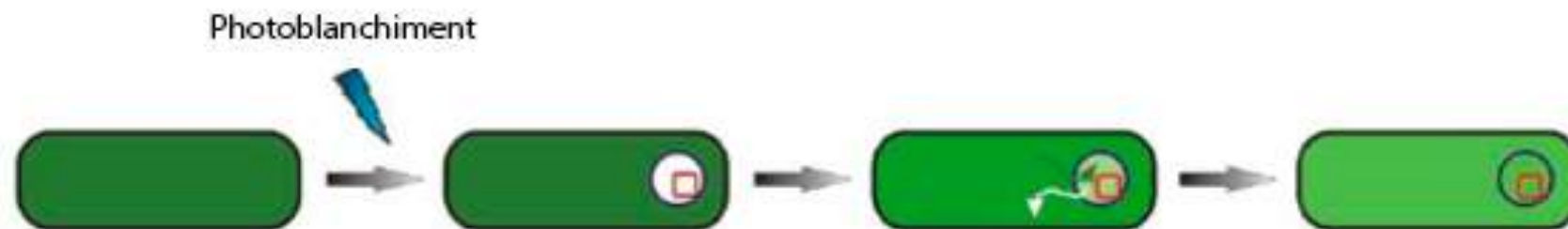
## FRET INTRAmoléculaire

- On va disposer 2 fluorochromes sur LA **MÊME** protéine.
- Voir si la protéine change de conformation dans l'espace



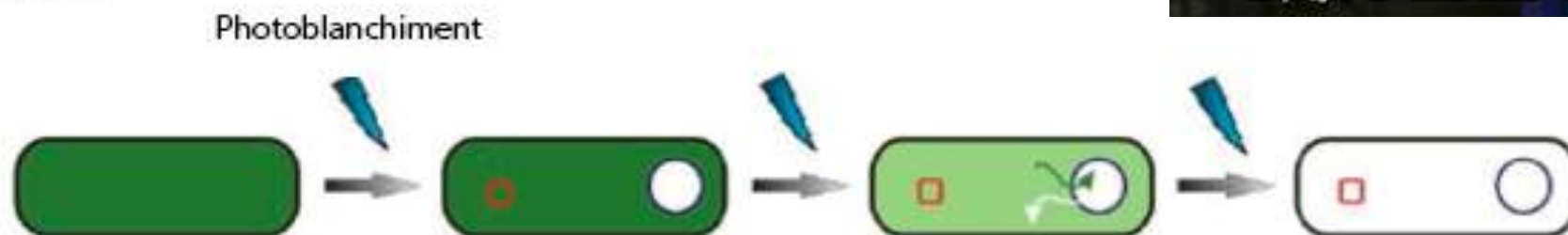
## ii) FRAP/FLIP

### FRAP



○ Zone de photoblanchiment  
□ Capteur

### FLIP

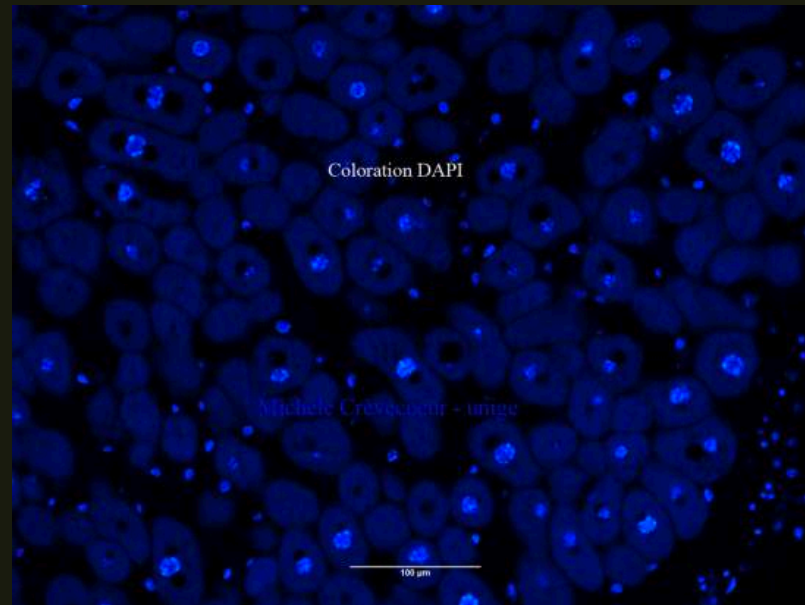


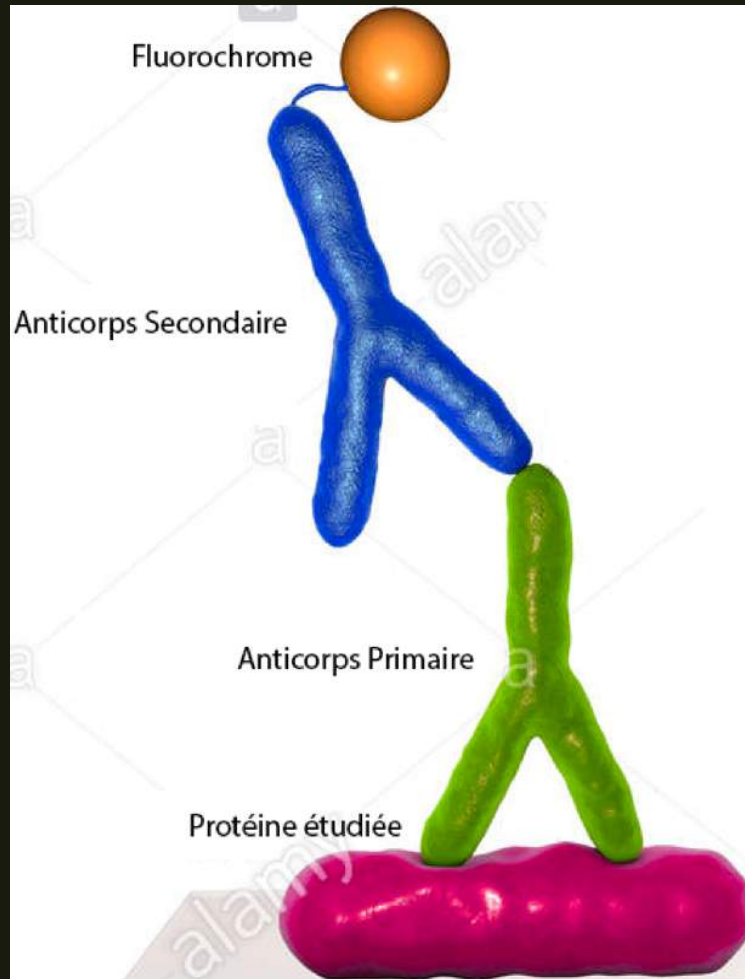


## g) La Fluorescence Induite

- La fluorescence induite = une molécule devient fluorescente quand elle se fixe à la molécule étudiée !

Hoechst et DAPI	Bromure d'Éthidium et Iodure de Propidium
Se fixent sur les bases A-T de l'ADN	Sont des <u>intercalants</u> de l'ADN= ils se fixent entre les brins d'ADN, <u>non-spécifiquement</u> .





## H) IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

- Il faut TOUJOURS que les anticorps PRIMAIRES ET SECONDAIRES SOIENT d'espèces DIFFÉRENTES !
- Dans le cas d'une immunofluorescence DOUBLE (avec 2 Anticorps Primaires ..) il faut TOUJOURS que les DEUX ANTICORPS PRIMAIRES SOIENT D'ESPÈCES DIFFÉRENTES ++
- Il est POSSIBLE de prendre DEUX ANTICORPS SECONDAIRES de la même espèce !

## QCM TIME !! ++++++

Dans le cas d'expérience de double immunofluorescence conduites avec des anticorps primaires de souris dirigés contre la protéine p53 et des anticorps primaires de lapin anti-myc, laquelle (ou lesquelles) de ces combinaisons d'anticorps secondaires est appropriée(s) pour visualiser séparément dans les mêmes cellules deux anticorps primaires :

- A) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à de la fluorescéine.
- B) Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la fluorescéine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à de la fluorescéine.
- C) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de chèvre couplés à de la fluorescéine.
- D) Anticorps de cheval anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la rhodamine et des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplés à de la fluorescéine.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses





*toi qui essaye de répondre au QCM*

Dans le cas d'expérience de double immunofluorescence conduites avec des anticorps primaires de souris dirigés contre la protéine p53 et des anticorps primaires de lapin anti-myc, laquelle (ou lesquelles) de ces combinaisons d'anticorps secondaires est appropriée(s) pour visualiser séparément dans les mêmes cellules deux anticorps primaires :

- A) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à de la fluorescéine.
- B) Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la fluorescéine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à de la fluorescéine.
- C) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de chèvre couplés à de la fluorescéine.
- D) Anticorps de cheval anti-immunoglobuline de lapin couplés à de la rhodamine et des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplés à de la fluorescéine.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses



Au cours de quel évènement historique fut crée le pancake ?

♦ A: En 1618, pendant la guerre des croissants au beurre

♦ B: En 1702, pendant le massacre du Saint Panini

♦ C: En 112, avant Céline Dion pendant la prise de la brioche

♦ D: La réponse D

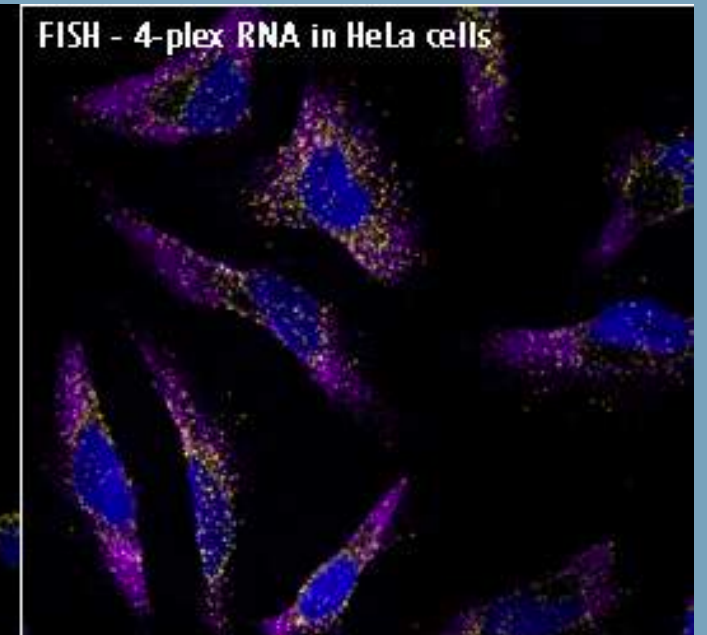
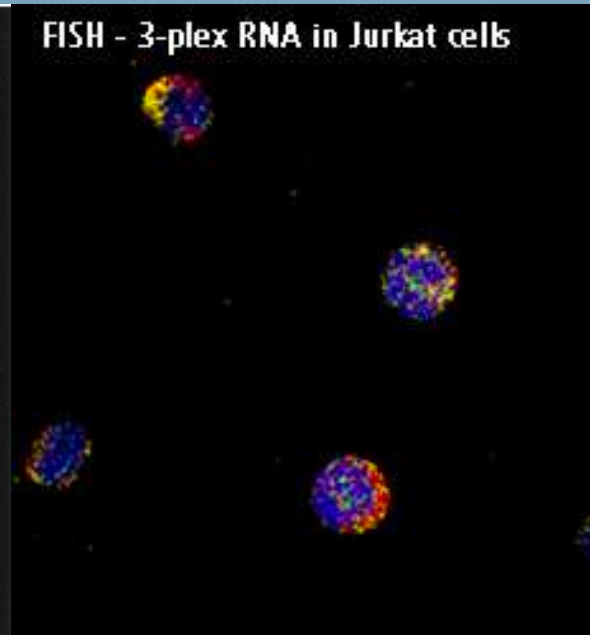
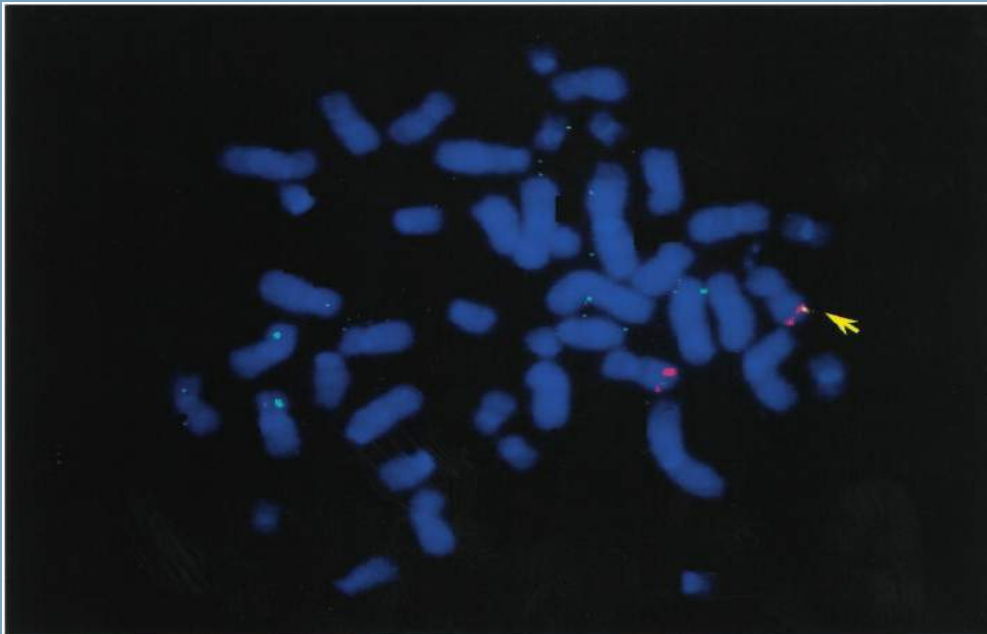


## i) L'hybridation in situ : le FISH

Permet de visualiser des acides nucléiques grâce à des sondes fluorescentes, spécifiques de certains gènes, soit de chromosomes entiers

3 étapes sont nécessaires:

- 1- Dénaturation
- 2- Hybridation
- 3-Révélation



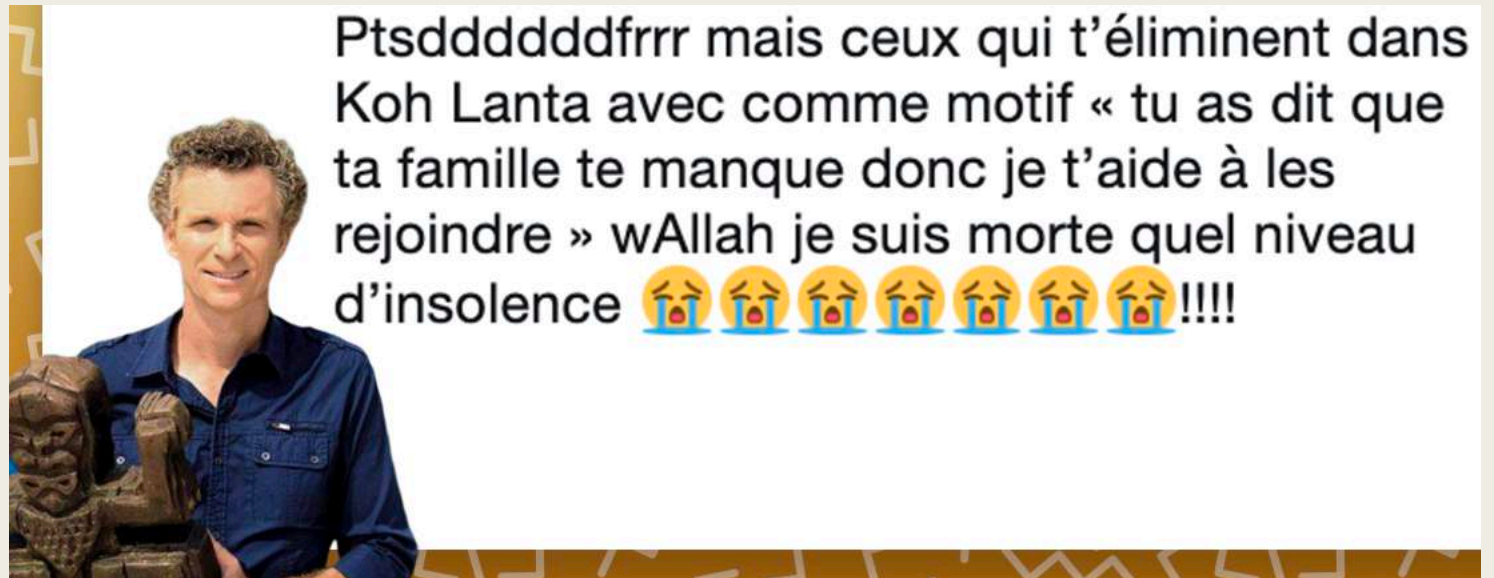
The background is a grayscale scanning electron micrograph (SEM) of a highly porous, interconnected network of fibers or cells, resembling a sponge or biological tissue. The structure consists of thick, irregular walls forming a complex lattice of open spaces. Some of these spaces contain smaller, more detailed structures, possibly cells or mineral deposits. The lighting creates strong shadows, emphasizing the three-dimensional nature of the porous structure.

# B- LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE



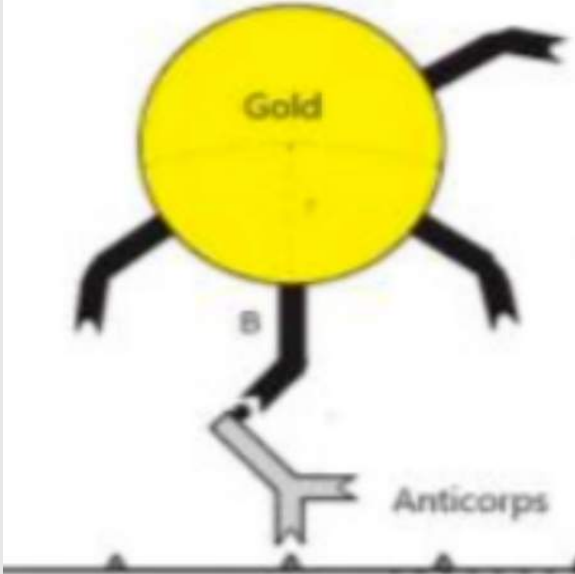
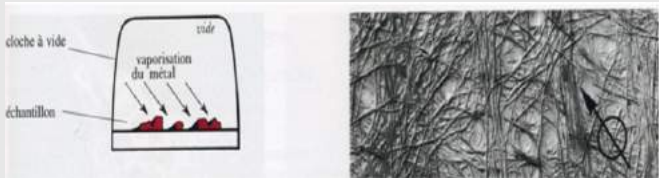
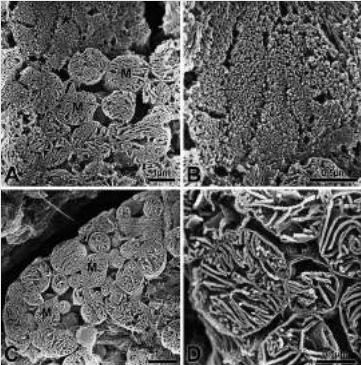
## 1- Le microscope électronique à transmission

- Un faisceau d'électrons qui traversent l'échantillon.
- Résolution de 0.2 nm !



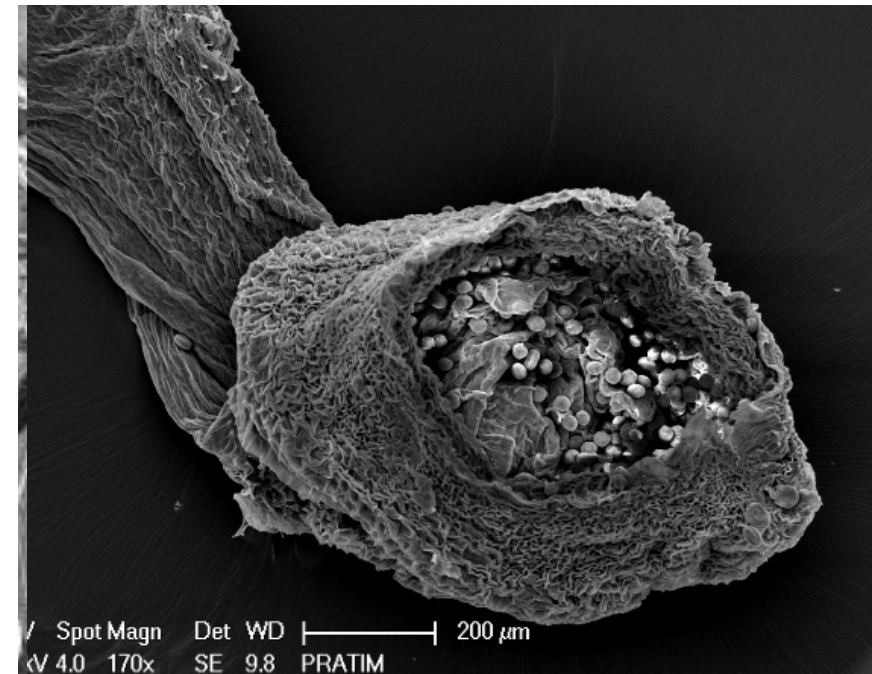


# 3 types de « coloration »

<u>Immunogold</u>	<u>Coloration par ombrage</u>	<u>Cryofracture/cryomicroscope</u>
<p>Nécessite la <u>fixation</u> au préalable de l'échantillon ++</p> <p><u>Repérer une protéine</u></p>  <p>The diagram illustrates the immunogold technique. A large yellow circle labeled 'Gold' is attached to a black Y-shaped structure labeled 'Anticorps' (antibody). The antibody is shown binding to a small red dot on a horizontal line representing the sample surface.</p>	<p>Nécessite la <u>fixation</u> au préalable de l'échantillon ++</p> <p>Visualisation indirecte du <u>relief de l'échantillon</u> via des métaux lourds</p>  <p>The left part of the image is a schematic diagram of the shadowing technique. It shows a 'cloche à vide' (vacuum bell) containing an 'échantillon' (sample) at the bottom. Arrows indicate 'vaporisation du métal' (metal evaporation) from the sample. The right part is a micrograph showing a textured surface with a shadow cast by a heavy metal, highlighting the relief of the sample.</p>	<p><b>Ne nécessite <u>PAS</u> la fixation au préalable de l'échantillon +++</b></p> <p>Technique utile car <u>limite les risques de dénaturation des cellules</u> ++</p>  <p>The image consists of four micrographs labeled A, B, C, and D, arranged in a 2x2 grid. They show various cellular structures, including membranes and organelles, captured in a frozen state, demonstrating the technique's ability to preserve cellular morphology without fixation.</p>

## 2- La Microscopie électronique à balayage

- Les électrons ne traversent pas les échantillons mais vont plutôt rebondir sur ces derniers.
- La résolution est cependant moins bonne : 10 nm ☹





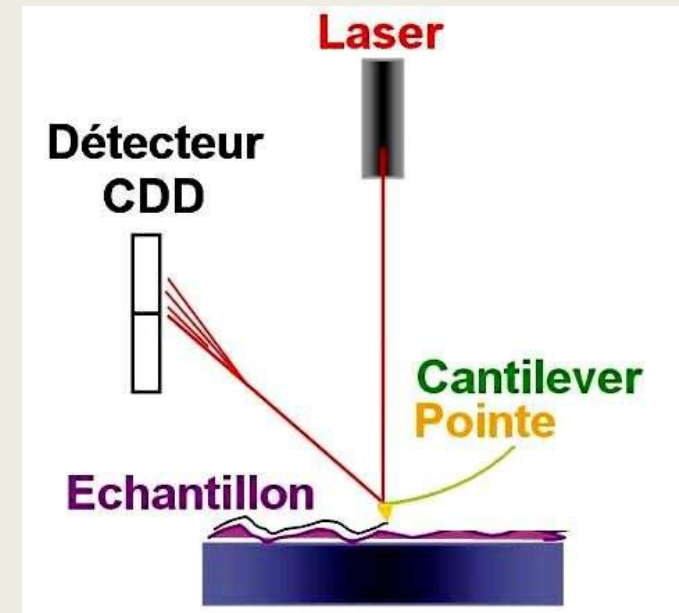
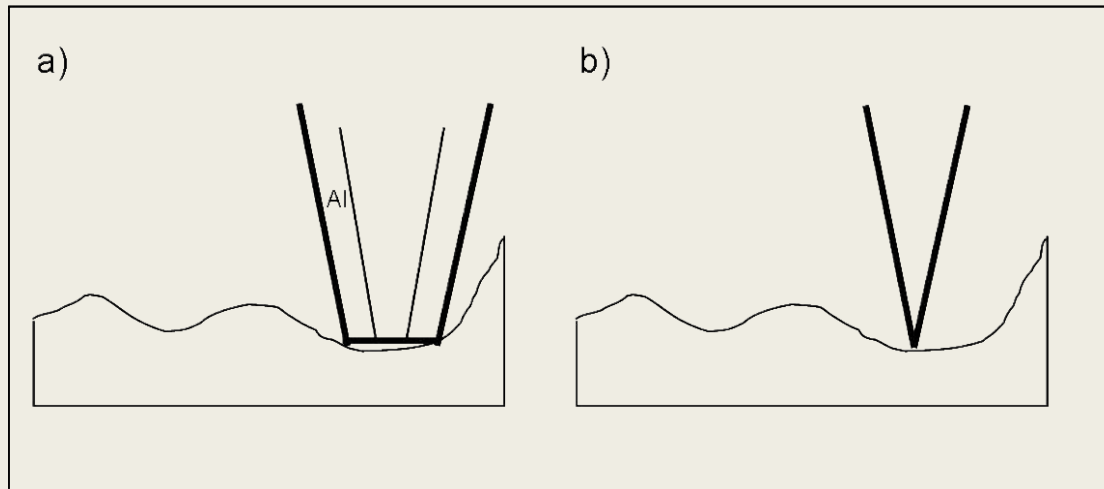


# III- LA MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE

(E) 144

(F) 93



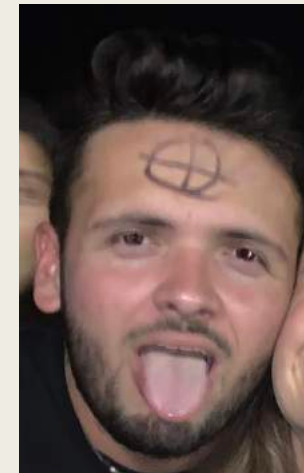


- Précision dictée par la taille de la pointe (« the tip is the limit » — Professor Gilson)
- L'échantillon n'a pas besoin d'être préparé/coloré, il peut même être *vivant*.

# Un autre petit QCM pour la route ...

On cherche à étudier la localisation cellulaire de la protéine GLUT. Pour cela on crée en laboratoire un gène hybride GLUT-GFP qu'on va ensuite transfecter dans la cellule. Après traduction, on observe une fluorescence au niveau de la membrane. Qu'en déduit-on par rapport à GLUT ?

- A) On ne peut pas interpréter cette expérience.
- B) On a démontré que GLUT s'exprime au niveau de la membrane
- C) Il faudrait davantage de manipulations pour démontrer l'expression membranaire de GLUT
- D) L'expérience suggère que GLUT s'exprime au niveau de la membrane
- E) Tout est faux.



On cherche à étudier la localisation cellulaire de la protéine GLUT. Pour cela on crée en laboratoire un gène hybride GLUT-GFP qu'on va ensuite transfecter dans la cellule. Après traduction, on observe une fluorescence au niveau de la membrane. Qu'en déduit-on par rapport à GLUT ?

- A) On ne peut pas interpréter cette expérience.
- B) On a démontré que GLUT s'exprime au niveau de la membrane
- C) Il faudrait davantage de manipulations pour démontrer l'expression membranaire de GLUT
- D) L'expérience suggère que GLUT s'exprime au niveau de la membrane
- E) Tout est faux.



# The last one ...

On cherche à étudier le mouvement d'un fibroblaste qui migre dans un tissu donné. Pour cela laquelle/lesquelles de ces techniques de microscopie va-t-on préconiser ?

- A) La microscopie électronique à balayage (MEB), du fait de l'obtention d'images en 3D.
- B) La microscopie optique conventionnelle.
- C) La microscopie à contraste de phase.
- D) La microscopie électronique à transmission, avec un coloration à l'immunogold.



*Moi qui vous regarde tomber dans mes petits pièges QCM*

On cherche à étudier le mouvement d'un fibroblaste qui migre dans un tissu donné. Pour cela laquelle/lesquelles de ces techniques de microscopie va-t-on préconiser ?

- A) La microscopie électronique à balayage (MEB), du fait de l'obtention d'images en 3D.
- B) La microscopie optique conventionnelle.
- C) La microscopie à contraste de phase.
- D) La microscopie électronique à transmission, avec une coloration à l'immunogold.