



MICROSCOPIE OPTIQUE

*Rappel

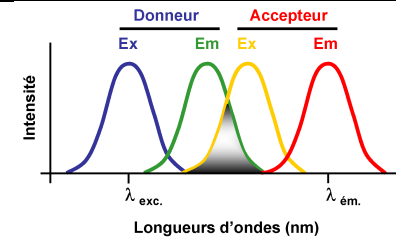
Limite de résolution = 200 nm (empêche de visualiser directement les constituants moléculaires de la cellule) - Visualisation grâce à des molécules fluorescentes = **fluorochrome**

- NRJ des photos d'émission < NRJ photos d'excitation
- **λ Emission > λ Excitation**

Elle permet la localisation de molécules spécifiques, les cellules peuvent selon le type de fluorochrome être fixées (mortes) ou vivantes

* **FRET = transfert d'NRJ NON RADIATIF = SANS EMISSION de lumière**

- > étudie **interaction** entre **2 molécules** très proches, **distance inférieure à 10 nm**
- > **spectre d'émission** du donneur **chevauche** le **spectre d'excitation/absorption** de l'accepteur



🍏 INTERMOLECULAIRE

Vérifier si 2 protéines se trouvent proches (**moins de 10 nm**) et interagissent

🍏 INTRAMOLECULAIRE

Étudier la conformation spatiale d'une molécule.
Ex : sonde calcique caméléon

FRAP & FLIP

Permettent d'étudier les vitesses de déplacement et la dynamique des molécules à l'intérieur de la cellule

Basées sur le **PHOTOBLANCHIMENT** = irradier les molécules fluorescentes de manière **IRREVERSIBLE** avec une lumière de très forte intensité. La molécule existe toujours et garde ses propriétés biologiques mais plus de fluorescence.

* **FRAP** (*tu frappes un coup et t'observe*)

On irradie une petite zone d'une cellule fluorescente de façon **TEMPORAIRE** et on observe la **REAPPARITION** de la fluorescence au **MÊME ENDROIT** que la zone irradiée. Si la zone est à nouveau fluorescente c'est que les autres molécules des autres zones ont diffusées pour coloniser la zone photoblanchie
⌘ La vitesse de recoloration dépend de la vitesse de diffusion des molécules.

* **FLIP**

Irradiation **CONTINUE**, le site d'observation est **DIFFÉRENT** du site d'irradiation. Les molécules se déplacent vers le site d'irradiation, la cellule perd peu à peu sa fluorescence.
On observe la **DIMINUTION** de la fluorescence à un autre endroit de la cellule, qui est fonction de la **vitesse de diffusion** de la molécule d'intérêt dans la cellule

* **FLUORESCENCE INDUITE**

= colorants **non intrinsèquement** fluorescents, qui deviennent fluo quand ils sont fixés à la molécule étudiée

★ Visualisation de la quantité de Calcium dans la cellule

Grace a la molécule Fura-2 qui possède des propriétés fluorescentes et fixe le calcium. **L'augmentation de l'intensité de la fluorescence est ici proportionnelle a la concentration en calcium**

MICROSCOPIE FLUORESCENCE

★ Visualisation des acides nucléiques

- fixation sur les paires de bases (A-T, G-C)
ex : HOECHST & DAPI se fixent sur A-T
- intercalant de la double hélice de ADN
ex : iodure de propidium & bromure d'éthidium

NB : - nucléole = PAS ADN = pas de coloration
 - hétérochromatine = coloration intense (ADN compacté) = gènes s'expriment peu
 - euchromatine = faible coloration (ADN ouvert) = expression ++ gènes

* IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (+++)

On introduit des AC fluorescents qui vont se fixer sur la protéine et permettent de l'observer. Les AC peuvent être directement fluorescents ou rendu fluorescents. Si les AC primaires ne sont pas directement fluorescents on utilise des anti-anticorps secondaires directement greffés à des fluorochromes qui reconnaissent tous les AC d'une espèce particulière, produit par une espèce DIFFERENTE de celle qui a produit les AC primaires.

Pour visualiser 2 protéines différentes

- AC primaires d'espèces DIFFÉRENTES (ex : chat & souris)
- AC secondaires différent de AC primaire
- Fluorochromes différents
- ATTENTION** : GFP & Fluorescéine IMPOSSIBLE (émettent dans le VERT)
- Limites
 - si la prot est transmembr → pas de ttt particulier
 - si prot est à l'intérieur → faut utiliser des détergents

* FISH

= visualisation spécifique de certains acides nucléiques par des sondes fluorescentes, ADN ET ARN !

1. On dénature ADN
2. La double hélice s'ouvre et on met la sonde fluorescente qui va s'hybrider par complémentarité

♥ MICROSCOPIE CONFOCALE

= outil d'exploration en 3D des cellules et des tissus

- Permet d'obtenir des sections optiques en éliminant les signaux hors champ par un diaphragme (=pinhole).
- Meilleure résolution
- Permet d'étudier des échantillons épais (ex : œuf, embryons, tissus)
- Résolution de l'ordre du micron

- Laser délivre une lumière monochromatique
- Fx est réfléchi par un miroir dichroïque
- Dispositif de balayage déplace le fx → plusieurs coupes

LES PHOTONS HORS CHAMPS NE TRAVERSENT PAS

🍏 MICROSCOPE A SUPER RESOLUTION (ou nanométrique)

On excite et éteint successivement les fluorochromes, on reconstitue les images

→ Pallie en partie au problème de diffraction de la lumière

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

- Résolution = 2 nm
- utilise le pouvoir séparateur des électrons qui ont des longueurs d'onde plus petites que le photon

* Conditions requises pour observer un échantillon

- Vide poussé
- Coupe ultrafine (< 0,1µm) par un ultramicrotome
- Echantillon fixé chimiquement.
- Echantillon séché
- Echantillon déshydraté (pb: eau = principal constituant cellulaire) **sauf en cryomicroscopie.**

M
E
T

🍏 **MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION (MET)**

Tétroxyde d'osmium	Fixe les lipides, empêche leur mobilité et permet de les observer
Marquage à l'or	Comme l'immunofluorescence indirecte en MO, l'or est l'équivalent du fluorochrome. Il augmente le contraste
Ombrage	<ul style="list-style-type: none"> Visualiser les surfaces Réplique en métal (=moule) en vaporisant des métaux lourds sur la surface
Cryofracture	<ul style="list-style-type: none"> On congèle la préparation dans de l'azote liquide à -150 °. On fracture les blocs sous vide grâce à une lame selon un plan de fracture = zone de moindre résistance qui passe ENTRE LES DEUX FEUILLETS LIPIDIQUES D'UNE MEMBRANE. On vaporise ensuite une fine couche de platine ou de carbone afin d'observer une réplique ou moule de la surface fracturée ou décapée.

- Sépare 2 points distants de moins de 0,2nm
- Le fx d'électrons traverse la préparation
- **LA STRUCTURE EST D'AUTANT PLUS FONCÉE QU'ELLE EST DENSE AUXELECTRONS**

🍏 **ME À BALAYAGE**

- Les électrons ne **TRAVERSENT PAS LA PREPARATION**,
- la surface va être balayée par un faisceau d'électrons qui vont exciter la surface de l'objet, il va y avoir émission **d'électrons secondaires** par la surface.
- La résolution est **plus faible**, de l'ordre de 10 nm
- Permet d'observer des **images en 3D et des échantillons épais.**
- Peut utiliser des métaux lourds pour augmenter le rendement

F
O
R
C
E

A
T
O
M
I
Q
U
E

MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE

- Résolution = 2nm
- **Pointe la plus fine possible** qui va venir interagir avec les surfaces des molécules. Il y a une interaction lorsque 2 objets sont **très proches** mais ne se touchent pas, cette interaction va faire bouger la pointe. Il va y avoir changement de direction de la pointe, on appelle ça une **déflexion**.
- Cette pointe est reliée à un bras de levier qui va faire bouger la pointe selon les reliefs de l'échantillon.
- La pointe et l'échantillon seront toujours à la même distance.
- On envoie un faisceau laser sur le bras de levier. Le faisceau va être réfléchi et on va le récupérer et l'analyser grâce à une photodiode et un ordinateur. En fonction des mouvements du bras de levier, le faisceau va être réfléchi à des endroits différents.
- **Plus la pointe est fine meilleure sera la résolution.** On relève la **TOPOGRAPHIE** de l'échantillon.

➤ **Avantages :**

- **AIR LIBRE**, avec **cellule vivante**.
- La résolution n'est limitée QUE par la taille de la pointe.
- Mesure des **volumes en 3D**
- Non destructif pour les cellules, peut travailler en phase liquide, on n'a pas besoin de coloration.
- **Moins cher** que la ME.