

Méthodes d'étude de la cellule

I) Introduction

✚ 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.

II) La microscopie optique

A) Microscopie optique conventionnelle

✚ Principe : un condensateur va concentrer la lumière sur notre échantillon et notre œil observe l'image agrandie.

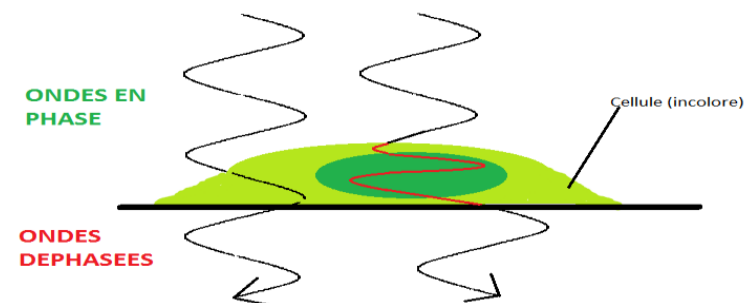
Il est nécessaire de **fixer** l'échantillon pour une bonne observation. La fixation cherche à rendre l'échantillon plus rigide. On utilise des traitements chimiques ou encore des colorants, ce qui dénature l'échantillon.

NB : La fixation tue la cellule.

Donc : On peut observer des cellules vivantes en microscopie optique mais avec une faible résolution (praticable sur de grosses cellules) ou des cellules fixées (donc mortes) avec une meilleure résolution.

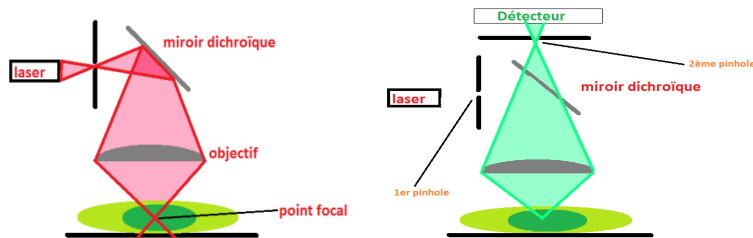
B) Contraste de phase

Ici, on utilise les propriétés de réfraction de l'échantillon. Le microscope va amplifier le **déphasage** ce qui va augmenter le contraste de l'image. Pas de fixation, pas de colorants, donc on peut étudier des échantillons vivants et faire du **time lapse** (=micro-cinéma ou vidéo en image par image).

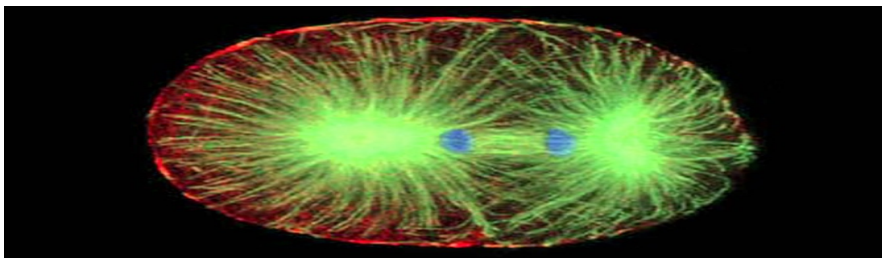


C) Microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de microscopie à fluorescence, elle permet l'étude tridimensionnelle des cellules et des tissus.



Cette technique permet d'enlever 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. Elle permet d'avoir des images 3D et d'étudier des échantillons épais (*ex* : *embryon*).



III) La fluorescence

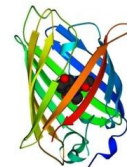
A) Principe

Une molécule fluorescente a la capacité d'absorber de l'énergie (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). On va donc greffer aux cibles que l'on souhaite observer des marqueurs fluorescents (= fluorochromes) afin de facilement les repérer.

B) Différents fluorochromes

1) GFP (Green Fluorescent Protein)

La GFP est une molécule qui est naturellement fluorescente. La fluorescence est une **propriété intrinsèque** de la GFP, il est donc possible d'exprimer cette molécule dans n'importe quelle cellule. La GFP absorbe dans le bleu et émet dans le vert.



2) Rhodamine

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

3) Fluorescéine

La fluorescéine absorbe dans le bleu et émet dans le vert.

C) Introduction de molécules fluorescentes

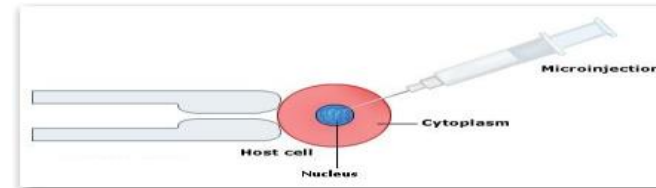
Il suffit de greffer le fluorochrome à la molécule que l'on souhaite étudier (le plus souvent une protéine). Cela ne modifie pas, en général, les propriétés de la molécule étudiée. Plusieurs méthodes existent pour introduire cette molécule dans la cellule.

une micropipette le fluorochrome, cellule par cellule.

1) La microinjection

Sous microscope, on injecte avec

Technique longue et fastidieuse. Peu utilisée.



2) 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 MB plasmique et permettra l'entrée du fluorochrome dans la cellule.

Cette technique permet de traiter beaucoup de cellules à la fois cependant elle est non physiologique et traumatisante pour la cellule.

3) Vectorisation par vésicule

On met les cellules en présence de vésicules contenant le fluorochrome, puis, par endocytose les vésicules franchissent la membrane et déversent leur contenu dans le cytoplasme.

♥ C'est la méthode la plus douce et la plus physiologique qui existe.

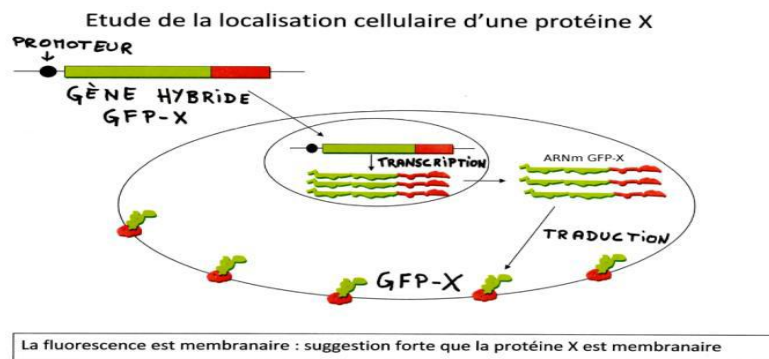
4) Expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

Ici le but n'est pas d'introduire la molécule fluorescente dans la cellule mais plutôt de la **faire exprimer** directement par cette dernière.

On connaît le gène qui code pour la protéine d'intérêt, on lui greffe la séquence nucléotidique de la GFP pour obtenir un gène hybride GFP-protéine.

On **transfecte** ce gène hybride dans la cellule, il sera ensuite reconnu par la machinerie cellulaire comme un gène appartenant à la cellule, enfin il sera transcrit par l'ARN polymérase en ARNm puis traduit en notre protéine de fusion GFP-protéine.

Ainsi, la fluorescence exprimée par cet hybride va nous permettre de trouver la localisation de la protéine d'intérêt.



ATTENTION : distinction suggérer/démontrer :

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

Ici, par exemple on suggère que la protéine de fusion est membranaire mais on ne peut pas le démontrer ; en effet **peut être que l'hybridation du gène** (GFP-protéine) a **modifié** certains paramètres de ce dernier comme par exemple sa localisation.

D) Application de la fluorescence

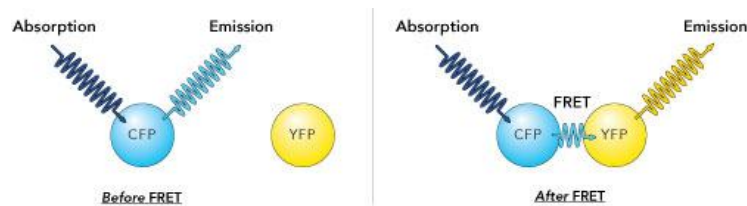
1) FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

- + **Définition** : le **FRET** est une technique permettant l'étude des **interactions moléculaires** via un **transfert d'énergie non radiatif** (càd sans émission de lumière) d'une molécule à une autre.

- ✚ Principe : on greffe des fluorochromes aux molécules qu'on souhaite étudier, mais pour que ça marche il faut :
 - ➔ que le **spectre d'émission** de fluorescence du **donneur** recouvre le **spectre d'absorption** de l'**accepteur**,
 - ➔ que les molécules soient espacées de **moins de 10 nm**.

Il existe deux variantes de FRET :

☆ FRET intermoléculaire :

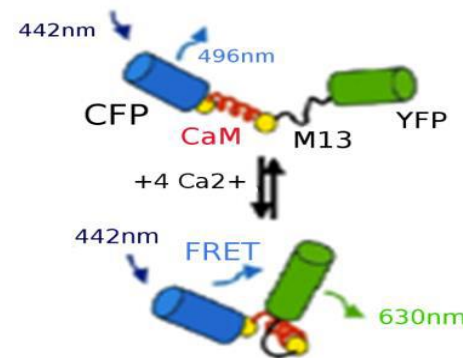


S'il y a détection de fluorescence lors de ce FRET cela témoigne d'une forte proximité des molécules d'intérêt voire une association. (Cf illustration)

☆ FRET intramoléculaire :

Cette fois on cherche à étudier une conformation moléculaire. Prenons l'exemple de la sonde calcique caméléon (#*calmoduline pour les intimes*) qui permet de mesurer la concentration en calcium dans la cellule ; cette protéine est ubiquitaire.

Lorsque le taux de calcium intra cellulaire augmente la conformation moléculaire de la calmoduline change et ses deux extrémités se rapprochent l'une de l'autre et dès lors qu'elles sont espacées de moins de 10 nm, il y a émission de fluorescence (verte ici si le rapprochement est suffisant). Ceci est détectable par un FRET intramoléculaire. La fluorescence sera donc **proportionnelle** au taux de calcium dans la cellule lors de ce FRET.



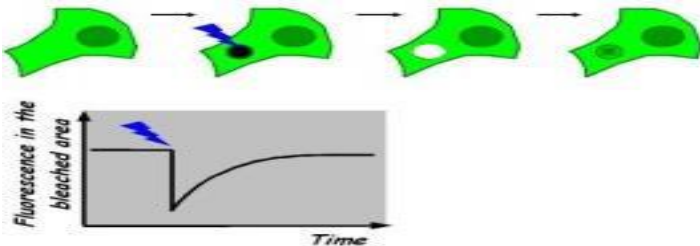
2) FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et FLIP (Fluorescence loss In Photobleaching)

Le **FRAP** et le **FLIP** sont des techniques basées sur le **photoblanchiment**. Il s'agit d'irradier la cellule (ce qui a pour cause de tuer la fluorescence) puis d'observer ce qui se produit.

✚ Deux techniques différentes existent :

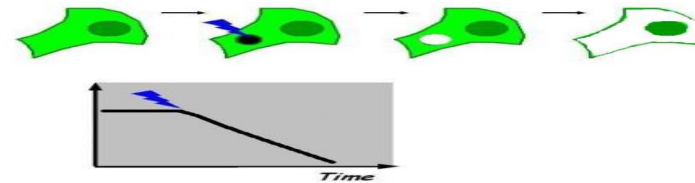
- **FRAP** : on irradie un point bien précis de la cellule puis on observe le **retour** de la fluorescence ou pas. Ce retour de la fluorescence dans la zone irradiée repose sur **une dynamique des autres molécules fluo de la cellule** et non pas sur une réapparition de la fluorescence dans la zone irradiée. En effet l'irradiation qui tue la fluorescence est irréversible.

(mnémo : FRAP : Rapide)



- **FLIP** : Même principe sauf que cette fois on irradie **en continu une zone précise** et on observe la **disparition de la fluorescence**. On peut ainsi mesurer la vitesse de déplacement des molécules en observant la perte de fluorescence.

(mnémo : FLIP : Long)



3) Fluorescence induite

Un colorant devient fluorescent lorsqu'il est **fixé** à la molécule étudiée. On se sert de cette propriété pour surtout étudier les acides nucléiques.

✚ On distingue deux colorants :

- **Hoechst** et **Dapi** qui se fixe **spécifiquement** sur les **bases A-T**.
- **Intercalants** (comme l'iodure de propidium et le bromure d'ethidium) qui viennent se fixer entre les brins d'ADN de manière **non spécifique**.

Grâce à ces techniques on peut mesurer la densité de l'ADN et sa localisation. Lorsque l'ADN sera condensé (**hétérochromatine**) on aura une **coloration intense** a contrario sous forme décondensé (**euchromatine**) on aura **peu de coloration**.

4) L'immunofluorescence indirecte

✚ Définition : L'immunofluorescence indirecte est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps :

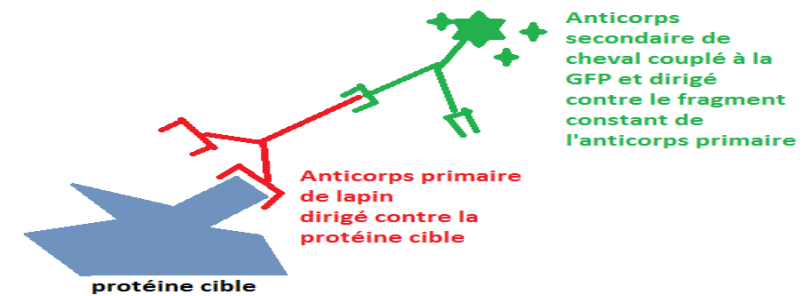
- le premier anticorps reconnaît spécifiquement la **protéine d'intérêt**.
- le second anticorps est dirigé contre l'**anticorps primaire** (anticorps anti-anticorps).

NB : Cette technique peut être utilisée sur des **cellules vivantes ou fixées (donc mortes)**.

✚ Explication : la protéine d'intérêt est considérée comme un antigène, car elle portera sur sa membrane un **épitope** reconnu spécifiquement par notre anticorps. Il y aura donc **réaction antigène/anticorps**. On a greffé un fluorochrome sur l'anticorps secondaire, et, lors de la réaction Ag/Ac primaire, celui-ci se fixera et il y aura fluorescence (donc possibilité de voir la molécule cible).

Pour cette technique nous avons donc besoin de 2 types d'anticorps :

- les **anticorps primaire** : ceux dirigés contre la protéine, **ne portent pas de fluorochromes**.
- les **anticorps secondaires**, ceux dirigés contre l'anticorps primaires **qui portent le fluorochrome**.



⚠ **ATTENTION** : L'anticorps primaire doit être d'une espèce animale différente de l'anticorps secondaire (un organisme ne va pas physiologiquement induire une réaction immunologique contre lui-même)

Si on veut étudier 2 protéines différents il faudra leur greffer à chacune un fluorochrome différent avec une longueur d'onde d'émission différente.

Exemple : Vous voulez étudier une protéine X et une protéine Y. On utilise des anticorps primaires de chevaux contre la protéine X et des anticorps de gazelles contre Y.

Quels anticorps secondaires peuvent nous aider à observer les deux protéines ?

On pourrait par exemple utiliser des anticorps de **canard** anti-immunoglobuline de **chevaux** couplé à la **GFP** et des anticorps **de chimpanzé** anti-immunoglobuline **de gazelle** couplé à la **rhodamine**.

🔦 Il faut savoir qu'avec l'immunofluorescence indirecte nous ne pourrions visualiser que des **protéines** car les anticorps reconnaissent uniquement les antigènes, de nature protéique !

Pas d'observation d'ADN par exemple.

5) L'immunofluorescence directe

✚ Principe : Dans ce type d'immunofluorescence on utilisera un **anticorps dirigé contre la molécule recherchée** (antigène). Cet anticorps est couplé

à un fluorochrome qui permettra donc la visualisation de la molécule d'intérêt par fluorescence. Pour révéler la préparation, on peut utiliser par exemple microscope confocal.

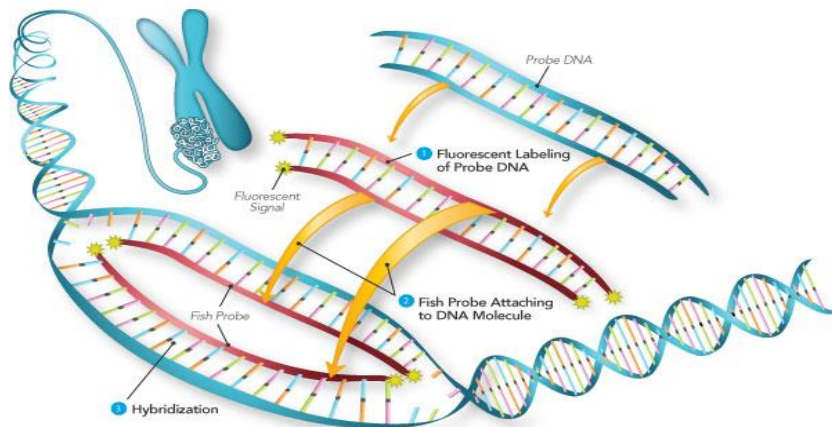
6) FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

Le FISH est une technique **d'hybridation in situ d'acides nucléiques avec des sondes fluorescentes spécifiques** soit de certains gènes soit de certains chromosomes.

✚ Principe :

- Tout d'abord, on **dénature** l'ADN double brin afin d'avoir deux **simples brins**.
- On ajoute la **sonde fluorescente** de l'ADN dénaturée qui vient former un hybride spécifique avec l'ADN simple brin
- La sonde est marquée directement (présence de fluorochrome sur la sonde) ou indirectement (révélation via un complexe avec des Ac marqués par des fluorochromes dirigés contre la sonde) avec un ou plusieurs fluorochromes permettant une visualisation en fluorescence.

- Plus la sonde est longue plus elle sera spécifique du gène.
- Il faut savoir que l'on peut étudier les ARNm et trouver leur localisation dans la cellule sauf qu'il n'y aura pas de dénaturation vu que l'ARN est déjà simple brin.
- La technique du FISH tue la cellule car il y a dénaturation de l'ADN. Donc pas d'étude sur cellule vivante.
- Le FISH permet d'étudier les caryotypes et de déceler des anomalies chromosomiques.



✚ Avantage/Inconvénient fluorescence :

- Avantages :
 - Travailler sur des cellules vivantes est totalement envisageable.
 - Possibilité de visualiser tous les compartiments de la cellule.
- Inconvénients :
 - Technique lourde de recombinaison génétique.
 - La protéine GFP-Prot doit conserver ses fonctions (Suggérer/démontrer).

IV) La microscopie électronique

La résolution de la microscopie électronique est bien meilleure que celle de l'optique. Entre 200nm et 0.2 nm. Elle permet d'observer les organelles et les molécules.

La microscopie électronique va utiliser un faisceau d'électrons et non plus de photons comme dans la photonique (=optique).

Les échantillons en microscopie électronique subissent des préparations spéciales car les **électrons possèdent un pouvoir pénétrant inférieur** à celui des photons.

✚ Préparation d'un échantillon :

- **Fixation** via des traitements chimiques (donc cellules mortes)
- **Déshydratation** avec des bains d'alcool ; ce qui est capital car la microscopie électronique se fait sous vide.
- Mettre l'échantillon dans une **résine** en Epoxy
- Coupe ultra fine grâce à un **ultra microtome**.
- Utilisation d'**agents de contraste** (des sels de métaux lourds denses aux électrons, permettant ainsi d'augmenter le contraste).

A) La microscopie électronique à transmission (MET)

On utilise un faisceau d'électrons que l'on a **accélééré** en le soumettant à une différence de potentiel de plusieurs kV.

L'énorme avantage de la MET est qu'elle permet de très bien visualiser les **contours de la cellule et des organites**.

Plus une structure cellulaire est dense aux électrons plus elle apparaîtra foncée.

Dans la MET on observe les électrons qui passent et qui vont aller exciter une plaque phosphorescente.

☠ Attention : on ne peut voir directement l'image car l'œil n'est pas un détecteur d'électrons (d'où la plaque phosphorescente).

Il existe plusieurs techniques de microscopie à transmission :

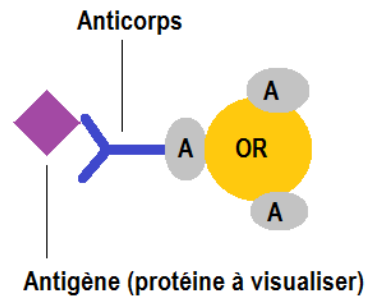
1) Le marquage à l'or (=immuno-gold)

C'est une technique de MET.

Elle consiste à utiliser de l'**or colloïdal** (qui est dense aux électrons, qui les bloque) afin d'observer une molécule d'intérêt. Cette bille d'or remplacera le fluorochrome.

✚ Principe : nous avons notre anticorps dirigé contre la molécule d'intérêt. L'or colloïdal viendra se fixer (via ses protéines A très affines de la chaîne lourde de l'Ac) sur l'Ac, ne laissant alors plus passer les électrons à l'endroit où se

trouve le complexe Ac/Ag et donc la protéine cible. Les protéines d'intérêts apparaîtront foncées.



2) La coloration par ombrage

Technique de MET qui va permettre d'étudier la surface de l'échantillon.

Notre échantillon est placé dans un système sous vide (cloche sous vide) où se trouve une électrode en métal lourd et une électrode en carbone.

On applique une différence de potentiel qui a pour but de vaporiser des atomes d'or et de platine de l'électrode en métal lourd sur la surface de l'échantillon afin de créer une réplique en métal de la surface de ce dernier.

On évapore les éventuel atome de carbones présents.

Ensuite on dissout l'échantillon dans l'acide de sorte à ne garder que la réplique en métal (précise et fidèle à l'échantillon de départ) qui sera ensuite observée.



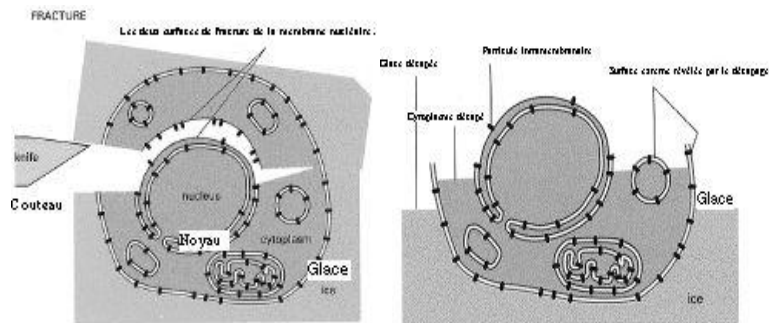
3) Cryomicroscopie

Technique utilisant la congélation et limite la dénaturation de l'échantillon.

✚ Principe :

- **Congélation ultra-rapide dans de l'azote liquide** pour durcir l'échantillon et préserver l'organisme interne.
- **Fracturation de l'échantillon sous vide** avec un couteau créant des fractures dans les zones de moindre résistance (**entre les bicouches de phospholipides membranaires**).

- **Décapage par sublimation** de la couche de glace superficielle afin d'augmenter les reliefs.
- **Vaporisation d'une couche de platine** pour augmenter les contrastes et favoriser la résistance mécanique de l'échantillon.
- **Dissolution** et **observation** de la réplique ; les zones riches en platine apparaissent noires.



B) La microscopie à balayage (MEB)

Ici on ne regarde plus ce qui est transmis mais on veut **regarder la surface de l'échantillon**.

La MEB a une résolution plus faible que la MET (10 nm).

On bombarde la surface d'électrons qui vont rebondir vers un détecteur et selon leur angulation vont

permettre une **reconstitution de la surface de l'échantillon**.

V) La microscopie à force atomique (AFM)

L'AFM permet d'aller plus loin que la microscopie électronique. En effet on se retrouve à observer des **atomes**.

C'est une technique en **champ proche**. Une sonde (pointe du microscope) va se déplacer selon les axes x ; y ; z (permet de mesurer des **volumes**, 3D) et en fonction de là où elle tape va reconstituer l'échantillon.

Plus la pointe du microscope sera fine plus la résolution sera bonne (**cette résolution est donc limitée par la finesse de la pointe et non par la diffraction** comme c'est le cas dans les autres types de microscopies).

De plus, l'AFM peut étudier les **contraintes élastiques**, **forces d'adhésion** ainsi que la **rigidité** d'un échantillon.

☆☆ Il faut savoir qu'il est possible d'étudier des échantillons vivants car pas besoin de fixer l'échantillon, ni de le colorer (l'AFM est donc non destructive pour l'échantillon).

De plus, cette microscopie a le gros avantage de pouvoir être utilisé en **milieu liquide** et donc d'étudier une cellule vivante, **dans son environnement**.

Ce type de microscopie est aussi **moins onéreux** que la microscopie électronique.

Cependant cet appareil est **très sensible aux vibrations** et nécessite donc une **grande précaution d'utilisation**.

✚ Pour finir :

Trois cas nous permettrons d'**observer des cellules vivantes** :

- La **microscopie optique confocale**,
- La **microscopie à contraste de phase**,
- L'**AFM**.

