

INTRO : Il existe 3 grands types de microscopie :

- ❖ Microscopie optique
- ❖ Microscopie électronique
- ❖ Microscopie atomique.

I. La microscopie optique (photonique)

A) Généralités

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

La microscopie optique (fonctionne avec des photons) à une **résolution maximale de 200 nm**. Autrement dit on ne peut plus distinguer 2 points séparés par moins de 200 nm.

Fonctionnement : Une série de verres optiques vont condenser les photons sur l'échantillon à observer. La lumière est transmise directement à notre œil qui observe l'image agrandie.

Préparation des échantillons à observer par microscopie photonique :

- **FIXER** / solidifier l'échantillon avec des agents qui vont former des liaisons covalentes entre les molécules.
- **RIGIDIFIER** avec de la résine époxy ou de la paraffine

- **COUPER** avec un microtome
- **COLORER**

Les cellules sont transparentes, pour les observer on va :

- **Utiliser des colorants** : Ils vont augmenter le contraste MAIS la cellule est morte et sa structure est modifiée par l'agent étranger
- **Utiliser la microscopie à contraste de phase** : Le principe est d'utiliser l'**indice de réfraction de l'échantillon**. Chaque structure de la cellule augmente le déphasage de la lumière qui la traverse et permet d'avoir une image plus contrastée. Cette technique ne tue pas la cellule on peut donc étudier les **mouvements de la cellule** (microscopie « **time-lapse** »)

B) La fluorescence

1. Principes de la fluorescence

C'est une technique de microscopie optique.

La fluorescence permet de visualiser des processus intra cellulaires au niveau moléculaire.

Principe : Une molécule fluorescente **absorbe** de la lumière (**lumière d'excitation**) et la **restitue** rapidement sous forme de lumière fluorescente (**lumière d'émission**). L'énergie de la lumière émise est inférieure à l'énergie de la lumière absorbée.

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

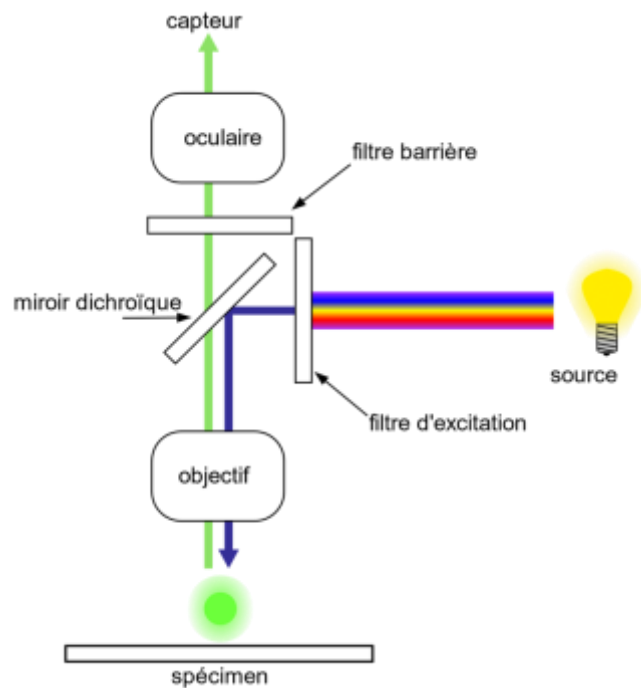
On va donc greffer aux cibles que l'on souhaite observer des marqueurs fluorescents (=fluorochromes) afin de les repérer dans la cellule.

Molécules fluorescentes :

- **GFP** → absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert**
- **FTTC (fluorescéine)** → absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert**
- **Rhodamine** → absorbe dans le **vert** et émet dans le **rouge**

Fonctionnement du microscope à fluorescence :

On a une source de lumière monochrome (ou une lumière blanche qui traverse des filtres qui vont laisser passer une seule longueur d'onde), cette **lumière d'excitation** va être **réfléchie** par un **miroir dichroïque** et être dirigée vers l'échantillon qui va absorber la lumière et la renvoyer sous forme de **lumière d'émission** qui va cette fois **traverser** le miroir et arriver dans



notre œil.

Miroir dichroïque : Réfléchit la lumière sauf pour une certaine portion du spectre de longueurs d'ondes qui sera transmise. ♥

2. Fluorescence naturelle : GFP

Elle est de 2 types :

- ✚ La **bioluminescence** (lucioles : grâce à une enzyme, la luciférase)
- ✚ La **fluorescence** (coraux, méduses)

La **GFP** (Green Fluorescent protein) est **naturelle** (contrairement à la fluorescéine qui est artificielle). Elle a été extraite d'une méduse. Sa propriété de fluorescence vient de 3 acides aminés arrangés en tonneaux que l'on appelle **le chromophore**. Varier ces acides aminés permet de changer la couleur de la fluorescence.

La fluorescence est une propriété intrinsèque à la GFP, il est donc possible de l'exprimer dans n'importe quelle cellule.

3. Introduction de molécules fluorescentes

Comment rendre la molécule qui nous intéresse fluorescente artificiellement ?

Différentes techniques permettent d'introduire une molécule fluorescente dans une cellule :

- 1er. **La micro injection** : la plus simple. On injecte avec une **micropipette** dans chaque cellule → **long et fastidieux**
- 2e. **L'électroporation** : On place les cellules entre deux électrodes que l'on va soumettre à une forte tension ce qui a pour but de provoquer **un choc électrique**. Ce choc électrique fera de nombreuses **perforations transitoires** dans la membrane plasmique et permettra l'entrée du fluorochrome dans la cellule → Permet de traiter **beaucoup de cellules en même temps** mais la technique n'est pas physiologique et **traumatisante pour la cellule**.

- 3e. **Vectorisation par vésicules** : On utilise des **vésicules** pour faire entrer le fluorochrome. La cellule absorbe la vésicule (endocytose) qui déverse son contenu dans le cytoplasme → **technique la plus physiologique**, la moins traumatisante.
- 4e. **Exprimer un gène codant pour une protéine fluorescente** : On va forcer la cellule à produire le fluorophore de la même manière qu'elle produit ses protéines. Cette technique est la plus utilisée, on appelle ça la **transfection**. On transfecte le gène codant pour le fluorochrome dans le noyau, ce gène est transcrit puis traduit.
NB : on peut fusionner le gène du fluorochrome au gène d'une protéine (hybride fluorochrome-protéine) → le gène sera traduit en **protéine de fusion fluorochrome-protéine** ainsi on peut tracer la protéine grâce à la fluorescence.

♥ ♥ DEMONTRER ≠ SUGGERER ♥ ♥

- ❖ **Démontrer** signifie qu'il n'y a aucune autre possibilité.
- ❖ **Suggérer** signifie que l'interprétation est possible mais pas sûre à 100%.

Ex : On a une image par microscopie à fluorescence. On voit que notre protéine tracée (GFP-protéine) se localise dans le noyau.

- On suggère que la protéine est nucléaire
- On démontre que l'hybride GFP-protéine est nucléaire.

En effet peut être que l'hybridation du gène (GFP-protéine) a modifié certains paramètres du gène de la protéine comme par exemple sa localisation → On ne peut pas démontrer que la protéine **seule** serait nucléaire

4. Applications FRET, FRAP, FLIP

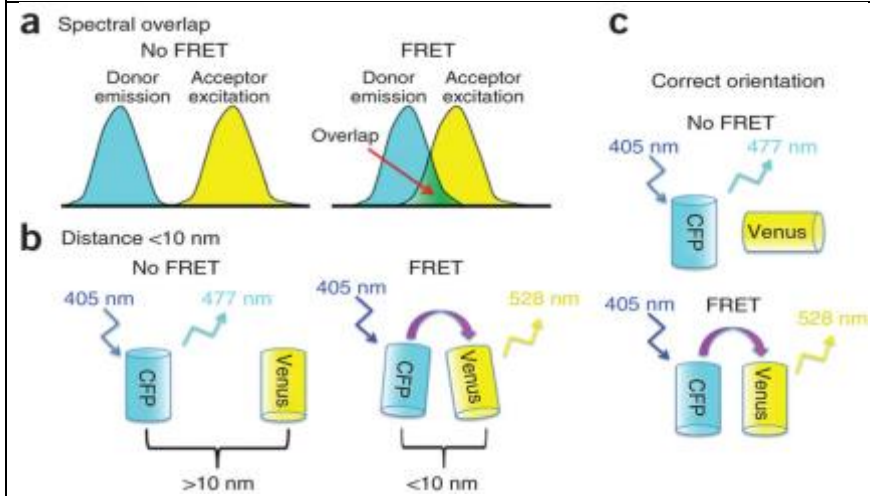
FRET

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

Condition de fonctionnement :

- ✓ Il faut deux protéines fluorescentes, dont **le spectre d'émission de la première correspond au spectre d'absorption de la deuxième.**
- ✓ Les molécules doivent être **espacées de moins de 10nm** pour donner lieu au transfert d'énergie.

→ On envoie une longueur d'onde correspondant au spectre d'absorption de la première molécule fluorescente, ce fluorophore renvoie une lumière d'émission. **SI LES 2 MOLECULES SONT A MOINS DE 10 NM DE DISTANCE** → la lumière d'émission est absorbée par la deuxième molécule fluorescente qui émet alors sa propre lumière d'émission à une longueur d'onde plus élevée (énergie plus faible).





FRET intermoléculaire : L'interaction de deux protéines qui sont toutes deux fusionnée avec un fluorophore va entraîner un transfert d'énergie entre les deux fluorophores et produire le FRET

FRET intramoléculaire : On étudie la conformation moléculaire. Une seule molécule va se **replier** et mettre en contact les 2 fluorophores qui sont greffés à des endroits différents de la molécule. Ce contact va produire le FRET.

- **Ex : La sonde caméléon** (calmoduline) est une sonde calcique qui va se replier en fonction du taux de calcium. En fonction du rayonnement fluorescent aperçu on va pouvoir mesurer le taux de calcium.

FRAP

➔ **On irradie brièvement une zone de la cellule** (on tue donc la fluorescence des molécules situées dans un endroit précis de la cellule). Peu à peu on voit que la **zone blanchie retrouve de la fluorescence**. Ce retour de la fluorescence dans la zone irradiée repose sur une **dynamique des autres molécules fluo** de la cellule et non pas sur une réapparition de la fluorescence dans la zone irradiée. En effet **l'irradiation qui tue la fluorescence est irréversible**.

Le FRAP permet d'étudier :

- La vitesse de mouvement de ces molécules
- La portion mobile ou fixe (Si la fluorescence ne revient jamais entièrement c'est qu'une partie de ces molécules est fixée).

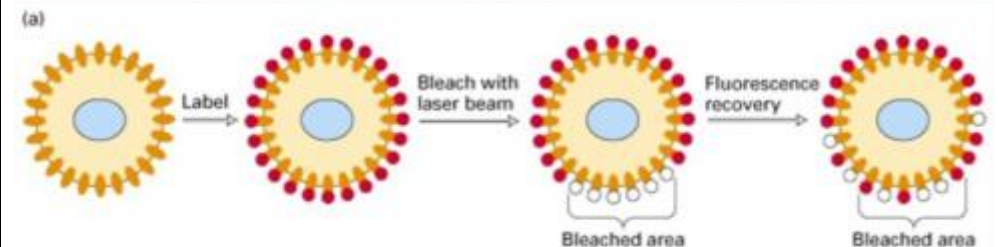


FLIP

Même principe sauf que cette fois **on irradie en continu une zone précise** et on observe la **disparition de la fluorescence**. Cette disparition progressive dépend de la vitesse de déplacement et de la portion fixée des molécules (idem que le FRAP).



On peut aussi mesurer la vitesse de migration latérale des protéines de membrane.



Mnémono : FRAP → Rapide ... FLIP → Long

- **Photoblanchiment** : Il s'agit d'**irradier** la cellule pour tuer la fluorescence irréversiblement à l'endroit voulu puis d'observer. Le FRAP et le FLIP sont 2 techniques de photoblanchiment.

5. Fluorescence induite

Un colorant devient fluorescent lorsqu'il est fixé à une molécule spécifique.

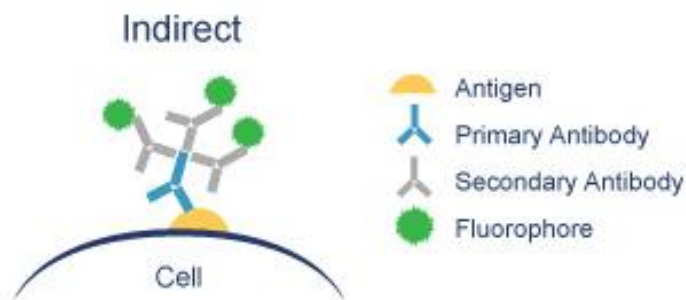
(Ici la fluorescence n'est pas intrinsèque → L'interaction induit la fluorescence). On s'en sert principalement pour visualiser les **acides nucléiques** :

- **Colorant** se fixant sur les paires de bases A et T : **Hoechst** et **DAPI**
- **Intercalants** se fixant non spécifiquement sur l'ADN : Iodure de propidium, Bromure d'éthidium

6. Immunofluorescence indirecte

Définition : L'immunofluorescence indirecte est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps (Ac) :

- Le premier Ac = **Ac primaire** reconnaît spécifiquement la **protéine d'intérêt**
- Le deuxième Ac = **Ac secondaire** est spécifique de l'anticorps primaire et **porte la fluorescence**, il va reconnaître l'Ac primaire plusieurs fois donc le signal sera amplifié.



L'Ac primaire doit provenir d'une espèce animale différente de celle de l'Ac secondaire

♥ Si on veut étudier 2 protéines différentes il faudra greffer à chaque Ac secondaire un fluorochrome différent avec une longueur d'onde d'émission différente (pour pouvoir distinguer les deux molécules différentes) ♥

Pas d'immunofluorescence directe ou indirecte avec de l'ADN car les Ac ne reconnaissent pas spécifiquement l'ADN.



NB : L'immunofluorescence directe n'utilise qu'un seul anticorps spécifique de la protéine d'intérêt et porteur de la fluorescence

7. Fluorescent in situ hybridization : FISH

Cette technique est basée sur la **complémentarité A-T G-C**. Elle permet de **reconnaître spécifiquement certaines séquences d'ADN**.

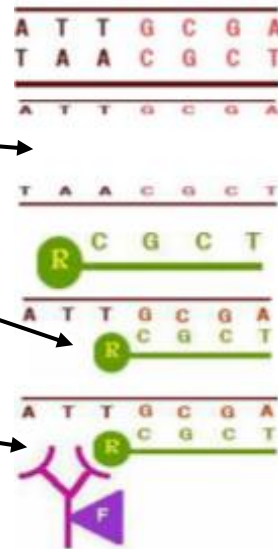
On a une sonde fluorescente qui se fixe à une portion spécifique de l'ADN.

La sonde peut être marquée par la fluorescence :

- ✓ Directement (présence de fluorochrome sur la sonde)
- ✓ Indirectement (révélation via un complexe avec des Ac marqués par des fluorochromes dirigés contre la sonde)

3 étapes :

1. **DENATURATION** : chaleur + agents dénaturants. On obtient deux branches d'ADN simple brin. La dénaturation tue la cellule
2. **HYBRIDATION** : la sonde fluorescente s'hybride spécifiquement à l'ADN simple brin
3. **REVELATION** : On fait réagir les fluorochromes (qui sont déjà sur la sonde ou sur des anticorps).



CONCLUSION SUR LA FLUORESCENCE

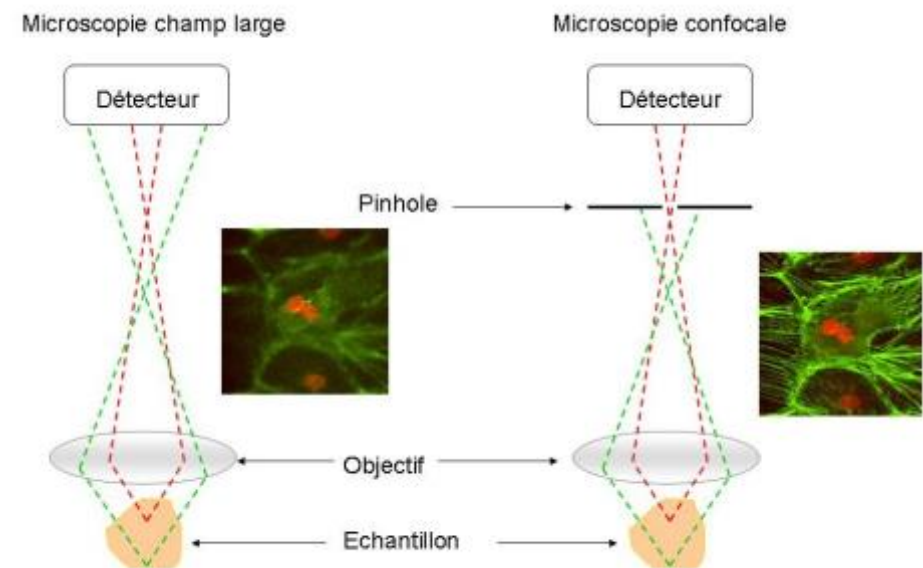
→ LA FLUORESCENCE est un outil d'observation en microscopie optique, elle permet :

- ✓ La localisation de molécules spécifiques
- ✓ La combinaison des différents fluorochromes donc d'étudier plusieurs molécules en même temps
- ✓ L'étude de cellules vivantes (ou fixées)
- ✓ L'étude de tous les compartiments cellulaires grâce aux marqueurs fluorescents

C) La microscopie confocale

Outils d'exploration **tridimensionnelle** d'un échantillon.

On peut observer un **échantillon épais** par tranche grâce à un **diaphragme/pinhole** qui permet de concentrer le rayon sur 1 seul plan de l'échantillon → enlève le flou du plan d'au-dessus et du plan d'en dessous (bruits de fond) afin de ne garder que le signal du plan de coupe qui nous intéresse. Cette technique permet de visualiser un échantillon en **3D** et **d'augmenter la résolution**.



D) La microscopie à super résolution

On est toujours dans la microscopie optique mais avec une meilleure résolution. Le principe est de **faire réagir les fluorochromes de façon successive** contrairement à la microscopie optique conventionnelle qui les allume tous en même temps. L'image est plus nette.

B/ La microscopie électronique (ME)

Résolution : 2nm

La résolution est meilleure que celle de la microscopie optique : on peut observer les organites et les molécules

Fonctionnement : On va utiliser **un faisceau d'électrons** qui va traverser l'échantillon ou rebondir. Les électrons ont un pouvoir de pénétration inférieur à celui des photons, donc les échantillons subissent des préparations spéciales.

Préparation des échantillons à observer par microscopie électronique :

- **FIXER** : Glutaraldéhyde ou tétroxyde d'osmium (cellule morte)
- **DESHYDRATER** : Obligatoire pour pouvoir visualiser sous vide, mais abîme l'échantillon
- **RIGIDIFIER** : avec de la résine époxy
- **COUPER** : avec un ultramicrotome
- **COLORER** : aux sels de métaux lourds qui sont denses aux électrons, créent le contraste en ME

A) La microscopie électronique à transmission (MET)

Un canon à électron projette des électrons vers la préparation préalablement traitée aux métaux lourds. **Les électrons traversent ou sont stoppés**. Un **capteur récupère ceux qui ont traversé**.

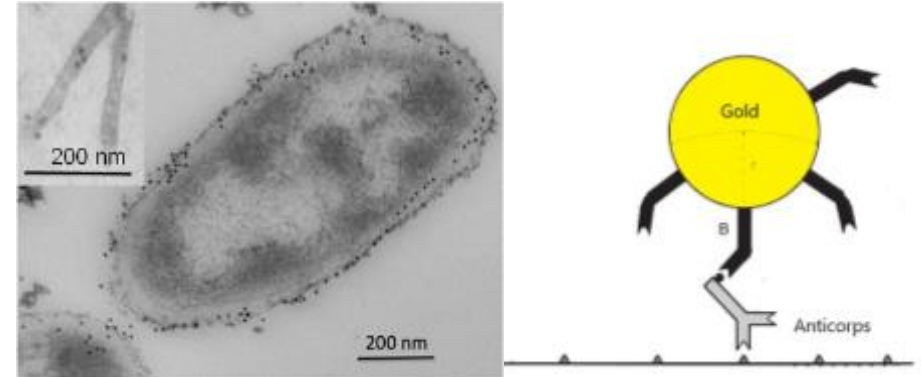
Un contraste apparaît entre les électrons qui ont été stoppés (sombre) et les électrons qui ont traversé (clair)

Bonne visualisation des contours de la cellule et des organites.

Il existe plusieurs techniques de MET :

1. Le marquage à l'or (immuno gold)

Une molécule d'or est fixée à un Ac qui va reconnaître la protéine d'intérêt (l'or remplace le fluorochrome). **L'or est opaque aux électrons** donc quand le faisceau arrive sur la préparation, la protéine fixée aux Ac apparaîtra foncée.



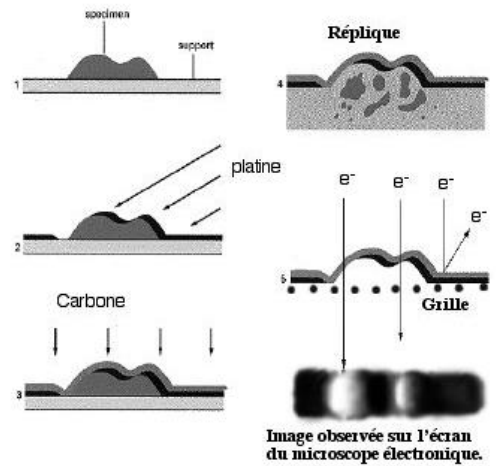
Les points noirs sur la photo sont les endroits opaques aux électrons → c'est là qu'il y a les molécules d'or → donc on a la localisation de notre protéine cible.

2. La coloration par ombrage

Le but est de faire un moulage, **une réplique de l'échantillon** que l'on veut analyser.

- L'échantillon est disposé sur une surface de mica sous vide
- On vaporise de métaux lourds
- On dépose un film de carbone qui va rigidifier l'ensemble
- On obtient une réplique de métal
- On dissout l'échantillon qui est en dessous et on garde le moulage

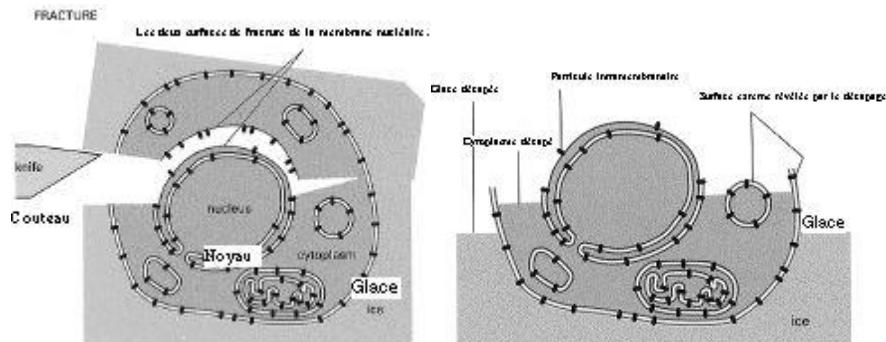
→ **Visualisation INDIRECTE (car on observe le moulage et non l'échantillon)**



3. La cryomicroscopie (cryofracture)

Technique la plus efficace pour **visualiser les reliefs des organites et les membranes cellulaires**.

- **Congélation** ultra-rapide de l'échantillon pour conserver l'organisation interne)
- **Fracturation** dans les zones de moindre résistance (entre les deux feuillettes de la membrane)
- **Décapage** de la couche superficielle par sublimation
- **Vaporisation** d'une couche de platine et de carbone
- **Dissolution** des tissus et observation du moulage



→ Les zones riches en platine font rebondir les électrons apparaissent noires et les zones sans platine vont laisser passer les électrons et apparaîtront blanche

B) La microscopie électronique à balayage

L'échantillon est balayé par un faisceau d'électrons qui ne pénètrent pas mais vont exciter la surface. Les électrons rebondissent vers un détecteur et selon leur angulation vont permettre de reconstituer une image de la surface de l'échantillon. Ce dernier est fixé et recouvert de métaux lourds. Cette technique permet de **visualiser la surface des cellules en 3D**.

- + La **résolution est plus faible que la MET** (10nm)
- + Très bonne appréciation des **reliefs**.

C/ La microscopie à force atomique

Cette microscopie permet de visualiser **jusqu'aux atomes** (10^{-10} m).

A une distance très faible les atomes se repoussent entre eux (force de déflexion). On va utiliser cette propriété → Une pointe de métal va se rapprocher de l'échantillon jusqu'à être **déviée par ces forces**. Elle va donc se déplacer sur l'échantillon sans jamais le toucher. Un laser va se refléter sur la pointe, quand celle-ci va se déplacer le laser va être dévié et permettre de détecter les variations de relief de l'échantillon. La reconstitution de l'image se fait informatiquement.

Avantages :

- Permet **d'étudier les contraintes élastiques**, forces d'adhésion ainsi que la rigidité d'un échantillon (grâce au contact sonde-matière)
- L'étude peut se faire **à l'air libre** (contrairement à la ME qui se fait sous vide)

- **Résolution limitée par la taille de la pointe** (plus elle est fine est meilleure est la résolution) et non par la diffraction comme c'est le cas pour les autres types de microscopie
- On peut **mesurer des volumes / surfaces**
- **Non destructif** (par de fixation ou de coloration)
- Peut être utilisé en **milieu liquide** → étude de cellules vivantes dans leur environnement
- **Moins cher que la ME**

C'est fini pour ce cours, désolée si c'est long mais j'ai voulu détailler mes explications.

Pour toute recommandation → go forum ♥