

A photograph of a crowd of people, likely at a sports event. In the foreground, a man wearing a white cap with a logo and a blue jacket with red and white stripes on the sleeves is looking towards the camera. To his right, a woman in a blue jacket with a white Adidas logo and a white emblem is smiling. In the background, a man with glasses and a dark shirt is looking towards the camera. The text "La microscopie" is overlaid in orange, italicized font across the middle of the image.

La microscopie

Sommaire

**I. La microscopie optique/photonique
/conventionnelle**

II. La microscopie à contraste de phase

III. La microscopie confocale

IV. La microscopie à (super) résolution

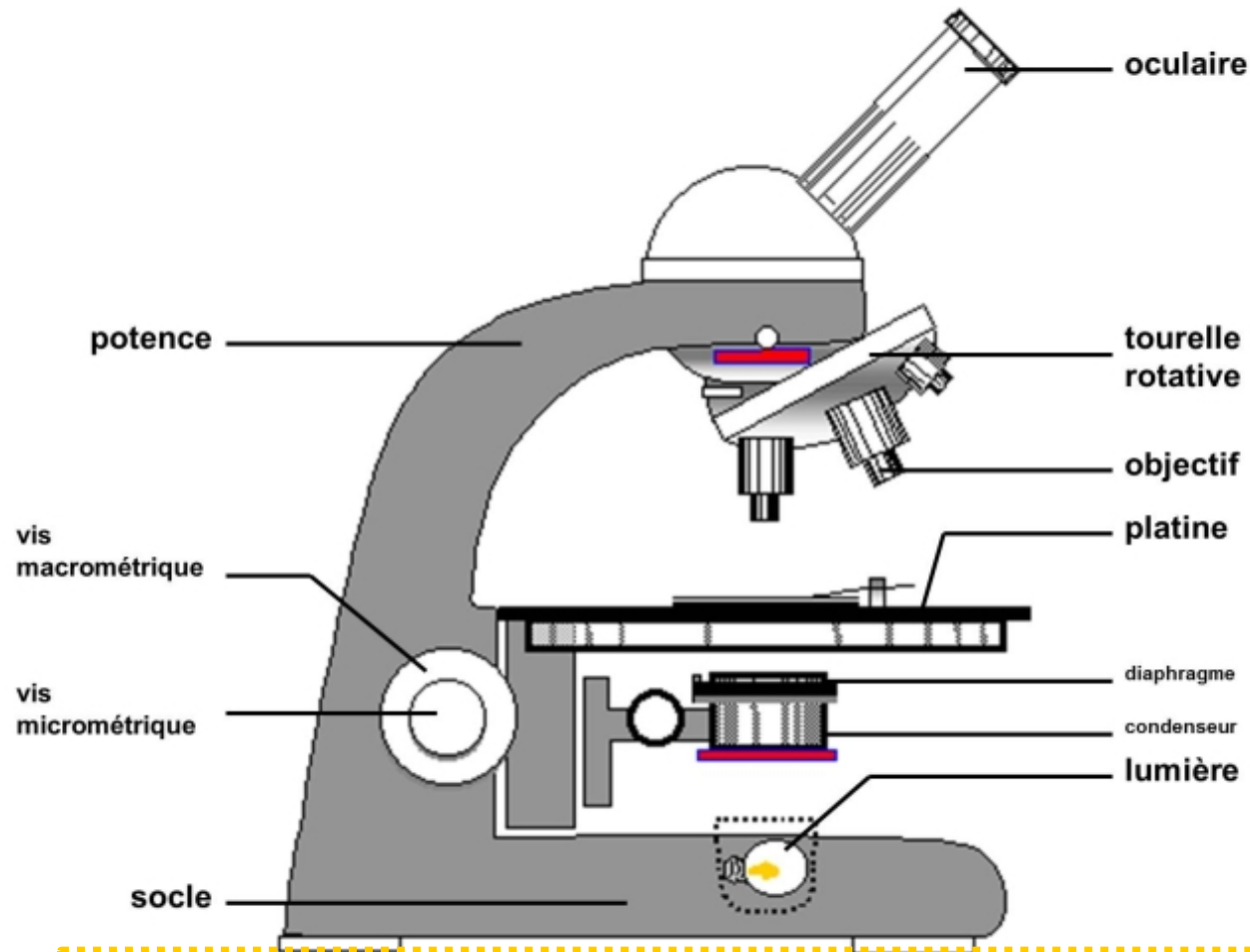
V. Visualiser les molécules dans la cellule, la fluorescence

VI. La microscopie électronique

VII. La microscopie à force atomique

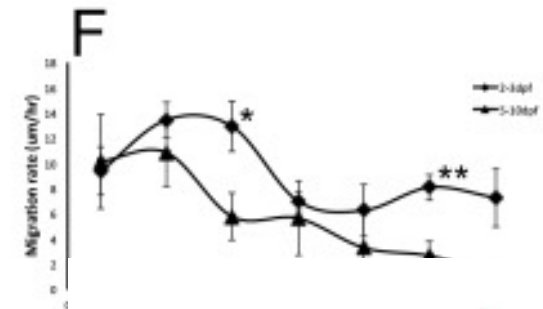
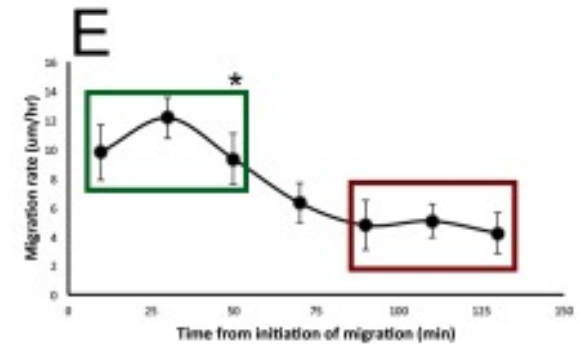
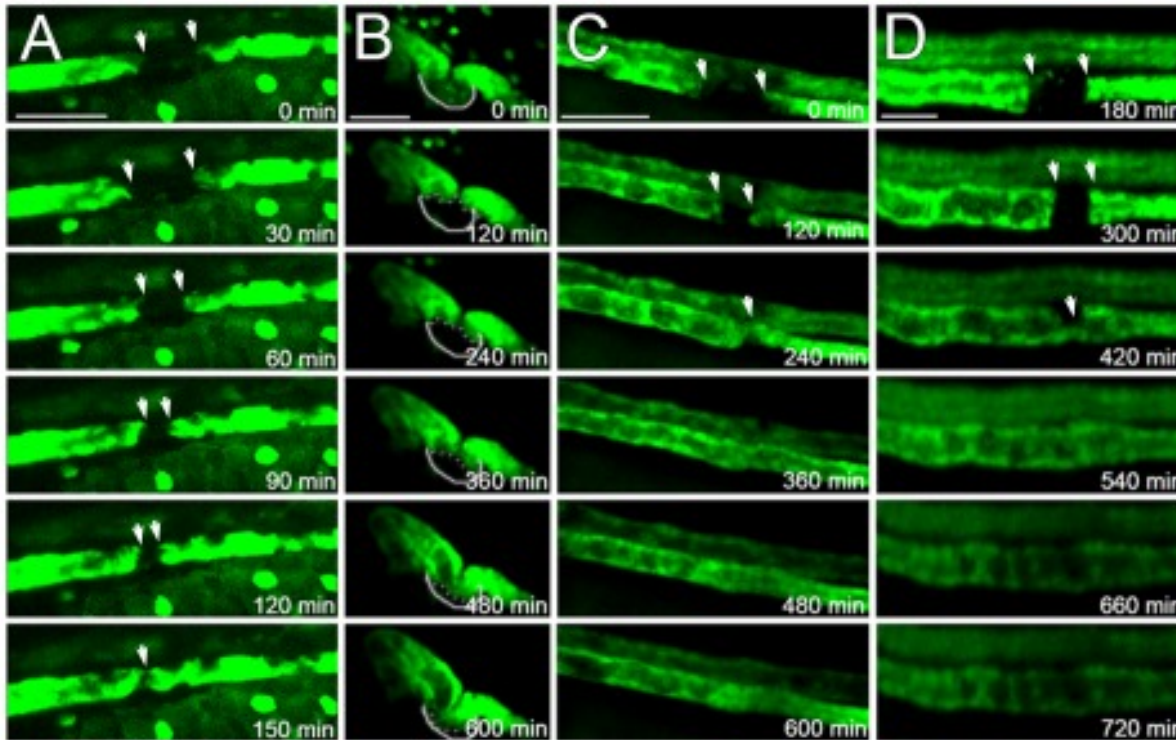


I. La microscopie optique/photonique/conventionnelle



- Résolution de l'œil humain : 0,2 mm = 200 micromètres
- Résolution en microscopie optique : 200 nanomètres

II. La microscopie optique à contraste de phase



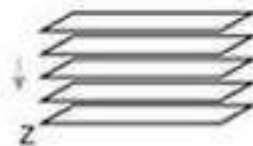
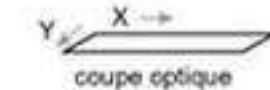
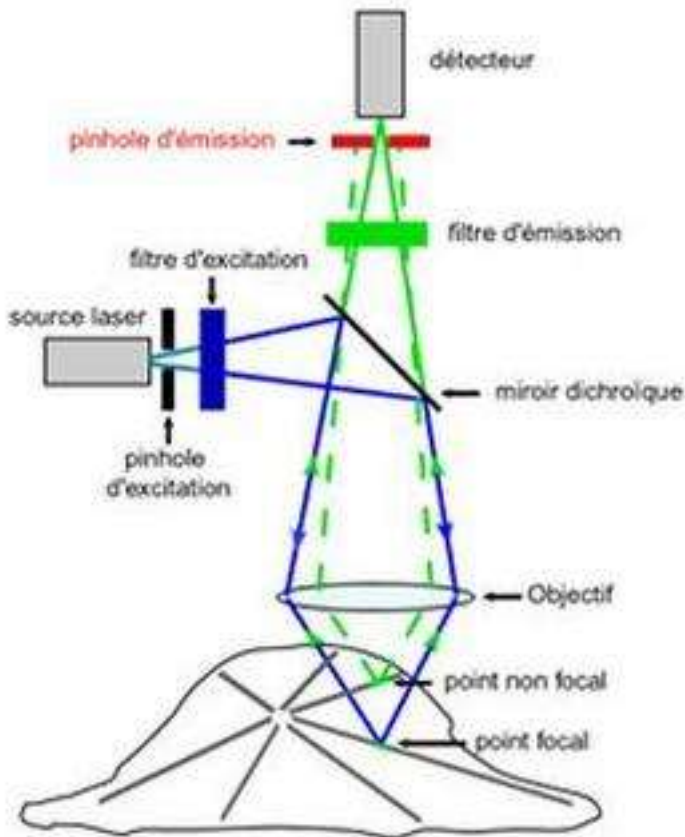
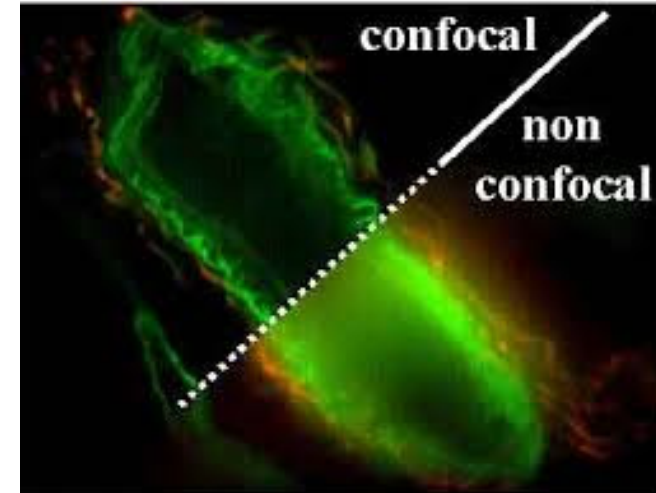
microcinema, ou microscopie time lapse

Breaking
Bricks





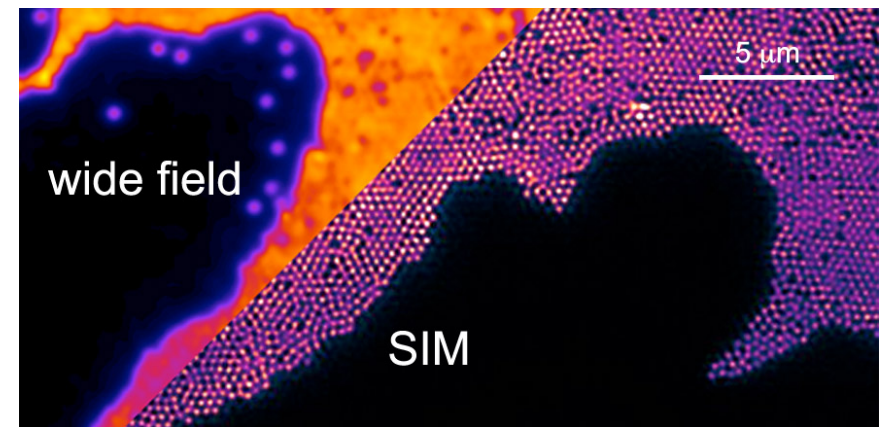
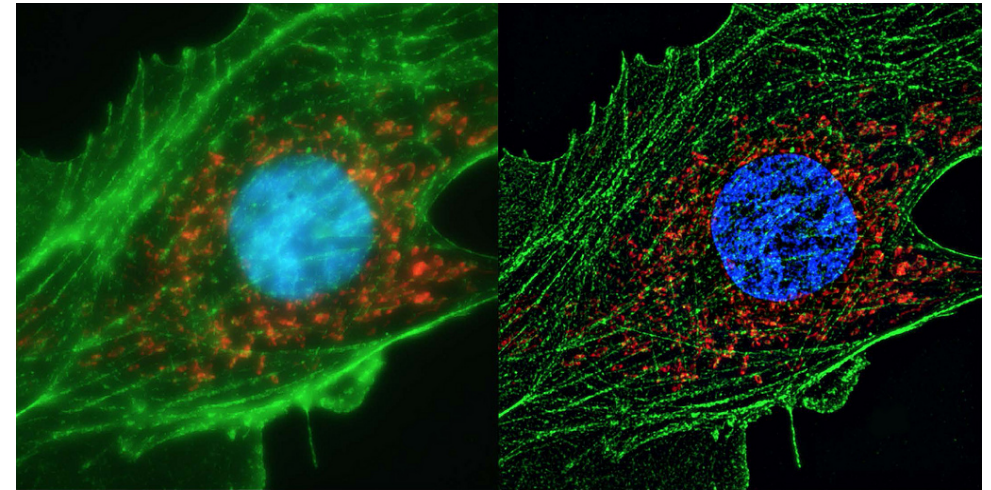
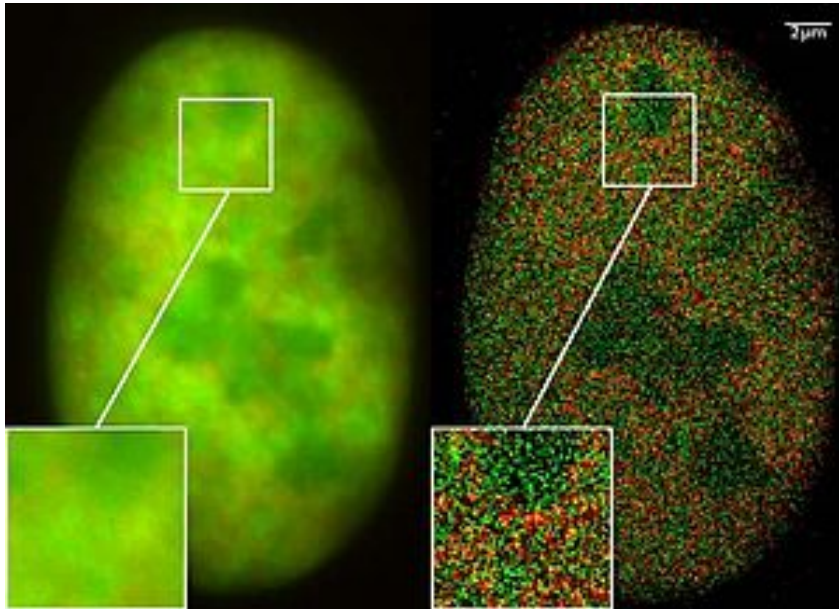
III. La microscopie confocale



point focal
↓
balayage laser
↓
déplacement vertical

- microscopie tridimensionnelle qui élimine les signaux hors champ focal grâce à un diaphragme/pinhole.
- résolution est augmentée
- images en 3D

IV. La microscopie à super (Mario) résolution



Excitation séquentielle des fluorochromes

V. Visualiser les molécules dans la cellule :

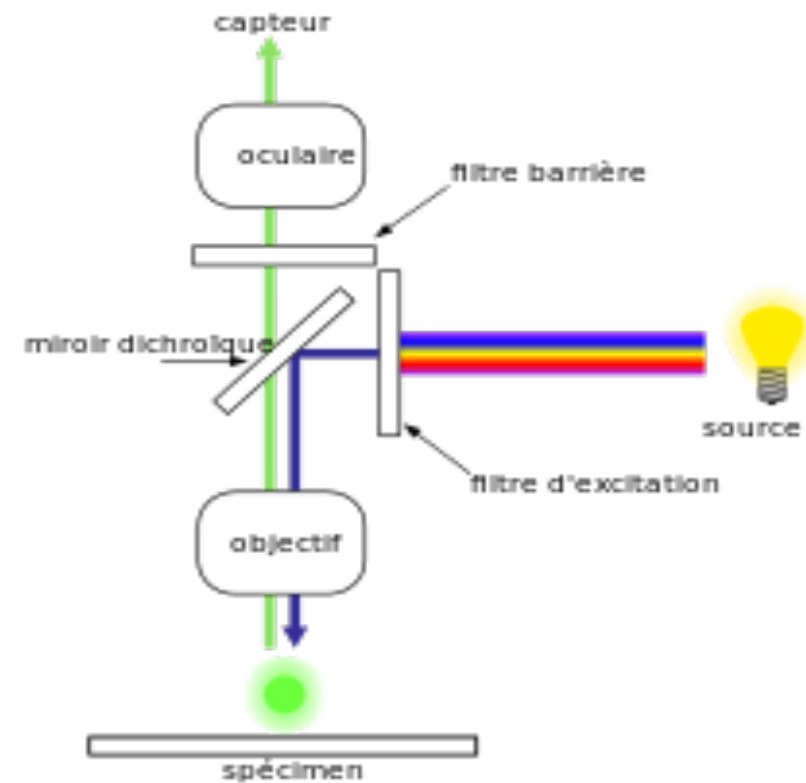
la fluorescence

A) Le principe

Une molécule fluorescente possède la capacité d'absorber l'énergie lumineuse :
→ c'est la **lumière d'excitation incidente** de la restituer (très rapidement <1ns) sous forme de lumière fluorescente :
→ c'est la lumière d'**émission**.

$E = hc/\lambda$ où $E_{\text{excitation}} > E_{\text{émission}}$
 $\lambda_{\text{excitation}} < \lambda_{\text{émission}}$

Perte de chaleur

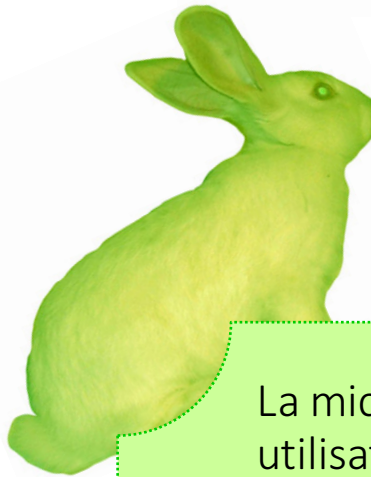
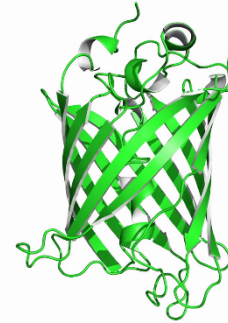


B) La fluorescence naturelle : la GFP

- 2 maxima d'excitation :
à 395nm (UV) et à 475nm (bleu),
- 1 spectre d'émission à 500nm (vert)

**GFP : fluorescence intrinsèque,
non toxique, et conservée.**

Visualisation de tous les compartiments



La microscopie à fluorescence a de nombreuses utilisations :

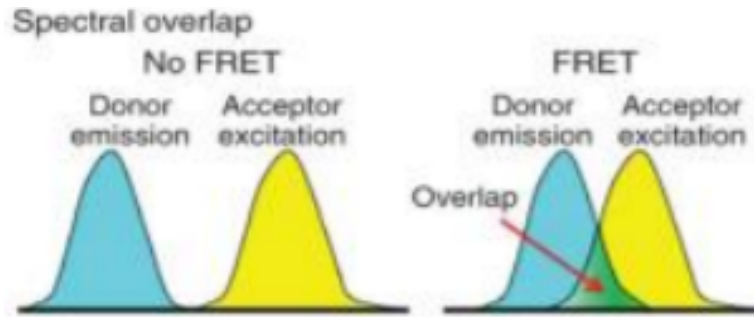
- **localisation de molécules spécifiques** "étiquetés" dans la cellule.
- les marqueurs fluorescents appelés fluorochromes, peuvent être associés **directement ou indirectement** à la structure cellulaire étudiée, ils peuvent être combinés.
- pour l'étude de molécules fluorescentes, les **cellules peuvent être fixées (mortes) ou non.**

Suggérer c'est pas démontrer

<3



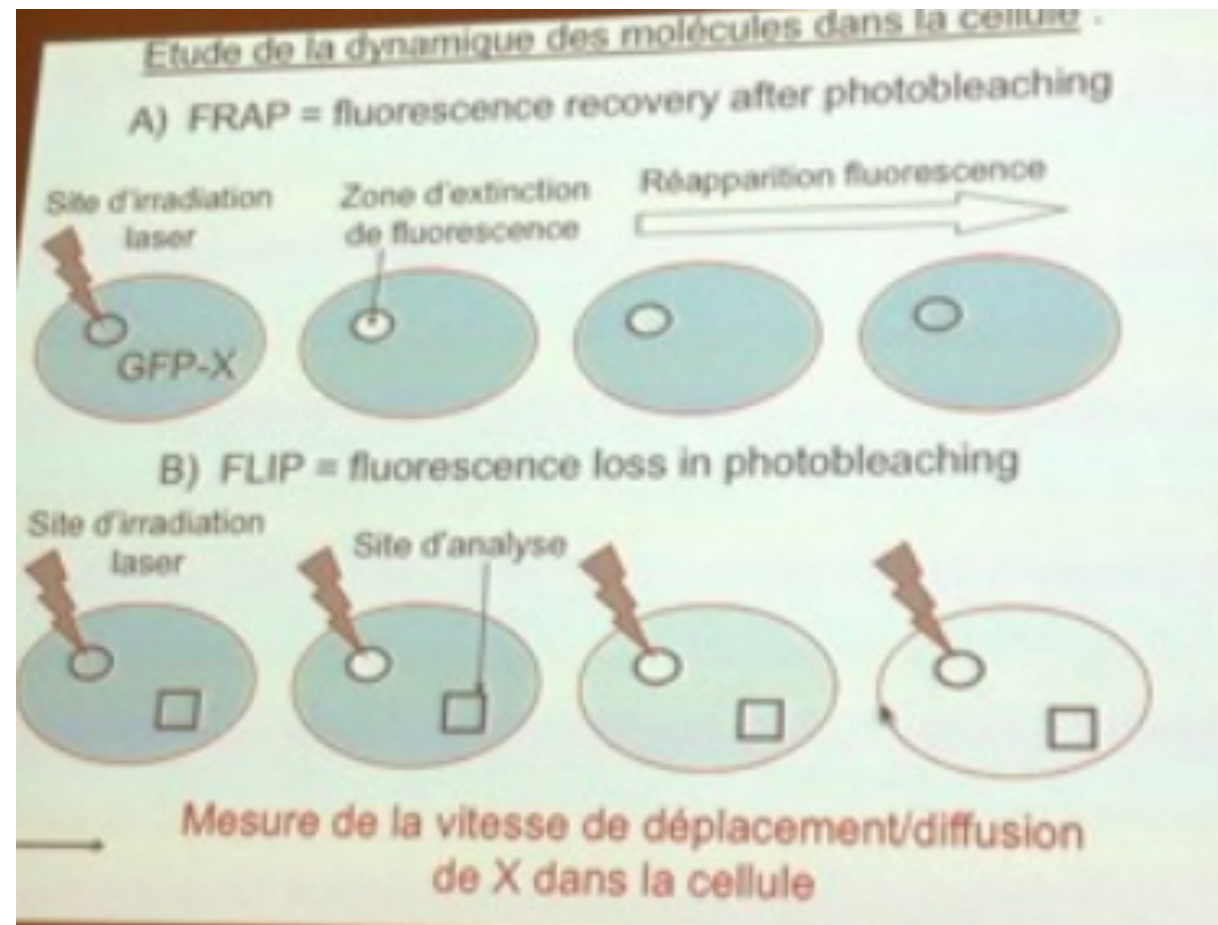
D) Application : FRET, FRAP, FLIP



→ spectre d'émission du donneur, recouvert par celui d'absorption de l'accepteur

→ proximité des 2 molécules (<10nm),

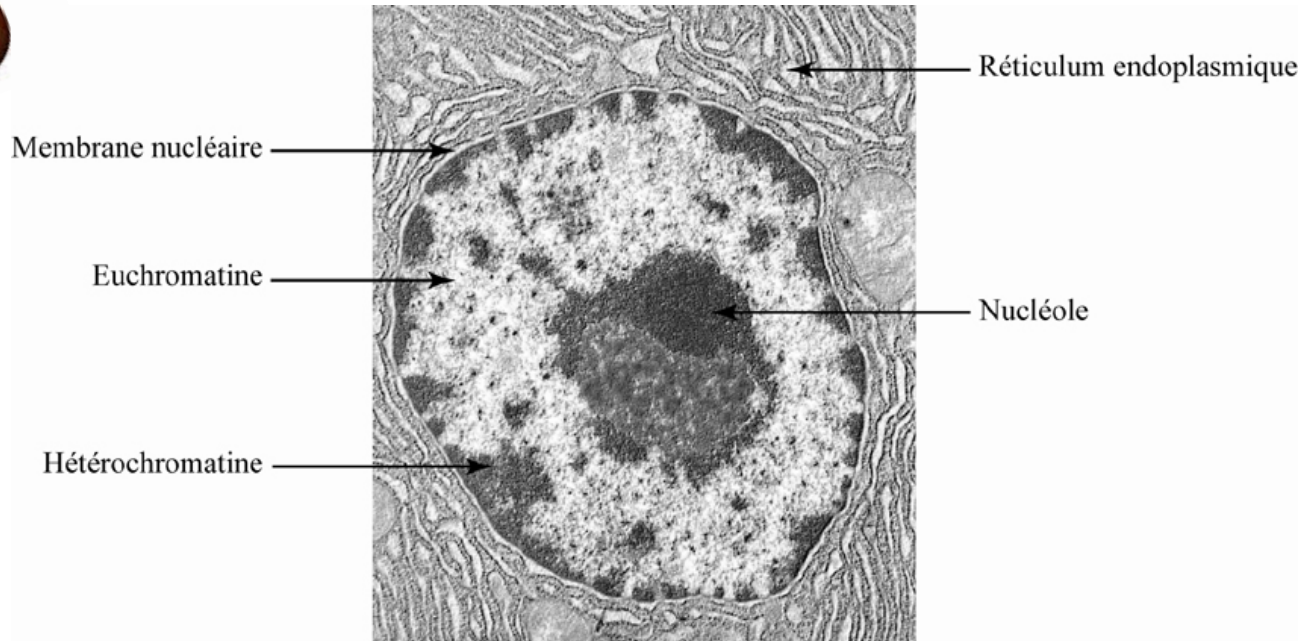
● Flip/Frap



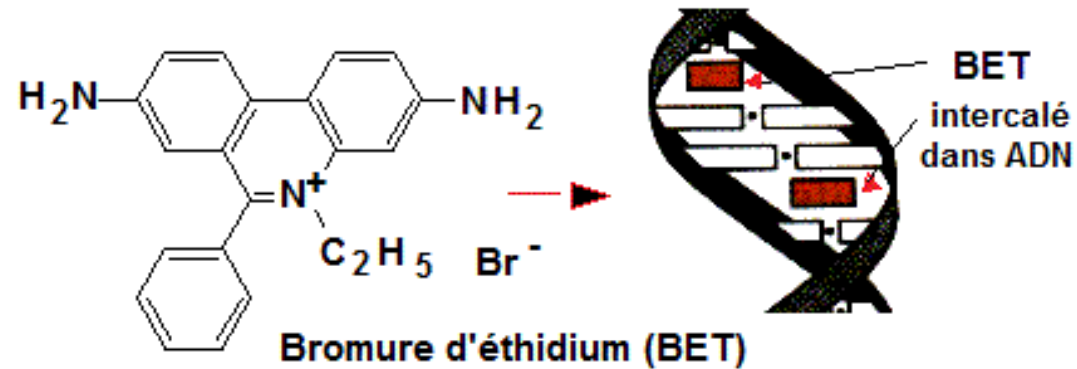
● Fret inter-moléculaire :
Fonctionnement de 2 molécules

● Fret intra-moléculaire :
Conformation moléculaire

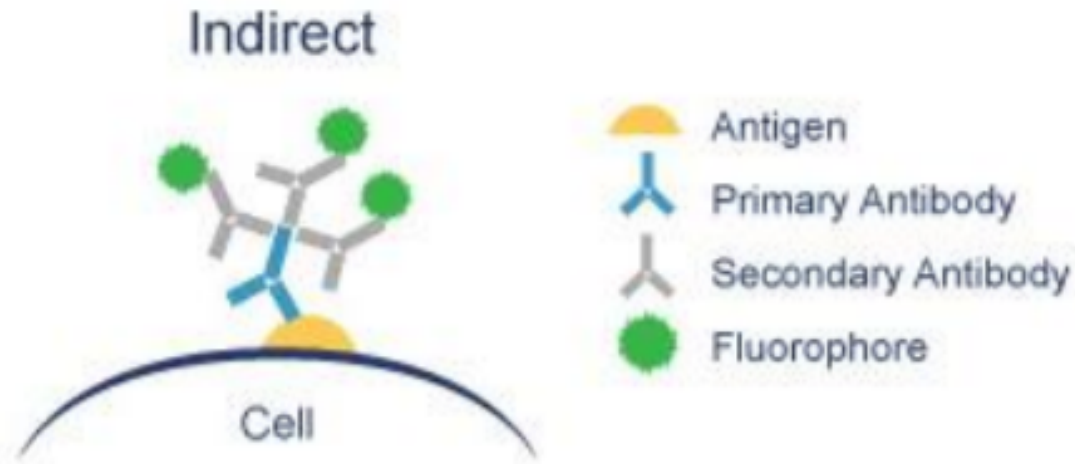
E) La fluorescence induite



- Hoeschst/DAPI
- Bromure/Iodure



F) L'immunofluorescence indirecte



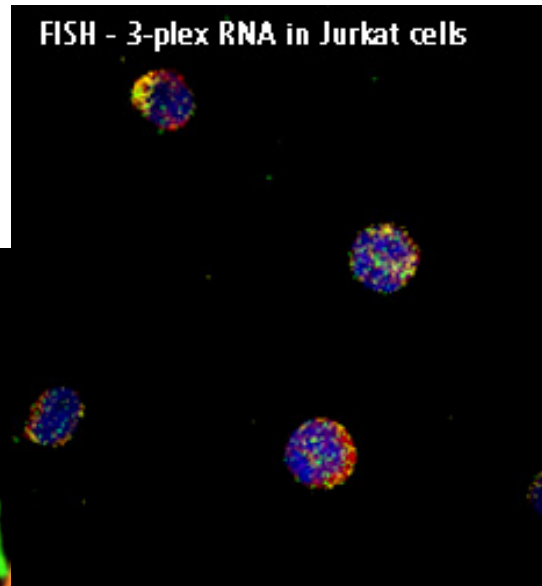
Anticorps primaires → espèce ≠ Ag/protéine étudiée
Anticorps secondaire → espèce ≠ Anticorps primaires

Anticorps monoclonaux → Criblage d'hybridome

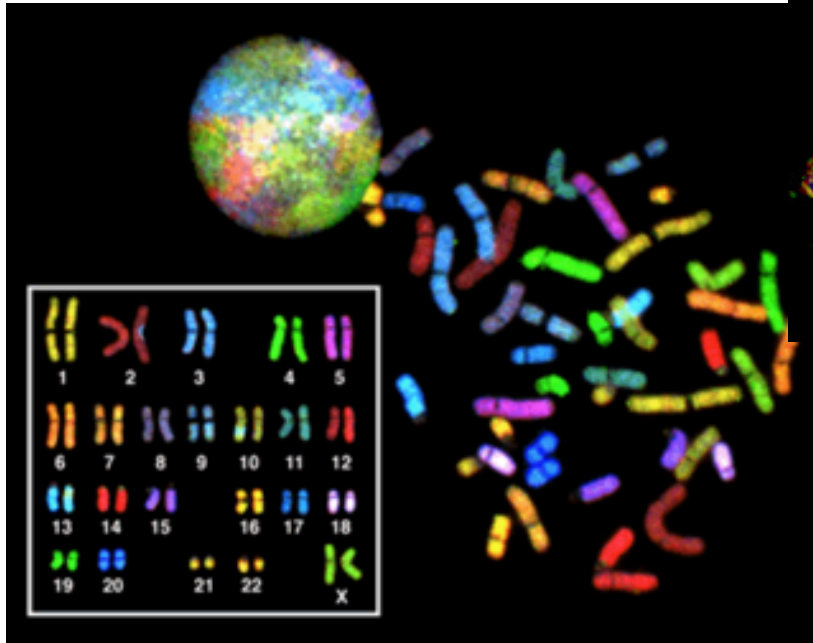
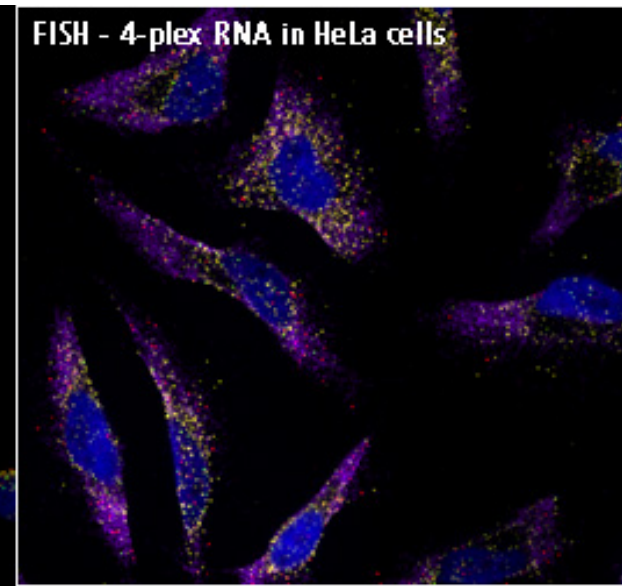
→ outils diagno, mdc, tri cellulaire..

G) l'hybridation in situ : le FISH

FISH - 3-plex RNA in Jurkat cells



FISH - 4-plex RNA in HeLa cells



SKY FISH

RNA FISH

- 1) Dénaturation (facultatif pour l'ARN)
- 2) Hybridation
- 3) Révélation



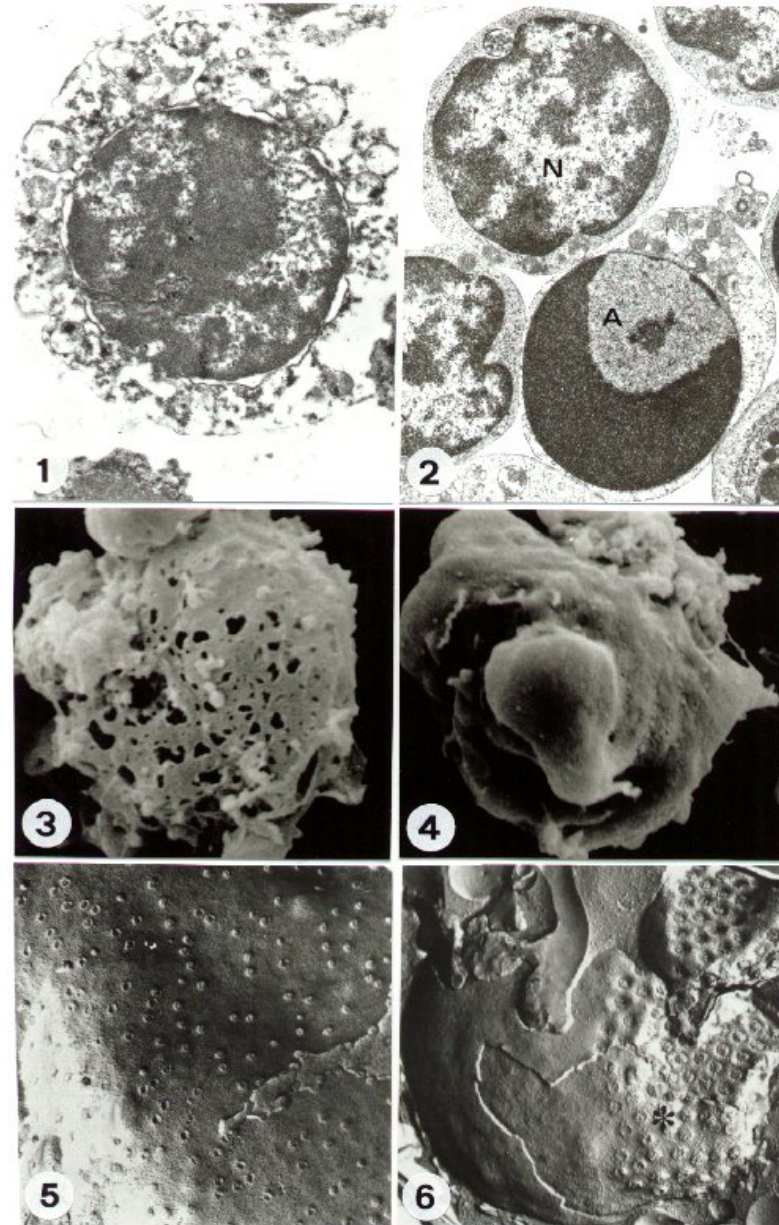
VI. La microscopie électronique

1) La microscopie électronique en transmission



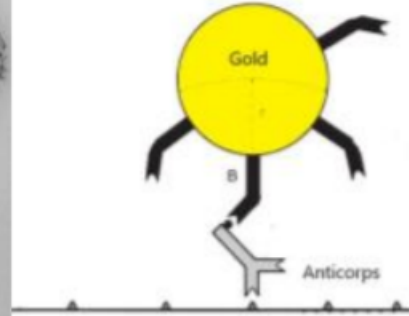
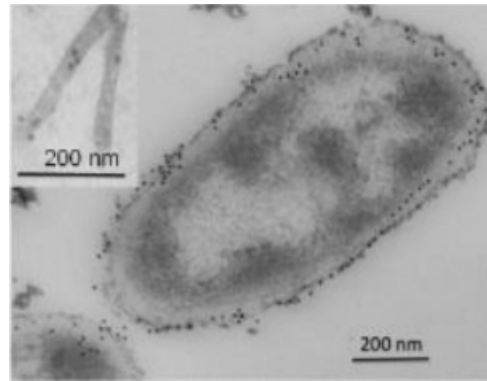
- Résolution 0,2 nm

- Les électrons
traversent
l'échantillon (PV de
pénétration < photons)



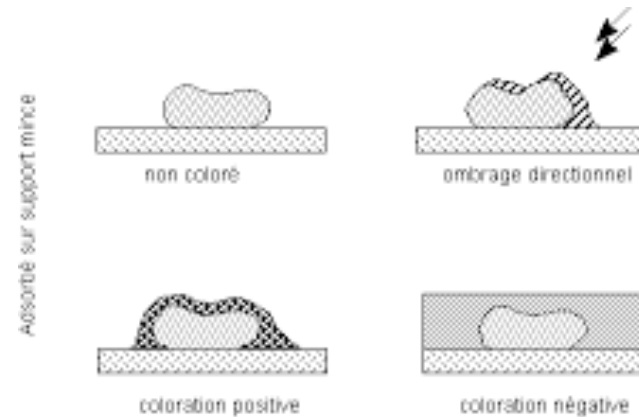
2) Les différentes techniques de MET

→ Marquage à l'or/immunogold

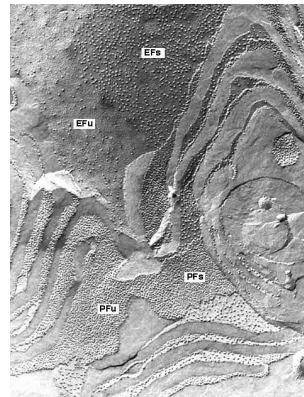


- Récupérer une protéine d'intérêt

→ Coloration par ombrage



- Visualiser indirectement l'échantillon

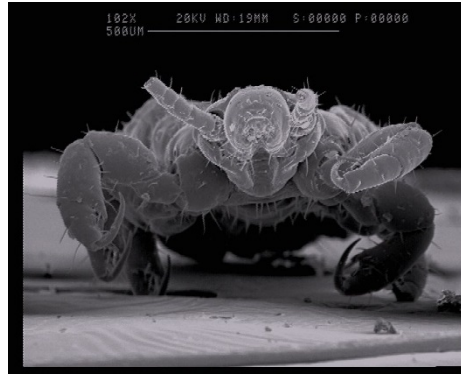


→ Cryofracture

- Visualiser sans dénaturation l'échantillon

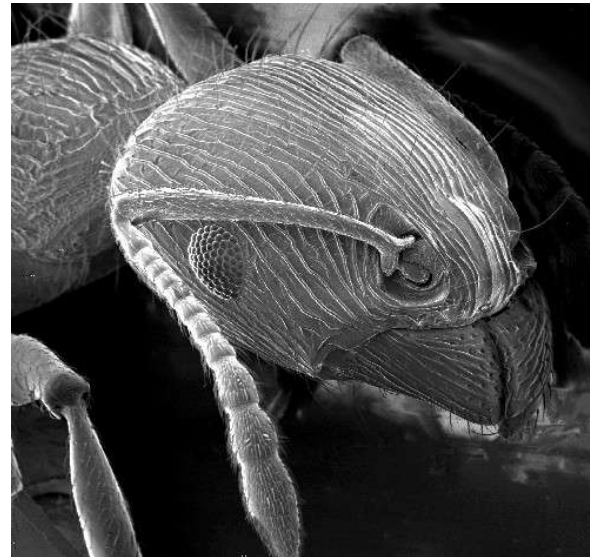


3) La microscopie électronique à balayage

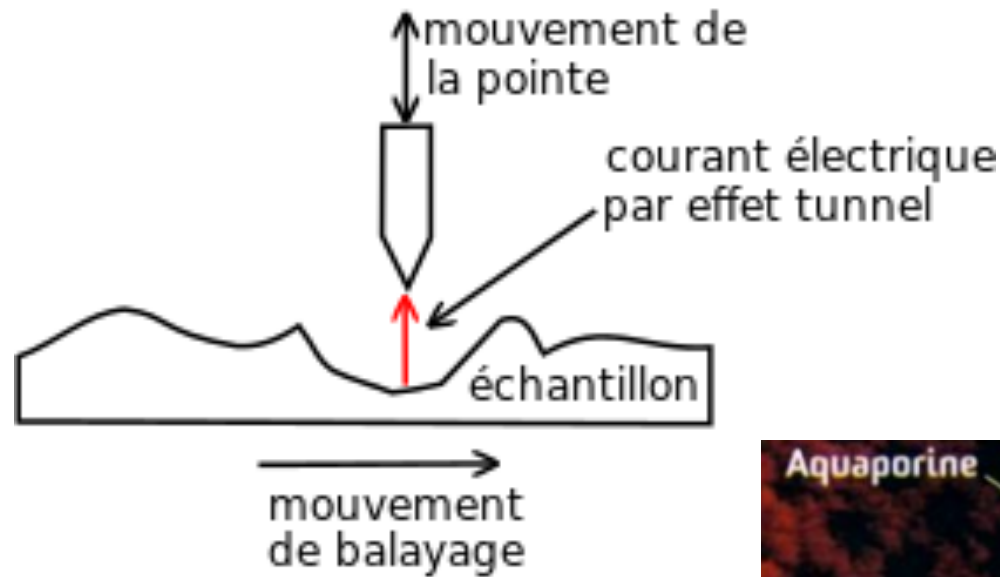


Résolution 10 nm

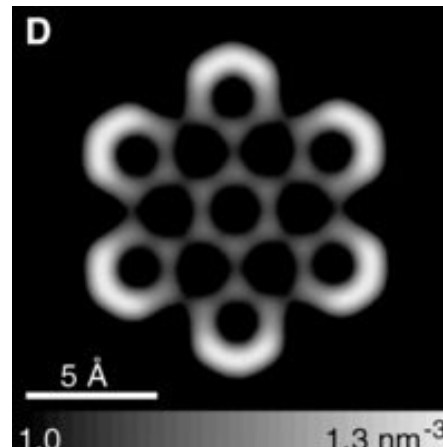
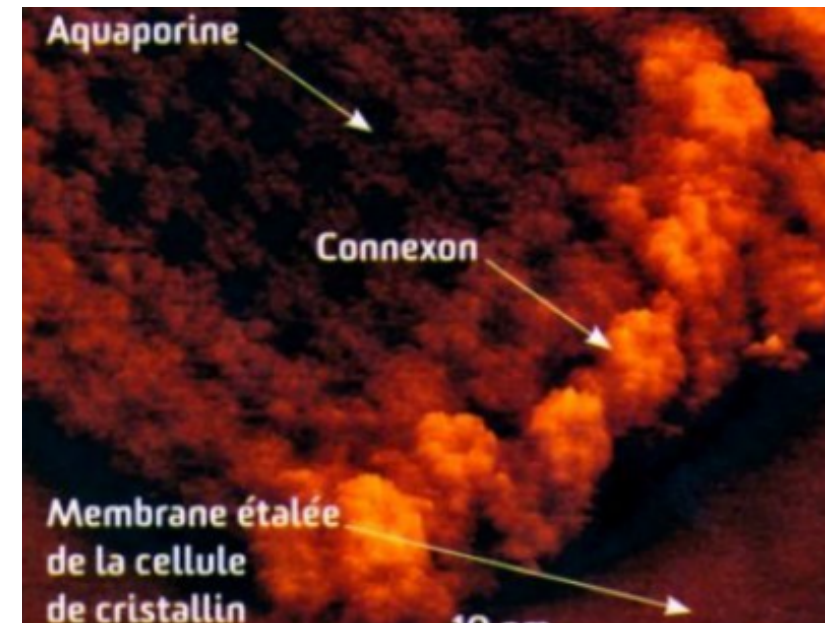
Les électrons **ne traversent PAS** l'échantillon



VII. La microscopie à force atomique



Aucune Diffraction, précision dictée par la taille de la pointe



QCM



1) A propos de la microscopie

- a) La résolution de l'œil est de 200 micromètres et celle du microscope optique est de 200 nanomètres
- b) En microscopie optique/photonique conventionnelle, les cellules sont toujours fixées
- c) La coloration par ombrage permet une visualisation directe de l'échantillon
- d) Le FRET intra moléculaire permet l'étude de la conformation moléculaire
- e) Toutes les réponses sont fausses



QCM



2) Des expériences de double immunofluorescence ont été conduites avec des anticorps primaires de hyène dirigés contre la protéine Biocelyne et des anticorps primaires de gnou dirigés contre la protéine Ambrozétine.

Donnez la/les proposition(s) appropriée(s) pour visualiser séparément dans les mêmes cellules les deux protéines d'intérêt :

- a) Anticorps de poisson rouge anti-immunoglobuline de hyène couplés à la rhodamine, et anticorps de hyène anti immunoglobuline de gnou couplés à la fluorescéine
- b) Anticorps de mégalodon anti-immunoglobuline de hyène couplés à la rhodamine, et anticorps de mégalodon anti immunoglobuline de gnou couplés à la fluorescéine
- c) Anticorps de poisson rouge anti-immunoglobuline de hyène couplés à la fluorescéine, et anticorps de castor anti immunoglobuline de gnou couplés à la GFP
- d) Anticorps de hyène anti-immunoglobuline de castor couplés à la rhodamine, et anticorps de gnou anti immunoglobuline de cheval couplés à la fluorescéine
- e) Toutes les réponses sont fausses



CORRECTIO N

2) Des expériences de double immunofluorescence ont été conduites avec des **anticorps primaires de hyène** dirigés contre la protéine Biocelyne et des **anticorps primaires de gnou** dirigés contre la protéine Ambrozétine.

Donnez la/les proposition(s) appropriée(s) pour visualiser séparément dans les mêmes cellules les deux protéines d'intérêt :

- a) Anticorps de poisson rouge anti-immunoglobuline de hyène couplés à la rhodamine, et anticorps de hyène anti immunoglobuline de gnou couplés à la fluorescéine
- b) Anticorps de mégalodon anti-immunoglobuline de hyène couplés à la rhodamine, et anticorps de mégalodon anti immunoglobuline de gnou couplés à la fluorescéine
- c) Anticorps de poisson rouge anti-immunoglobuline de hyène couplés à la fluorescéine, et anticorps de castor anti immunoglobuline de gnou couplés à la GFP
- d) Anticorps de hyène anti-immunoglobuline de castor couplés à la rhodamine, et anticorps de gnou anti immunoglobuline de cheval couplés à la fluorescéine
- e) Toutes les réponses sont fausses

2) B

A) ; Ici on utilise 2 fois la même espèce, donc ça ne marche pas

B) ; Vrai

C) ; Everything is ok concernant les espèces, or au niveau des fluorochromes, on aura les mêmes couleurs, donc on ne pourra pas étudier correctement nos protéines.

D) ; petite subtilité, les Ac primaires et secondaires sont inversés, il aurait fallu que les Ac secondaires reconnaissent l'Ig de hyène ou de gnou

Réponse possible : Ac de X (par ex poisson rouge), anti Ig de **hyène** + fluorescéine
Ac de Y (par ex castor), anti Ig de **gnou** + rhodamine



