



Université  
de Lille



# Stratégies d'analyses des cellules

Olivier PLUQUET

Master 1 MISO

2 février 2022

# Objectifs du cours

---

A l'issu du cours vous devriez être en mesure :

- D'expliquer des méthodes classiques de biologie moléculaire et cellulaire permettant d'explorer la cellule

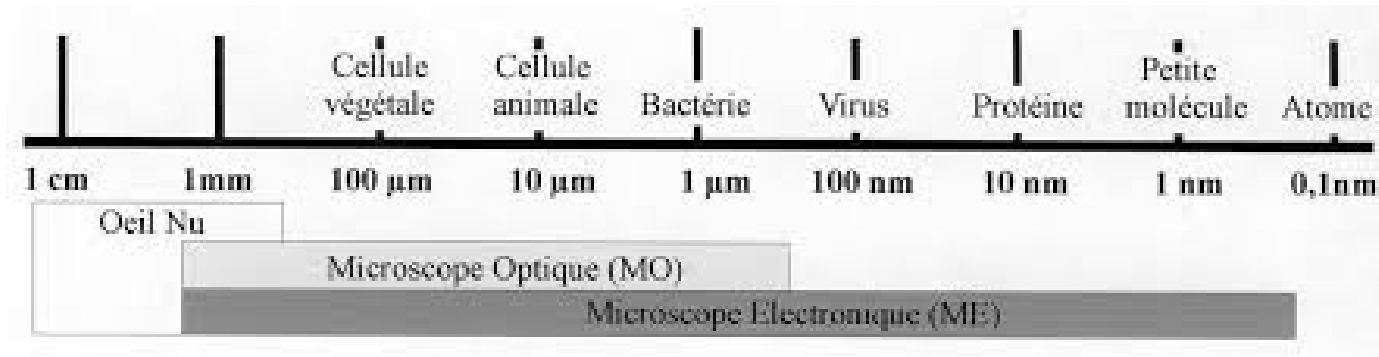
# Plan du cours

---

- 1) La microscopie
- 2) L'exploration cellulaire par les protéines fluorescents
- 3) Le Western Blot
- 4) La PCR quantitative

# Conditions pour observer une image

---



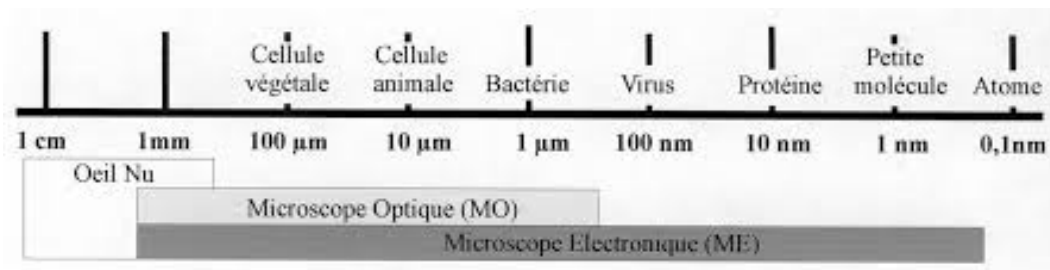
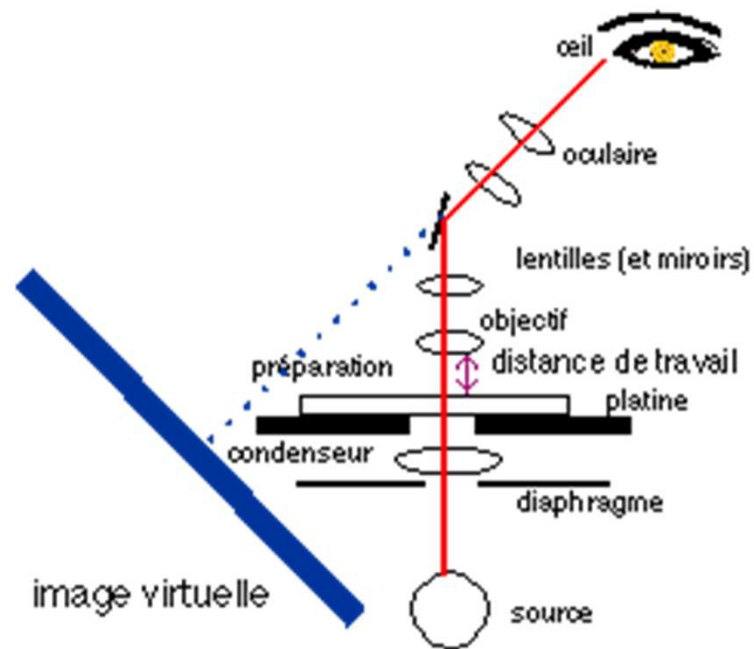
L'oeil est capable de distinguer 2 objets séparés par **0,2 mm** et le microscope optique des objets séparés par **~200 nm**.

## Une image de bonne qualité:

- \*Nette
  - \*Lumineuse
  - \*Peu de bruit de fond
  - \*Bien contrastée
  - \*Résolution adéquate
- \*Qualité d'image => 1er facteur : qualité de l'échantillon et sa préparation

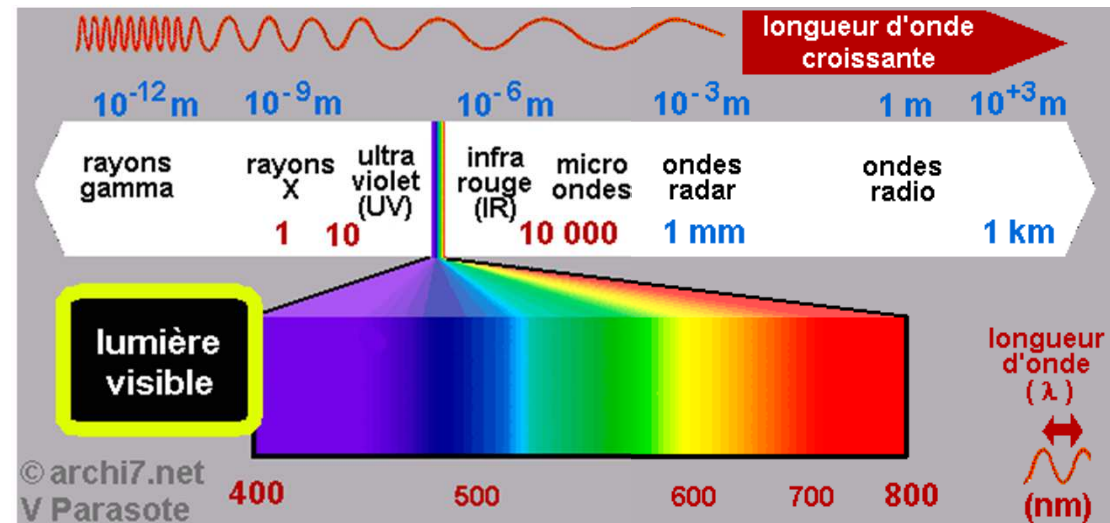
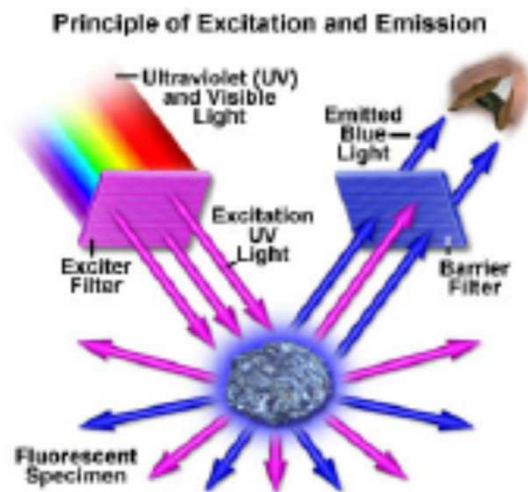
# Techniques d'étude des cellules: microscopie

## *Microscopie optique*

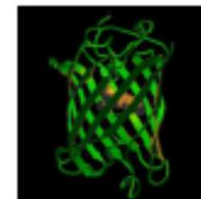
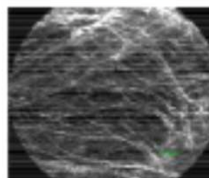


# Techniques d'étude des cellules: microscopie

## Microscopie optique à fluorescence



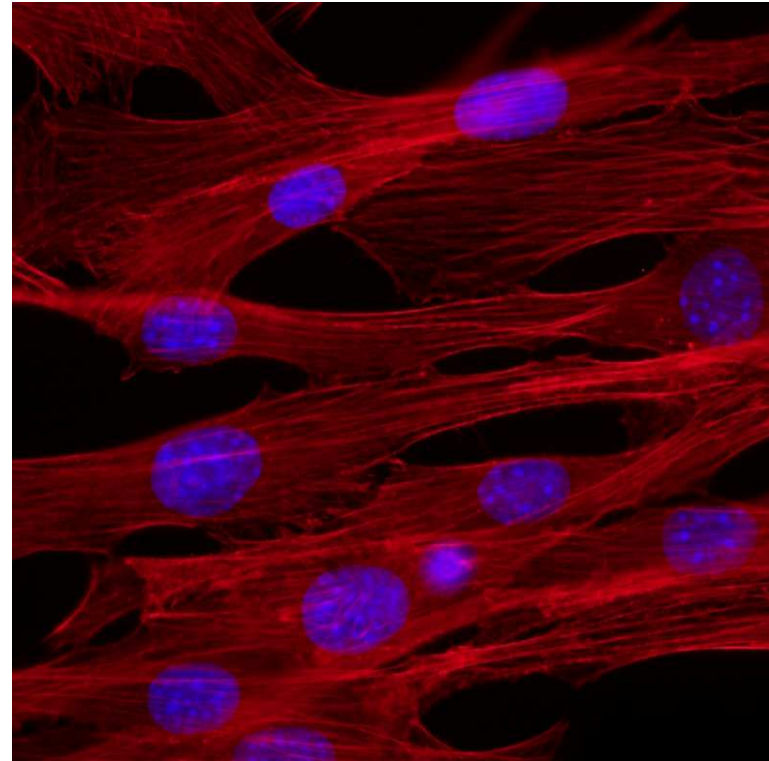
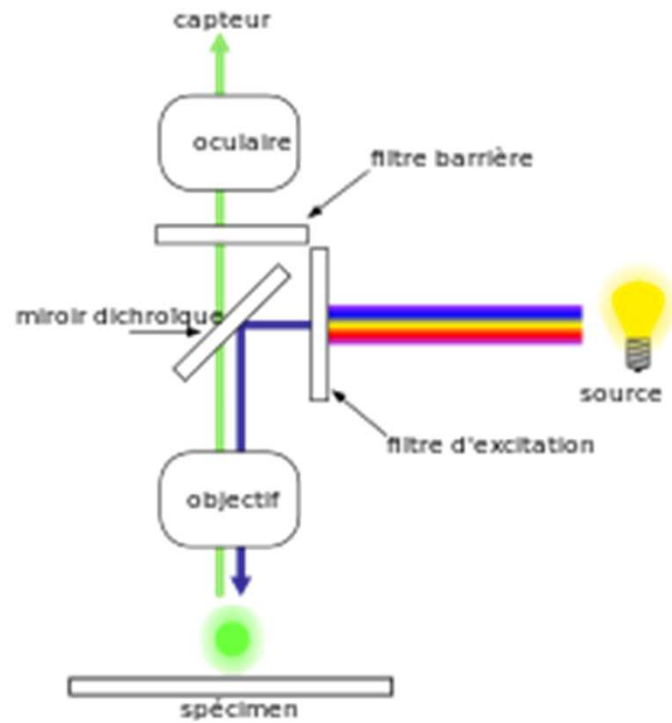
- **Fluorophores exogènes** intercalables, greffables (spécifique)...
- **Protéines chimériques** (GFP...);
- **Billes fluorescentes** (plus lumineux mais plus gros);
- **Fluorophores endogènes** (moins lumineux);



# Techniques d'étude des cellules: microscopie

---

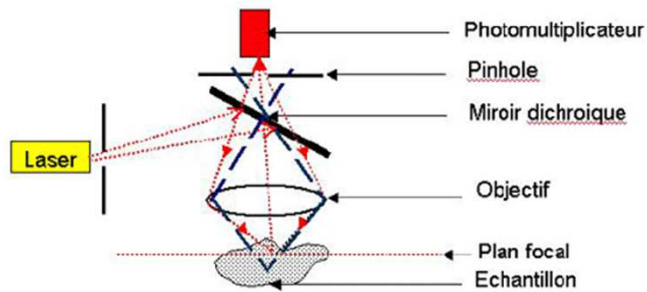
## *Microscopie optique à fluorescence*





# Techniques d'étude des cellules: microscopie

## Microscopie confocale

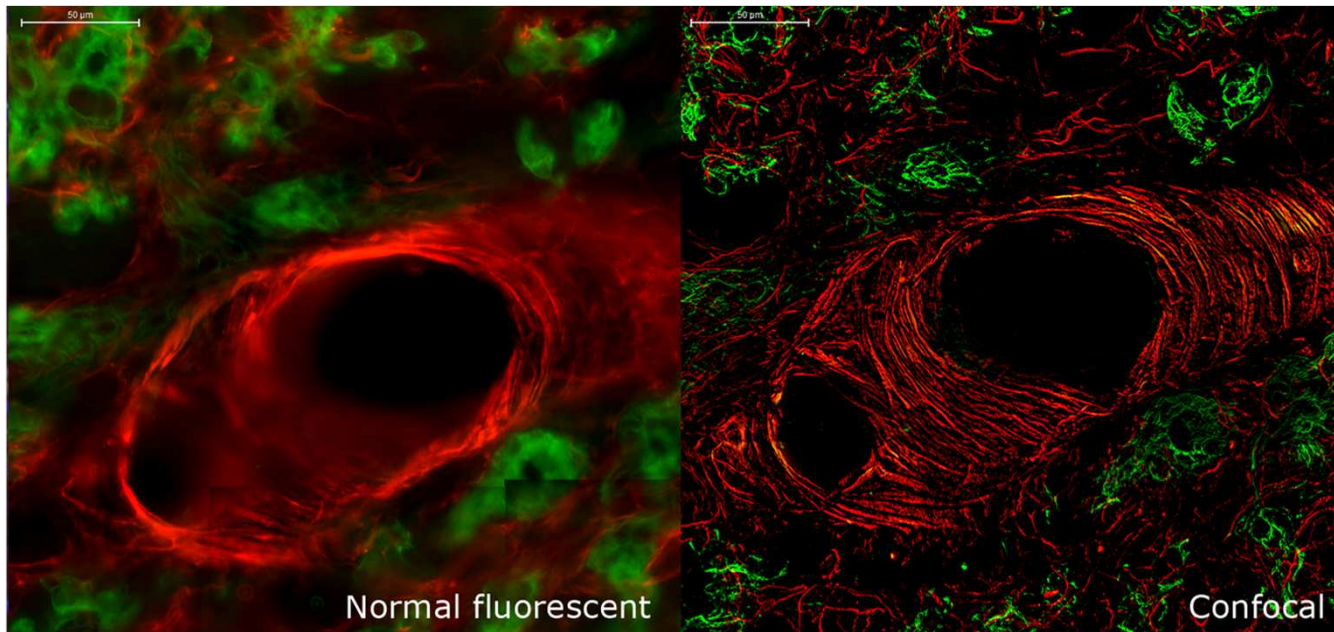


Principe du microscope confocal

### ➤ Section optique

Un diaphragme minuscule (pinhole), situé dans un plan conjugué, bloque les raies lumineuses provenant des niveaux supérieurs et inférieurs.

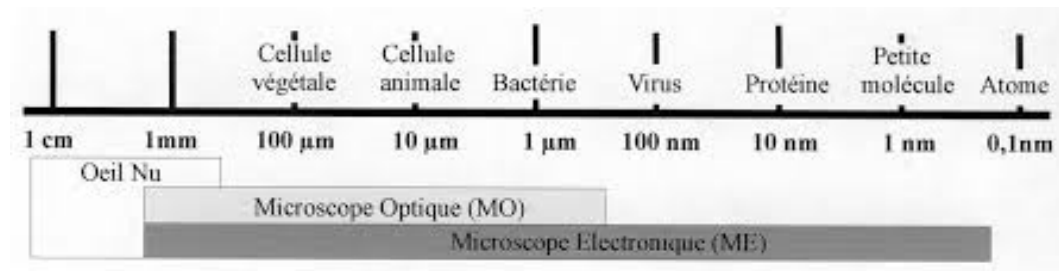
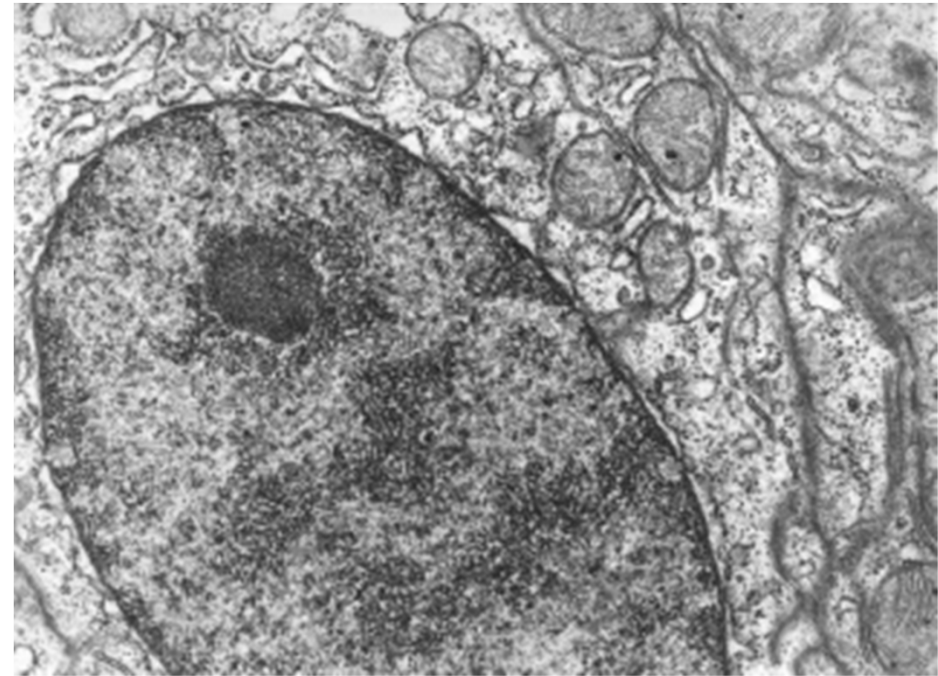
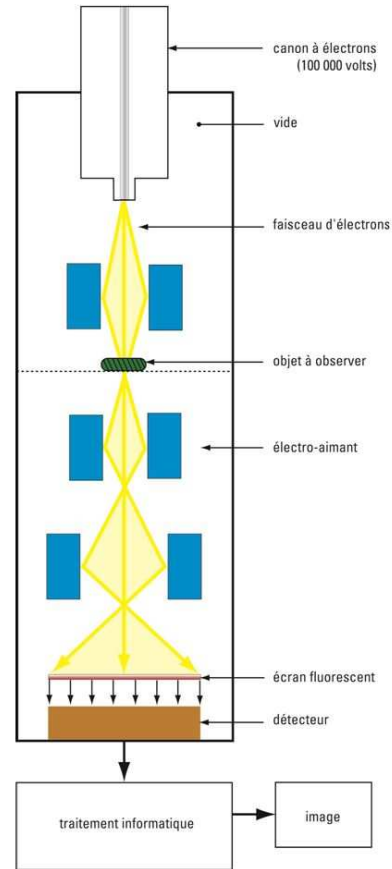
### ➤ Amélioration de la résolution





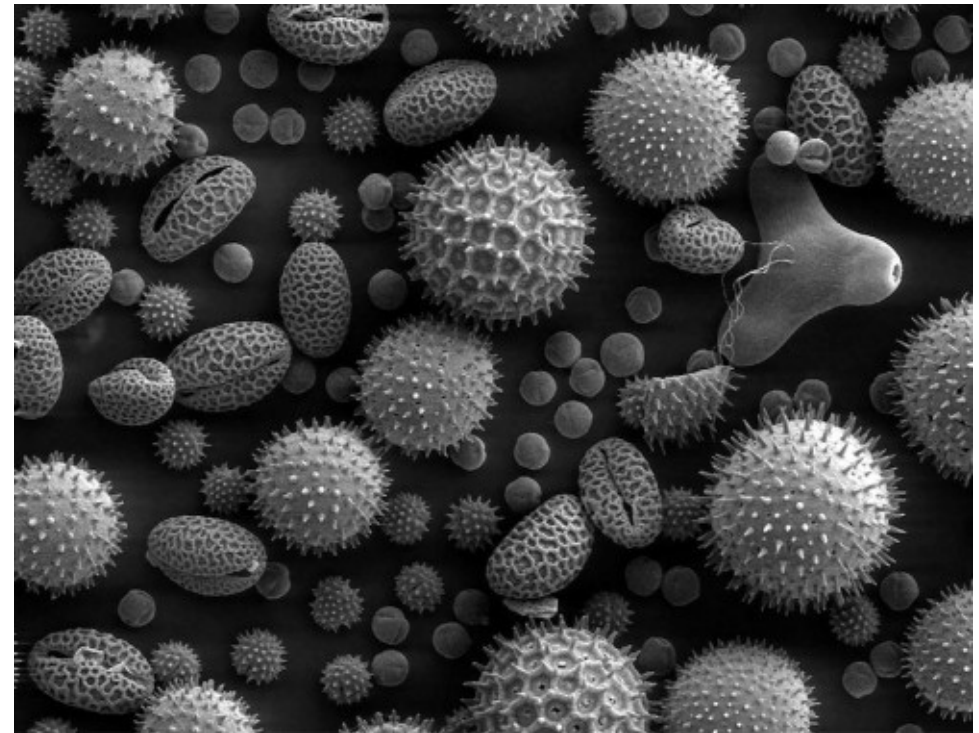
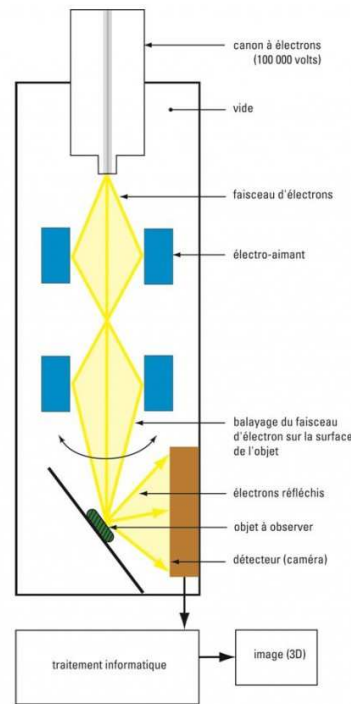
# Techniques d'étude des cellules: microscopie

## *Microscopie électronique à transmission*



# Techniques d'étude des cellules: microscopie

## *Microscopie électronique à balayage*



Grains de pollen

Pour obtenir des images de la surface d'un échantillon.  
Cette technique est caractérisée par un effet de relief de l'image.

# Techniques d'étude des cellules: microscopie

---

## *Vidéomicroscopie*



<https://www.youtube.com/watch?v=cT5gfFpgdRI>



# Techniques d'étude des cellules: microscopie

## *Intravital*

### **a Animal model**

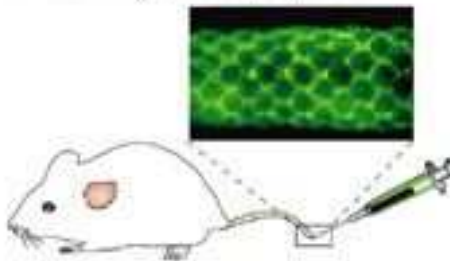
Chronic-transparent window preparation



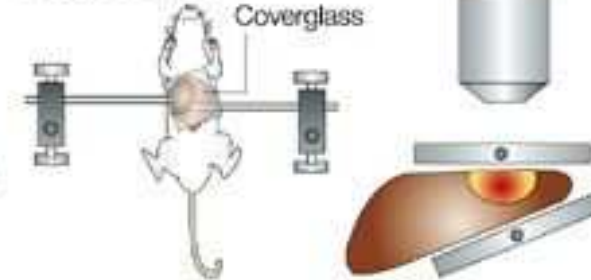
Tumour



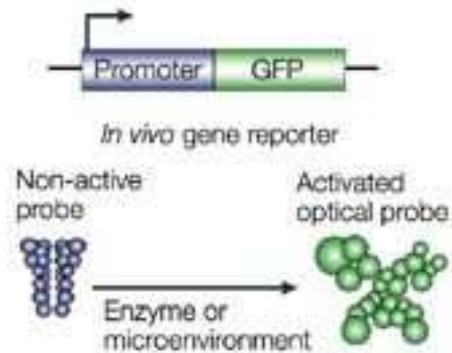
*In situ* tail lymphatic preparation



Acute liver model



### **b Molecular probe**



### **c Microscope**



### **d Image workstation**



Nature Reviews | Cancer

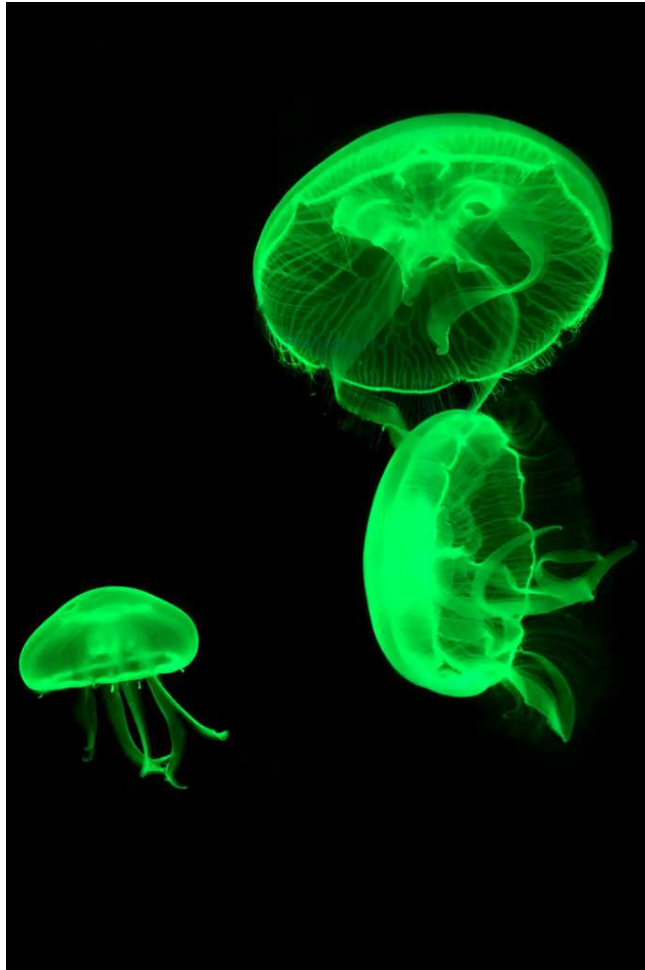
# Plan du cours

---

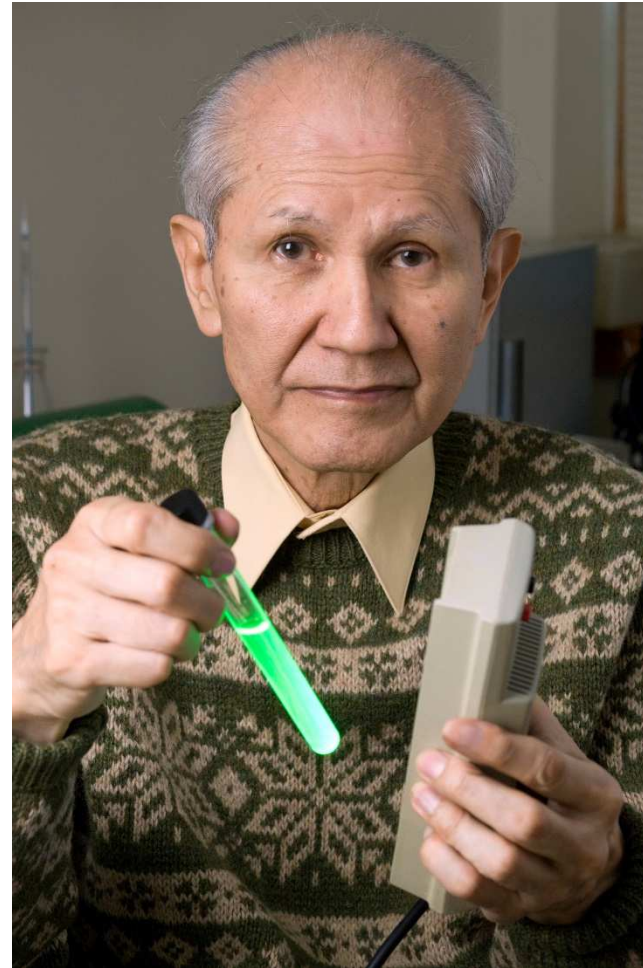
- 1) La microscopie
- 2) L'exploration cellulaire par les protéines fluorescents
- 3) Le Western Blot
- 4) La PCR quantitative

# Exploration cellulaire par les protéines fluorescentes

---



*Aequorea victoria*

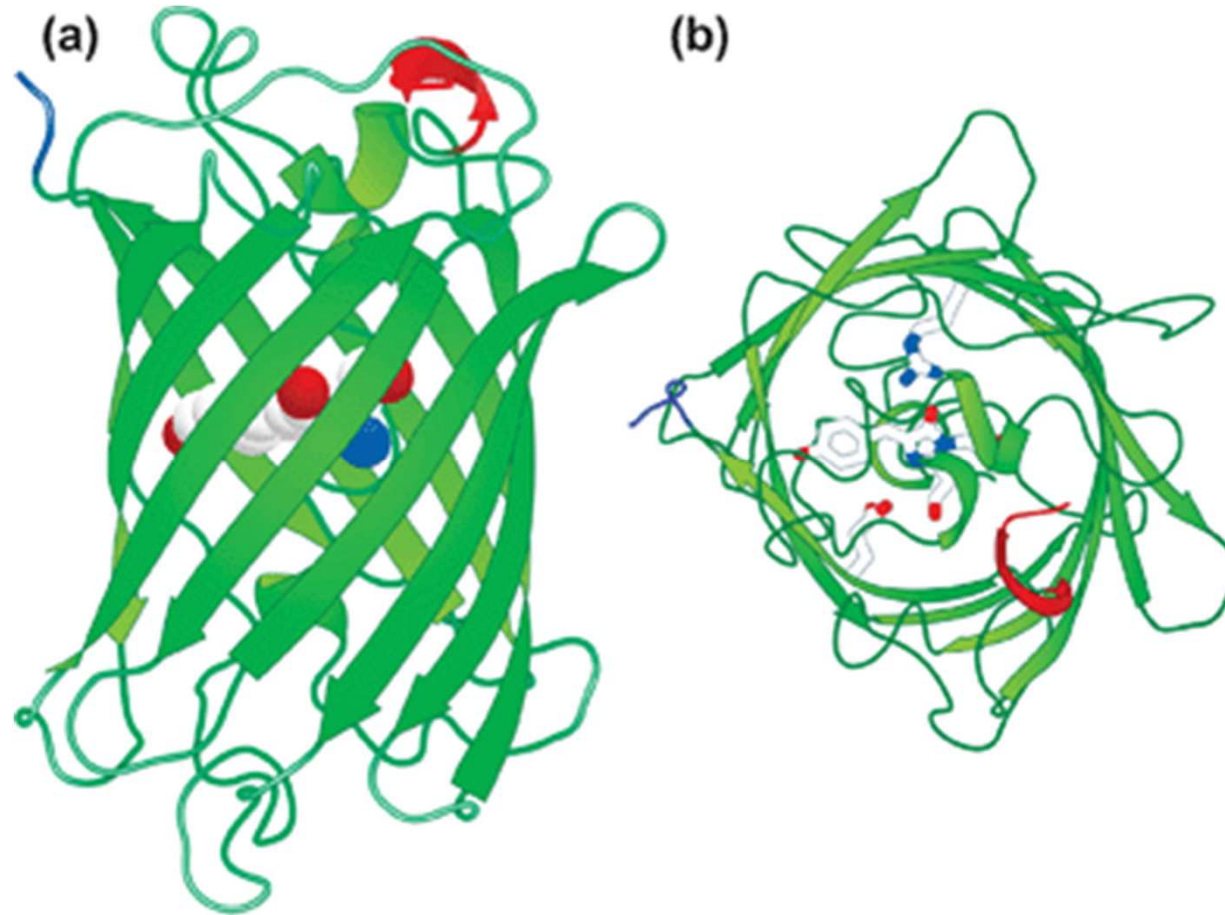


Osamu Shimomura

Le prix Nobel de Chimie 2008: Osamu Shimomura, Roger Tsien et Martin Chalfie, pour leur travaux sur la GFP,

# La Green Fluorescent Protein

---

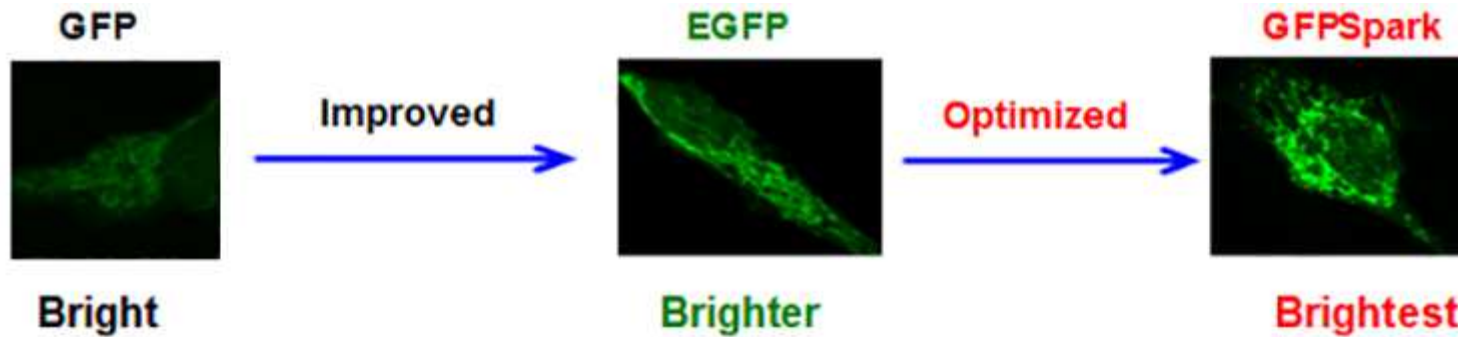


- Structure en tonneau: confère grande photostabilité
- Importance des Cys de l'hélice alpha dans la fluorescence
- GFP résistante à la dénaturation, fluorophore protégé dans le cylindre
- GFP est flexible et peut être fusionné à d'autres protéines en C- ou N- terminal

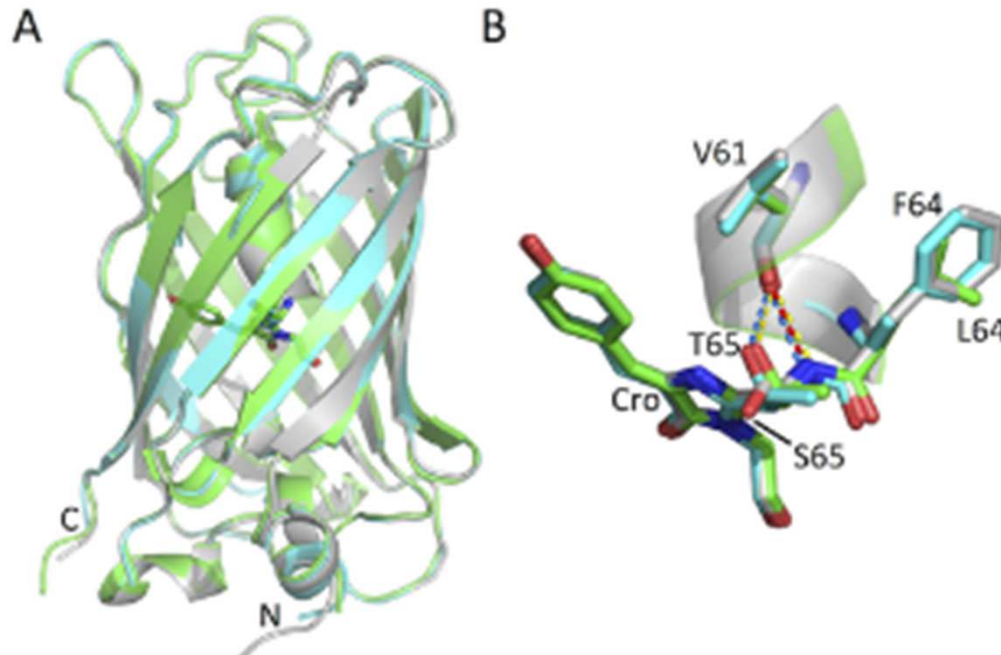


# La Green Fluorescent Protein et ses dérivées

---



recommended for cell and organelle labeling



eGFP= substitution de la serine65 du chromophore par une thréonine, conséquence: changement spectre emission/excitation

# La Green Fluorescent Protein et ses dérivées

Mutagenèse sur chromophore:

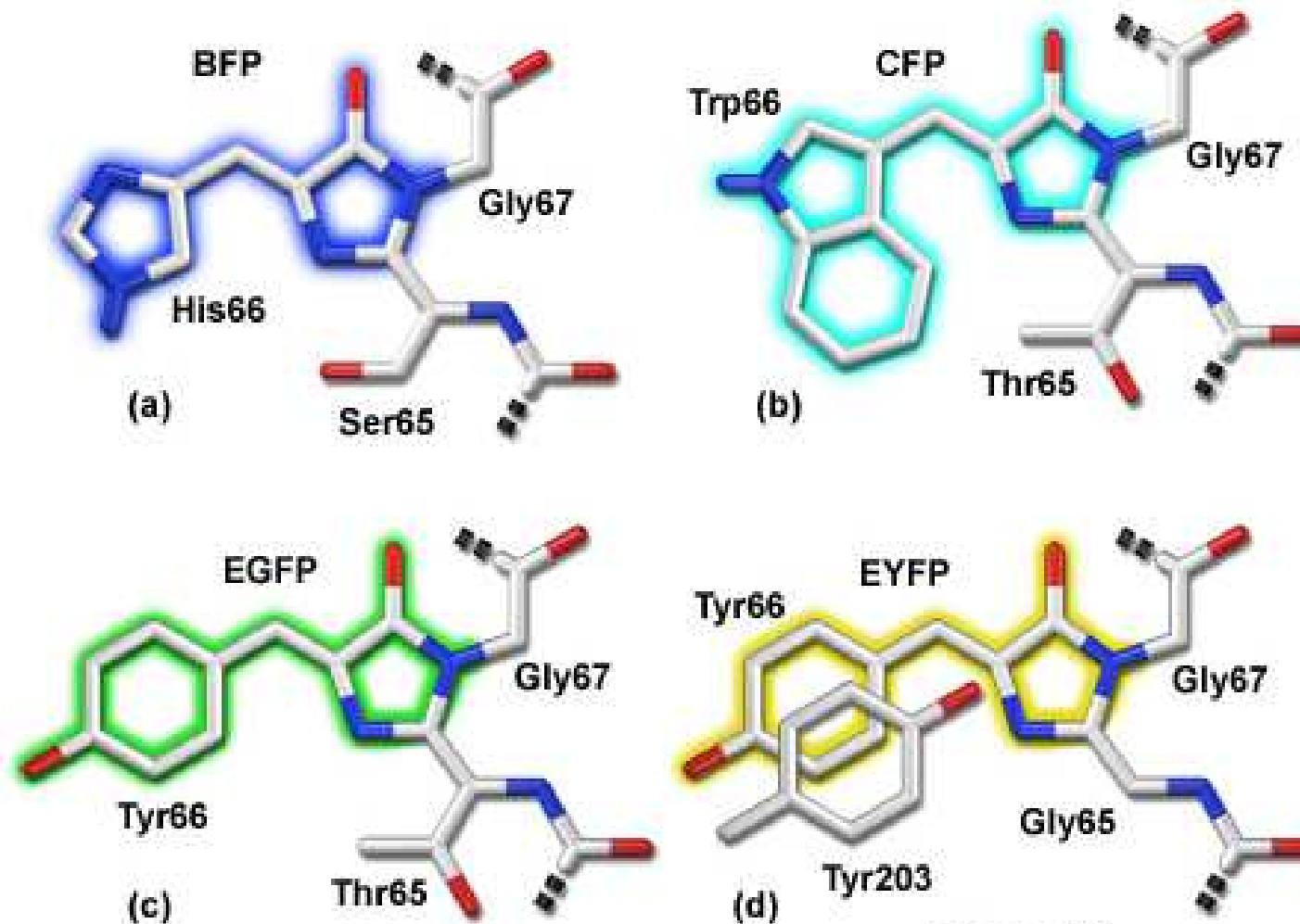
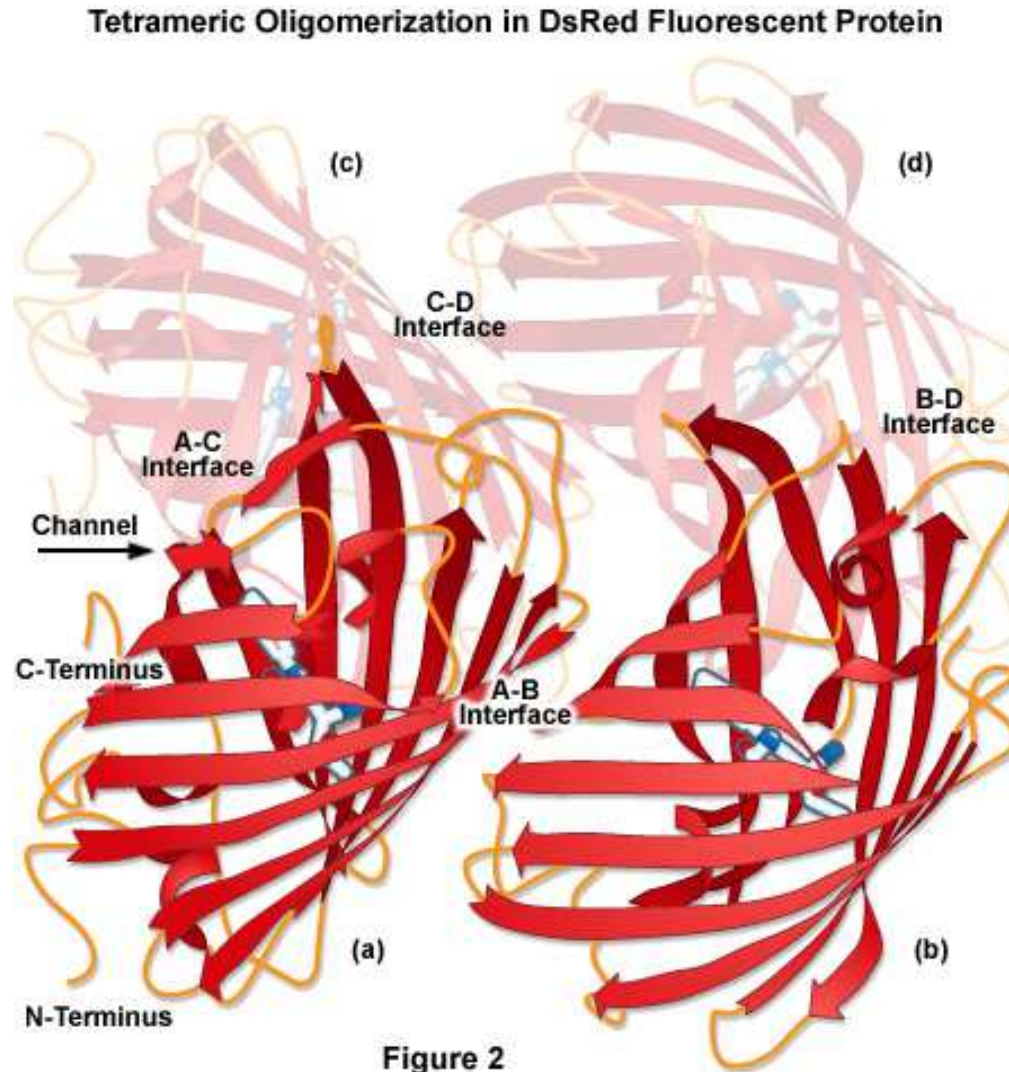


Figure 3

# protéines fluorescentes (FP) à partir d'autres organismes marins appartenant aux Anthozoaires (coraux, hydres)

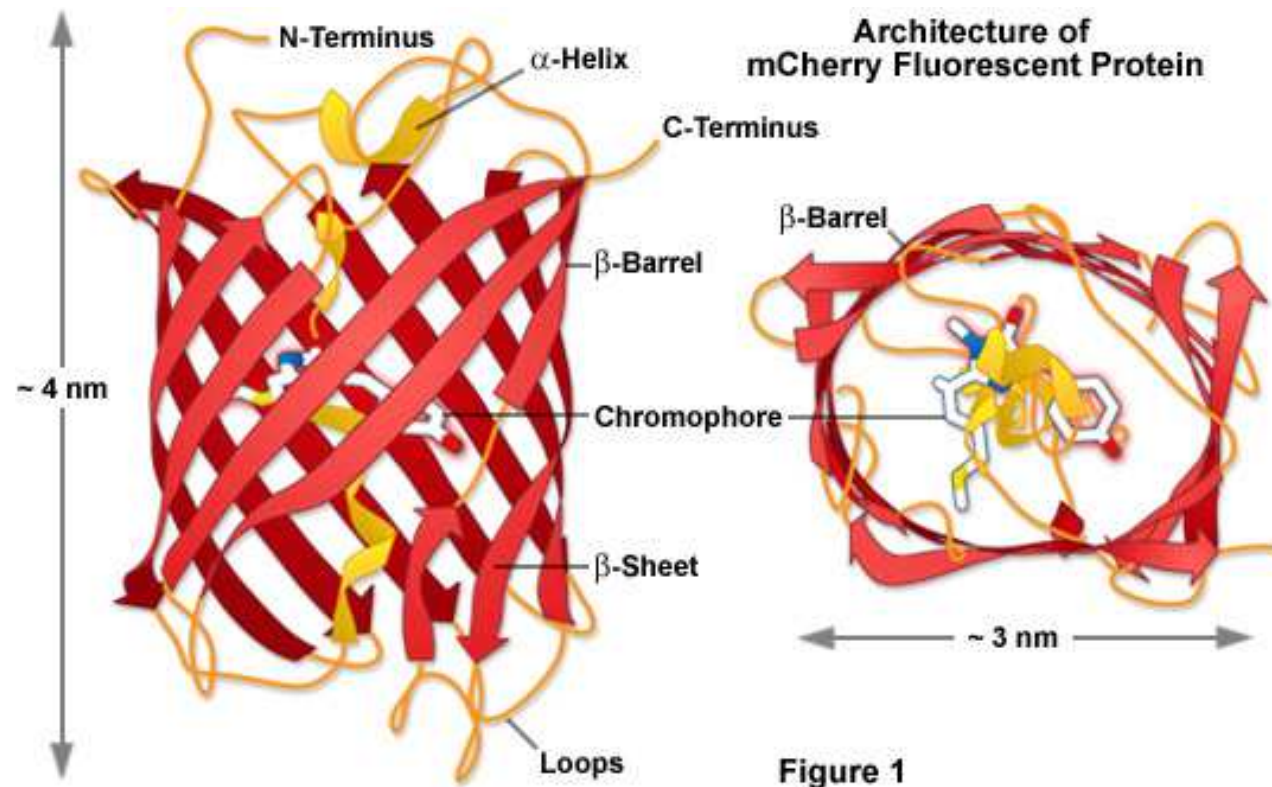
---



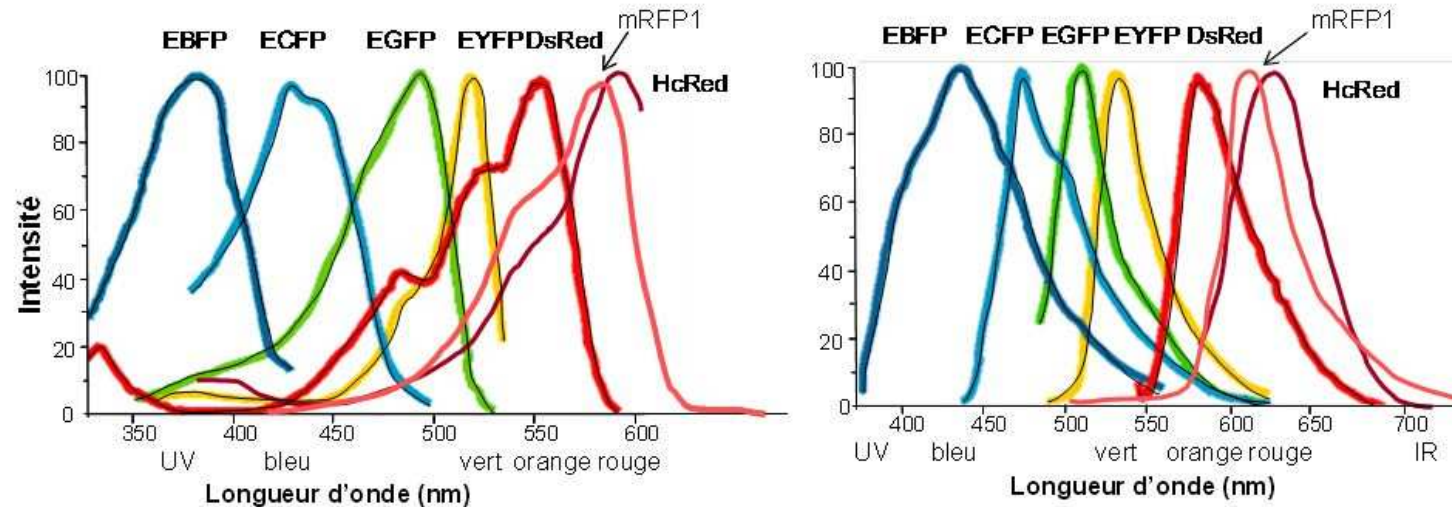
# La mCherry: dérivée du DsRed

---

extensive mutagenesis



# Spectre GFP et variants



	Ex (nm)	Em (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	$\Phi_F$	brillance ( $\epsilon \cdot \Phi_F$ ; UA)
wtGFP neutre	395	508	25-30 000	0,79	21 800
wtGFP phénolate	475	503	9,5-14 000		~9 400
EBFP	380	440	31 000	0,18	5 600
ECFP	434	477	28 000	0,40	10 000
EGFP	488	509	55 000	0,60	33 000
EYFP	515	529	80 400	0,61	49 000
Venus YFP	510	530	92 000	0,57	52 000
DsRed ; DsRed2	558	583	57 000	0,79	45 000
mRFP1	584	607	44 000	0,25	11 000
HcRed1 ; HcRed-2A	588	618		faible	
fluorescéine	490	520	80 000	0,90	72 000

Absorption Rendement Q





Fluorescence Imaging of Anthozoa Fluorescent Protein Subcellular Localization Fusions

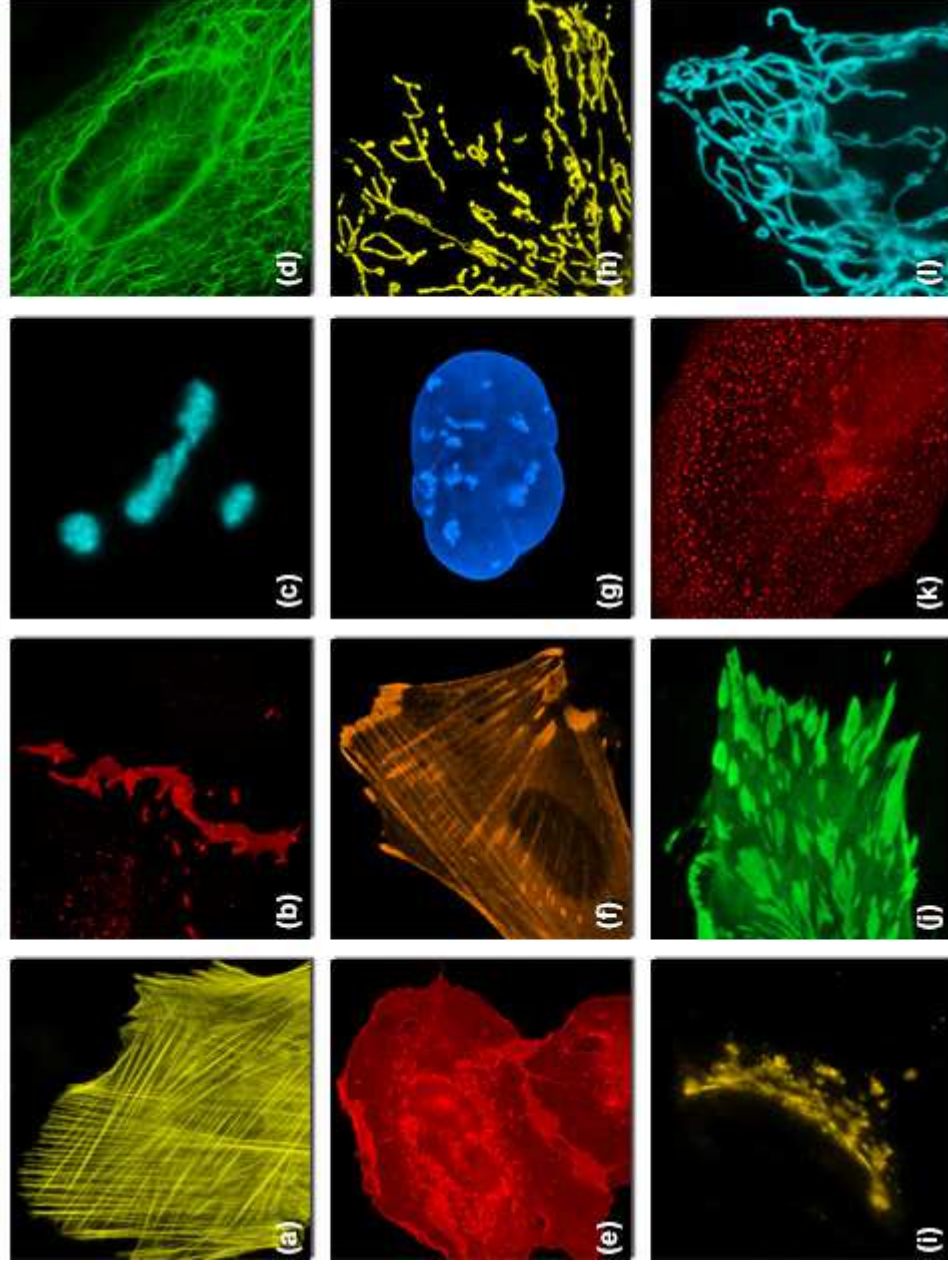


Figure 11

# The mFruit Series of Fluorescent Proteins

---

mHoneydew, mBanana, mOrange, mTangerine, mStrawberry, (and mCherry)

mHoneydew, mBanana, and mTangerine, suffer from low intrinsic brightness and poor photostability.

## Creating Pseudo-Monomeric Fluorescent Proteins with Tandem Dimers

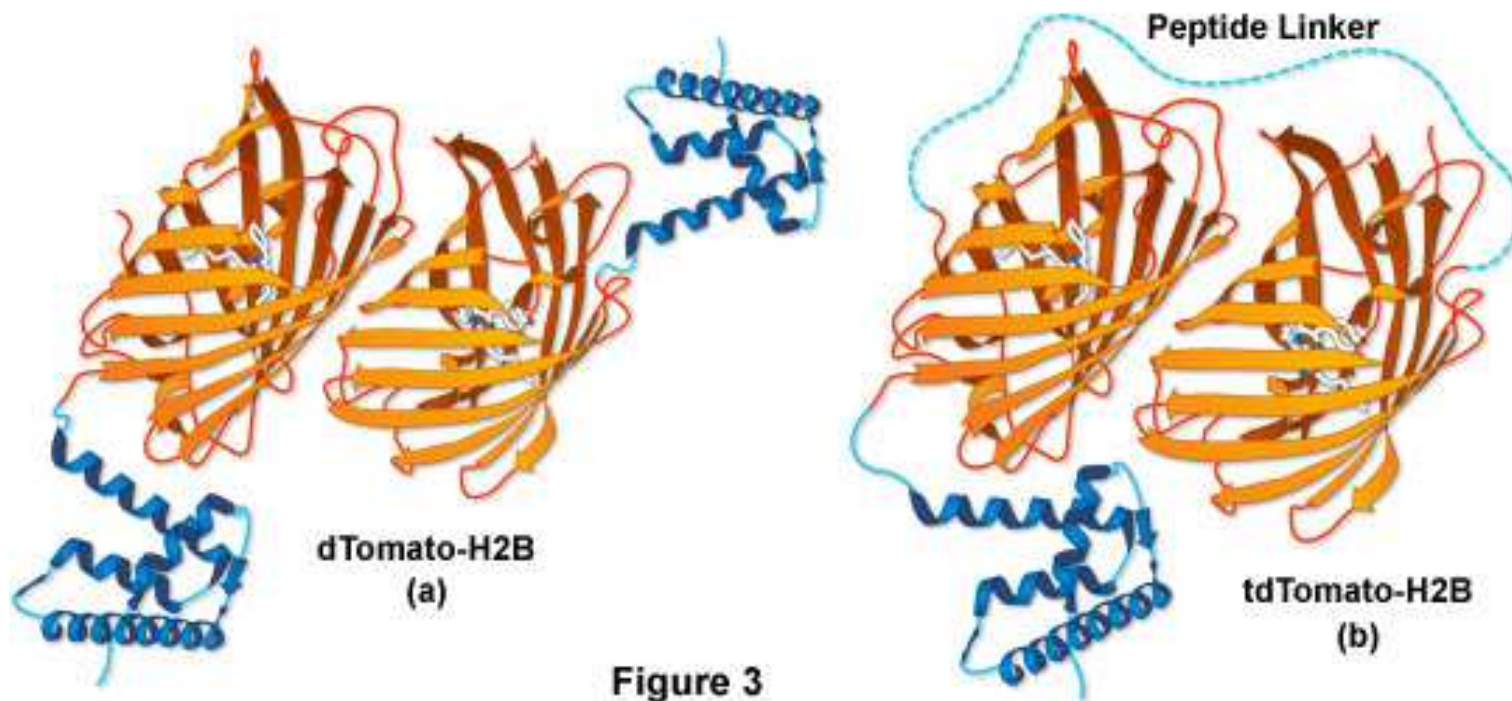
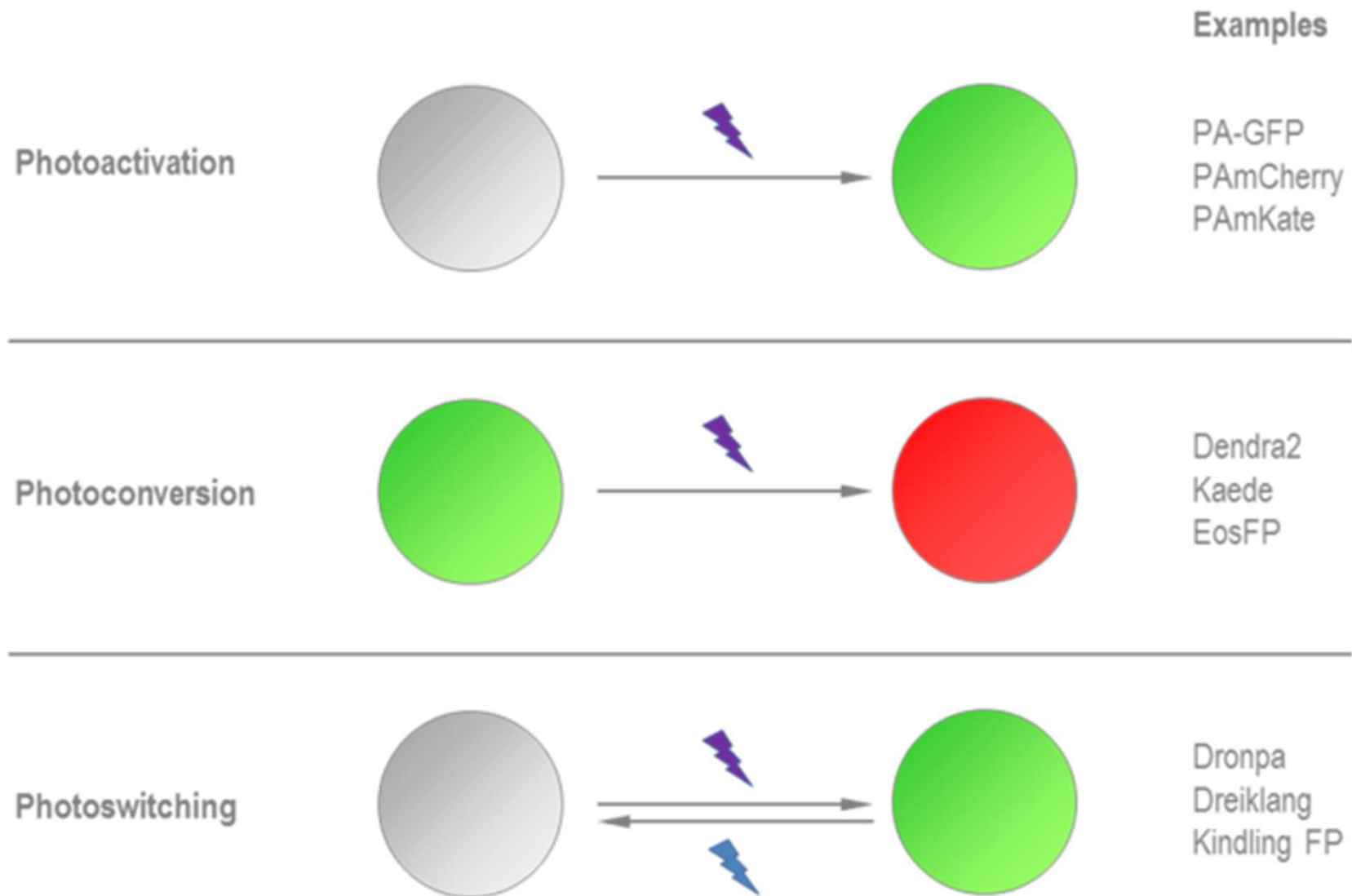


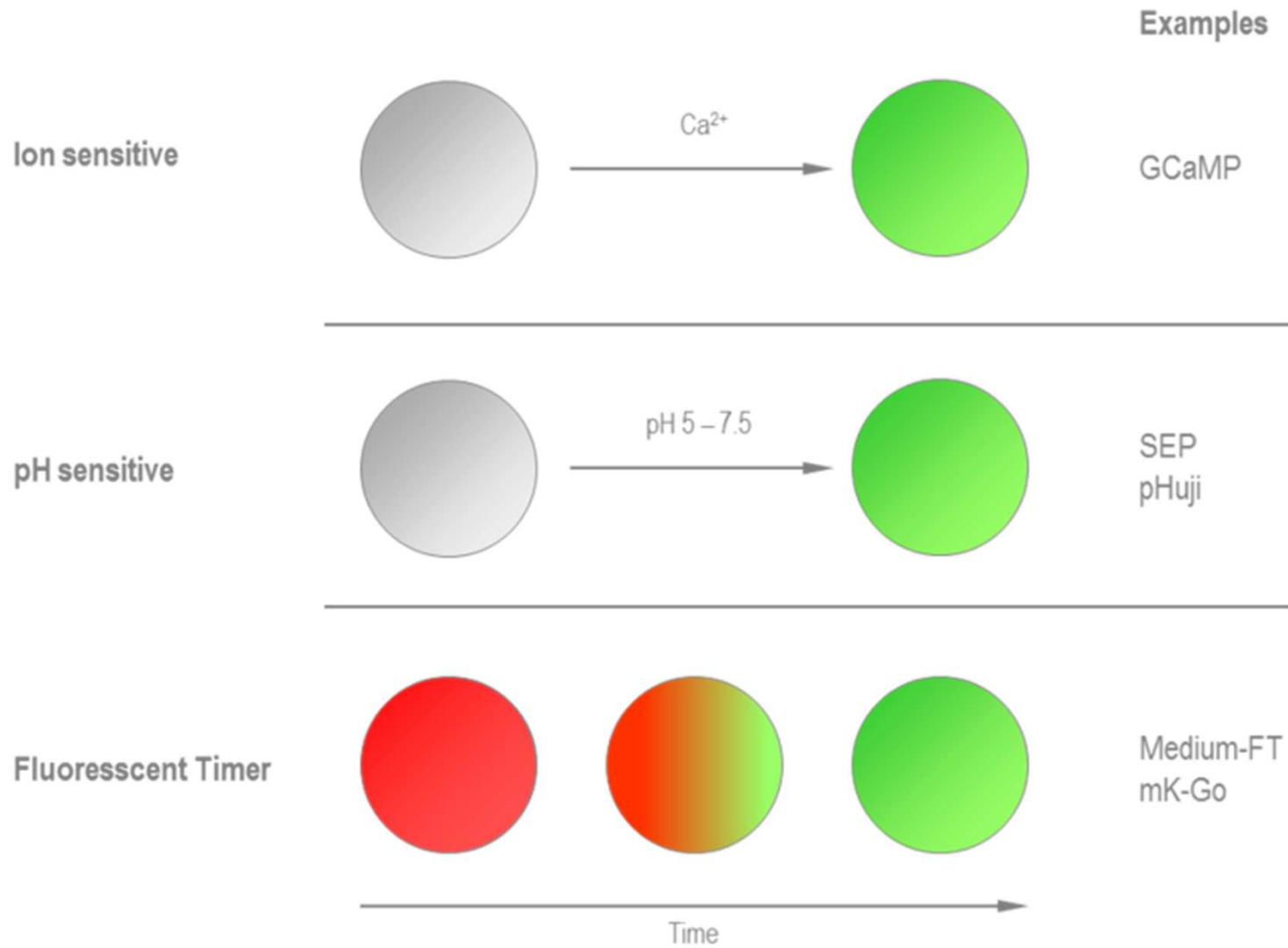
Figure 3



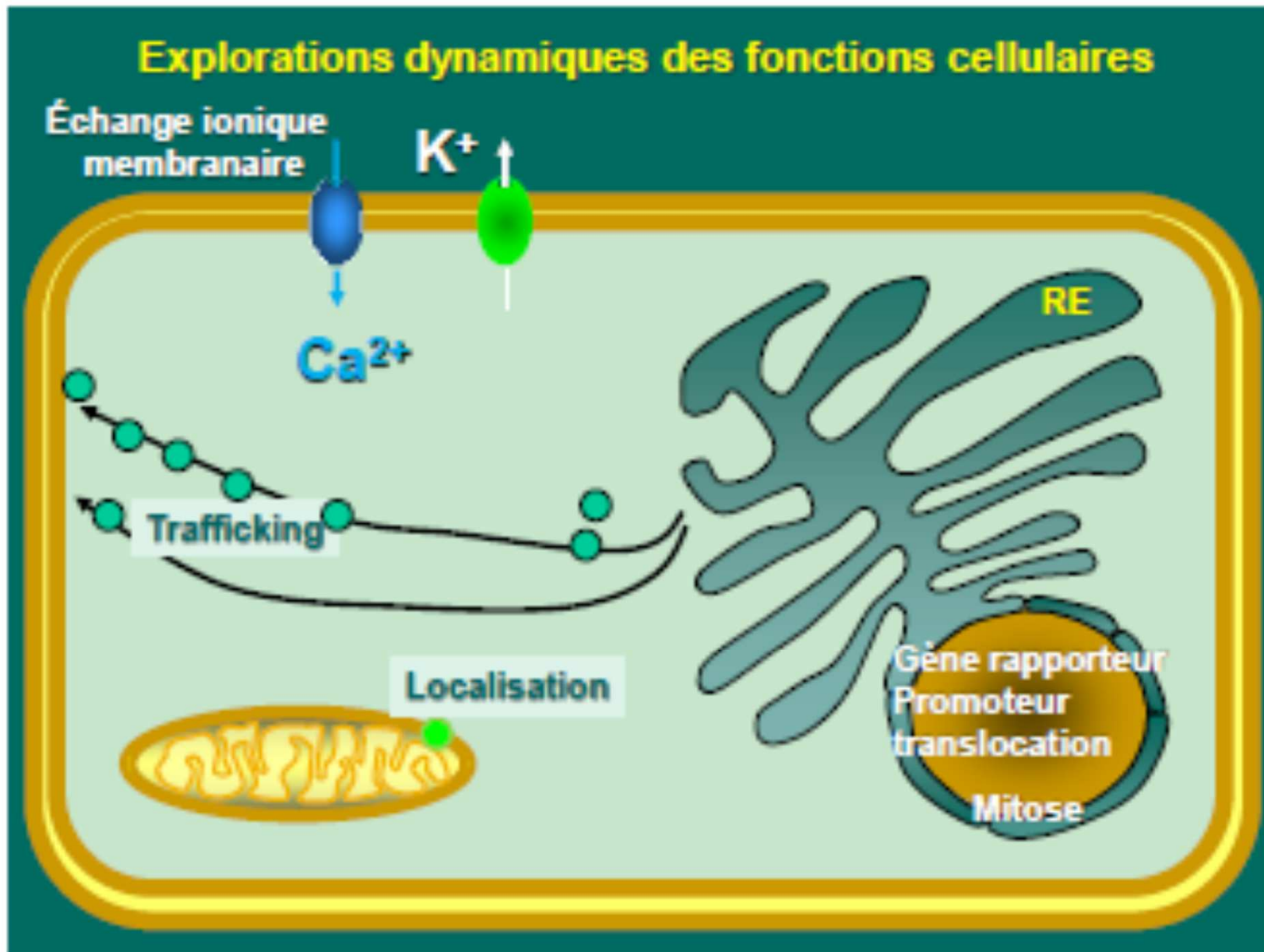
# Protéines fluorescentes photo...



# Autres protéines fluorescentes



# Applications des protéines fluorescentes en biologie



# Conclusion

---

Quelle FP choisir, quels sont les critères de choix ? Les paramètres importants à considérer sont multiples :

- ☐ La couleur (☐ d'excitation/émission)
- ☐ Photostabilité
- ☐ Brillance
- ☐ Maturation (lente vs rapide)
- ☐ Sensibilité au pH
- ☐ FRET ou non

.....mais le plus important reste « Quelle est la question biologique ? »

\*Luminosité

\*photostabilité

\*fusion

# Plan du cours

---

- 1) La microscopie
- 2) L'exploration cellulaire par les protéines fluorescents
- 3) Le Western Blot
- 4) La PCR quantitative

# Gel d'électrophorèse

- Technique permettant de **séparer des molécules chargées en fonction de leur taille** en les faisant migrer à travers un gel par application d'un champ électrique.
- Cette technique peut être utilisée pour séparer des **acides nucléiques** (ADN ou ARN, sur gels d'agarose ou d'acrylamide) ou des **protéines** (sur gel d'acrylamide)

# Gel de protéines: SDS PAGE

- Pour **S**odium **D**odecyl **S**ulfate -  
**P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis
  - SDS : solution anionique
  - Polyacrylamide : matière faisant le gel.
- Il faut **dénaturer** la protéine, c'est à dire lui faire perdre sa structure tridimensionnelle.

Pour cela, on « l'enveloppe » de charges négatives (grâce au SDS). Ainsi, les chaines polypeptidiques se repoussent et la protéine perd sa structure et est chargée. Elle peut donc migrer dans un champ électrique.



# Gel de protéines: SDS PAGE

- En conséquence :
  - les protéines sont **dénaturées** : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native
  - Les protéines n'ont plus de pont disulfure : elles sont sous une forme **monomérique**

# En pratique

support pour  
couler le gel



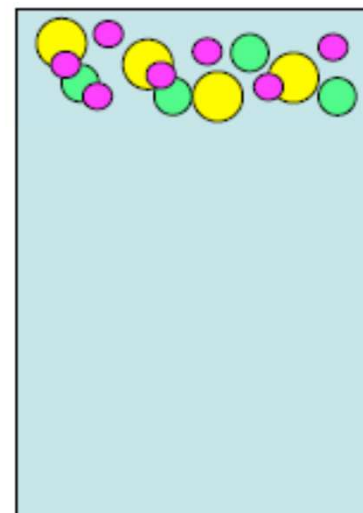
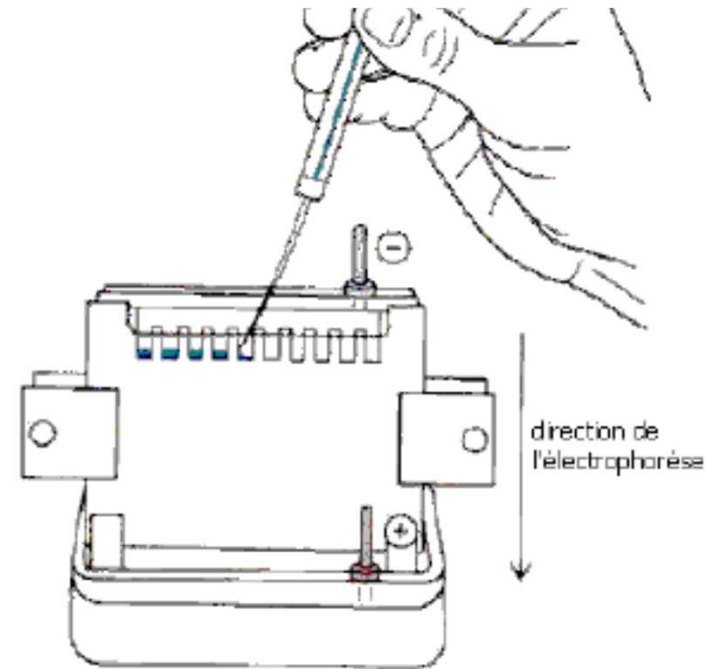
plaques de  
verre  
pour couler  
le gel



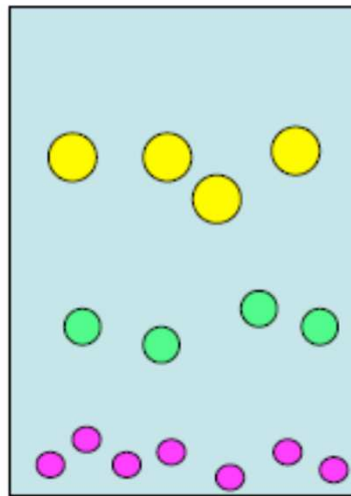
peignes



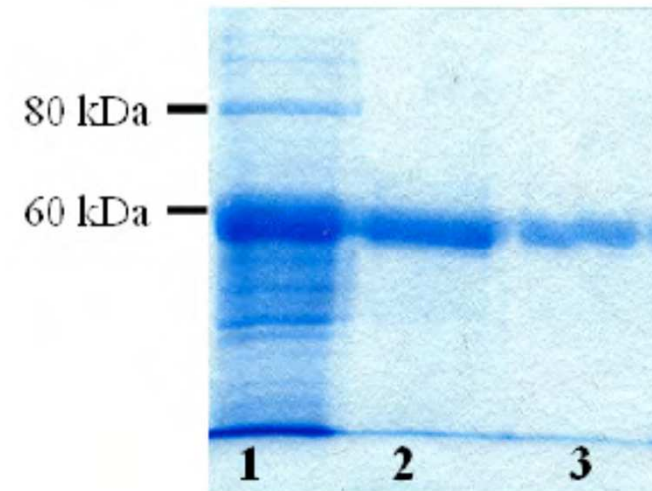
cuve



# Révélation du gel



Marquage au  
bleu de  
Coomassie →



# Western Blotting (buvardage)

