

Méthode d'étude des cellules: la microscopie

Il faut distinguer 2 grands types de microscopie: la microscopie **optique (photonique)** et la microscopie **électronique**.

I. La microscopie optique

A. La microscopie photonique standard

La résolution est caractéristique des photons (200nm), on peut observer la cellule et ses organites mais pas directement les molécules.

La résolution est la capacité à distinguer deux points distants l'un de l'autre. La résolution minimum de l'oeil nu est de 0,2mm.

Un faisceau de lumière est projeté sur un condenseur et se reflète sur la préparation, passe à travers l'objectif et nous pouvons voir une image à travers le globe oculaire.

Problème: les cellules apparaissent **transparentes**, on utilise alors des **colorants** (après avoir fixé, déshydraté, rigidifié) ce qui modifie la structure des cellules.

⇒ Microscopie utilisée en recherche (histologie) car elle permet d'observer des échantillons de tissu.

❖ La microscopie à contraste de phase

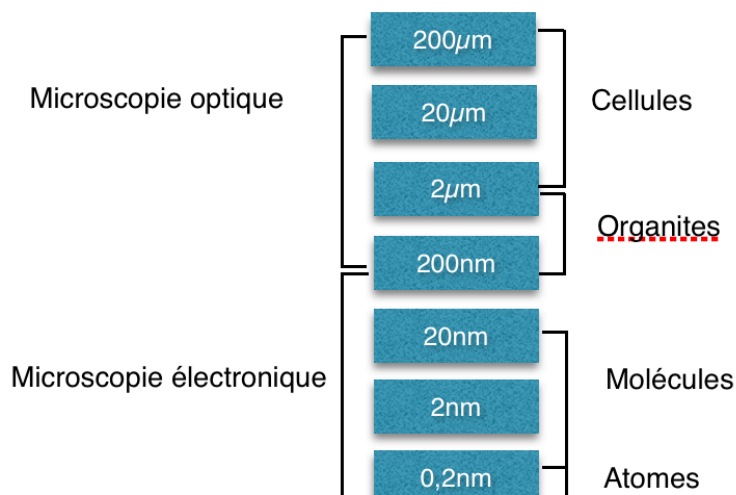
Technique permettant de voir des cellules vivantes en utilisant les propriétés de réfraction de l'échantillon on observe les différences de contraste.

Les structures biologiques induisent des changements de phase lorsque la lumière les traverse.

On a la longueur d'onde qui est déphasée lorsqu'elle traverse l'échantillon et le microscope de phase va justement amplifier ce déphasage ce qui permet d'**améliorer le contraste**.

Le contraste étant du aux variations des indices de réfraction des différents milieux cellulaires.

A l'aide de ces microscopes et de micro caméras, il est possible de faire du **microcinéma** ou **microscopie « time lapse »** de cellules vivantes on peut donc étudier les mouvements de la cellule.



B. Microscopie photonique à fluorescence

Une molécule fluorescente a la propriété **d'absorber** de la lumière appelée (**lumière d'excitation**) et de la **restituer** instantanément (<1ns) sous forme de lumière fluorescente (**lumière d'émission**).

☆ Principe

Au départ on a une source de lumière blanche (lumière photonique) qui passe à travers un **filtre** qui va sélectionner un type de lumière (ex: lumière bleue)

Cette lumière bleue vient se réfléchir sur un **miroir dichroïque** (miroir qui laisser passer certaines longueurs d'ondes et réfléchi les autres).

La microscopie à fluo permet:

- **Localisation** de molécules spécifiques
- Les marqueurs fluorescents (**fluorochromes**) peuvent être **associés directement ou indirectement**
- On peut **combiner** différents fluorochromes simultanément.
- Les cellules peuvent être **fixées ou vivantes**.

👑 La GFP

Bioluminescence: production et l'émission de lumière par un organisme vivant résultant d'une réaction chimique.

La première protéine naturelle fluo a été découverte dans une méduse.

- Forme tridimensionnelle en tonneau possédant 3 AA (chromophore) responsable de la fluo.
- **2 maxima d'excitation** : à 395nm (**UV**) et à 475nm (couleur **bleu**)
- Excitée la GFP **émet** une longueur d'onde autour de 500nm (couleur **verte**)
- Propriété de fluo intrinsèque, non modifiée lorsqu'elle est insérée dans des organismes.

Grâce aux mutations, on a obtenu plusieurs variants de la GFP (en changeant les 3AA du chromophore).

- **Fluorescéine** qui émet dans le **vert** quand elle est excitée dans le **bleu**
- **Rhodamine** qui émet dans le **rouge** quand elle est excitée dans le **vert**)

♣ Introduction de molécules fluorescentes

1) Microinjection

Injection cellule par cellule avec une micropipette.

↔ Procédé long et fastidieux

2) Electroporation

Choc électrique très court qui crée des trous transitoires dans la membrane.

↔ faire rentrer des molécules (protéines, portions d'ADN...)

3) Vectorisation par vésicules

Moins traumatisante (phénomène naturelle) c'est la fusion des vésicules à la membrane plasmique.
 ⇒ introduction du matériel créé en labo par endocytose.

4) Exprimer un gène codant une protéine fluorescente

Expérimentation plus lourde, elle a pour but de faire exprimer directement par la cellule une protéine hybride fluo.

En laboratoire, on obtient un gène possédant les propriétés qui nous intéressent ainsi que des propriétés de fluo puis on le fait pénétrer dans la cellule par vésication ou électroporation. C'est ce qu'on appelle la **transfection**.

Attention: le gène doit aussi posséder une séquence promoteur: elle est spécifique de chaque espèce et permet à la cellule de reconnaître et d'intégrer le gène, elle est indispensable.

⇒ gène intégré → ARN → ADN → protéine

Intérêt: Rendre une protéine endogène observable par fluo. et de suivre sa localisation dans la cellule grâce à la microscopie fluo.

Important: Si on suit une protéine hybride fluo et qu'elle devient membranaire, cela suggère que cette protéine soit membranaire mais ne le prouve/démontre pas.

Nous sommes ici dans un système artificiel où chaque portion de gène peut influencer l'autre, c'est la raison pour laquelle on ne peut pas démontrer.

☞ *La transfection n'est possible que pour les fluorochromes protéiques comme la GFP, mais pas pour les petits fluorochromes non protéiques.*

❖ FRET (fluorescence résonance energy transfer):

Le FRET se définit comme le transfert d'énergie sans émission de lumière (**non radiatif**).

Ce transfert d'énergie résulte de l'interaction entre deux molécules (en fait l'énergie lumineuse émit par une molécule est absorbé par une autre qui à son tour émet de la lumière).

Pour que ce transfert se produise il faut que les 2 molécules soient très proches (<10nm).

Conditions physiques: le spectre d'émission de la première molécule doit recouvrir le spectre d'absorption de la 2ieme molécule.

Il existe deux utilisations de cette technique:

- **intermoléculaires** (entre 2 molécules)
- **intramoléculaire**: étude de la conformation moléculaire (on peut greffer à chaque extrémité d'une molécule capable de se replier, un fluorochrome. Si la molécule se replie portant ainsi les deux fluorochromes à moins de 10nm, on pourra observer un signal du FRET.)

☞ *La calmoduline est une protéine qui se replie en présence de calcium.*

Exemple de FURA2:

Cette molécule est **lipophile** (traverse la mb plasmique). Plus il y a de calcium fixé sur cette molécule, plus elle devient fluorescente. C'est cette caractéristique qui est utilisée pour mesurer la quantité de calcium, selon l'intensité de fluorescence on en déduit la **quantité de calcium**.

❖ FLIP/ FRAP

Technique de photoblanchiment: on tue de manière irréversible la fluorescence pour étudier la dynamique des protéines de la cellule.

☞ *Seule la fluorescence est détruite pas la molécule!*

FRAP: Irradiation laser pendant un **court instant**, puis on observe la **réapparition** fluo dans cette zone.

FLIP: Irradiation **continue** au laser et on analyse **un autre point** que la zone irradiée.

☞ diffusion des molécules voisines vers la zone irradiée pour rétablir la fluo = **disparition** de fluo

❖ Fluorescence induite

Cette technique permet essentiellement **d'étudier les acides nucléiques** (ADN + ARN). Le colorant va venir se fixer spécifiquement sur des paires de base.

On en compte 2 types:

- **Hoechst et Dapi** (+ utilisés) se fixent sur les **bases A-T**.

- **Les intercalants** de l'ADN, qui vont venir se fixer **entre** les brins d'ADN de façon **non spécifique** (Bromure d'éthidium et Iodure de Propidium).

Les zones **d'hétérochromatine** (ADN condensé) vont prendre une coloration intense tandis que les zones **d'euchromatine** (décondensé) vont exprimer une fluorescence plus faible.

❖ Immunofluorescence indirecte

Technique immunochimique utilisant des anticorps couplés à un fluorochrome.

On fait intervenir plusieurs anticorps:

- **Un premier qui sera spécifique de la molécule étudiée** → l'anticorps primaire

- **L'anticorps secondaire fluorescent car fixé à un fluorochrome** (reconnait le 1er AC de façon spécifique)

!! L'AC SECONDAIRE DOIT OBLIGATOIREMENT PROVENIR D'UNE AUTRE ESPECE QUE CELLE DE L'AC PRIMAIRE !!

Comment fabriquer les anticorps polyclonaux? monoclonaux?

Par **injection d'un antigène dans un animal**.

On va donc **stimuler les Lymphocytes B pour produire des Anticorps**. Beaucoup de cellules B différentes peuvent être stimulées par le même antigène, donnant un mélange d'anticorps légèrement différents (du fait des épitopes) mais reconnaissant tous le même antigène (**anticorps polygonaux**).

Sur l'Ag il existe plusieurs parties (**épitopes**) capables d'être reconnus par des Ac. On perd donc en spécificité avec les Ac polyclonaux.

On va créer un **hybridome** (fusion entre une cellule cancéreuse et des lymphocytes)

Des **techniques de dilutions** sont utilisées pour récupérer les hybridomes d'intérêt.

On va ensuite tester chaque hybridome dans chaque puits pour voir contre quel épitope ils agissent, **c'est le criblage d'hybridomes**.

Le criblage permet donc de **sélectionner nos anticorps d'intérêt qui sont monoclonaux c'est à dire qu'ils sont seulement dirigés contre un seul épitope de la protéine X**.

❖ Hybridation in situ: FISH

Visualiser des acides nucléiques (ADN, ARN) par des sondes fluorescentes spécifiques (complémentaires) soit de certains gènes, soit de chromosomes.

On compte 3 étapes principales:

1. L'étape de **dénaturation**: les 2 brins d'ADN vont être **séparés**.
2. L'étape **d'hybridation**: la sonde fluo vient former un hybride spécifique avec l'ADN simple brin.
3. L'étape de **révélation**: cette sonde est marquée directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes. !

⇒ L'hybridation des séquences nucléiques complémentaires sera **visualisée en fluorescence**.

Comment rendre une sonde fluorescente?

- Soit elle est **directement** marquée, en incorporant des nucléotides qui eux sont marqués.
 - ⇒ l'amplification du signal n'est pas nécessaire car notre sonde est d'emblée fluorescente.
- Soit elle est **indirectement** marquée par un complexe antigène-anticorps.
 - ⇒ C'est plus long car il y a une étape en plus, celle de l'immunoréaction.

☞ On peut observer des chromosomes métaphasiques, des noyaux interphasiques, des suspensions nucléaires, des coupes tissulaires, un gène donné, le caryotype (méthode sky).

☞ Le FISH permet également de visualiser des ARNm (il n'y a pas de dénaturation car ARN = simple brin).

C. Microscopie à super résolution

L'intérêt est encore d'augmenter la résolution (de l'ordre du nanomètre).

Basée sur l'**excitation séquentielle des fluorochromes**.

Contrairement à la microscopie optique traditionnelle dans laquelle on excite toutes les molécules en même temps on va « allumer » au fur et à mesure nos zones d'intérêt afin d'avoir une image plus nette.

On balaye tout l'échantillon et on obtient notre image en 3D..

⇒ Il y aura une **excitation et une extinction séquentielle des fluorochromes selon l'excitation ce qui permet d'observer une image beaucoup plus nette**.

D. Microscopie confocale

Exploration tridimensionnel des cellules et des tissus. Le principal intérêt est d'augmenter la résolution et de travailler sur des échantillons épais dont on va pouvoir percevoir une image en 3D.

On travaille sur du matériel fixé ou vivant, il est possible de réaliser des études dynamiques de la cellule et des interactions moléculaires.

☆ Principe

On a un Laser qui va passer par un diaphragme (ou pinhole).

Il est réfléchi par notre miroir dichroïque et passe à travers l'objectif.

Cela illumine notre échantillon fluorescent sur un **point focal très précis** (de très petite taille).

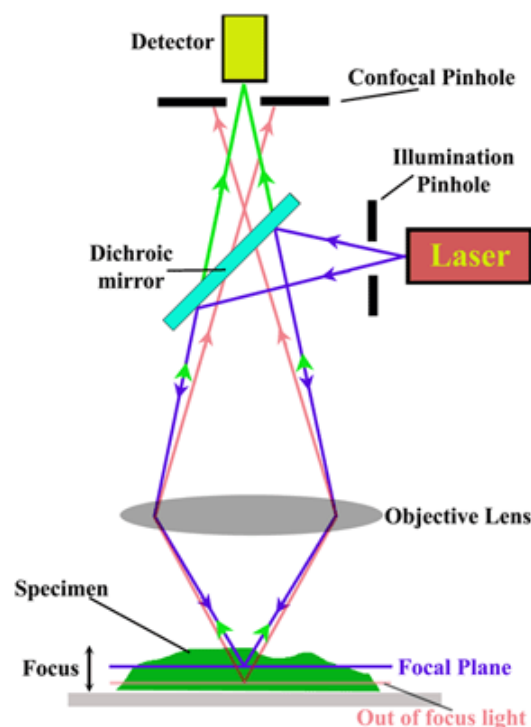
A son tour la fluorescence émise va être renvoyée et traverser le miroir dichroïque, puis le diaphragme (ou pinhole) et venir au niveau du détecteur.!

La lumière qui arrive en dehors du pinhole ne passera pas, **seule celle passant par le pinhole sera détectée.!**

-> Cela permet d'obtenir des images très précises et très nettes et d'analyser l'échantillon dans son épaisseur.!

C'est en focalisant le Laser sur différents points de l'échantillon que l'on obtient différentes coupes de sections qui seront remises ensemble par un traitement numérique (technique de balayage qui déplace le Laser sur tout l'échantillon) afin de donner une image en 3D.!

👉 Application clinique en dermatologie (dépistage mélanomes) car permet de distinguer l'épaisseur.



II. La microscopie électronique

La microscopie électronique permet de **séparer deux points distants de 0.2nm**.

☞ On se situe au niveau des **organelles** mais aussi des **molécules**.

Les électrons ont un pouvoir de pénétration inférieur à celui des photons, **la résolution est donc plus important mais la pénétration est diminuée**.

Comment préparer nos échantillons?

1. Ils sont tout d'abord **fixés** (glutaraldéhyde++) puis **déshydratés**.

⇒ **La déshydratation est une étape capitale et importante puisque les observations en microscopie électronique se font sous vide!**

2. Ensuite l'échantillon est **enrobé dans une résine** (en époxy, résine très dure).

3. On utilise après un **ultramicrotome** pour couper des coupes ultra-fines de 50 à 100nm.

4. On monte ces coupes ultra-fines sur des grilles puis **coloration avec des métaux lourds**.

A. La microscopie à transmission

On a un canon à électrons qui génère un faisceau d'électron qui va traverser la préparation préalablement traitée aux sels de métaux lourds.

☞ **Les sels de métaux lourds (denses aux électrons) permettent de colorer, d'augmenter le contraste.**

☆ Principe

Le faisceau d'électrons est **accélééré** car il est **soumis à une différence de potentiel de plusieurs kiloVolts**. Il passe à travers le **condenseur** et va heurter notre échantillon.

Selon la densité le faisceau va passer plus ou moins et on détectera l'image sur un **écran fluorescent**.

Avantages:

- Permet de très bien **visualiser les contours** de la cellule.

- **Distinguer la paroi** avec la double membrane, le noyau, les mitochondries, l'appareil de Golgi et même les ribosomes (sous forme de petits points)!

⇒ **Plus une structure cellulaire est dense aux électrons plus elle apparaîtra foncée!**

❖ Le marquage à l'or

Equivalent de l'immunofluorescence en microscopie photonique. On peut observer des protéines avec la résolution de la ME, pour cela on rend la protéine **opaque aux électrons**.

⇒ Permet d'identifier une protéine d'intérêt.

Dispositif:

Les coupes d'échantillons sont mises en présence d'Ac dirigés contre la protéine que l'on veut visualiser. **Ces Ac couplés à des particules d'or**. Pour cela on mélange les Ac à une solution de protéine A associées à des particules d'or. Les protéines A ont pour propriété de reconnaître toutes les **immunoglobulines** (Ac) et donc lorsque l'Ac reconnaît la protéine étudiée, on aura une zone opaque aux électrons due aux particules d'or.

☒ Exemple:

Sur une coupe d'hépatocyte on a essayé de colorer à l'or une enzyme, la **catalase**, qui est contenue dans les **péroxyosomes** et qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en H₂O₂.

Les péroxyosomes sont visibles par les **structures ovalaires** et on remarque qu'ils contiennent de multiples **petits points noirs** qui sont justement nos enzymes (la catalase) qui ont fixé l'or.

⇒ Cette technique permet donc de localiser l'enzyme dans les organismes.

❖ Coloration par l'ombrage

Le but ici est de faire une **empreinte** ou une **réplique** de notre échantillon que l'on veut analyser.

⇒ Permet la visualisation précise des surfaces (cellulaires et moléculaires).

Dispositif:

On dépose notre échantillon sur une surface des mica. Une électrode de métaux lourds projette des métaux sur ce dernier, cette vaporisation permet de former une réplique dont l'épaisseur varie en fonction de l'angle de vaporisation. On élimine l'échantillon situé sous la couche de métal grâce à un traitement acide, on obtient donc uniquement la réplique.

Attention: Ceci permet une visualisation **indirecte** puisqu'on réalise un moulage de l'échantillon ! De plus la manipulation se fait dans le vide.

❖ La cryomicroscopie

Permet également de visualiser les surfaces en donnant un aspect tridimensionnel et ce qui a le gros avantage de ne pas passer par l'étape de fixation ni de coloration.

C'est la technique de choix pour visualiser les reliefs des organites et les membranes cellulaires.

Dispositif:

- **Congélation ultra-rapide** (-150° à l'azote liquide) de l'échantillon, permet de durcir le matériel et de préserver l'organisation interne de l'échantillon.

- **L'échantillon congelé est fracturé sous vide** (couteau avec une lame de verre ou par automate) puis il est **décapé par sublimation** de la couche superficielle de glace dans le but d'augmenter les reliefs.

Généralement la ligne de fracture passe par les zones de moindre résistance, l'échantillon se cassera de manière préférentielle.

⇒ *L'avantage c'est que **nos protéines intra-membranaires seront intactes.***

- **Vaporisation d'une fine couche de platine et de carbone** pour solidifier, on obtient alors comme dans la coloration par ombrage un moule de la surface. Cela augmente le contraste et la résistance mécanique.

- **Les tissus sont dissous et la réplique observée.** Les zones riches en platine apparaîtront noires tandis que les zones sans platine laisseront passer les électrons et apparaîtront blanches et les zones sans relief seront grises car on aura une répartition uniforme des sels de platine.

B. La microscopie à balayage

Elle est plus récente et la résolution est moins bonne (environ 10nm).

Principe: l'échantillon analysé est balayé par un faisceau d'électrons qui **ne pénètre pas** mais qui va seulement en exciter la surface et émettre des électrons secondaires qui seront recueillis par un détecteur

L'échantillon est fixé et recouvert de métaux lourds. Cela permet de visualiser les surfaces des cellules ou des tissus en nous donnant un aspect tridimensionnel.

⇨ Le faisceau d'électrons est réfléchi par l'échantillon.

☞ *Il est possible de visualiser plein de choses comme des fibres de collagène, des neurones avec leurs faisceaux d'axone...*

III. La microscopie à force atomique

On se situe au niveau des **molécules et des atomes**.

Utilisée **sur tout types de matériaux, sans altérer l'échantillon, et à l'air** elle permet de voir une image directe à l'échelle **atomique** si l'état de la surface le permet (surfaces peu rugueuses).

On a aussi une cartographie des forces atomiques qui sera transformée en une image et nous révélera la topographie d'un échantillon.

Cela va de la fraction de micromètres à des dizaines de nanomètres.

Une pointe vient à la surface de l'échantillon mais ne rentre pas en contact avec cette dernière (à cause des forces de déflexion). Le Laser va venir se refléter au niveau de la pointe et la réflexion va être transmise sur une photodiode.

Selon les forces exercées, par exemple lors d'une force de répulsion, la pointe va monter et le faisceau Laser va être dévié sur le photodiode et c'est ce qui va nous permettre de **détecter les variations de relief de l'échantillon**.

-> **Plus la pointe sera fine, meilleure sera la résolution**

Avantages:

- Résolution limitée par la taille de la pointe, non la diffraction
- Peut mesurer des volumes (3D) et voir les surfaces de l'échantillon
- Non destructif
- Pas de coloration
- Peut être utilisé en milieu liquide contrairement à la microscopie électronique
- Moins cher que la microscopie électronique