

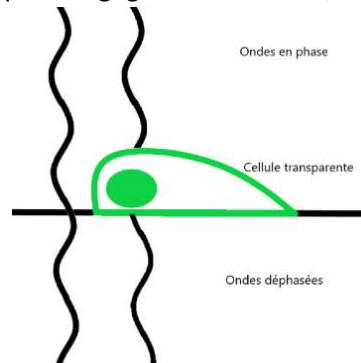
On distingue 3 types de microscopie :

- 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. La microscopie à contraste de phase

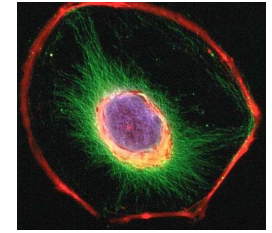
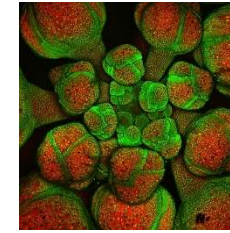
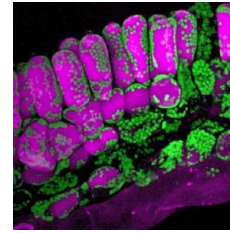
Ici on n'utilise pas de colorant, on pourra donc observer des cellules vivantes. Le microscope à contraste de phase va augmenter le déphasage en retardant la lumière déphasée, augmentant le contraste. → Ce que l'on gagne en contraste, on le perd en brillance (meilleure résolution, moindre intensité).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



II. 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



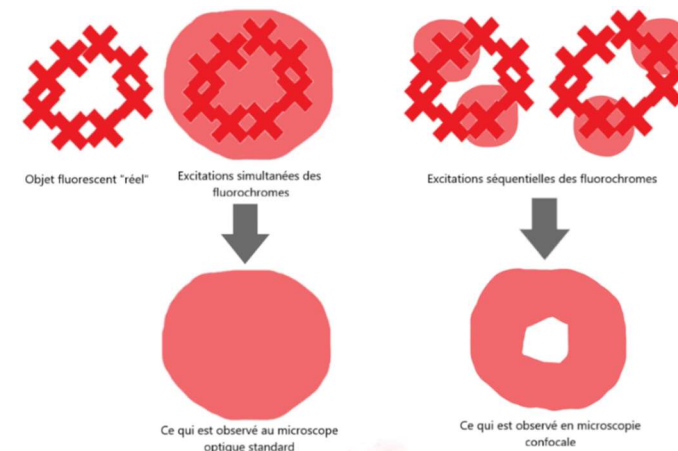
III. La microscopie à la super-résolution

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.



IV. La microscopie à fluorescence

1. L'immunofluorescence indirecte

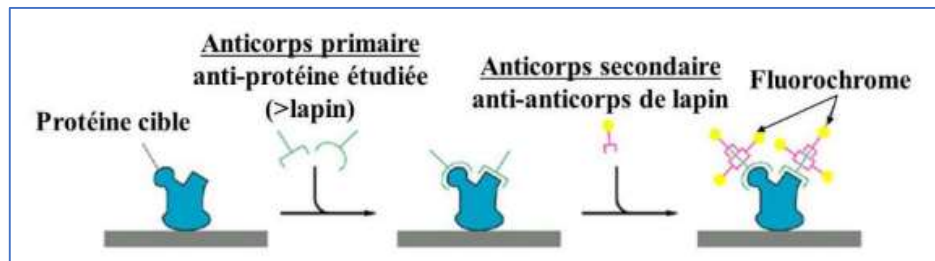
C'est une technique permettant de visualiser des protéines en les rendant **indirectement** fluorescentes. On évite alors les manipulations génétiques.

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 reconnaîtra l'Ac primaire !

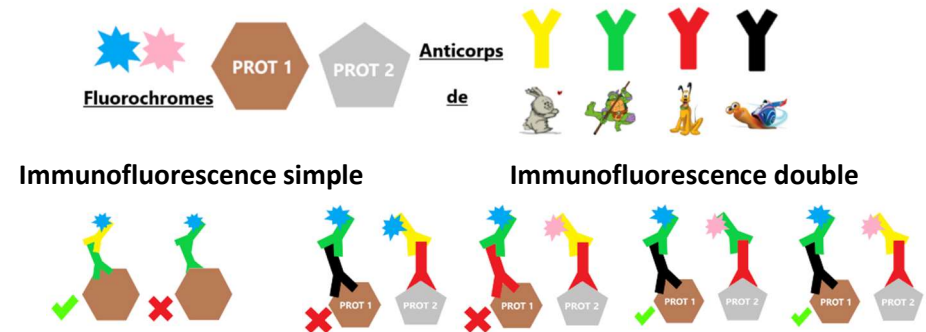
Cependant, il y a des règles à observer pour choisir les Ac à utiliser pour l'immunofluorescence indirecte :

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.



2. Application de la fluorescence

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.

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 $\lambda = 360 \text{ nm}$, 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 !

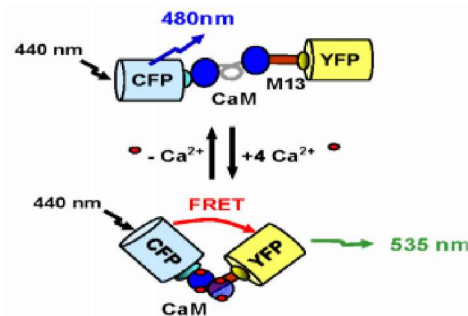
On retrouve 2 types de FRET, **INTRAmoléculaire** et **INTERmoléculaire**. On utilise le premier pour étudier la **conformation** d'1 molécule (sa forme) et le second pour chercher la **proximité** de 2 molécules.

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 !

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 séjournant !

Schéma récap :

FRAP : Photoblanchiment



○ Zone de photoblanchiment
□ Capteur

FLIP :

Photoblanchiment



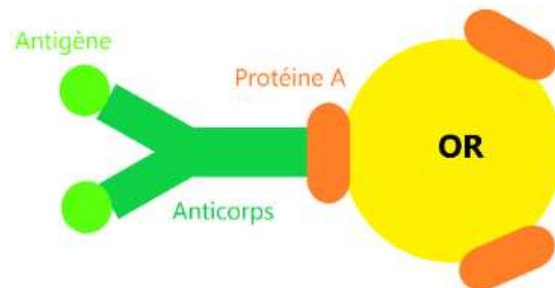
○ Zone de photoblanchiment
□ Capteur

V. Les colorations de la microscopie de transmission

1. L'immunogold

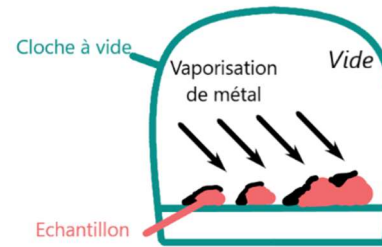
Nécessite la fixation au préalable de l'échantillon

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



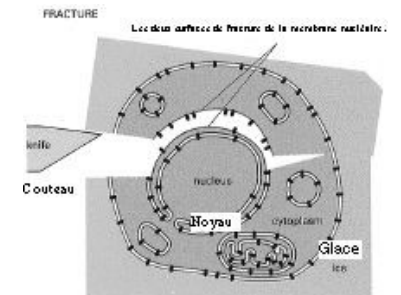
Observation « indirecte » de l'échantillon. On fait une **réplique** (observation indirecte) en relief de l'échantillon via la vaporisation de métaux lourds de manière oblique (pas perpendiculaire, pour plus de reliefs), sous vide. On dissout ensuite l'échantillon dans l'acide pour ne garder que la réplique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