

METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE

On distingue 3 types de microscopie :

- Microscopie optique (=photonique)
- Microscopie électronique
- Microscopie à champ proche

I. La microscopie optique

**Résolution de la microscopie optique** : 200nm ( → Permet de distinguer 2 points distincts uniquement s'ils sont séparés de 200nm ou plus)

- Permet d'observer les cellules et les organites mais ne donne pas d'information directe sur les molécules.

Avec la technique standard de microscopie optique, on observe des fragments de tissus **fixés, rigidifiés, coupés** puis **colorés** (initialement les cellules sont transparentes) → **cela entraîne la mort des cellules** ☹

Il existe différentes techniques spécialisées de microscopie optique :

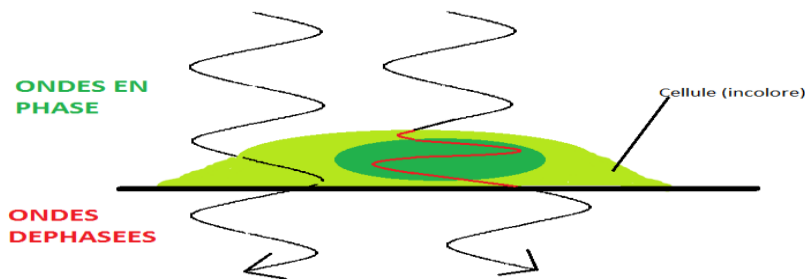
- La microscopie à contraste de phase

On utilise les propriétés de **réfraction** de l'échantillon

Le microscope va augmenter le déphasage en retardant la lumière déphasée par rapport à la lumière non déphasée.

On obtient des images **moins brillantes** mais **plus contrastées** → **plus de détails** !

**Cette méthode ne tue pas les cellules** et ne nécessite pas l'utilisation de colorants → possibilité de faire de la **microscopie time-lapse** (vidéomicroscopie) pour étudier le mouvement des cellules.



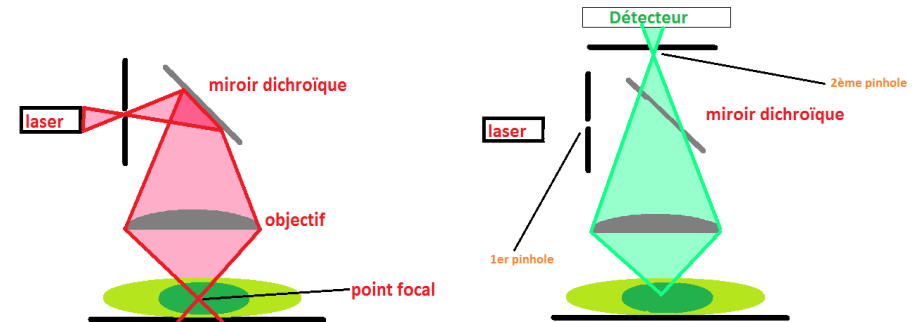
Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

- La microscopie à fluorescence

Permet d'observer des molécules de manière indirecte par émission de photons par l'échantillon (voir plus loin)

- La microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de microscopie à fluorescence. Elle a une **meilleure résolution** et permet l'étude de l'échantillon **plan par plan**.



Les **photons** émis par la source passent par un **premier pinhole** puis ils sont réfléchis sur le **miroir dichroïque** jusqu'à un **objectif** qui va concentrer les photons sur un seul **point focal** de l'échantillon).

(miroir dichroïque = miroir qui va réfléchir ou laisser passer la lumière en fonction de sa longueur d'onde)

Ensuite, au niveau de l'échantillon, les molécules fluorescentes vont émettre des photons d'une certaine longueur d'onde qui vont traverser le miroir dichroïque et un **deuxième pinhole** avant d'atteindre le **détecteur**. Ce deuxième pinhole permet de reconcentrer les photons et d'éliminer tous les photons qui proviennent d'un autre plan focal.

NB : il est possible de remplacer la source laser par une lumière blanche et de rajouter un filtre d'excitation qui sélectionnera la bonne longueur d'onde (qui sera ensuite réfléchi sur le miroir dichroïque et atteindra l'objectif).

- La microscopie optique à super résolution

C'est une technique mettant en jeu une **excitation séquentielle de différents fluorochromes**.

Permet une **amélioration de la résolution au-delà de la limite théorique des 200nm**.

## II. La fluorescence

**Principe** : On greffe à des molécules des marqueurs fluorescents (**fluorochromes**)

La fluorescence permet de visualiser les molécules dans la cellule en microscopie optique malgré la limite de la résolution de 200 nm.

Les fluorochromes vont être capables d'absorber l'énergie lumineuse et de la restituer rapidement sous forme de **fluorescence** (**radiation d'énergie inférieure**).

Une molécule fluorescente est caractérisée par une longueur d'onde qui permet son **excitation** et une longueur d'onde d'**émission** (plus grande que celle d'excitation).



**Energie** absorption > **Energie** émission

$\lambda_{\text{absorption}} < \lambda_{\text{émission}}$

⚠ QUAND L'ENERGIE DIMINUE, LA LONGUEUR D'ONDE AUGMENTE ⚠

### A. EXEMPLES DE MOLECULES FLUORESCENTES

#### ➤ GFP (Green Fluorescent Protein)

La **GFP** est une protéine naturellement fluorescente.

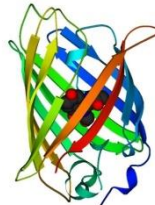
Cette protéine a la forme d'un tonneau avec au milieu **3 acides aminés** responsables de la fluorescence : le **chromophore**.

La GFP absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert**.

La modification de la triade d'acide aminé (le chromophore) permet de **modifier les propriétés spectrales de la GFP** → création de variants **bleus, jaunes, rouges...** (Fluorochromes artificiels)

La fluorescence est une **propriété intrinsèque** de la molécule, ainsi on peut exprimer cette molécule dans les cellules de n'importe quel organisme.

Remarque : à la base, la GFP est une protéine issue d'une méduse.



#### ➤ Rhodamine

La rhodamine absorbe dans le **vert** et émet dans le **rouge**

#### ➤ Fluorescéine

Absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert** (comme la GFP)

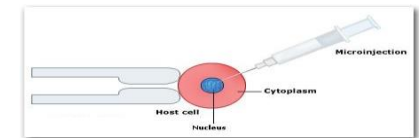
### B. COMMENT RENDRE UNE MOLECULE FLUORESCENTE ?

On greffe un fluorochrome (GFP, rhodamine...) sur la molécule à étudier pour l'observer au microscope optique. Théoriquement, cela ne modifie pas les propriétés de la molécule étudiée. Il existe ensuite plusieurs méthodes pour introduire cette molécule dans la cellule :

#### ★ La microinjection

Sous contrôle binoculaire, on injecte le fluorochrome **cellule par cellule**, à l'aide d'une micropipette en verre.

➔ Méthode **longue** et **fastidieuse**



#### ★ L'électroporation

On réalise un **choc électrique** très rapide → formation de trous transitoires dans la membrane plasmique → entrée des fluorochromes dans les cellules.



Cette technique permet de traiter beaucoup de cellules en même temps.

Cependant, elle a un défaut : elle **traumatise** la cellule

➔ Ne permet pas l'étude de phénomènes subtils.

### ★ Vectorisation par vésicules

On met les cellules en présence de **vésicules** (sphères de membrane) remplies de fluorochromes. Ces vésicules vont pouvoir **fusionner** avec les membranes plasmiques des cellules et ainsi déverser leur contenu dans leur cytoplasme.

C'est la méthode la plus douce et la plus naturelle.

### ★ Expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

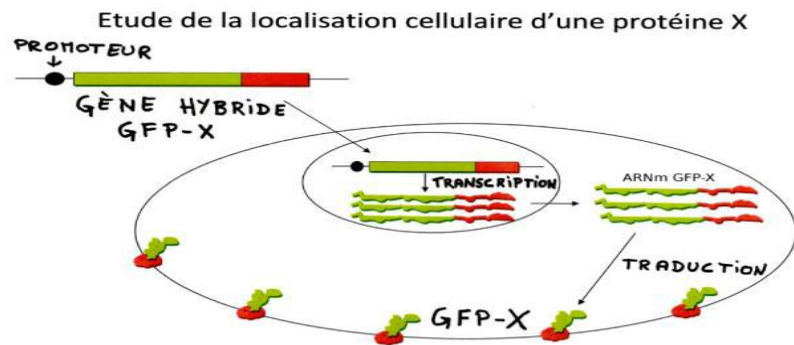
On a le gène qui code pour la protéine que l'on veut étudier. On va lui greffer la séquence nucléotidique correspondant à la GFP : on obtient un **gène hybride GFP-protéine X**.

On greffe également dans ce gène la séquence des éléments de régulation comme le **promoteur** (indispensable à la transcription de l'ADN en ARNm).

On introduit ce gène hybride dans une cellule : c'est la **transfection**.

Ce gène va être reconnu par la machinerie cellulaire comme nos propres gènes : il va être reconnu par l'**ARN polymérase** qui va le transcrire en ARNm puis cet ARNm sera traduit en **GFP-Protéine X** (protéine fluorescente) par les **ribosomes**.

Ainsi, la fluorescence va nous permettre de suivre la **localisation de la protéine** dans la cellule.



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

Par exemple, ici on observe une fluorescence au niveau de la membrane plasmique, cela **SUGGERE** que la protéine X est une protéine membranaire.

Pourquoi « **SUGGERE** » ?

### SUGGERER / DEMONTRER / COMPATIBLE

En biologie cellulaire, quand on **démontre**, c'est qu'il n'y a pas d'autre interprétation possible.



Quand on **suggère**, c'est l'interprétation la plus plausible mais ce n'est pas la seule possibilité.

Quand l'expérience est **compatible** avec un résultat, c'est qu'il y a beaucoup d'autres interprétations possibles.

Or, dans notre expérience, on a greffé un fluorochrome (GFP) à notre protéine. Cela a peut être modifié ses propriétés (notamment sa localisation cellulaire).

On ne peut donc pas démontrer que la protéine X est membranaire, cependant, on le **suggère** fortement.

En revanche, on **démontre** que la **protéine GFP-X** est membranaire.

**ATTENTION QCM** : « l'expérience démontre que la protéine X est une protéine membranaire » → **FAUX !!!**

## C. LES APPLICATIONS DE LA FLUORESCENCE

### ★ FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

Le FRET est une technique permettant l'étude des interactions moléculaires.

FRET : transfert d'énergie **non radiatif** (=sans émission de lumière) d'une molécule à une autre.

On peut étudier 2 types d'interaction moléculaire : **interaction intermoléculaire** et **interaction intramoléculaire** (changement de conformation d'une molécule).

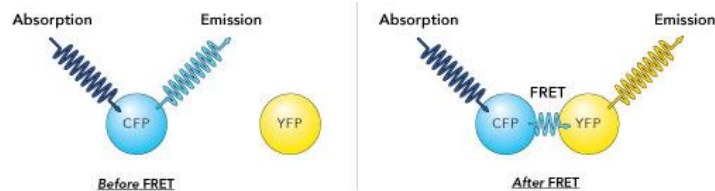
Principe : On greffe des **fluorochromes** aux molécules qu'on souhaite étudier, ensuite on envoie une **lumière d'excitation** qui va exciter le premier fluorochrome, il va donc renvoyer une **lumière d'émission**.

Cette lumière d'émission va être immédiatement captée par le 2<sup>ème</sup> fluorochrome qui va être excité à son tour et va émettre une **radiation** (d'énergie inférieure mais de longueur d'onde supérieure +++)

On ne peut pas observer la radiation du premier fluorochrome car elle est tout de suite captée par le second fluorochrome → **transfert d'énergie non radiatif**.

**2 conditions doivent être remplies pour que le transfert soit possible :**

- La **distance** entre les 2 fluorochromes ne doit pas dépasser **10 nm**.
- Le **spectre d'émission du donneur** (1<sup>er</sup> fluorochrome) doit recouvrir au moins partiellement le **spectre d'excitation du receveur**.



• Exemple de FRET intermoléculaire :

La GFP absorbe dans le **bleu** et émet dans le **vert**, la rhodamine absorbe dans le **vert** et émet dans le **rouge**. Si la protéine **X-GFP** et **Y-rhodamine** sont en interaction dans une cellule, alors lorsqu'on excite la cellule avec une radiation **bleue**, on devra obtenir une émission fluorescente **rouge**.

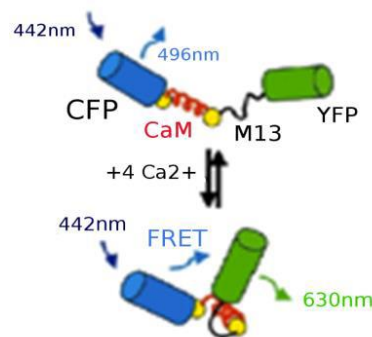
• Exemple de FRET intramoléculaire : la sonde calcique « caméléon ».

On greffe 2 fluorochromes (**CFP** et **YFP**) à la **calmoduline** sur chacune de ses extrémités (distance de plus de 10nm).

La calmoduline est une protéine qui a la capacité de fixer le calcium.

La calmoduline **change de conformation** en présence de calcium et les 2 fluorochromes se rapprochent → on peut observer le phénomène de **FRET**.

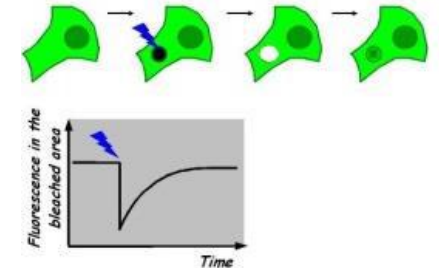
Plus il y a de calcium, plus la calmoduline se replie sur elle-même → la fluorescence est proportionnelle à la concentration en calcium dans le milieu, on peut mesurer la concentration de calcium grâce à cette sonde.



★ FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)

Le **FRAP** et le **FLIP** (voir plus loin) sont des techniques de photobleaching (photoblanchiment), on « tue » la fluorescence.

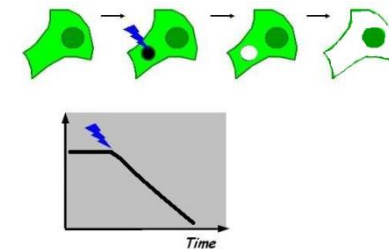
On va envoyer une lumière d'intensité extrêmement forte sur une **zone précise** de notre échantillon, cela va tellement exciter les molécules fluorescentes qu'elles vont perdre leurs capacités de fluorescence (**irréversible**).



On va observer le **retour de la fluorescence dans la zone irradiée**, c'est-à-dire qu'on mesure le déplacement des molécules fluorescentes. Cela nous renseigne sur la dynamique des molécules dans la cellule.

★ FLIP (Fluorescence loss in photobleaching)

C'est toujours le même principe mais cette fois on **irradie en continue**. Toutes les molécules arrivant dans la zone d'irradiation perdent leur fluorescence.



On étudie une autre zone que la zone irradiée : on peut mesurer la vitesse de déplacement des molécules fluorescentes du site d'analyse au site irradié.

★ La fluorescence induite

Les colorants utilisés ici ne deviennent fluorescents que lorsqu'ils sont en contact avec la molécule étudiée. On utilise souvent ces techniques pour visualiser les **acides nucléiques** (ADN, ARN).

On distingue 2 types de colorants :

- Les colorants se fixant spécifiquement sur les paires de bases (**Hoechst** et **DAPI** spécifiques des bases **A-T**)
- Les **intercalants** : iodure de propidium et bromure d'éthidium (se fixent entre 2 brins d'ADN peu importe la séquence nucléotidique)

Ces colorants permettent de distinguer l'**hétérochromatine** (ADN très condensé donc fluorescence très forte) et l'**euchromatine** (ADN peu condensé donc fluorescence plus faible).

- ➔ L'ADN n'est pas réparti de manière homogène dans le noyau donc on a une coloration hétérogène avec ces colorants.

Remarque : lorsqu'on colore l'ADN d'une cellule, on remarque des zones non colorées (il s'agit des **nucléoles** car ils contiennent très peu d'ADN). Le nucléole est un **sous compartiment nucléaire**.

### ★ L'immunofluorescence indirecte

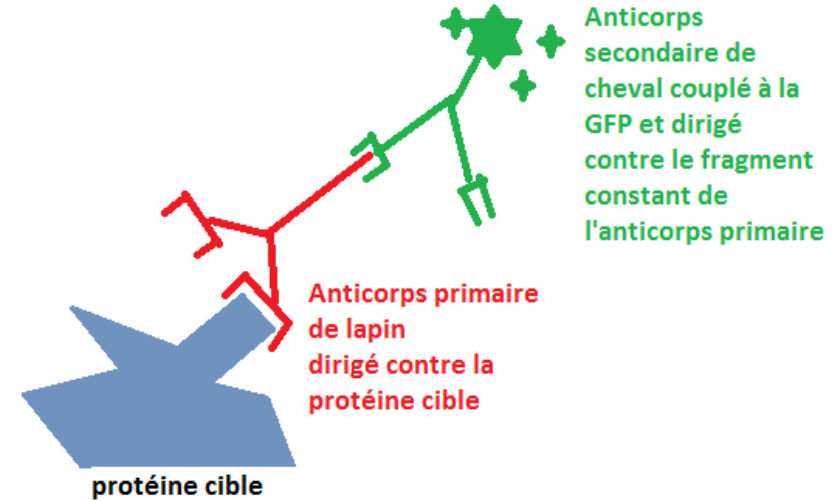
On utilise des **anticorps fluorescents** pour marquer les molécules à étudier et les visualiser en microscopie optique, cette technique permet d'éviter les modifications génétiques de la cellule. On peut rendre artificiellement les anticorps fluorescents en les couplant chimiquement à des fluorochromes.

La **protéine** joue le rôle de l'**antigène**. Sur cette protéine il y a plusieurs **épitopes** (zones que les anticorps reconnaissent). Pour plus de précision, on va utiliser des **anticorps monoclonaux** (mélange d'anticorps qui ne reconnaissent qu'un seul épitope).

Pour la technique d'immunofluorescence indirecte, on a besoin de 2 types d'anticorps :

- **Les anticorps primaires**, dirigés contre la protéine d'intérêt.  
**Comment obtient-on ces anticorps ?**  
On injecte à un animal l'antigène (la protéine d'intérêt). L'animal va créer des anticorps pour se défendre et on ira les récupérer.
- **Les anticorps secondaires**, dirigés contre l'anticorps primaire (ils reconnaissent la partie constante des anticorps primaires) et couplés à des fluorochromes. Ils permettent de localiser les anticorps primaires et donc les protéines d'intérêt.

Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.



**QCM +++ : choisir le bon anticorps et le bon fluorochrome associé.**

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

**Pour visualiser et distinguer 2 protéines différentes, il faudra que les fluorochromes greffés sur les 2 anticorps secondaires aient des propriétés spectrales différentes. De plus, les 2 anticorps primaires devront provenir de 2 espèces différentes** (sinon les 2 anticorps primaires auront le même fragment constant, ils seront donc reconnus par le même anticorps secondaire et on ne pourra donc pas distinguer les 2 protéines).

**Les 2 anticorps secondaires doivent également provenir d'espèces différentes.**

### ★ FISH (fluorescence in situ hybridization)

Le FISH, c'est l'hybridation in situ d'acides nucléiques (ADN, ARN) avec des molécules fluorescentes.

On ne peut pas utiliser d'anticorps car ils ne peuvent reconnaître que des structures protéiques. Il n'existe pas d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement un gène.

Cette technique passe par l'utilisation de **sondes fluorescentes spécifiques d'une séquence nucléotidique**. Ces sondes vont permettre de marquer spécifiquement dans l'ADN un gène en particulier (à la différence des techniques de fluorescence induite qui marquaient tout l'ADN).

On utilise la propriété des acides nucléiques à s'hybrider lorsqu'ils reconnaissent leur séquence complémentaire. On va donc créer une **sonde complémentaire au gène d'intérêt** (soit on greffe directement des fluorochromes aux nucléotides, soit on greffe un antigène qui sera reconnu par un anticorps fluorescent).

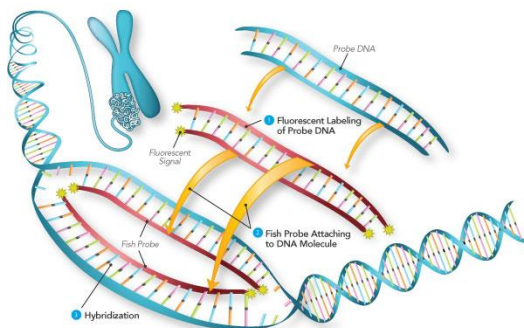
Principe :

- Par un **traitement chimique ou thermique**, on **dénature les liaisons hydrogènes** qui unissent les 2 brins d'ADN
- On rajoute la sonde fluorescente à cet ADN dénaturé

Si le gène est présent, la sonde va s'hybrider et on va voir apparaître la fluorescence. Si le gène n'est pas présent on n'aura pas de fluorescence.

Remarque : La sonde doit être **suffisamment longue** pour être **spécifique** d'un gène donné.

La technique du FISH permet également de trouver la **localisation des ARNm** dans la cellule en les hybridant avec une sonde fluorescente (pour les ARN, il n'est pas nécessaire de passer par une étape de dénaturation car ils ne sont pas double brin).



### III. La microscopie électronique

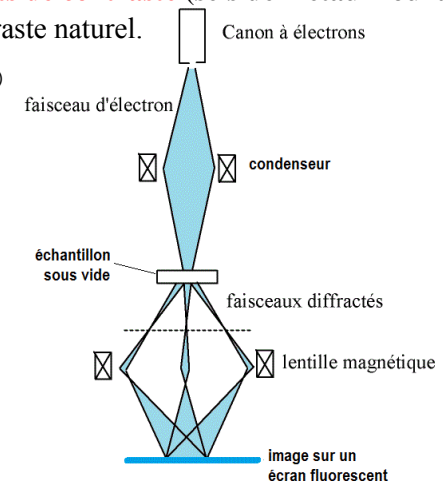
**Résolution de la microscopie électronique** : **0,2nm** → permet d'avoir un accès direct aux molécules.

L'échantillon est :

- **fixé** avec des agents de fixation (fixent toutes les interactions moléculaires)
- **Déshydraté** avec des bains d'alcool (  $\Delta$  en enlevant l'eau, on se prive d'informations liées à la présence d'eau dans un échantillon normal)
- **Inclus dans une résine d'Epoxy** (permet de le couper de manière très fine)

On utilise également des **agents de contraste (sels de métaux lourds)** car les échantillons n'ont pas de contraste naturel.

→ Cela tue les cellules ☹



#### A. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Un faisceau d'électron est focalisé sur l'échantillon sous vide grâce à des lentilles électromagnétiques.

**Les électrons traversent l'échantillon**, l'image est donnée par la résultante des contrastes entre les zones perméables et imperméables aux électrons.

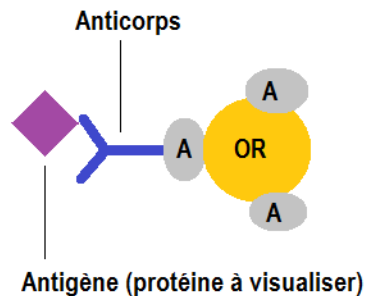
Il existe des techniques spécialisées de microscopie électronique à transmission :

### ➤ Le marquage à l'or

Avec la résolution de la microscopie électronique, on peut voir les molécules mais on n'arrive pas forcément à les identifier. Le marquage à l'or permet de marquer **spécifiquement** des molécules (l'or ne laisse pas passer les électrons).

Principe : On utilise des anticorps dirigés contre la protéine à visualiser. On rajoute une protéine de staphylocoque : la **protéine A**, qui a la propriété de pouvoir se fixer sur tous les anticorps. La protéine A utilisée est couplée à l'or.

Donc on a notre protéine d'intérêt qui est reconnue par l'anticorps de manière spécifique, lui-même reconnu par la protéine A qui est couplée à l'or → la protéine d'intérêt est marquée.



### ➤ L'ombrage

C'est une technique de visualisation indirecte de l'échantillon qui permet d'étudier la surface de l'objet.

Sous vide, l'échantillon est bombardé de métaux lourds qui vont créer une réplique en métal de l'objet. On dissout ensuite l'objet dans de l'acide et on n'observe que la réplique métallique en envoyant le faisceau d'électrons dessus (les électrons ne traversent pas).



Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

### ➤ La cryomicroscopie

C'est une technique qui permet d'éviter la fixation chimique et donc la dénaturation.

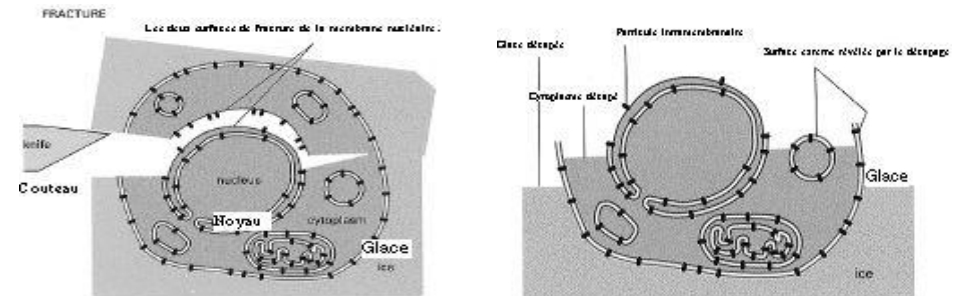
Principe : L'échantillon est **congelé** dans de l'azote liquide puis **fracturé** sous vide (**cryofracture**).

On fait passer un **couteau** qui va passer entre les 2 feuillets de la membrane plasmique (la membrane plasmique est formée par 2 feuillets lipidiques).

On va **augmenter les reliefs** en **décapant** l'échantillon par sublimation de la couche superficielle de glace. Ensuite on **augmente les contrastes** en vaporisant une fine couche de **platine** et de **carbone** → on obtient une **réplique**.

Finalement, on détruit l'objet avec de l'acide et on observe la réplique au microscope électronique.

On obtient des images de bonne résolution, c'est une technique de choix pour l'étude des reliefs des organites et des membranes.



### B. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

La résolution est un peu moins bonne : **10nm**, mais on visualise les images en 3D.

On l'utilise pour visualiser les surfaces des **cellules** et des tissus (**reliefs**).

Les électrons sont accélérés à une très forte tension et sont toujours **réfléchis** à la surface de l'échantillon, on recueille l'émission d'**électrons secondaires** (électrons qui ont été réfléchis).

Cette technique permet également de travailler sur des **échantillons vivants** (mais on ne peut les maintenir en vie que peu de temps).

## IV. La microscopie à force atomique

Elle fait partie des techniques de microscopie à **champ proche**. Elle est basée sur les **forces répulsives** entraînant la déflexion de la pointe qui entraîne la déviation du laser.

La microscopie à force atomique nous donne une **image directe** de l'échantillon à l'échelle atomique.

Elle permet de mesurer des volumes, elle peut être utilisée en phase liquide, ne nécessite pas de coloration et est non destructive !

Principe : on balaye l'échantillon à l'aide d'une pointe très fine. Dès que la pointe détecte une surface grâce aux forces de proximité, le microscope l'enregistre grâce à un dispositif laser. Ensuite l'ordinateur convertit ces forces de proximité en image.

**Résolution égale ou meilleure que la microscopie électronique.**

**Plus la pointe est fine, plus la résolution sera bonne.**

Vidéo explicative : <https://www.youtube.com/watch?v=0jP7baCqFLw>

