BIOLOGIE CELLULAIRE

TUT RENTREE 2017
COURS 1

METHODE D'ETUDE DE LA CELLULE
LA MICROSCOPIE

Il existe 3 grands types de microscopie :

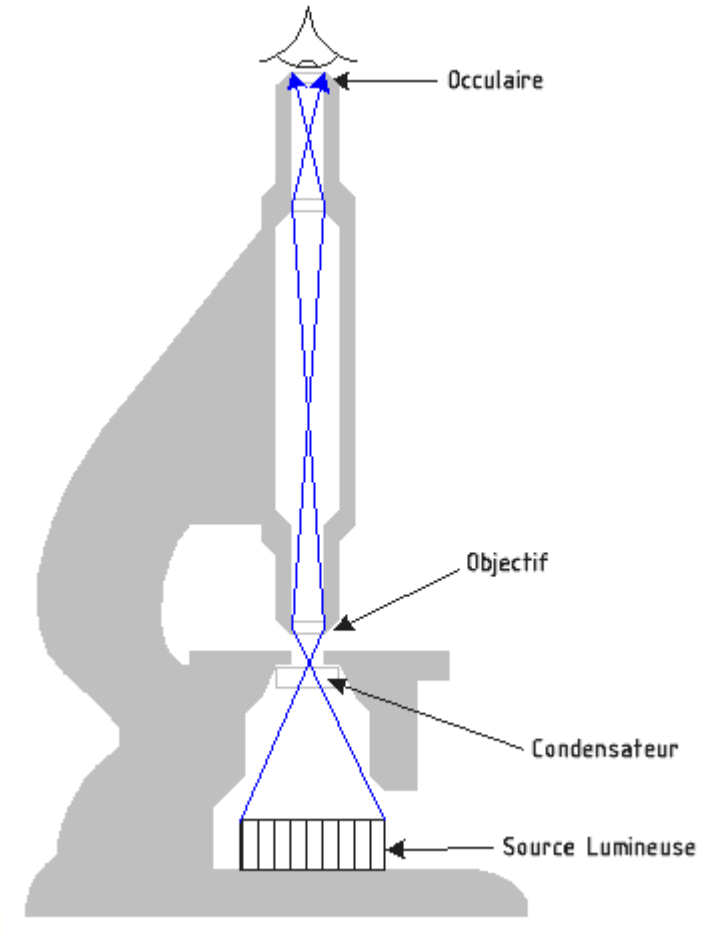
- Microscopie optique (=photonique)
- Microscopie électronique
- Microscopie atomique.

- **Définition** : La résolution est la capacité de distinguer deux objets côte à côte.

I. La microscopie optique (photonique)

A) Généralités

Fonctionnement d'un microscope optique :



Résolution : 200nm

PREPARATION DES ECHANTILLONS A OBSERVER **PAR MICROSCOPIE OPTIQUE**

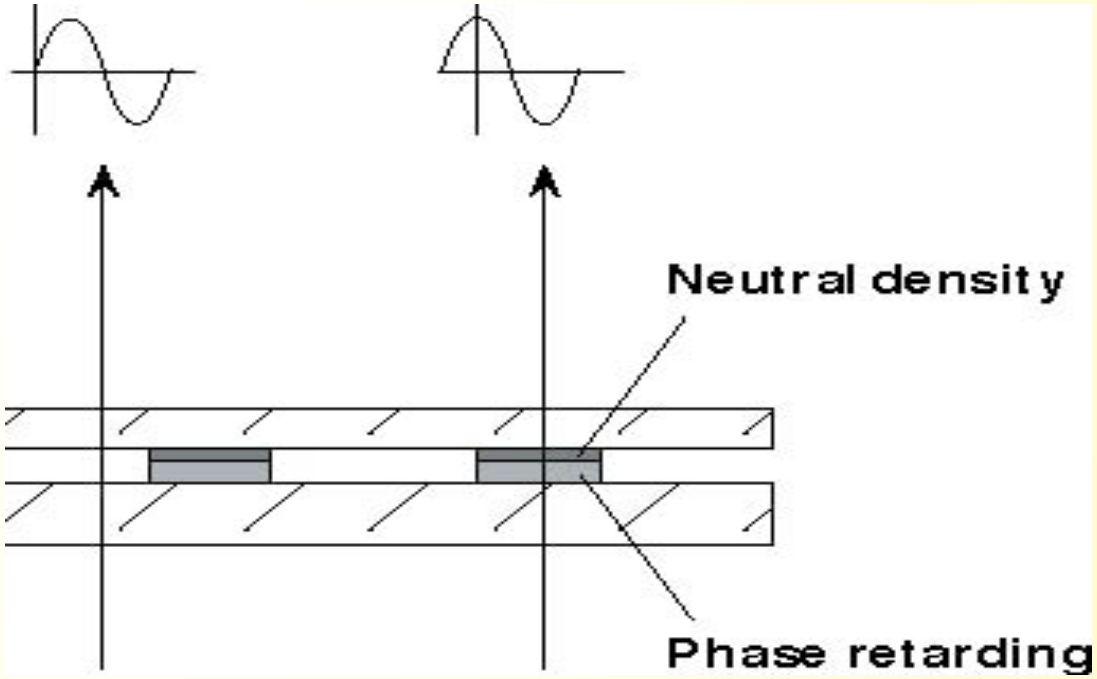
- FIXER
- RIGIDIFIER (résine époxy/paraffine)
- COUPER (microtome)
- COLORER

Technique d'observation :

- Colorants : Augmente le contraste mais la cellule est morte

- Microscopie à contraste de phase : Chaque structure de la cellule à un **indice de réfraction** de la lumière qui lui est propre. Le **déphasage de la lumière** qui traverse les éléments de la cellule créé le **contraste**.

Ne tue pas la cellule : on peut étudier ses mouvements (« time lapse »).

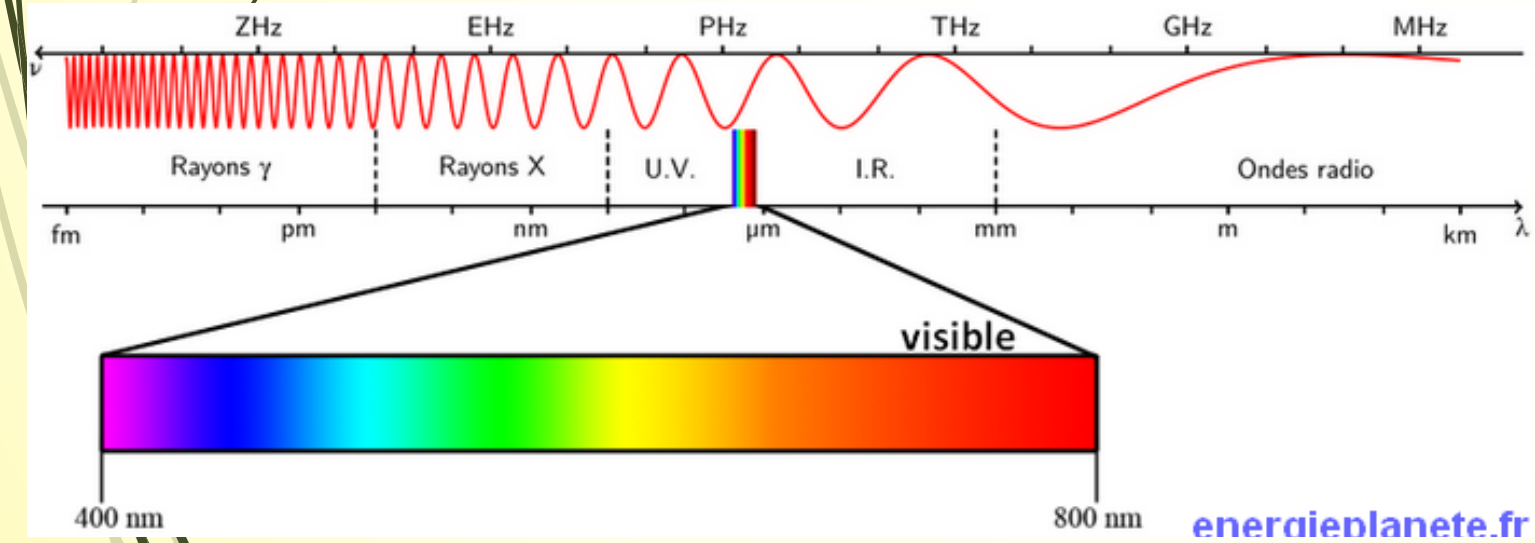


B) La fluorescence

Technique de microscopie optique

Permet de visualiser des processus intracellulaires au niveau moléculaire : un fluorochrome fixé à la molécule d'intérêt servira de traceur.

Un fluorochrome absorbe la **lumière d'excitation** et la renvoie sous forme de **lumière d'émission.**

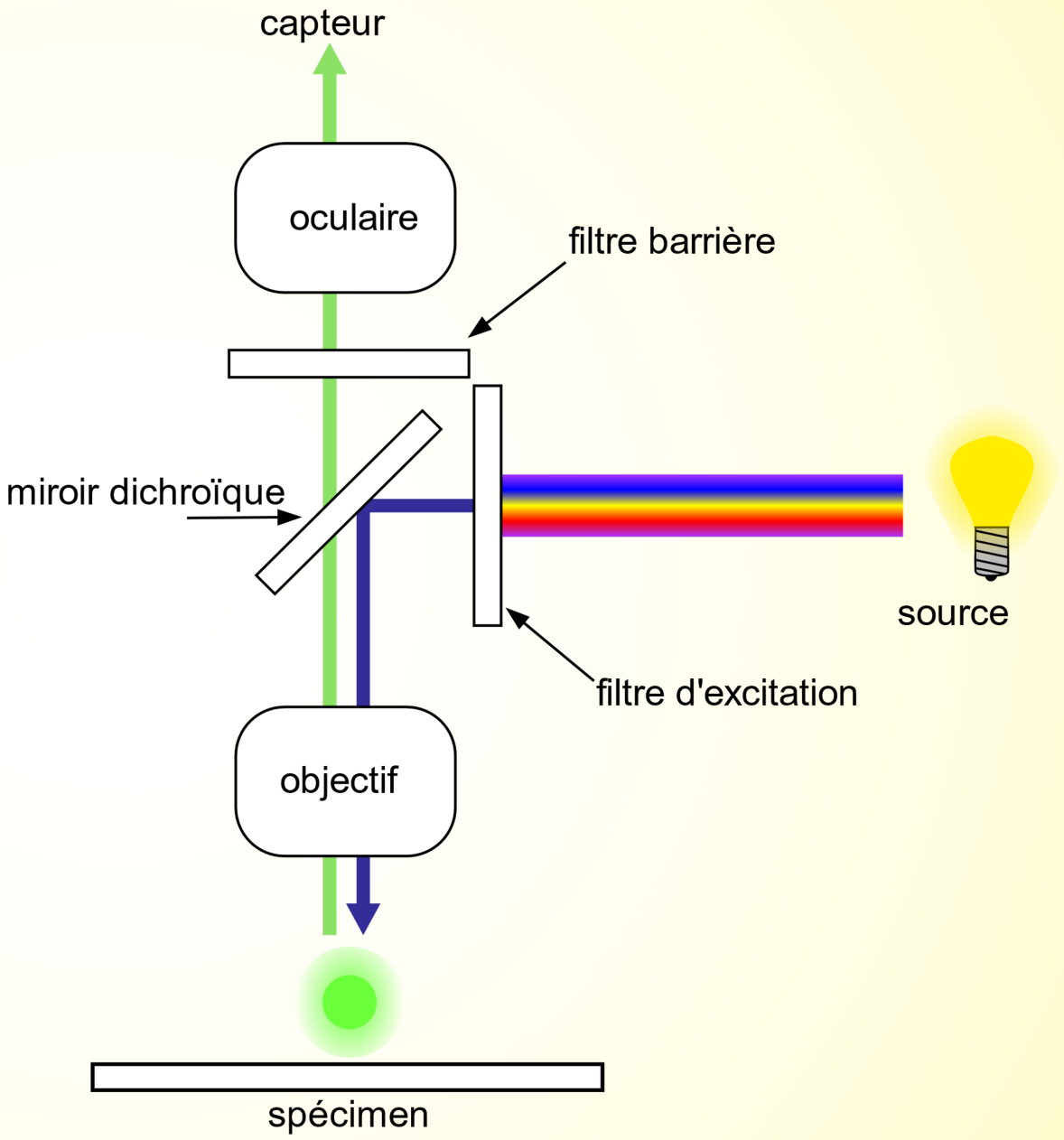


$$E_{excitation} > E_{émission}$$
$$\lambda_{excitation} < \lambda_{émission}$$

Principales molécules fluorescentes :

- **GFP** → absorbe dans le bleu, émet dans le vert
- **FITC (fluorescéine)** → absorbe dans le bleu, émet dans le vert
- **Rhodamine** → absorbe dans le vert, émet dans le rouge

Fonctionnement d'un microscope à fluorescence :



1) Fluorescence naturelle

Bioluminescence

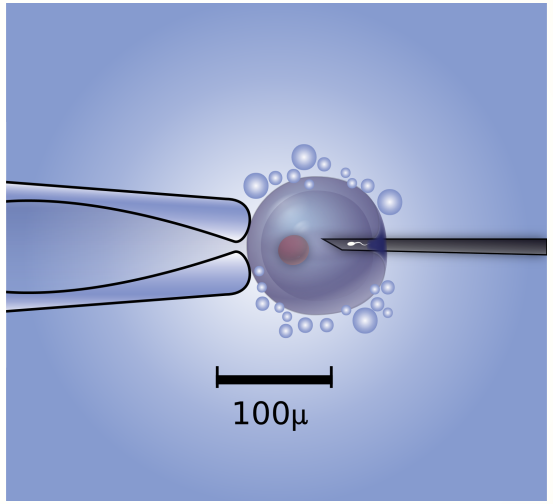
Fluorescence

Exemple de la **GFP** : Sa fluorescence vient de 3 acides aminés arrangés en tonneau → le chromophore

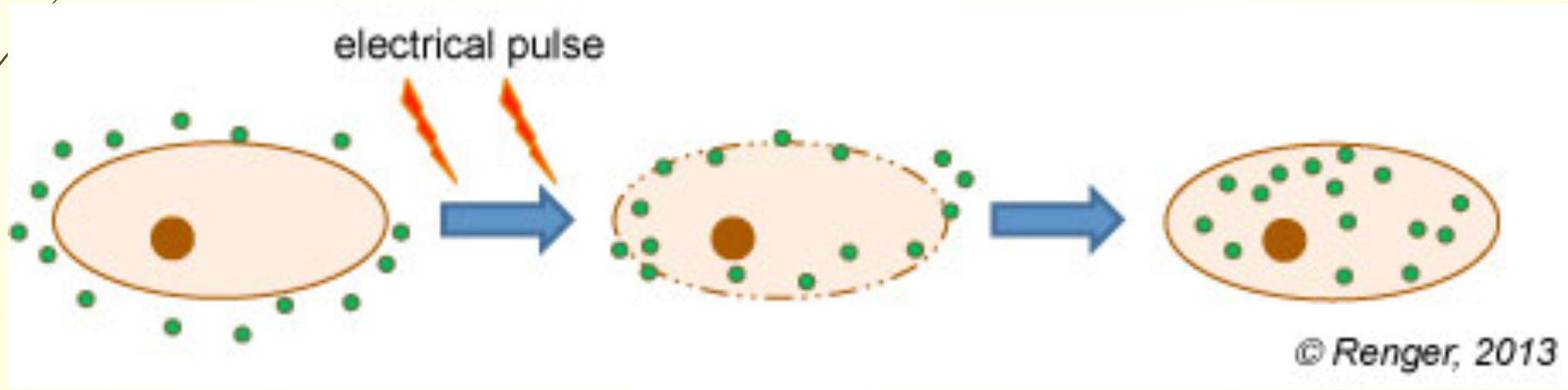
2) Introduction de molécules fluorescentes

Comment introduire les molécules fluorescentes dans la cellule ?

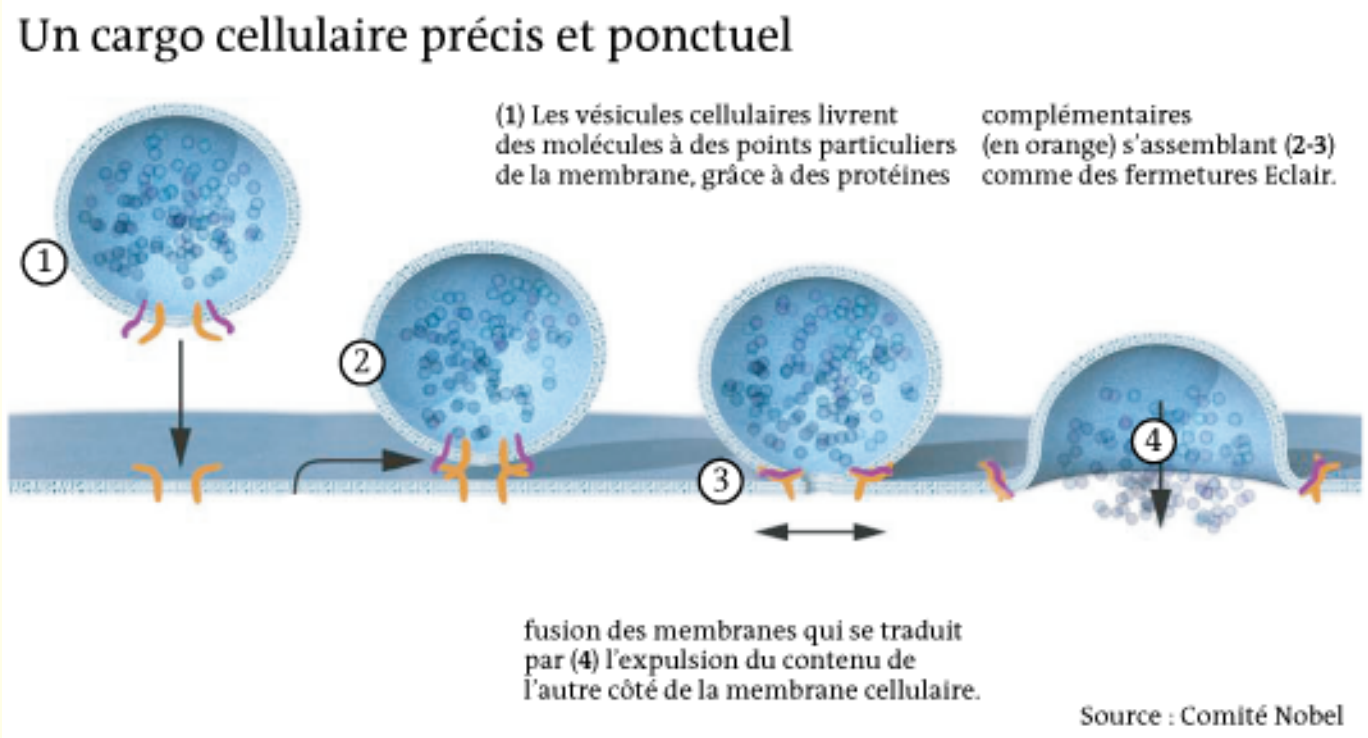
- **Micro injection**



- **Electroporation**



Vectorisation par vésicule



- **Exprimer un gène codant pour une protéine fluorescente**

On transfecte le gène codant pour le fluorochrome dans le noyau → traduction → protéine

Si on fusionne ce gène au gène de la protéine étudiée on obtient un hybride :

Protéine-fluorochrome

La protéine d'intérêt est tracée par un marqueur fluorescent.

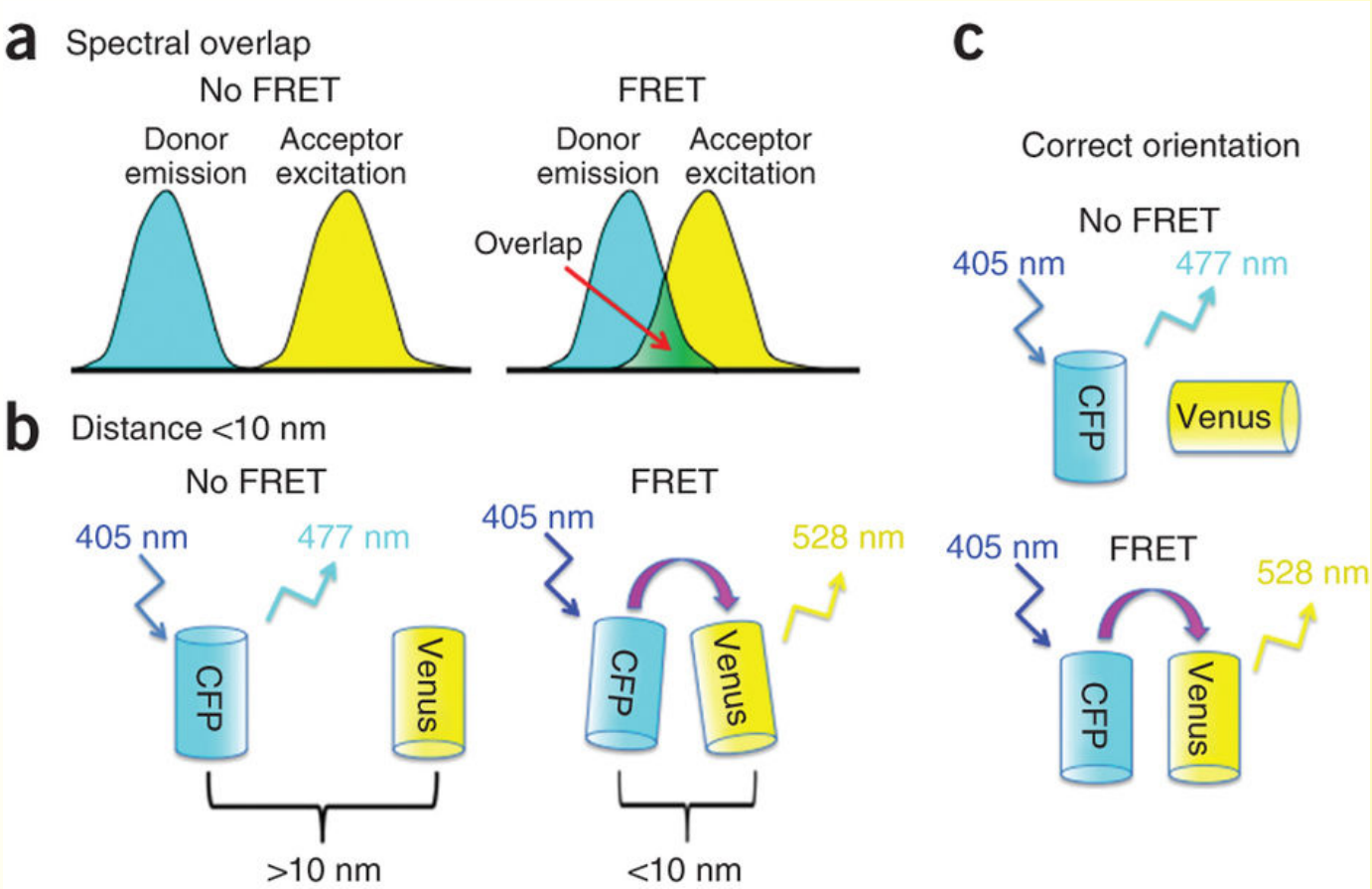
3) Application FRET, FRAP, FLIP

FRET

Cette technique permet l'étude des **interactions moléculaires** via un transfert d'énergie d'une molécule à une autre.

On a un FRET si :

- ✓ les deux molécules sont **à moins de 10 nm**
- ✓ le spectre d'émission de la première protéine fluorescente correspond au spectre d'absorption de la 2eme.



FRAP

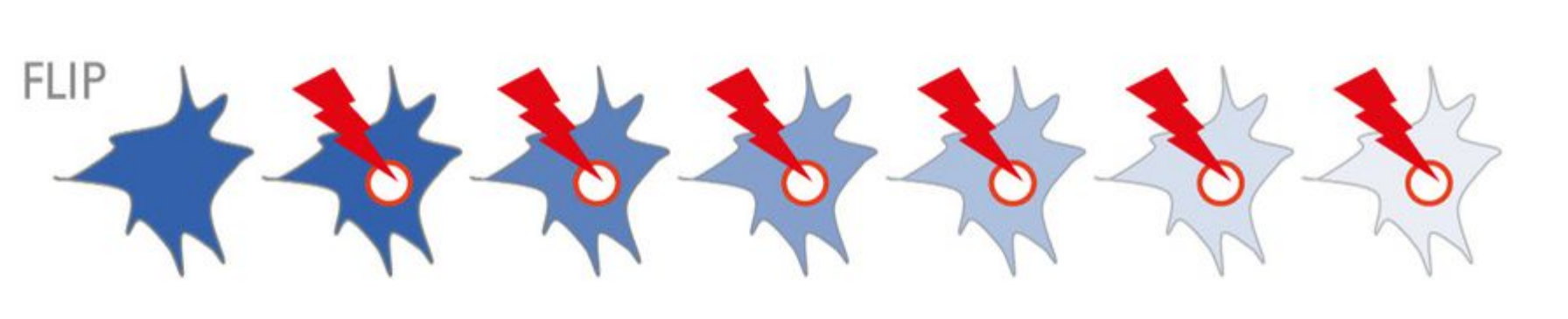
On irradie une zone de la cellule une seule fois

Cette technique permet d'étudier :

- ✓ La vitesse de mouvement des molécules
- ✓ La portion fixée/libre de molécules

Attention la fluorescence est tuée irréversiblement !

FLIP



Même principe que le FRAP sauf que cette fois on **irradie en continu** une zone précise et on observe la disparition de la fluorescence.

NB : Le Photoblanchiment c'est le fait de blanchir/tuer le fluorescence → comprend le FRAP et le FLIP

4) Fluorescence induite

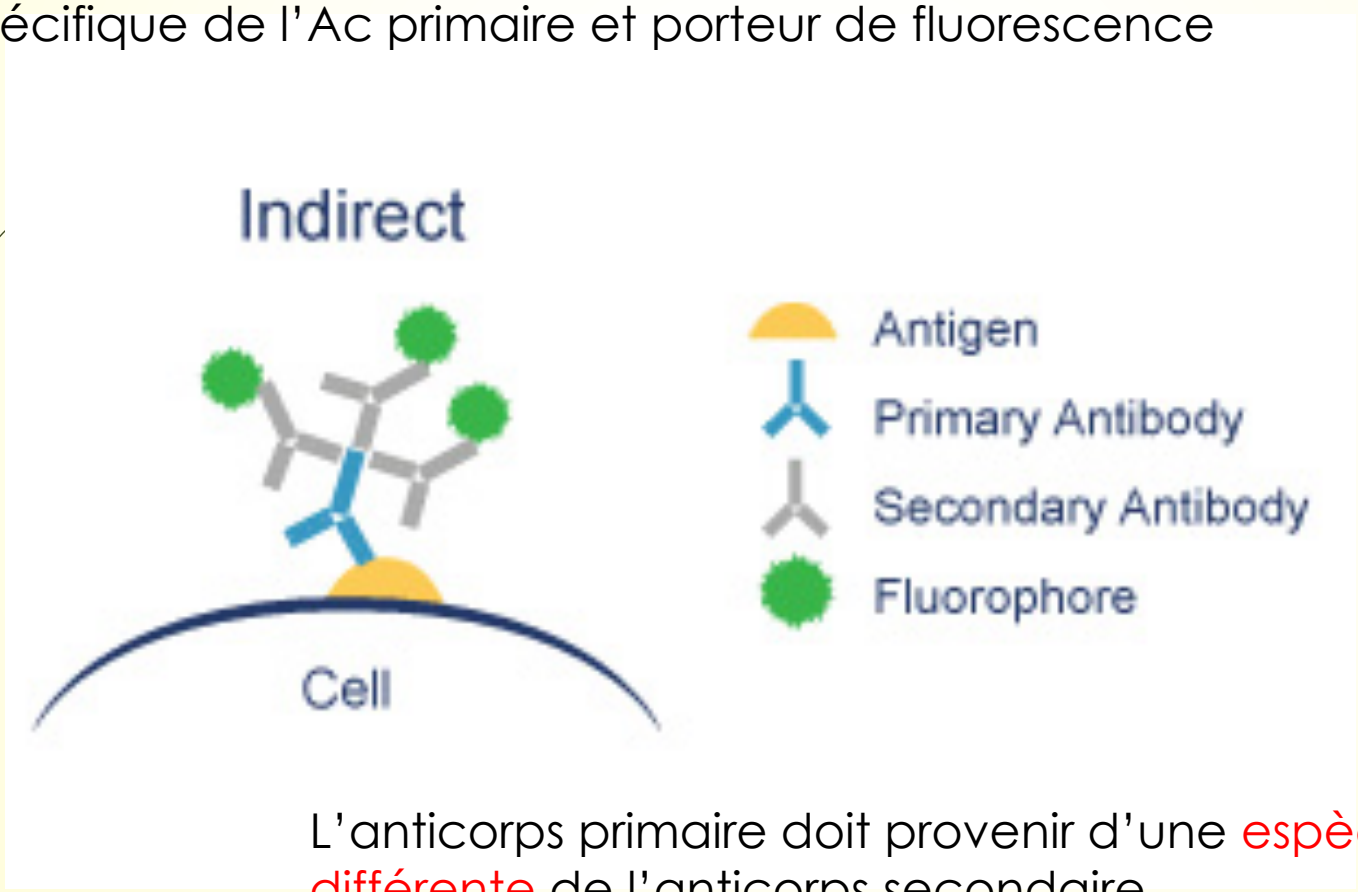
La fluorescence n'est pas intrinsèque → L'interaction induit la fluorescence

- Colorants : Hoechst et DAPI
- Intercalants

5) Immunofluorescence indirecte

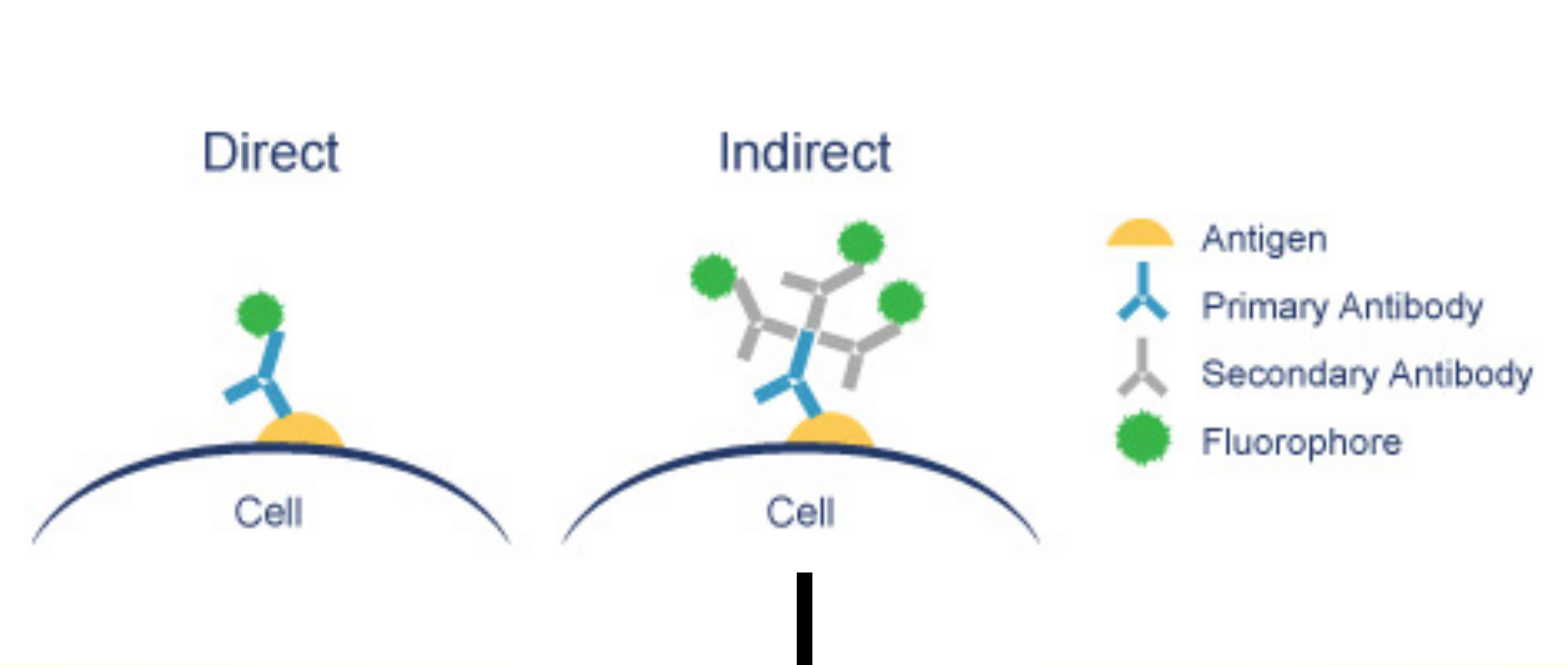
Utilisation de 2 Anticorps :

1. Spécifique de la molécule d'intérêt
2. Spécifique de l'Ac primaire et porteur de fluorescence



L'anticorps primaire doit provenir d'une espèce animal différente de l'anticorps secondaire.

NB : La fluorescence directe utilise 1 seul Anticorps porteur de la fluorescence.



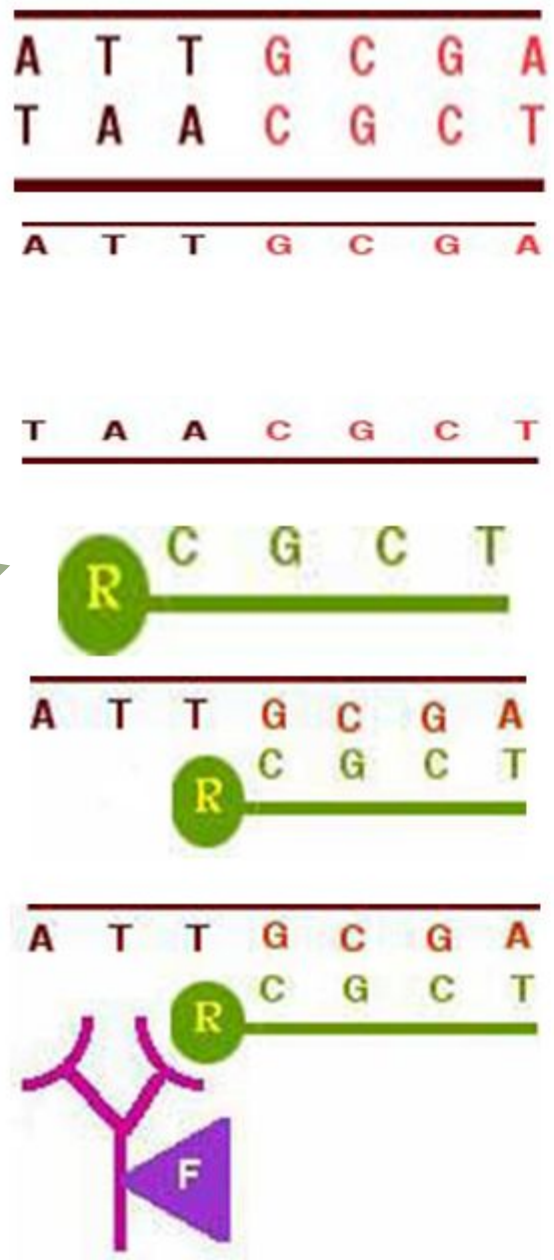
Le signal est amplifié

6) Fluorescent in situ hybridization : FISH

Une sonde fluorescente se fixe à une **portion spécifique d'ADN** (complémentarité A-T G-C)

3 étapes :

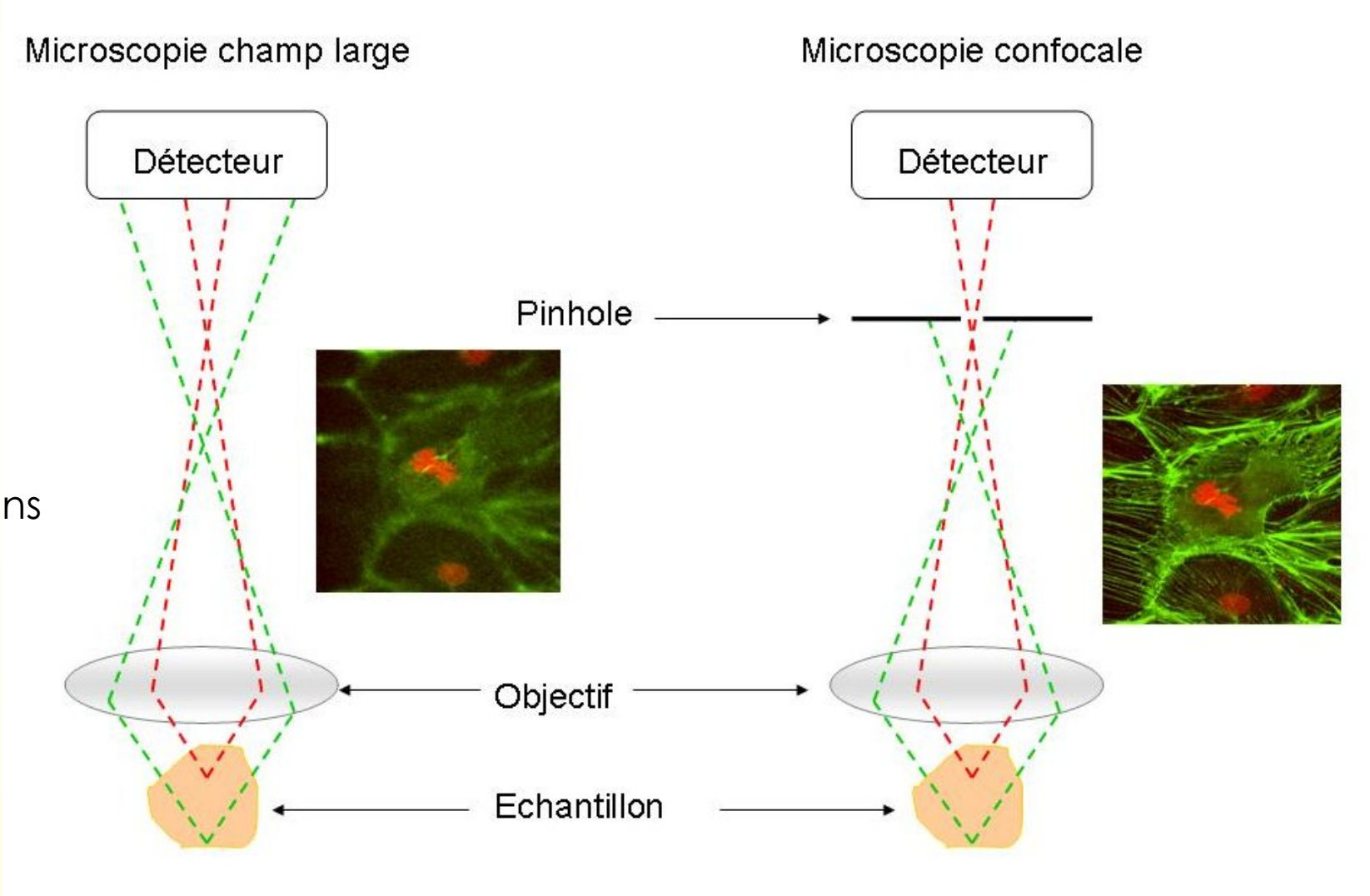
1. Dénaturation
2. Hybridation
3. Révélation



C) Microscopie confocale

On ajoute un **pinhole/diaphragme** à un microscope optique

<u>Augmente la résolution</u>
Permet de voir des échantillons en **<u>3D</u>**



D) Microscopie à super résolution

On excite les fluorochromes **successivement** puis on superpose les images obtenues. Permet d'avoir des images plus nettes.

II. La microscopie électronique (ME)

Résolution : 2nm

PREPARATION DES ECHANTILLONS A OBSERVER PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

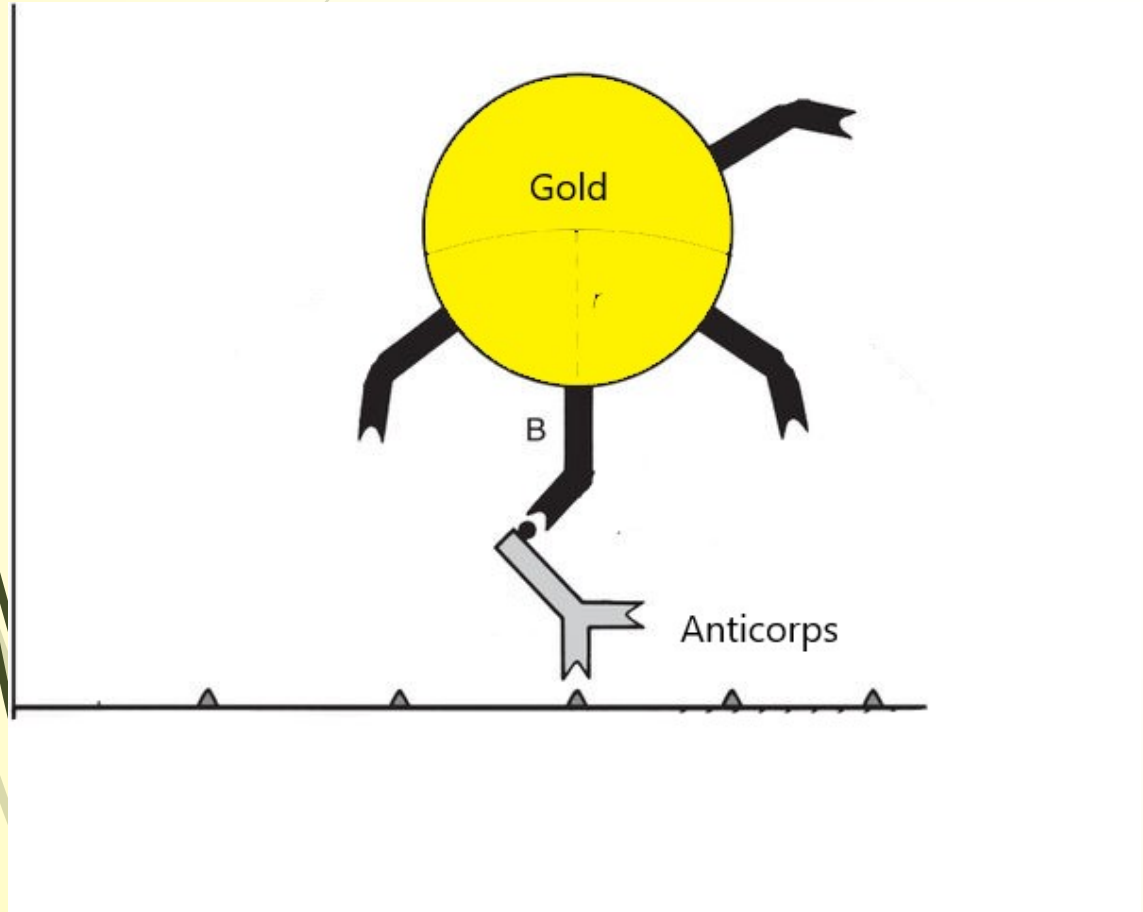
1. FIXER (glutaraldéhyde)
2. DESHYDRATER (pour l'observation sous vide)
3. RIGIDIFIER (époxy)
4. COUPER (ultramicrotome)
5. COLORER (sels de métaux lourds)

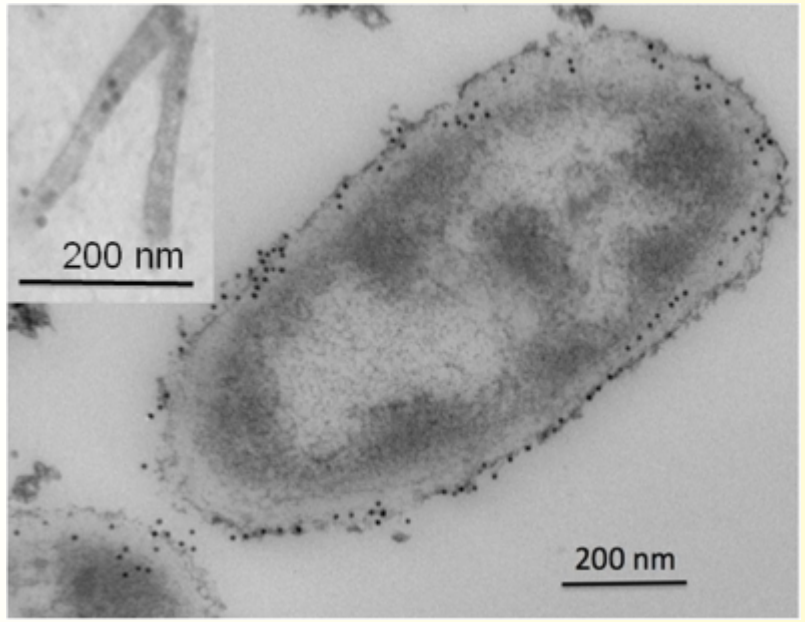
A) Microscopie électronique à transmission

Principe : Des électrons sont projetés sur l'échantillon préalablement traité aux métaux lourds (denses aux électrons), un capteur récupère ceux qui traversent et forme l'image.

Bonne visualisation des **contours de la cellule** et des **organites**.

1) Immunogold (marquage à l'or)



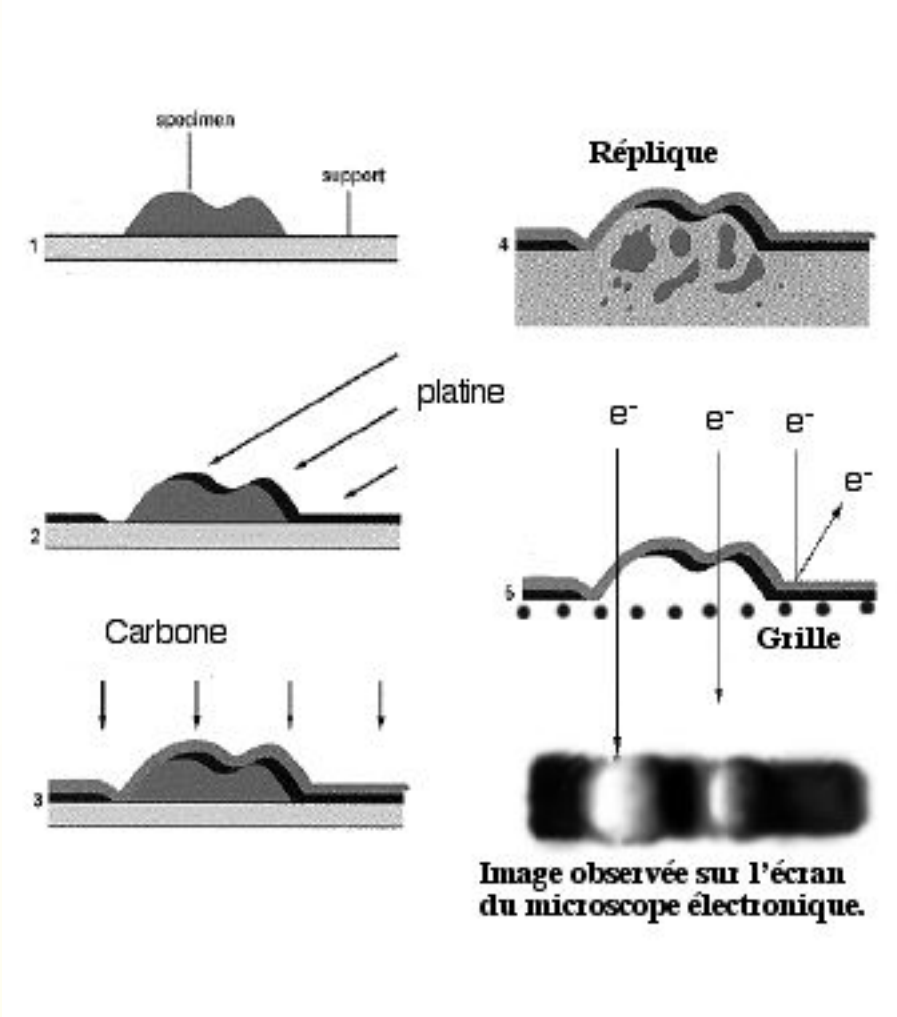


2) Coloration par ombrage

Création puis observation d'une **réplique** de l'échantillon :

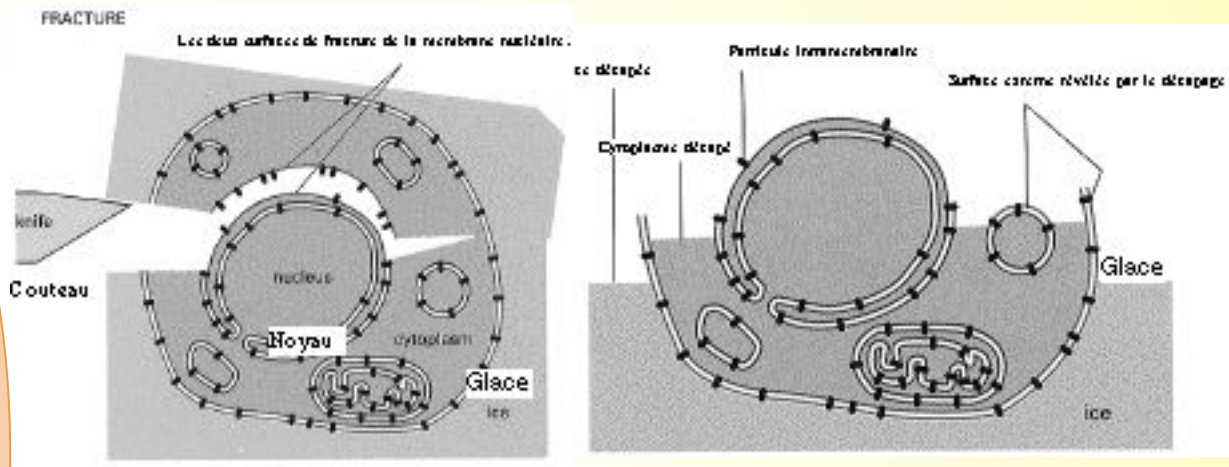
1. Echantillon sous vide
2. Vaporisation de métaux lourds
3. Dépôt de carbone
4. Dissolution de l'échantillon sous la réplique
5. Observation de la réplique

→ Visualisation indirecte



3) Cryomicroscopie

1. Congélation ultra-rapide
2. Fracturation dans les zones peu résistantes
3. Décapage de la couche superficielle
4. Vaporisation de platine + carbone
5. Dissolution de l'échantillon
6. Observation



B) La microscopie électronique à balayage

Le faisceau d'électron ne traverse pas, il excite la surface de l'échantillon.

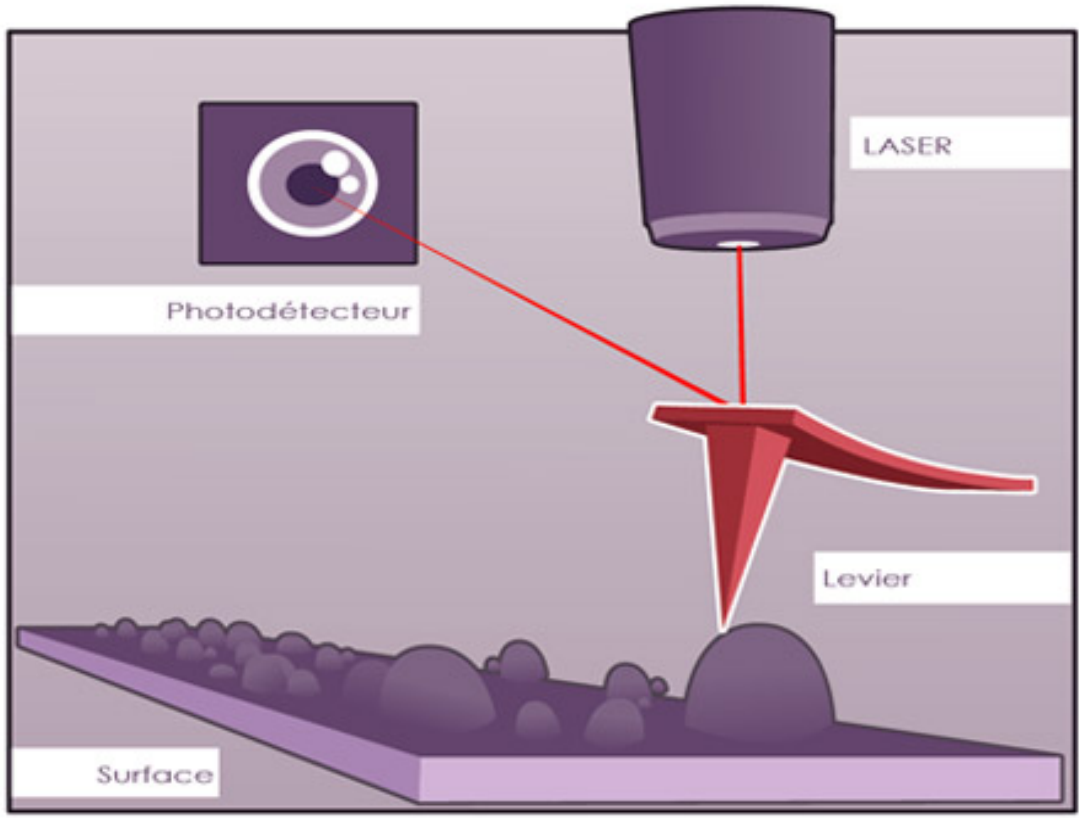
Les électrons rebondissent contre la matière vers un détecteur et selon l'angulation un système informatique peut reformer l'image.

On observe les **reliefs en 3D** mais la résolution est moins bonne

III. Microscopie à force atomique

Résolution de l'ordre atomique (0,1 nm)

Fonctionnement :
Une **pointe très fine** va balayer l'échantillon a quelques nm de distance sans jamais le toucher car elle sera déviée par **les forces de déflexion**. Le déplacement de la pointe est capté et l'image formée informatiquement.



Avantages :

- S'utilise à l'air libre

- Appréciation de la texture de l'échantillon

- Résolution limité par la pointe

- Mesure de volumes, surfaces

- Non destructif (pas de fixation/coloration)

- Cellules vivantes (milieu liquide)

- Moins cher que le ME

QCM

QCM 1 : A propos de la fluorescence

A/ Une molécule fluorescente absorbe une lumière d'émission et restitue une lumière d'excitation

B/ La GFP absorbe dans le bleu et émet dans le vert

C/ La GFP est une molécule fluorescente artificielle

D/ La fluorescence est une technique de microscopie à force atomique

E/ A B C et D sont fausses

QCM 1 : CORRECTION

A/ FAUX : Une molécule fluorescente absorbe une lumière d'excitation et restitue une lumière d'émission

B/ VRAI

C/ FAUX : naturelle

D/ FAUX : technique de microscopie optique

E/ FAUX

QCM 2 : A propos du photoblanchiment

A/ Lors du FRAP la fluorescence des molécules irradiées réapparait

B/ Le FLIP permet de mesurer la vitesse de migration des molécules fluorescentes

C/ Lors du FLIP on irradie un point de la cellule en continue

D/ Dans le cas du FRAP le retour de la fluorescence dans la zone irradiée repose sur la dynamique des autres molécules fluorescentes

QCM 2 CORRECTION

A/ FAUX : La fluorescence des molécules irradiées est tuée irreversiblement

B/ VRAI

C/ VRAI

D/ VRAI

E/ FAUX

MERCI POUR VOTRE ATTENTION