

I. La microscopie optique/photonique (m.O.)

La microscopie conventionnelle permet de voir des éléments que l'on ne peut pas voir à l'œil nu, il s'agit d'une microscopie à lumière directe qui traverse l'échantillon, et qui est concentré par un condensateur.

Pour assurer l'observation de l'échantillon, une préparation est requise selon les étapes suivantes (voir histo) :

- **Fixation** : on stabilise les liaisons chimiques, mais on tue la cellule
- **Déshydratation** : cela fait en général perdre la couleur de l'échantillon
- **Rigidification** : inclusion de l'échantillon en résine/paraffine pour le couper
- **Coupe**
- **Coloration** : pour permettre une meilleure observation en donnant du contraste.

La résolution en microscopie est la taille du plus petit point que l'on peut réussir à observer en étant capable de le distinguer du point d'à côté.

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

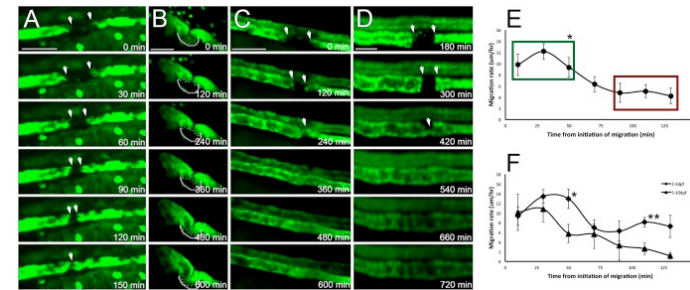
II. LA MICROSCOPIE OPTIQUE à contraste de phase

Contrairement à la technique précédente, la microscopie à contraste de phase permet l'étude de **cellules vivantes, donc non fixées**.

Un microscope à contraste de phase est un microscope optique qui transforme en niveaux de contraste, les différences d'indices de réfraction entre deux structures, lesquelles se traduisent en différences de phase pour les ondes lumineuses les traversant.

Quand une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un **déphasage** par rapport aux autres rayons lumineux, et il en résulte sur l'image un **contraste accentué** de la structure.

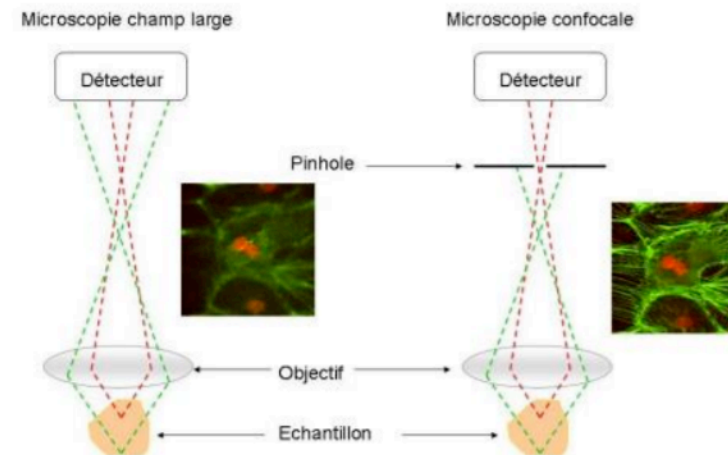
Un autre avantage à ce type de microscopie, est que l'on peut voir des cellules se déplacer : c'est ce que l'on appelle le **microcinema**, ou **microscopie time lapse**



III. La microscopie confocale

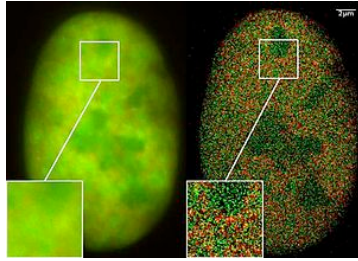
Dans la microscopie optique conventionnelle, on est limité à des échantillons fins, car si l'épaisseur augmente, l'image reste floue.

Cependant, la microscopie confocale règle ce problème, on peut observer un **échantillon épais** par tranche grâce à un **diaphragme/pinhole** qui permet de concentrer le rayon sur 1 seul plan de l'échantillon → enlève le flou du plan d'au-dessus et du plan d'en dessous (= les bruits de fond) afin de ne garder que le signal du plan de coupe qui nous intéresse. Cette technique permet de **visualiser un échantillon en 3D** et d'**augmenter la résolution**.



IV. La microscopie à super résolution

Afin d'accroître la résolution de l'image, on excite **séquentiellement** ce que l'on appelle un **fluorochrome**, c'est à dire une substance chimique capable d'émettre de la lumière fluorescente après excitation, ainsi la succession d'image, donnera une image plus précise.



V. Visualiser les molécules dans la cellule : la fluorescence

Mise à part la microscopie à super résolution, les techniques vues précédemment n'offrent pas la possibilité de visualiser de petits organites, ni même des molécules.

Les scientifiques ont donc développé une petite astuce : **la fluorescence**.

A) Le principe

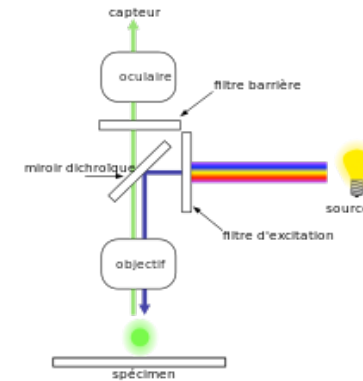
Une molécule fluorescente possède la capacité

- 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**.

Ainsi, la molécule fluorescente sera caractérisée par 2 longueurs d'onde et 2 énergie différentes selon la relation : $E = hc/\lambda$ où **E excitation > E émission**

$$\lambda \text{ excitation} < \lambda \text{ émission}$$

Le principe de la microscopie à fluorescence est exactement le même, à savoir une lumière bleue qui se réfléchit sur un miroir dichroïque (cad qui ne laisse passer que certaines gammes de longueurs d'onde), cette lumière vient exciter un échantillon qui comporte des molécules fluorescentes qui émettent dans le vert, puis ces lumières vertes traverse le miroir en question, avant de passer un filtre précédant l'oculaire.



B) La fluorescence naturelle : la GFP

La microscopie à fluorescence a de nombreuses utilisations comme la **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 fixés (mortes) ou non**.

Par ailleurs, dans la nature, de nombreux cas de **bioluminescence** sont relatés, mais le plus célèbre reste celui de la luciole (*selon ces fameuses luciférases <3*), ou de la méduse *aequorea victoria*. A partir de cette dernière, nous avons extrait la GFP (*green fluorescent protein*) qui est particulière à plusieurs points de vue :

- elle comporte un **chromophore**, en forme de tonneau, **émettant une fluorescence verte**
- ce chromophore est une triade composé de 3 acides aminés - la GFP possède **2 maxima d'excitation** : à 395nm (UV) et à 475nm (bleu), et un spectre d'émission à 500nm (vert).

De nombreux variants peuvent être obtenus à partir de la GFP (en changeant pas exemple les acides aminés), le spectre d'émission sera dès lors différent : YellowFP, CyanFP...

Ainsi, cette GFP tient une place particulièrement importante en biologie cellulaire, d'autant plus que sa fluorescence est **intrinsèque, non toxique, et conservée**.

Elle permet de visualiser **tous les compartiments** et lorsqu'on l'exprime artificiellement, elle n'est aucunement modifiée, que ce soit dans des organismes eucaryotes ou procaryotes.

C) Introduction de molécules fluorescentes

Parmi les fluorochromes artificiels, on peut citer :

- La **fluorescéine**, qui lorsqu'elle est excitée dans le bleu, émet dans le vert (comme la GFP)
- La **rhodamine**, qui lorsqu'elle est excitée dans le vert, émet dans le rouge

Les molécules étudiés juste avant, doivent afin de nous permettre d'étudier la cellule, être insérer dans celle-ci selon plusieurs techniques détaillées ci-après.

• La **micro-injection** : une micropipette en verre contient le mélange de molécules fluorescentes que l'on veut déverser dans la cellule, ce procédé est long et fastidieux car on ne traite qu'une seule cellule à la fois.

• L'**électroporation** : les cellules placées entre 2 électrodes subissent un choc électrique, des trous apparaissent dans la membrane et les molécules fluorescentes peuvent rentrer. Plusieurs cellules peuvent être traités à la fois, mais on risque d'altérer les propriétés de la cellule.

• La **vectorisation par vésicule** : méthode la plus physiologique utilisant l'endocytose (vue dans un autre cours tq), cette technique consiste simplement en la fusion de vésicules (qui contient donc ce qu'on veut faire rentrer dans la cellule) et la membrane plasmique. L'avantage est que l'on peu traiter toutes les cellules en même temps, sans les léser.

• L'**expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente** :

"Aujourd'hui avec les techniques de biologie moléculaire, la limite c'est l'imagination"

Cette dernière technique a pour but non pas de transférer les molécules fluo dans la cellule, mais plutôt de les lui faire exprimer directement. Ainsi, la cellule va exprimer un gène (pour le coup, c'est le gène GFP) qui lui, va coder pour la protéine fluorescente : c'est une **expression artificielle**.

Dans un second temps, notre gène GFP va se coupler à un gène d'intérêt, pour par exemple, se greffer à lui et nous permettre sa localisation : cela donnera un gène hybride GFP-X, qui donnera lui même une protéine hybride GFP-X.

Par la suite, nous serons amener à constater une fluorescence, et on nous demandera d'interpréter, comment faire ?

◇ Démontrer ≠ ≠ Suggérer ◇

Admettons que la fluorescence soit détectée au niveau de la membrane. Dans ce cas ci, nous ne pouvons QUE suggérer que la Protéine X est membranaire. Attention, nous pouvons démontrer que la Protéine GFP-X est membranaire, mais pas si on considère seulement la Protéine X désolidarisée de la GFP.

Démontrer = aucun doute possible (très rare, voire improbable)

Suggérer = très souvent, sécurité

SUGGÉRER C'EST PAS DÉMONTRER

Ces techniques de recombinaisons, bien que très utiles, sont **très lourdes** et encombrant les gènes.

D) Applications : FRET, FRAP, FLIP

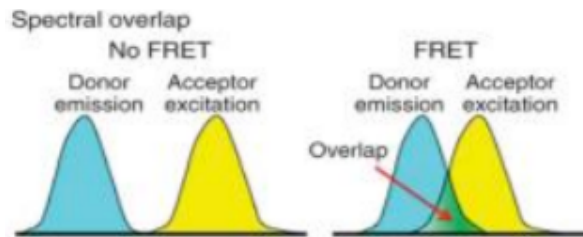
○ **Fret** (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) = étude d'un transfert d'énergie non radiatif (= pas d'émission de lumière), instantané, entre 2 molécules fluorescentes.

Conditions préalables :

→ **Que le spectre d'émission du donneur, recouvre celui d'absorption de l'accepteur**

→ **Que les 2 molécules soient proches (<10nm), on dit qu'elles colocalisent**

Exemple : une molécule A est excitée à 360nm, et émet dans le bleu à 450 nm. Une molécule B étant suffisamment proche, sera excitée par cette lumière bleu, et émettra dans le jaune (sorte d'effet domino). Ainsi, si les 2 conditions préalables listées précédemment sont accomplis, on ne détectera QUE la lumière jaune :



1) FRET INTERmoléculaire

Il permet de voir si 2 molécules fonctionnent ensemble.

→ Exemple : Une prot A émet dans le bleu (470nm), une prot B émet dans le jaune (510). Si on excite à environ 430 et on ne détecte que l'émission jaune à 510, il y a eu FRET, et les 2 fluorochromes ont été rapproché.

2) FRET INTRAmoléculaire

Même principe que le FRET intermoléculaire, sauf qu'ici on étudie plus précisément la conformation moléculaire.

On greffe 2 fluorochromes sur la même protéine à 2 endroits différents. Si les 2 territoires protéiques se rapprochent (donc changement de conformation), alors il y a émission de fluorescence.

→ Exemple : La sonde calcique "caméléon " permet de mesurer la concentration intracellulaire en calcium.

La **calmoduline** est une protéine, qui en présence de calcium change de conformation. Ainsi, en greffant des fluorochromes à cette protéine plongée dans un environnement calcique, on aura aussi un mécanisme de FRET de par le changement de conformation.

Aussi, la fluorescence détectée sera proportionnelle à la concentration en calcium du milieu étudié.

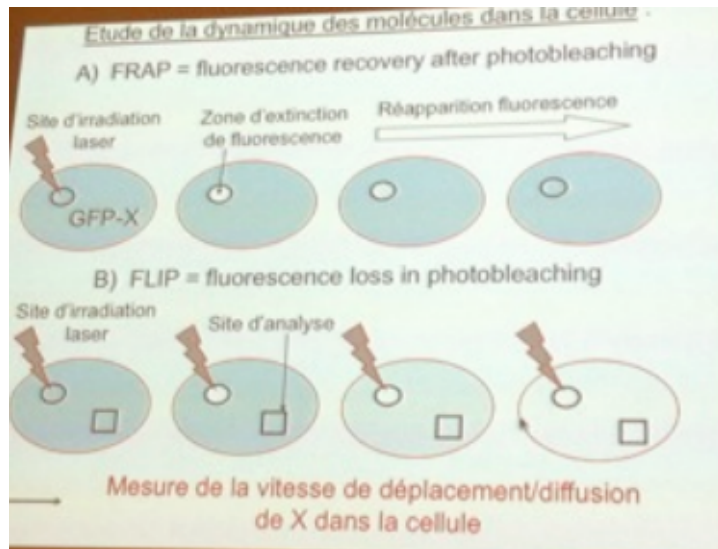
3) Photo-blanchiment (FLIP/FRAP) +++++

Lorsqu'on expose de la lumière à très forte intensité et ce, de manière prolongée, **on tue la fluorescence (et non la cellule!)** des molécules de manière irréversible, la cellule est blanchie (de tout soupçon).

Le photo-blanchiment est l'étude du déplacement des molécules dans la cellule, il y a 2 manières de l'utiliser : le **FRAP** (*fluorescence recovery after photobleaching*) et **FLIP** (*fluorescence lost in photobleaching*).

Le FRAP/FLIP est extrêmement utilisé en biologie cellulaire, notamment dans les **mesure de déplacement/diffusion de protéines membranaire dans une cellule.**

<u>FRAP (le fluorescence Revient)</u>	<u>FLIP</u>
<p>► On fait une irradiation laser transitoire et on regarde le retour de la fluorescence en fonction du temps, on observe le mouvement (c'est l'expérience décrite au dessus)</p>	<p>► On fait une irradiation en continu. On épuise les capacités de fluorescence de la cellule car toutes les molécules arrivant dans la zone photoblanchie perdent leur capacité de fluorescence.</p> <p>On étudie une autre zone que la zone irradiée, on peut alors mesurer la vitesse de déplacement entre le site d'analyse et le site d'irradiation. On a une info supplémentaire, on sait que les molécules bougent mais on sait en plus qu'elles bougent «de ce compartiment à ce compartiment» et à une certaine vitesse</p>



E) La fluorescence induite

Il s'agit d'une technique d'utilisation de colorants, qui deviennent fluorescents quand ils sont fixés à la molécule étudiée. On étudie essentiellement les acides nucléiques (ADN/ARN).

2 types de colorants sont à l'étude :

- **Hoeschst/DAPI**, se fixant spécifiquement sur les bases A-T
- Les **intercalants (bromure d'éthidium, iodure de propidium)** qui se fixent entre les brins d'ADN, mais de manière non spécifique.

→ Exemple 1 : le marquage au DAPI du noyau, met en évidence certaines zones où l'ADN est très condensé (hétérochromatine, en périphérie), et certaines zones où il l'est moins (euchromatine, au centre).

→ Exemple 2 : certains fluorochromes sont sensibles aux conditions du milieu, c'est le cas de la molécule FURA-2, qui en présence de calcium émet dans le rouge.

F) L'immunofluorescence indirecte +++

C'est une technique immunochimique (sur tissus vivant ou fixé) utilisant des anticorps couplés à un fluorochrome.

La technique est dite "**indirecte**", car le fluorochrome n'est pas lié à la molécule, mais plutôt à l'anticorps. Le premier anticorps reconnaît la molécule étudiée (= anticorps primaire), et le deuxième anticorps qui est greffé à un fluorochrome, ira reconnaître l'anticorps primaire.



Il est important de comprendre que les **anticorps primaires** doivent être produits dans une **espèce différente** de celle de l'Ag/protéine étudiée, et que les **anticorps secondaires** doivent être d'une **espèce différente** des **Ac primaires**.

Par ailleurs, les **Ac monoclonaux** utilisés en immunofluorescence indirecte s'obtiennent par la technique dite du **criblage d'hybridome**.

Les Ac monoclonaux ont beaucoup d'utilisations différentes outre l'immunofluorescence :

- outils diagnostiques (SIDA, grossesse..)
- médicaments en -MAB (*monoclonal antibody*, très utilisés en cancérologie)
- support d'une purification par chromatographie d'affinité (méthode de tri cellulaire)

G) L'hybridation in situ : le FISH

L'intérêt du FISH, est de visualiser des séquences spécifiques d'acides nucléiques (ADN/ARN) par des sondes fluorescentes complémentaires soit de certains gènes, soit de certains chromosomes.

Il permet selon 3 étapes que l'on va détailler, de voir la présence ou non d'une séquence, son locus sur le chromosome, ou encore son devenir dans la machine transcriptionnelle.

Pour les ADN, les 3 étapes sont :

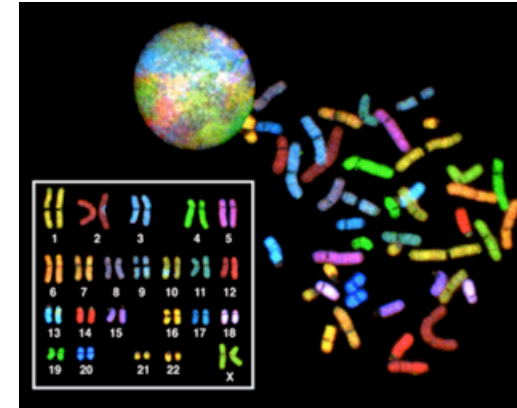
1. **Dénaturation** (les 2 brins sont séparés par chaleur ou traitement chimique)
2. **Hybridation** de la sonde avec le brin
3. **Révélation**, la sonde étant marquée par un fluorochrome, la fluorescence est repérée.

La sonde peut être **directement** (en incorporant des nucléotides qui sont marqués) ou **indirectement fluorescente** (indirectement marquée par un complexe antigène-anticorps)

Attention, dans **l'étude de l'ARN**, **seul 2 étapes seront nécessaires (la 2 et la 3, car on a qu'un seul brin dans l'ARN)**.

Exemples d'utilisation du Fish :

- **SkyFish** : caryotype en 24 couleurs, une couleur pour chaque paire d'autosome (22)



- **RNA FISH** : visualisation des ARNms dans la cellule.