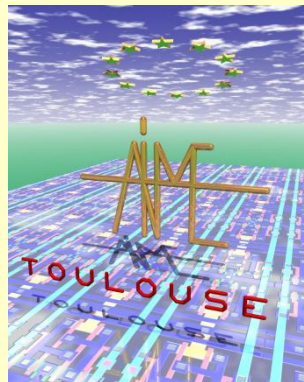


# Immunofluorescence

LAAS-CNRS

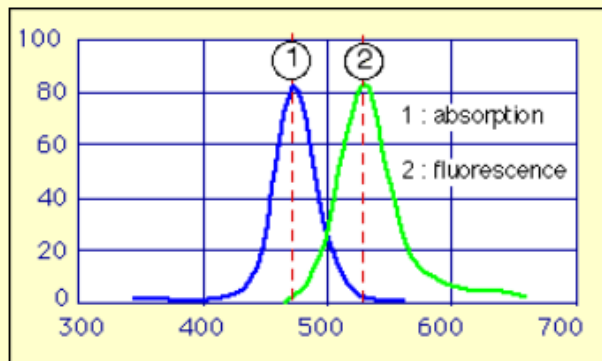


*Christophe Vieu  
Amélie Bédier  
Florent Seichepine  
Jonathan Bareille  
Angélique Coutable  
Christel Cerclier  
Christophe Thibault*

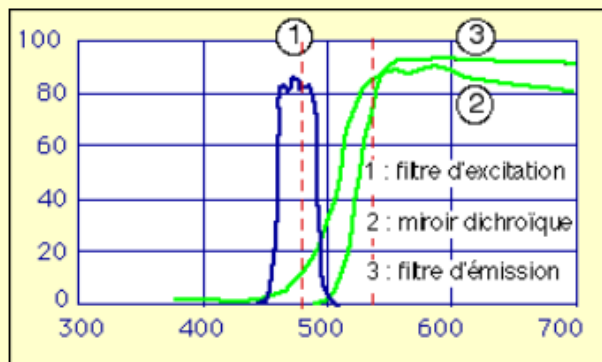
# La fluorescence

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.

Un fluorochrome est caractérisé par deux spectres : son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence.

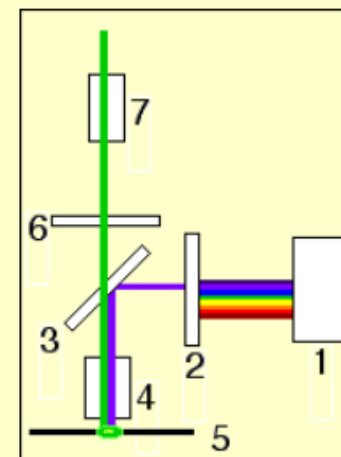


Comme on le voit, la fluorescéine absorbe les radiations /bleues (max 490nm) et restitue une fluorescence verte (max 520nm).



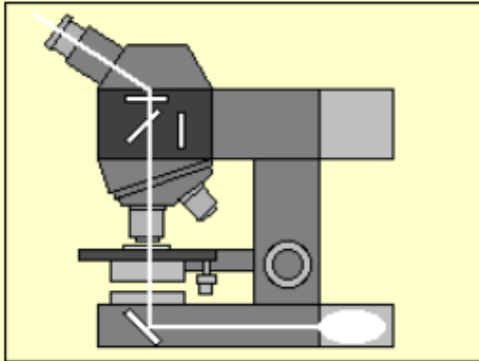
Le microscope doit être équipé d'un jeu de filtres correspondant aux caractéristiques du fluorochrome :

- 1-un filtre d'excitation permettant la sélection des radiation absorbées par le fluorochrome (autour de 490nm),
- 2-un miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations vertes et au dessus (>500nm),
- 3-un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations vertes et au dessus (>500nm).

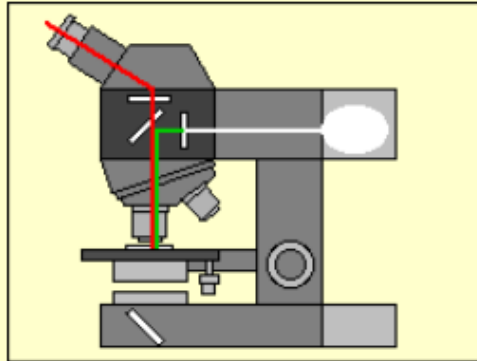
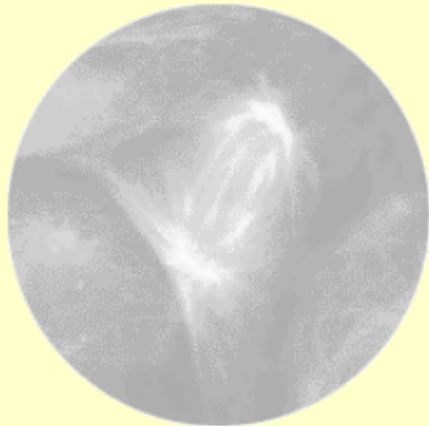


Optique simplifiée du microscope à fluorescence

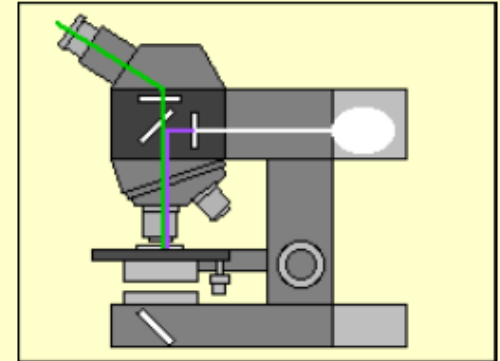
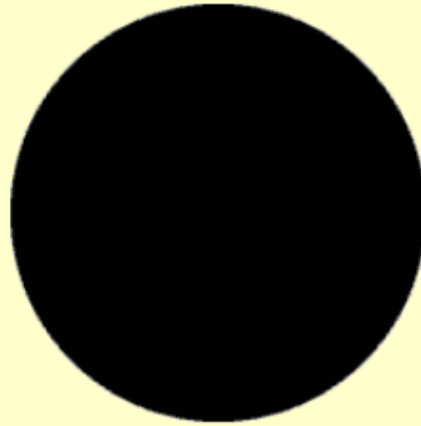
- 1-lampe à arc
- 2-filtre d'excitation
- 3-miroir dichroïque
- 4-objectif
- 5-préparation
- 6-filtre d'émission
- 7-oculaire



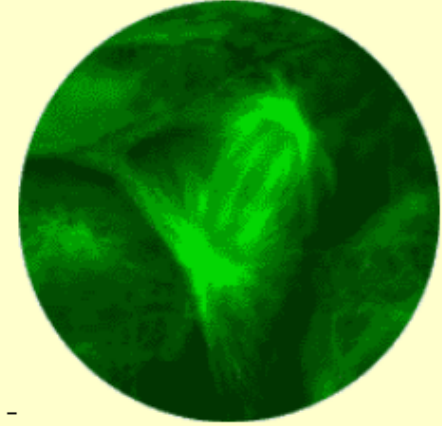
Observation témoin classique en lumière blanche.



Observation en utilisant le jeu de filtres spécifique de la rhodamine.

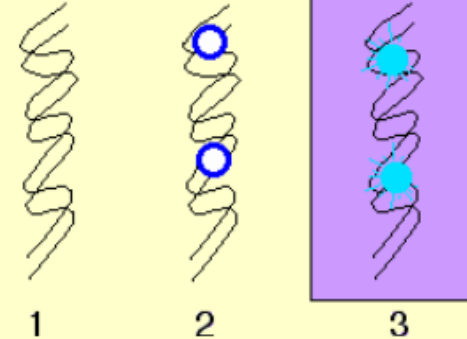
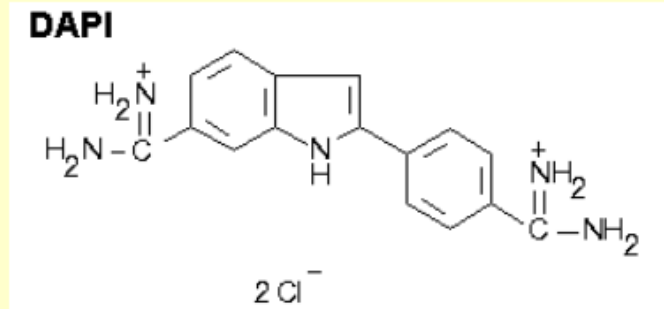


Observation en utilisant le jeu de filtres spécifique de la fluorescéine.



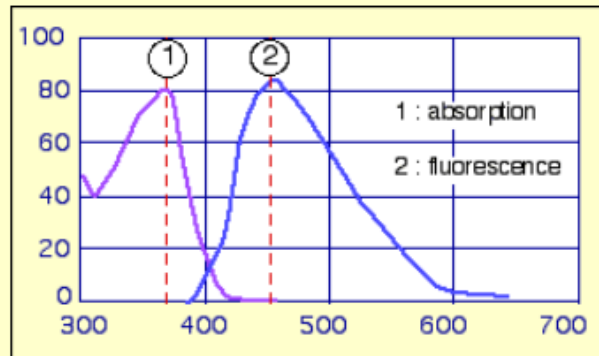
# Utilisation du DAPI

Le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) colorant utilisé en cytochimie et spécifique de l'ADN fluoresce en bleu.



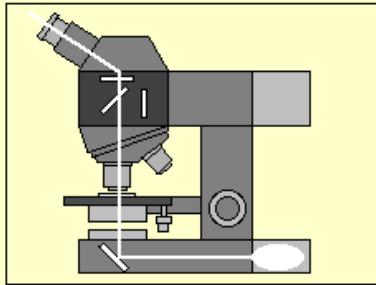
Le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) se fixe spécifiquement sur l'ADN. Eclairé en lumière violette (max 372nm), il émet une fluorescence bleue (max 456nm).

Un fluorochrome est caractérisé par deux spectres : son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence.

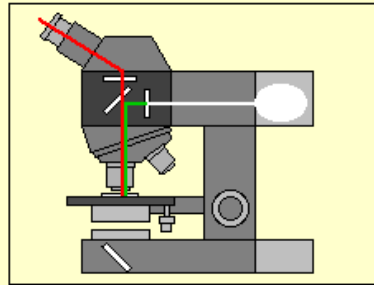
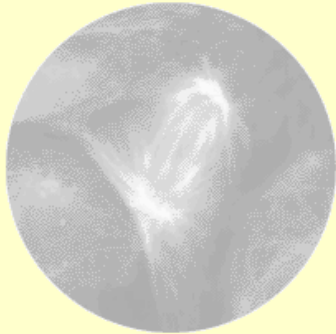


Comme on le voit, le DAPI absorbe les radiations violettes (max 372nm) et restitue une fluorescence bleue (max 456nm).

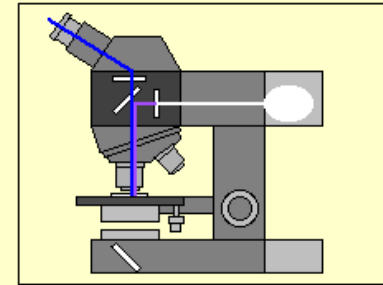
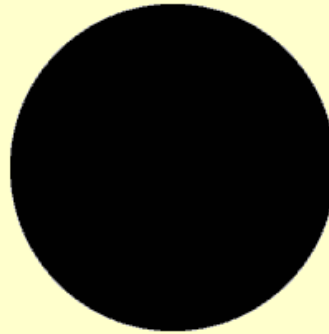
Expérience : le DAPI est utilisé pour localiser l'ADN dans des cellules en culture (cellules PTK).



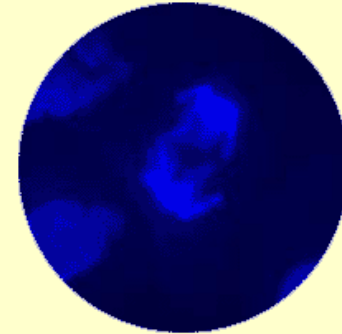
Observation témoin classique en lumière blanche.



Observation en utilisant le jeu de filtres spécifique de la rhodamine.



Observation en utilisant le jeu de filtres spécifique de la fluorescéine.

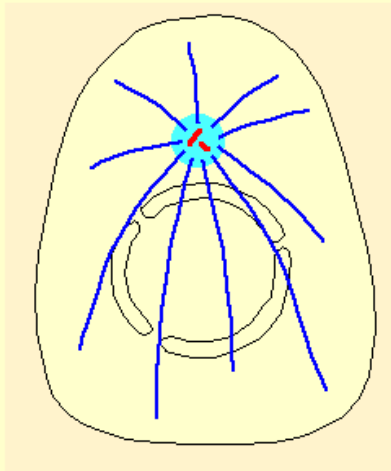


**Résultat :** l'ADN est, comme on s'en doutait, localisé essentiellement dans les noyaux (chromatine). Au cours de la mitose, on observe que l'ADN est essentiellement localisé dans les chromosomes. Le fuseau non marqué n'est pas visible.

# le cytosquelette

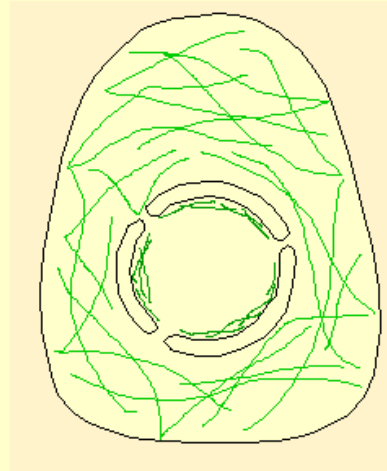
Le cytosquelette est constitué de trois composants principaux :

## les microtubules



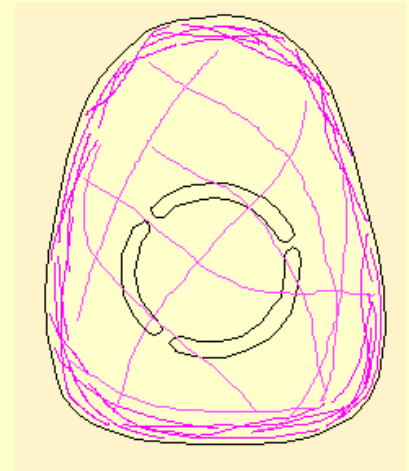
Les microtubules constituent un "réseau" dont le centre est situé au niveau du centrosome.

## les filaments intermédiaires



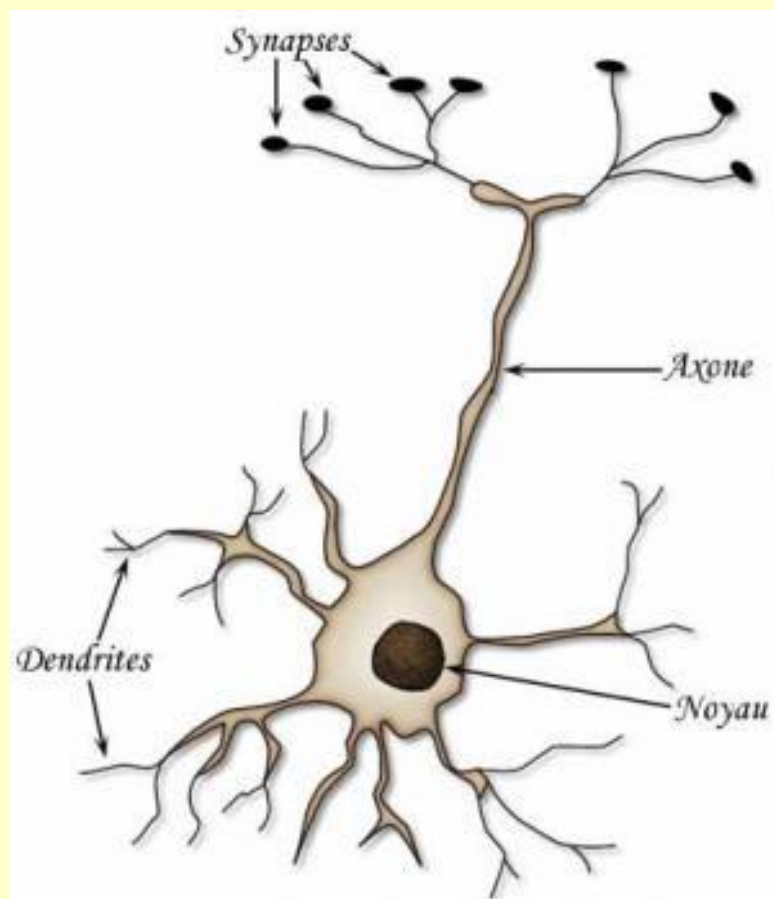
Les filaments intermédiaires constituent un réseau qui occupe tout l'espace cytoplasmique. Sous la membrane nucléaire interne ils constituent la lamina.

## les microfilaments d'actine



Les microfilaments d'actine constituent un réseau principalement localisé sous la surface cellulaire.

# Neurone



Le neurone est composé d'un corps appelé soma, et de deux types de prolongements : l'axone, unique, qui conduit le potentiel d'action, et les dendrites.

La morphologie, la localisation et le nombre de ces prolongements, ainsi que la forme du soma, varient et contribuent à définir différentes familles morphologiques de neurones



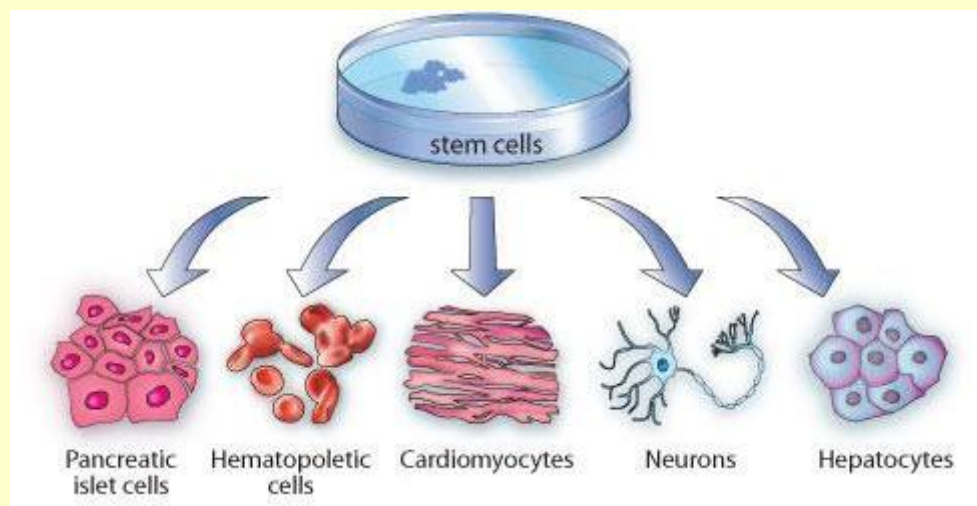
## Cellules souches : définition

En biologie, une cellule est dite **cellule souche** (ou **cellule indifférenciée**) à deux conditions :

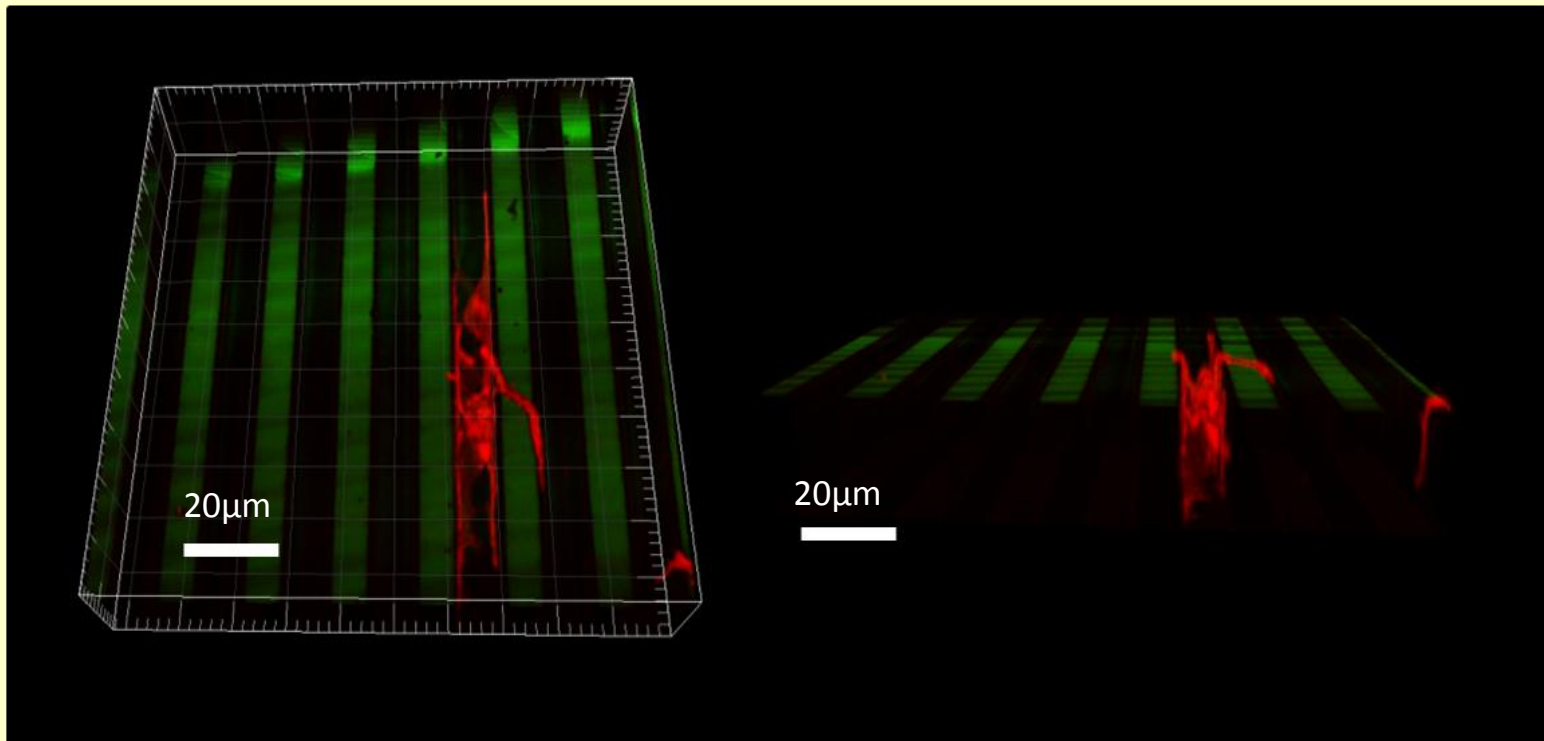
- Elle peut donner des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et,
- Elle peut pratiquement se renouveler indéfiniment

Les études sur les cellules souches adultes (ASC) ont montré qu'elles étaient présentes dans de nombreux tissus mais qu'elles n'étaient capables que de donner naissance à des cellules propres au tissu donné

Exemple : une cellule souche neurale pourra donner des neurones, des astrocytes ...



# Le microscopie optique en fluorescence confocale



Vert = Matériau microstructuré

Rouge = cytosquelette des cellules Neuro2a, cellules neurales de souris.