

# MÉTHODES D'ÉTUDES DE LA CELLULE

*PART.1*



Helloooo !!!

On se retrouve aujourd'hui pour MON DERNIER COURS 🤔!

Eh oui, déjà... mais ne soyez pas tristes, puisque ce cours sera divisé en trois parties!

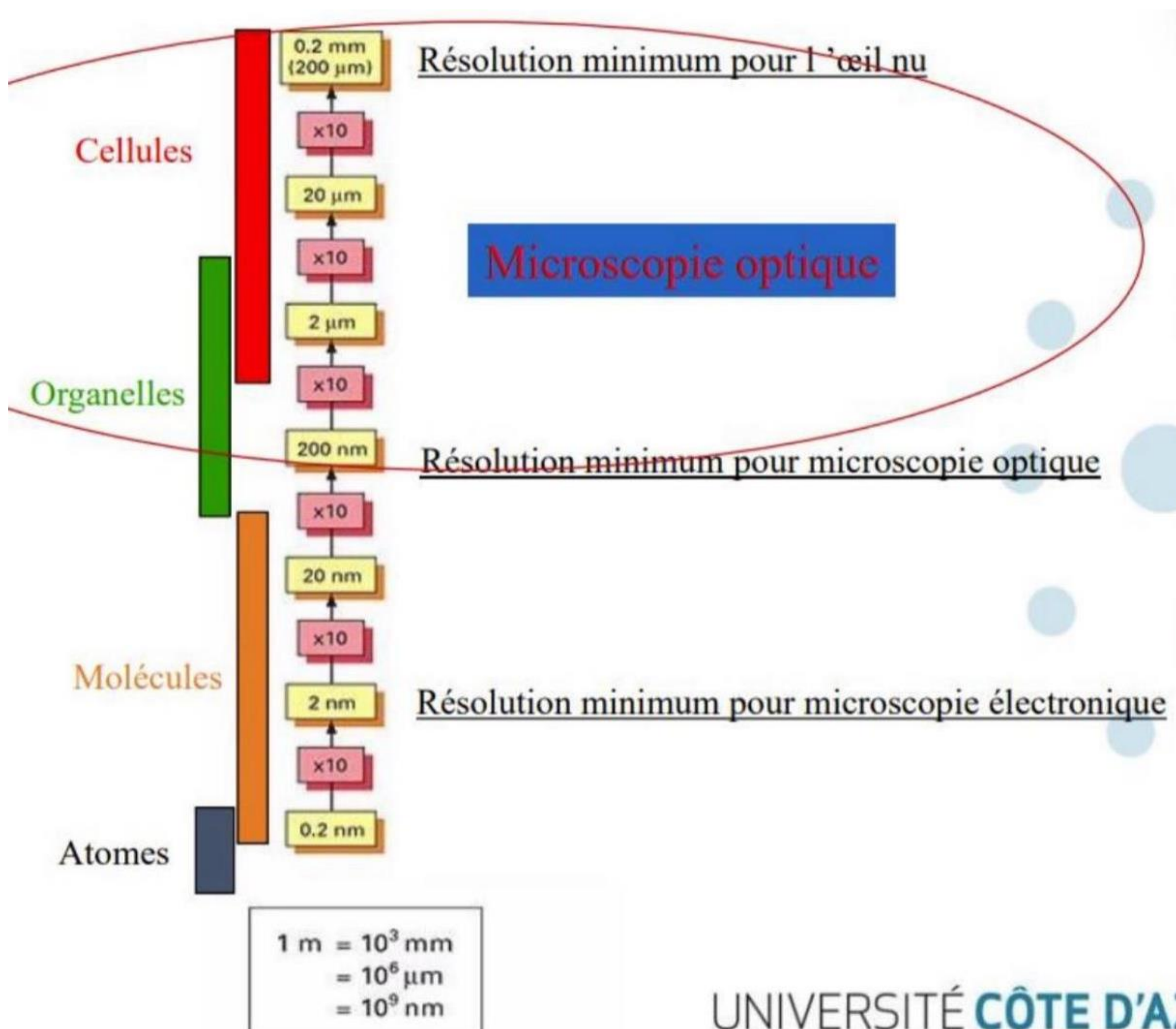
Comme ça vous avez le temps d'assimiler petit à petit, vu que c'est un peu long.

Ce cours contient pas mal de notions qui tombent à l'examen !!! Donc on le bosse +++++  
Prenez le temps de bien le lire et d'essayer de le comprendre. Et si jamais il y a des notions  
que vous ne comprenez pas... ON FONCE SUR LE FORUMMMMMMM

Maintenant... À L'ATTAQUEEEEEEEEEEEEEEE 🗡️🔥

## I - La Microscopie

La biologie cellulaire est née avec l'invention de la microscopie. On distingue trois types de cette dernière : optique, électronique et à champ proche (que nous ne verrons pas). Ces trois types de microscopie reposent chacune sur des principes physiques différents.



Nous avons cette échelle classique qui nous permet de mettre en correspondance les niveaux de taille des cellules et de ses constituants par rapport aux différentes techniques de microscopie et leur limite de résolution.

### Définition:

- **Résolution:** Capacité à distinguer 2 points d'une image

### A/ La microscopie optique ou photonique

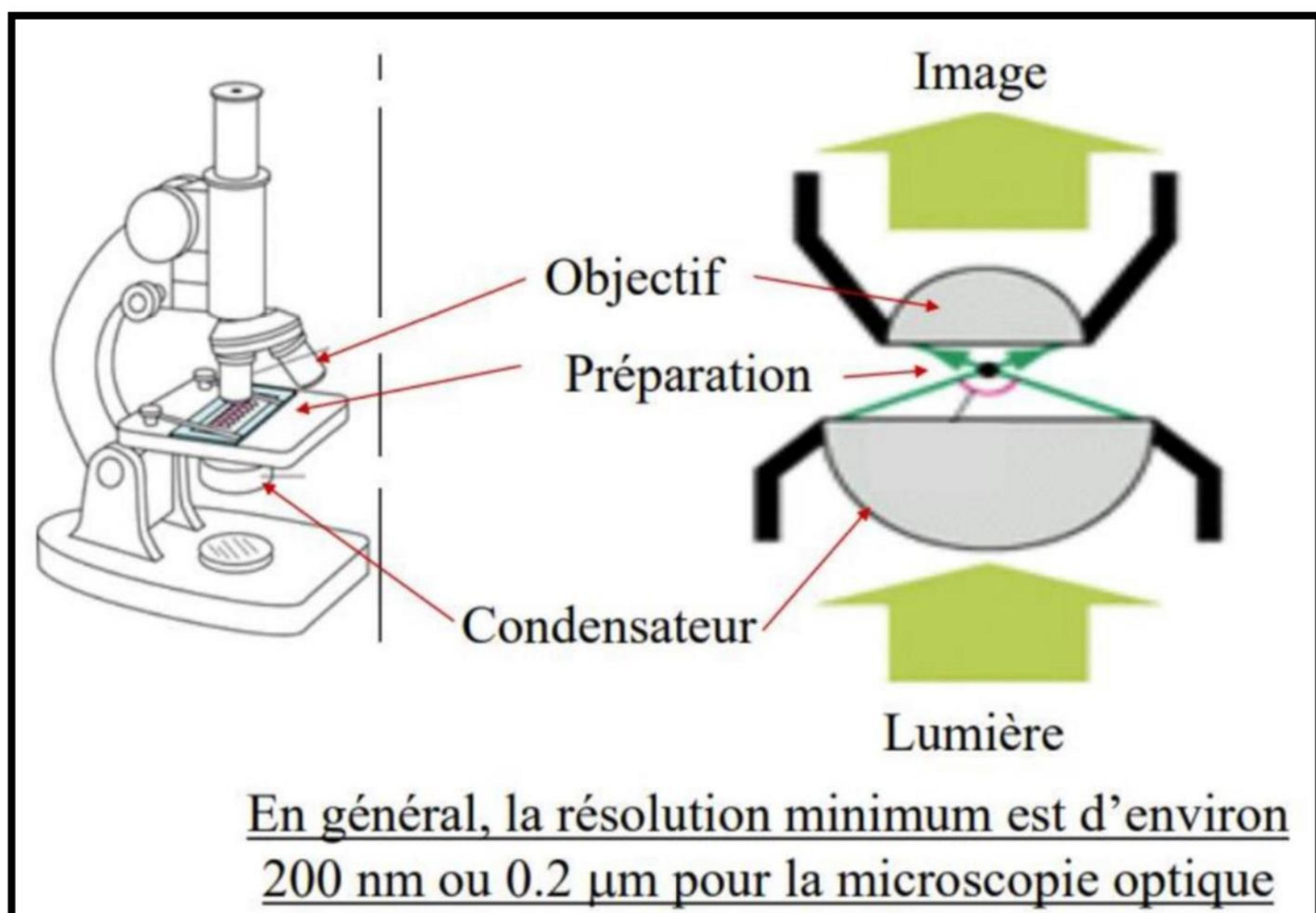
#### 1) Généralités

Pour la **microscopie optique (MO)**, la limite de résolution **théorique est de 200 nm**. Cette limite est théorique car nous verrons plus tard des astuces qui nous permettront d'améliorer cette limite. *En clair, si on utilise ce microscope et que 2 points sont à une distance < à 200nm on ne pourra pas les distinguer.*

Cette technique **repose sur les photons** et permet d'observer des cellules ainsi que des **organelles** mais pas les molécules

Le principe est simple : une **source de photons** (la lumière) est concentrée sur l'objet qui nous intéresse par un **condensateur** et des systèmes optiques permettent de **renvoyer l'image grossie** à l'observateur à travers un **objectif**

On ne pourra pas observer des molécules. Cependant on peut les observer **indirectement** principalement en utilisant la **fluorescence** que ces molécules émettent.

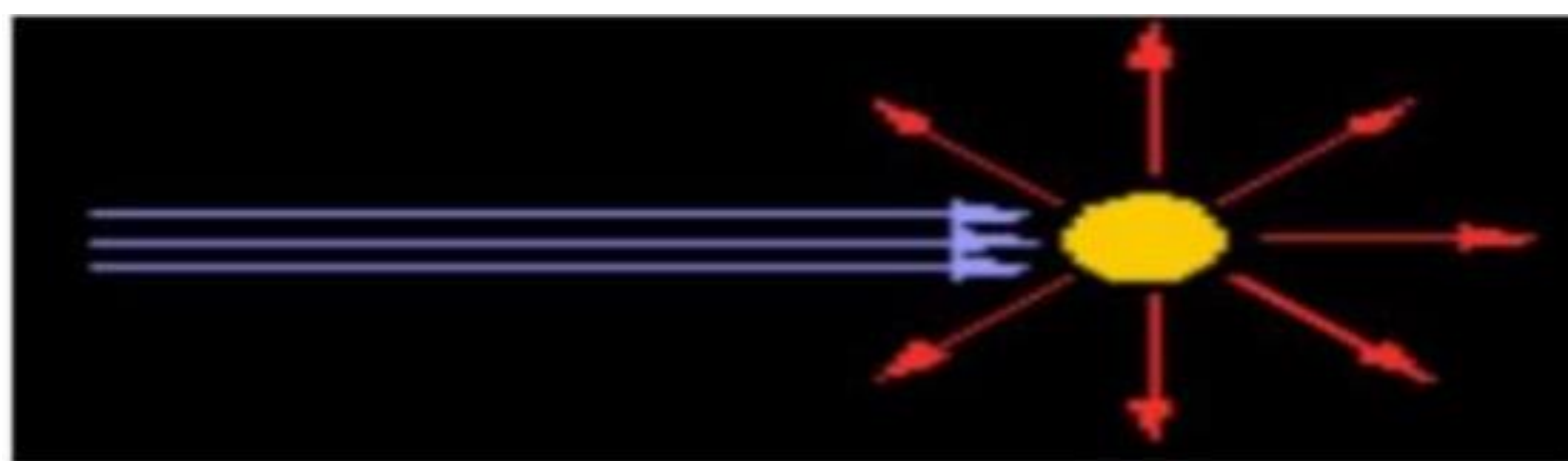


## 2) Visualiser les molécules dans la cellule : fluorescence

### a) Principes

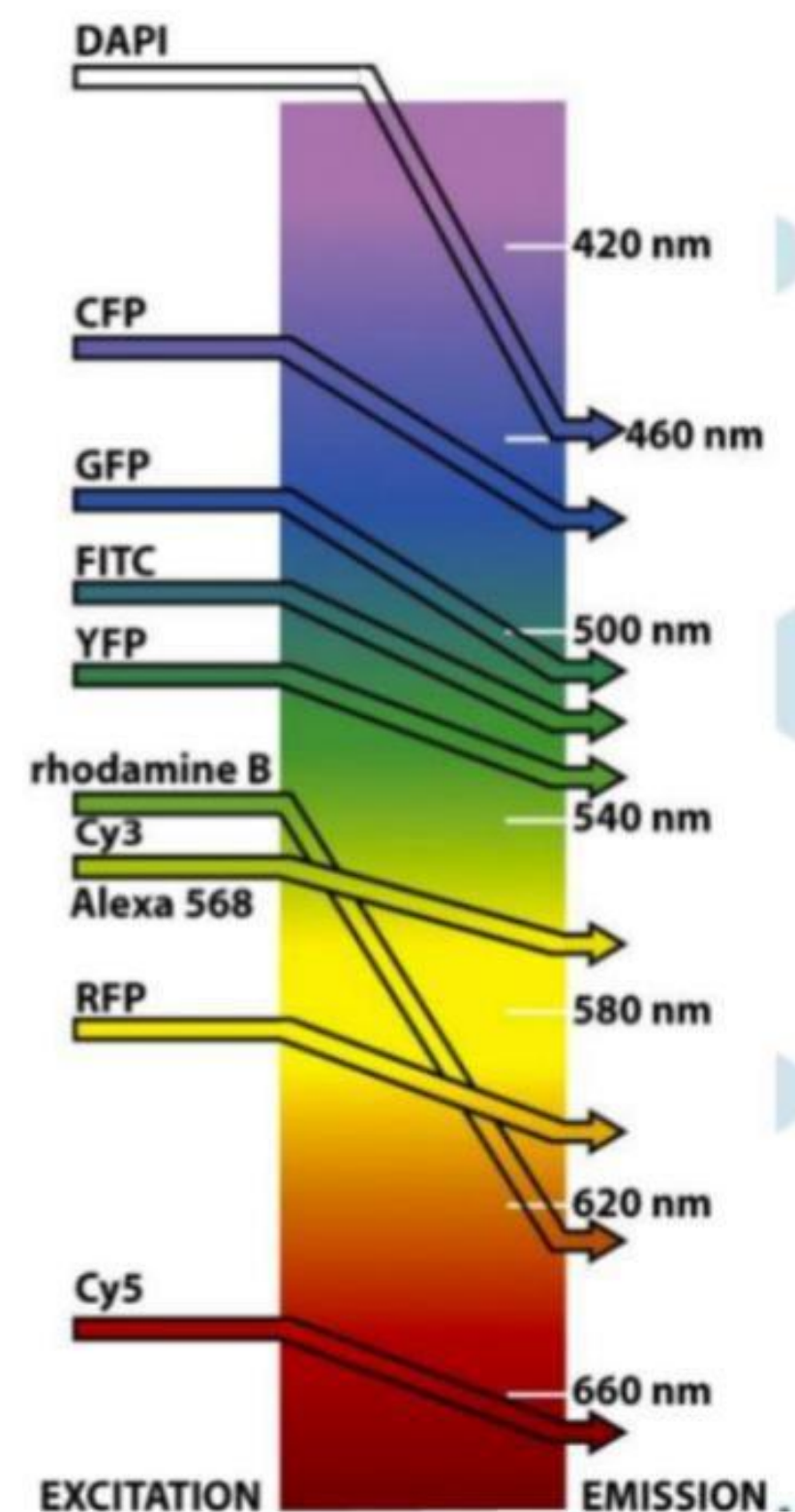
Certaines molécules ont des **propriétés de fluorescence** : si elles reçoivent des photons avec une énergie lumineuse d'une certaine longueur d'onde, cette énergie lumineuse va être transmise à la molécule qui va émettre d'autres photons d'énergie moindre.

### Principe de la fluorescence



Une molécule fluorescente possède l'aptitude d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement (< 1 sec) sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission)

Ces molécules ont pour propriété intrinsèque une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Comme l'énergie du photon d'émission est plus faible, la longueur d'onde d'émission est plus grande que la longueur d'onde d'excitation.



*Petite explication de votre vieux vieux Hugosome :*

*L'énergie d'une onde électromagnétique se calcule à l'aide de cette formule :  $E = h\nu$   
Avec  $h$  la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence.*

*C'est comme le son, plus la fréquence est élevée plus le son est aigu : analogie avec haut en énergie.*

*Or la fréquence est en  $s^{-1}$ .*

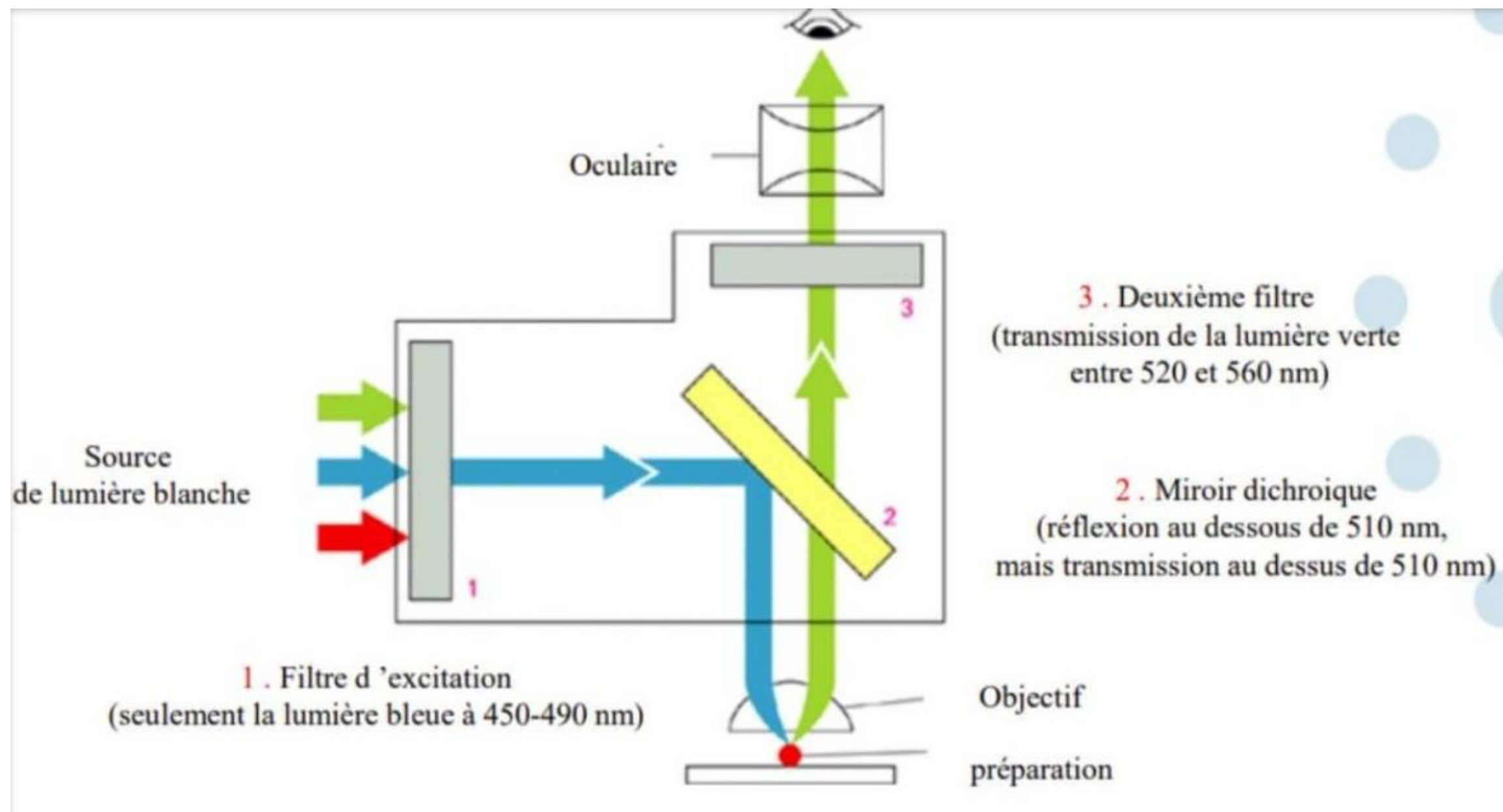
*Ainsi on retrouve la formule :  $\nu = c / \lambda$*

*Avec  $c$  la célérité de la lumière dans le vide et  $\lambda$  la longueur d'onde.*

*Donc  $E = h \times c / \lambda$*

*Si l'énergie diminue alors la longueur d'onde augmente. Retenez surtout ça.*

A partir de ce principe, on a élaboré un **microscope à fluorescence**. Il y'a donc une source de lumière blanche qui va être filtrée par le filtre d'excitation, pour n'obtenir **que des longueurs d'ondes d'excitation** intéressantes pour la molécule fluorescente à observer.



Les photons vont rencontrer un **miroir dichroïque**. Ce miroir va **réfléchir les photons** au dessous d'une certaine longueur d'onde vers la préparation et **transmettre** ceux au-dessus d'une autre longueur d'onde à **l'objectif**.

S'il y'a une molécule fluorescente dans la préparation, elle va émettre des **photons d'excitation** d'une longueur d'onde **plus grande**. Ces photons vont cette fois traverser le miroir dichroïque. Pour finir, les photons sont directement visualisés par un oculaire, soit couplés à système de vidéo pour numériser les images.

Il y'a de nombreuses applications de la microscopie à fluorescence. On l'utilise pour comprendre le fonctionnement des cellules voire pour effectuer des tests dans des examens à visée médicale.

- Elle permet de **localiser** des molécules spécifiques dans la cellule. Seules quelques molécules sont fluorescentes.
- Les marqueurs fluorescent peuvent être associés directement ou indirectement à la structure cellulaire étudiée. On les appelle des **fluorochromes**.

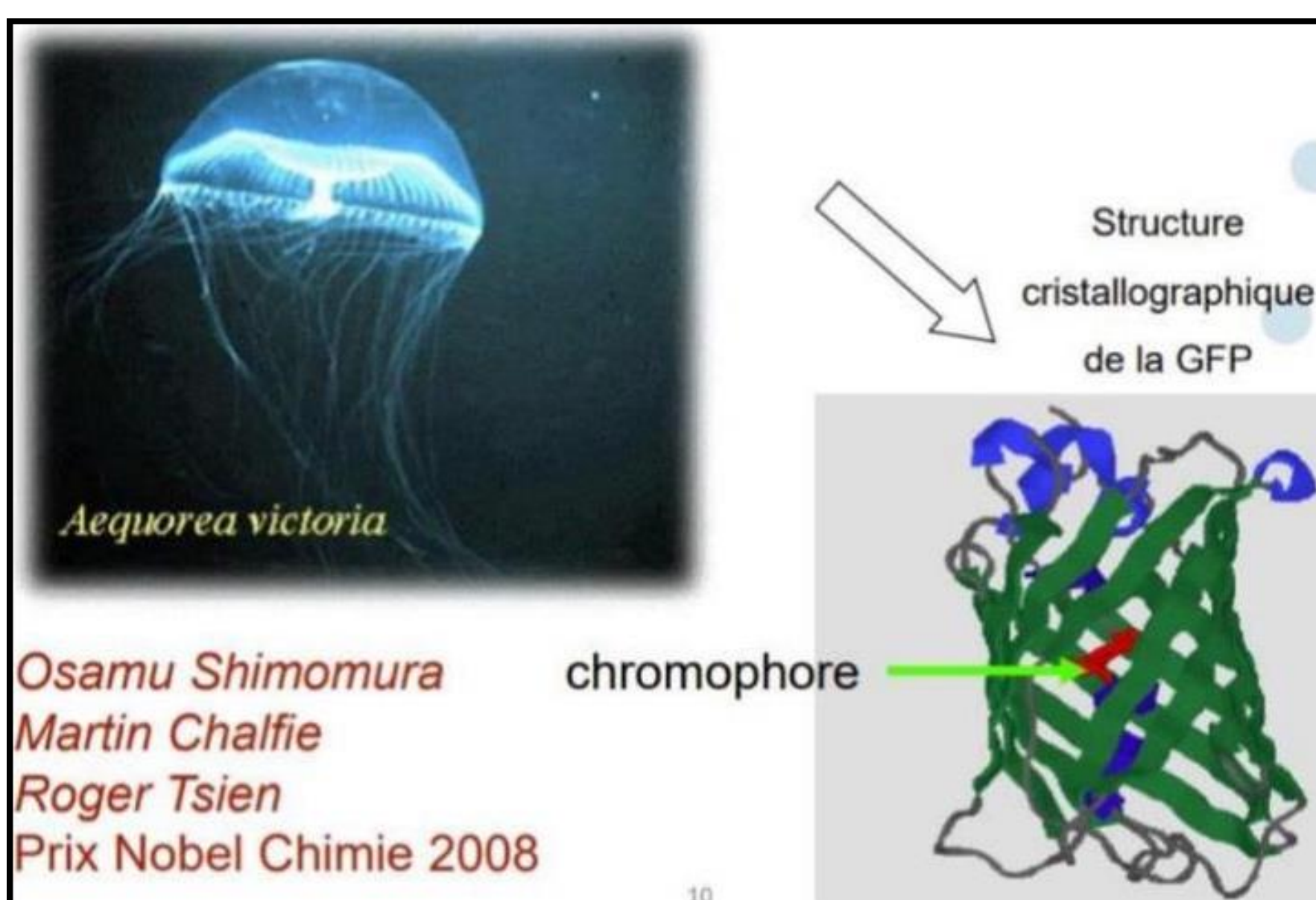
- On peut combiner plusieurs fluorochromes, c'est-à-dire qu'on peut visualiser simultanément plusieurs molécules.
- On peut coupler ces techniques de microscopie à des techniques de **microcinéma** qui permettent de filmer ces molécules ainsi que leur dynamique dans une cellule vivante.

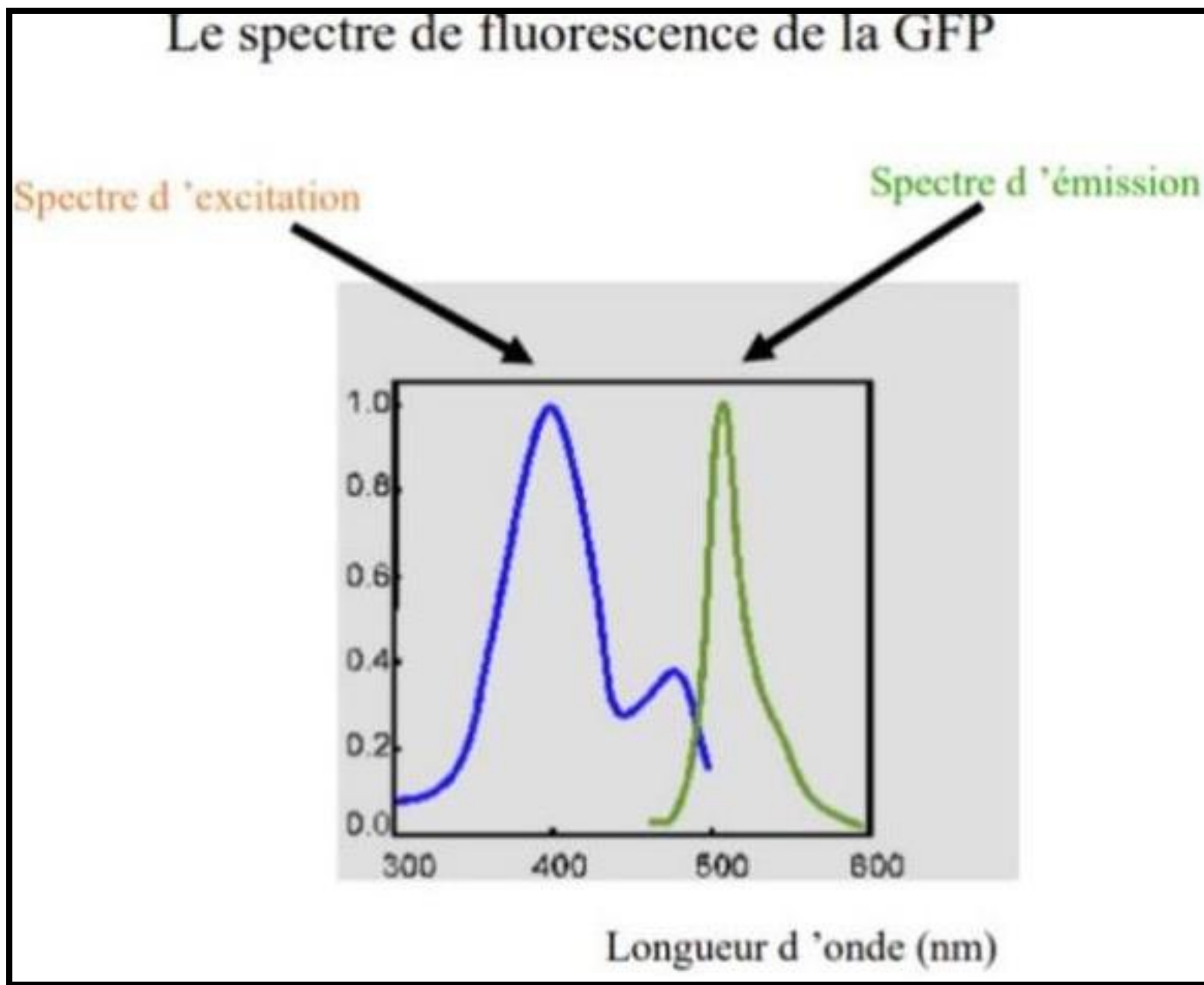
Le problème va être de rendre les molécules fluorescentes puisqu'elles ne le sont pas toutes naturellement. Actuellement, la technique de choix est de les rendre fluorescentes en utilisant une molécule, une protéine qu'on retrouve dans les méduses, c'est la GFP.

### B/ Fluorescence naturelle: GFP ( Green Fluorescent Protein )

Il existe des petites molécules qui sont naturellement fluorescentes, mais c'est aussi le cas de protéines. C'est le cas d'une très célèbre protéine : la **GFP**. On entre ainsi dans le domaine de la bioluminescence.

Un certain nombre d'organismes vivants émet de la lumière naturellement : la luciole (avec une enzyme nommée **luciférase**), les méduses ou d'autres invertébrés.

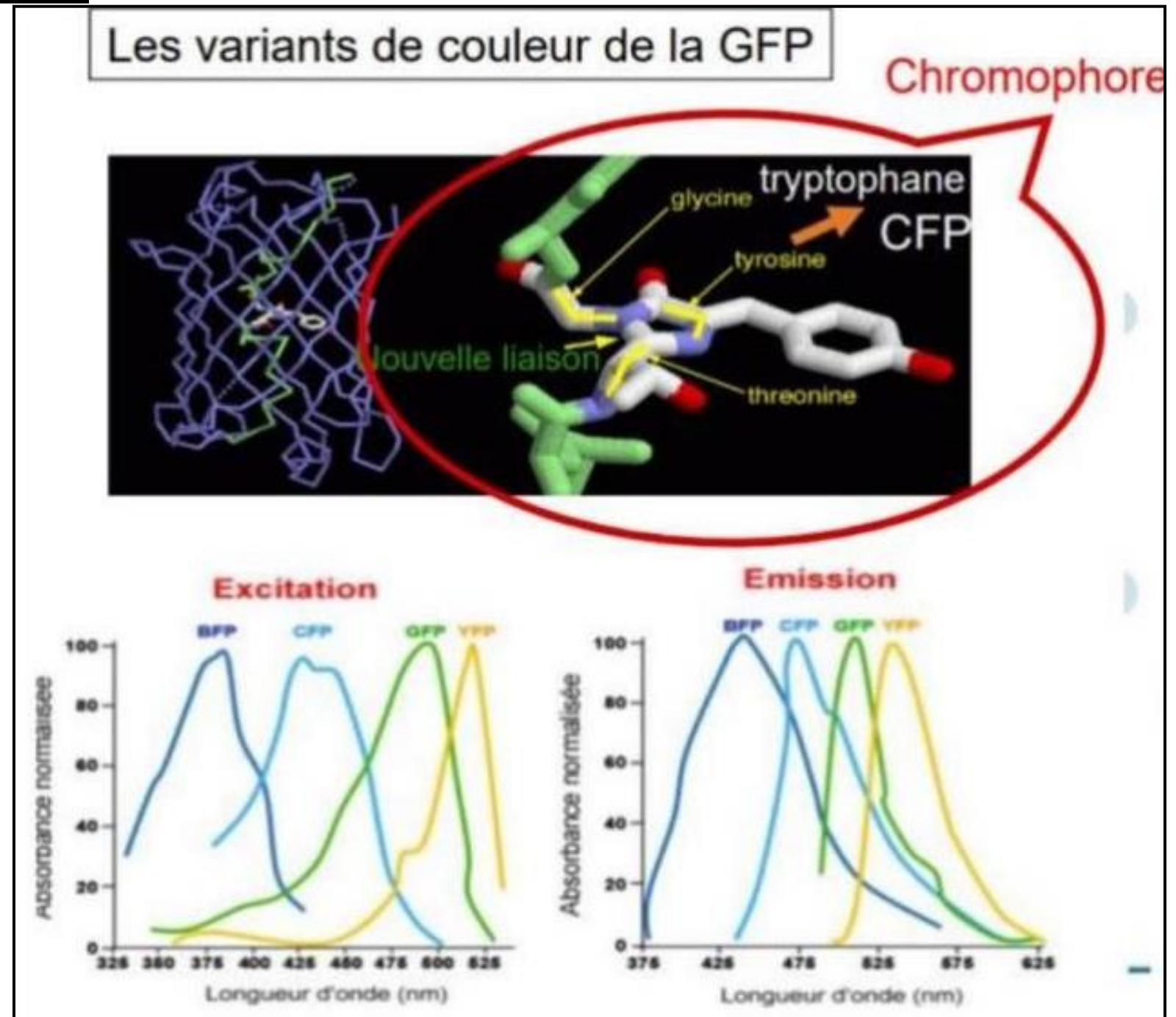




Les biologistes souhaitant marquer plusieurs molécules en même temps ont réalisé un travail de mutagenèse de la GFP naturelle pour obtenir d'autres molécules fluorescentes d'autres couleurs

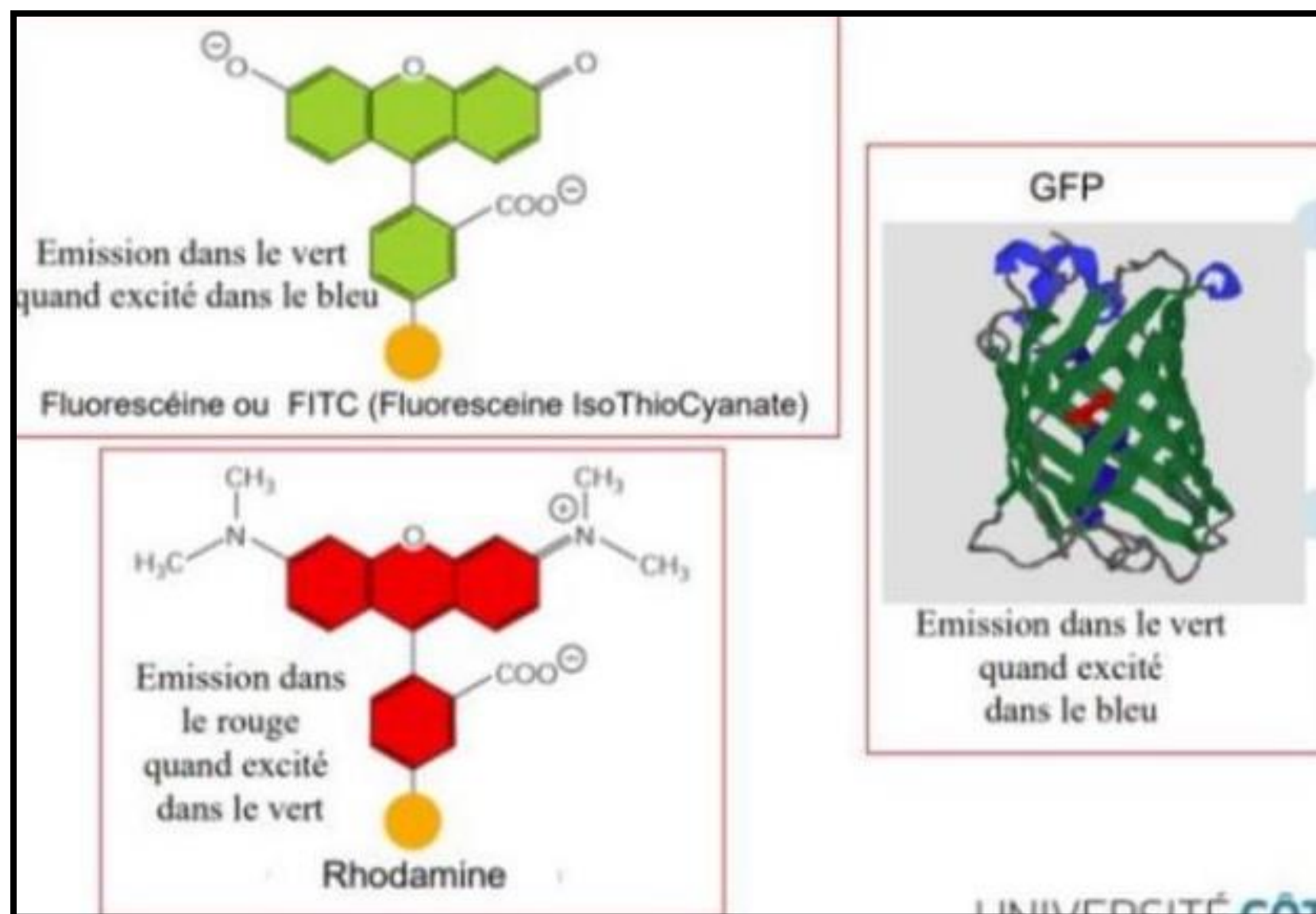
Une mutation est suffisante pour changer le spectre de la molécule. On a donc à notre disposition une batterie de dérivés de la GFP : YFP (jaune), BFP (bleu), CFP (cyan)...

La GFP conserve ses propriétés de fluorescence quand elle est exprimée artificiellement dans des cellules procaryotes et eucaryotes



Il existe d'autres fluorochromes comme la fluorescéine qui émet dans le vert.

La rhodamine qui émet dans le rouge



### C/ Introduction de molécules fluorescentes

Pour rendre une molécule fluorescente qui ne l'est pas naturellement, une molécule fluorescente (fluorochrome) est **greffée** à la molécule étudiée ou v s'associer dans la cellule à la molécule étudiée.

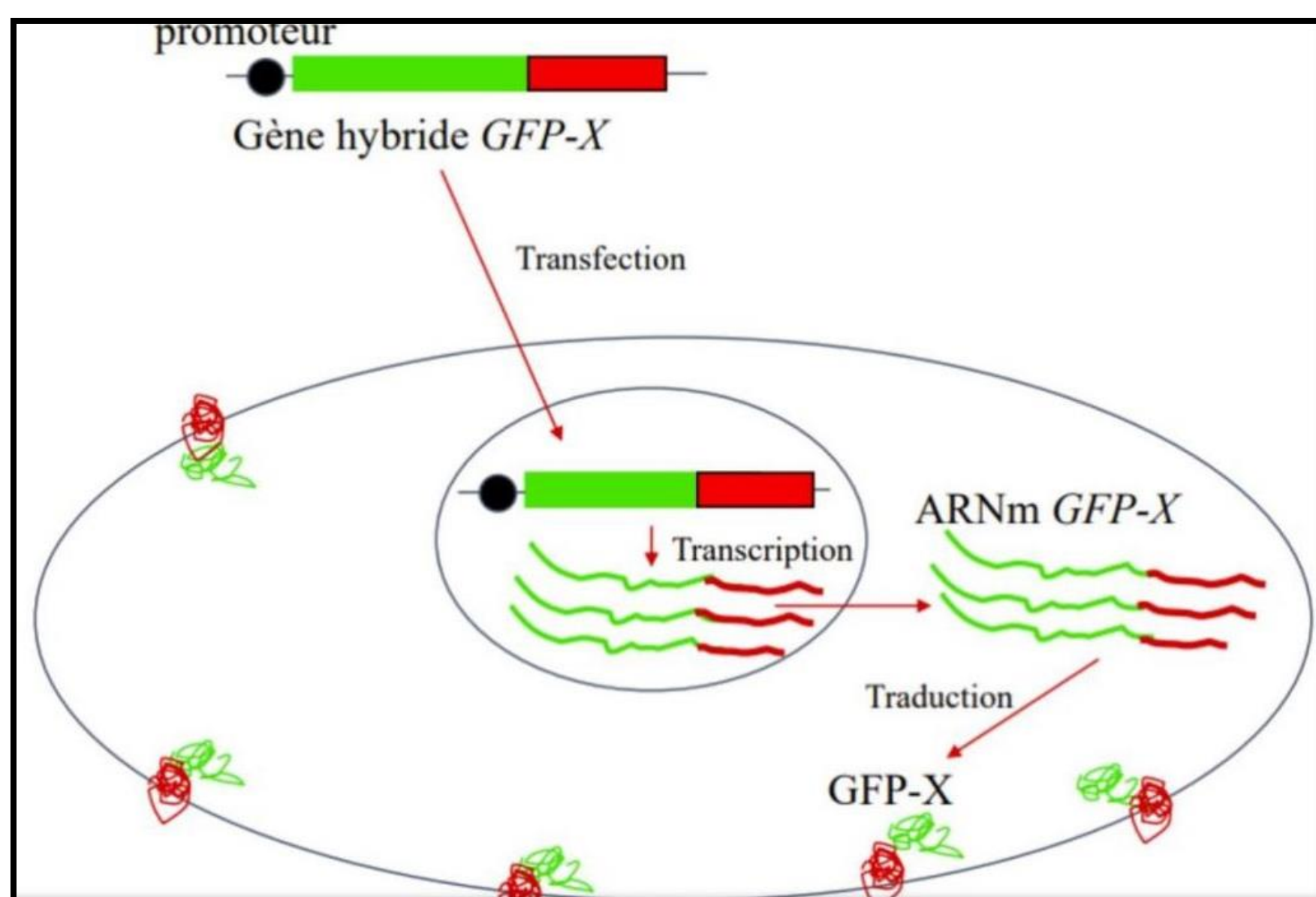
Une fois greffée, il faut pouvoir l'introduire dans la cellule qui nous intéresse. Le fait d'introduire de l'ADN dans une cellule en laboratoire s'appelle la **transfection**.

Quand l'ADN arrive dans la cellule, le gène va être **reconnu** comme un gène de cette dernière qui va être trompée. Elle va donc utiliser sa machinerie de transcription pour aller **transcrire** ce gène en ARN qui va être **exporté** dans le cytoplasme où il va être **traduit** en protéine GFP.

A chacune de ces étapes, il y'a une **amplification** : une molécule d'ADN va donner plusieurs molécules d'ARN et chacun va donner plusieurs protéines.

Ce qui a beaucoup plus d'intérêt, c'est de créer artificiellement un **gène hybride** où l'on fusionne la phase codante du gène permettant de coder la GFP au gène codant pour la protéine X que l'on étudie.

Le principe est le même, la cellule va produire la protéine hybride qui est une construction humaine. Cette nouvelle protéine hybride va acquérir **en partie ou totalement** les propriétés de la protéine X.



Dans cet exemple, on observe que la fluorescence est localisée dans la membrane. Cela donne comme information que la protéine GFP-X est membranaire. Cette expérience suggère que la protéine X est membranaire

On peut **supposer** que la protéine est membranaire, mais il peut y'avoir d'autres interprétations donc ce n'est **pas une démonstration**. Pour que ça le soit, il faut que par le raisonnement on soit capable de conclure qu'il n'y a aucune autre interprétation possible.

Ici parce que notre protéine est fusionnée à GFP, elle a pu acquérir de nouvelles propriétés. Même si c'est peu probable on ne peut pas l'exclure. C'est pour cela que le résultat n'est pas « cette expérience démontre » mais qu'elle « suggère ».

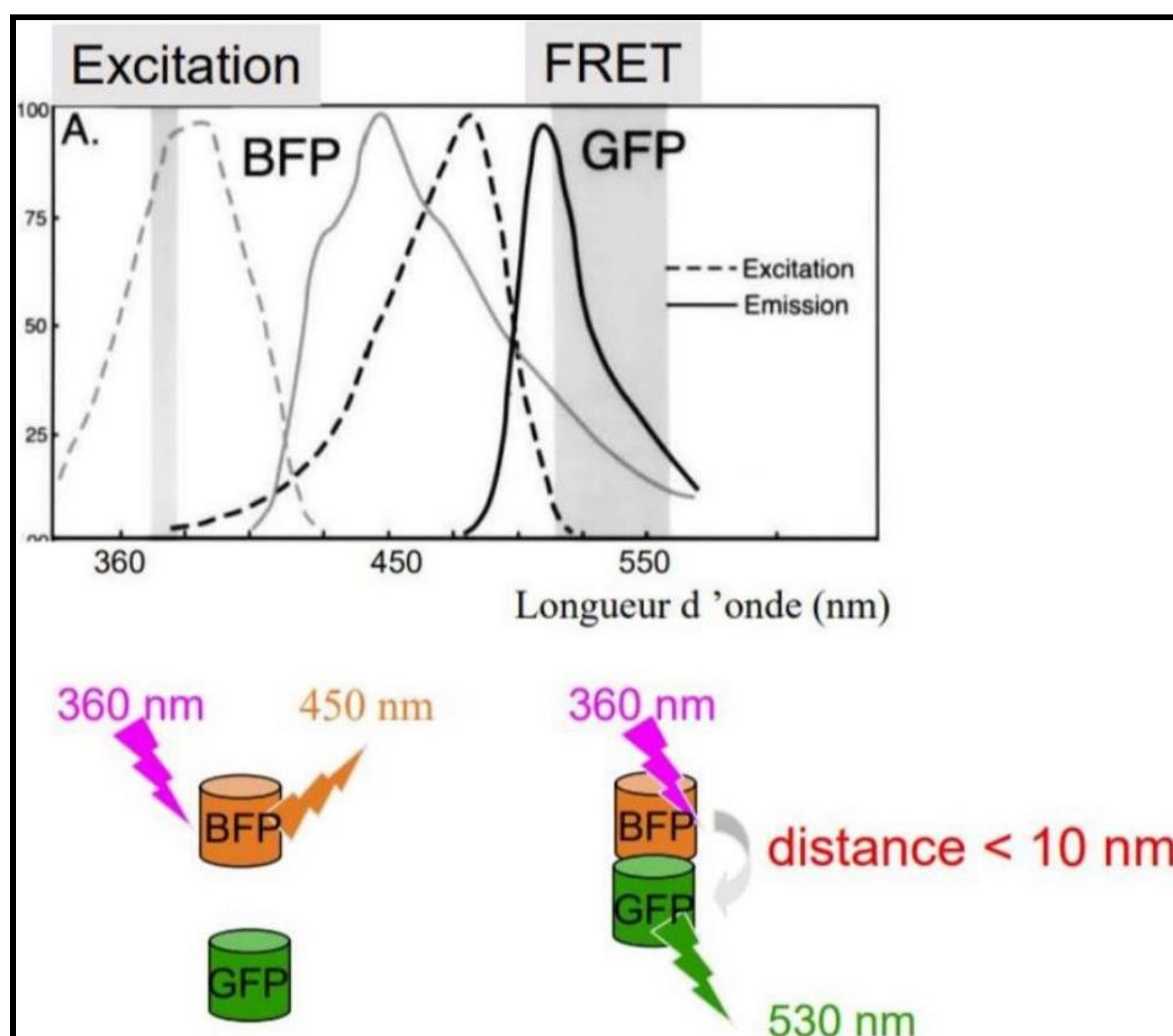
L'interprétation d'une protéine hybride liée à la GFP dépend d'autres tests nous permettant de dire qu'elle est fonctionnelle.

### D/ Applications : FRET/FRAP/FLIP

#### ➤ Le FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

Le **FRET** consiste en un transfert d'énergie non radiatif, sans émission de lumière, résultant de l'interaction entre deux molécules situées à **moins de 10 nm** : une molécule donneuse d'énergie et une molécule cible accepteuse d'énergie.

Ce phénomène physique nécessite que le spectre d'émission du donneur recouvre au moins **partiellement le spectre d'absorption** du receveur 📺📺📺



EXEMPLE :

Si on irradie un premier fluorochrome à 360 nm, il va normalement émettre à 450 nm. Mais si les deux fluorochromes différents (ici BFP et GFP) sont suffisamment proches (à moins de 10 nm), le photon d'émission à 450 nm au lieu d'être repéré directement par le microscope, va servir à exciter le **deuxième fluorochrome**.

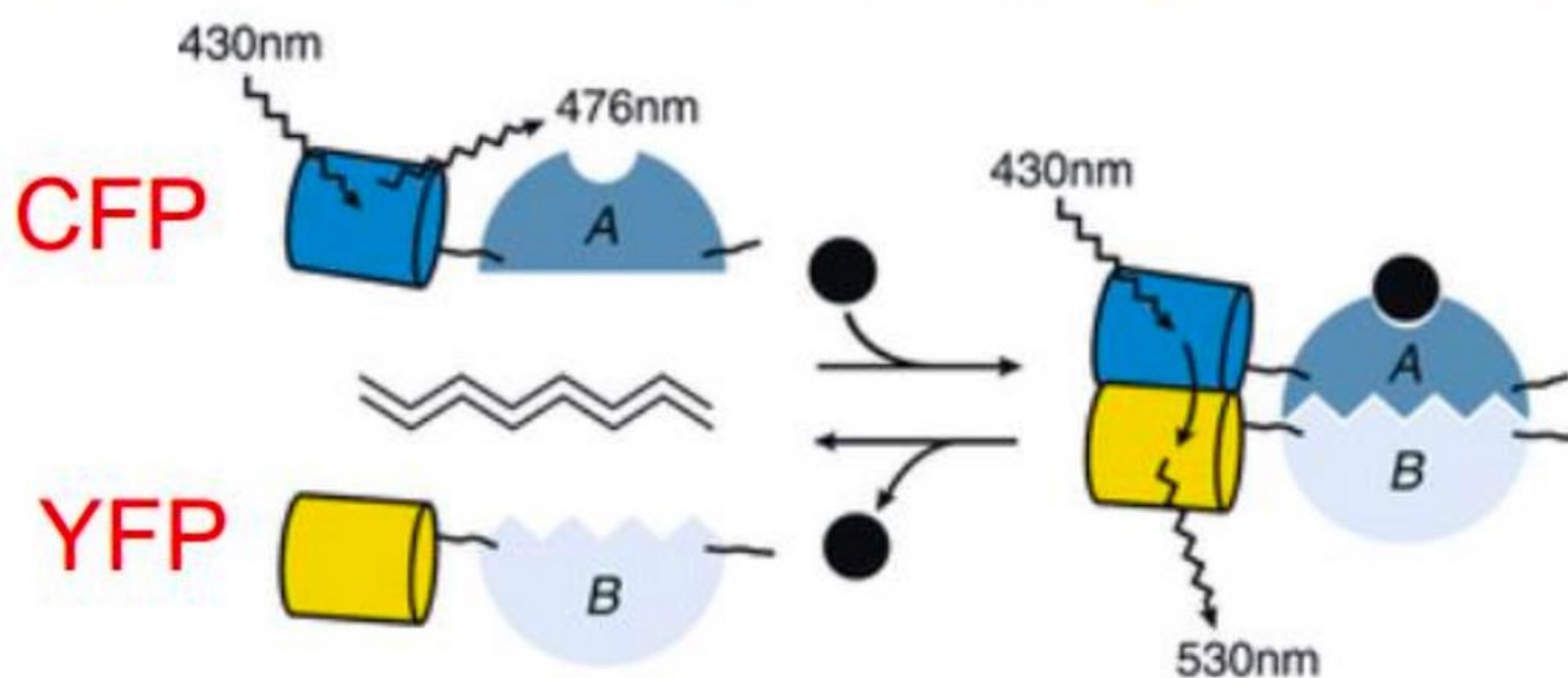
Ce dernier à condition que les spectres se chevauchent, va alors émettre à **une autre longueur d'onde** (ici 530 nm).

Ainsi en ayant initialement irradié avec le microscope à 360 nm, si les deux fluorochromes sont à une distance **inférieure à 10 nm** (c'est-à-dire qu'ils font partie du même complexe moléculaire), on va pouvoir repérer au microscope une émission à 530 nm.

### Etude de l'interaction entre deux molécules : FRET **INTER**moléculaire

On a deux fluorochromes émettant dans des spectres différents (ici la CFP et la YFP, des variants de la GFP). Si les molécules A et B sont en interaction, lorsqu'on irradie à 430nm, on aura une longueur d'onde émise à 530 nm.

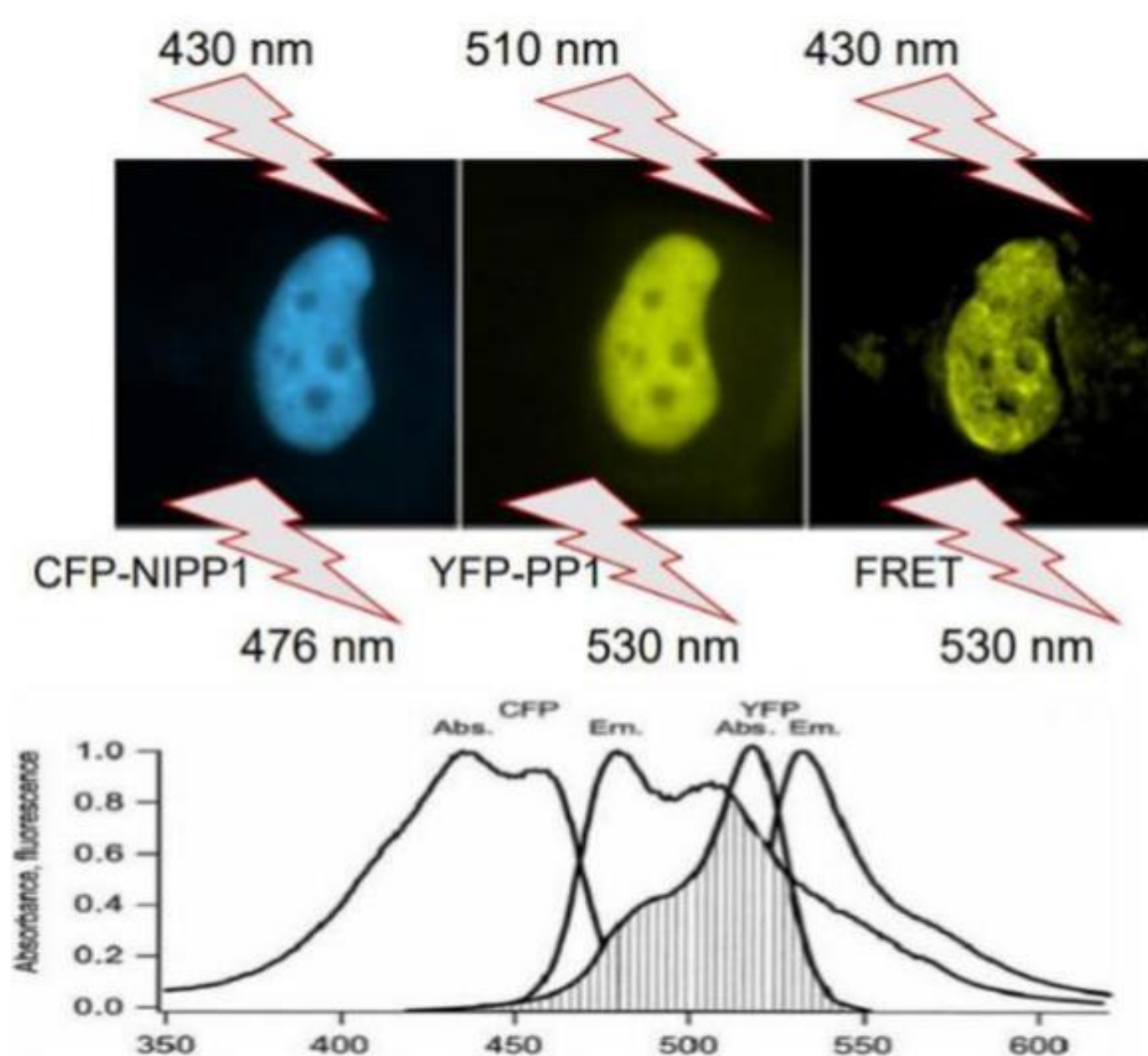
Intermoléculaire -> étude des interactions entre deux molécules



## EXEMPLE :

On a dans la cellule une protéine NIPP1 associée au fluorochrome CFP (CFP-NIPP1) et une protéine PP1 associée au fluorochrome YFP (=YFP-PP1).

- Si on irradie à 430 nm et que les **deux protéines n'interagissent pas**, on récupère une longueur d'onde à 476 nm (fluorescence cyan).
- Si on irradie à 510 nm et que les **deux protéines n'interagissent pas**, on récupère une longueur d'onde à 530 nm (fluorescence jaune).
- Si les **deux protéines sont exprimées** en même temps dans la cellule et **qu'elles interagissent**, en irradiant à 430 nm on aura une fluorescence à 530 nm.

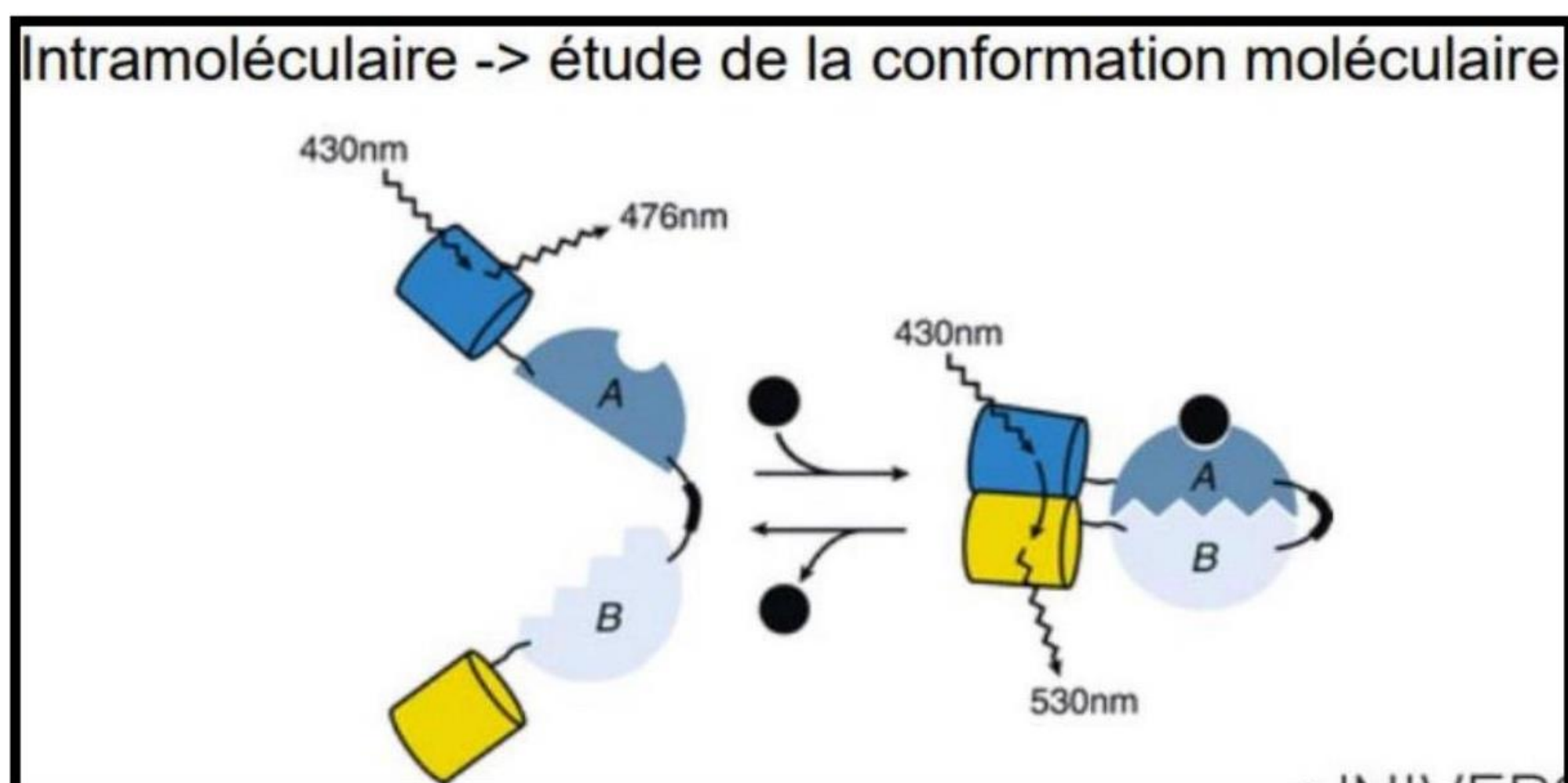


Cela nous fournit aussi **une information spatiale**. On voit que la fluorescence n'est pas uniforme dans le nucléoplasme.

Elle est plutôt sous forme de **petits foyers plus intenses**, ce qui nous donne comme information que ces molécules interagissent dans ces foyers particuliers.

Au sens biologique on comprend que NIPP1 et PP1 sont localisées à une distance **inférieure à 10nm** et donc qu'elles appartiennent au même complexe.

### Etude de la conformation moléculaire : FRET **INTRA**moléculaire



On veut savoir si une protéine donnée est capable de **se replier** dans l'espace et de rapprocher deux fluorochromes (qui vont alors émettre à 530 nm).

## EXEMPLE :

Un exemple de FRET intramoléculaire est celui de la mesure du calcium avec une sonde que l'on appelle « sonde ».

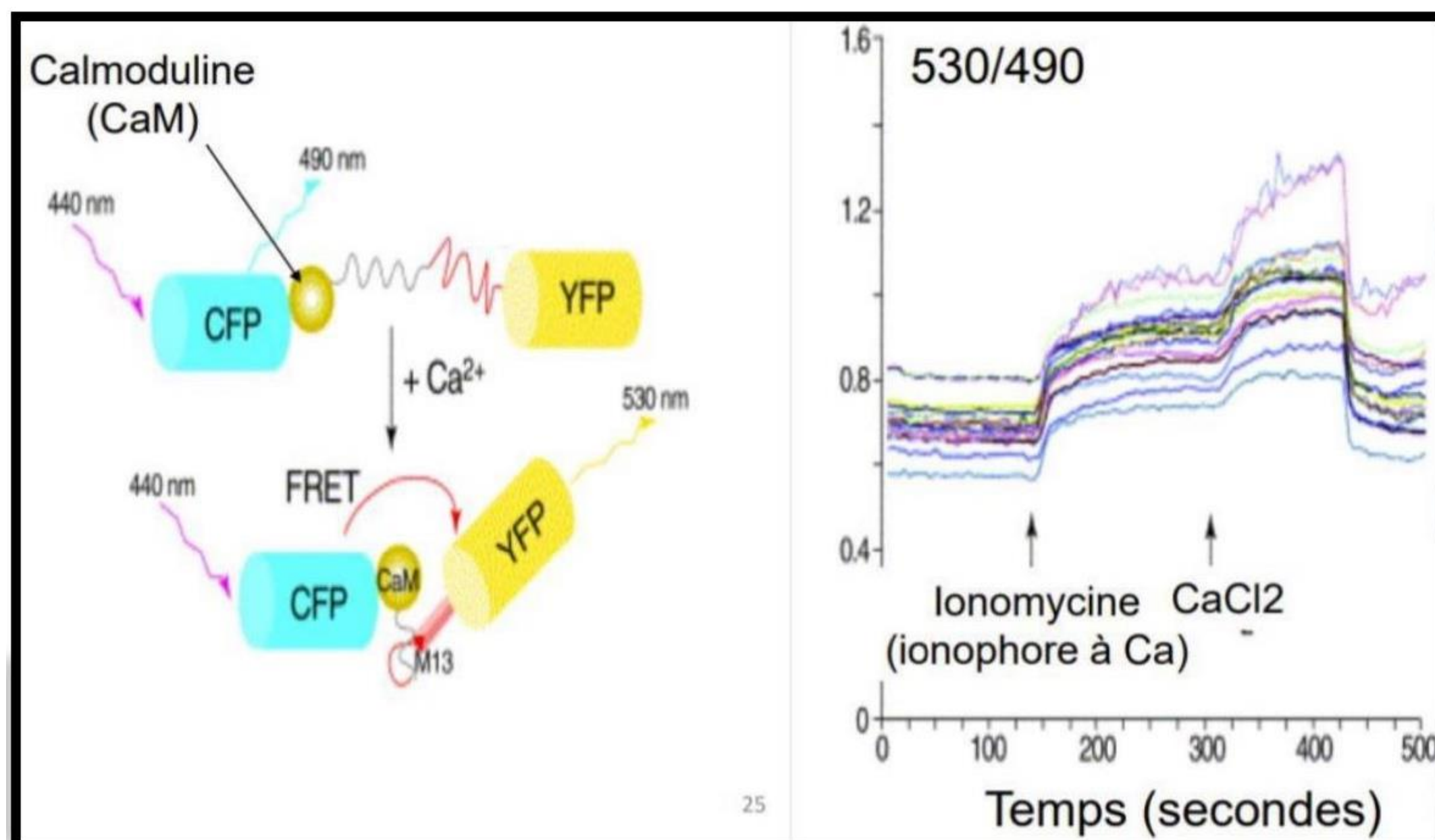
En intramoléculaire, on a des molécules qui ont des propriétés de reconnaissance du calcium.

Ces molécules vont répondre en fonction de la concentration du calcium ;

- Lorsque le calcium est présent dans la cellule, il va se fixer sur la calmoduline.
- La calmoduline va induire une modification de la conformation de la protéine
- CFP et YFP vont alors se rapprocher
- On aura ainsi un signal de FRET proportionnel à la quantité de calcium

On peut voir sur le graphique l'application avec une cellule humaine :

- Pour être précis on va mesurer le rapport entre le spectre d'émission à 530 nm et le spectre d'excitation à 490 nm (en ordonné), ce qui va permettre de donner la concentration en calcium.
- Si on rajoute du calcium dans la cellule, on voit bien que le rapport augmente.
- A l'inverse, on peut induire une perte de calcium en traitant la cellule par ionomycine (ionophore = canal à calcium). On observe dans ce cas que le rapport baisse.

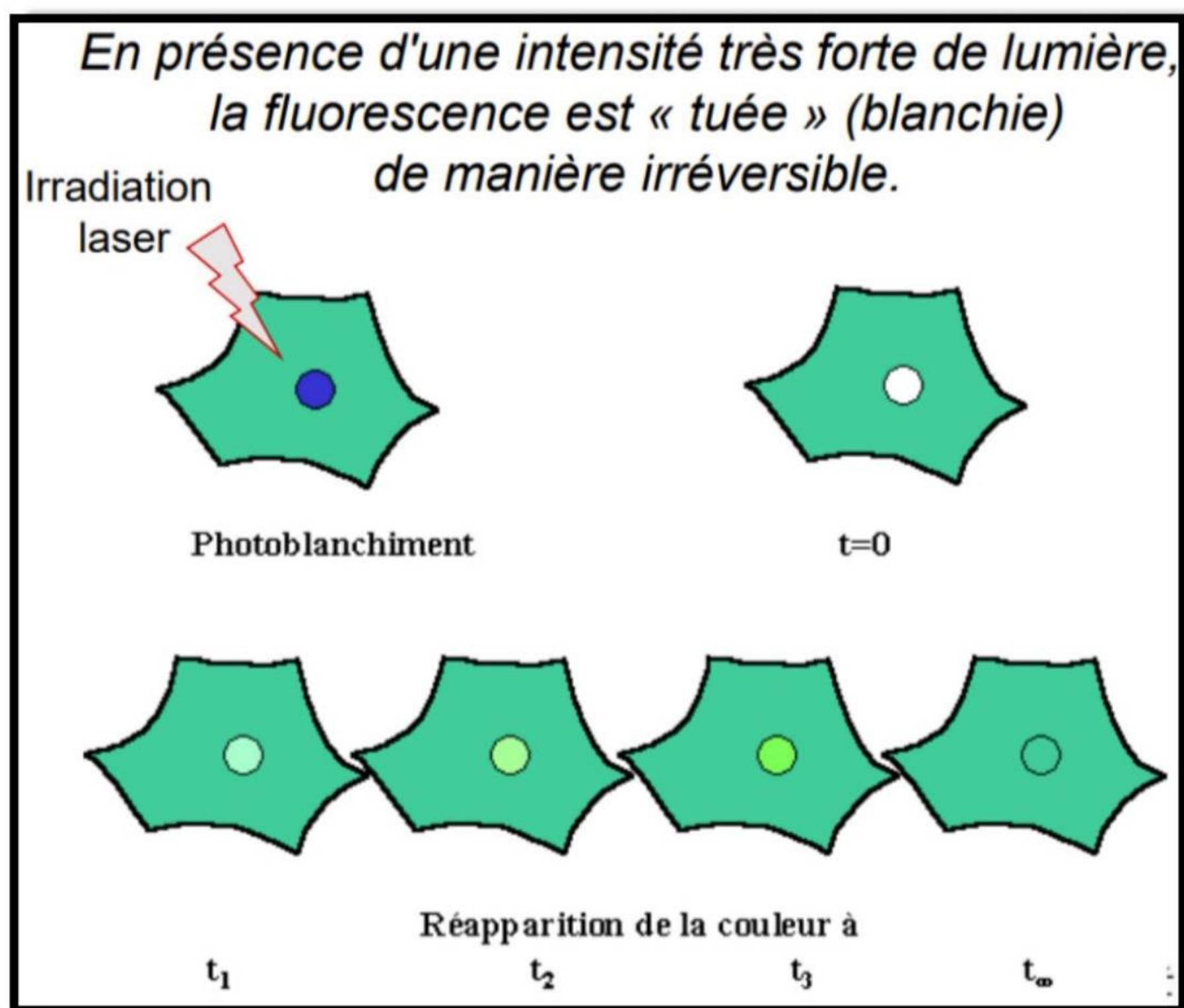


## ➤ Le photoblanchiment (FRAP/FLIP)

La réaction normale de fluorescence est d'émettre de l'énergie à une longueur d'onde plus grande (d'énergie inférieure). Toutefois si l'on irradie avec une intensité **très forte** de lumière, une forte proportion des molécules fluorescentes va « s'éteindre ».

En effet, les molécules qui auraient été fluorescentes au départ vont être profondément **modifiées** (perte d'électrons, production de radicaux libres...) ce qui va induire la perte de la propriété de fluorescence de la molécule.

On dit alors qu'elle est « **tuée** » ou **blanchie** (puisqu'elle n'émet plus de lumière) et ce de manière irréversible. C'est ce qu'on appelle le **photoblanchiment**.



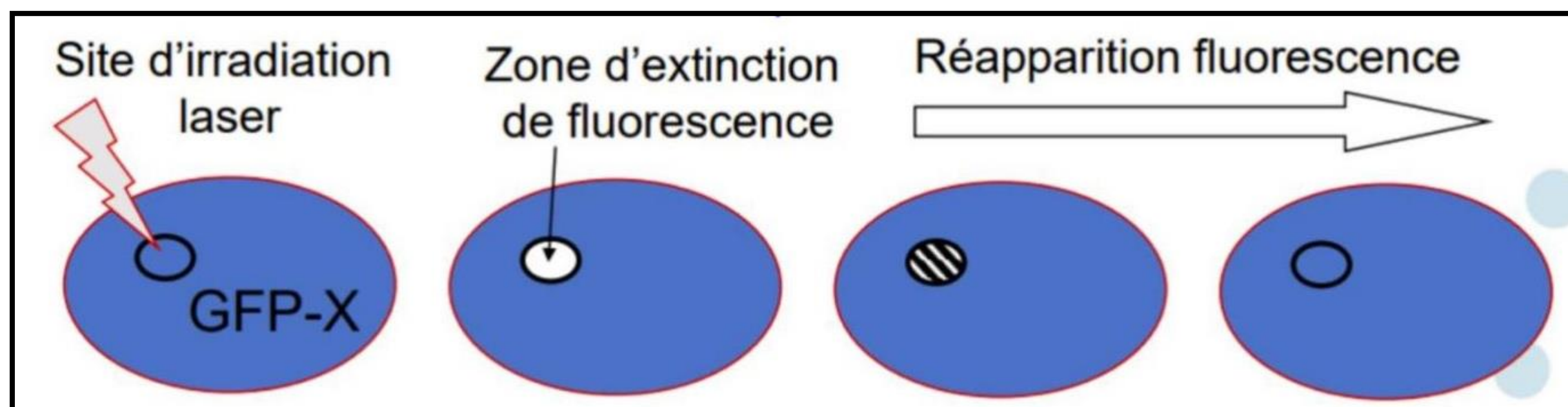
## ➤ FRAP = Fluorescence Recovery After Photobleaching:

On irradie au laser une petite portion de la cellule formant un « trou » fluorescent dans celle-ci. On va voir lors d'une expérience de cinétique/timelapse la fluorescence réapparaître progressivement. En effet les autres molécules de même nature vont migrer dans l'endroit irradié en fonction de leurs propriétés dynamiques.

➤ On peut donc :

- Mesurer le temps de réapparition de la molécule
- En déduire de cette dernière donnée la vitesse de diffusion de la molécule dans la cellule.

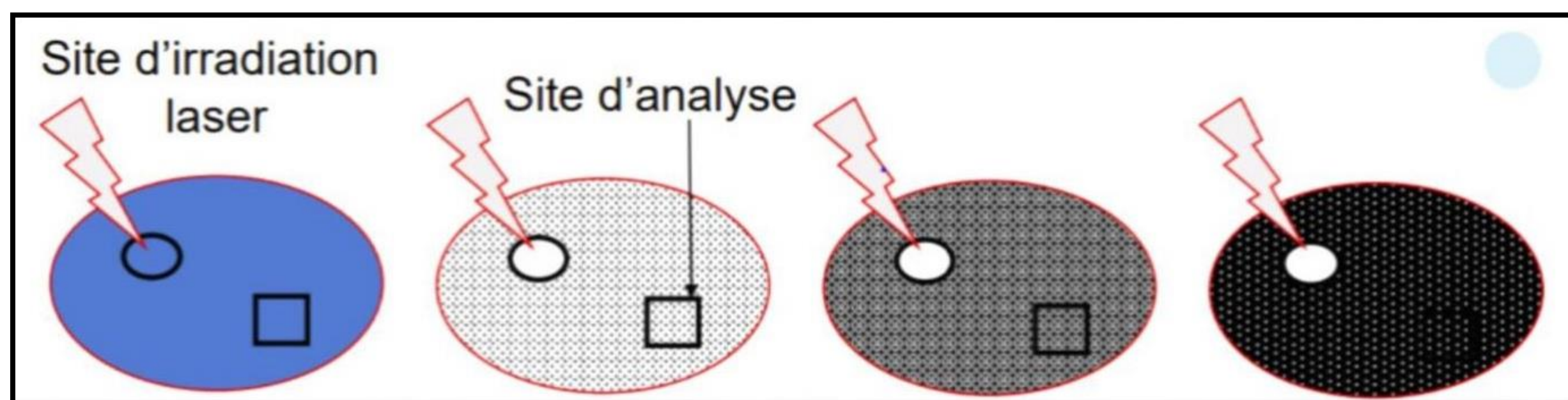
Toutes les molécules de la cellule ne diffusent pas de la même façon (en fonction du lieu où elles sont associées, de leur fonction, de l'état de la cellule, etc.). Ceci nous informe sur le mode de fonctionnement de la cellule. *En gros on frappe la cellule et on la regarde récupérer (recovery)*



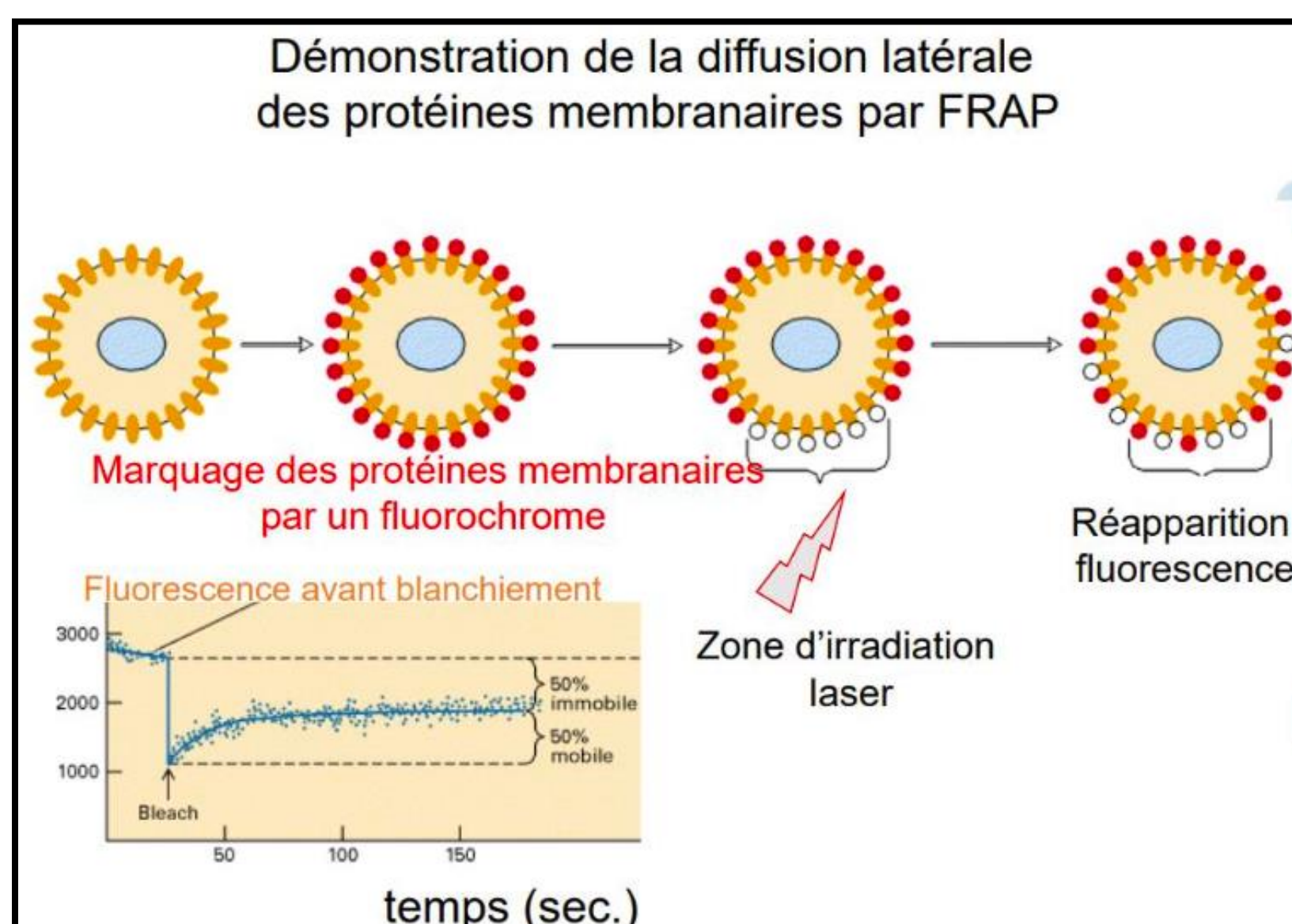
➤ **FLIP = Fluorescence Loss In Photobleaching**

Cette fois, on a **deux sites** d'études de la cellule.

- Un 1er où l'on **maintient** une irradiation qui est donc tout le temps blanc (chaque molécule qui migre dans ce site est tuée à son tour).
- Un 2ème site **non irradié** où l'on enregistre la fluorescence, et plus précisément sa disparition ce qui va permettre de mesurer la vitesse de déplacement/diffusion de la molécule. *(Les molécules flippent et on mesure leur disparition)*



**Un exemple classique est la démonstration de la diffusion latérale des protéines membranaires par FRAP.**





### Attention à la nuance du langage :

Cette expérience **démontre** que GFP-X est mobile et **suggère** que X seule est également mobile.

La GFP est un outil de choix pour visualiser la localisation des protéines dans la cellule.

Elle possède en effet plusieurs avantages :

- Travailler sur des  **cellules vivantes**  (étude dynamique : vidéo time-lapse)
- Possibilité de visualiser **tous les compartiments** de la cellule
- Possibilité d'étudier des phénomènes **complexes** (ex : forme, distribution des organelles...)
- Peut être utilisée avec de **nombreuses techniques** : FRET, FRAP, FLIP

Mais aussi des inconvénients :

- C'est une **technique lourde** nécessitant des étapes de recombinaison génétique et d'expression artificielle dans les cellules (pour l'introduction des fluorochromes). Ces techniques coûtent cher et ne peuvent pas être utilisées en routine. Ce sont donc des analyses qui s'adressent à des laboratoires spécialisés.
- La protéine chimère GFP-X doit conserver la fonction de X. Les molécules étudiées doivent être greffées à un fluorochrome et peuvent ainsi perdre une partie de leur fonction ou en gagner une nouvelle. Il faut donc faire très attention car sinon l'interprétation sera faussée. (*D'où la nuance au niveau du langage dont nous avons parlé plus haut*)

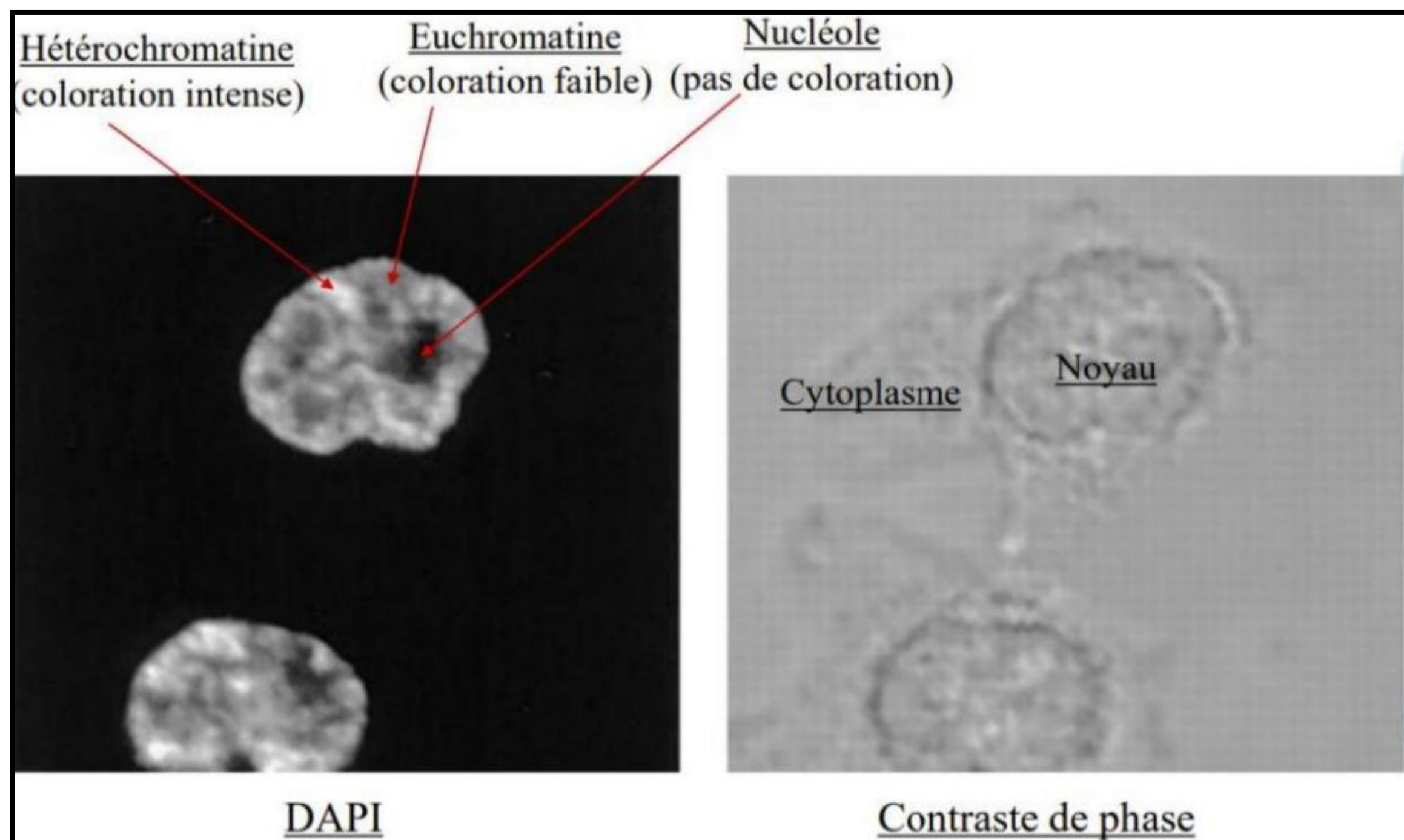
### E/ Fluorescence induite

La fluorescence induite correspond à des molécules qui deviennent fluorescentes lorsqu'elles sont fixées à une molécule particulière.

On les utilise pour visualiser l'ADN par exemple.

Ces colorants se fixent spécifiquement sur les paires de bases de l'ADN :

- **Hoechst** et le **DAPI** se fixent spécifiquement sur les paires de bases A-T de l'ADN.
- Le **bromure d'éthidium** et l'**iodure de propidium** sont des **agents intercalants** : ils s'intercalent dans la double hélice de l'ADN de manière non spécifique.



A droite nous avons deux cellules sans coloration observée avec une technique de microscopie optique sans coloration avec contraste de phase. On n'obtient pas vraiment d'informations.

À gauche, on observe les deux mêmes cellules mais cette fois **colorées au DAPI**. Ce sont les chromosomes et donc l'ADN qui sont colorés (plus c'est blanc, plus la coloration est intense).

On remarque que la répartition de l'ADN **n'est pas homogène** dans le noyau.

Il y'a :

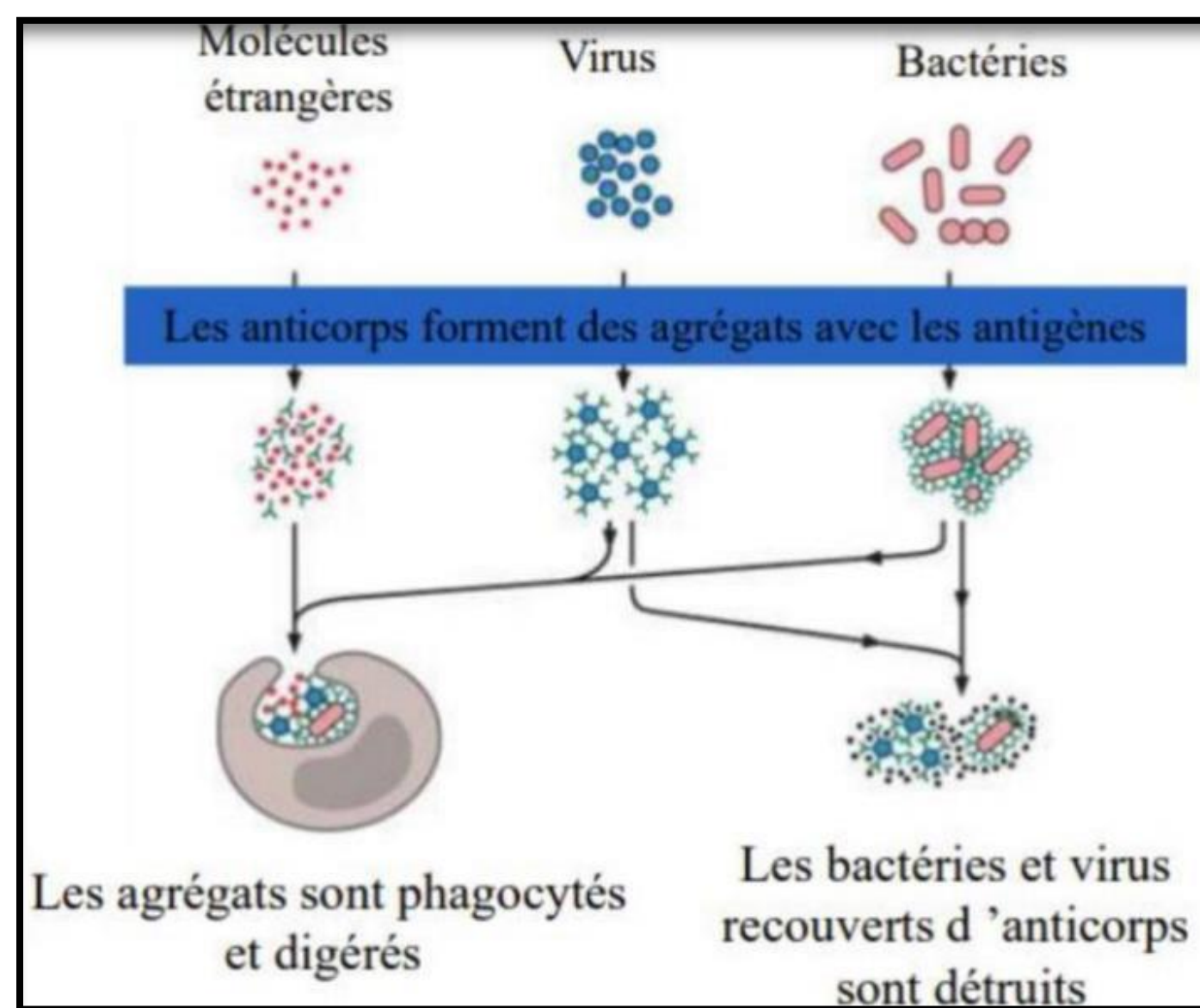
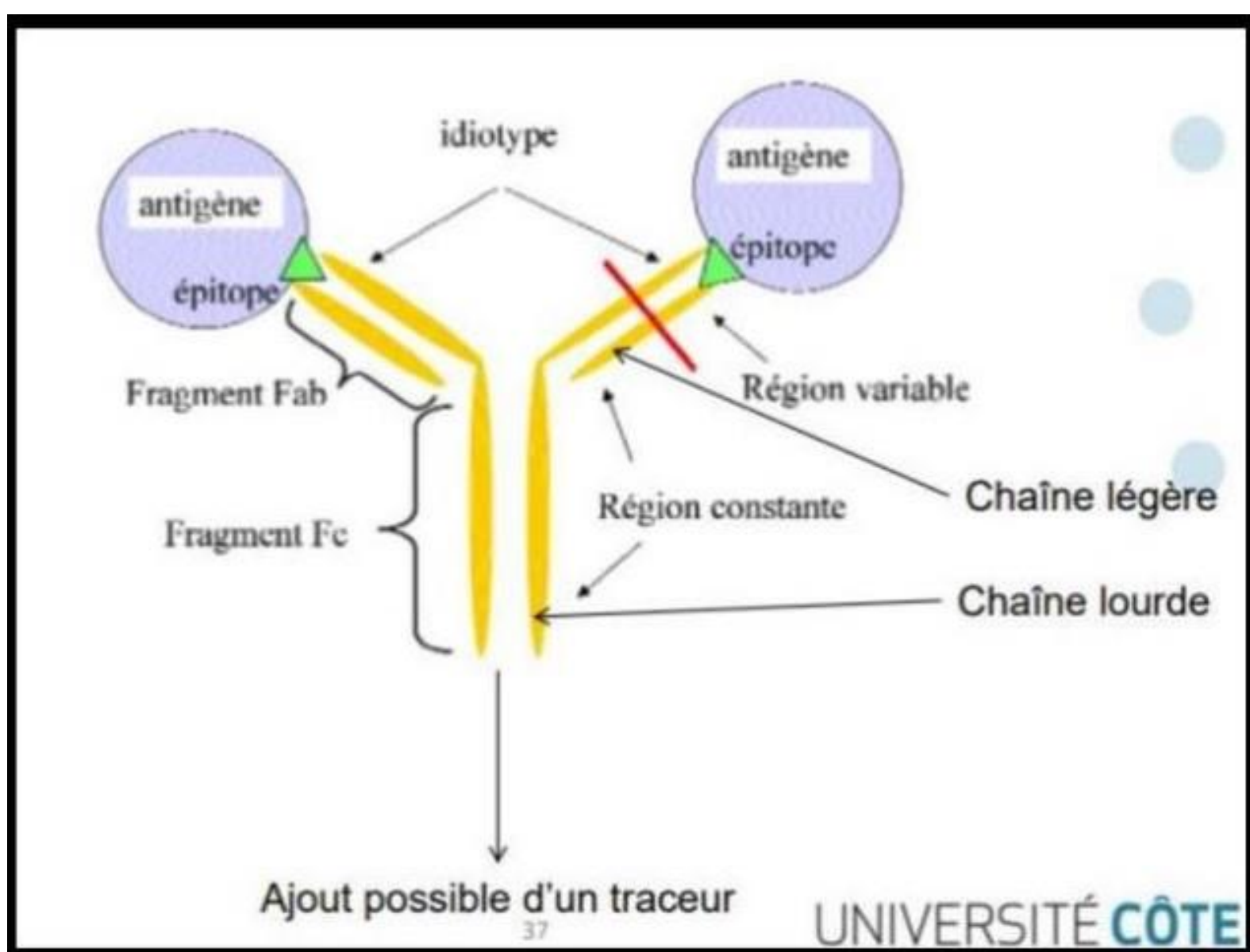
- Des zones très blanches où l'on retrouve beaucoup d'ADN. L'ADN est très condensé, c'est ce que l'on appelle de **l'hétérochromatine**.
- Des zones grises avec un peu d'ADN. Cet ADN est donc moins condensé, c'est que l'on appelle **l'euchromatine**.
- Il y'a également une zone sans coloration. C'est **le nucléole**, qui est une zone du noyau où il n'y a pas d'ADN. C'est un compartiment non délimité par une membrane mais ayant plusieurs fonctions dont synthétiser les ribosomes qui seront exportés du noyau pour servir à la traduction.

Pour mesurer le calcium, le Fura-2 est une molécule qui a été fabriqué pour reconnaître le calcium. On a une réponse quantitative proportionnelle à la concentration de calcium qui peut être utilisé pour étudier par exemple la transmission neuronale dans une cellule du type cellule de Purkinje.

## F/ Immunofluorescence indirecte

### Rappel d'immunologie

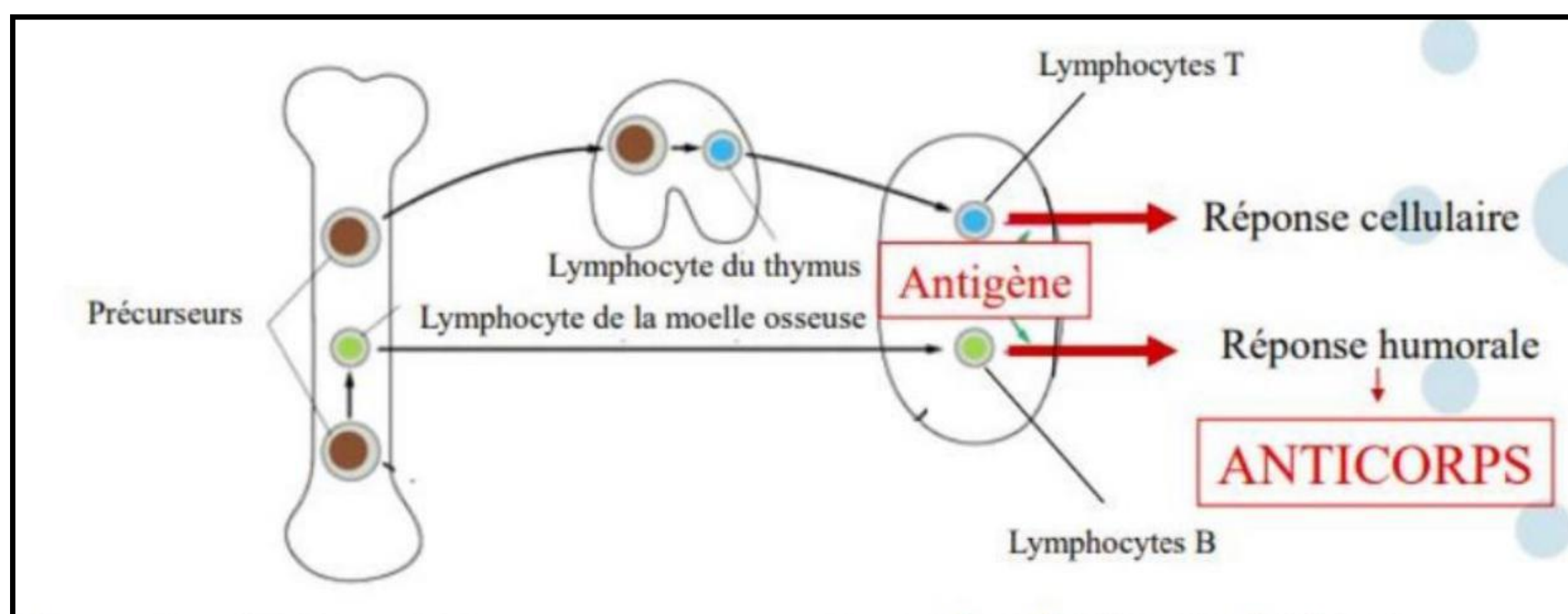
Qui dit immunologie, dit **anticorps**. Un anticorps, c'est une protéine qui va permettre de reconnaître **spécifiquement** un antigène. Ils sont produits pour se défendre contre les agents pathogènes.



Les anticorps sont synthétisés par deux types de cellules spécialisées :

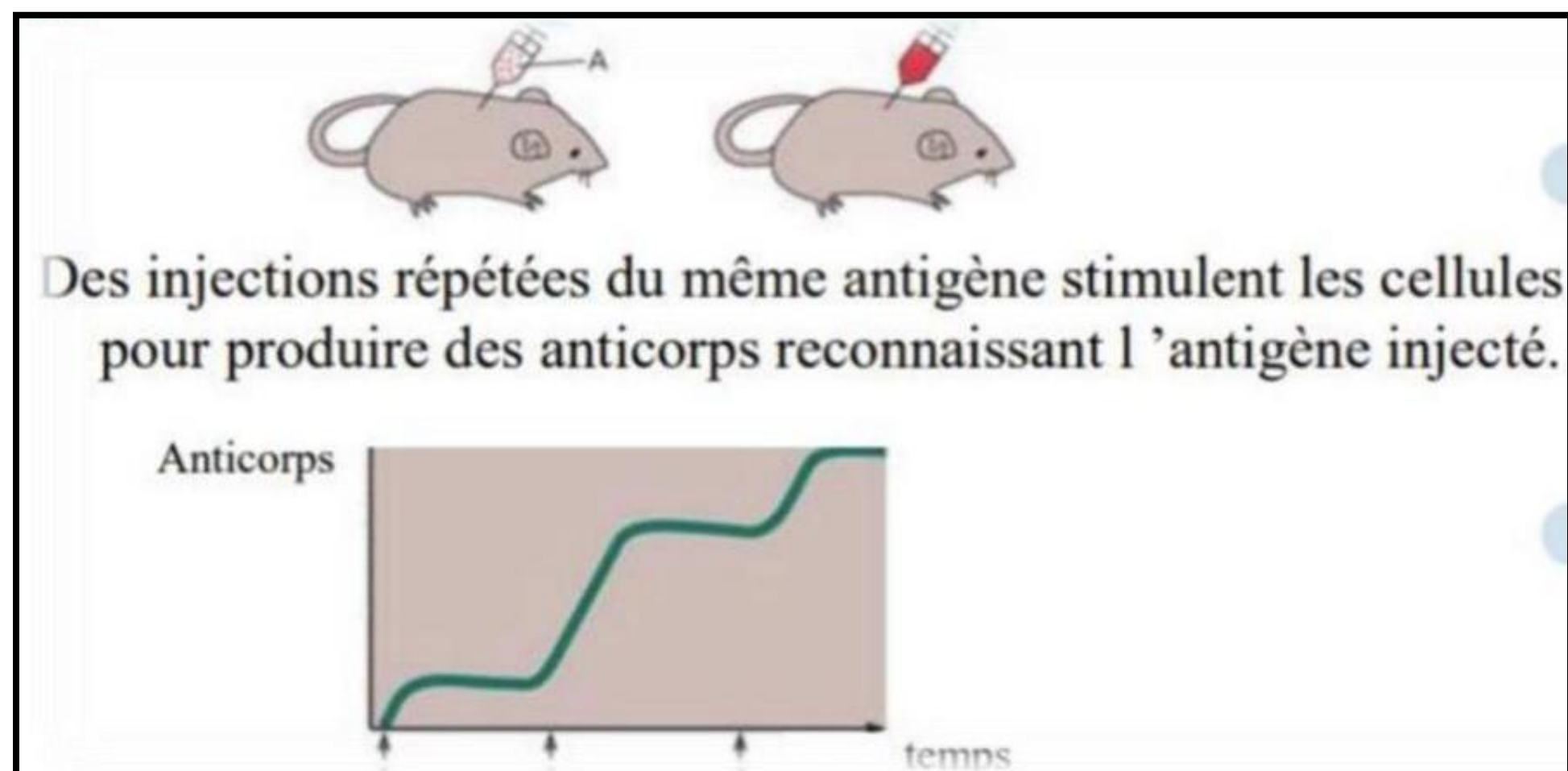
- Les **lymphocytes T** qui sécrètent des anticorps en restant sur la **membrane**
- Les **lymphocytes B** qui sécrètent les anticorps solubles = immunité humorale
- Les anticorps utilisés en microscopie sont ceux **synthétisés par les lymphocytes B**.

L'hématopoïèse se situe dans la **moelle osseuse**.



Et au labo ???

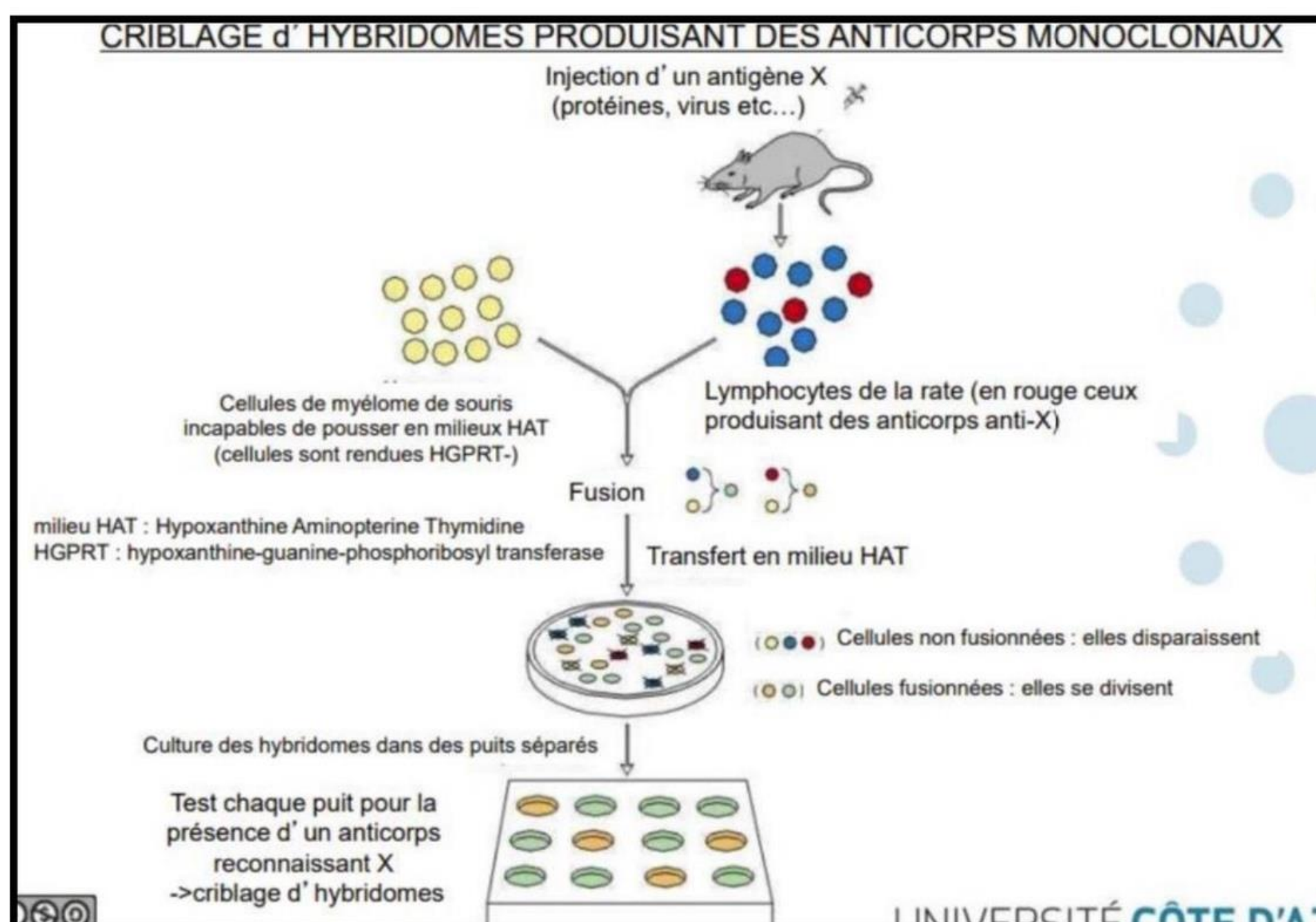
Au laboratoire, les anticorps peuvent être obtenus en injectant l'antigène dans un animal (souris, lapin, chèvre, mouton, cheval...). Des **injections répétées** du même antigène stimulent les cellules B pour produire des anticorps reconnaissant l'antigène injecté. Comme beaucoup de cellules B différentes peuvent être stimulées par le même antigène, le sérum va contenir un mélange d'anticorps légèrement différents mais reconnaissant tous l'antigène : anticorps **polyclonaux**.



Il existe une technique de laboratoire permettant d'obtenir des anticorps **monoclonaux**, ne reconnaissant qu'un seul épitope d'antigène.

On réalise un **criblage d'hybridomes**. On met en culture des cellules de cancer immortelles que l'on fusionne avec des lymphocytes B, ce qui va les rendre immortelles à leur tour.

On va pouvoir tester un par un les clones obtenus (cribler) avec l'antigène afin d'obtenir des anticorps monoclonaux



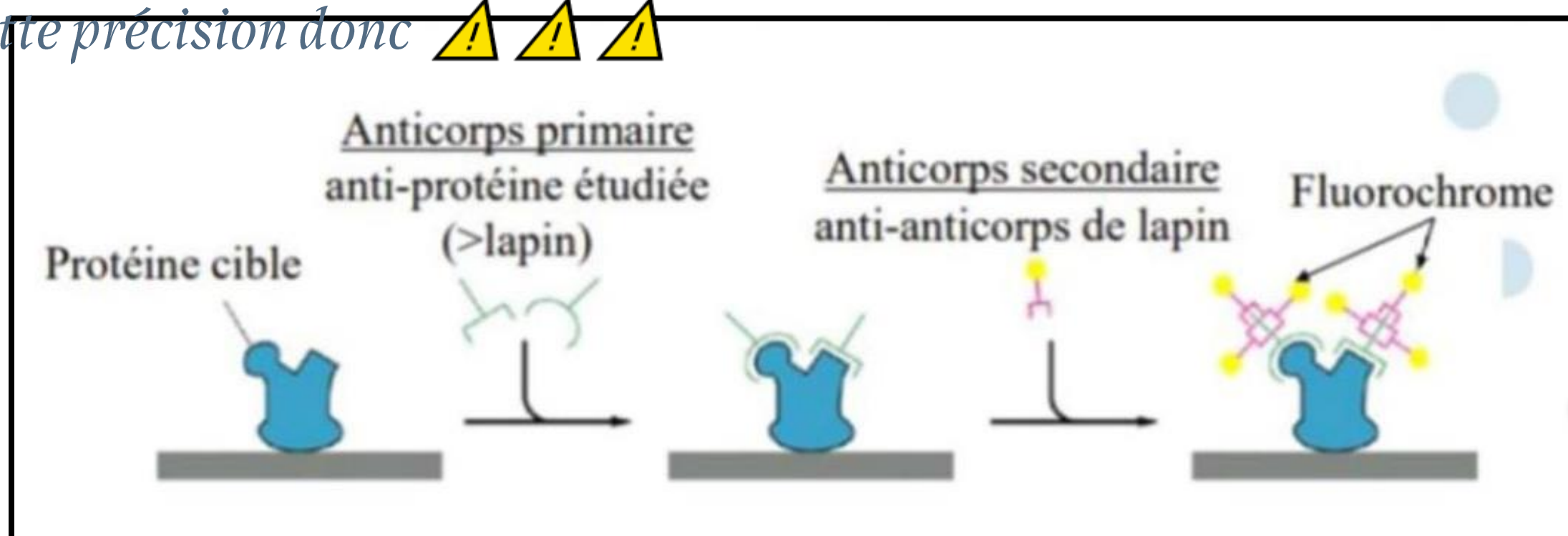
Les anticorps monoclonaux ont plusieurs utilisations :

- Marquage d'une protéine pour visualisation en microscopie à fluorescence (immunofluorescence indirecte)
- Purification par chromatographie d'affinité (couplage des anticorps monoclonaux à une colonne)
- Outils diagnostiques : test de grossesse, dépistage séropositivité au VIH...
- Médicaments : infection, anti-rejet de greffe, allergie, psoriasis, anti-cancer

⚠ **Principe de l'immunofluorescence indirecte :** 📺 📺 📺 📺 📺 📺 📺 📺 📺  
(oui 9) ⚠

Un premier anticorps reconnaît **spécifiquement** la molécule étudiée (**anticorps primaire**) et un deuxième anticorps (**anticorps secondaire**) greffé à un fluorochrome reconnaît le **premier anticorps** (**anti-anticorps**) 📺 📺.

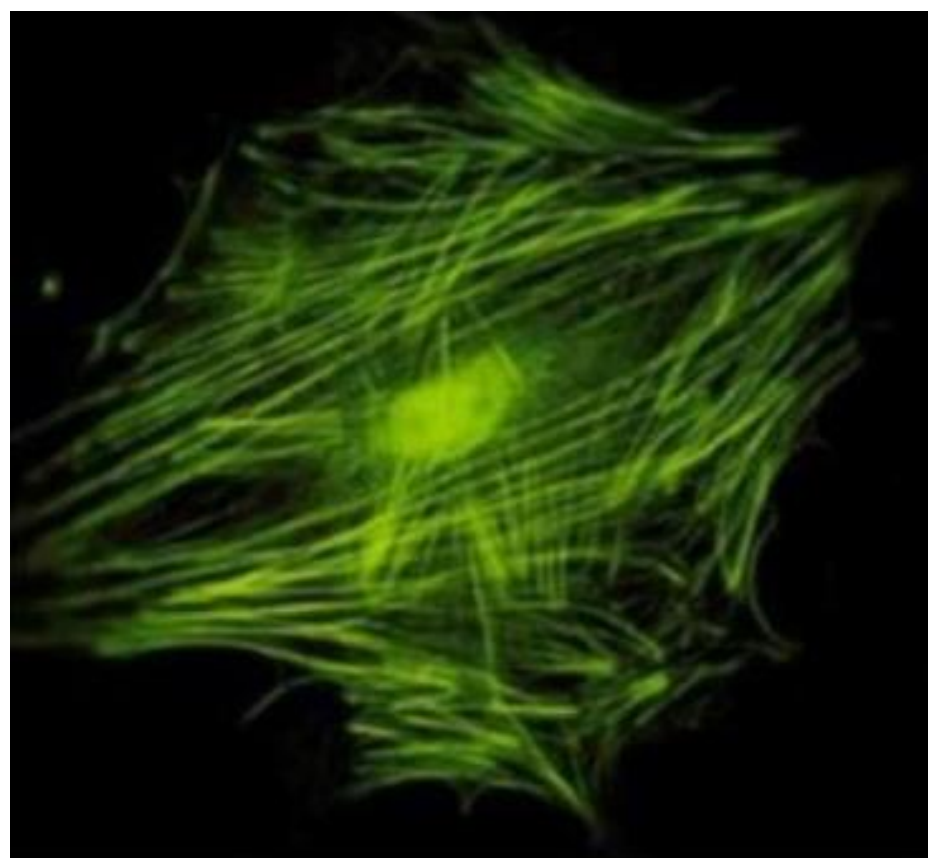
*Attention les anticorps primaires et secondaires doivent être d'espèces différentes. Les anticorps primaires ayant des cibles différentes aussi. Un qcm revient très souvent et nécessite cette précision donc* ⚠ ⚠ ⚠



Les anticorps ne sont pas fluorescents naturellement : il faut les coupler à des fluorochromes.

Les anticorps secondaires ont été produits dans des boîtes de biotechnologies pour les rendre fluorescents. En microscopie à fluorescence, on va pouvoir ainsi visualiser la protéine d'intérêt.

Exemple :



Une cellule humaine (fibroblaste) fixée et perméabilisée (détergent) pour laisser entrer des anticorps anti-actine et visualisée par des anti-anticorps (2ème anticorps) fluorescents

## G/ FISH = Fluorescent In Situ Hybridization

La technique **FISH** permet de visualiser de manière spécifique certaines séquences d'ADN ou d'ARN.

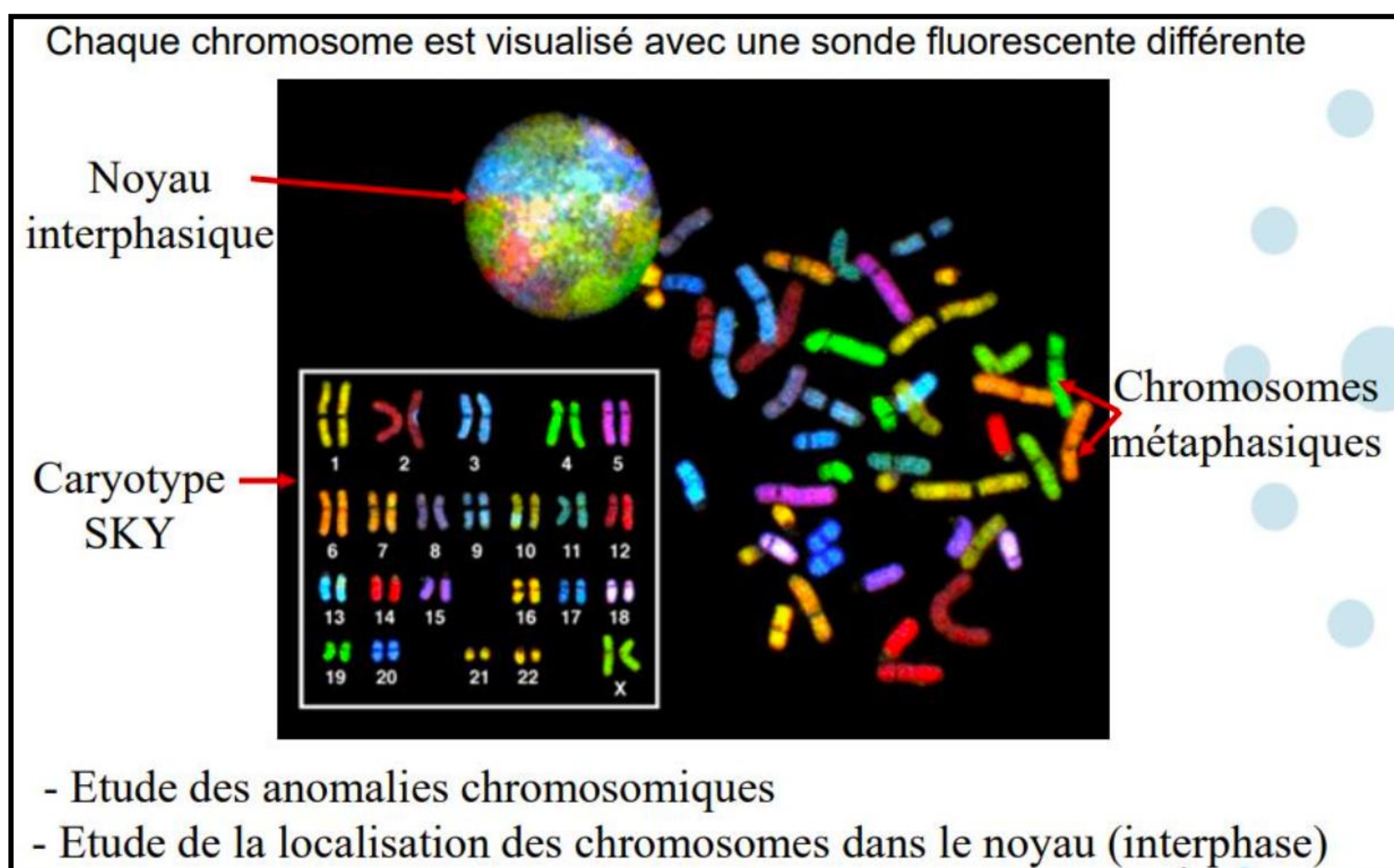
Ce ne sont pas des anticorps qui reconnaissent les séquences mais des **sondes** qui s'apparient **spécifiquement** à la séquence étudiée.

Les sondes sont des petites séquences **d'ADN** synthétisées artificiellement qui vont cibler uniquement la région contenant la séquence complémentaire.

Cela implique de **dérouler** l'hélice de l'ADN par des méthodes physiques ou chimiques pour pouvoir **hybrider** la sonde.

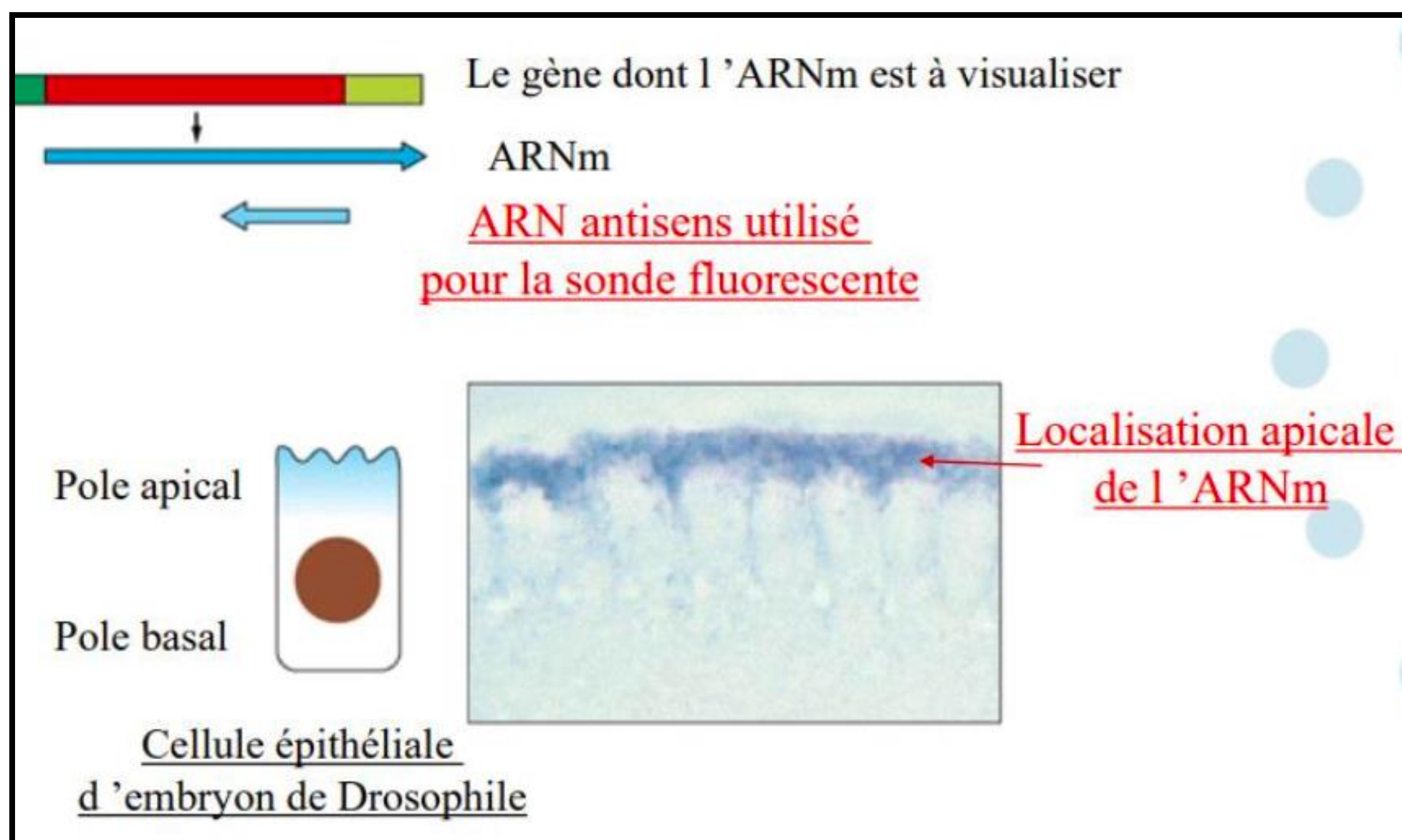
Les sondes sont fluorescentes car elles comportent un précurseur particulier sur lequel est greffée soit un fluorochrome, soit une molécule pouvant être reconnue par un anticorps.

Il est possible d'utiliser **plusieurs sondes** pour étudier **plusieurs séquences d'ADN** sur un même chromosome voire plusieurs chromosomes.



Pourquoi utiliser FISH ?

Cette technique permet d'étudier des **anomalies chromosomiques** en pathologie et la localisation des **chromosomes** dans le noyau ainsi que la localisation des **ARNm** dans la cellule.



### 3) La microscopie confocale

**Cette partie là est super importante et tombe à l'examen donc si vous n'avez plus le temps (mais vous l'avez) bossez ça en priorité!**

La microscopie confocale est un outil **d'exploration tridimensionnelle** des **cellules** et des **tissus**.

Ce sont des microscopes un peu différents encore plus chers et qui ont pour avantage par rapport au microscope à fluorescence standard cette capacité d'analyse en trois dimensions riches en information spatiale. 📺 📺

Il s'agit du même dispositif de microscope à fluorescence sauf qu'il possède un dispositif concentrant la lumière d'excitation vers un plan nommé **plan confocal** de l'échantillon. C'est ce plan que l'on pourra observer. 📺

Nous allons pouvoir **déplacer** ce plan confocal et ainsi **scanner tous les plans** de la cellule. On pourra donc reconstruire la cellule en 3D.

Ainsi, la microscopie confocale :

- Permet d'obtenir des images de sections optiques en éliminant les signaux hors champ focal grâce à un **diaphragme** ou **pinhole**. 📺
- Augmente la résolution (par rapport à la microscopie photonique standard) 📺

Pour pas que TUT'EMBROUILLES :

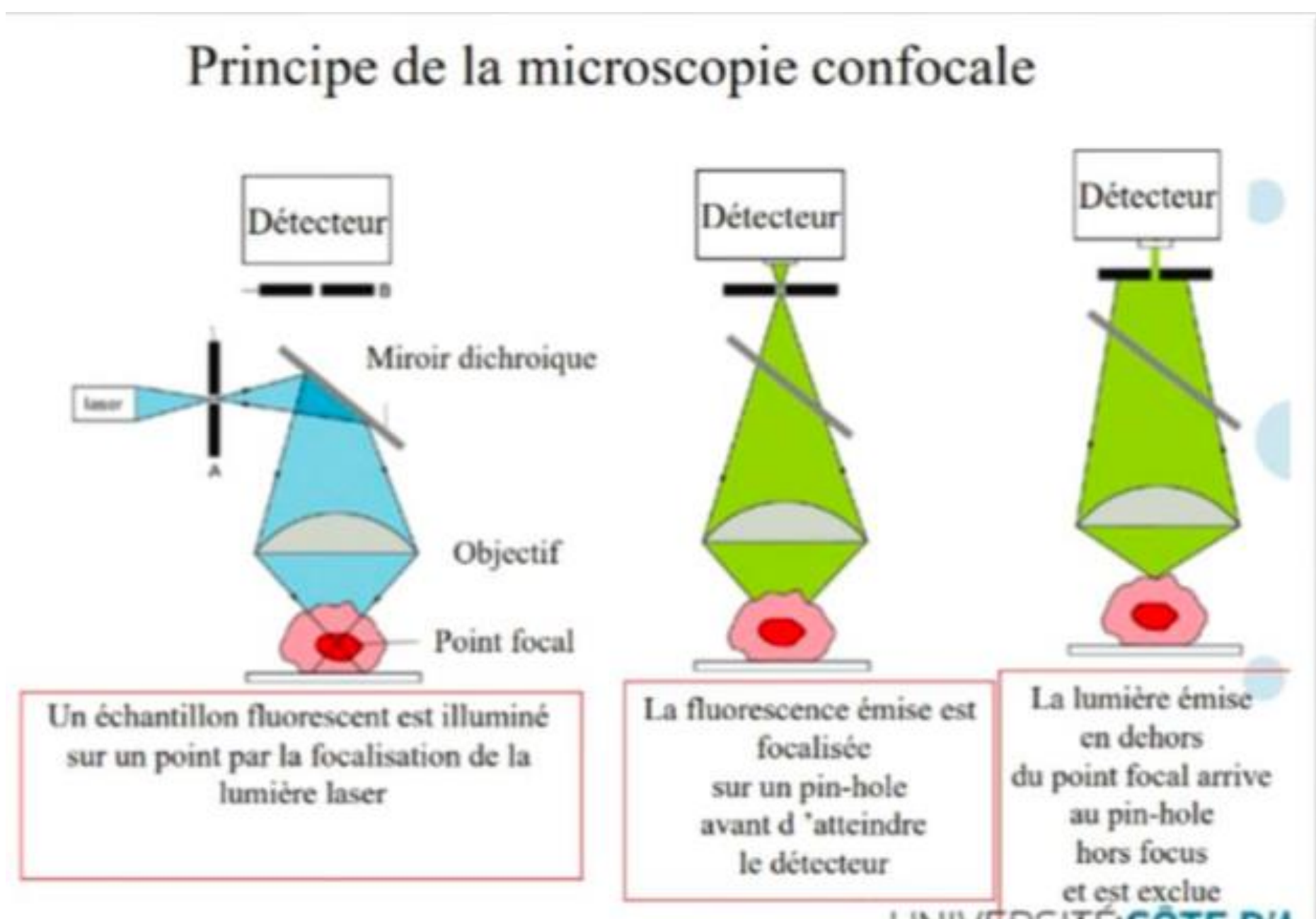
Ici la résolution augmente (elle est **AMÉLIORÉE**) donc la LIMITE de résolution (càd la capacité à distinguer 2 points distants) diminue

- Peut générer des images en trois dimensions des cellules
- Permet d'examiner des échantillons épais (œuf, embryons, tissus) puisque l'on peut déplacer le plan confocal

Principe :

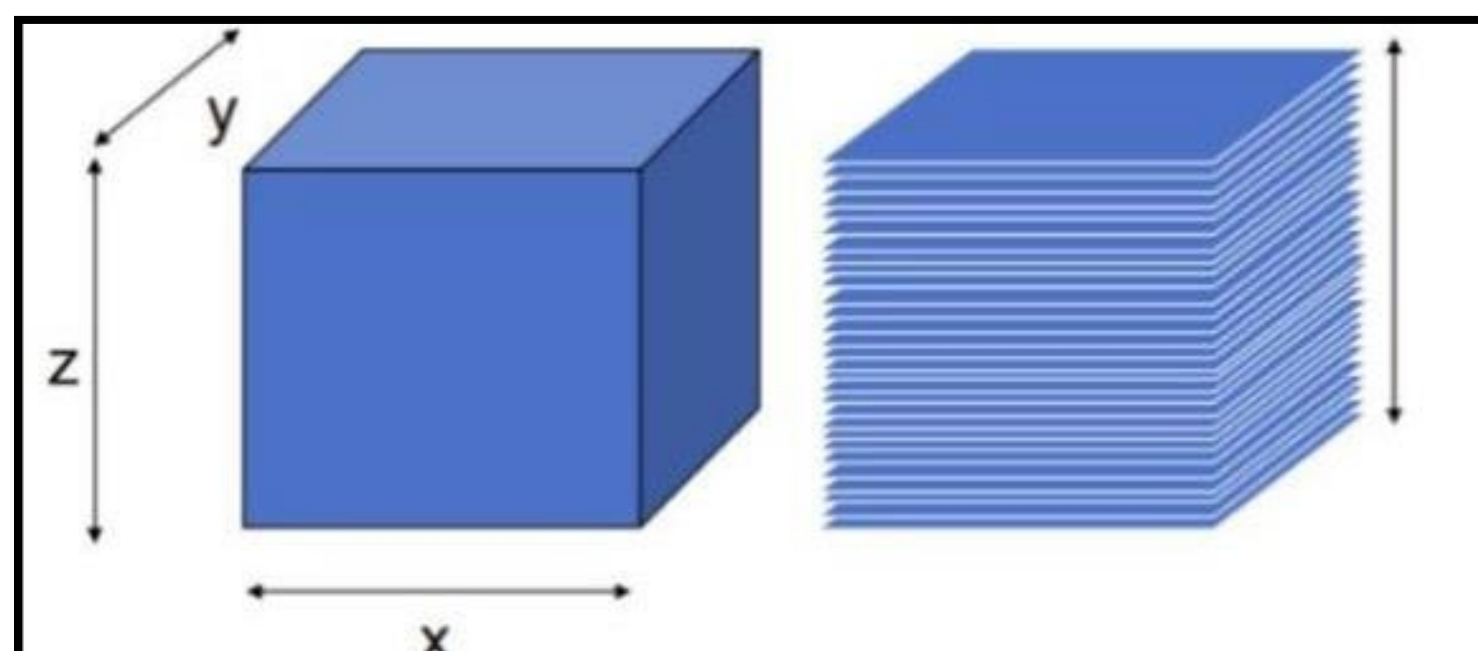
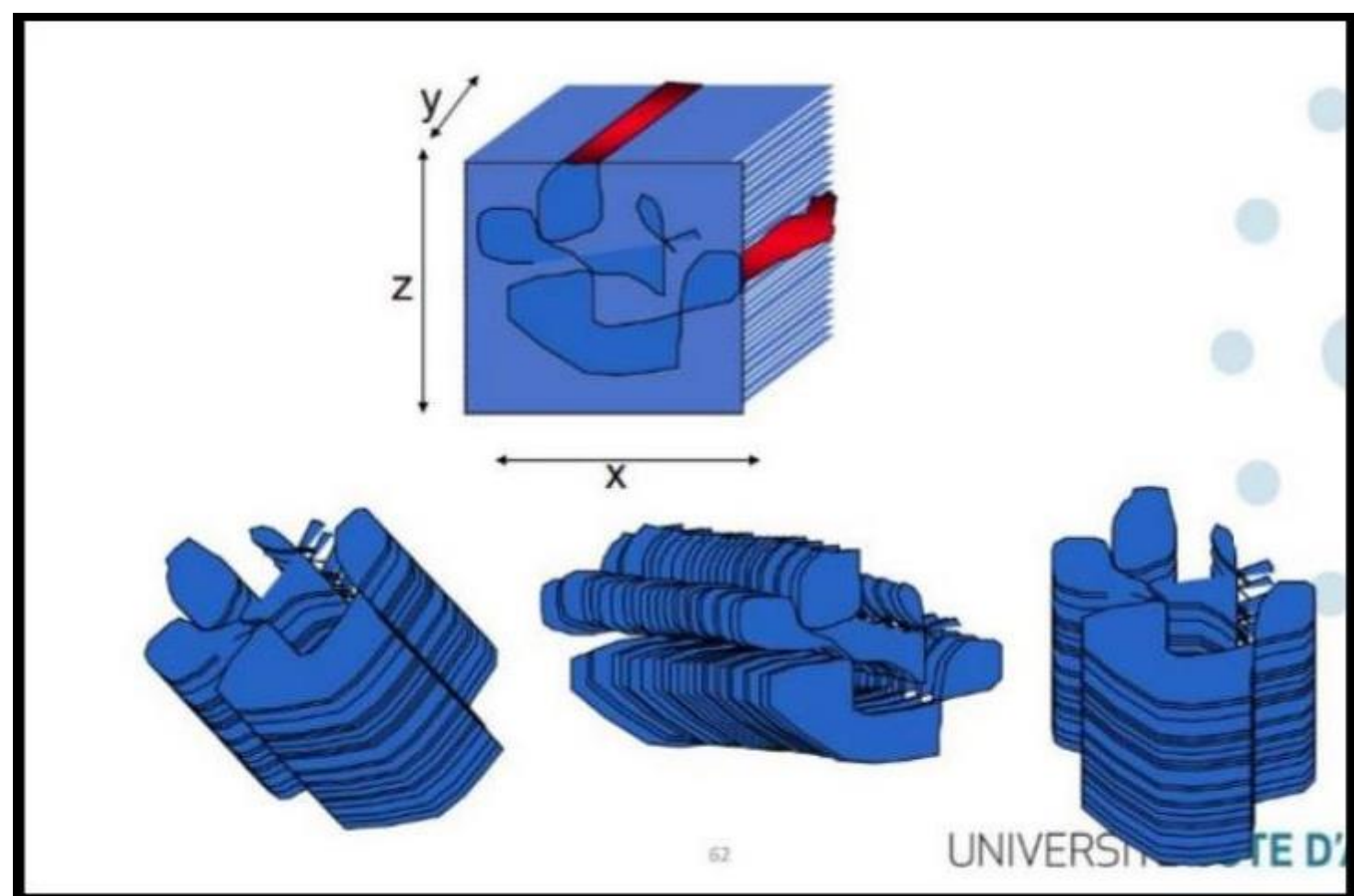
Un laser émet une lumière **monochromatique**. Le faisceau est ensuite **réfléchi** par le miroir dichroïque et va illuminer l'échantillon analysé.

- - Un dispositif de balayage permet de déplacer le faisceau sur la totalité de l'échantillon (déplacement horizontal pour pouvoir observer toute la surface de l'échantillon).



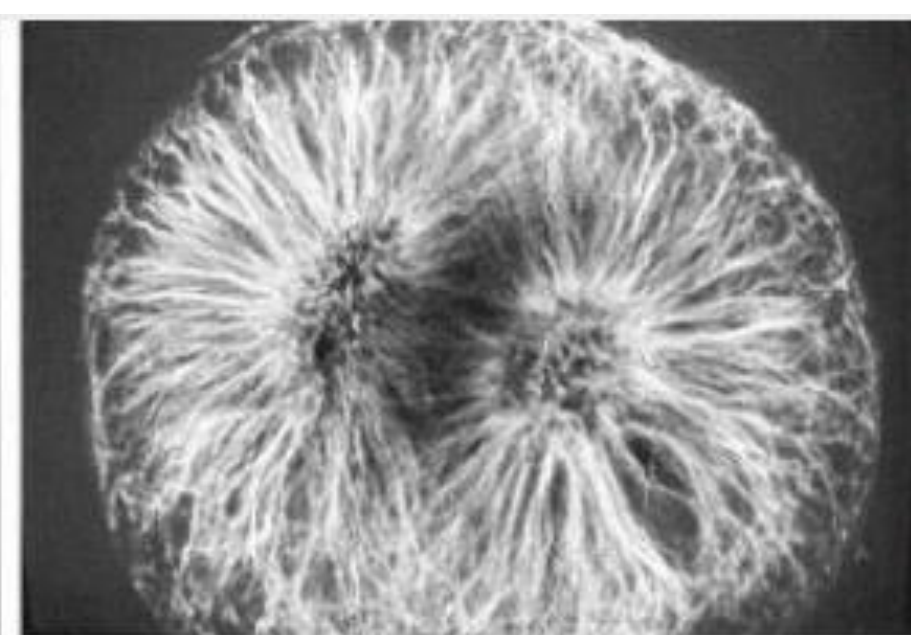
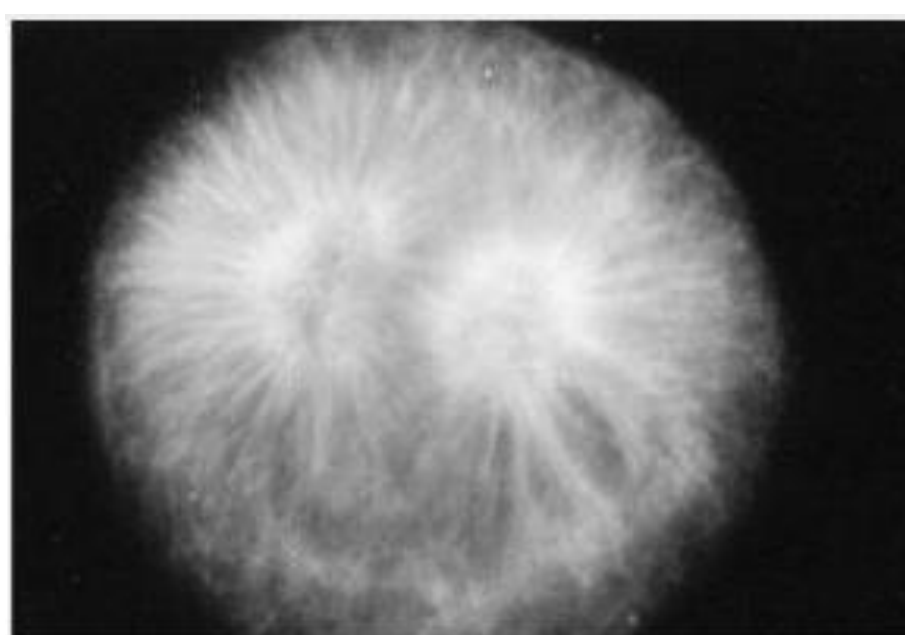
- Un moteur de haute précision déplace la platine (C'est la partie plane du microscope percée sur lequel on place la préparation) par rapport à l'objectif pour obtenir une succession de coupes (de plans focaux) dans la profondeur de l'échantillon.
- Les fluorochromes présents dans l'objet biologique éclairé par les faisceaux lumineux vont donc réémettre des photons de longueur d'onde supérieure et traverser le miroir dichroïque.
- Un dispositif de diaphragme appelé le pinhole ne laisse passer que les photons provenant spécifiquement du plan focal analysé. Il va ensuite les envoyer sur un photomultiplicateur qui va permettre de visualiser l'image sur un ordinateur.

Les images obtenues sont donc des images numériques. On peut faire défiler sur l'ordinateur tous les plans confocaux que l'on a analysés.



• Exemples :

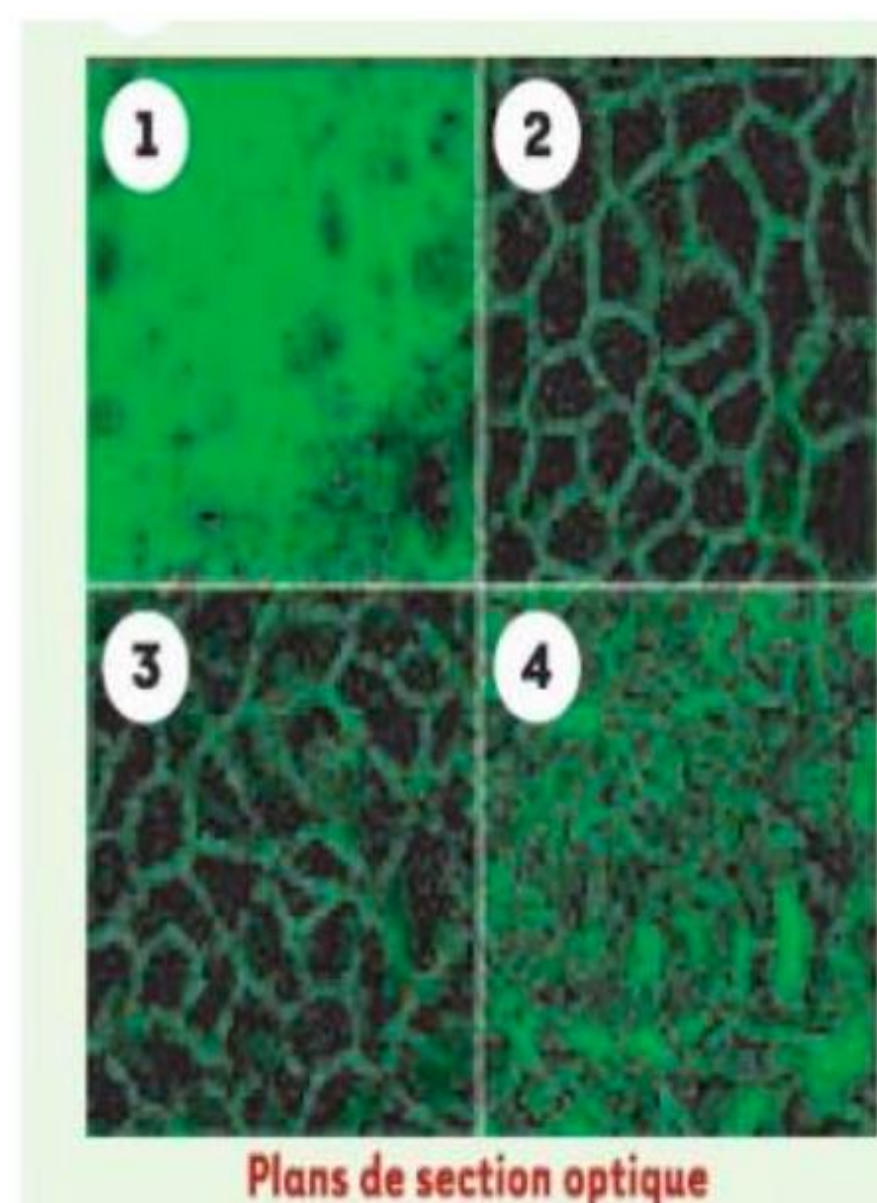
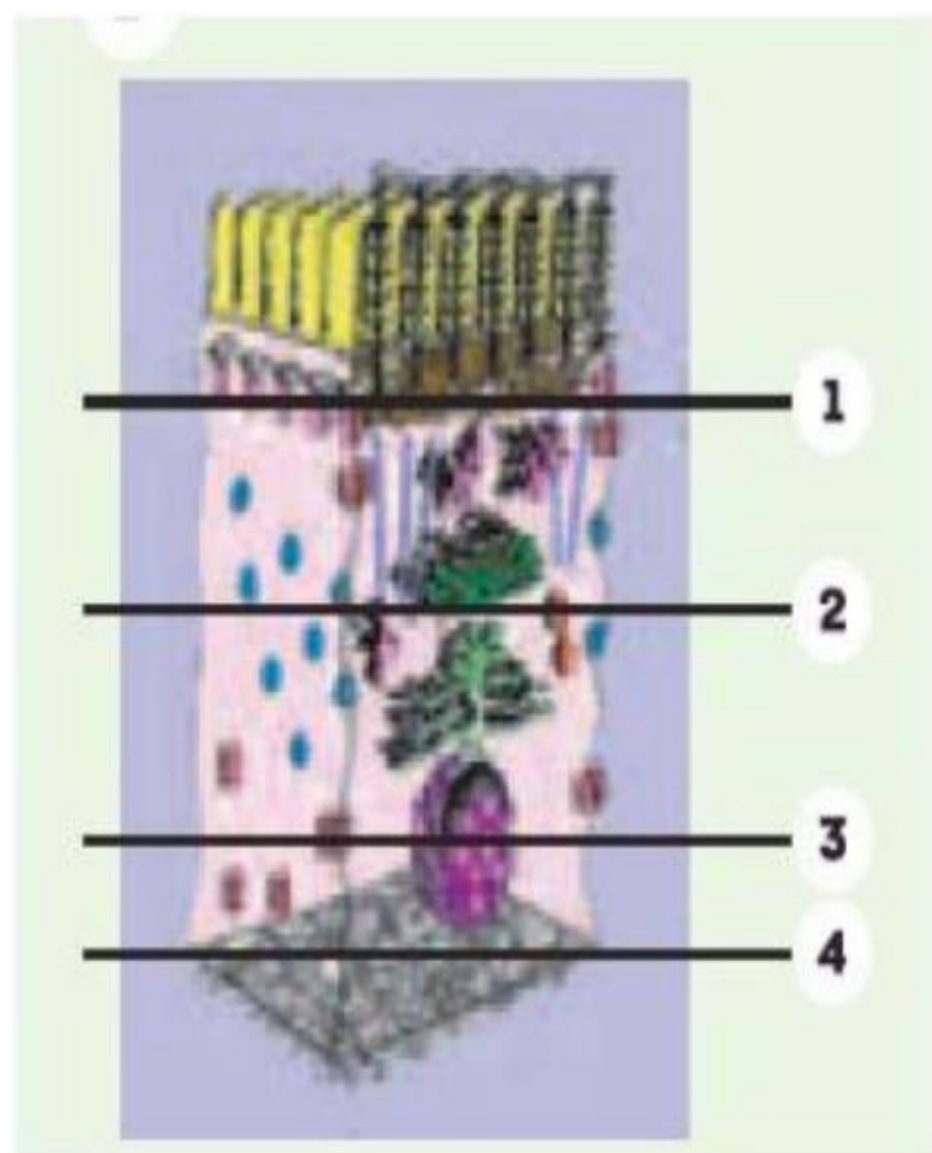
Un œuf d'oursin fertilisé est lysé avec un détergent, incubé avec des anticorps anti-tubuline et révélé par des anti-anticorps fluorescents. Ici on peut bien voir le gain en résolution pour un même objet que l'on a entre un microscope standard à fluorescence et un microscope confocal.



Microscopie standard à fluorescence

Microscopie confocale

On observe ici une cellule d'épithélium. Les numéros 1, 2, 3, 4 correspondent aux plans confocaux. Encore une fois, on voit bien que l'on peut vraiment reconstituer la structure tridimensionnelle d'une cellule, voire d'une cellule dans un tissu et donc du tissu en lui-même.



Plans de section optique

La reconstruction des images en 3D, la chose est très simple. Il faut imaginer qu'un objet peut toujours être décomposé en différentes sections avec une certaine épaisseur. Chaque section va correspondre à une image (sur le schéma de droite, les images correspondent au gris foncé). L'ordinateur peut superposer ces images et donc reconstruire à l'aide de logiciels spécialisés la structure tridimensionnelle de l'objet à partir d'une série d'images de plans confocaux.

# DEDI

# TIMEEEEE

Dédi à ce cours en 3 parties ( donc 3x plus de dédis !!!!)

Dédi à la Lidocaïne qu'on a synthétisé avec Milena en 2 j de dur labeur

Dédi à mes fillotsssssss

Dédi au café noisette de la fac (non jamais trop de dédis pour ca)

Dédi à journée de dimanche passée a faire cette fiche

Dédi à la pharmaaaaa (meilleur fillière)

Dédi à mes vieuxxxxxxxxxx

Pas dédi à canva qui m'a enlevé le joli fond cadrillé que j'ai mis 1h à choisir pour cette fiche

Dédi à ma petite Miaaaa 

Et bien sur DEDI A TOIIIIIIII petit biocellois  