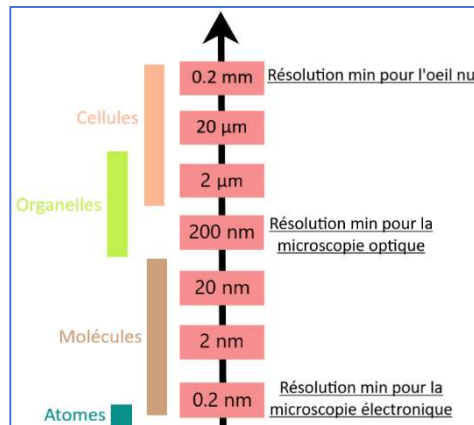


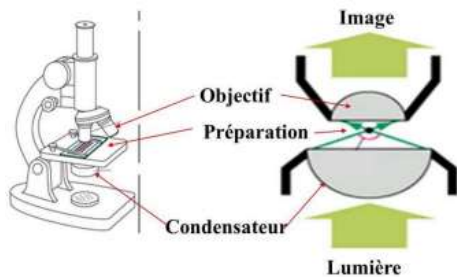
On distingue 3 types de microscopie :

- 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 (non abordée)

On définit un microscope par sa **limite de résolution** qui est la **capacité de distinguer 2 points séparés d'une certaine distance**. (Quand on peut voir distinctement 2 objets séparés de 2 mm, mais pas de 1,99 mm, la limite de résolution est de 2 mm)

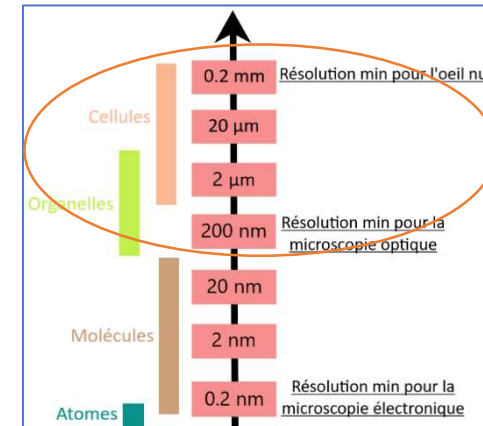


## I. Le microscope optique / photonique



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). Cette résolution est plus faible que celle du microscope électronique.

Si on met en commun ce fait et l'image précédente, on se rend compte que la microscopie électronique permet de visualiser les cellules et certaines organelles (noyau, mitochondrie, lysosomes...), mais pas de visualiser directement les molécules.



- On a besoin d'une source de photons, venant d'une lumière normale ou alors d'un dispositif avec une longueur d'onde particulière (ex : laser).
- Ces photons seront dirigés vers l'échantillon grâce à un condensateur.
- Ensuite on récupérera l'image avec un objectif qui augmentera la dimension des photons.

### A- 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. On n'observera donc pas directement la molécule, mais la fluorescence qu'elle émettra.

#### a) La fluorescence

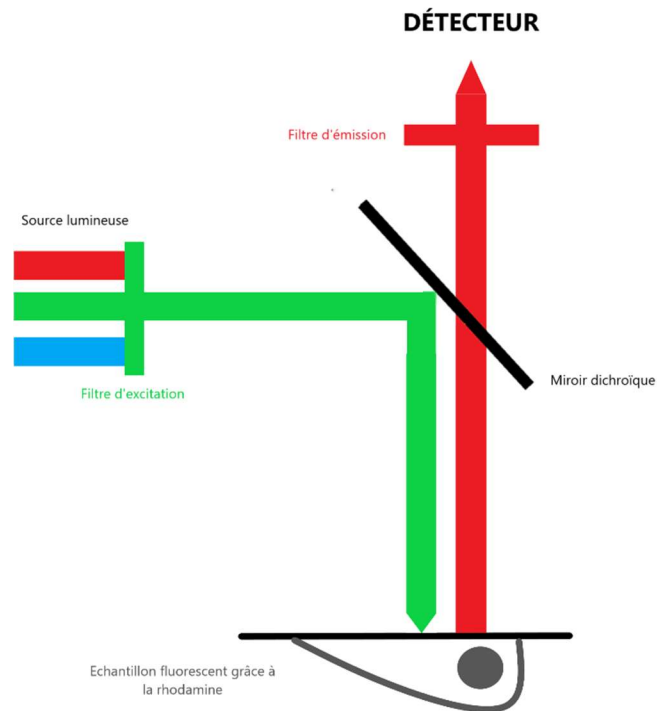
Fluorescence ≠ phosphorescence

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 (une longueur d'onde correspond à une couleur).

## 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  $\lambda$  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  $\lambda$  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 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.

On peut visualiser directement l'image à l'oculaire, ou grâce à un système vidéo couplé au microscope, pour numériser les images.

### La microscopie à fluorescence permet :

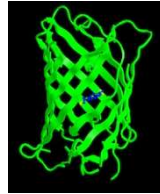
- **La localisation** de molécules spécifiques dans la cellule. Pour une molécule de taille inférieure à la limite de résolution, on pourra la rendre fluorescente et donc visible en la couplant à un fluorochrome.
- On peut **combiner** plusieurs fluorochromes associés directement ou indirectement aux structures étudiées
- On peut visualiser plusieurs molécules simultanément
- On peut s'en servir pour faire du micro-cinéma, cad filmer des molécules et leur dynamique dans la cellule (quand la cellule n'est pas fixée, lorsqu'elle est vivante)

On va devoir rendre les molécules fluorescentes, elles ne le sont pas toutes naturellement. Actuellement, on utilise souvent la **GFP** pour rendre fluo des protéines.

*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**, l'*Aequorea Victoria* (osef). Cette fluorescence émanait de la **GFP (Green Fluorescent Protein)**. Cette protéine est formée d'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** (400 nm) et d'émission dans le **vert** (500 nm) (d'où le green).



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

Ici on exprime la GFP dans une souris transgène.

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 non protéiques).

→ Les gros fluorochromes comme la GFP.

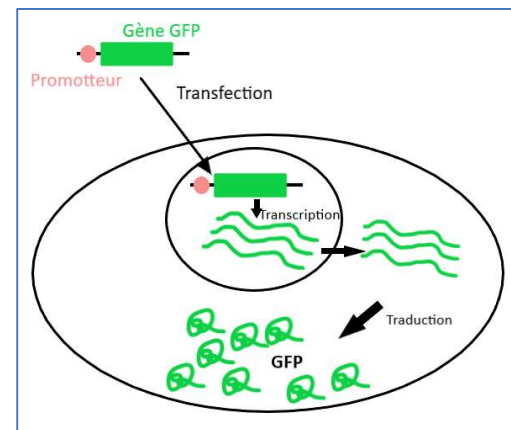
#### Exemples de fluorochromes :

→ 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** (non vue)
2. L'**électroporation** (non vue)
3. **Vectorisation par vésicule** (non vue)
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 :**

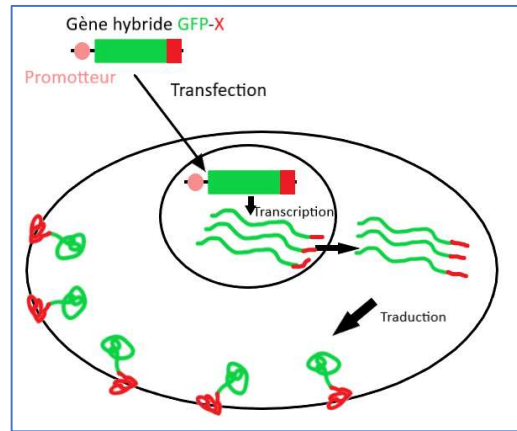
**ADN** → **ARN** = **Transcription** dans le **noyau** (pour les procaryotes)

**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) 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**.

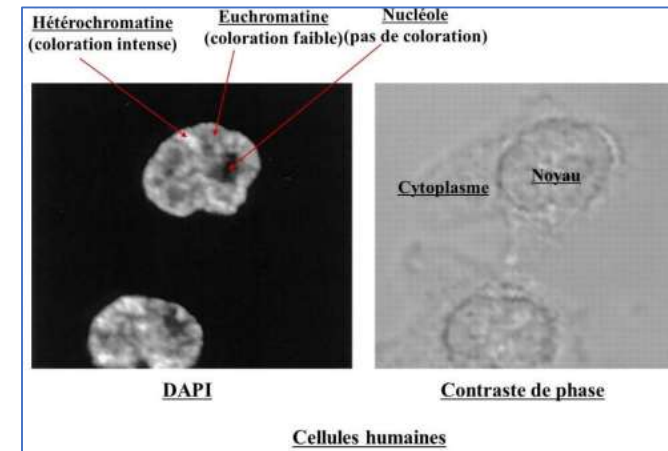
Pour visualiser les acides nucléiques, on retrouve 2 types de colorants :

→ 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 blanche (zone d'hétérochromatine → pas de transcription de gènes)*

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

*Le nucléole est une zone du noyau sans ADN. Non délimité par une membrane il participe notamment à la synthèse de ribosomes*



#### f) L'immunofluorescence indirecte (+++)

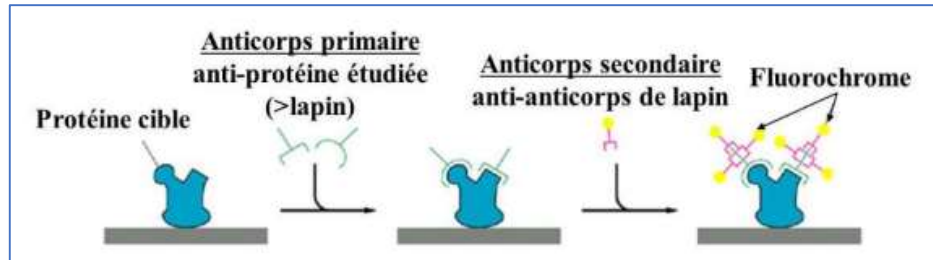
C'est une technique permettant de visualiser des protéines en les rendant **indirectement** fluorescentes. On évite alors les manipulations génétiques.

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)

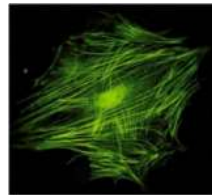
→ L'épitope est la partie de la protéine qui est reconnue par l'Ac

→ UNE protéine peut posséder PLUSIEURS épitopes

On utilisera 2 Ac, un **primaire** (par exemple originaire d'un lapin) qui reconnaîtra l'**épitope de la protéine** que l'on souhaite visualiser et un **secondaire**, (par exemple originaire de sanglier) qui reconnaîtra l'**Ac primaire** et qui sera couplé à un **fluorochrome** donc **fluorescent** (il aura été rendu fluorescent dans une boîte de biotechnologie)



Ça nous permet de visualiser une molécule dans une cellule, ici par exemple, toute l'actine que la cellule contient nous apparaît vert. On aura un Ac primaire qui reconnaît l'actine et un Ac secondaire couplé à un fluorochrome vert qui reconnaît l'Ac primaire !



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

*Fluorescent In Situ Hybridization.*

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) qui se fait grâce à la complémentarité des bases.

→ 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.

Cette technique est très utilisée en biocell et en cytogénétique.

### 2. Que peut-on voir ?

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). 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). C'est une application de la cytogénétique.

Pour ce qui est de la biologie cellulaire, le **FISH** permet d'étudier le noyau. Cette technique consiste à colorer chacun des chromosomes avec une couleur différente.



On peut voir à gauche, un noyau en interphase (= en dehors de la mitose). On peut constater avec les sondes que chacun des chromosomes occupe des espaces qu'on appelle des **territoires**. On peut distinguer des territoires différents, ce qui nous permet d'étudier la localisation et la dynamique des chromosomes dans le noyau, et donc de comprendre comment il fonctionne.

### 3. Visualisation de l'ARN.

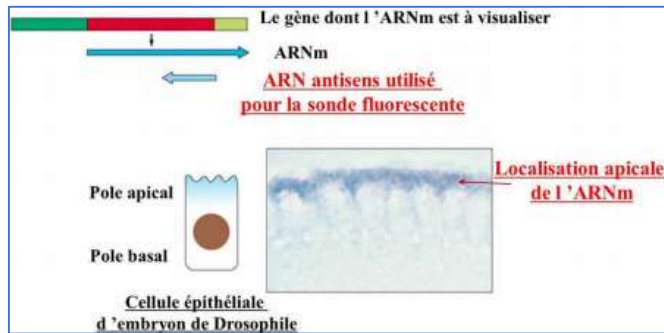
On va hybrider nos sondes avec de l'ARN. On colorera ainsi des ARN codés par des gènes spécifiques pour comprendre quelles cellules expriment quel gène !

L'**intensité** d'hybridation dépendra de la **quantité** d'ARN dans chaque cellule, donc de leur **localisation**. Cette méthode nous donnera donc une information quantitative sur l'expression d'un ARN dans un tissu.

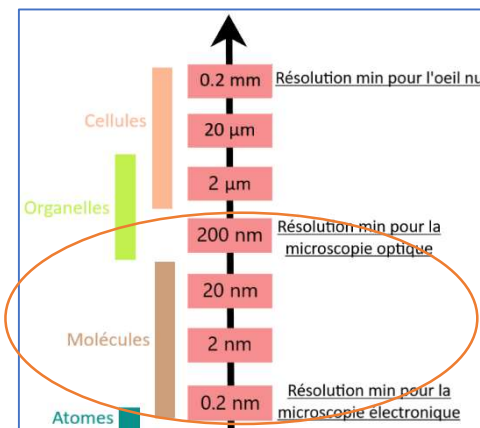
Exemple à droite : Vous avez ici un épithélium.

On a une double information :

- L'ARN est exprimé en grande quantité
- Il est de localisation apicale dans le tissu.



## 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.

→ 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** (car la particule est plus petite)

Il existe 2 types de microscopies électronique :

→ La microscopie électronique à **transmission**

→ La microscopie électronique à **balayage** (MEB)

### A- La microscopie électronique à transmission

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

- On va devoir faire une coupe ultrafine de l'échantillon (0.1 μm)
- Colorer l'échantillon aux métaux lourds pour créer un contraste (à l'or, par ombrage ou encore par cryofracture)

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)

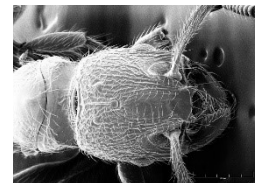
→ Une structure laissant passer les électrons apparaîtra claire et une structure qui ne les laisse pas passer apparaîtra foncée.

La résolution est nettement meilleure elle est de **0,2 nm** ! (Contre environ 200 nm en Microscopie optique). On peut même visualiser les membranes et ce qu'on appelle les **ultrastructures cellulaires** (tous les organites)

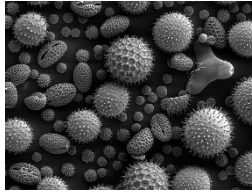


### B) Microscopie électronique à balayage (c t r o b o)

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 en 3D. 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.

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 ! Le cours a été très très épuré par rapport à l'année dernière, si vous êtes curieux, vous pouvez aller sur le CT des PACES pour voir leur fiche complète, mais ça ne vous sera pas utile ce semestre !

Désolée de vous avoir fait une septième page pour si peu de texte... Je vous jure que je l'ai pas créée juste pour mettre des dédicaces !

Bon courage pour la fin du semestre !

Bisous à mes fillots !

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