

La Microscopie

La microscopie est une des méthodes incontournables pour étudier les cellules. Elle se définit par rapport au **type de particules** que rencontre l'échantillon étudié, on distingue alors 3 types de microscopes :

- 1- La Microscopie **optique/photonique**
- 2- La Microscopie **électronique**
- 3- La Microscopie **à champs proche (à force atomique)**

On va vouloir observer des cellules, des molécules, voire des atomes, des objets qui ont des échelles, des tailles différentes.

A. La microscopie optique/photonique

1. La limite de résolution

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

La résolution de l'œil est de 0,2 millimètres, soit 200 micromètres

Tandis que la résolution de la microscopie optique est de 0,2 micromètres. ++

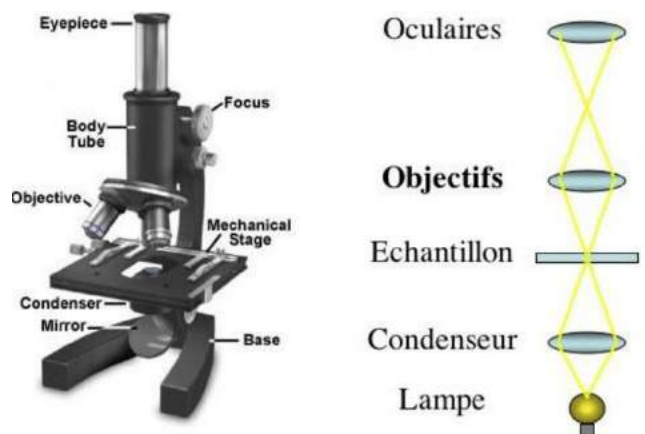
Avec le microscope optique on peut étudier un objet d'une taille MINIMALE de 0,2 micromètres, soit **200 nanomètres**.

Cette résolution n'est, au final, pas réellement suffisante pour les structures que l'on cherche à étudier et on essaiera de « tricher » pour essayer d'avoir une limite de résolution inférieure.

2. Le microscope optique conventionnel

On a différentes étapes pour préparer l'échantillon afin de l'observer. (revues dans le premier cours d'histologie avec le Pr.Long-Mira)

- **Fragmentation du tissu**
- **Fixation** : avec du glutaraldéhyde, formaldéhyde (pour stabiliser les liaisons chimiques, mais cela tue la cellule)
- **Rigidification** : inclusion de l'échantillon en résine/paraffine pour le couper
- **Coupe** (de l'ordre de quelques microns)
- **Coloration** : afin de pouvoir voir les cellules, car celles-ci sont naturellement transparentes.



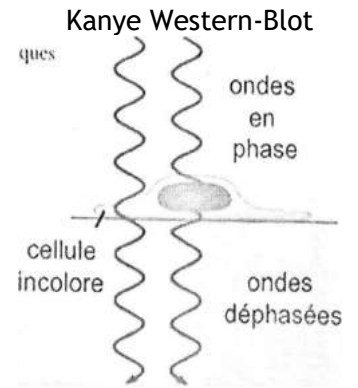
3. La microscopie à contraste de phase

On a dit juste en haut que la Fixation tuait les cellules. La microscopie à contraste de phase permet, elle, d'observer des **cellules vivantes**.

On va alors utiliser des propriétés de **réfraction** de la lumière, le milieu cellulaire ayant des **indices de réfraction différents** en fonction de la structure étudiée.

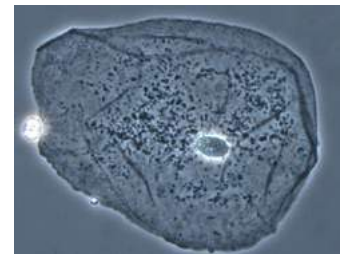
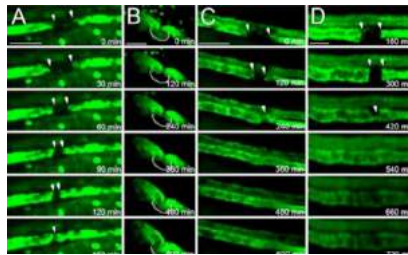
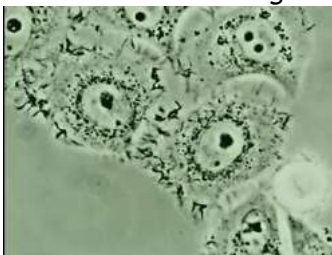
→ On augmente le **contraste** entre les structures cellulaires par un mécanisme qui augmente le **déphasage de la lumière incidente**, et le microscope enregistrera ensuite des ondes qui seront déphasées.

Une structure cellulaire donnée va donc déphaser la lumière d'une certaine façon, le **microscope va amplifier ce déphasage** → on va alors améliorer le contraste.



→ Ce microscope a une **meilleure résolution**, il permet de voir encore mieux les reliefs, par contre, on a des images de moindre intensité ☹

La microscopie à contraste de phase permet de faire du time-laps, du microcinéma ! On va pouvoir observer des cellules vivantes bouger



4. Le microscope confocal

Cette technique de microscopie un peu particulière et permet d'obtenir des images d'échantillons en **3D** !

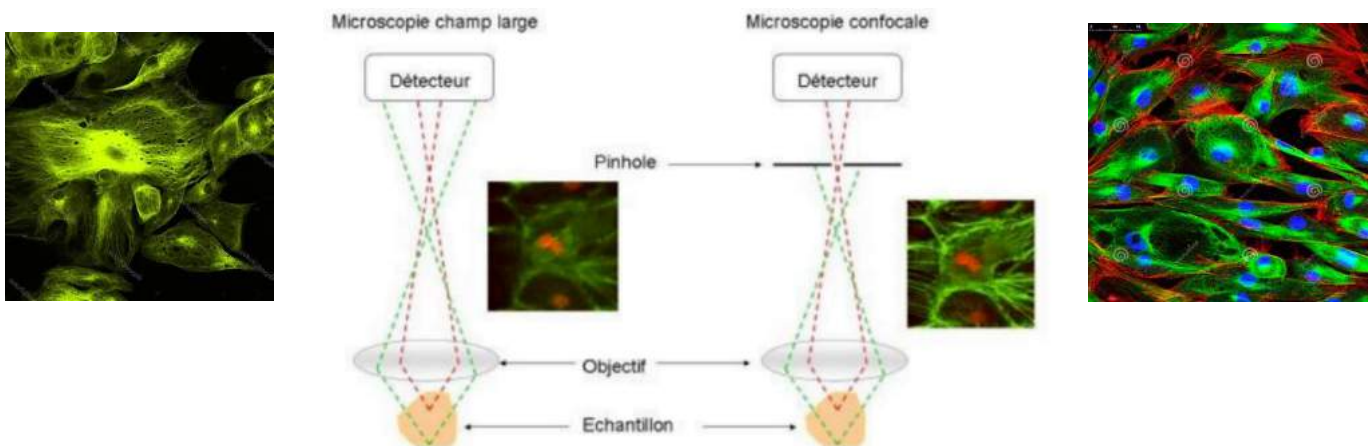
Ce microscope permet également d'augmenter la résolution. En effet, en microscopie classique on observe des échantillons « plats » (cellules).

→ La microscopie confocale nous permet de travailler sur des échantillons ayant une certaine épaisseur grâce au procédé suivant :

La source lumineuse est ici un **laser**, passant par un diaphragme, qui **focalise les rayons sur UN SEUL plan de l'échantillon**.

Le laser va venir illuminer l'échantillon sur un point focal précis grâce au diaphragme, ce qui va éliminer « les bruits de fond », c'est-à-dire les photons (la lumière) qui sont hors champs focal (c'est-à-dire dans un plan différent).

On va répéter ce procédé plan par plan et on obtiendra *in fine* une belle image en 3D.



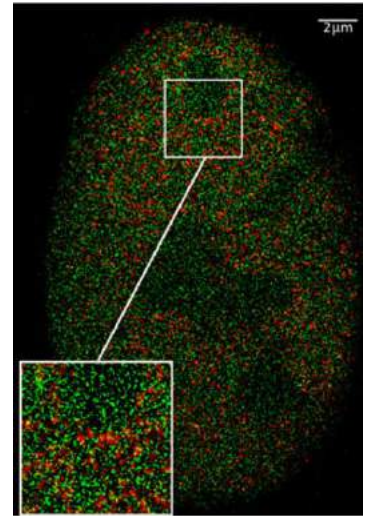
5. Le microscope à super-résolution

La limite de résolution est problématique en microscopie optique, en effet, c'est le caractère ondulatoire de la lumière qui va limiter la résolution du microscope optique à **200nm**.

Cette technique de microscopie à super-résolution permet de **diminuer cette limite de résolution** de la manière suivante :

On va exciter des fluorochromes (des molécules qui deviennent fluorescentes après excitation, qui peuvent être mises dans une cellule après manipulation, cf. partie suivante) **séquentiellement**, et non pas simultanément.

Le microscope va **superposer** informatiquement de nombreuses images (environ 20 000), permettant ainsi d'avoir une limite de résolution inférieure à 200nm !



6. Le microscope à fluorescence ++

||| a) Principe de fluorescence |||

Une molécule fluorescente (AUSSI APPELÉE **FLUOROCHROME ++**) absorbe de l'énergie lumineuse → c'est la lumière incidente

Elle va la restituer sous forme d'énergie lumineuse également (de manière quasi-immédiate, <1ns) → c'est la lumière d'émission

Ce principe d'absorption/émission de photon est revu en détail en Biophysique !

De manière générale il est important de savoir que :

Énergie d'Excitation > Énergie d'émission
 λ d'excitation < λ d'émission
 (λ étant la longueur d'onde de la lumière)

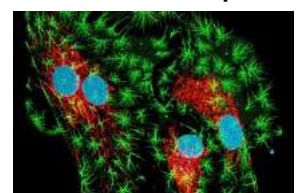
Le principe général de cette technique de microscopie sera d'associer une molécule fluorescente (qui émet de la lumière et qui est donc visible au microscope) à une petite molécule qu'on ne peut pas voir en temps normal car trop petite pour être observée.

IL EST PRIMORDIAL DE RETENIR QUE LA LONGUEUR D'ONDE (donc la couleur) INCIDENTE SERA TOUJOURS INFÉRIEURE À LA LONGUEUR D'ONDE ÉMISE PAR LE FLUOROCHROME.

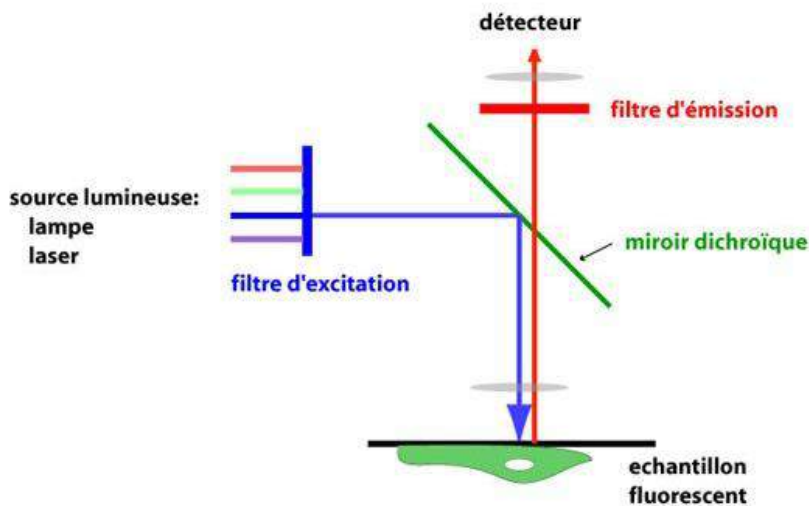


La microscopie à fluorescence permettra de **LOCALISER** des molécules spécifiques dans une cellule qui pourra être fixée **OU** vivante. +++

Trop trop trop bo →



b) Fonctionnement du microscope à fluorescence



La lumière blanche émise par le microscope sera filtrée de manière à obtenir une longueur d'onde d'excitation voulue (filtre d'excitation sur le schéma)

Cette lumière filtrée va ensuite être réfléchi par un miroir dichroïque (en vert) VERS l'échantillon étudié.

Elle va ensuite exciter les fluorochromes qui vont donc émittre de la lumière.

Cette lumière émise (flèche rouge) par les fluorochromes va ensuite TRAVERSER le miroir dichroïque, et non pas être réfléchi par ce dernier, étant donné qu'elle aura une longueur d'onde différente. (d'où l'intérêt d'utiliser ce miroir qui réfléchit et laisse passer des longueurs d'ondes différentes)

Enfin, la lumière passe dans un 2^{ème} filtre avant d'être observée par l'observateur (lol)

Mini-récap les gars ☺ regardez bien le schéma en même temps, c'est méga simple :

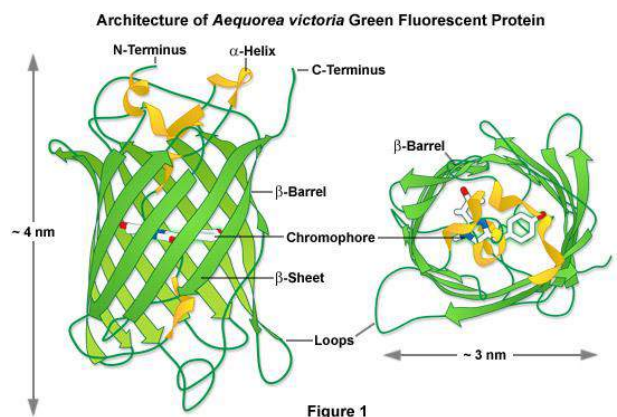
Lumière blanche → 1^{er} FILTRE sélectionnant une longueur d'onde → RÉFLEXION par miroir dichroïque → EXCITATION des fluorochromes → ÉMISSION de lumière par les fluorochromes → TRAVERSÉE de la lumière à travers le miroir dichroïque → 2^{ème} FILTRE → OBSERVATION

c) La Fluorescence naturelle : la GFP

La GFP est une protéine naturelle fluorescente découverte chez des méduses fluorescentes ayant une structure 3D en tonneau, avec au milieu de celui-ci un groupe chromophore lui conférant sa fluorescence

Elle a un spectre d'excitation dans le bleu et d'émission dans le vert (d'où son nom, GFP = green fluorescent protein).

C'est un marqueur universel qui conserve sa fluorescence qu'elle soit dans une cellule animale ou végétale. Elle est évidemment non toxique pour la cellule.



On va pouvoir modifier cette protéine pour avoir des propriétés spectrales, et donc des couleurs de fluorescences différentes (YFP de couleur jaune, CFP de couleur cyan) pour observer plusieurs molécules à la fois !

→ Parmi les fluorochromes on retrouve notamment : la Fluoréscine (FITC), excitée dans le bleu, émettant dans le vert

La rhodamine, excitée dans le vert, émettant dans le rouge.

||| d) Introduction des molécules fluorescentes dans la cellule |||

Pour introduire ces fluorochromes qui ne sont pas naturellement présents dans les cellules étudiées on va avoir 4 techniques différentes :

1- La micro-injection	On va utiliser une micropipette pour injecter le fluorochrome. Peu utilisée car on doit le faire individuellement pour chaque cellule (relou un peu) ☹️
2- L'électroporation	Méthode invasive faisant des petits trous dans la membrane plasmique grâce à un champs électrique permettant aux fluorochromes de rentrer. On peut traiter plusieurs cellules en même temps. 😊
3- Vectorisation par vésicule	Méthode la plus naturelle car utilise l'endocytose ++ On va mettre les fluorochromes dans des vésicules que la cellule va endocyter (absorber)
4- Exprimer un gène codant pour une protéine fluorescente directement	Technique sophistiquée, permettant à la cellule d'exprimer directement les fluorochromes en lui faisant exprimer un gène qui code pour des fluorochromes via une expression artificielle de ce gène.

||| e) Utilisation et interprétation de la fluorescence |||

Comme dit précédemment, on va vouloir utiliser ces molécules fluorescentes pour localiser une molécule d'intérêt, qu'on appellera dorénavant la Protéine X.

Il est nécessaire de fusionner cette protéine X qui est normalement invisible au microscope avec la protéine GFP. On obtiendra donc une protéine GFP-X

On va créer (via des techniques de manipulation génétique) un gène hybride GFP-X, puis le transfecter dans la cellule (transfection = transfert de matériel génétique étranger dans la cellule).

La cellule va exprimer le gène GFP-X pour être enfin traduit en protéine GFP-X.

On va comme cela pouvoir tracer la protéine X dans la cellule (un peu comme un sorte de tracker qu'on met sur une voiture dans une film d'espion lol).

À présent mettons nous en situation d'exemple ! ++

→ Admettons qu'on a bien réussi à obtenir une protéine hybride GFP-X qui va avoir une fluorescence verte. On observe, par exemple, que la fluorescence provient de la membrane plasmique.

Que va-t-on avoir comme réflexion directement ?

→ « La fluorescence provient de la membrane plasmique, donc logiquement la protéine X s'exprime forcément au niveau de la membrane ! ».

Sauf que ce n'est pas si simple malheureusement.

Le fait que la fluorescence soit localisée au niveau de la membrane ne fait que **SUGGÉRER** que la protéine X est membranaire, pourquoi ?

En Biologie Cellulaire comme dans toutes les autres matières, il faut bien faire attention à la terminologie qu'on utilise, **SUGGÉRER ne veut pas dire DÉMONTRER.**

SUGGÉRER ≠ DÉMONTRER

Démontrer revient à affirmer que le résultat obtenu est la seule interprétation possible.

Dire « je **DÉMONTRE** que la protéine X est membranaire » est **FAUX**.

Il peut exister une autre interprétation : on a créé une protéine hybride GFP-X et on peut admettre que la protéine GFP-X va avoir une localisation différente de la protéine X normale ! Ce changement de localisation après hybridation reste RARE mais il est existant et ne peut être négligé.

Il est donc obligatoire d'employer ici le terme **SUGGÉRER** plutôt que **DÉMONTRER** : « je **SUGGÈRE** que la protéine X est membranaire » est **VRAI**.

En revanche, il existe des manipulations plus poussées qui pourraient nous aider à **DÉMONTRER** que la protéine X est bel et bien membranaire, non détaillées ici ...



|| f) Application de la fluorescence (FRET, FRAP, FLIP)

(Partie qui peut s'avérer intéressante pour faciliter votre compréhension de certaines expériences qui peuvent tomber au CC++)

i- Le FRET

Le FRET est une technique permettant de vérifier la proximité de 2 protéines ou même de vérifier la conformation d'une seule protéine.

Le FRET c'est avant tout un **transfert d'énergie entre 2 molécules fluorescentes**

C'est-à-dire, Kanye ?

→ On prend 2 fluorochromes : le **BFP (qui émet dans le bleu)** et le **GFP (qui émet dans le vert, et qui absorbe le bleu)**

Si on dispose les 2 fluorochromes de manière éloignée et qu'on va exciter par exemple, uniquement l'endroit où se trouve **la BFP**, on va observer uniquement une **fluorescence bleue** (logique)

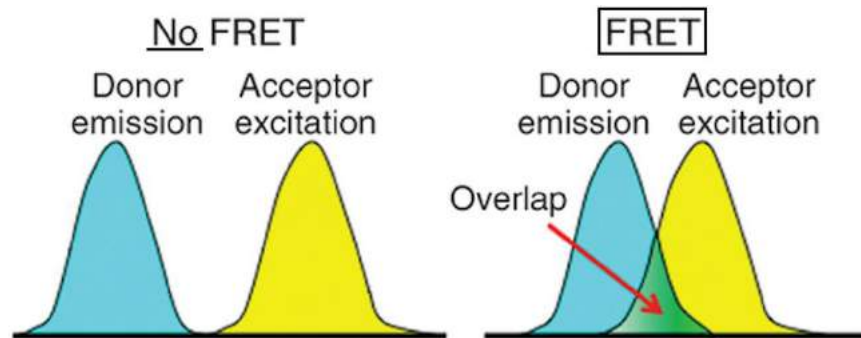
MAIS, si on dispose les 2 fluorochromes de manière **très proche** (inférieur à 10nm de distance entre les 2), et qu'on excite la BFP, on ne va pas observer une fluorescence bleue mais une fluorescence VERTE +++

→ La BFP a bien absorbé un photon et a émis un photon bleu en conséquence, MAIS, celui-ci a été directement absorbé par la GFP qui se trouve tout près !! La GFP ayant absorbé le photon bleu va à son tour émettre le photon vert !

Mini-récap : Excitation d'un fluorochrome (BFP) → Émission d'un photon (bleu) → Photon bleu est absorbé par le 2^{ème} fluorochrome (GFP) → Émission d'un photon (vert) qui sera observé au microscope.

On déduit de ce principe 2 conditions pour que le FRET fonctionne :

- 1- Le spectre d'émission (donc la longueur d'onde du photon) du premier fluorochrome doit recouvrir le spectre d'absorption du 2^{ème} fluorochrome.
- 2- Les 2 molécules doivent se situer à une distance inférieure à 10nm.



On pourra distinguer 2 types de FRET différents :

I- Le FRET intermoléculaire

Le FRET intermoléculaire, comme son nom l'indique, cherche à vérifier l'interaction, la proximité entre 2 protéines !

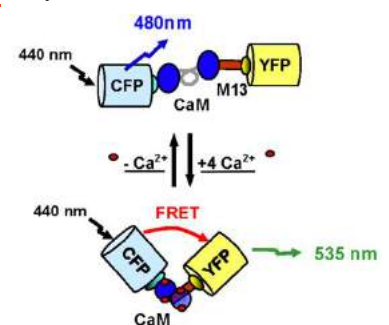
On peut reprendre un exemple avec 2 protéines, NIPP1 (excité à 430 nm et émet à 510nm) et PP1 (excité à 510nm et qui émet à 530nm). Si on envoie des photons d'excitation à 430nm et qu'on observe des photons émis de 530nm, cela voudra dire que les 2 protéines sont proches l'une de l'autre.

II- Le FRET intramoléculaire

Encore une fois, comme le nom l'indique, ce FRET se fera de manière intramoléculaire= on va disposer 2 fluorochromes sur LA MÊME protéine.

→ Ce procédé permet de voir si 2 territoires protéiques (là où on aura mis les fluorochromes du coup) se rapprochent, et ainsi voir si la protéine change de conformation dans l'espace ++.

Exemple : Une sonde au calcium « caméléon » qui, quand il y aura présence d'une concentration importante de calcium dans la cellule, va changer de conformation et ainsi émettra une fluorescence proportionnelle à la concentration en calcium dans le milieu !



Le principe global de ces 2 techniques repose sur le **photoblanchiment** → c'est-à-dire l'exposition à une lumière de très forte intensité, tellement forte que cela va tuer la fluorescence de manière irréversible !

Ces techniques vont permettre d'observer le **DÉPLACEMENT** d'une molécule dans la cellule via le microcinéma.

Le FLIP/FRAP peuvent être utilisés par exemple, pour observer la fluidité des membranes (oui oui, une membrane c'est fluide !). On observera ainsi la mobilité d'une partie des protéines membranaires (qui diffusent latéralement) en irradiant une fraction de la membrane et en observant ensuite la réapparition de la fluorescence !

I- Le **FRAP**

(Mnémono : la fluorescence Revient)

« On détecte la réapparition de fluorescence que l'on avait fait disparaître ».

Principe :

- 1- On irradie (on la « photoblanchie » la cellule en un point précis)
- 2- On aura ainsi une DISPARITION de la fluorescence à cause de cette irradiation
- 3- On arrête d'irradier
- 4- On attend
- 5- On observe la fluorescence revenir petit à petit grâce au DÉPLACEMENT des protéines fluorescentes qui n'ont pas subi l'irradiation et qui bougent perpétuellement dans la cellule

→ Ces protéines fluorescentes mobiles, non irradiées vont « recoloniser » la zone photoblanchie et vont donc faire réapparaître la fluorescence au fur et à mesure !

II-Le **FLIP**

(Mnémono : on Lose la fluorescence, on perd la fluorescence)

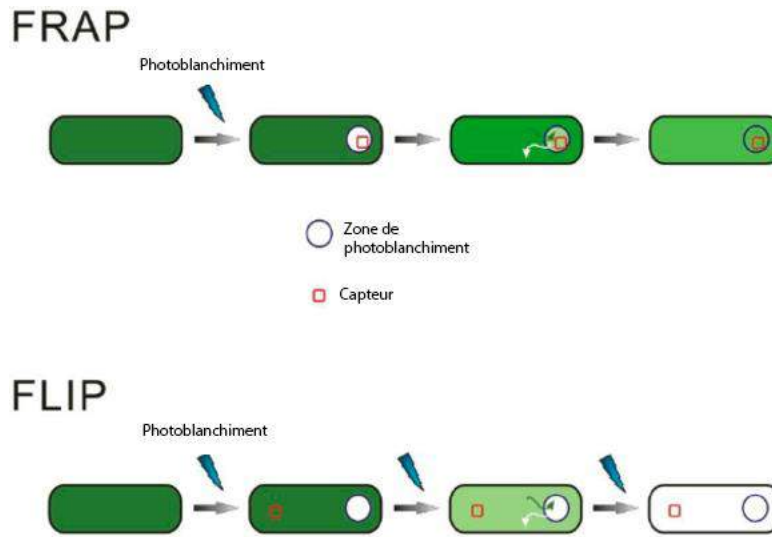
« On détecte la perte de la fluorescence dans un endroit que l'on n'a pas irradié »

Principe :

- 1- On irradie la cellule à un endroit précis mais cette fois de manière continue, **SANS S'ARRÊTER**
- 2- **MAIS**, on enregistre la variation de fluorescence dans un **AUTRE ENDROIT** (pas à l'endroit où on photoblanchie comme dans la FRAP)
- 3- Les protéines fluorescentes sont toujours en déplacement perpétuel, et à chaque fois qu'elles vont atteindre la zone qui est en train d'être irradiée, la fluorescence va donc disparaître
- 4- La fluorescence mesurée en un point A va donc diminuer progressivement vu que l'irradiation est continue en un autre point B et que les protéines sont en mouvement constant.

→ Les molécules fluorescentes qui sont passées au niveau du point photoblanchi ont donc perdu leur fluorescence, et leur diffusion vers le site d'observation va donc permettre d'observer la perte de fluorescence. ++

Schéma Récap :



||| g) La Fluorescence Induite |||

La fluorescence induite = une molécule devient fluorescente quand elle se fixe à la molécule étudiée !

Technique très utile dans l'étude des acides nucléiques (constituants de l'ADN)

On a notamment 2 types de coloration pour les acides nucléiques :

Hoechst et DAPI	Bromure d'Éthidium et Iodure de Propidium
Se fixent sur les bases A-T de l'ADN	Sont des intercalants de l'ADN= ils se fixent entre les brins d'ADN, <u>non-spécifiquement</u> .

Cette technique permettra alors d'observer les zones très concentrées en ADN (zone d'hétérochromatine, très condensées = **pas de transcription de gènes**)

Ou des zones moins concentrées en ADN et donc moins fluorescentes (zones d'euchromatine = **transcription de gènes**)

||| h) L'immunofluorescence indirecte |||

L'immunofluorescence indirecte est une technique utilisant des anticorps associés à un fluorochrome.

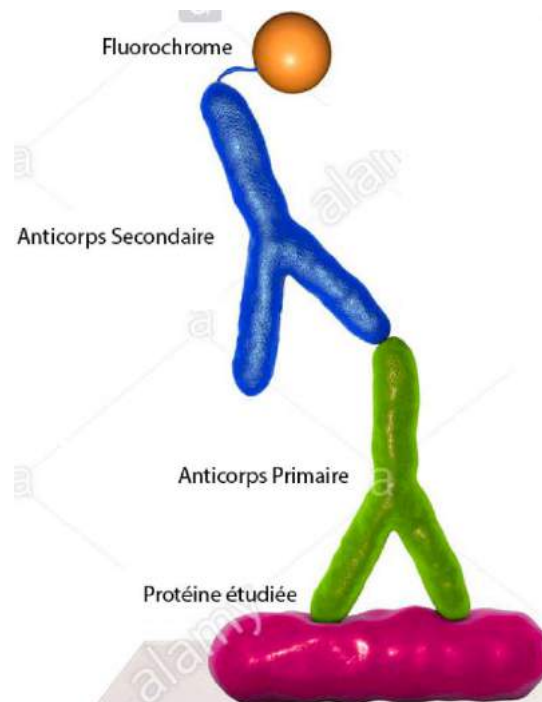
Pourquoi on qualifie ça d' « indirect » ?

→ Car on ne rend pas la molécule fluorescente directement, on rend **l'anticorps fluorescent** et c'est l'anticorps qui va ensuite s'associer à la molécule étudiée.

Un anticorps ne reconnaît pas uniquement une bactérie ou un virus ... Un anticorps reconnaît **un antigène ou bien une molécule plus généralement**. Ils vont reconnaître en réalité une toute petite partie de la protéine étudiée, partie qu'on appelle **l'épitope**.

La réalisation d'une immunofluorescence indirecte se fait donc de la manière suivante (un peu comme des sortes de Lego qui s'emboîtent mdr) :

On a un 1^{er} anticorps qui va reconnaître la molécule étudiée : c'est l'**Anticorps Primaire**
 Puis on a simplement un 2^{ème} anticorps qui va reconnaître l'Anticorps Primaire : c'est l'**Anticorps Secondaire**, qui lui sera **Fluorescent car greffé d'un Fluorochrome ++**



- Il existe **2 types d'anticorps** qui peuvent être conçus pour réaliser des immunofluorescences indirectes (*je ne détaillerai pas leur processus de fabrication, juste leurs caractéristiques principales*)

Anticorps polyclonaux	Anticorps monoclonaux
<ul style="list-style-type: none"> - Fabrication « simple », avec des animaux de laboratoire - Reconnaissent plusieurs épitopes, donc ont une mauvaise spécificité .. 	<ul style="list-style-type: none"> -Fabrication complexe (nécessite une cancérisation de lymphocytes B par la technique du criblage d'hybridome ...) - Excellente spécificité ++

- On distinguera également l'immunofluorescence indirecte **SIMPLE** ET l'immunofluorescence indirecte **DOUBLE** :

L'immunofluorescence indirecte <u>SIMPLE</u>	L'immunofluorescence indirecte <u>DOUBLE</u>
Correspond au cas précédent, c'est-à-dire avec l'utilisation d' UN SEUL Anticorps Primaire = pour localiser une seule protéine	On utilise 2 Anticorps Primaires (et donc 2 anticorps secondaires de couleurs différentes) pour localiser 2 protéines différentes

Point EXTREMEMENT mais genre EXTREMEMENT IMPORTANT ++++++ QCM QUI TOMBE PRATIQUEMENT TOUS LES ANS

Peu importe que ce soit une immunofluorescence simple ou double, il faut TOUJOURS que les anticorps PRIMAIRES ET SECONDAIRES SOIENT d'espèces DIFFÉRENTES !

Exemple : un Anticorps Primaire de chèvre et un Anticorps Secondaire de cheval

Dans le cas d'une immunofluorescence DOUBLE (avec 2 Anticorps Primaires ..) il faut TOUJOURS que les DEUX ANTICORPS PRIMAIRES SOIENT D'ESPÈCES DIFFÉRENTES ++

Exemple : un Anticorps Primaire de pigeon pour une protéine X et Anticorps Primaire de chien pour une protéine Y

EN REVANCHE, toujours dans le cas d'une immunofluorescence DOUBLE, il est POSSIBLE de prendre DEUX ANTICORPS SECONDAIRES de la même espèce !

Exemple : un Anticorps Secondaire de poulet et un Anticorps Secondaire de poulet

|| i) L'hybridation in situ : le FISH

Le FISH permet de visualiser des acides nucléiques grâce à des sondes fluorescentes qui sont **spécifiques de certains gènes, soit de chromosomes entiers**

Instant Tut' : À ne pas confondre avec le Hoeschst/Dapi ou le Bromure d'éthidium/Iodure de propidium qui ne sont pas spécifiques de certains gènes/chromosomes mais juste de l'acide nucléiques/certains acides nucléiques.

Il faut noter qu'aucun anticorps n'est capable de reconnaître une séquence d'ADN particulière, seules des sondes fluorescentes peuvent s'hybrider par un principe de complémentarité aux acides nucléiques.

On a 3 étapes requises pour hybrider la sonde au gène/chromosome étudié : (elles seront revues en détail en Biologie Moléculaire au S1 et en UE11 au S2) :

- 1- Dénaturation : on sépare les 2 brins d'ADN grâce à de la chaleur/traitement chimique.
- 2- Hybridation : la sonde vient se fixer spécifiquement à une séquence d'un des 2 brins d'ADN par hybridation
- 3- Révélation : on observe la fluorescence émise par la sonde (qu'elle soit directe ou indirecte)

La sonde peut émettre la fluorescence DIRECTEMENT si elle est fluorescente par nature (des nucléotides fluorescents) = **fluorescence DIRECTE**

Ou bien on peut greffer, à une sonde non fluorescente, des anticorps qui se fixeront donc sur cette sonde grâce à de la disoxygénine (DIG) qui sera reconnue par les anticorps= **fluorescence INDIRECTE**

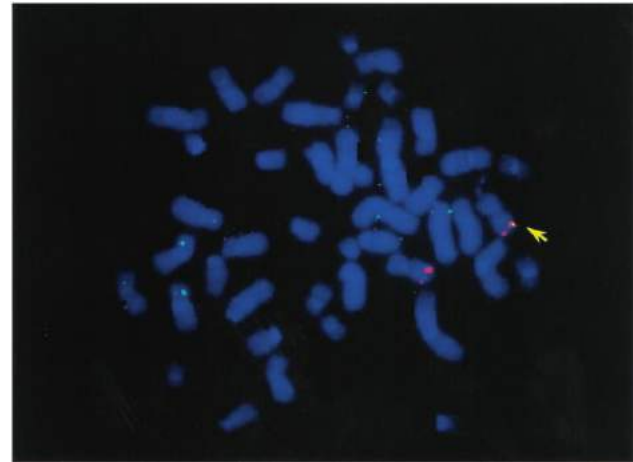
Intérêt de cette technique et exemples d'utilisations :

Position des gènes dans le noyau, leur localisation sur le chromosome → on établit une véritable cartographie génétique (on devient les Christophe Colomb de la cellule quoi ^^')

La technique du **Sky FISH** : cette technique consiste à marquer des chromosomes entiers avec des sondes spécifiques à des chromosomes, avec une couleur pour chaque chromosome.
 → Utile pour rechercher des anomalies chromosomiques de type trisomie !

Plus généralement le FISH permettra de rechercher des anomalies génétiques de type translocation par exemple.

Le FISH peut se réaliser également sur de l'ARN (dans ce cas-là, l'étape 1-Dénaturation n'est pas nécessaire vu que l'ARN est déjà simple brin)



B. La Microscopie Électronique

La différence majeure entre la microscopie optique et la microscopie électronique réside dans le **type de particule utilisé** pour observer les échantillons

- La microscopie optique utilise les **photons**
- La microscopie électronique utilise les **électrons**

L'utilisation des électrons va avoir pour conséquence **d'augmenter grandement la résolution ++**

Il existe 2 types de microscopies électroniques :

- La microscopie électronique à **transmission**
- La microscopie électronique à **balayage (MEB)**

Toutes les techniques de microscopie électronique nécessitent la fixation (donc la mort) des cellules SAUF la cryofracture (vu juste après)

1. Le microscope électronique à transmission

||| a) Fonctionnement et préparation |||

On va envoyer un faisceau d'électrons qui **traversent** l'échantillon.
 Le **contraste** se créera en fonction du degré de transmission des électrons (certaines structures cellulaires laissent plus passer les électrons que d'autres ++).

→ Une **structure laissant passer les électrons apparaîtra claire** et une **structure qui ne les laisse pas passer apparaîtra foncée.**

La résolution est nettement meilleure elle est de **0,2 nm** ! (contre environ 200nm en Microscopie optique)

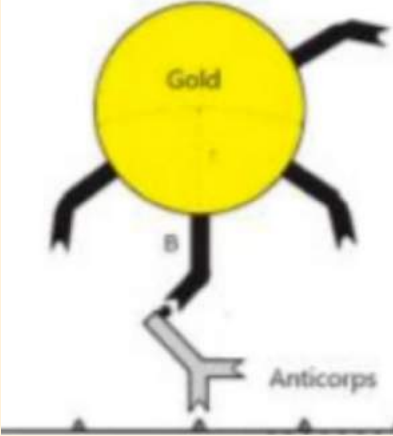

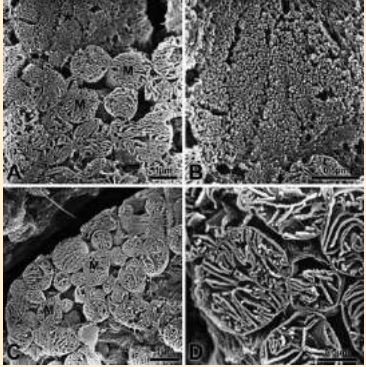


Préparation de l'échantillon pour la microscopie électronique (détaillée aussi dans le cours d'histo du Pr.Long-Mira ...) :

- 1- Fixation au glutaraldéhyde/métaux lourds
- 2- Déshydratation
- 3- Inclusion dans une résine
- 4- Coupe à l'ultra microtome
- 5- Coloration avec des **sels de métaux lourds**, denses aux électrons (pour créer un contraste)

Il existe **3 techniques** de « coloration » en microscopie électronique à transmission :

||| **b) Coloration d'un échantillon en Microscopie à Transmission** |||

Marquage à l'or : immunogold	Coloration par ombrage	Cryofracture/Cryomicroscopie
<p>Nécessite la fixation au préalable de l'échantillon ++</p> <p><i>Fonctionnement similaire à l'immunofluorescence indirecte</i></p> <p><u>Différence</u> = Il n'y a pas de fluorochrome fixé à l'anticorps,</p> <p>De l'or est fixé (via une protéine) à l'anticorps, car l'or est dense aux électrons → <u>crée un contraste</u> !</p> 	<p>Nécessite la fixation au préalable de l'échantillon ++</p> <p>Observation « indirecte » de l'échantillon</p> <p>On fait une réplique en relief de l'échantillon via vaporisation de métaux lourds, sous vide</p> <p>On visualise ensuite cette réplique au microscope.</p> <p><i>Permet d'observer des grosses molécules, virus, bactéries ...</i></p> 	<p>Ne nécessite PAS la fixation au préalable de l'échantillon +++</p> <p>Permet de visualiser les reliefs des organites, en congelant l'échantillon à -150°C dans de l'azote liquide</p> <p>On manipule ensuite l'échantillon de sorte à obtenir encore une fois une réplique de la surface de l'échantillon</p> <p>Enfin on observe cette réplique au microscope</p> <p>→ Technique utile car limite les risque de dénaturation des cellules ++</p> 

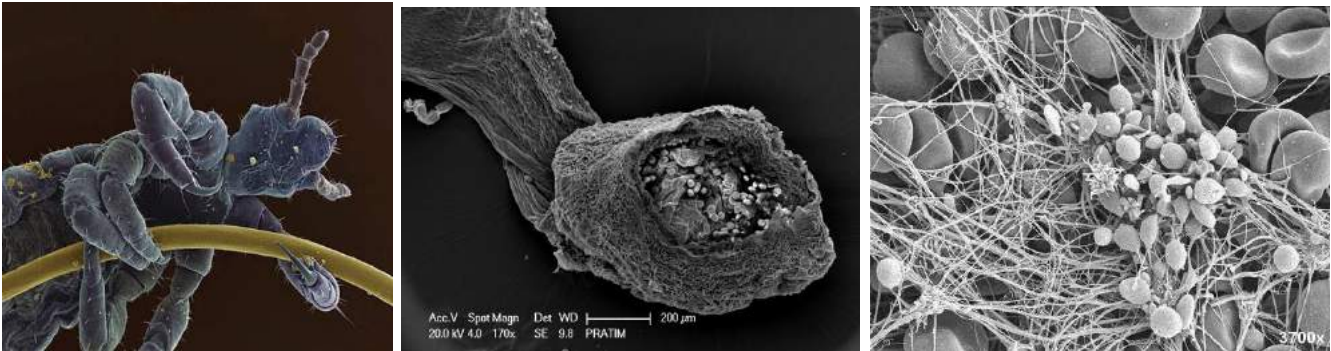
c) Le microscope électronique à balayage

Dans ce type de microscopie électronique, les électrons ne traversent pas les échantillons mais vont plutôt **rebondir** sur ces derniers.

La résolution est cependant moins bonne : **10 nm** ☹️

Nécessite également une fixation au préalable de l'échantillon et des métaux lourds pour créer le contraste.

Les électrons rebondissent et seront captés par un capteur (lol) qui reconstituera informatiquement une image 3D *plutôt stylée*.



C. La Microscopie à Force Atomique

Cette technique de microscopie, récente et très utilisée est aussi appelée **microscopie à champs proche**. (*fonctionnement étudié en physique !*)

Le microscope balaye la surface de l'échantillon avec une **pointe** extrêmement fine.

→ La pointe va frôler la surface de l'échantillon (sans la toucher) de sorte à en établir le relief et reconstituer une image de l'échantillon.

La limite de résolution est déterminée par la taille de la pointe («the tip is the limit» — Professor Gilson), **plus elle est fine, plus la résolution est meilleure**.

En général, la microscopie à force atomique a une résolution comparable à celle de la microscopie électronique.

Technique EXTREMEMENT utile dans la mesure où **l'échantillon n'a pas besoin d'être préparé/coloré**, il peut même être vivant.

Permet d'avoir des données comme la topographie/force/dureté de l'échantillon, d'étudier toutes les structures cellulaires, mesurer la plasticité des membranes ...

Utilisation très large, c'est donc un outil de choix.

