

Plate-forme de Bio-imagerie
Centre de Recherche en Infectiologie
Bioimaging Platform
Infectious Disease Research Centre

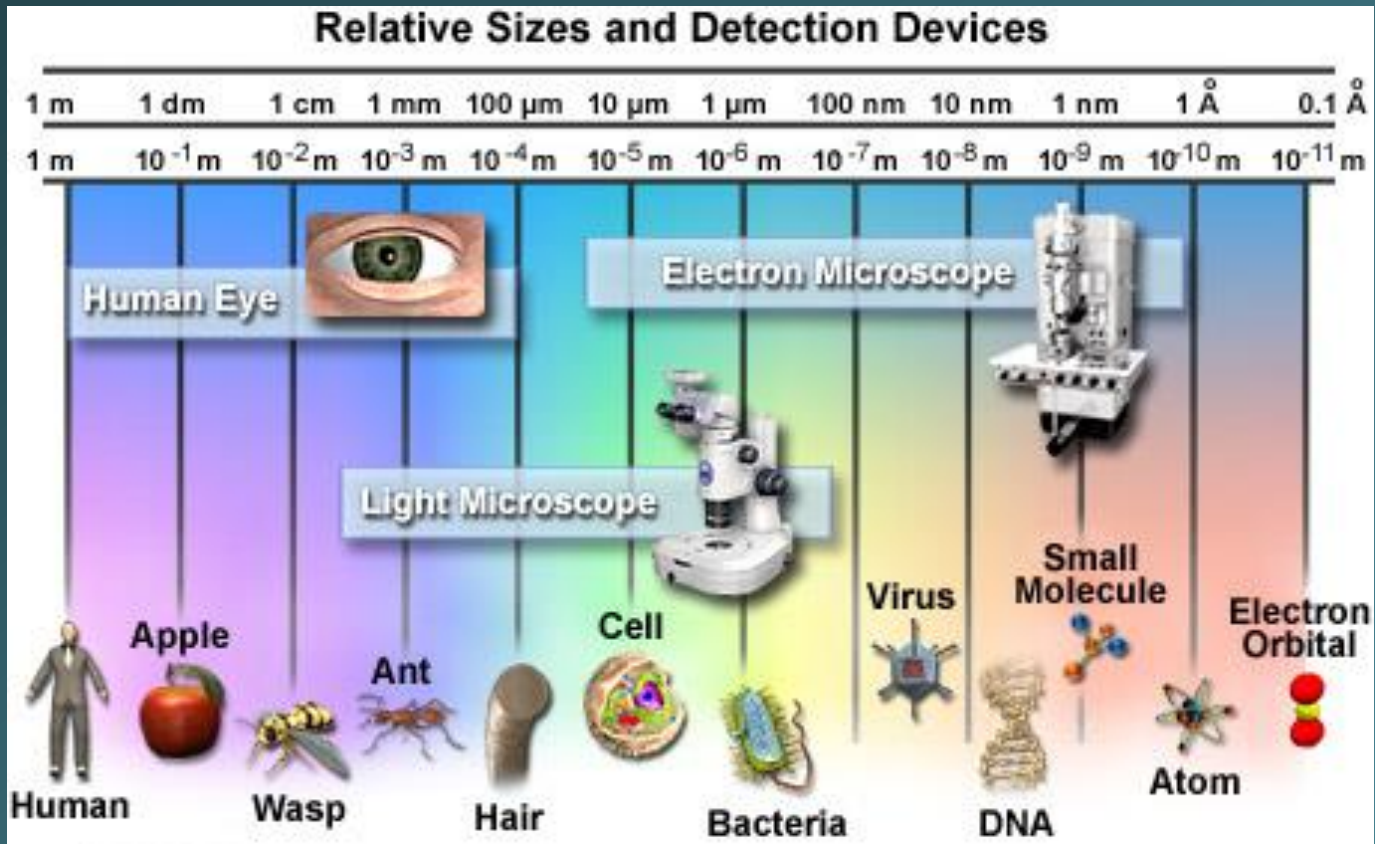
MICROSCOPIE OPTIQUE ET À FLUORESCENCE

Julie-Christine Lévesque, M.Sc

Coordonnatrice de la plateforme de Bio-imagerie

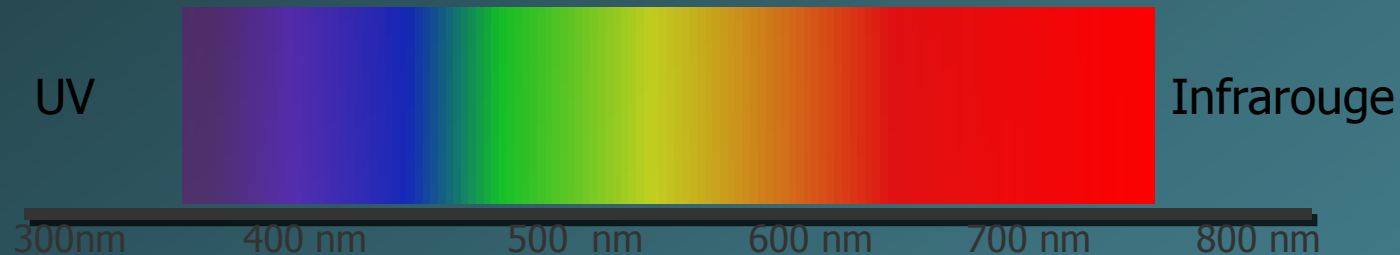


Taille relative et Moyens de détection des objets



<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/index.html>

Spectre de la lumière



La microscopie optique utilise la lumière (blanche ou autre) pour permettre la formation d'images à l'aide de lentilles de verre.

Grossissement maximal: 1000X

Résolution maximale: ~ 200 nm

Observation de spécimens avec la LUMIÈRE BLANCHE

- Utilisation de colorants
- Utilisation de la densité des spécimen (réfraction)

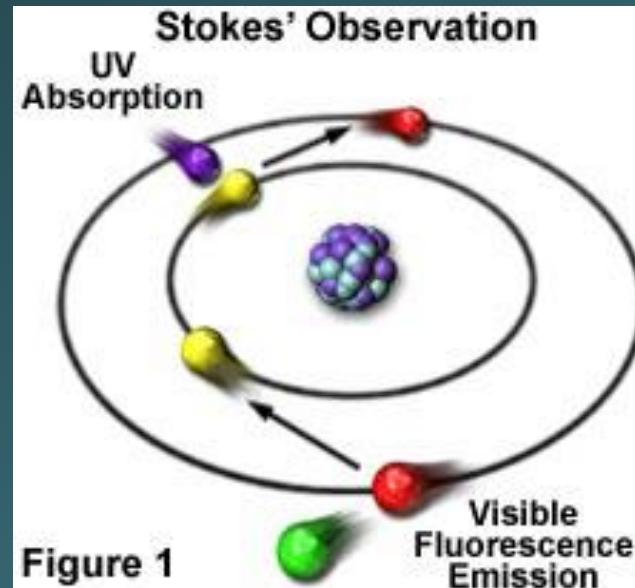
Contraste de phase



Contraste de Nomarski



Observation de spécimens avec la FLUORESCENCE

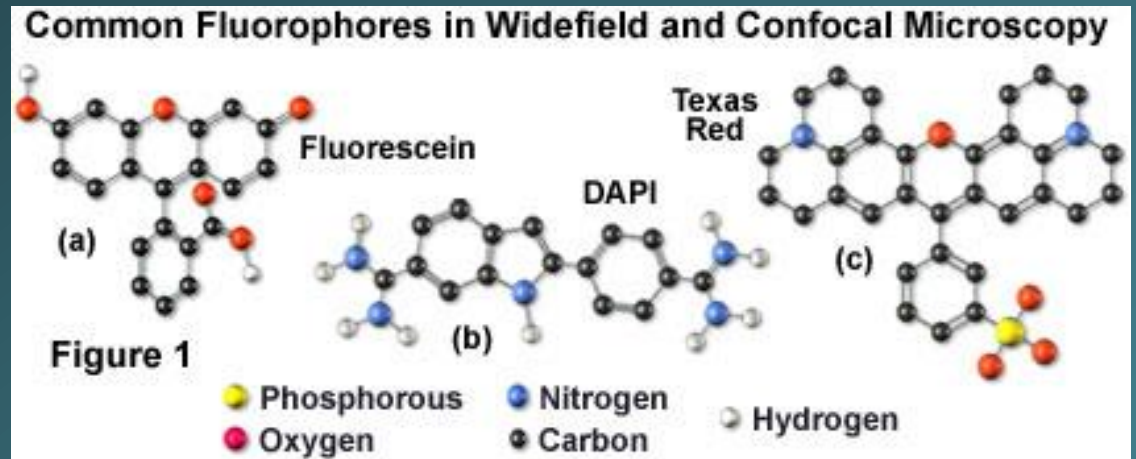


La **fluorescence** est une émission lumineuse provoquée par diverses formes d'excitation autres que la chaleur (on parle parfois de « lumière froide »). Elle se distingue de la phosphorescence en ce que la production de lumière intervient immédiatement ou rapidement après l'excitation.

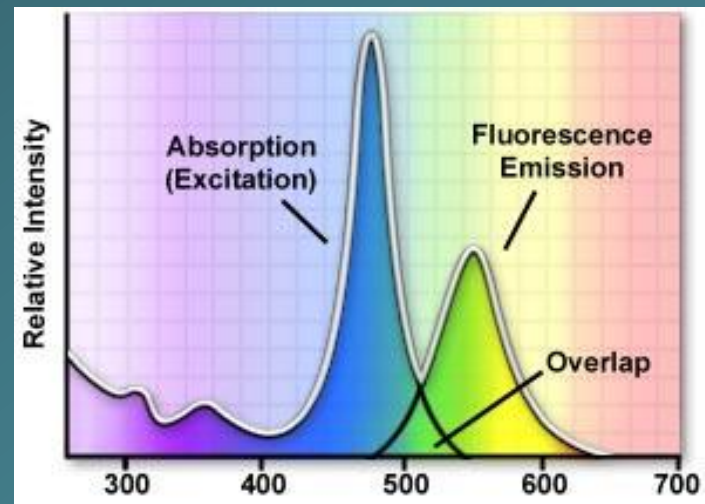
Source: Wikipédia

Les Fluorophores

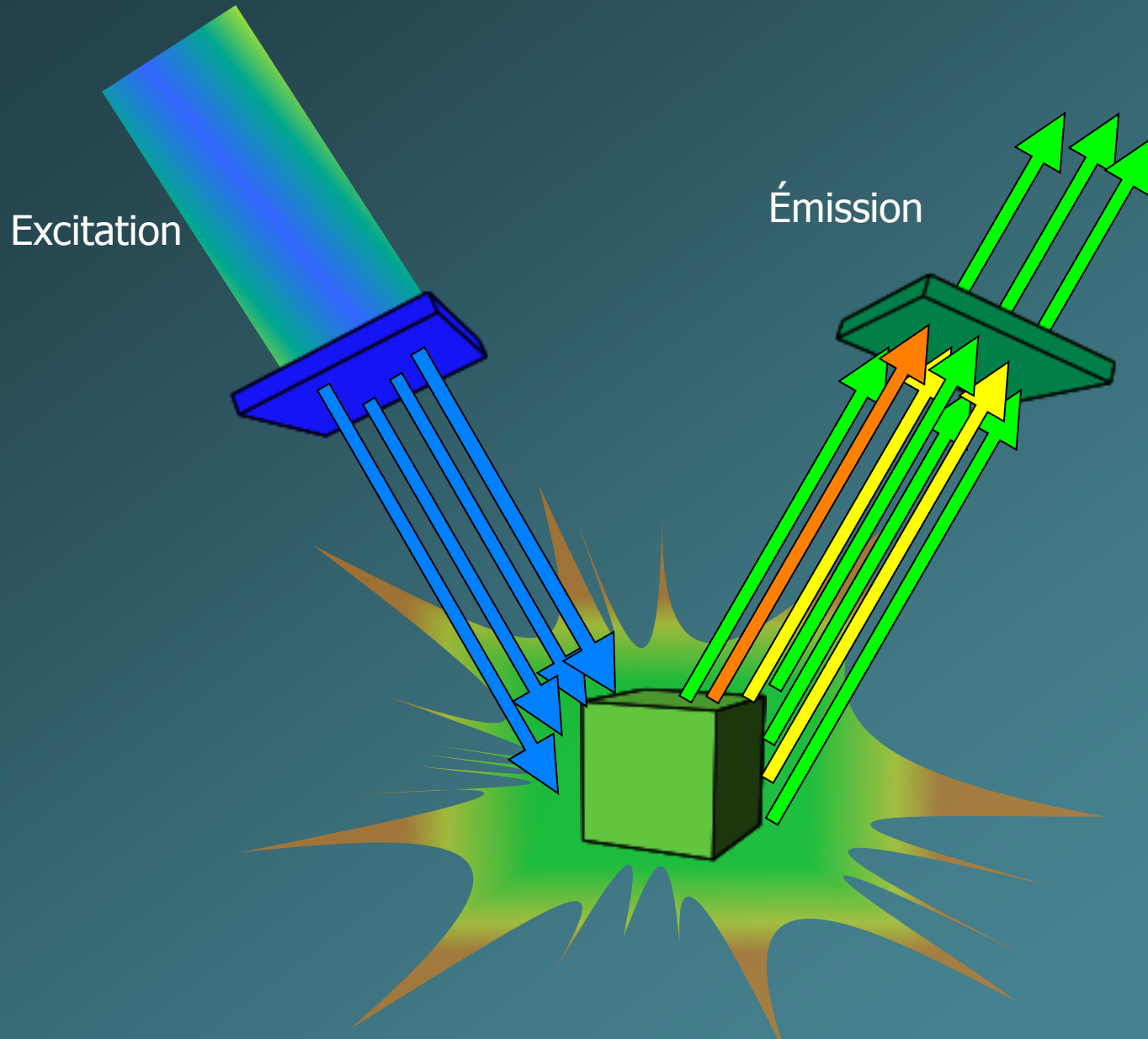
Exemples de fluorophores



Spectres d'excitation et d'émission

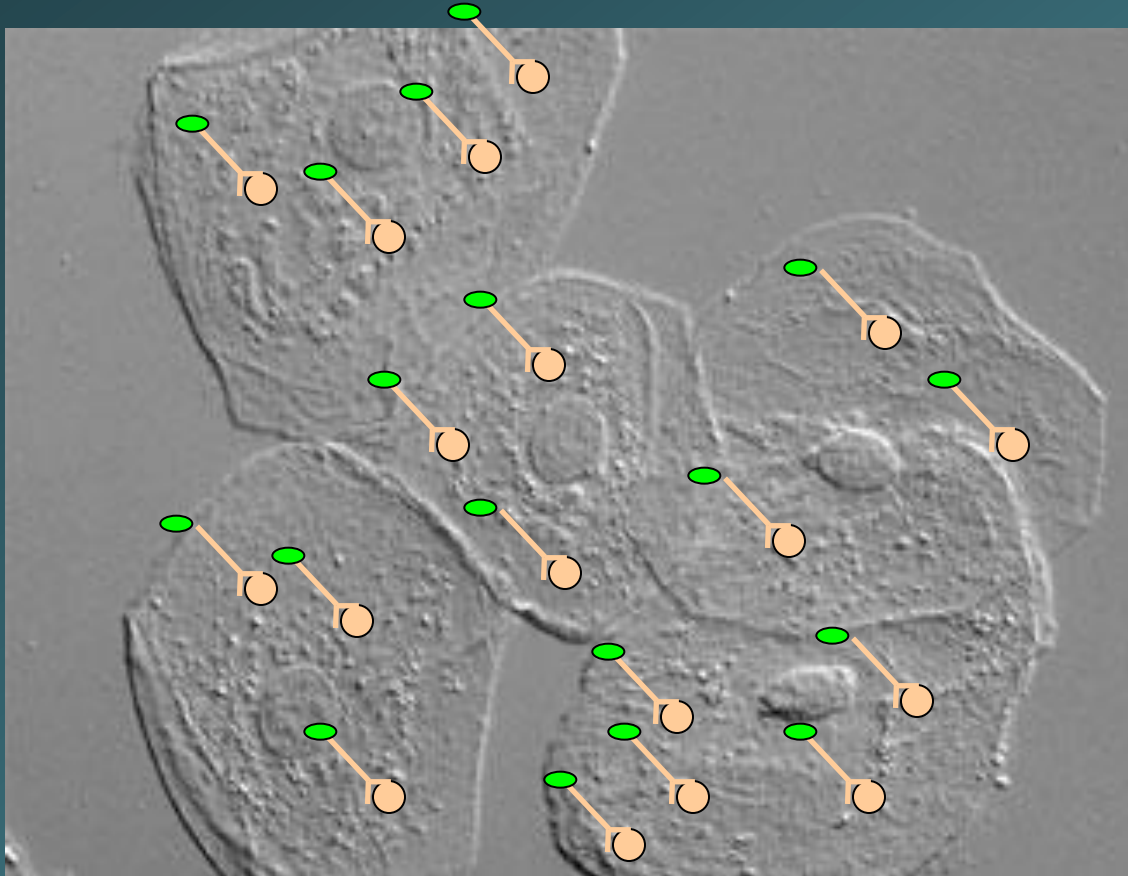


Utilisation de filtres appropriés



Marquage fluorescent des cellules

Immunofluorescence directe

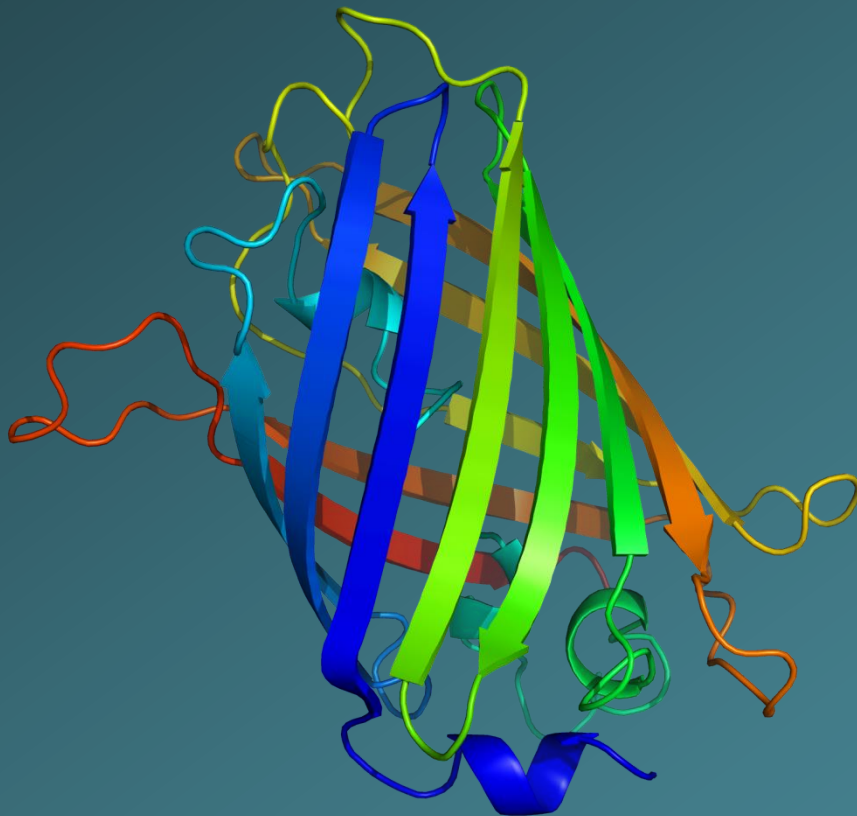


Les protéines fluorescentes

Green Fluorescent Protein (GFP)

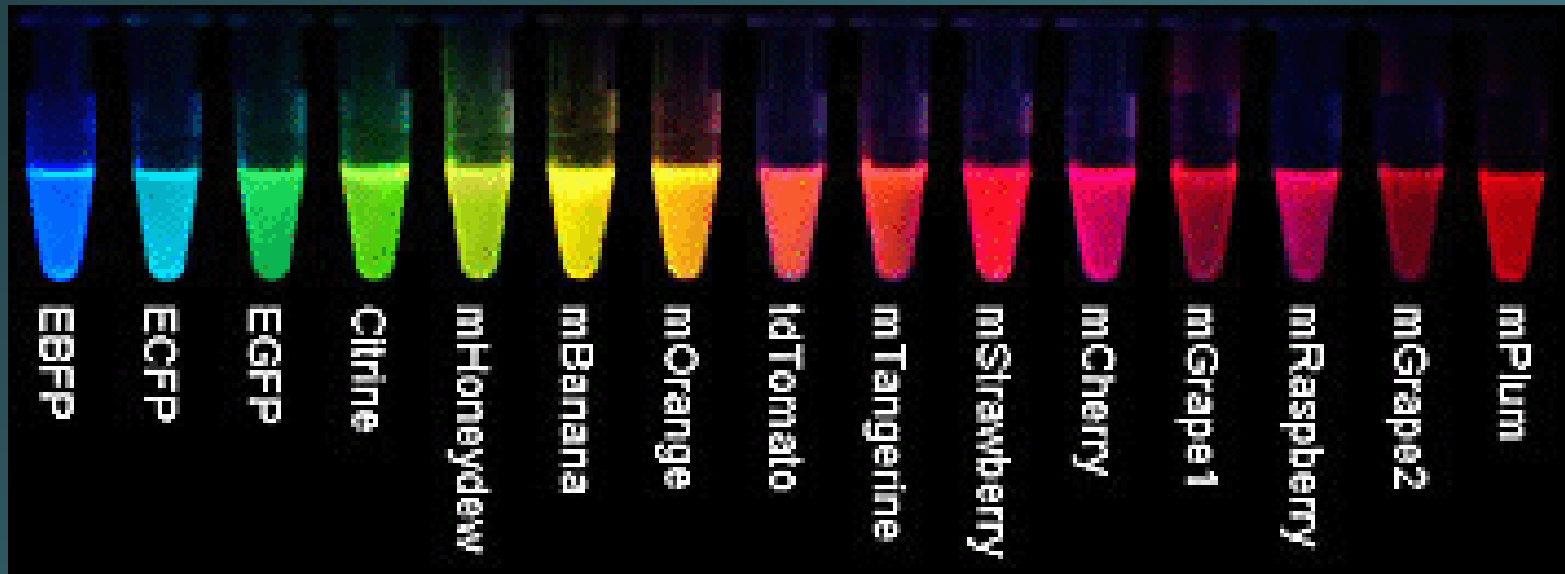
Découverte en 1962 par le chimiste et biologiste marin Osamu Shimomura.

Utilisée pour la première fois comme traceur dans des bactéries en 1990 par Martin Chalfie

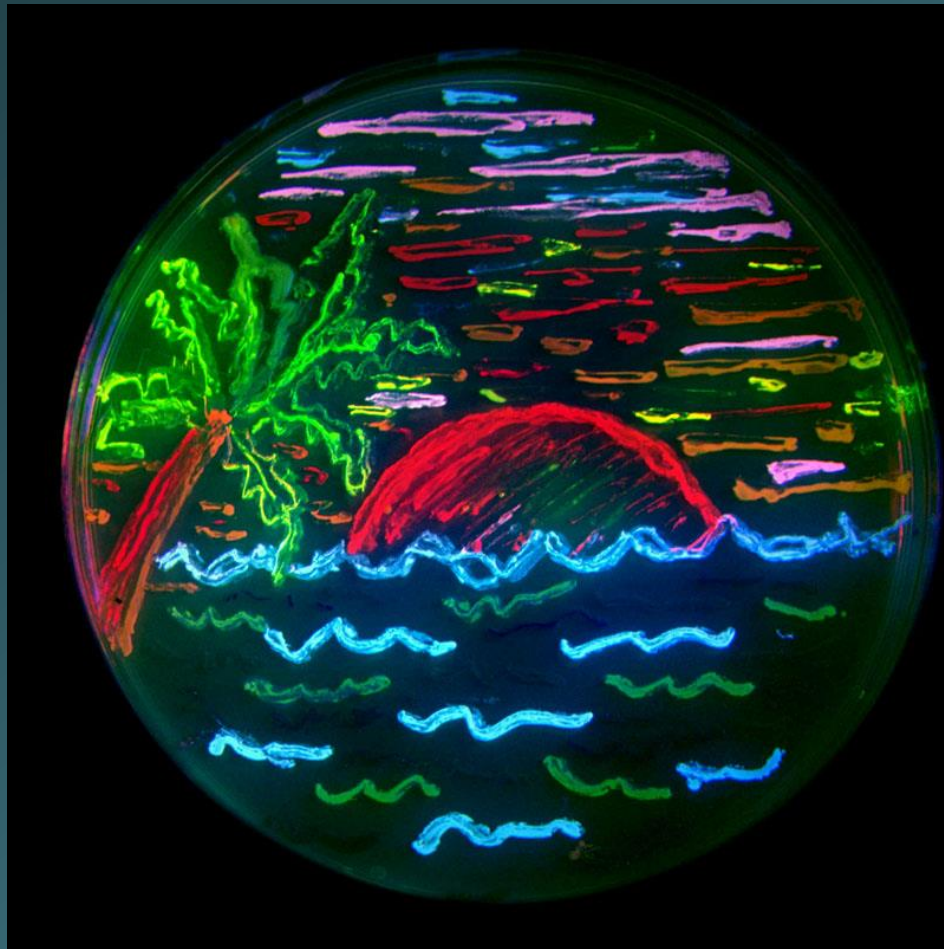


Aequorea victoria

Toute une famille de protéines fluorescentes...

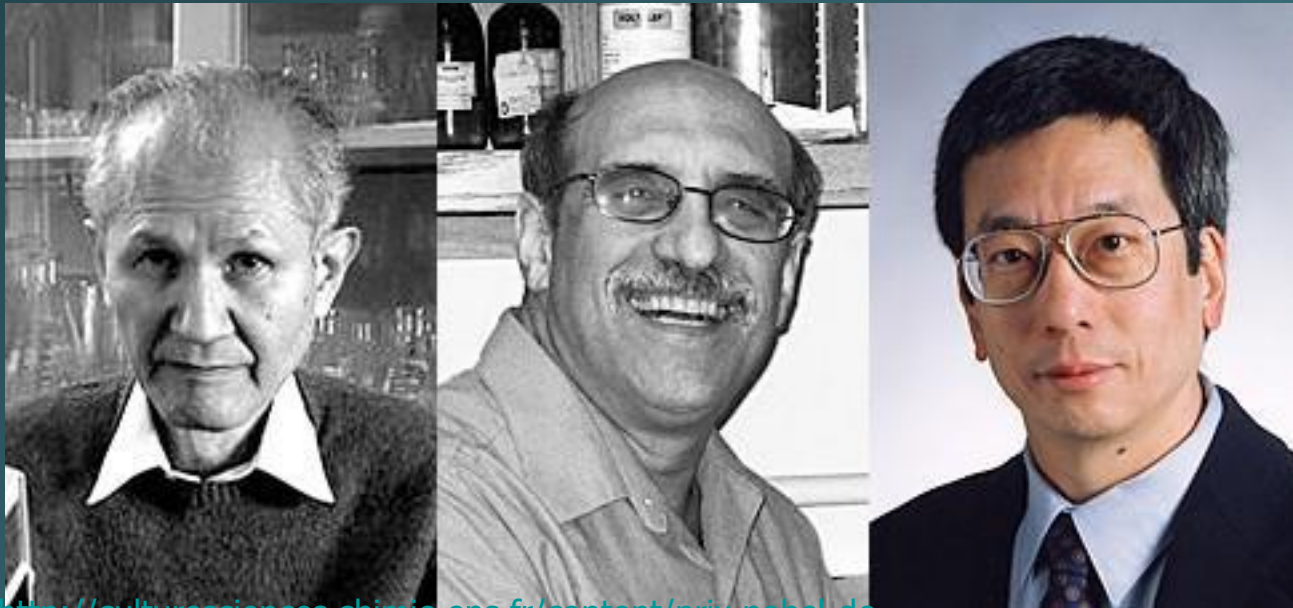


Elles ont été développées dans le laboratoire du Dr Roger Tsien à UCSD (University of California, San Diego).



<http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>

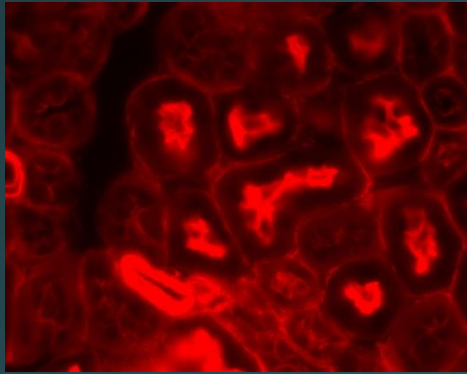
A San Diego beach scene drawn with an eight color palette of bacterial colonies expressing fluorescent proteins derived from GFP and the red-fluorescent coral protein dsRed. The colors include BFP, mTFP1, Emerald, Citrine, mOrange, mApple, mCherry and mGrape. Artwork by Nathan Shaner, photography by Paul Steinbach, created in the lab of Roger Tsien in 2006



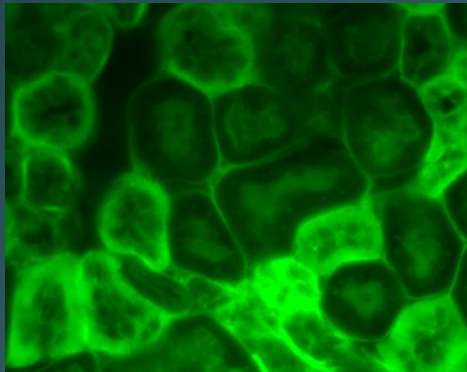
<http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/prix-nobel-de-chimie-2008-une-meduse-fluorescente-recompensee-925>

Le Dr Tsien, Osamu Shimomura et Martin Chalfie ont reçu le Prix Nobel de chimie en 2008 pour leurs travaux sur la protéine GFP et ses dérivés.

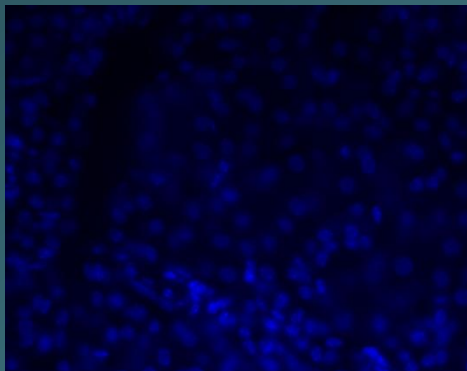
Rein de souris



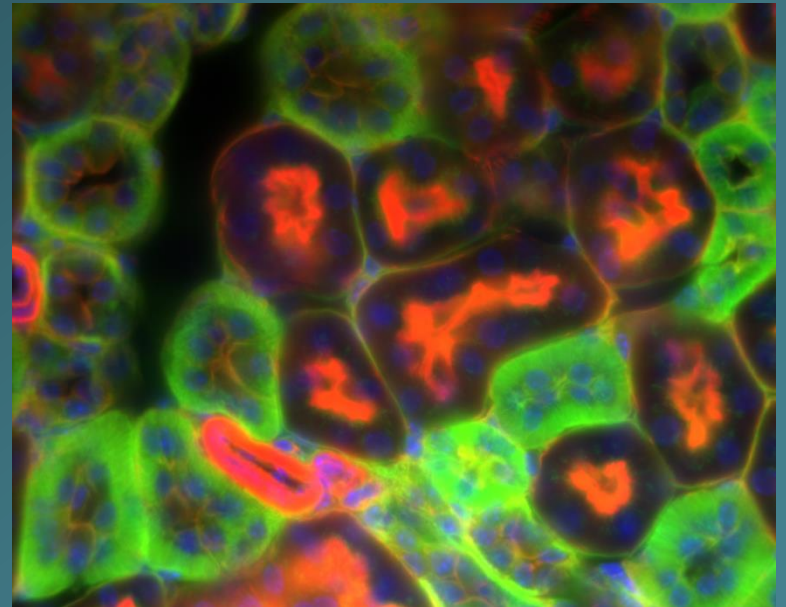
Alexa 568
phalloidin: Actine



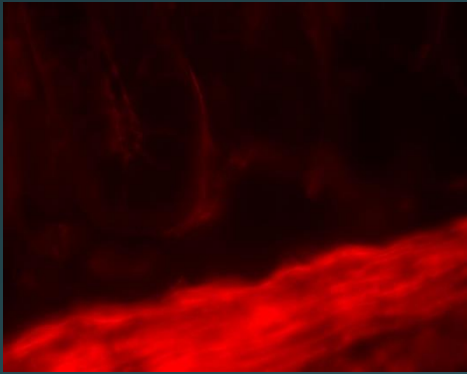
Alexa 488 WGA:
Acide Sialique



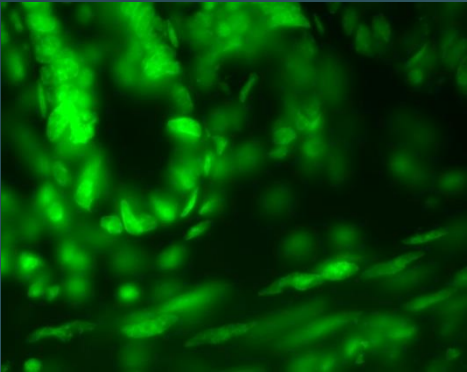
DAPI: ADN



Intestin de souris



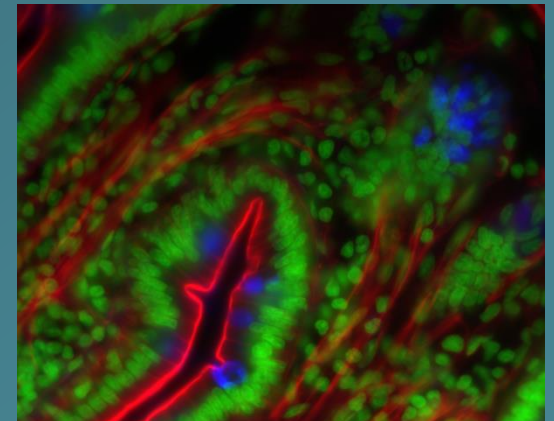
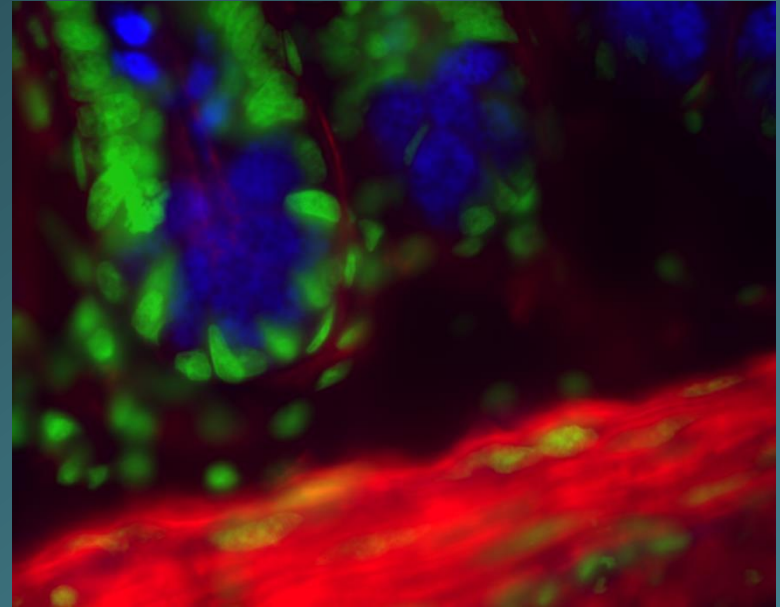
Alexa 568
phalloidin: Actine



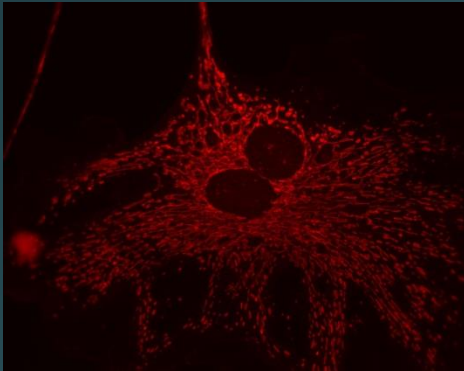
SYTOX Green:
ADN



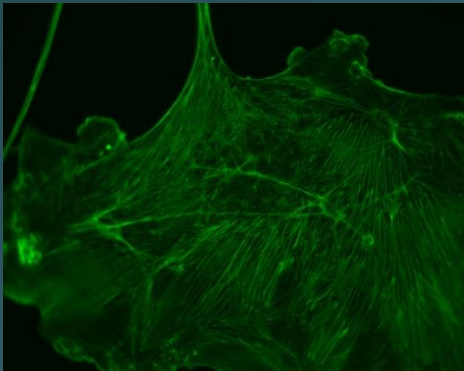
Alexa 350 WGA:
Acide Sialique



Cellules endothéliales d'artères pulmonaires bovines (Bovine pulmonary artery vascular endothelium cells, BPAE)



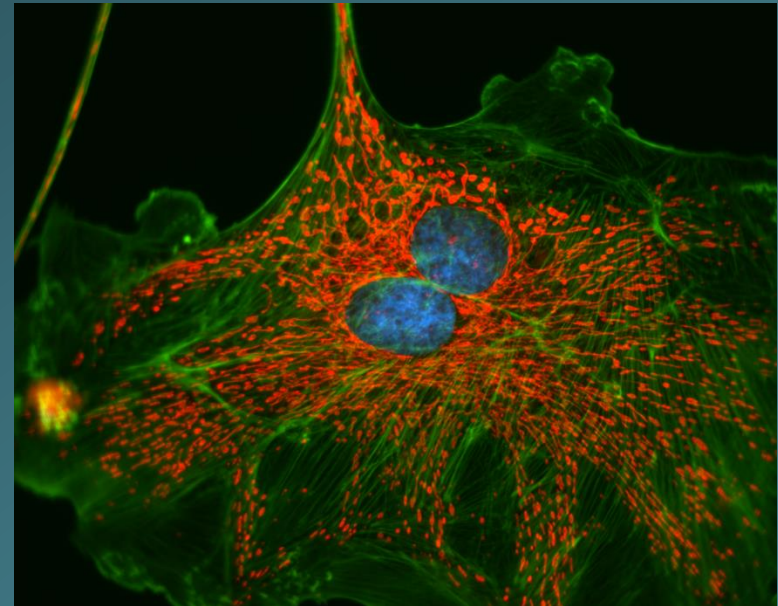
Mitotracker:
Mitochondries



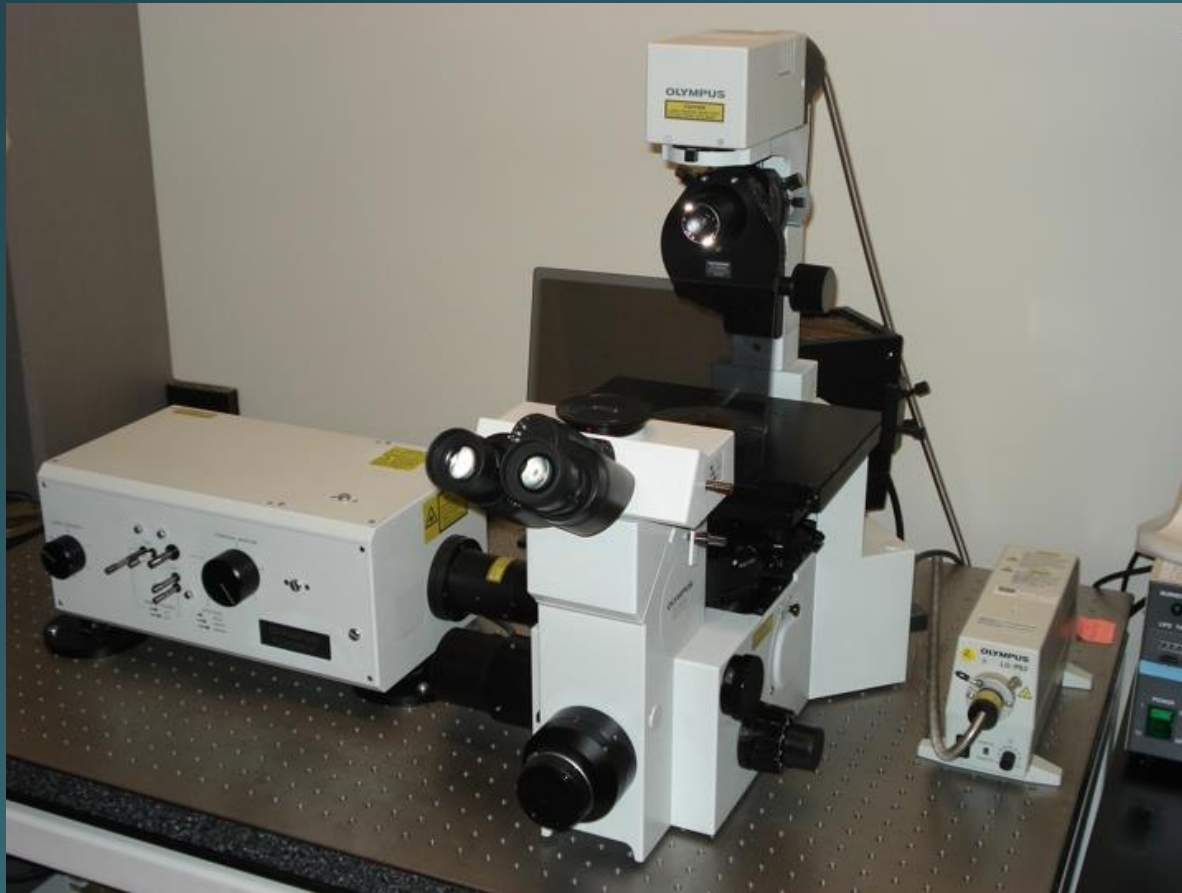
Alexa fluor
488-
phalloidin:
Actine



DAPI: ADN

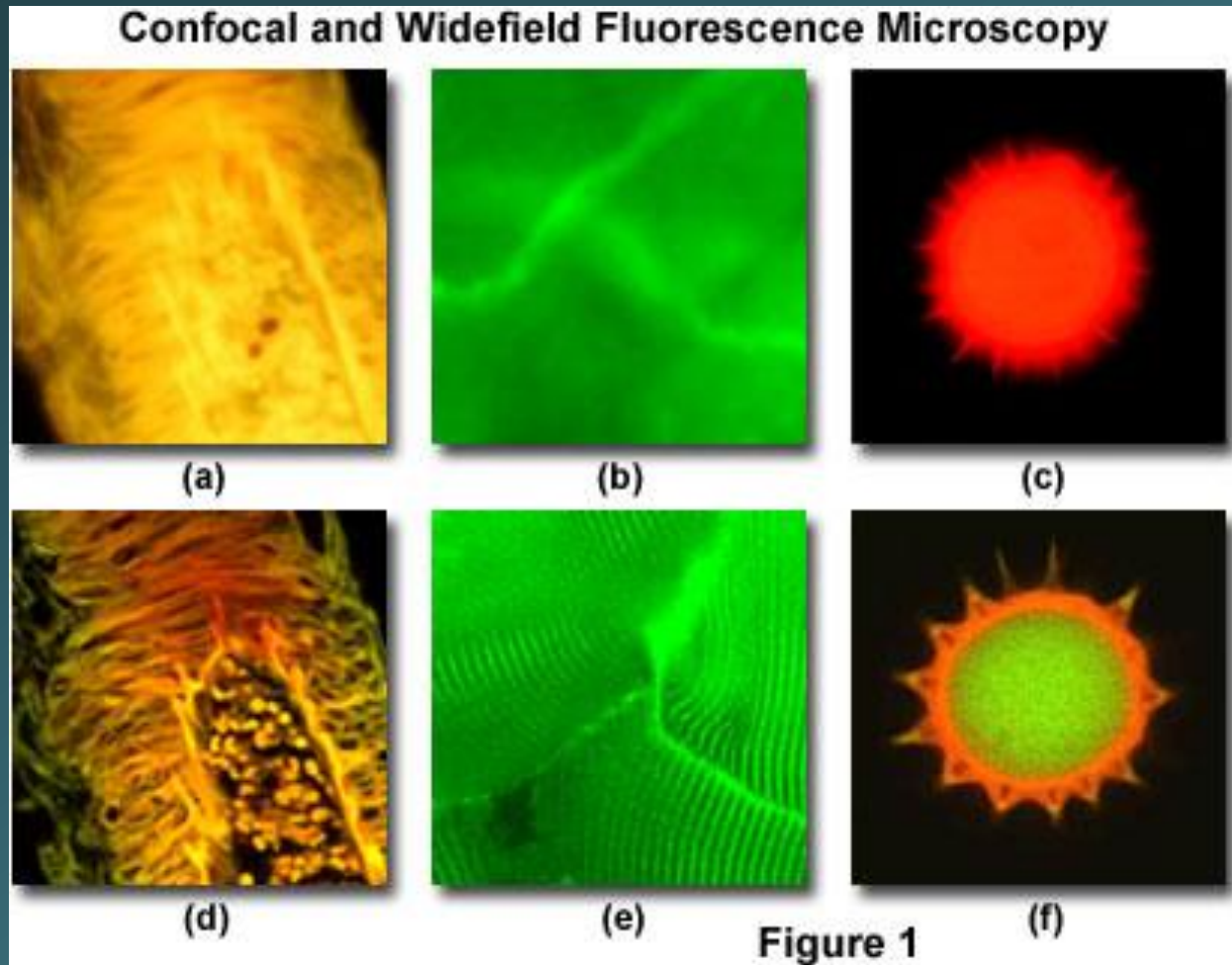


Microscopie confocale



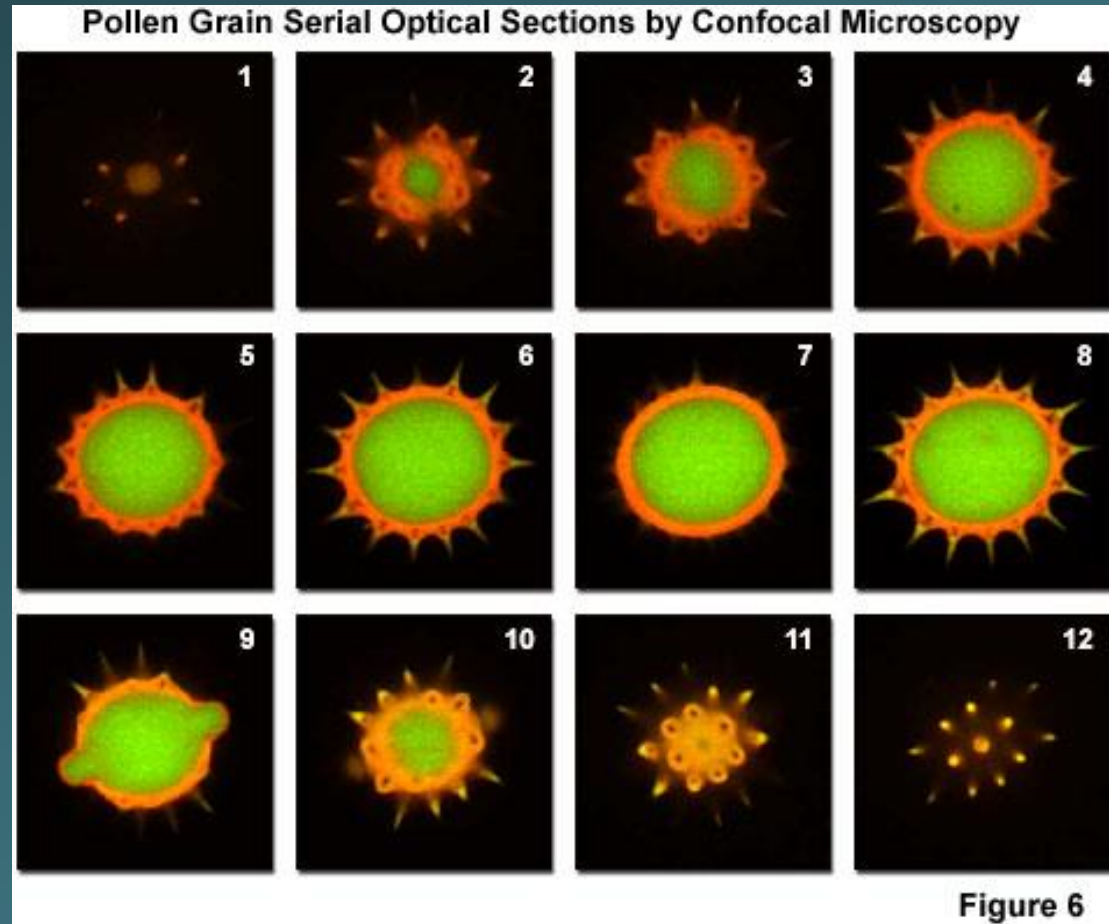
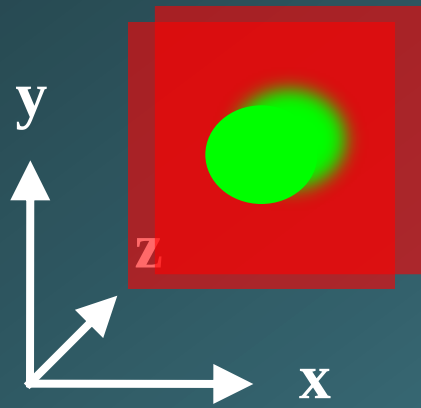
Équipement de microscopie qui permet d'éliminer la lumière hors-focus.

Microscopie confocale vs Microscopie en fluorescence



<http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html>

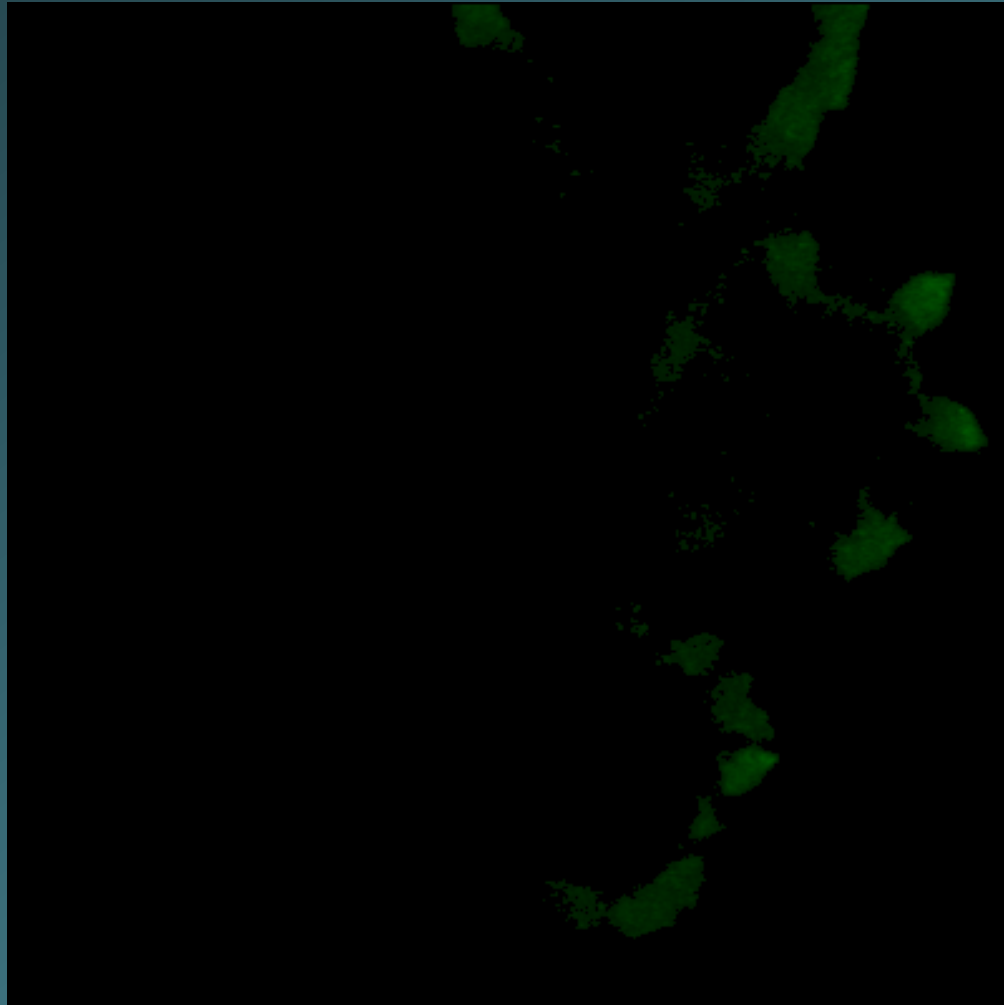
Série d'images (z-stack) dans l'épaisseur d'un échantillon



<http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html>

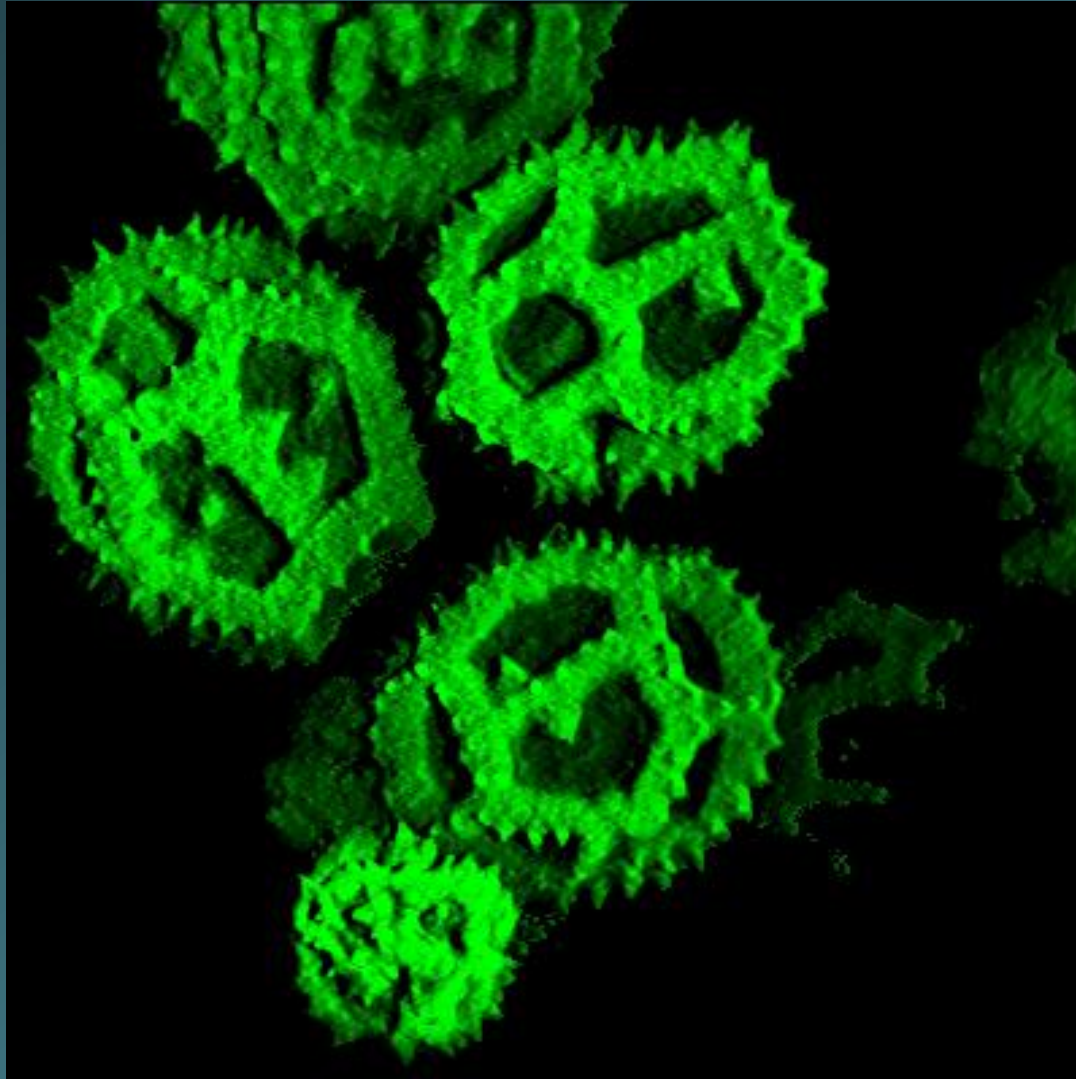
Série d'images (z-stack)

Grains de pollen

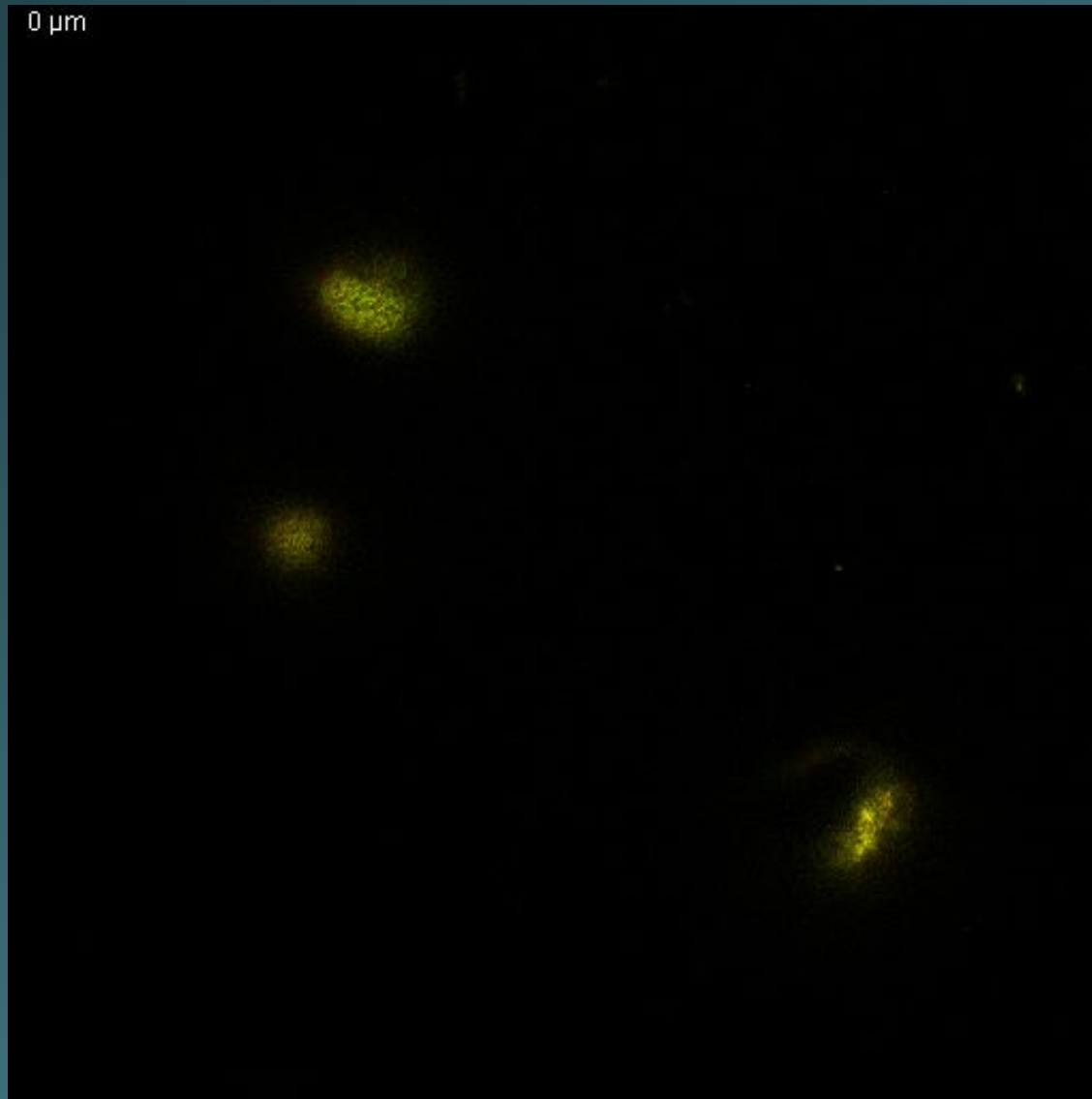


Reconstruction 3D

Grains de pollen



Série d'images (z-stack)



Reconstruction 3D



Observation de cellules vivantes (Live-Cell Imaging)

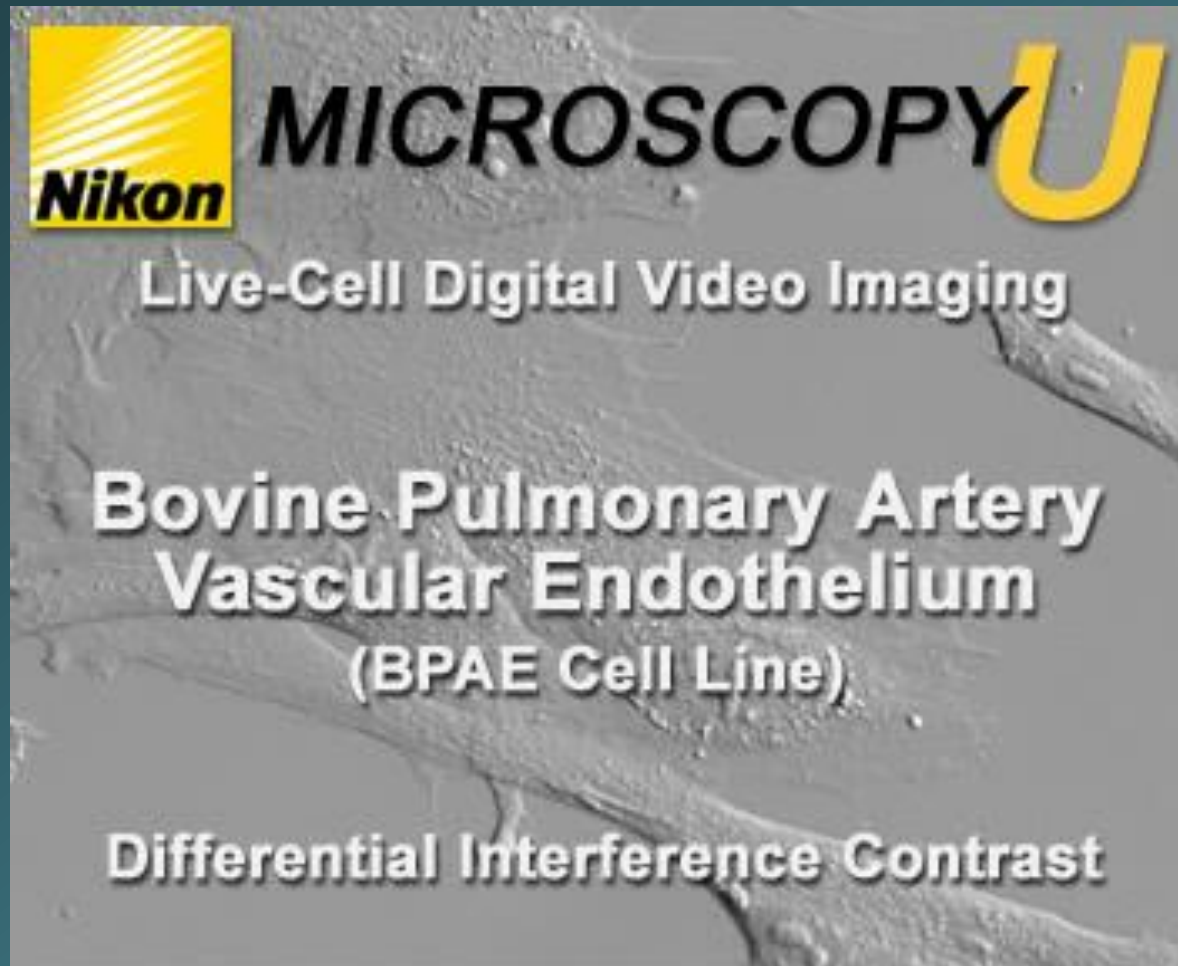


Microscope confocal à disque rotatif (spinning disk) Wave FX de Quorum technologies



Labtek II chambered coverglass

Cellules endothéliales d'artères pulmonaires bovines



Cellules épithéliales en mitose

Hamamatsu ImageEM electron multiplying camera system coupled to an Olympus DSU spinning disk microscope.

Tubuline-eGFP

H2B (histones)-
mCherry



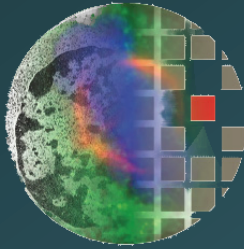
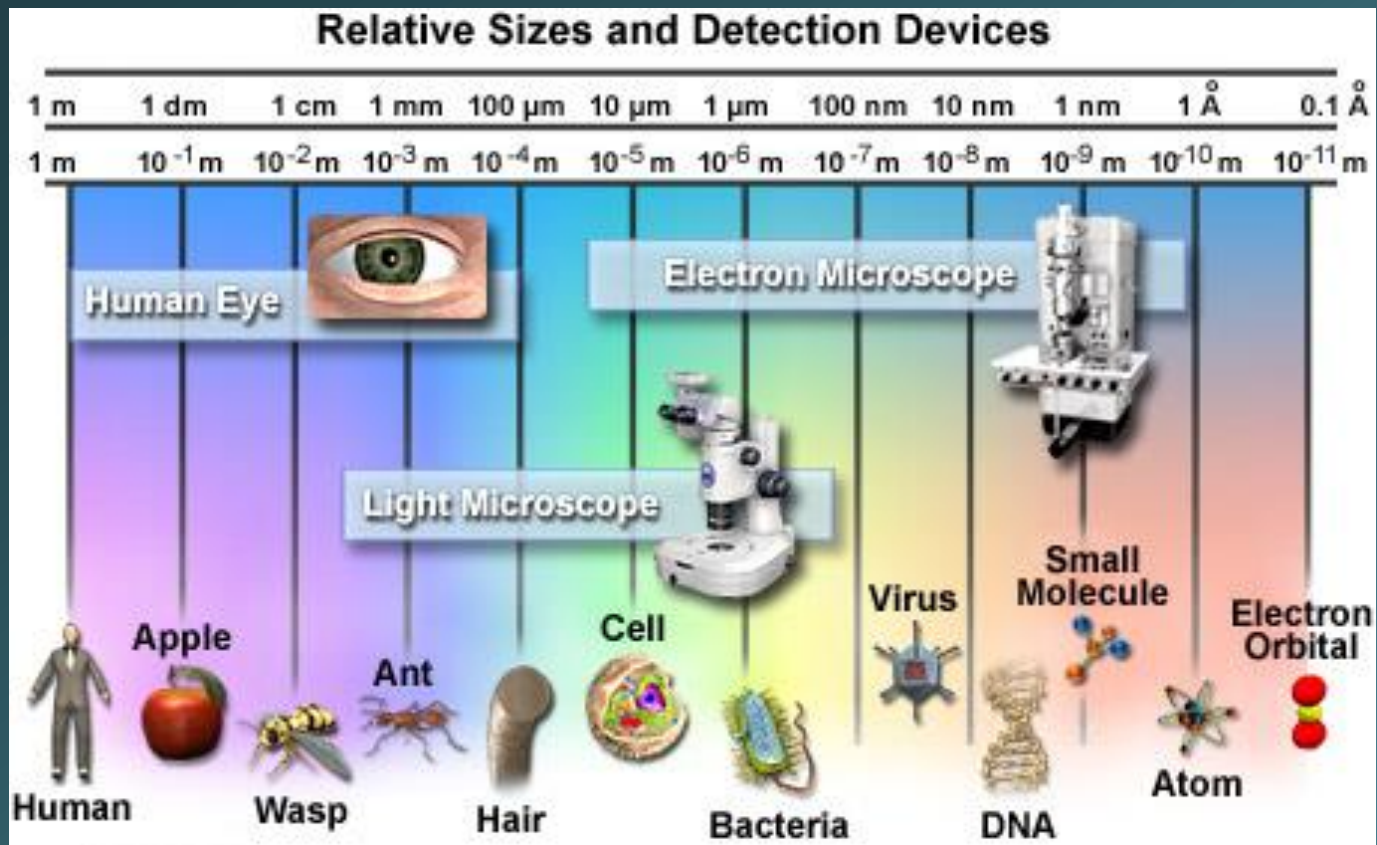


Plate-forme de Bio-imagerie
Centre de Recherche en Infectiologie
Bioimaging Platform
Infectious Disease Research Centre

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE



<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/index.html>

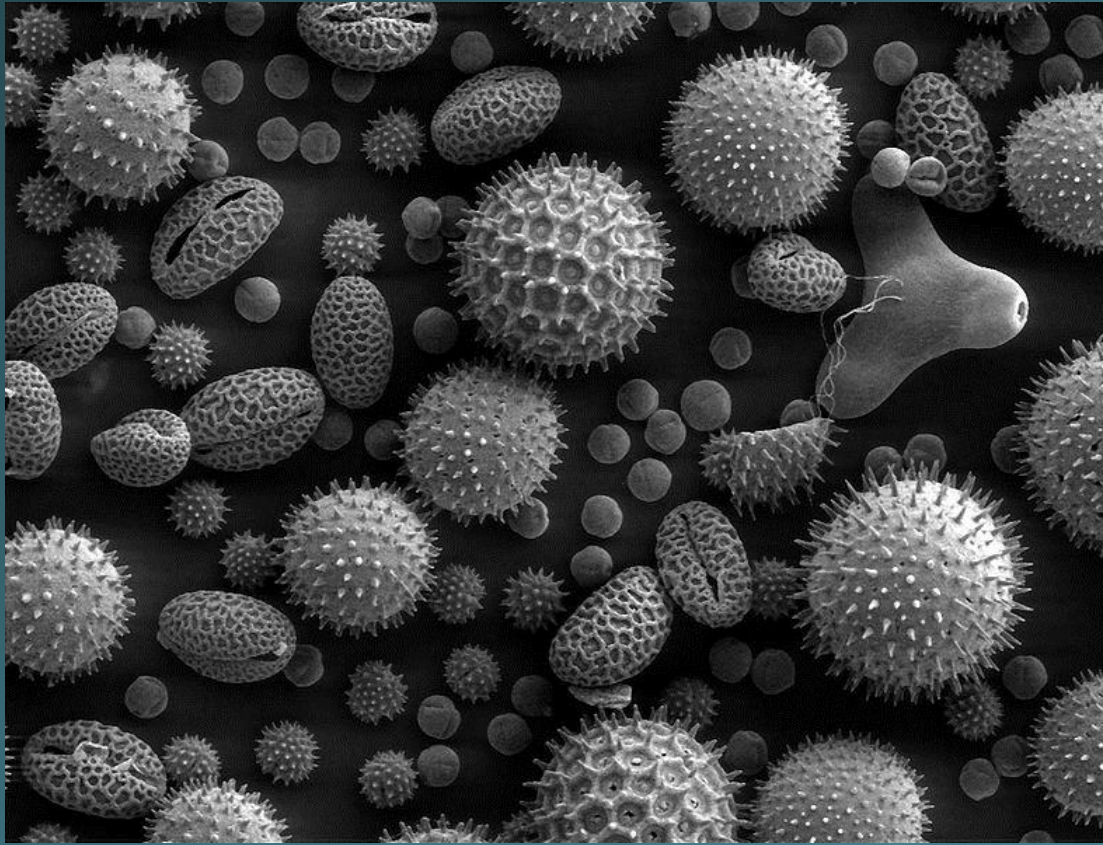
La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons pour visualiser des spécimens colorés à l'aide de métaux lourds pour en augmenter la densité. Les lentilles sont électromagnétiques.

Grossissement : 500X à 500 000X

Résolution maximale: $\sim 0,5\text{ nm}$ à $2\text{ \AA}$

Microscopie électronique à balayage (SEM)

Image obtenue à l'aide des électrons qui sont déviés par la surface de l'échantillon à observer.



Microscopie électronique à transmission (TEM)

Image obtenue à l'aide du faisceau d'électrons qui traverse l'échantillon à observer.

Microscope Tecnai Spirit
BioTwin de FEI

Voltage: 80-120KV



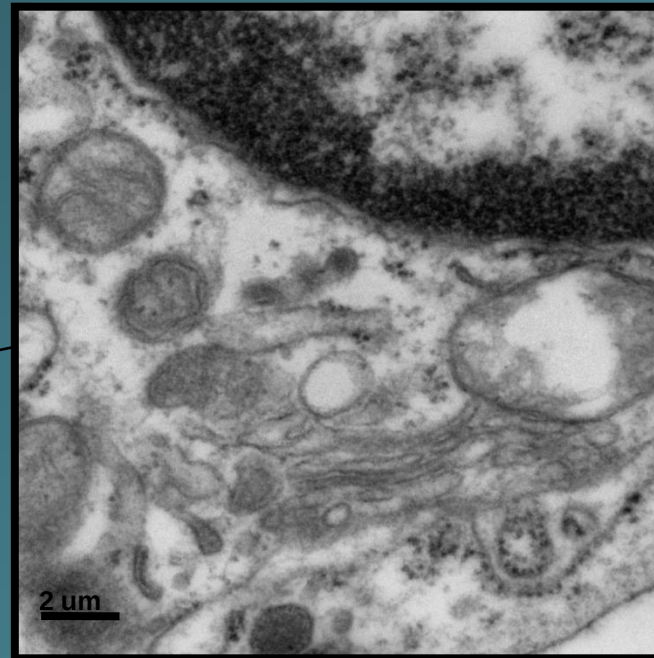
Microscopie électronique à transmission (TEM)

Ultrastructures

Colorants: métaux lourds
affinité pour les lipides, protéines, ADN, ARN



25 000X



75 000X

Microscopie électronique à transmission (TEM)

Étude ultrastructurale en ME

Préparation des échantillons:

- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 nm
- Dépôt sur grilles
- Observation

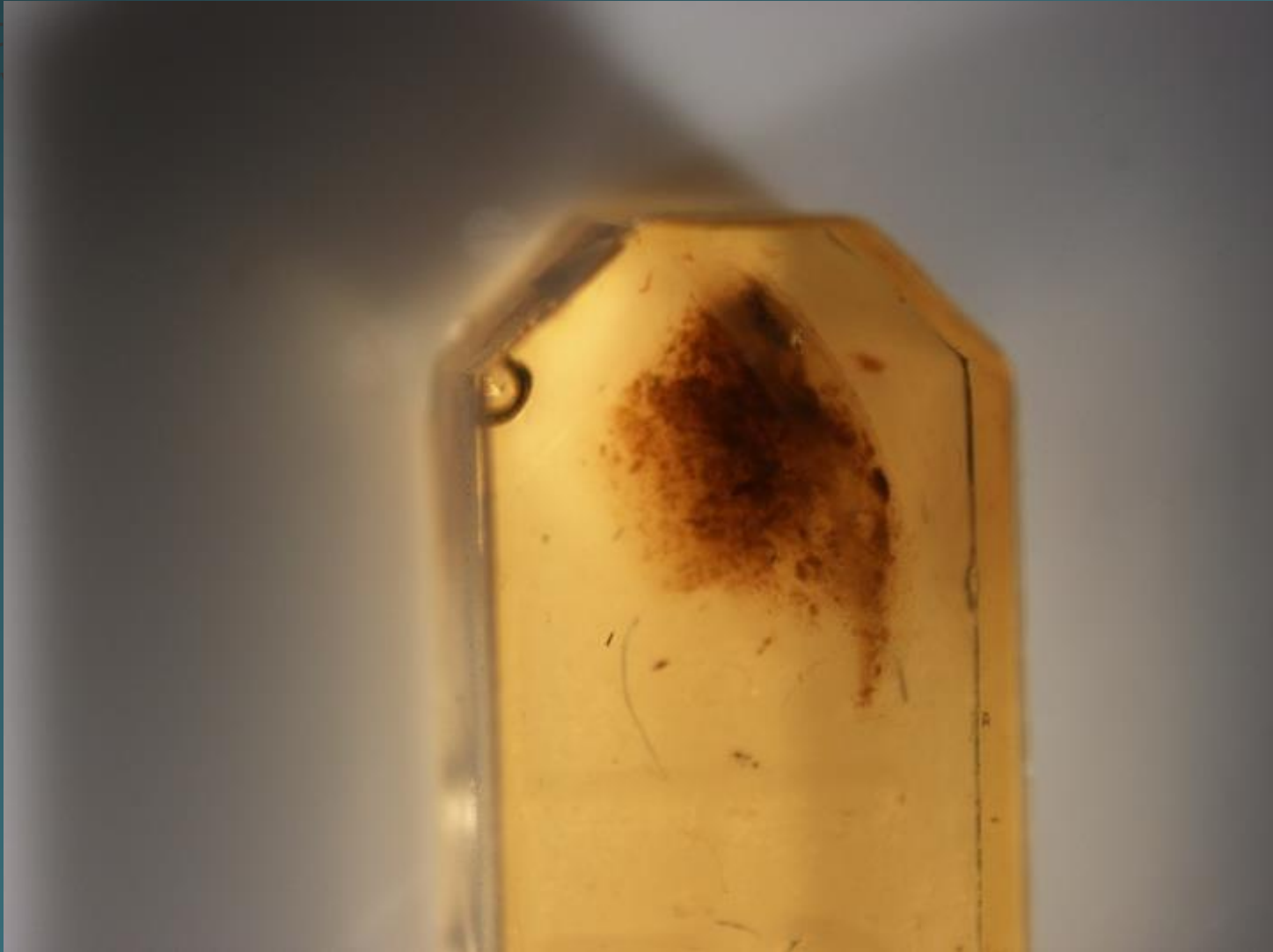
Préparation des échantillons:

- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 nm
- Dépôt sur
- Observati



Préparation des échantillons:

- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 nm
- Dépôt
- Obser



Préparation des échantillons:

- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 μm
- Dépôt
- Obser



Préparation des échantillons:

- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 nm
- Dépôt sur grilles
- Observation



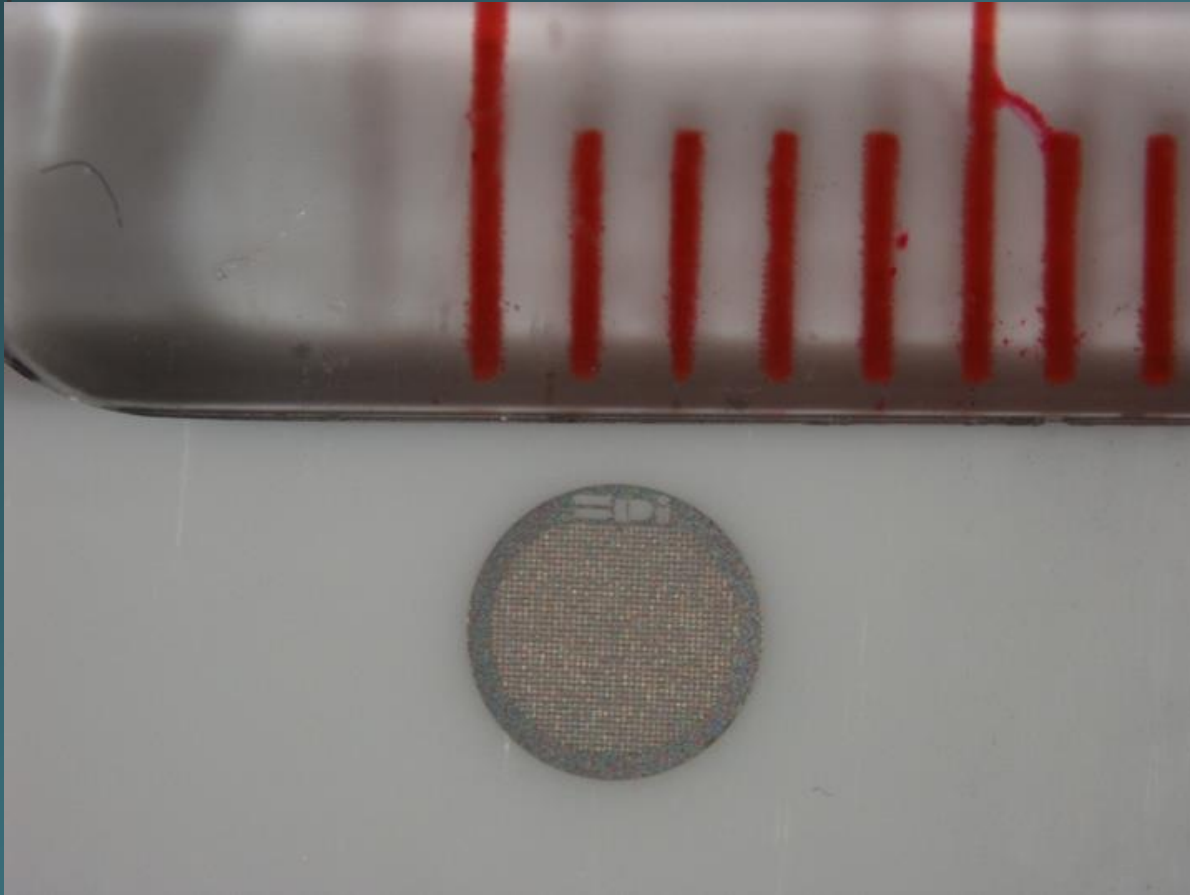
Préparation des échantillons:

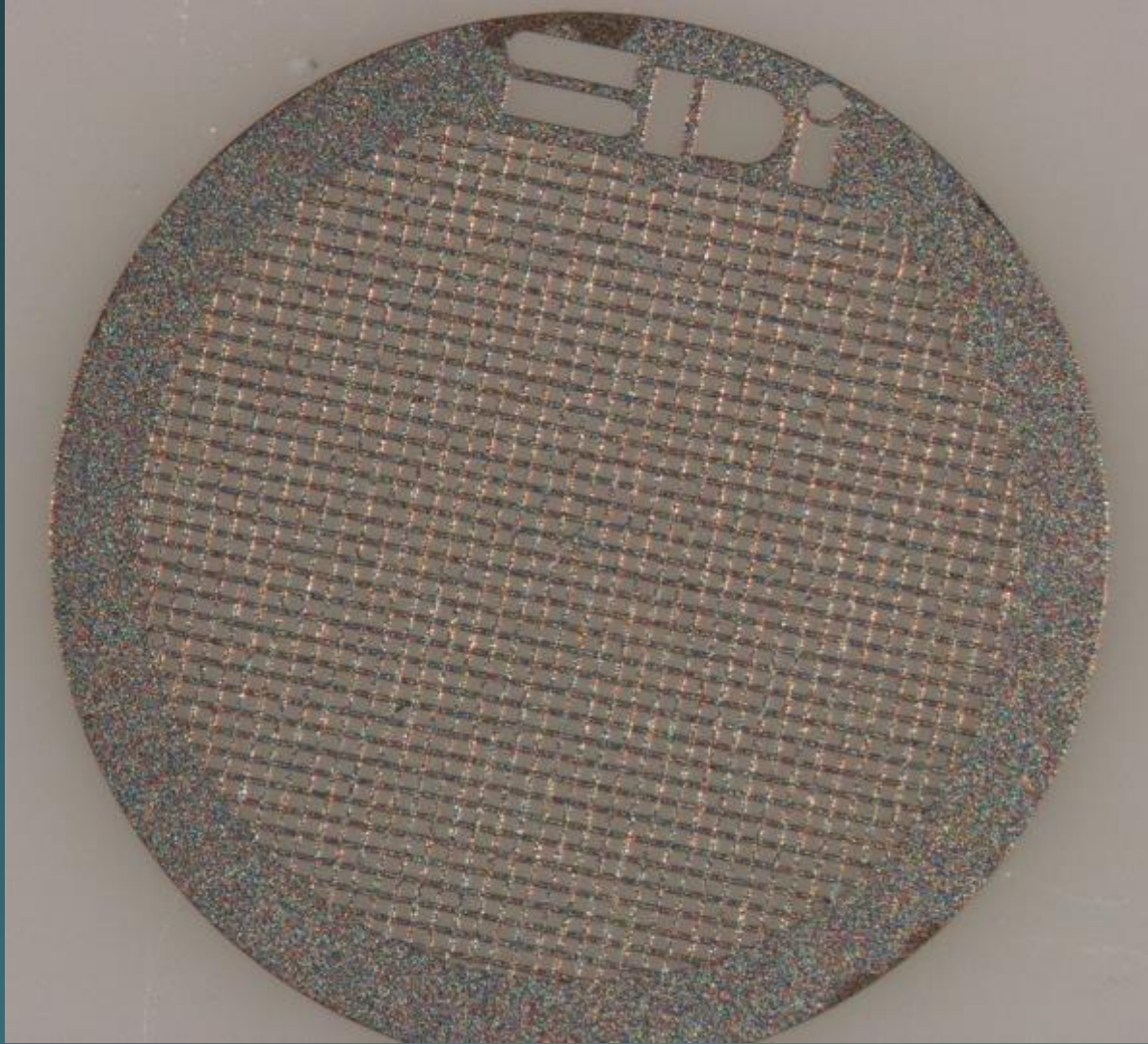
- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 nm
- Dépôt sur grilles
- Observation



Préparation des échantillons:

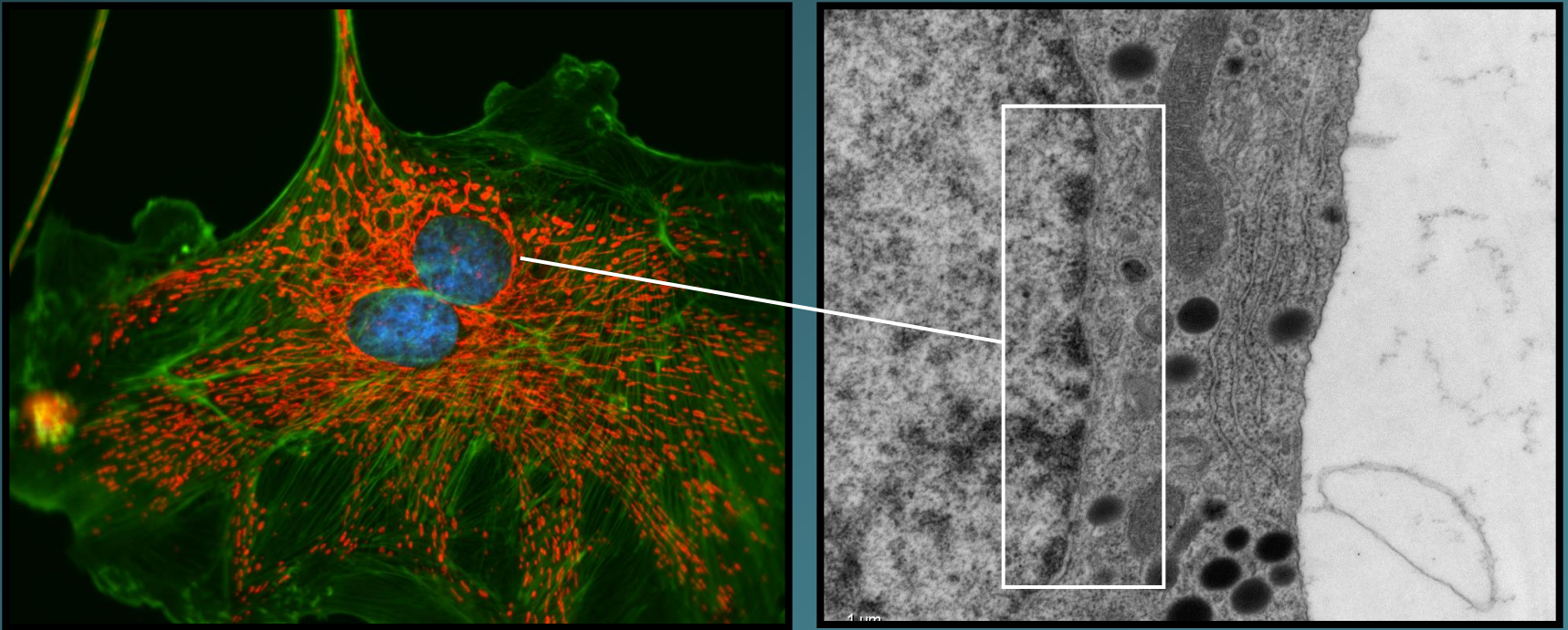
- Inclusion dans résine (Aclar, Araldite, Epon,...)
- Coupe des blocs de résine à 60-80 nm
- **Dépot sur grilles**
- Observation





Observation en Microscopie électronique à transmission (TEM)

Étude ultrastructurale en ME

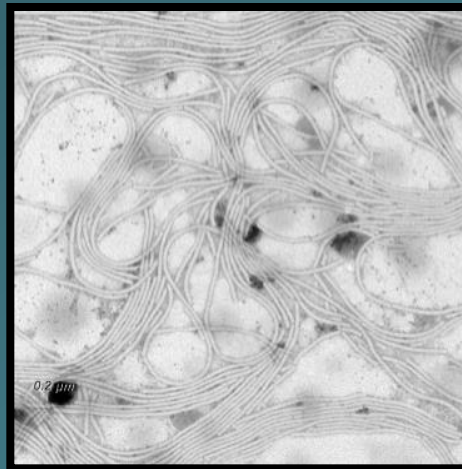


Étude ultrastructurale en ME

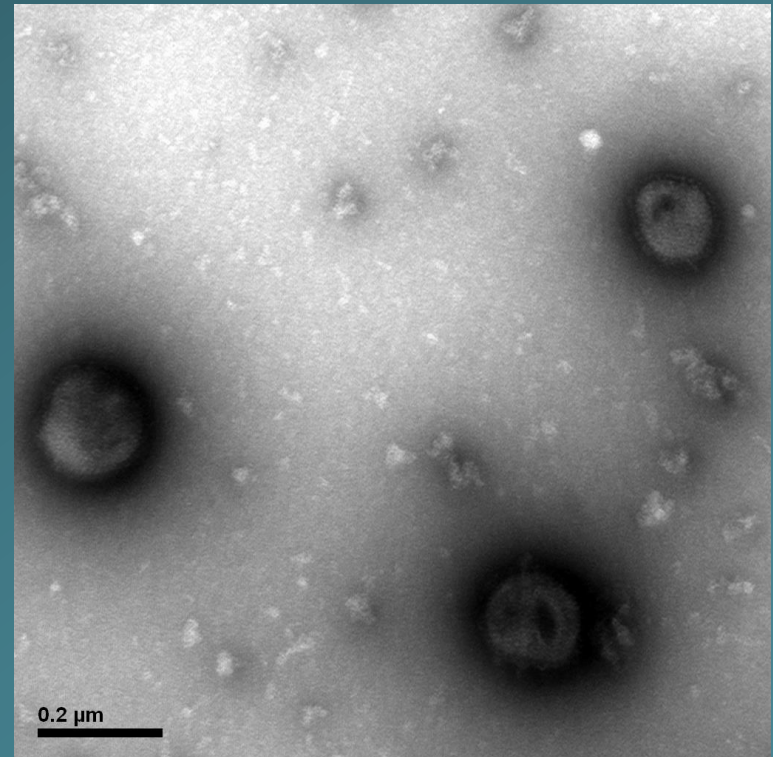
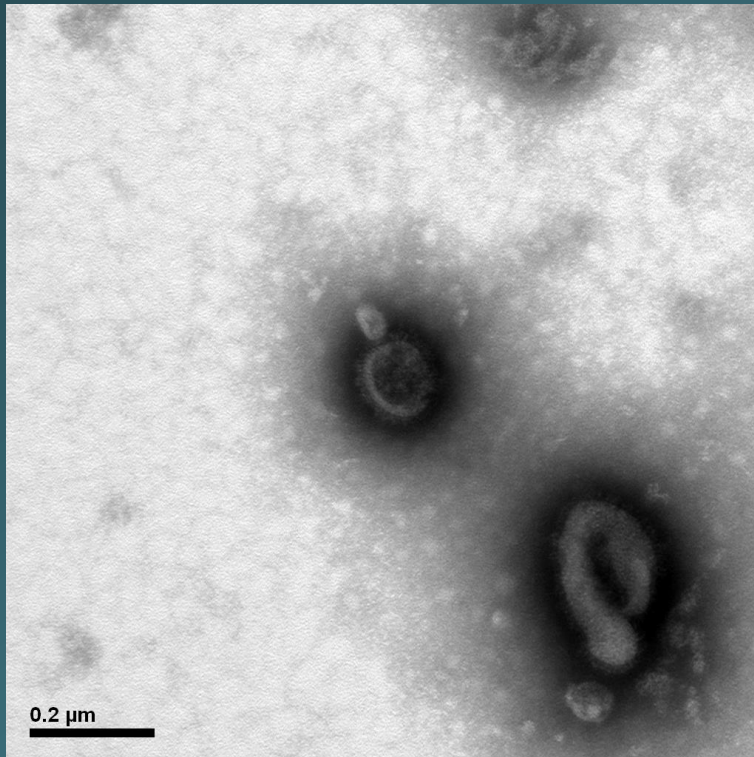
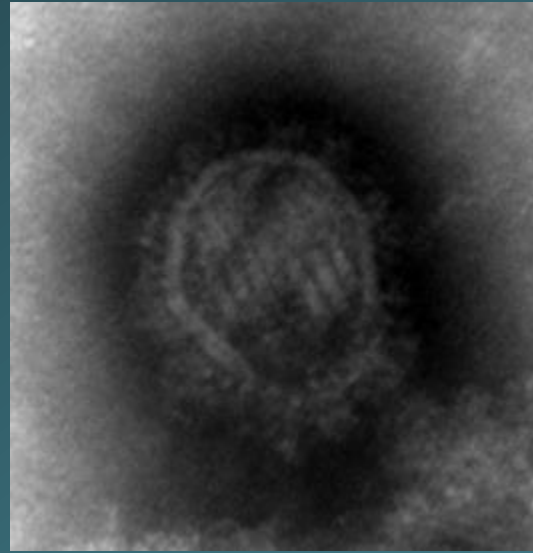
Ultrastructure
directe



**Méthylamine
tungstate**



Virus influenza

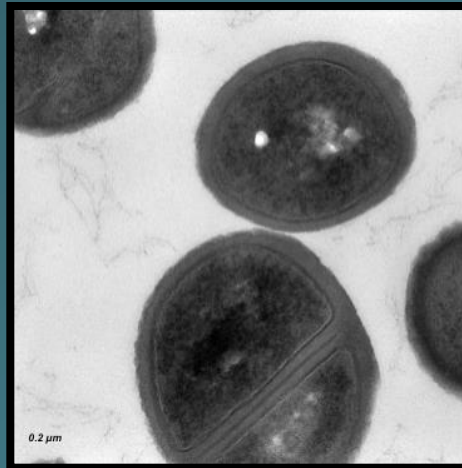


Étude ultrastructurale en ME

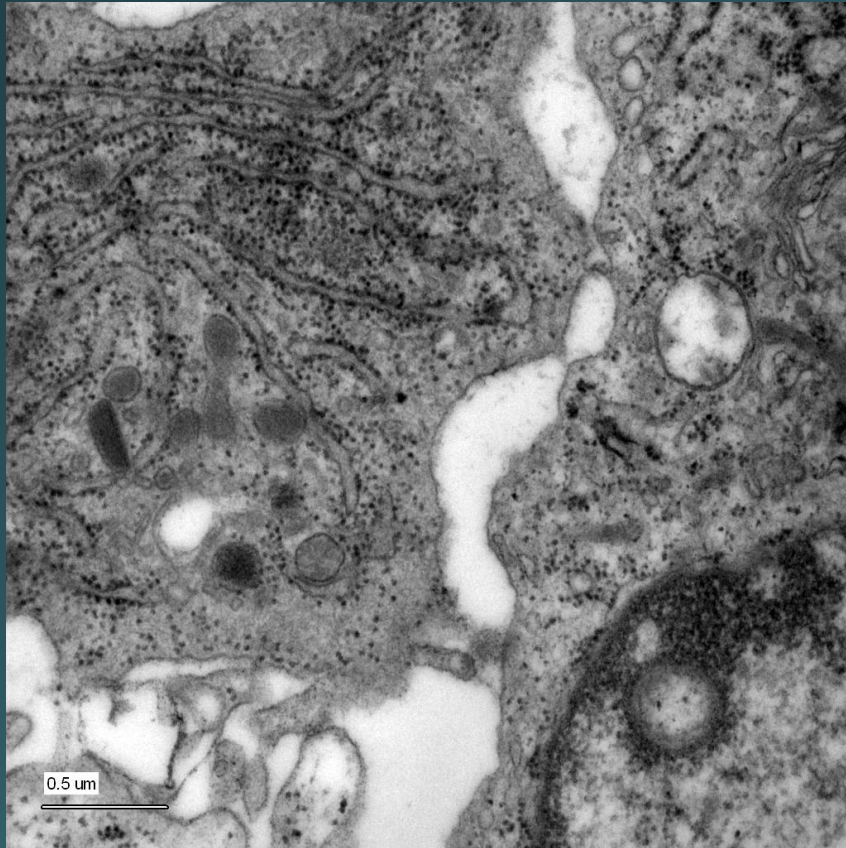
Ultrastructure
Coupes fines



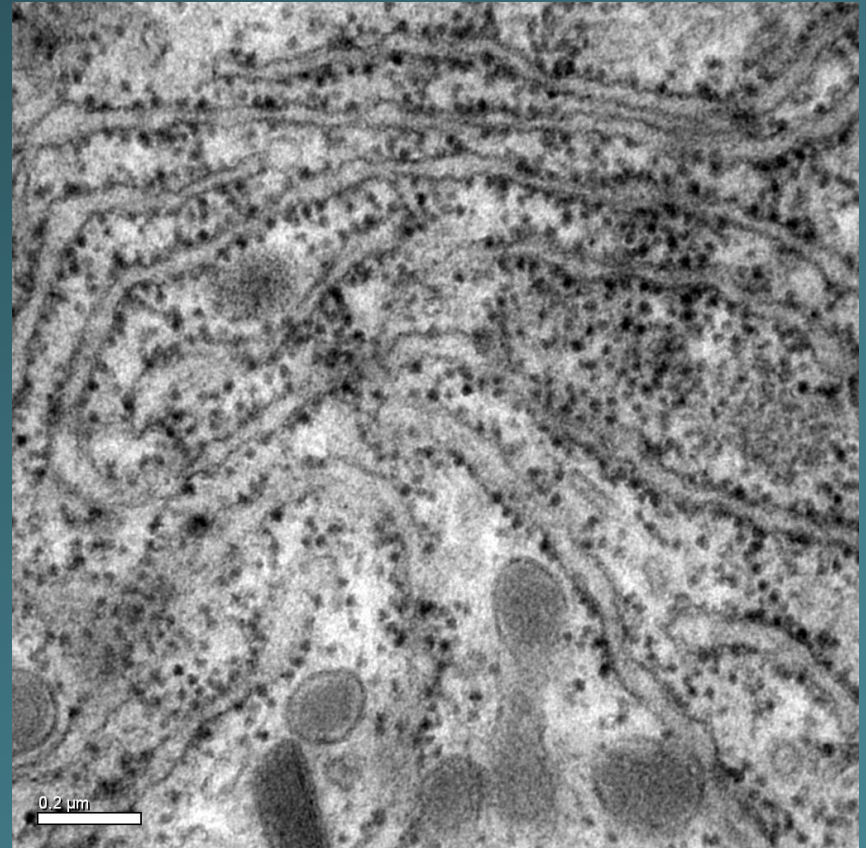
**Uranyle acétate et
Citrate de plomb**



Réticulum endoplasmique rugueux (avec ribosomes)

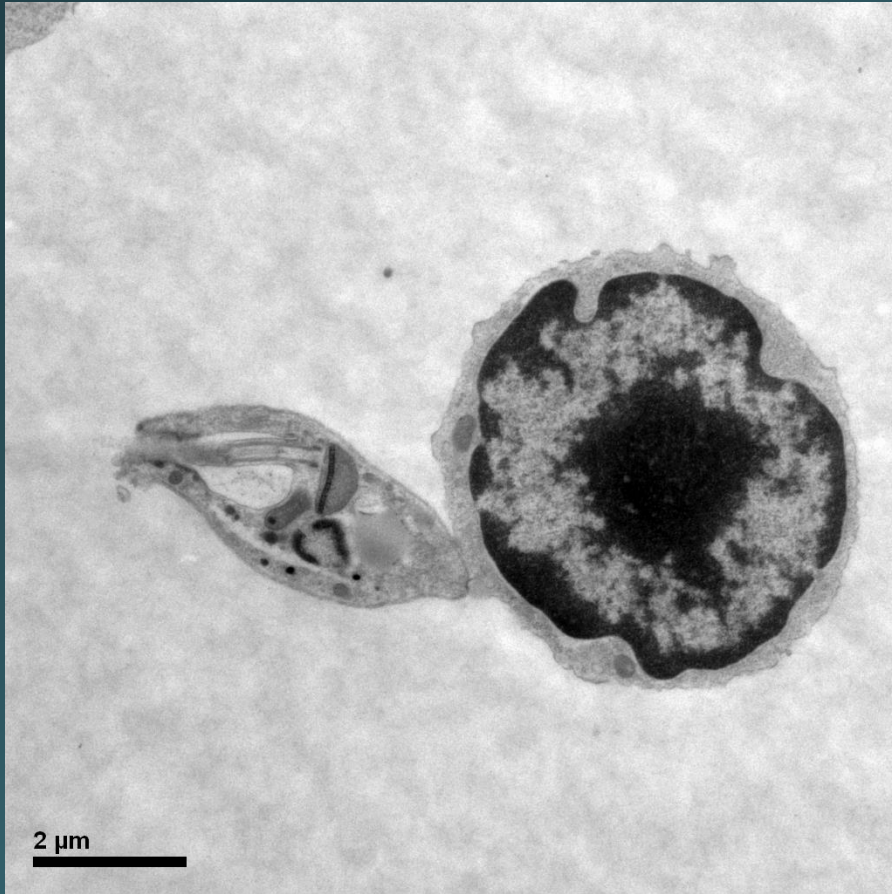


50 000 X

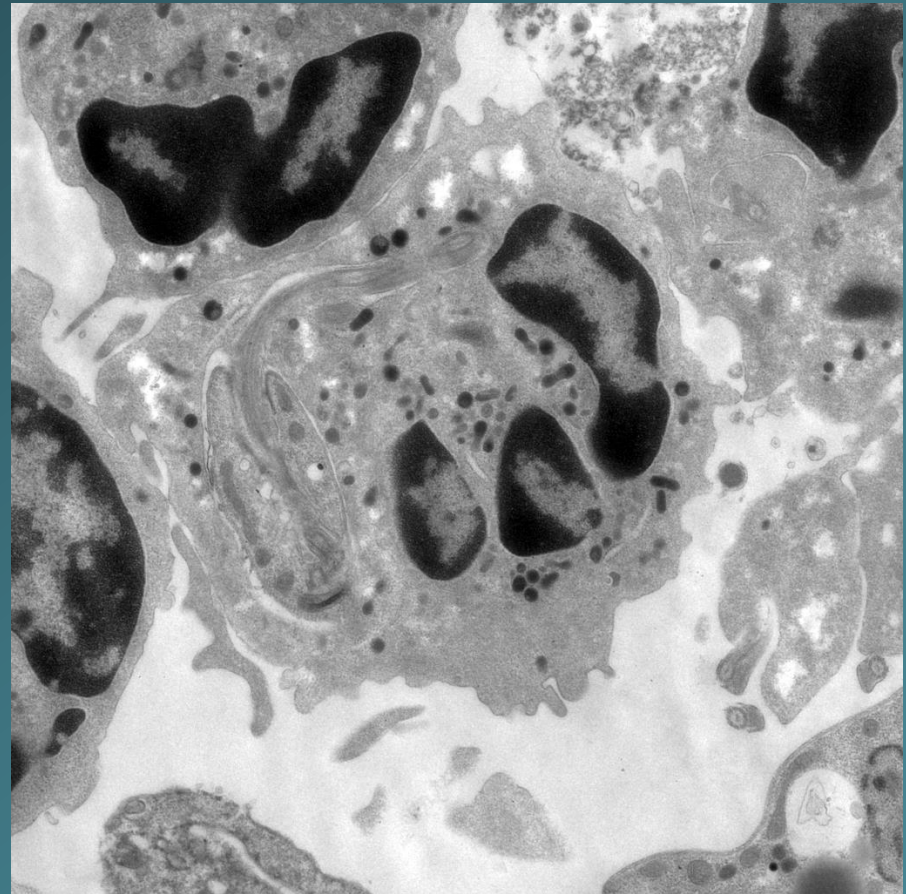


100 000 X

Neutrophiles et parasites (*Leishmania infantum*)

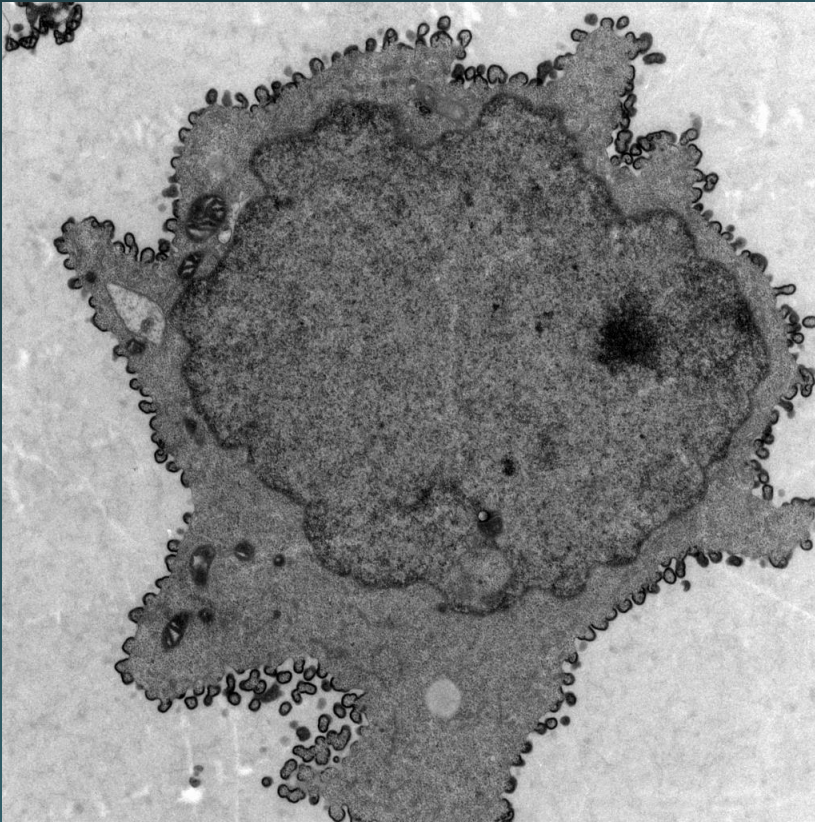


12000 X

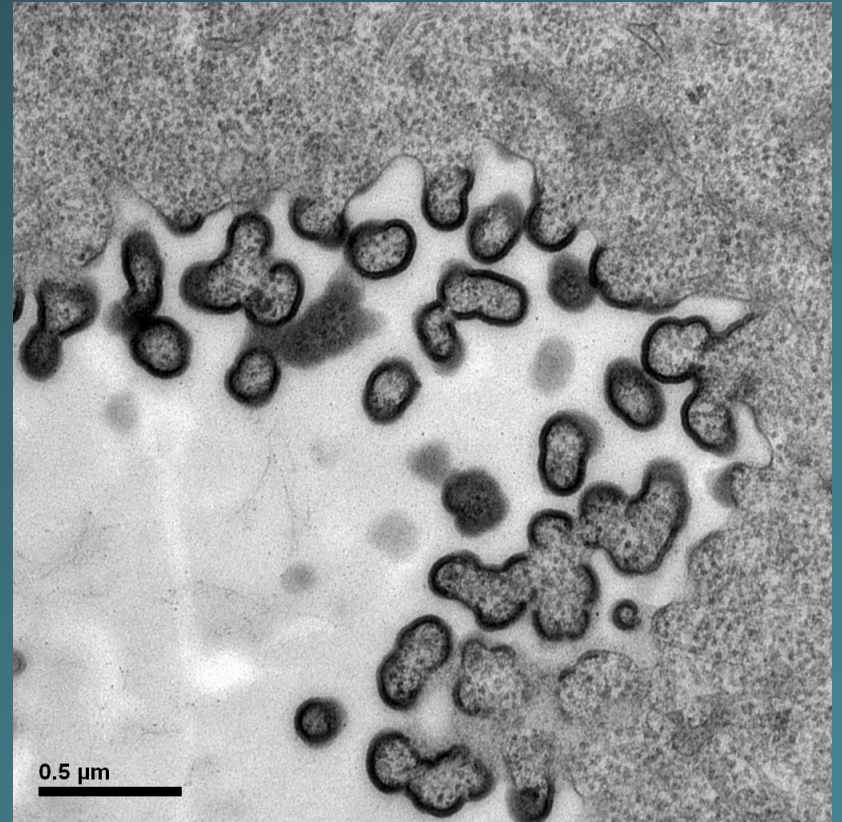


12000 X

Cellules produisant des pseudo-virus VIH



10000 X

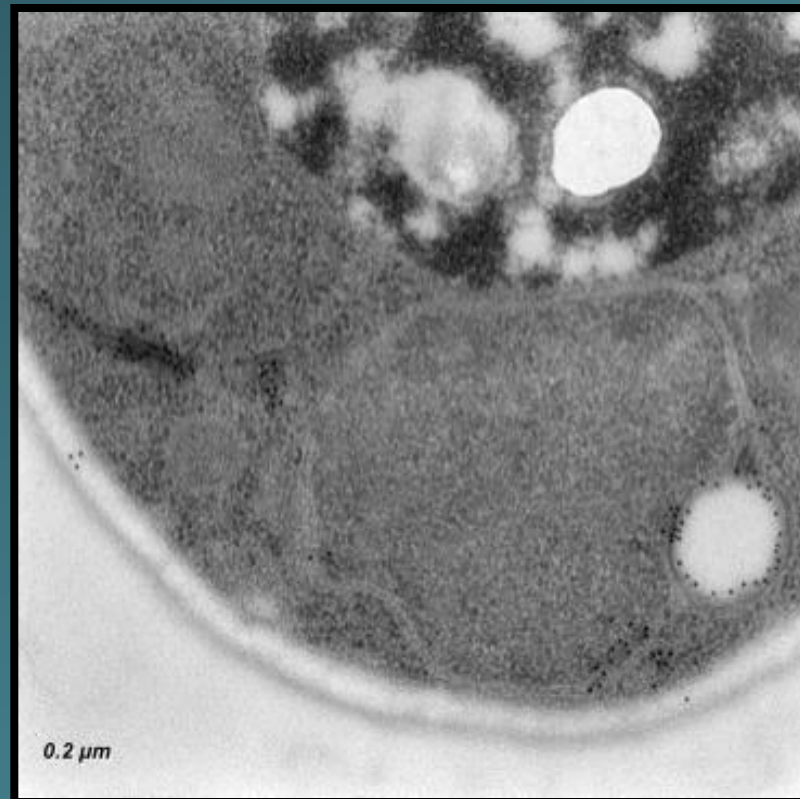
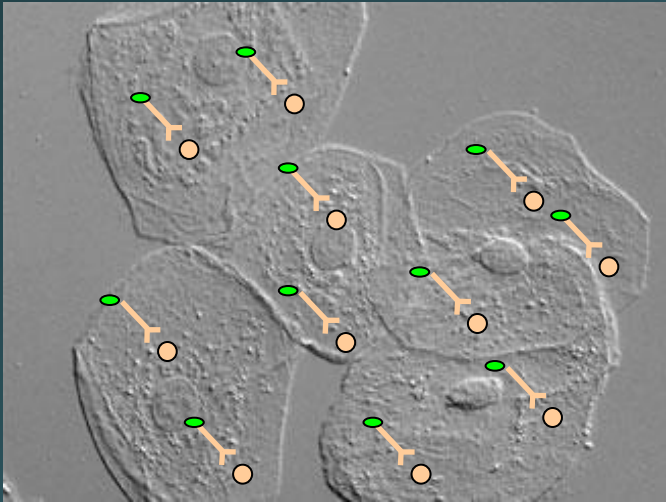


50000 X

Détection ciblée

Immunodétection
Coupes fines

Or colloïdal



Références

Abramowitz, M. «Optics, A Primer», publié par Olympus America, 1994, 22 p.

Abramowitz, M. « Microscope, Basics and Beyond», Volume 1, publié par Olympus America, 2003, 42 p.
(**Aussi disponible sur le web)

Abramowitz, M. « Fluorescence Microscopy, The Essentials», Volume 4, publié par Olympus America, 1993, 43 p.

Claxton, N.S., Fellers, T.J., and Davidson, M.W. 2005. *Laser scanning confocal microscopy*, Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, 37 p., Unpublished (<http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>)

Références

Sites Web:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

The Carl Zeiss Microscopy Online Campus: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/spinningdisk/spinningdiskfundamentals/index.html>

Olympus Microscopy Resource Center: <http://www.olympusmicro.com/>

Molecular Expressions: <http://www.microscopy.fsu.com/>

Leica Science Lab: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/>