

MICROSCOPIE

On distingue 3 types de microscopie :

- La microscopie optique ou photonique → Les particules qui rencontrent les échantillons sont les **photons**
- La microscopie électronique → Les particules qui rencontrent les échantillons sont les **électrons**
- La microscopie à champs rapprochés ou à force atomique

Peu importe le microscope choisi, on est limité par l'échelle de l'objet, sa taille.

En biologie cellulaire, on veut regarder du très petit, des molécules, voire même des atomes. C'est aussi la biologie sous une échelle moléculaire ou atomique, avec parfois des structures de plusieurs microns.

C'est pour ça qu'on définit un microscope par son **pouvoir de résolution** qui est la capacité de distinguer 2 points séparés d'une certaine distance +++.

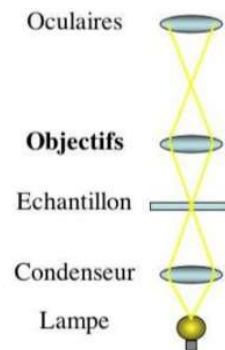
I. Le microscope optique / photonique

La résolution est de **200 nm** (ou 0.2 μm), c'est lié à la particule utilisée, le photon qui est issu d'une source de lumière (on peut utiliser une simple lampe ou des lasers de différentes couleurs donc différentes longueurs d'onde).

Le système optique va concentrer la lumière sur la préparation étudiée. En microscopie, on va étudier des cellules (biocell), des tissus (histologie). Les tissus peuvent être fixés, rigidifiés (paraffine) et coupé (microtome) (tout ce processus sera plus étudié en histo avec long-mimi).

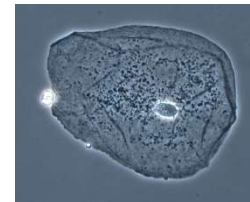
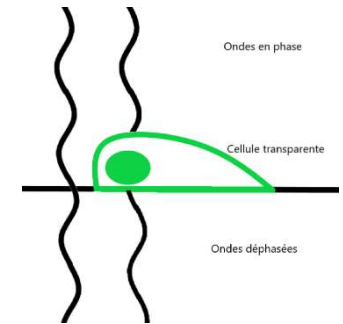
En Biocell, on va surtout chercher à étudier les cellules vivantes et les interactions entre celles-ci, on utilise les méthodes les moins perturbantes possibles, alors qu'en histologie (anatomopathologie), on tue la plupart du temps les cellules en les marquant avec des composés pour les identifier.

De plus, une cellule est plutôt transparente, on utilise donc des colorants de différentes natures qui changent la longueur d'onde ou modifie le contraste, ils changent la structure de la cellule. *La biologie cellulaire n'aime pas trop les colorants.*



A- La microscopie à contraste de phase

Ici on n'utilise pas de colorant, on pourra donc observer des cellules vivantes. Le microscope à contraste de phase va augmenter le déphasage en retardant la lumière déphasée, augmentant le contraste. → Ce que l'on gagne en contraste, on le perd en brillance (meilleure résolution, moindre intensité). Avec ce système qui s'adapte sur les microscopes, on peut observer des cellules en

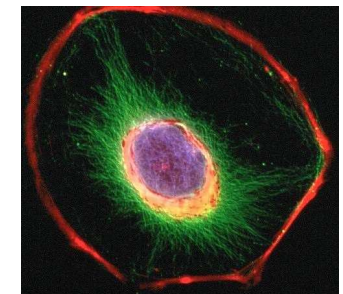
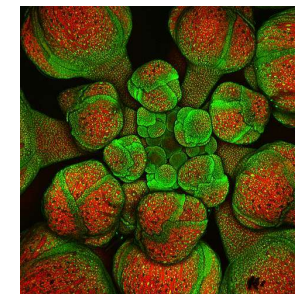
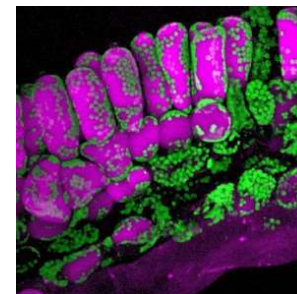


mouvement et faire du microcinéma (même pas de scénarii à écrire, que des impros), on appelle aussi ça la microscopie Timelapse. Le microscope est équipé d'une caméra et enregistre en direct. On peut par exemple observer les déplacements d'un fibroblaste (que vous verrez avec le cytosquelette)

B- La microscopie confocale

La microscopie confocale est un outil d'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 obtenir des **images en 3D**.

La source lumineuse utilisée est **un laser**, il passera par un diaphragme qui le focalisera sur **UN plan** de l'échantillon, il illumine l'échantillon puis est renvoyé vers l'objectif après avoir traversé un second diaphragme qui éliminera les **bruits de fond** (les photons hors du plan focal, hors du champs). Puis on répètera plan par plan



Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

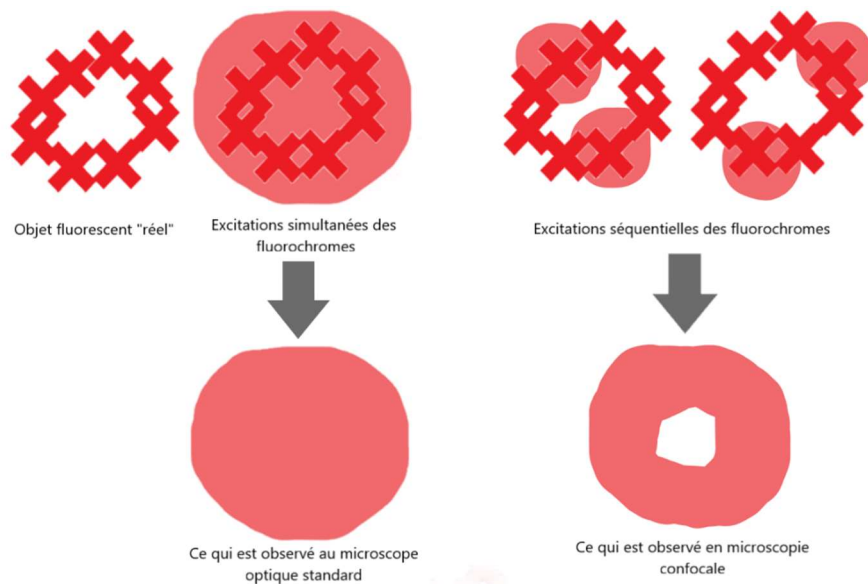
MICROSCOPIE

C- La microscopie 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 200 nm.

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

On va exciter des fluorochromes (des molécules qui deviennent fluorescentes à la suite d'une 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 200 nm !**



En gros on va exciter un fluorochrome qui va faire une « grosse » lumière, mais un logiciel va permettre de ne garder que le point central de la grosse lumière ce qui sera plus précis.

D- La microscopie à fluorescence

En Biocell ♥, on s'intéresse aux molécules, la microscopie photonique classique et sa résolution de 200 nm n'est donc pas suffisante, on va donc s'aider de la fluorescence. Cette fluorescence sera spécifique à une molécule et émettra des photons qui seront repérables sur le microscope.

a. La fluorescence

Fluorescence ≠ phosphorescence (vous le verrez en physique)

Une molécule fluorescente absorbe de l'énergie lumineuse (une lumière d'excitation, incidente), pour ensuite la restituer (quasi-immédiatement <1 ns) sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission).

Le photon d'émission est d'énergie plus faible que le photon incident, donc de longueur d'onde plus élevée. Chaque molécule fluorescente va être rendue fluorescente en recevant un photon d'une longueur d'onde précise et en émettant dans une longueur d'onde précise aussi. Ces molécules sont caractérisées par un couple de valeur : la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission.

La rhodamine aura un λ d'excitation dans le vert et un λ d'émission dans le rouge. Et le FITC émettra dans le vert. Ces deux molécules sont souvent utilisées.

b. La fluorescence appliquée au microscope

On va utiliser une source de lumière blanche et sélectionner une longueur d'onde qui sera reconnue par la molécule fluorescente que l'on cherche à observer.

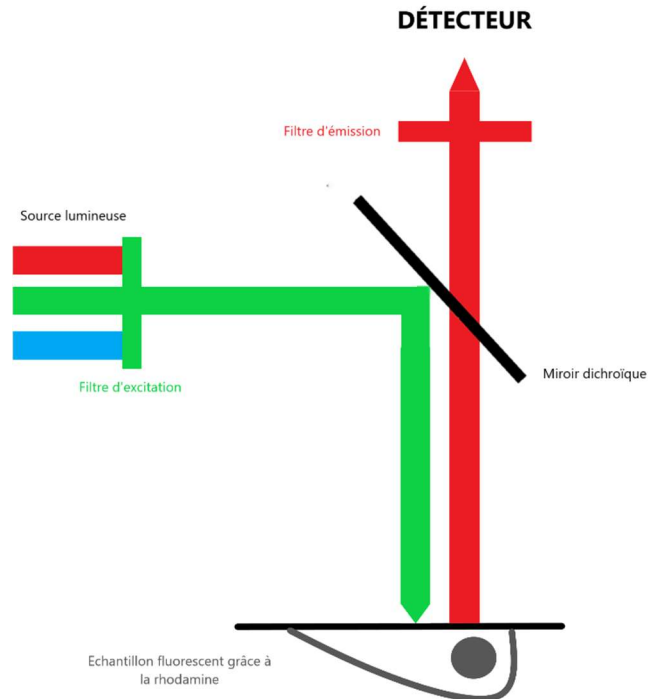
1. La lumière blanche traverse un premier filtre d'excitation qui laissera passer uniquement la longueur d'onde d'excitation de notre molécule (par exemple un λ vert si on a de la rhodamine)
2. La lumière croise ensuite un miroir dichroïque qui est traversé par certaines longueurs d'onde et qui en reflète d'autres (la longueur d'onde d'excitation est réfléchi et celle d'émission le traversera). (Pour revenir à notre exemple, la lumière après avoir traversé le filtre 1 aura un λ dans le vert, qui sera réfléchi sur le miroir, ira atteindre l'échantillon où il réagira avec la rhodamine qui émettra dans le rouge, les photons « rouges », eux

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

MICROSCOPIE

traverseront le miroir dichroïque pour passer par le second filtre et finalement être visualisés).

3. Finalement, la lumière traversera un filtre pour éviter les photons parasites.



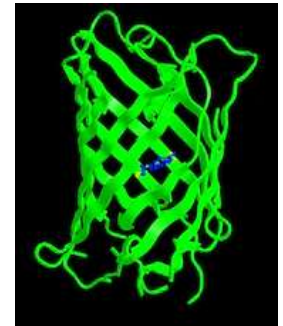
La microscopie à fluorescence permet :

La localisation de molécules spécifiques dans la cellule. Pour une molécule de taille inférieure à la limite de résolution, on pourra la rendre fluorescente et donc visible en la couplant à un fluorochrome.

On peut **combiner** plusieurs fluorochromes associés directement ou indirectement aux structures étudiées → Pour regarder 2/3 molécules simultanément

Aparté : on peut aussi observer le phénomène de bioluminescence, de la lumière émise par les animaux à l'état naturel. Ça correspond à l'émission de photons sans fluorescence. Cette bioluminescence est souvent due à des réactions enzymatiques notamment grâce à la luciférase qui peut être utilisée à des fins expérimentales. DONC → Fluorescence = photons d'excitation nécessaire et Bioluminescence = photons d'excitation pas nécessaire.

Historiquement, l'un des premiers animaux où la fluorescence a été détectée fut la méduse. Cette fluorescence émanait de la GFP (Green Fluorescent Protein). Cette protéine est formée d'un ensemble de 3 AA (GAS) qui forment un fluorochrome autour duquel le reste de la molécule semble avoir une forme de tonneau. Le fluorochrome est responsable de la fluorescence. La GFP est caractérisée par une longueur d'onde d'excitation dans le bleu et d'émission dans le vert (d'où le green).



On peut créer des mutations au sein des 3 AA pour changer les propriétés spectrales du fluorochrome (changer les λ spécifiques), on aura la CFP qui émet dans le cyan, la YFP qui émet dans le jaune (soit yellow en anglais) ...

De plus la GFP possède une fluorescence **intrinsèque**, elle est fluorescente peu importe dans quelle espèce elle est exprimée, pas uniquement chez la méduse ! ++

Comment rend-t-on une molécule, qui n'est pas naturellement fluorescente, fluorescente ?

2 possibilités :

→ Soit on greffe chimiquement un fluorochrome sur une molécule pour la rendre fluorescente.

→ Soit on greffe un fluorochrome sur une molécule qui va elle-même aller reconnaître la molécule qu'on souhaite observer.

Les types de fluorochromes :

→ Les petits fluorochromes que l'on peut manipuler chimiquement (petits constituants).

→ Les gros fluorochromes comme la GFP.

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

MICROSCOPIE

Exemples de fluorochromes :

→ La *Fluoresceine* ou *FITC*, qui lorsqu'elle est excitée dans le **bleu** émet dans le **vert**.

→ La *Rhodamine*, qui lorsqu'elle est excitée dans le **vert** émet dans le **rouge**.

c. Introduction des molécules fluorescentes

1. La micro-injection

Méthode brutale, longue et fastidieuse donc **peu utilisée**.

On traite les cellules **individuellement** et on utilise une **micropipette** pour casser la membrane plasmique et injecter les molécules fluorescentes dans le corps de la cellule.

2. L'électroporation

Technique **plus passive**.

Plusieurs cellules peuvent être traitées en même temps. On va les soumettre à des **micro-chocs électriques** pour créer des pores (trous) transitoires. Les molécules fluorescentes qui baignent dans le milieu où sont disposées les cellules peuvent rentrer dans celles-ci. Une fois que le choc électrique est passé, la membrane se referme, les molécules fluorescentes à l'intérieur. Tout ceci, n'est pas naturel pour les cellules et certains aspects de leur physiologie peuvent être modifiés.

3. Vectorisation par vésicule

On peut aussi utiliser des vecteurs plus naturels (grâce à l'endocytose). On met les molécules fluorescentes dans des vésicules phospholipidiques (composition similaire à la membrane plasmique), qui vont fusionner avec la membrane de la cellule, et donc le contenu sera délivré à l'intérieur de la cellule.

4. Faire exprimer un gène de la fluorescence directement à la cellule

C'est la technique **la plus utilisée**. Ici, on va partir directement d'un morceau d'ADN qui va être transformé en protéine (Par exemple en **GFP**). On aura d'abord la transcription puis la traduction (cf biomol). En partant du principe que le code génétique est universel, un gène de méduse (comme celui qui déterminera la synthèse de **GFP**) pourra être introduit dans une cellule humaine, et induire des signaux d'expression. Ici, **on ne transfère pas directement les molécules fluorescentes**, elles seront directement exprimées par la cellule.

RAPPELS :

ADN → ARN = Transcription dans le **noyau** (pour les procaryotes)

ARN → Protéine = Traduction dans le **cytoplasme**

Pour pouvoir être transcrit un gène doit recevoir des signaux. A partir d'une molécule d'ADN, on produira beaucoup d'ARN (10, 100, 1000 molécules d'ARN) et à partir de chaque molécule d'ARN, on produira beaucoup de protéines (10, 100 1000 protéines), donc il y a une **amplification du flux génétique**.

5. Les protéines de fusion

→ On peut aussi greffer par une fusion génétique le gène codant pour la **GFP** sur un gène codant pour une protéine X d'intérêt et donc forcer la synthèse de la protéine fluorescente sur la protéine d'intérêt (que l'on souhaite observer) afin d'étudier son comportement dans la cellule. On aura alors un hybride **GFP-X**.

→ On introduit ensuite ce gène dans la cellule (selon la technique la plus appropriée), il va être reconnu comme appartenant à la cellule, sera transcrit puis traduit en protéine comme un gène classique.

→ Au microscope à fluorescence et on ne va pas voir la protéine d'intérêt, car elle n'est pas fluorescente. Ce qu'on voit, c'est le **vert** dû à l'expression du gène **GFP**. Si ce vert est proche de la membrane, qu'il colocalise avec elle, on dira que « notre fluorescence est membranaire ».

DÉMONTRER ≠ SUGGÉRER

« Notre fluorescence est membranaire » **suggère** que notre protéine X est membranaire, mais **ne le démontre PAS**, car d'autres interprétations sont possibles ! En ayant créé une nouvelle protéine GFP-X, on a pu créer artificiellement une séquence qui va amener la protéine à la membrane alors que la protéine X seule ne s'y retrouve pas (en général, on ne démontre pas avec une protéine chimère).

On peut démontrer que s'il n'y a qu'**UNE** interprétation possible

d. Application de la fluorescence : FRET, FRAP, FLIP

1. FRET (Fluo. Resonance Energy Transfert)

Aussi appelé transfert d'énergie non radiatif (= sans émission de photons) entre 2 molécules.

Le photon émis par la 1^{ère} molécule, va être capturé par la 2^{ème} molécule **seulement** si cette molécule est très proche de la première (<10 nm). Cette fluorescence est donc **dépendante de la proximité** entre des molécules.

MICROSCOPIE

EXEMPLE :

Si on prend la BFP (qui émet dans le bleu) et la GFP (qui émet dans le vert et est excitée dans le bleu). Le BFP est excitée à 360 nm, elle émet une longueur d'onde à 450 nm (valeur de l'énergie d'un photon d'excitation de la GFP).

→ Si dans une cellule, on a **que de la BFP**, alors la fluorescence perçue sera **bleue**, si on envoie un photon avec un $\lambda = 360$ nm.

→ *Si Dans une même cellule, on a **BFP et GFP**, mais associé à deux molécules **éloignées de plus de 10 nm**, et qu'on excite avec un photon avec un $\lambda = 360$ nm, la fluorescence perçue sera aussi **bleue**. Le photon fera son chemin. Grâce à sa λ , il réagira avec la BFP qui renverra un photon bleu. La longueur d'onde du photon émis correspond au photon nécessaire pour exciter la GFP, cependant l'espace qui sépare les deux molécules est trop élevée (> 10 nm) et le photon n'arrivera pas à parcourir cette distance et sera directement observé, sans avoir excité la GFP.

→ **Si Dans une même cellule, on a **BFP et GFP**, mais associé à deux molécules **éloignées de moins de 10 nm**, et qu'on excite avec un photon avec un $\lambda = 360$ nm, la fluorescence perçue sera cette fois **verte**. Le photon fera son chemin. Grâce à sa λ , il réagira avec la BFP qui renverra un photon bleu. La longueur d'onde du photon émis correspond à celle du photon nécessaire pour exciter la GFP, il réagira (car assez proche) et la GFP émettra un photon vert. On observera ce second photon au microscope !

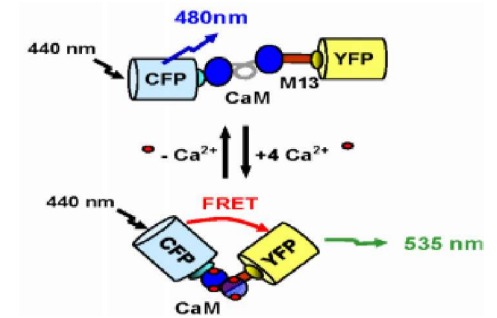
On retrouve 2 types de FRET, **INTRAmoléculaire** et **INTERmoléculaire**. On utilise le premier pour étudier la **conformation** d'1 molécule (sa forme) et le second pour chercher la **proximité** de 2 molécules.

Pour le FRET INTERmoléculaire, c'est exactement le cas qu'on a vu plus tôt (**), qui nous permet de **suggérer** (et non pas de démontrer !!!) que les deux molécules, celle couplée à la BFP et celle couplée à la GFP, sont à moins de 10 nm.

Pour le FRET INTRAmoléculaire, on va mettre un fluorochrome (le BFP par ex) sur une partie de la molécule et un autre fluorochrome (le GFP pour continuer dans notre ex) sur une autre partie. Si la molécule est repliée sur elle-même alors les deux fluorochromes seront proches et la fluorescence observée sera due au photon d'émission du second fluorochrome (ici le GFP donc vert). Si la molécule n'est pas repliée sur elle-même, les fluorochromes seront éloignés et la fluorescence visible sera celle du premier fluorochrome (ici le BFP donc bleue).

Exemple de FRET intramoléculaire : La sonde calcique « caméléon »

Elle permet de mesurer la concentration intracellulaire de calcium. La fluorescence sera proportionnelle à la concentration de calcium dans le milieu étudié. La YFP se rapprochera de la CFP lors d'un changement de conformation dû à un changement de concentration de calcium. On enregistre la fluorescence totale et ainsi on peut mesurer la concentration totale de calcium !



2. Techniques de photoblanchiment

On retrouve deux techniques qui reposent sur ce principe, le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et le FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching).

FRAP: On détectera la réapparition de la fluorescence que l'on avait fait disparaître.

Mnémo : La fluorescence Revient donc FRAP

La cellule fluorescente est irradiée en un point précis de manière irréversible (càd que les molécules irradiées perdent leur fluorescence définitivement). On regarde ce qui se passe **dans cette zone** à différents moments. Progressivement la fluorescence réapparaît **dans la zone précédemment photoblanchie** grâce au déplacement des molécules fluorescentes qui n'ont pas subi d'irradiation.

Au début, toute la cellule est fluorescente, car toutes les molécules qui la compose le sont. On va irradier une zone, donc enlever la fluorescence de toutes les molécules qui s'y trouve. On arrête l'irradiation. Si on observe de nouveau une fluorescence là où on irradiait, on peut déduire que les molécules étudiées se déplacent. En effet, le photoblanchiment étant irréversible, les molécules irradiées n'ont pas pu redevenir fluorescentes ! C'est donc forcément d'autres cellules, elles, fluorescentes, qui sont venues prendre leur place !

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

MICROSCOPIE

FLIP: On détecte la perte de la fluorescence dans un endroit que l'on n'a pas irradié.

Mnémo: La fluorescence est Lost (perdue en anglais) donc FLIP

La cellule fluorescente est encore une fois irradiée en un point précis de manière irréversible. On regarde ce qui se passe **dans le reste de la cellule** à différents moments. Progressivement la fluorescence disparaît dans **toute** la cellule grâce au déplacement des molécules fluorescentes qui ont subi une irradiation.

Au début, toute la cellule est fluorescente, car toutes les molécules qui la compose le sont. On va irradier une zone, donc enlever la fluorescence de toutes les molécules qui s'y trouve. On **n'arrête pas** l'irradiation. Si on observe une disparition de la fluorescence dans toute la cellule, on peut déduire que les molécules étudiées se déplacent. En effet, toutes les molécules de la cellule ayant perdu leur fluorescence, elles ont dû être toutes irradiées. Or, on n'a irradié qu'une seule zone de la cellule. Donc toutes les molécules ont dû passer à un moment dans la zone d'irradiation pour ensuite en sortir et coloniser toute la cellule !

Le FLIP et le FRAP ont permis de montrer la **fluidité des membranes**, selon la vitesse de déplacement des molécules y siégeant !

Schéma récap :

FRAP: Photoblanchiment



○ Zone de photoblanchiment
□ Capteur

FLIP:

Photoblanchiment



○ Zone de photoblanchiment
□ Capteur

e. Fluorescence induite

Une autre façon d'avoir des molécules fluorescentes est la fluorescence induite. C'est quand une molécule **devient fluorescente** lorsqu'elle est **fixée à la molécule** étudiée. A l'état originelle, la molécule en question n'est pas fluorescente. En effet, lors de la fixation, il va y avoir libération de molécules fluorescentes.

Cette technique permet essentiellement d'étudier les **acides nucléiques**.

Pour visualiser les acides nucléiques, on retrouve 2 types de colorants :

→ Le **Hoechst** et le **DAPI** qui se fixent **spécifiquement** sur les bases A-T de l'ADN.

→ Le **Bromure d'éthidium** et l'**Iodure de Propidium** qui sont des intercalants de l'ADN : ils vont venir se fixer entre les brins d'ADN de façon **non spécifique**.

Cette technique permettra d'observer des zones très concentrées en ADN (zone d'hétérochromatine → pas de transcription de gènes)

Et des zones moins fluorescentes donc moins concentrées en ADN (zone d'euchromatine → transcription de gènes).

f. L'immunofluorescence indirecte

C'est une technique permettant de visualiser des protéines en les rendant **indirectement** fluorescentes

On utilise un **anticorps (Ac) spécifique** de l'épitope de la protéine que l'on souhaite observer. (Les Ac et leur rôle dans l'immunité seront vus en histo)

→ L'épitope est la partie de la protéine qui est reconnue par l'Ac

→ UNE protéine peut posséder PLUSIEURS épitopes

On peut faire des immunofluorescences **simples** ou **doubles**.

Simples : On ne visualise qu'une seule protéine

Doubles : On visualise en même temps 2 protéines.

Différent Ac existent :

Ac polyclonal → + simple, - spécifique

→ Obtenus par **protocole d'immunisation**



Ac monoclonal → - simple, + spécifique

→ Obtenus par criblage d'hybridome

On utilisera 2 Ac, un **primaire** qui reconnaîtra l'**épitope de la protéine** que l'on souhaite visualiser et un **secondaire**, qui reconnaîtra l'**Ac primaire** et qui sera couplé à un fluorochrome donc **fluorescent**.

Il y a des règles à observer pour choisir les Ac à utiliser pour l'immunofluorescence indirecte :

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

MICROSCOPIE

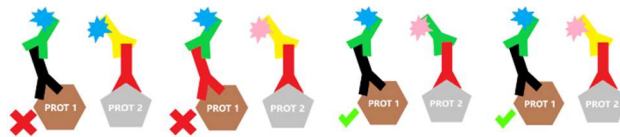
- Y L'Ac primaire doit être originaire d'une espèce animale différente de celle à l'origine de l'Ac secondaire
- Y Pour une double immunofluorescence, les 2 Ac primaires doivent être d'origine animale différente
Les Ac secondaires peuvent être d'origine animale similaire.
- Y Pour une double immunofluorescence, les fluorochromes des Ac secondaires doivent être de couleurs différentes.



Immunofluorescence simple



Immunofluorescence double



g. Le FISH (tkk, pas besoin de sortir la canne à pêche)

L'intérêt est de visualiser les acides nucléiques (ADN ou ARN) grâce à des **sondes fluorescentes spécifiques** (complémentaires), soit de certains **gènes** (partie de chromosomes) soit de **chromosomes entiers**. Cette technique permet de quantifier, localiser, étudier l'évolution au cours du cycle cellulaire des gènes, mais aussi de faire des cartographies génétiques...

Il existe des anticorps capables de reconnaître de l'ADN mais ils sont très peu spécifiques : aucun anticorps n'est capable de reconnaître une séquence d'ADN particulière. C'est pour cela qu'on est obligés d'utiliser une sonde (rendue fluorescente), qui aura la capacité de s'hybrider par complémentarité aux acides nucléiques. (Une sonde c'est tout simplement un acide nucléique fluorescent simple brin complémentaire à la séquence qui nous intéresse.)

1. Comment hybrider notre sonde sur la séquence d'intérêt ?

→ L'étape de **dénaturation** (séparation des deux brins par chaleur ou méthode chimique). On sépare nos 2 brins d'ADN pour que la sonde puisse s'hybrider par

complémentarité. **Cette étape sera inutile si on travaille sur de l'ARN** (car déjà simple brin).

→ Ensuite on a une étape de **d'hybridation** de la sonde avec l'ADN (ou l'ARN)

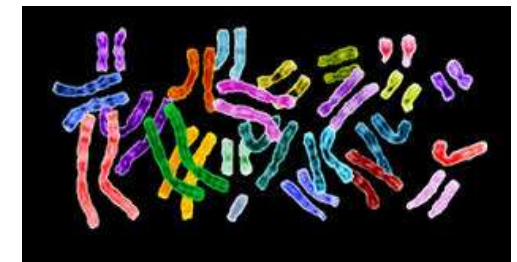
→ Enfin, une étape de **révélation** : cette sonde étant marquée directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes, on peut maintenant observer notre séquence d'intérêt complémentaire à la sonde.

2. Comment rendre une sonde fluorescence ?

→ Directement : Incorporation des nucléotides marqués lors de la fabrication de la sonde.

→ Indirectement : les nucléotides sont marqués par la suite grâce à un complexe antigène-anticorps (un peu comme on a vu avec l'immunofluorescence mais là, la molécule d'intérêt est la sonde). Pour cela on met de la digoxigénine (DIG) sur les nucléotides de la sonde, et c'est sur la DIG que se fixeront les anticorps (on observera les fluorochromes sur les Ac, sur les DIG sur la sonde).

On peut marquer des chromosomes entiers avec des sondes spécifiques de chromosomes, ce qui permet de réaliser des caryotypes et détecter certaines maladies (une trisomie notamment, on marquera par exemple le K21 et si on en voit 3 dans la cellule, on pourra conclure à une trisomie 21). Une des techniques qui illustrent ce concept est le **Sky FISH** : on va marquer les 23 paires de chromosomes dans des couleurs différentes pour tous les voir en même temps. Le FISH permet aussi de rechercher des **anomalies génétiques** (on peut voir grâce à des colorations de chromosomes s'il n'y a pas d'associations de différentes couleurs sur le même chromosome, ce qui signifierait qu'il y a eu échange de matériel entre les 2 chromosomes = une translocation).



II. Le microscope électronique

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

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

MICROSCOPIE

→ 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 électronique :

→ 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 ou cryomicroscopie (vue juste après).

A- La microscopie électronique à transmission

a. Fonctionnement et préparation

On va envoyer un faisceau d'électrons (créé par un canon à électron) puis concentré par un condensateur à aimant pour ensuite **traverser** l'échantillon. On observera l'image sur un **écran** fluorescent.

Le contraste se créera en fonction du degré de transmission des électrons (certaines structures cellulaires laissent plus passer les électrons que d'autres, les métaux lourds les arrêtent beaucoup)

→ 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 200 nm en Microscopie optique)



Préparation de l'échantillon en ME : (vous le reverrez en histo avec Long-Mimi)

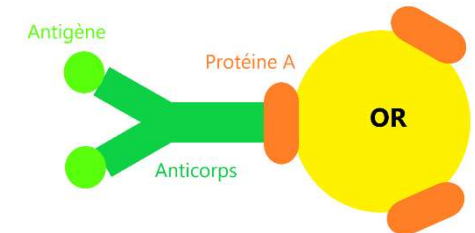
- 1- Fixation au glutaraldéhyde/métaux lourds
- 2- Déshydratation
- 3- Inclusion dans une résine
- 4- Coupe à l'ultra microtome
- 5- Coloration avec des sels de métaux lourds, denses aux électrons (pour créer un contraste)

b. Coloration de la microscopie à transmission

1. L'immunogold

Nécessite la fixation au préalable de l'échantillon

Fonctionnement similaire à l'immunofluorescence indirecte sauf qu'il n'y a pas de fluorochrome fixé à l'anticorps, c'est de l'or qui y est fixé (via une protéine, l'or ne peut pas se fixer directement à l'Ac), car l'or est dense aux électrons ce qui crée un contraste !



2. Coloration par ombrage

Nécessite la fixation au préalable de l'échantillon

Observation « indirecte » de l'échantillon. On fait une **réplique** (observation indirecte) en relief de l'échantillon via la vaporisation de métaux lourds de manière oblique (pas perpendiculaire, pour plus de reliefs), sous vide. On dissout ensuite l'échantillon dans l'acide pour ne garder que la réplique et la visualiser au microscope.

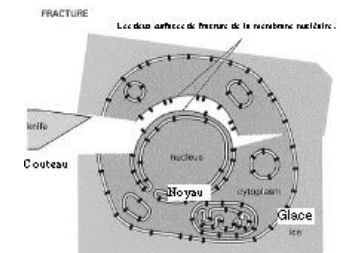
→ Permet d'observer des grosses molécules, virus, bactéries, organites ...

3. Cryofracture / cryomicroscopie

Ne nécessite **PAS** la fixation au préalable de l'échantillon

Permet de visualiser les reliefs des organites, en congelant l'échantillon à -150°C dans de l'azote liquide. On fracture la cellule sous vide, à l'aide d'un couteau spécial, passant généralement naturellement par les membranes, on fait ensuite une **réplique** (en platine ou carbone) de cet échantillon, on dissout celui-ci et on observe la réplique au microscope (observation indirecte de l'échantillon)

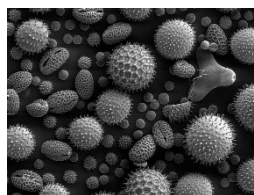
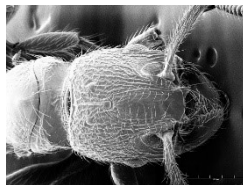
→ Technique utile car limite les risques de dénaturation des cellules (car non fixée)



MICROSCOPIE

B- Microscopie électronique à balayage (c tro bo)

C'est une technique **peu** utilisée en biologie cellulaire à cause de sa limite de résolution (**10 nm**). Ici les électrons ne traversent pas l'échantillon mais vont rebondir dessus. Bien que cette technique soit **plus récente** que la MET, elle est moins résolutive. Elle permet de visualiser les surfaces des cellules et des tissus. Il faut au préalable fixer l'échantillon et le recouvrir de métaux



lourds. On balaye l'échantillon avec des **électrons primaires**, ils se réfléchissent sur la surface de l'échantillon, qui renvoie alors des **électrons secondaires** qui seront détectés par un capteur. L'image est reconstituée informatiquement pour donner de très belles images en relief.

III. Le microscope à force atomique ou à champs rapprochés

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 (plus la pointe est fine plus la résolution sera bonne).

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

En général, la microscopie à force atomique a une **résolution comparable à celle de la microscopie électronique**. Cette technique est extrêmement utile dans la mesure où l'échantillon n'a **pas besoin d'être préparé/coloré**, il peut même **être vivant**.

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

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

Voilà ! Ce cours est fini, j'espère que la fiche vous plaît, si vous voulez changer un peu de support de cours, normalement tout y est ! J'ai juste retiré 2/3 petits exemples et la grosse partie sur les lésions de l'ADN qui a le droit à sa propre fiche (la petite veinarde) qui arrive bientôt. Vous aurez aussi des petites fiches récap, notamment une juste sur l'immunofluorescence indirecte vu que ça tombe souvent au concours !

Si vous avez n'importe quelle question n'hésitez pas à aller sur le forum, ou même si vous avez des suggestions pour les fiches (plus de schémas, plus de tableau...) après tout c'est pour vous qu'on les fait !

Maintenant bossez bien et niquez ce concours !

(Et cœur sur les pouilleux bien sûr)

