

# Méthodes d'étude de la cellule

→ on pourra faire de la microscopie **time lapse** (enregistrement de film) pour étudier les mouvements de la cellule

## I- La microscopie

Il existe 2 grands types de microscopie :

- Microscopie optique (photonique)
- Microscopie électronique



### A. La microscopie photonique (= optique)

- Observation de la cellule et ses organites mais pas directement les molécules (on utilisera alors des marqueurs)
- **résolution de 200nm** (taille des photons)
- **cellules vivantes** (=/= de l'histologie où l'on travaille avec des cellules morte)
  - la cellule étant transparente, pour l'observer on utilise soit des **colorants** mais cela **tue la cellule** soit la microscopie à **contraste de phase** qui garde les **cellules vivantes**

### Les différentes microscopies photoniques :

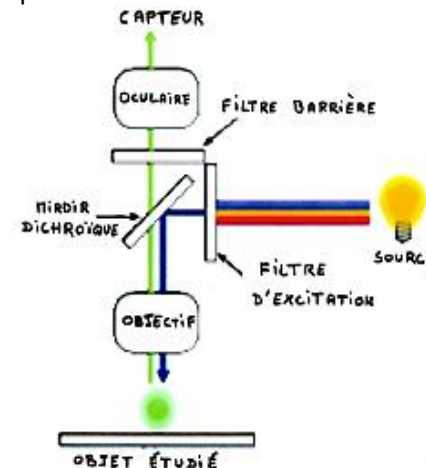
- **La microscopie à contraste de phase** : la lumière est **réfractée**, on augmente le déphasage entre les photons qui traversent l'échantillon

**On augmente le contraste mais on perd en luminosité**

- **La microscopie à fluorescence** : l'échantillon va **réémettre sa propre lumière** (++++ à voir plus loin)
- **La microscopie optique à super résolution** : **excitation séquentielle** de différents fluorochromes, améliore la résolution jusqu'au nm.
- **La microscopie confocale** : étudie la cellule **point par point et plan par plan**. Permet de reconstituer la **cellule en 3D**  
**Nécessite des molécules fluorescentes**

Principe microscopie confocale : une lumière blanche passe dans un **filtre** qui sélectionne une longueur d'onde (**lumière d'excitation**), le **miroir dichroïque** réfléchit la **lumière d'excitation** et laisse passer la **lumière d'émission de longueur d'onde supérieur**. La **lumière d'émission** passe ensuite dans un diaphragme (pinhole) qui élimine la lumière hors champ focal.

La résolution est améliorée et les coupes d'échantillons peuvent être plus épaisses et on peut les visualiser en 3D



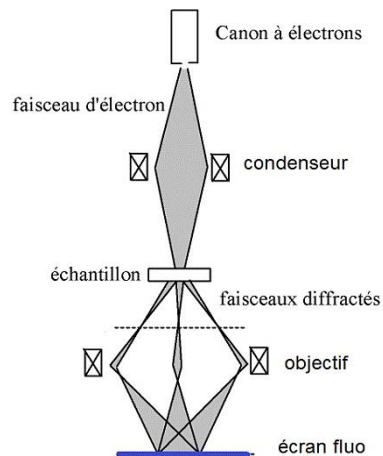
## B. La microscopie électronique

- **Résolution de 0.2 nm**
- Etude des **molécules et même des atomes**
- **Pas applicable aux cellules vivantes**
- On étudie **l'intérieur d'une cellule**
- Les échantillons sont **fixés** (les cellules sont donc **mortes**), **déshydratés, séchés**, inclus dans une résine, **vaporisés par des sels de métaux lourds** (pour augmenter le contraste) et coupés à **l'ultramicrotome**

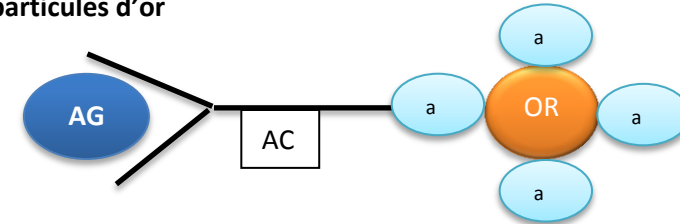
### La microscopie électronique à transmission

Principe : des **électrons** sont produits par un canon et sont concentrés dans un **condenseur** vers **l'échantillon sous vide**. Les électrons traversent l'échantillon et atteignent un écran fluorescent.

Les électrons ont un pouvoir de pénétration **inférieur** à celui des photons. On fera donc des **coupes ultrafines**.



- × **Le marquage à l'or** : l'échantillon est mis en présence d'**anticorps** (AC) dirigés contre l'antigène à étudier. Les AC sont **couplés à des particules d'or**



- × **La cryomicroscopie** : l'échantillon est congelé dans de l'azote liquide, il sera ensuite fracturé en bloc **sous vide** : c'est la **cryofracture**. On dissocie **2 feuillets membranaires**, les protéines membranaires vont rester accrocher à un des deux feuillets et on pourra les observer. On pourra ensuite utiliser la **coloration par ombrage** pour visualiser la **surface de la membrane**

Avantage : l'échantillon est **sous vide mais hydraté** ce qui permet **d'augmenter le contraste**, on pourra visualiser les **membranes des organites** ou **l'enveloppe nucléaire**. On évite la **fixation chimique** donc le risque de **dénaturation**

### La microscopie électronique à balayage

Elle permet d'étudier la **surface d'une cellule**. Les **électrons** ne traversent pas la préparation mais y sont **réfléchis**. Dans certaines conditions on peut observer les **cellules vivantes**

La **résolution** est **moins bonne** mais les échantillons peuvent-être **plus épais** et en **3D**

### C. La microscopie à force atomique

On l'utilise pour visualiser les **surfaces d'un échantillon**

Principe : une **pointe très fine** balaye la surface de l'échantillon **sans rentrer en contact** avec celui-ci grâce à des forces de repoussement entre les atomes. La pointe va changer de direction : c'est la **déflexion**

→ **Plus la pointe est fine plus la résolution sera bonne**

Avantages :

- Permet d'avoir une image 3D
- L'échantillon n'est pas mis sous vide
- Pas besoin de coloration
- Cellule vivante ou morte
- Non destructif

Bref c'est trop cool

## II- La fluorescence (+++)

Principe : On associe à des molécules des marqueurs fluorescents, **fluorochromes**.

Ainsi on pourra observer leur fluorescence grâce à la microscopie à fluorescence (principe microscopie confocale) sur des cellules vivantes ou mortes.

L'échantillon absorbe une lumière à une énergie donnée et une longueur d'onde donnée, et émet une lumière avec une **énergie inférieure et une longueur d'onde supérieure**.

→ **Plus l'énergie émise est grande plus petite sera la longueur d'onde !**

### A. Les différents fluorochromes

➤ La GFP(+++)

Protéine **naturellement fluorescente** découverte dans une méduse. Une **triade d'acides aminés (AA)** appelés **chromophore** lui confère ses **caractéristiques de fluorescence**. En modifiant les AA on peut obtenir des **variantes de la GFP**. On aura donc des **fluorochromes artificiels** avec une gamme d'émission et d'absorption dans tout le spectre d'excitation et d'émission.

Elle est excitée par le **BLEU** et émet dans le **VERT**



→ **La GFP est universelle : elle garde ses propriétés de fluorescence dans toutes les cellules où elle est incorporée**

➤ Rhodamine

Absorbe dans le **Vert** et émet dans le **rouge**.

➤ La FITC = fluorescéine

A des propriétés comparables à la GFP car elle absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert**.

## B. Comment rendre une molécule fluorescente (ex : GFP)

Principe : On **greffe un fluorochrome** à une protéine, ainsi on peut observer la protéine tout en **gardant théoriquement ses propriétés**. Plusieurs méthodes sont utilisées

### La micro-injection

C'est une méthode **longue et fastidieuse** qui consiste à injecter directement le fluorochrome dans la cellule à l'aide d'une micro-pipette. Chaque cellule est traitée individuellement.

### L'électroporation

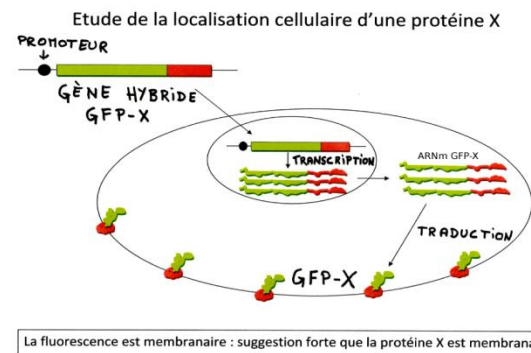
On va mettre la cellule en présence d'un **champ électrique** qui va « percer » la membrane d'une multitude de petits trous qui vont permettre de laisser entrer le fluorochrome. Les trous vont se **refermer très vite**. On va pouvoir **traiter un grand nombre de cellules à la fois**. Cette technique est **traumatisante** pour la cellule à cause du choc électrique.

### La vectorisation par vésicules

C'est la méthode **la plus douce** et la plus **naturelle**. Des **vésicules lipidiques** contiennent la **molécule fluo**, viennent **fusionner** avec la **membrane plasmique** de la cellule et déversent leur contenu dans le cytoplasme.

Inconvénient : on introduit des **nouvelles molécules** dans la cellule, et on ne sait pas si le **comportement** de la cellule n'est pas **biaisé** par cette **introduction artificielle**. Il est donc plus avantageux de faire exprimer par la cellule elle-même les molécules fluorescentes.

## C. Expression d'un gène codant pour une molécule fluo +++



Le but ici est de faire **s'exprimer la GFP** par **transgénèse**

Principe : on a un gène initial qui code pour une protéine. On va lui **greffer la GFP** et obtenir un **gène recombiné (=chimère (fluo) = hybride)**. Il sera réintégré à la cellule : c'est la **transfection**. Cependant il est indispensable d'avoir une **séquence promoteur propre à l'espèce** pour que le gène puisse être reconnu par la cellule et s'exprimer. Le gène intégré va être ensuite **transcrit en ARN puis traduit en protéine** : c'est l'**amplification**

Ainsi on pourra suivre la **localisation de la protéine grâce à la fluorescence de la GFP**

→ **Différence suggérer et démontrer** (ex avec dessin)

Ne sachant pas si la GFP induit un changement de comportement de la protéine, on pourra seulement dire que l'on **suggère** que la **protéine X** est membranaire (en temps normal peut-être que la localisation est différente). Cependant on peut **démontrer** que la **protéine GFP-X** est membranaire.



## D. Les applications de la fluorescence

Ici on aura recours au miroir dichroïque vu qu'on utilise des fluorochromes

### Le FRET (fluorescence résonance energy transfer)

Transfert d'énergie **non radiatif** qui résulte d'une interaction entre 2 molécules. Permet d'étudier

- Les **interactions entre 2 protéines** très proches (< 10 nm) : **intermoléculaires**
- Les **changements de conformation** d'une protéine au sein de la cellule : **intramoléculaire**

Principe :

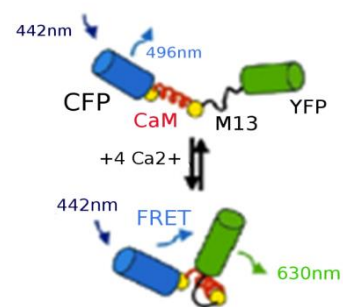
1. On envoie une **lumière d'excitation** qui excite un **premier fluorochrome**. Celui-ci renvoie une lumière d'émission.
2. Cette lumière d'émission va **exciter un deuxième fluorochrome** qui lui-même va émettre une radiation d'énergie inférieure (=lumière d'émission)

On a eu un **transfert d'énergie non radiatif** (entre les 2 fluorochromes, la lumière émise par le premier est tout de suite absorbée par le second, on ne peut pas l'observer). Ce transfert est possible à 2 conditions :

- La distance entre les deux fluorochromes ne doit pas être **supérieure à 10nm**
- **Les spectres** des 2 fluorochromes doivent se **chevaucher** au moins partiellement.

(Le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'absorption du receveur). Par exemple on peut avoir la GFP qui va absorber le **Bleu**, émettre du **vert**, ce vert va exciter la rhodamine, qui va

absorber dans le vert et réémettre dans le rouge. On ne verra que le **rouge**.



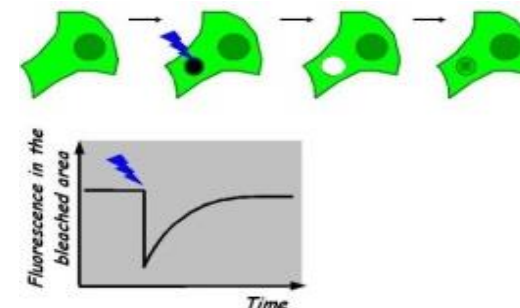
Exemple d'application : Un exemple d'application du FRET **intra moléculaire** est la **sonde calcique Caméléon**. On sait qu'en **présence de calcium**, la **calmoduline est modifiée**, change de conformation, rapprochant les deux acides aminés marqués par la CFP et la YFP. Ce **rapprochement** qui ne se fait qu'en **présence de calcium** va permettre le transfert d'énergie. **Plus il y a de calcium, plus la calmoduline change de conformation, plus le FRET a lieu, plus on observe les radiations à une longueur d'onde spécifique.**

### Le FRAP (Fluorescence RECOVERY after photobleaching)

Cette technique permet d'étudier la mobilité d'une protéine dans la cellule grâce au photoblanchiment

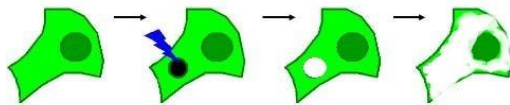
Principe : On irradie un point de la cellule fluo pendant un **court laps de temps** grâce à un laser. Le **fluorochrome perd sa fluorescence**.

On va observer la **réapparition ou non** de la fluorescence (car les protéines marqués peuvent être mobiles) **dans la zone photoblanchie**

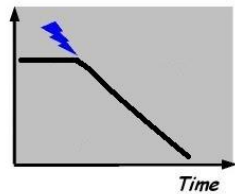


### Le FLIP (Fluorescence LOST in photobleaching)

Principe : on irradie toujours un point de la cellule mais en continue. Mais cette fois, au lieu d'étudier la zone photoblanchie, on étudie une zone située à un autre endroit de la cellule. On va voir petit à petit **disparaître** la fluorescence. On étudie la **perte de la fluorescence**. Ici, on va pouvoir déterminer la **vitesse** de déplacement des molécules fluorescentes.



*Les molécules n'étant pas immobiles, elles passent au fur et à mesure dans la zone photoblanchie et perdent ainsi leur fluorescence*



### La fluorescence induite

Ici on va utiliser des fluorochromes qui tous seuls ne sont **pas fluorescents** mais qui le **deviennent quand ils se fixent à une molécule**. On va surtout pouvoir visualiser l'**ADN** et l'**ARN**

#### ➤ **Hoescht and DAPI :**

- Reconnaît les **bases A-T**
- Ne nécessite **pas une perméabilisation de la membrane**

#### ➤ **Les intercalants :**

- Nécessite une **perméabilisation de la membrane**
- **Iodure de propyldium et bromure** s'intercalent entre les double-brins d'ADN.

➔ On va pouvoir distinguer l'**hétérochromatine** qui est de l'**ADN très condensé** (peu de transcription) car la **fluorescence** y sera **plus forte**, de l'**euchromatine** dont l'**ADN est décondensé** et où la **fluorescence** sera **moins forte**

Remarque : On ne retrouvera la fluorescence qu'au niveau du noyau, le nucléole ne sera pas coloré car c'est une partie du noyau qui ne contient pas d'ADN ou ARN

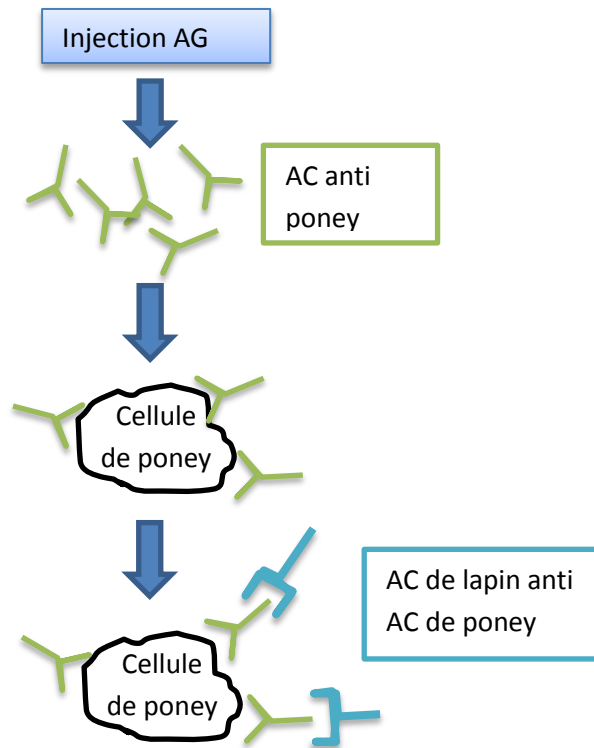
### Immunofluorescence indirecte

On procède en plusieurs étapes :

- 1) On va injecter un **antigène à un animal** (ex un lapin) pour provoquer la **création de très nombreux anticorps** (qui serviront d'anticorps primaires) contre cette molécule → Cette étape sert uniquement à la création d'anticorps primaires.
- 2) On va ensuite **recupérer ces anticorps primaires** et les **injecter dans la cellule d'intérêt** (≠ cellule du lapin) → ils vont se fixer à la molécule
- 3) On achète ensuite des **anticorps génériques (ANTICORPS SECONDAIRES)** qui vont être des «anti-anticorps» pour le lapin par exemple.  
Ils vont se **fixer sur les anticorps primaires** (de lapins, ceux qui reconnaissent spécifiquement l'antigène), mais aussi sur tous les autres

anticorps de lapins qui pourraient se trouver dans notre cellule d'étude. Cet **anticorps secondaire** est couplé à un **fluorochrome** et donc permettra de **localiser** les anticorps primaires et donc, la **protéine** qu'on étudie.

Schéma récap :



→ **Pour localiser 2 molécules à la fois, il faut que les deux anticorps primaires et les deux anticorps secondaires proviennent de deux animaux différents ET que les fluorochromes aient des longueurs d'onde d'émission différentes.**

Visualisation de la quantité de calcium dans la cellule :

La molécule Fura-2 possède des propriétés fluorescentes en fonction de sa fixation au calcium.

**L'augmentation de l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration en calcium.** Ainsi les endroits de la cellule riches en calcium seront d'avantage fluorescent (Exemple : le RE).

### Le FISH (Fluorescence In Situ Hybridation)

Il est difficile de localiser de l'ADN car il n'y a **pas d'anticorps anti ADN spécifiques**, (un anticorps ne pourra pas reconnaître spécifiquement la séquence d'un gène donné).

Le FISH peut s'appliquer à **l'ADN ou à l'ARN**.

L'ADN formé d'un **double brin** doit d'abord être **dénaturé**, c'est à dire qu'on va défaire les 2 brins qui seront chacun seuls.

On introduit alors une **sonde fluorescente** et qui possède la séquence en **nucléotide complémentaire** du gène que l'on cherche à localiser. La sonde va donc se fixer à sa moitié complémentaire. Ceci fonctionne aussi avec l'ARN (**sans dénaturation** car l'ARN n'a qu'un seul brin). On utilise le **brin anti-sens de l'ARN**.

On parle **d'hybridation** de la sonde fluorescente à l'ARN ou l'ADN.

Comment rendre la sonde fluorescente?

On peut **greffer des fluorochromes** aux nucléotides.

On peut **greffer un antigène** reconnu ensuite par un **anticorps marqué** par un fluorochrome.

