



BIOCELL TUT'RENTRÉE 2014-2015

- I. MICROSCOPIE OPTIQUE**
- II. FLUORESCENCE**
- III. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**
- IV. MICROSCOPIE A FORCE
ATOMIQUE**

3 TYPES DE MICROSCOPIE

- ◉ **MICROSCOPIE OPTIQUE**
- ◉ **MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**
- ◉ **MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE**

I. LA MICROSCOPIE OPTIQUE

- Résolution : **200 nm**
- Observation des cellules et des organites
- Pas d'information **directe** sur les molécules
- Observation de tissus **fixés, rigidifiés, coupés et colorés** → **mort**

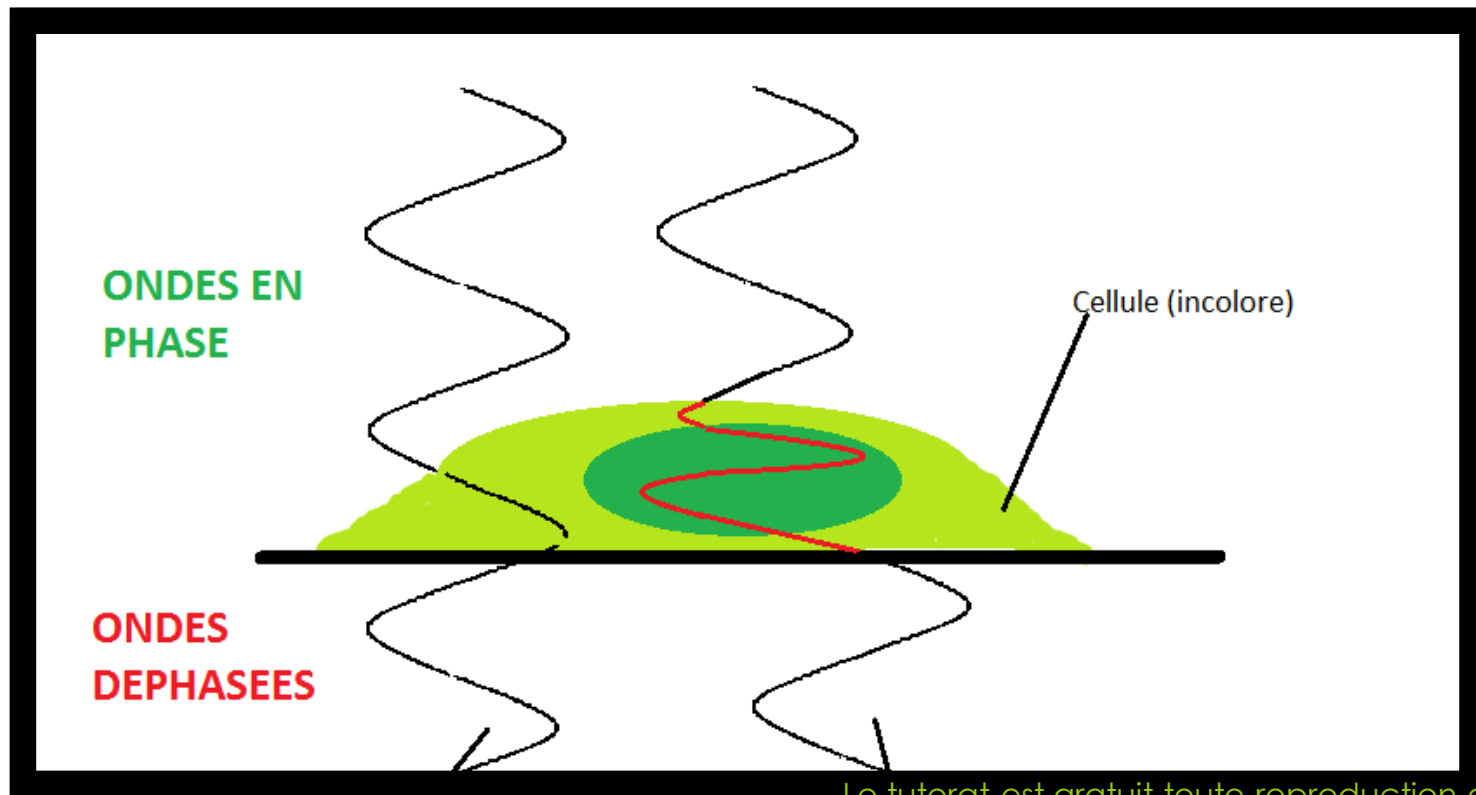
Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

I. LA MICROSCOPIE OPTIQUE

Il existe plusieurs types de microscopie optique:

- A. Microscopie à contraste de phase**
- B. Microscopie à fluorescence**
- C. Microscopie confocale**
- D. Microscopie optique à super résolution**

A. Microscopie à contraste de phase



Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

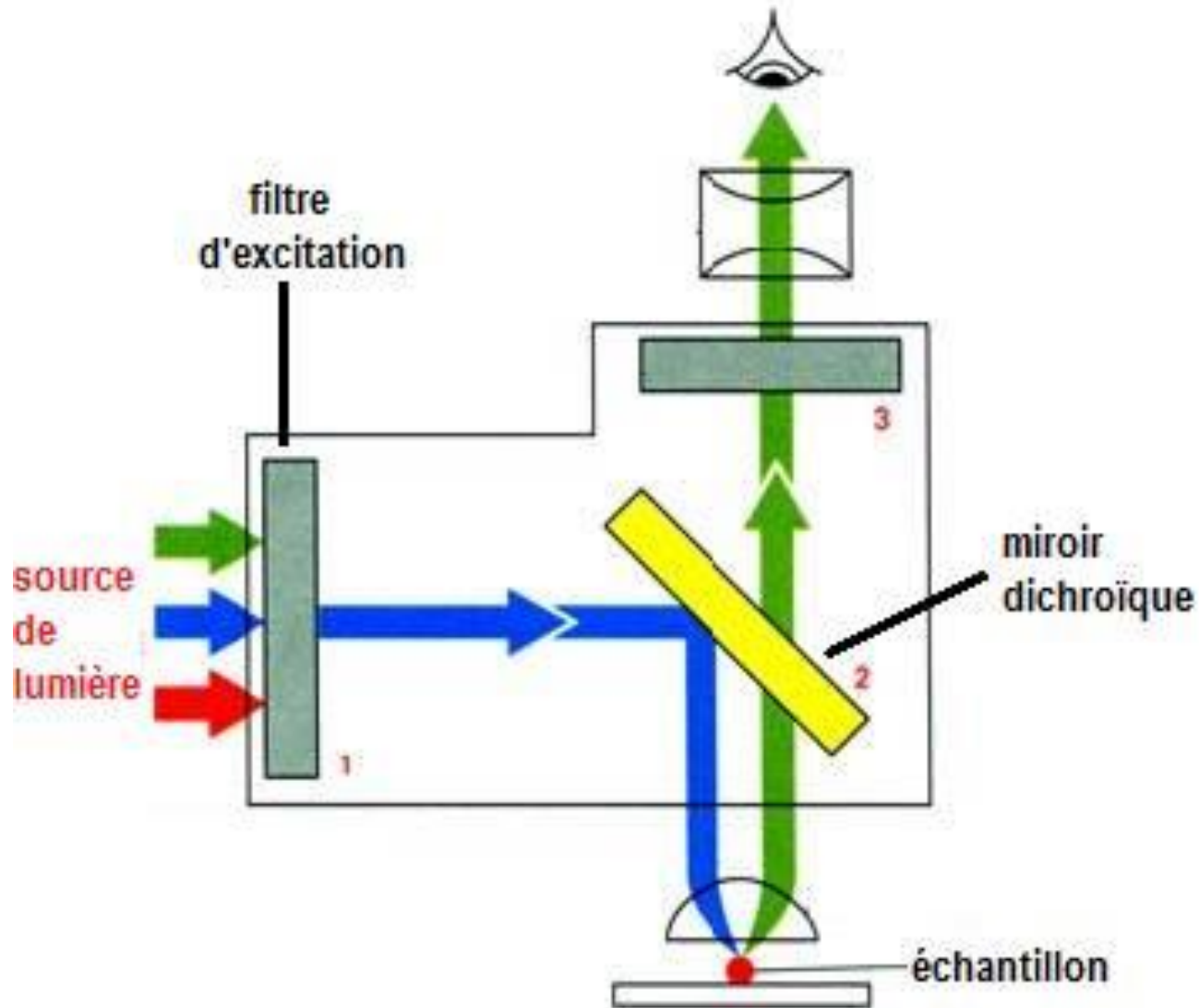
A. Microscopie à contraste de phase

- On utilise les **propriétés de réfraction** de l'échantillon
- Le microscope **augmente le déphasage** en retardant la lumière déphasée par rapport à la lumière non déphasée.
- Images **moins brillantes** mais **plus contrastées** (plus de détails)
- **NE TUE PAS LES CELLULES +++**
- **Microscopie time lapse**

B. Microscopie à fluorescence

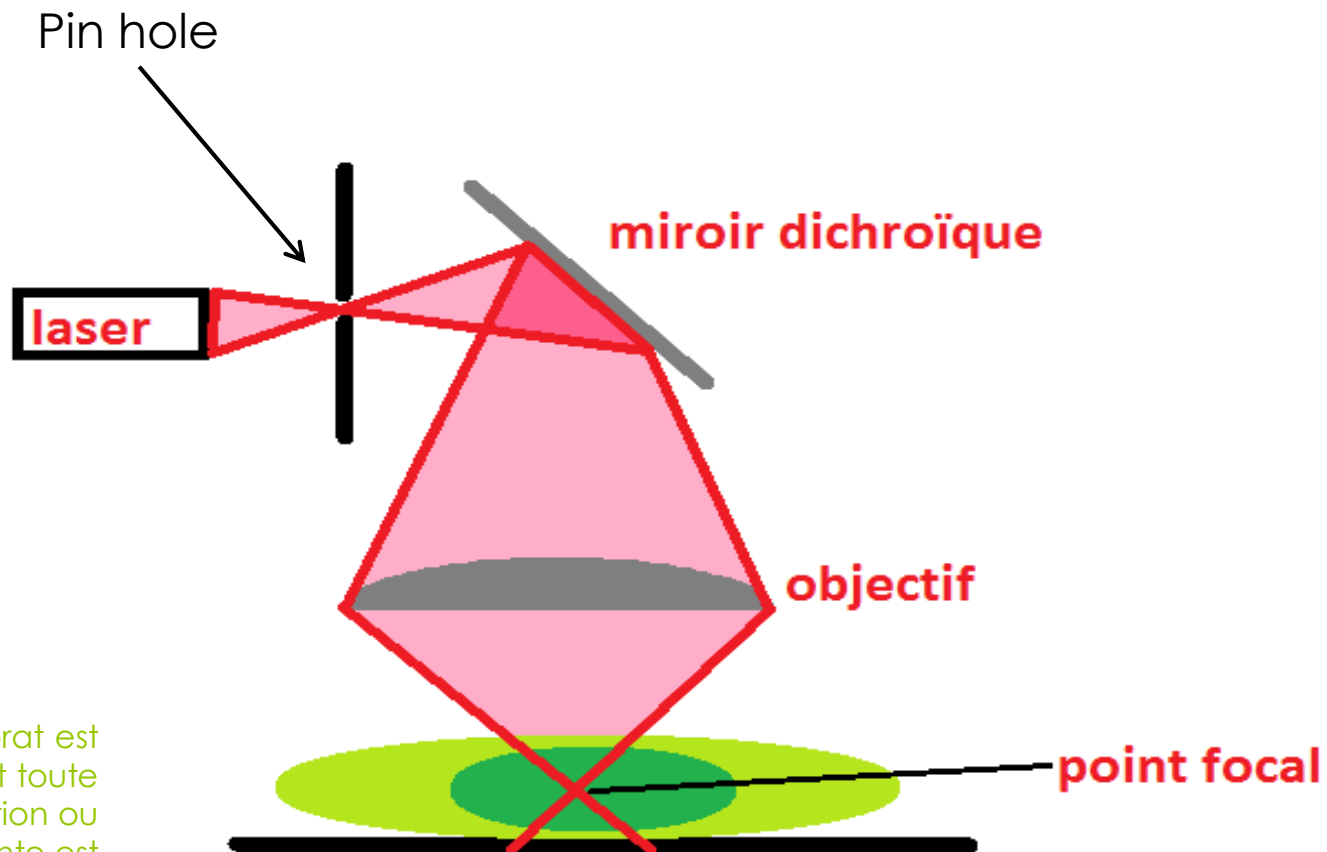
- **Observation de molécules** de manière **indirecte** en leur greffant des **fluorochromes**

B. Microscopie à fluorescence



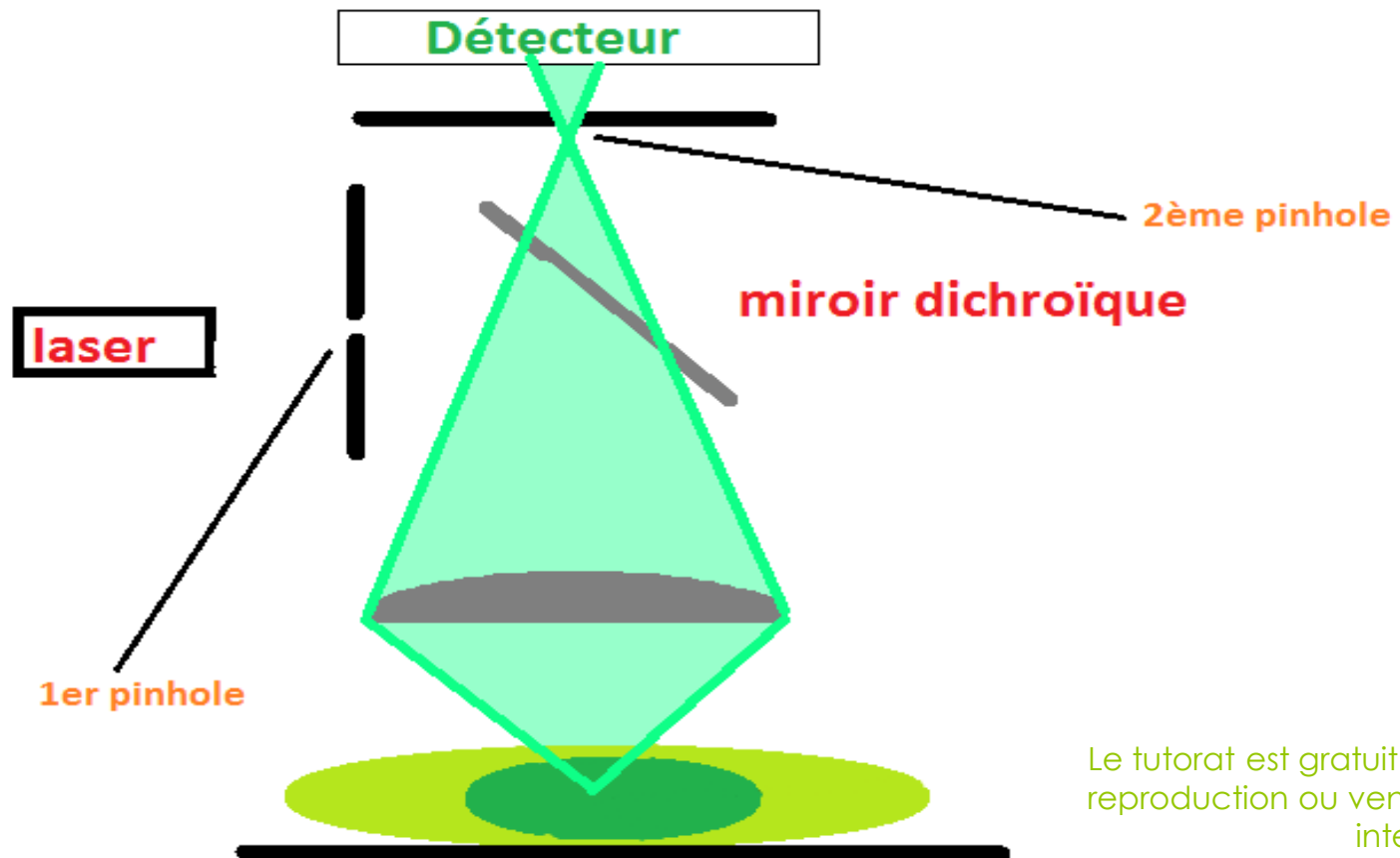
Le tutorat est
gratuit toute
reproduction
ou vente est
interdite.

C. Microscopie confocale



Le tutorat est
gratuit toute
reproduction ou
vente est
interdite.

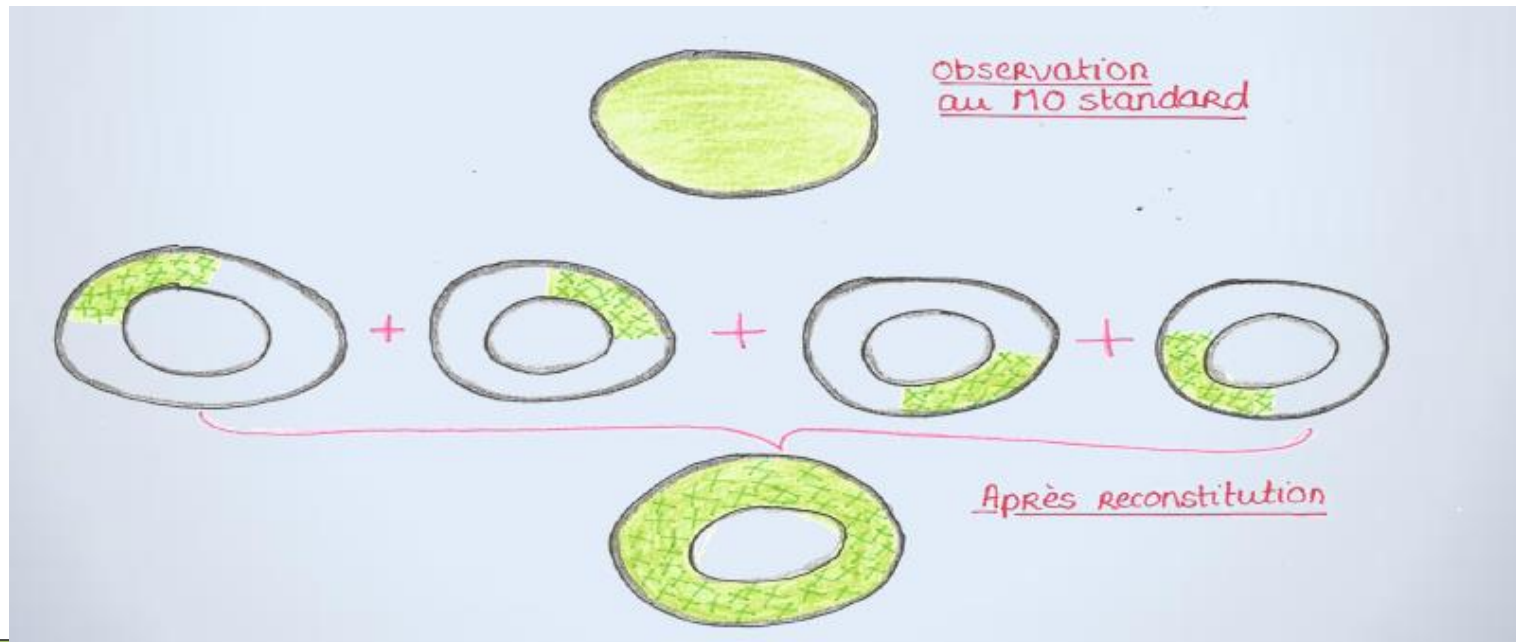
C. Microscopie confocale



Le tutorat est gratuit toute
reproduction ou vente est
interdite.

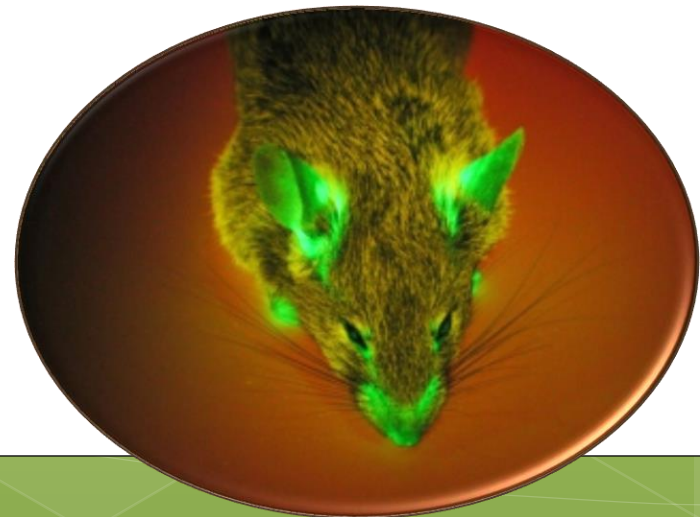
D. Microscopie optique à super résolution

- Repose sur **l'excitation séquentielle** de plusieurs fluorochromes.
- **Amélioration de la résolution**



II. LA FLUORESCENCE

- Permet la visualisation indirecte de molécules en microscopie optique
- Un **fluorochrome** absorbe l'énergie lumineuse et émet une fluorescence d'**énergie plus faible** et de **longueur d'onde plus grande**.



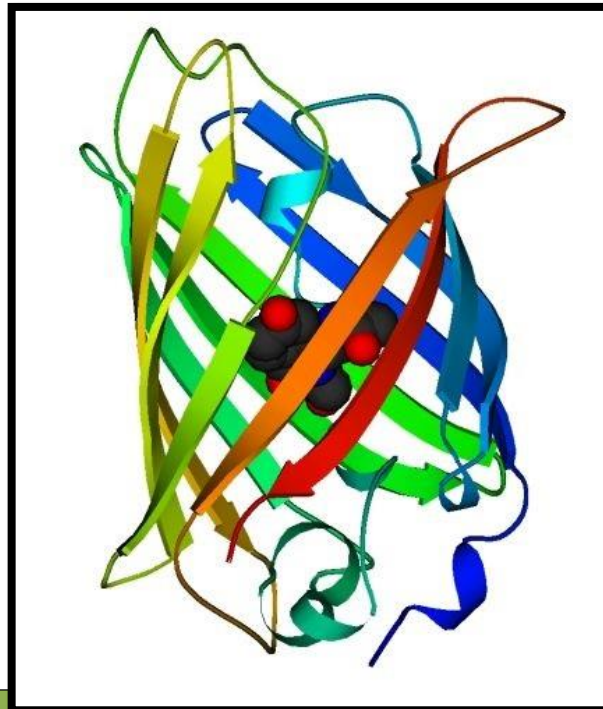
Exemples de fluorochromes

LA GFP

- Protéine de méduse naturellement fluorescente
- Absorbe dans le **BLEU** et émet dans le **VERT**
- Possibilité de l'exprimer dans n'importe quelle cellule

Exemples de fluorochromes

- Forme d'un **tonneau** avec au milieu **3 acides aminés responsables de la fluorescence : le chromophore**



Le tutorat est gratuit
toute reproduction
ou vente est
interdite.

Exemples de fluorochromes

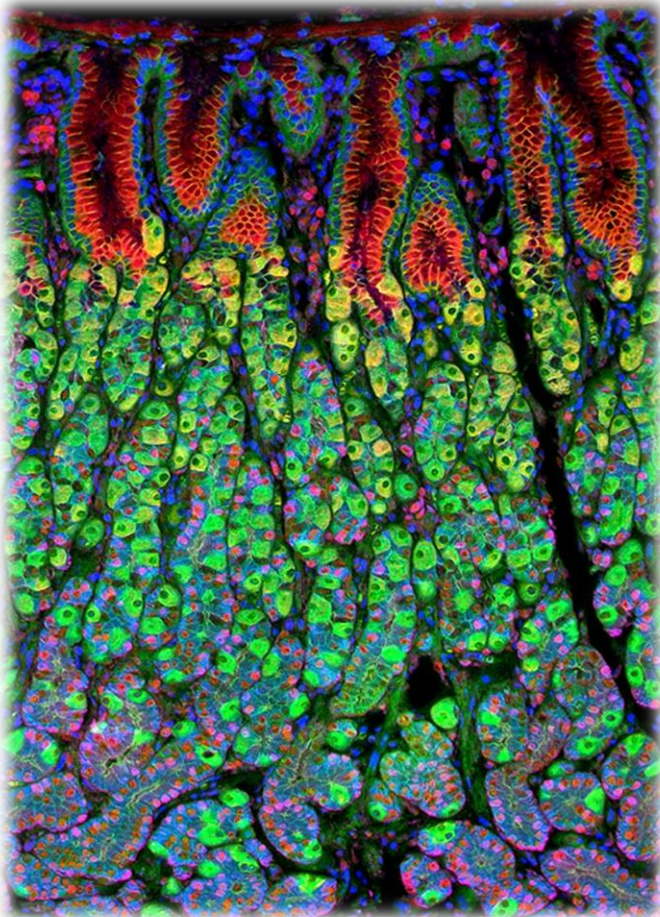
Rhodamine

- Absorbe dans le **VERT** et émet dans le **ROUGE**

Fluorescéine

- Absorbe dans le **BLEU** et émet dans le **VERT** (comme la GFP)

Comment introduire un fluorochrome dans une cellule?



Plusieurs méthodes:

- La microinjection
- L'électroporation
- La vectorisation par vésicules
- L'expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

Comment introduire un fluorochrome dans une cellule?

La micro injection



- Injection cellule par cellule à l'aide d'une micropipette en verre
- Méthode longue et fastidieuse

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

Comment introduire un fluorochrome dans une cellule?

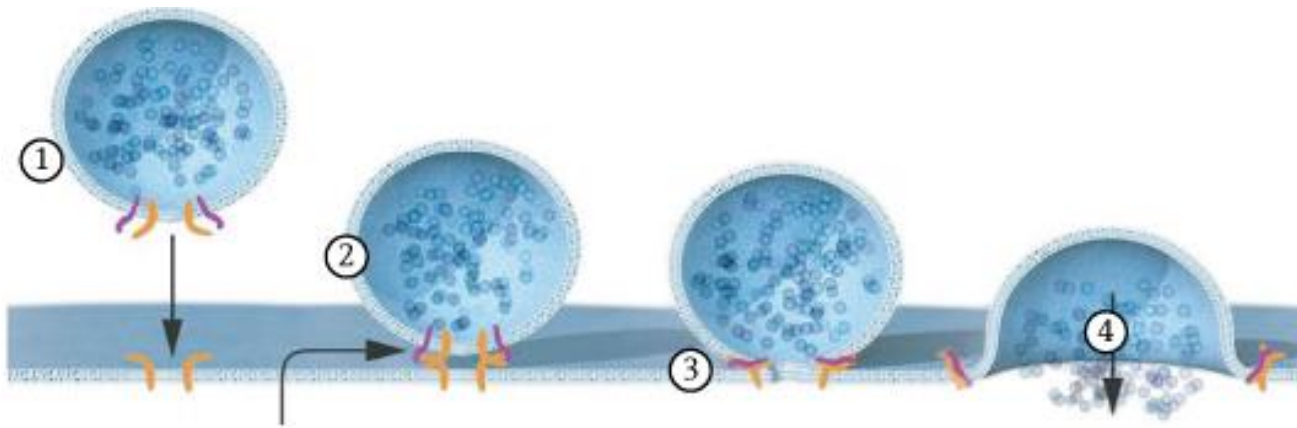
L'électroporation



- Choc électrique → trous transitoires dans la membrane plasmique → entrée des fluorochromes
- Méthode traumatisante

Comment introduire un fluorochrome dans une cellule?

La vectorisation par vésicule



- Vésicules remplies de fluorochromes
- Fusion avec la membrane plasmique
→ contenu déversé dans la cellule

Comment introduire un fluorochrome dans une cellule?

Expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

- On greffe la **séquence de la GFP** au gène de la protéine que l'on souhaite étudier
- On introduit ce **gène hybride** dans une cellule: c'est la **transfection**
- Ce gène sera transcrit dans la cellule en **protéine fluorescente**
- On pourra suivre la **localisation** de la protéine grâce à cette fluorescence

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

DIFFERENCE DÉMONSTRER/SUGGÉRER

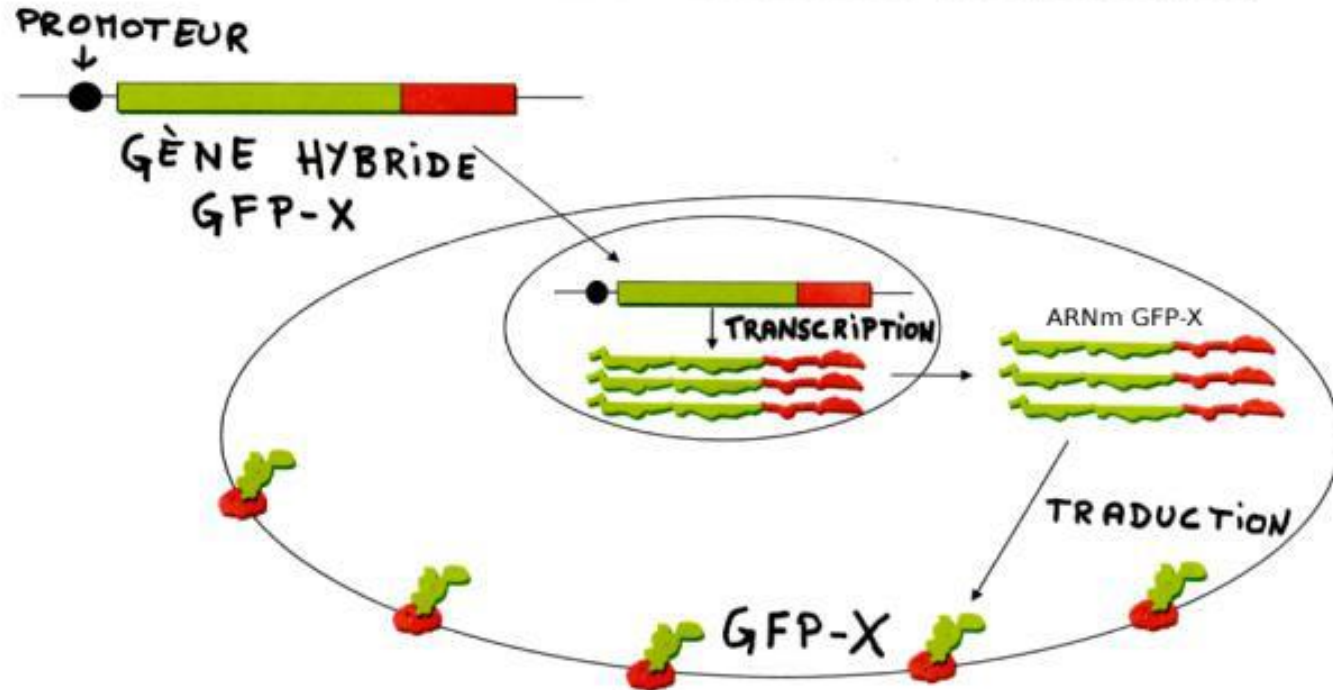


Le tutorat est gratuit toute reproduction ou
vente est interdite.

DIFFERENCE DÉMONTRER/SUGGÉRER

- **Démontrer**: il n'y a pas d'autre interprétation possible
- **Suggérer**: c'est l'interprétation la plus plausible mais ce n'est pas la seule possibilité

Etude de la localisation cellulaire d'une protéine X



La fluorescence est membranaire : suggestion forte que la protéine X est membranaire

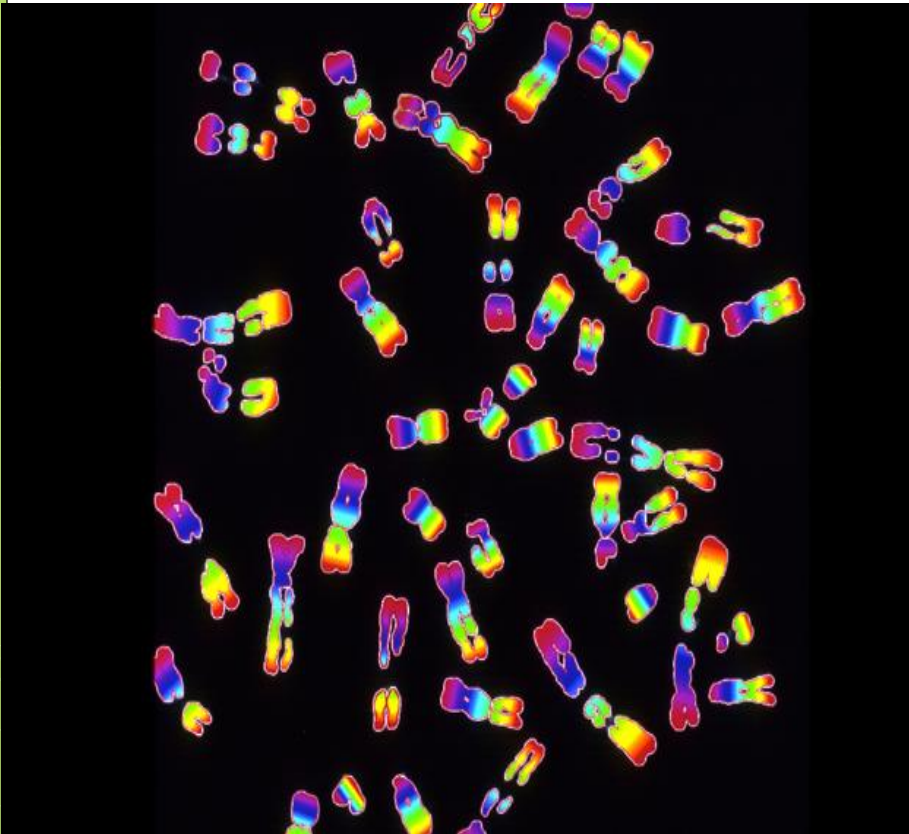
On **suggère** que la protéine X est membranaire

On **démontre** que la protéine GFP-X est membranaire

(le comportement de la protéine X peut avoir été changé car elle est couplée à la GFP)

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

LES APPLICATIONS DE LA FLUORESCENCE



- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)
- FLIP (Fluorescence loss in photobleaching)
- Fluorescence induite
- Immunofluorescence indirecte
- FISH (fluorescence in situ hybridization)

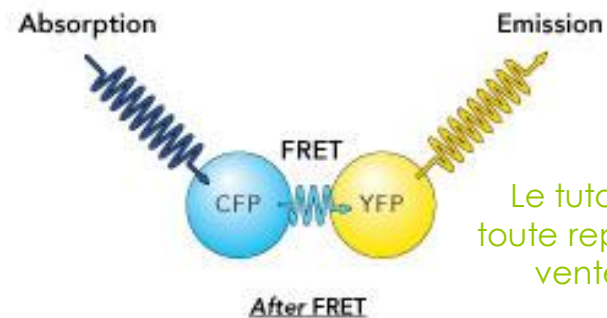
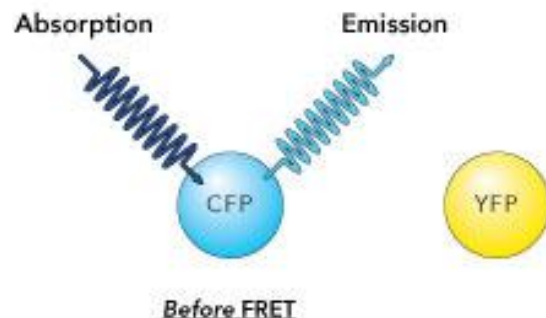
Le tutorat est gratuit
toute reproduction ou
vente est interdite.

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

- Permet l'étude des **interactions intermoléculaires** et **intramoléculaires**
- Transfert d'énergie **non radiatif** d'une molécule à une autre.

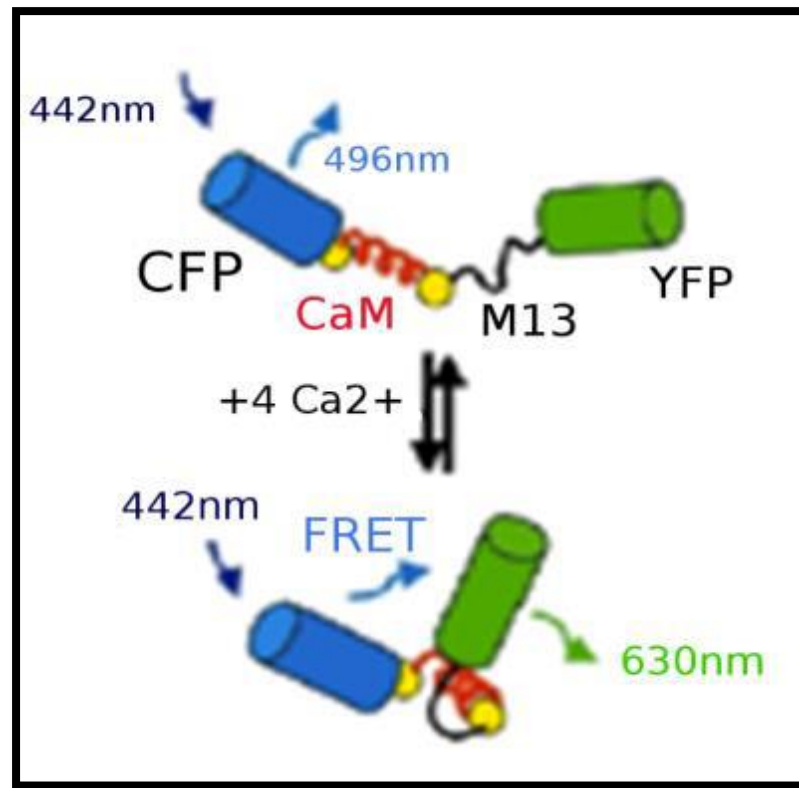
FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

- On greffe des fluorochromes aux molécules à étudier
- On excite le premier fluorochrome qui excitera à son tour le second
- 2 conditions : **distance < 10 nm** et **chevauchement des spectres** d'émission du donneur et d'absorption du receveur



Le tutorat est gratuit
toute reproduction ou
vente est interdite.

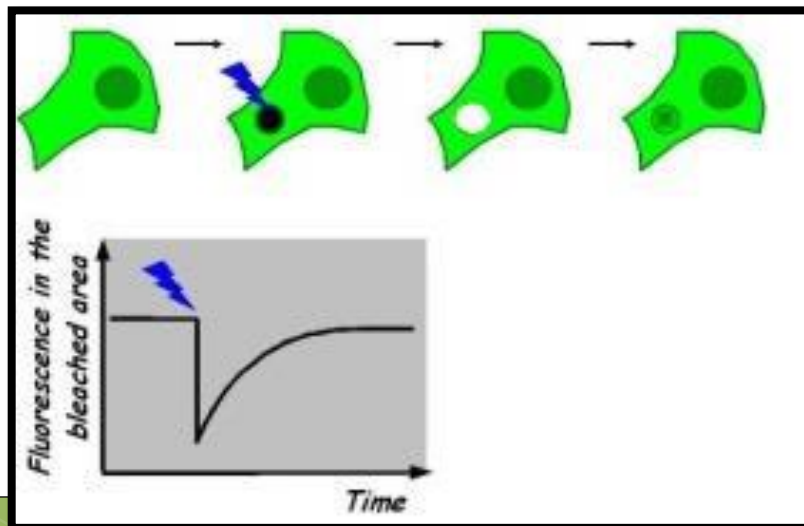
Exemple de FRET intramoléculaire: la sonde calcique « caméléon »



Le tutorat est
gratuit toute
reproduction ou
vente est interdite.

FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)

- Technique de **photoblanchiment**
- **Irradiation** d'une zone précise de la cellule → **perte de la fluorescence**
- On observe le **retour de la fluorescence** dans cette zone



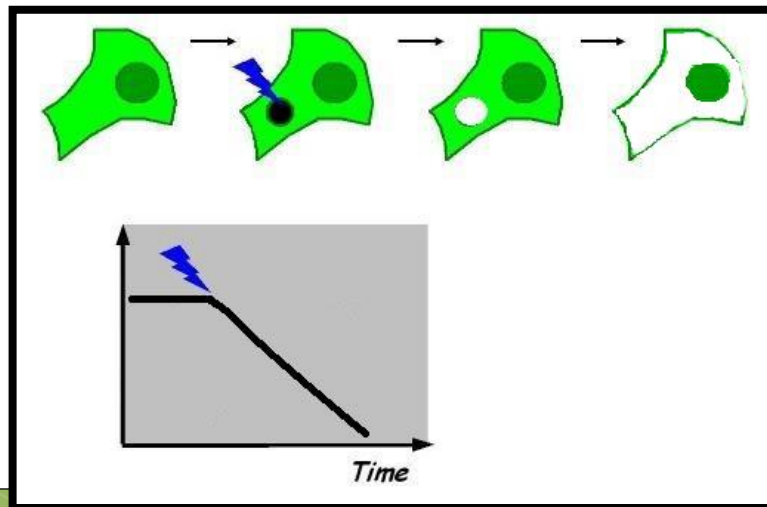
On étudie la
mobilité des
molécules dans la
cellule

Le tutorat est gratuit
toute reproduction
ou vente est
interdite.

FLIP

(Fluorescence loss in photobleaching)

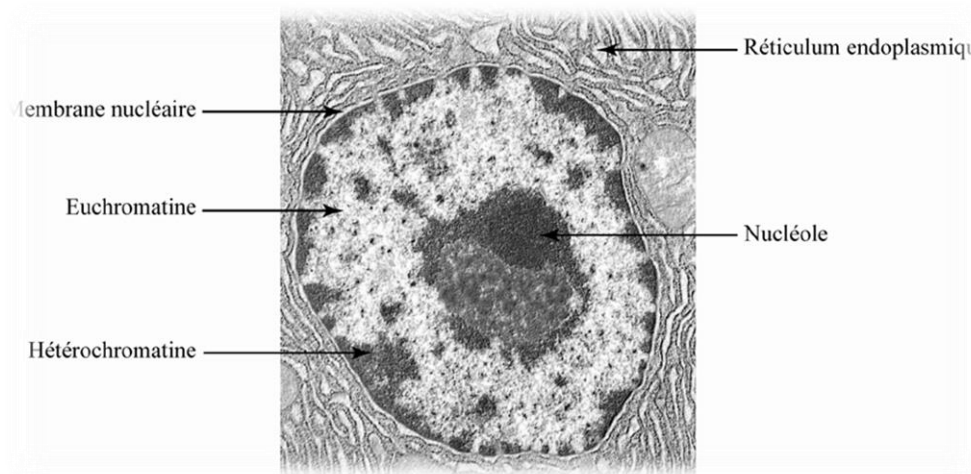
- Technique de **photoblanchiment**
- On **irradie** une zone **en continue**
- On observe la **disparition de la fluorescence** dans une **autre zone** que celle photoblanchie.



On mesure la
vitesse de
déplacement
des molécules
fluorescentes
d'une zone à
une autre

La fluorescence induite

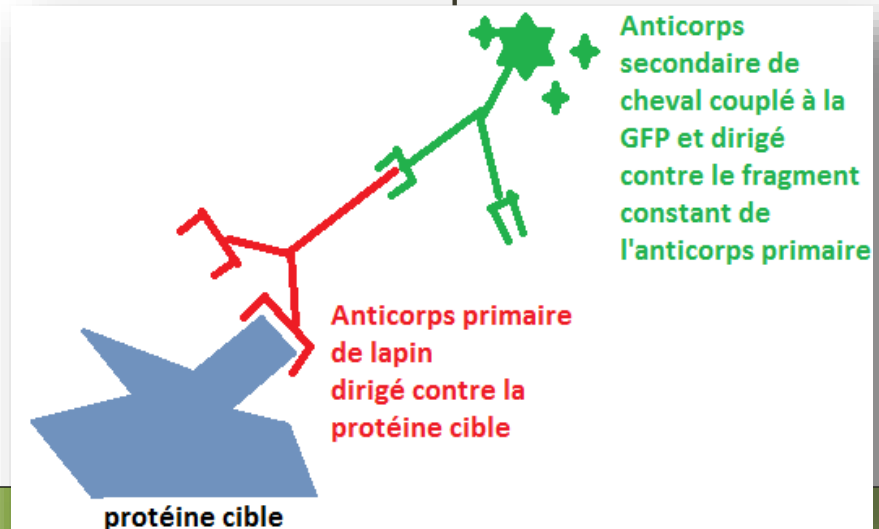
- Fluorescence **non intrinsèque** à la molécule
- Visualisation des acides nucléiques (ADN, ARN)



- Hoescht & DAPI se fixent sur les paires de bases A-T
- Les intercalants se mettent entre les 2 brins d'ADN (peu importe la séquence)

L'immunofluorescence indirecte

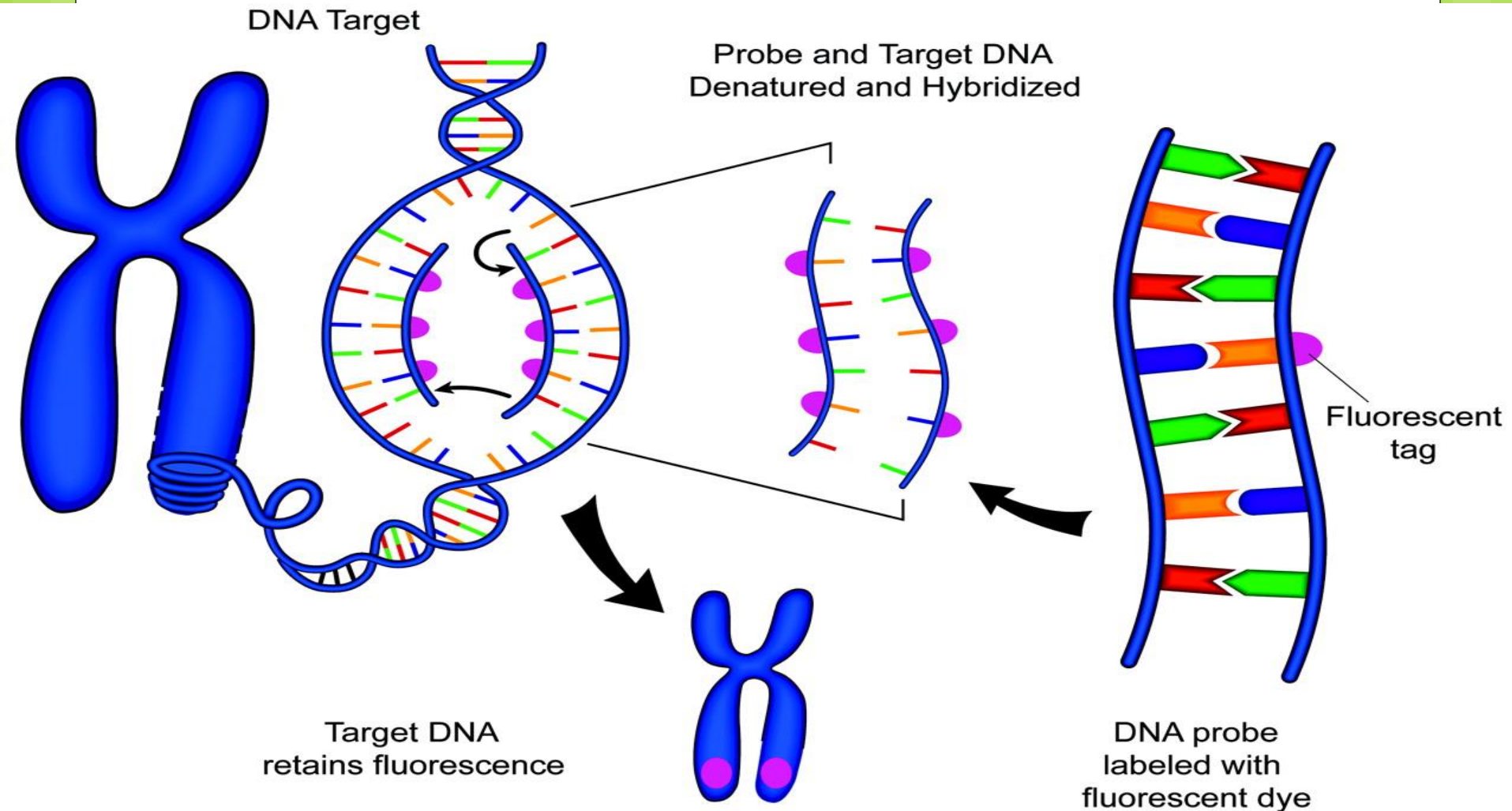
- La protéine joue le rôle de l'antigène
- On utilise des **anticorps monoclonaux**
- **Anticorps primaires**: reconnaissent la protéine
- **Anticorps secondaires**: reconnaissent les anticorps primaires et sont couplés à des fluorochromes



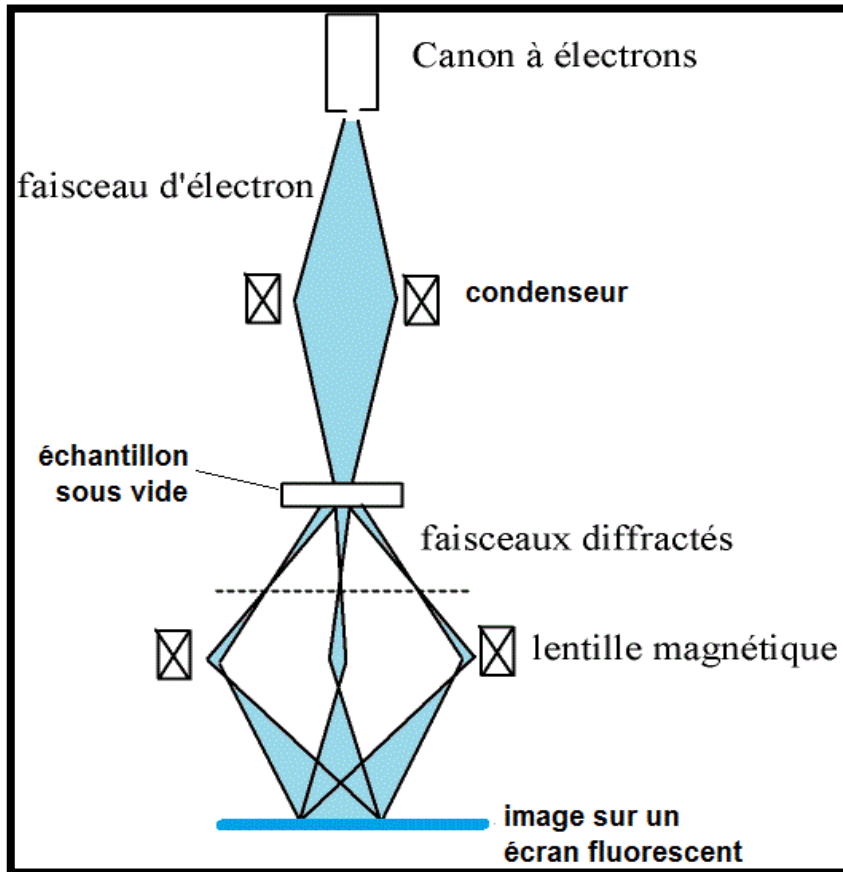
L'immunofluorescence indirecte

- **Attention! Pour localiser 2 protéines à la fois:**
- 2 **anticorps primaires** d'espèces différentes
- 2 **anticorps secondaires** d'espèces différentes
- Les anticorps primaires et secondaires ne peuvent pas être de la même espèce.
- Les **fluorochromes** des 2 anticorps secondaires doivent émettre dans des couleurs différentes.

FISH (fluorescence in situ hybridization)



III. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE



- **Résolution : 0,2 nm**
- Echantillon **fixé, déshydraté**, inclus en **résine** d'Epoxy
- Utilisation **d'agents de contrastes**

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

III. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Plusieurs types de microscopie électronique:

A. Microscopie électronique à transmission

B. Microscopie électronique à balayage

A. Microscopie électronique à transmission

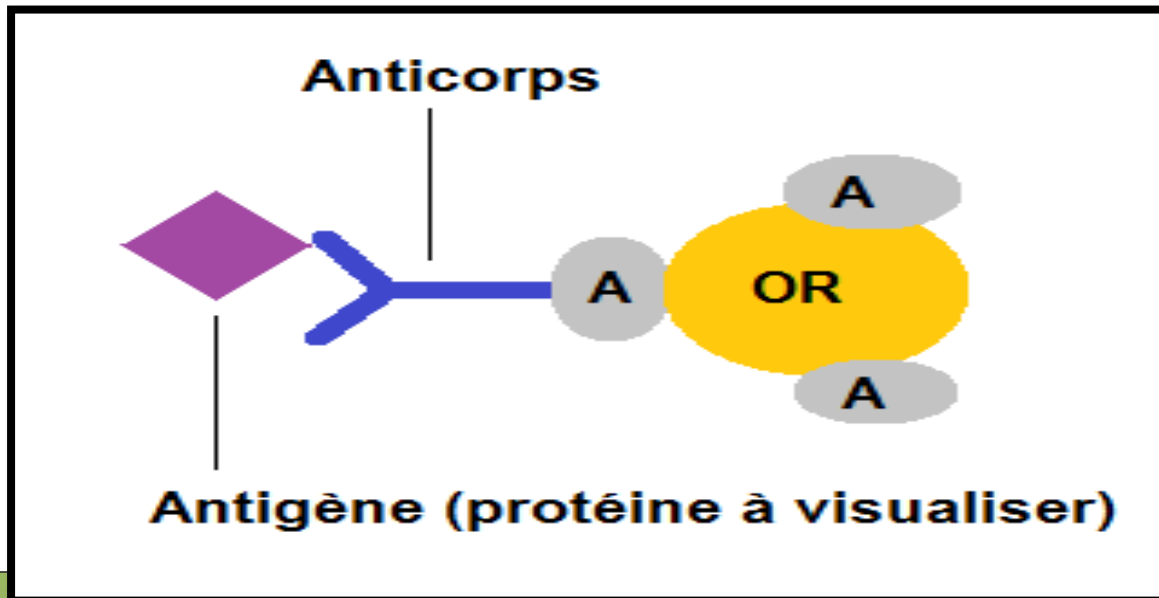
- Les **électrons traversent l'échantillon**
- **Contrastes** entre zones perméables et non perméables aux électrons.

Il existe des techniques spécialisées:

- **Marquage à l'or**
- **Ombrage**
- **Cryomicroscopie**

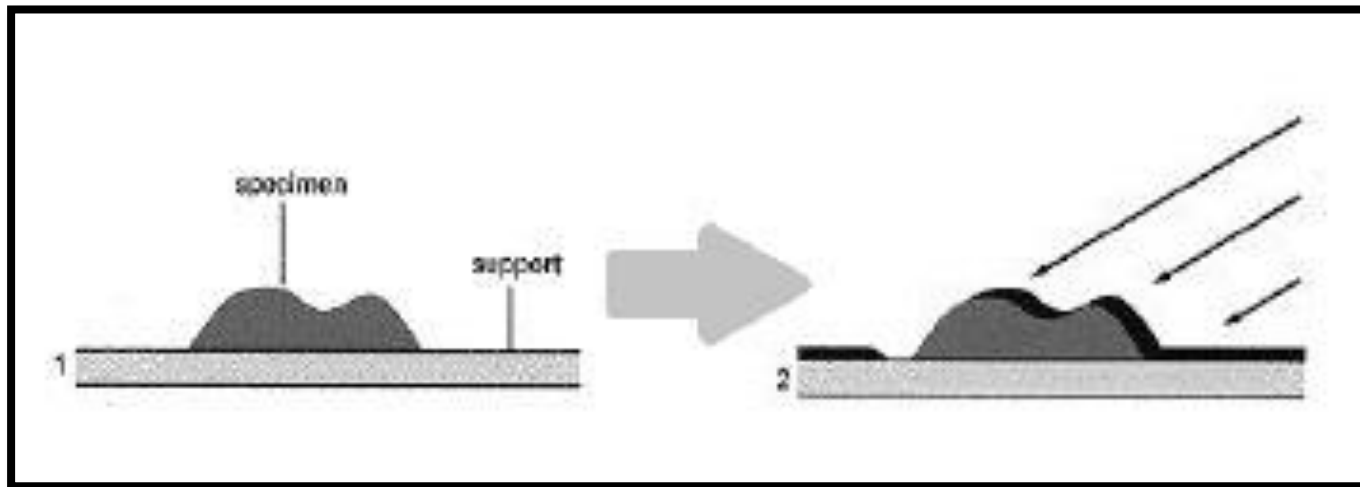
Marquage à l'or

- L'or ne laisse pas passer les électrons
- Permet de **marquer spécifiquement des molécules**
- **Anticorps** dirigés contre la protéine à visualiser
- **Protéine A couplée à l'or**



Ombrage

- Echantillon bombardé de **métaux lourds**
- Réalisation d'une **réplique en métal** de l'échantillon
- On **dissout** l'objet
- **Visualisation indirecte** de l'échantillon
- Les électrons ne **traversent pas**



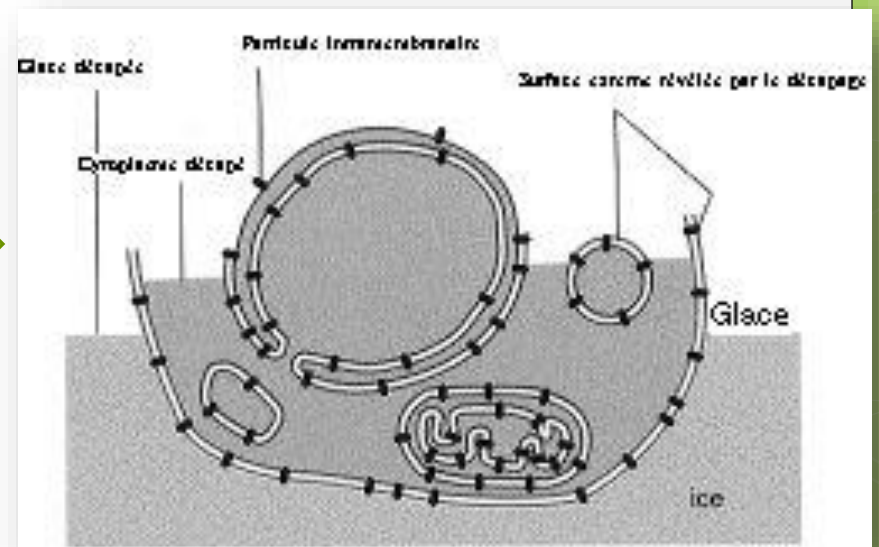
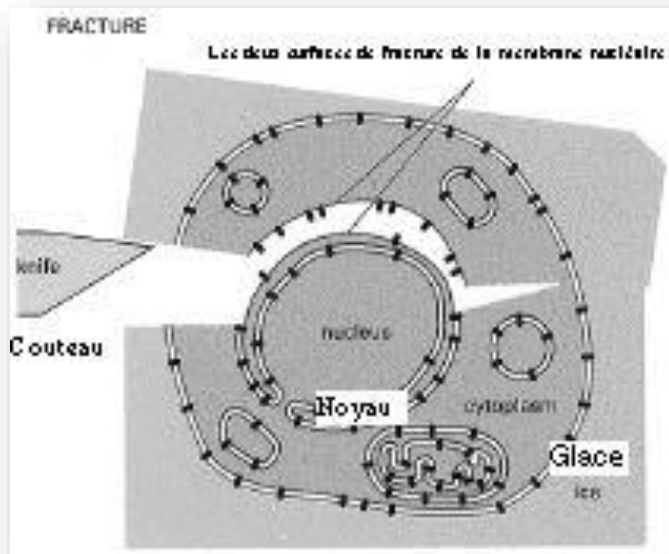
Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

La cryomicroscopie

- Échantillon **congelé**
- **Fracturé sous vide (cryofracture)**
- On passe au **couteau entre les 2 feuillets** de la membrane plasmique
- Sublimation de la couche superficielle de glace → **augmente les reliefs**
- Vaporisation d'une fine couche de **platine** et de **carbone** → on obtient une **réplique (augmente les contrastes)**
- On **dissout** l'objet

La cryomicroscopie

- Bonne résolution
- Technique de choix pour l'étude des **reliefs** des organites et des membranes



Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

B. Microscopie électronique à balayage

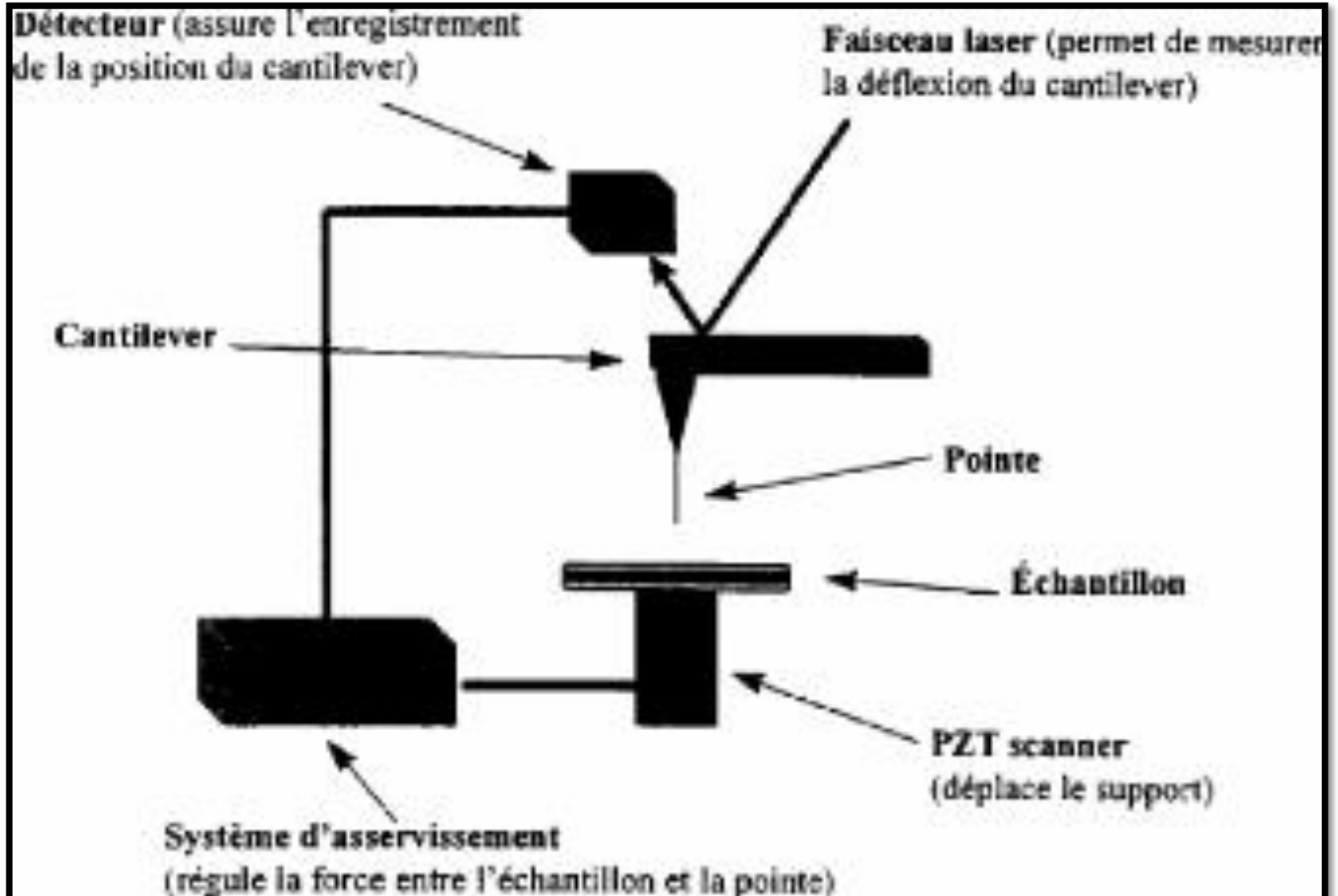
- Résolution un peu **moins bonne: 10nm**
- Visualisation de la **surface** des cellules et des tissus
- Les électrons sont **réfléchis** à la surface de l'échantillon
- On recueille les **électrons secondaires**
- Permet de travailler sur des **échantillons vivants**

IV. MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

- ◉ **Image directe** de l'échantillon à l'échelle **atomique**
- ◉ Permet de mesurer des **volumes**
- ◉ Peut être utilisée en **phase liquide**
- ◉ Ne nécessite **pas de coloration**
- ◉ **Non destructive !**
- ◉ On balaye l'échantillon avec une **pointe très fine**
- ◉ Relief enregistré grâce à un **dispositif laser**
- ◉ **Résolution égale ou supérieure à la microscopie électronique**

Le tutorat est
gratuit toute
reproduction
ou vente est
interdite.

Plus la pointe est fine, plus la résolution sera bonne



QCM

A propos de la microscopie optique :

- A) Sa résolution est de 200 nm
- B) Elle permet l'observation directe à l'échelle moléculaire
- C) La microscopie confocale est une technique de microscopie optique
- D) Elle repose sur l'utilisation d'une pointe très fine qui balaye l'échantillon
- E) Toutes les propositions sont fausses

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

QCM

A propos de la microscopie optique :

- A) Sa résolution est de 200 nm
- B) Elle permet l'observation directe à l'échelle moléculaire
- C) La microscopie confocale est une technique de microscopie optique
- D) Elle repose sur l'utilisation d'une pointe très fine qui balaye l'échantillon
- E) Toutes les propositions sont fausses

QCM

A propos de la fluorescence :

- A) La GFP émet dans le bleu
- B) Un fluorochrome est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission
- C) Le FRET est une application de la fluorescence
- D) Le FLIP est une application de la fluorescence
- E) Toutes les propositions sont fausses

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou
vente est interdite.

QCM

A propos de la fluorescence :

- A) La GFP émet dans le bleu
- B) Un fluorochrome est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission**
- C) Le FRET est une application de la fluorescence**
- D) Le FLIP est une application de la fluorescence**
- E) Toutes les propositions sont fausses

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou
vente est interdite.

QCM

A propos de la microscopie électronique :

- A) Sa résolution est de 200 nm
- B) Le marquage à l'or permet de marquer spécifiquement des molécules
- C) La microscopie électronique à balayage a une meilleure résolution que la microscopie électronique en transmission
- D) Dans la technique d'ombrage, les électrons traversent toujours l'échantillon
- E) Toutes les propositions sont fausses

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

QCM

A propos de la microscopie électronique :

- A) Sa résolution est de 200 nm
- B) Le marquage à l'or permet de marquer spécifiquement des molécules**
- C) La microscopie électronique à balayage a une meilleure résolution que la microscopie électronique en transmission
- D) Dans la technique d'ombrage, les électrons traversent toujours l'échantillon
- E) Toutes les propositions sont fausses

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou vente est interdite.

THE END

Le tutorat est gratuit toute reproduction ou
vente est interdite.