***Unité3 :***

***Préparations et examens microscopique***

* ***Le microscope optique***
* ***Etat frais***
* ***Frottis***
* ***Colorations***
* ***Utilisation de microscopes spéciaux***

***Préparations microscopiques***

*Elles sont effectuées sur des lames de verre ordinaire (76 x 26 x 1,2 mm) propres, éventuellement dégraissées dans un mélange d'alcool éthylique à 90 °C (9/10) et d'HCI (1/10) (dans ce cas elles sont essuyées au papier Joseph). Dans certains cas, on utilise des lamelles couvre-objets très fines (22 x 22 mm). Les préparations microscopiques utilisées sont de deux types : état frais et frottis.*

1. ***Etat frais***

*Cette préparation consiste à examiner le micro-organisme vivant en milieu liquide entre lame et lamelle. Une goutte de suspension microbienne est déposée au centre de la Lame Cette goutte doit être de petite taille pour éviter les débordements.*

*La manipulation est effectuée de manière aseptique, la lame étant placée près du bec Bunsen. Dans le cas d’une culture sur milieu solide ou d'un produit semi-solide, une goutte d'eau est déposée sur la lame et une très faible quantité de produit est prélevée à l'öse et dissociée dans la goutte. Une lamelle est ensuite appliquée sur la goutte en évitant de crée des bulles d'air et des débordements à la limite entre lame et lamelle et toujours dans des conditions aseptiques. Les grossissements utilisés sont x 10 et x 40. L'examen microscopique de bactéries à l’étal frais peut être délicat : la mise au point est difficile et peut être obtenue facilement sur une petite bulle d'air ou une impureté. Cet examen permet d'apprécier la forme et parfois la mobilité des germes étudiés. Il faut éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec les mouvements de convection susceptibles de l'entraîner.*

*L'examen à l’état frais de germes anaérobie nécessite le lutage de la lamelle à la paraffine, C'est-à-dire l’étalement de paraffine sur les quatre côtés de la lamelle, de façon à isoler la préparation de l'extérieur. Il faut manipuler la préparation avec précaution. Le lutage peut aussi être utilisé pour l'examen microscopique de germes très pathogènes (il peut inhiber la mobilité de germes aérobies).*

*L'observation terminée, il faut prendra soin de placer immédiatement la lame dans un bac d'eau de Javel pour éviter les contaminations. Des techniques particulières de prélèvement et d’examen à l'état frais sont nécessaires pour certains micro-organismes, levures filamenteuses, moisissures (culture sur lame, prélèvement au ruban adhésif).*

1. ***Frottis***

*Le frottis consiste en un étalement de la substance à étudier, suivi d'un séchage, d'une fixation et éventuellement d'une coloration. Les frottis sont réalisés fréquemment pour les bactéries ou les produits contenant des bactéries, rarement et avec une technique spéciale pour les autres microorganismes. L'étalement est réalisé à partir d'un prélèvement identique à celui effectué pour l'état frais. La goutte est ensuite étalée sur la lame avec l'öse ou la pipette Pasteur, de façon à obtenir un étalement mince, homogène, de l'ordre de 0,5 à 2 cm2. Le séchage s'effectue en portant la lame au-dessus de la flamme du bec Bunsen (20 à 30 cm) en la tenant entre pouce et index : ceci évite un chauffage trop violent. L'étalement peut être effectué conjointement. Il faut travailler dans les meilleures conditions d’asepsie, la fixation s'opère par dessiccation ; elle est réalisée, soit en chauffant fortement 2 à 3 fois une demie seconde la préparation tenue à la pince, soit en versant sur la préparation quelques gouttes d'alcool éthylique absolu que l'on enflamme (combustion de 3 à 4 secondes maximum) puis en laissant refroidir. Après fixation, on peut considérer que la lame ne présente qu'un danger de contamination très limité. Le frottis peut être examiné tel quel, mais il est souvent coloré.*

*Certains micro-organismes nécessitent des précautions en ce qui concerne la fixation : en effet, la chaleur affecte la morphologie cellulaire de germes ou de cellules fragiles ; il faut donc utiliser des techniques moins drastiques : fixation à l'alcool à froid (action de l'alcool éthylique absolu ou méthylique pendant 5 minutes puis séchage a l'air), fixation par l'intermédiaire de blanc d'œuf, ou d'un agent chimique (fixateur de Helly, de Schaudinn, vapeurs d'acide osmique utilisé pour les levures).*

*Des coupes au microtome sont parfois utilisées lors d'examens particuliers : protozoaires, parasites, champignons, organes. Elles sont fréquemment colorées.*

***Colorations***

*Les colorations sont utilisées soit pour accentuer le contraste des préparations (colorations simples) soit dans un but de mise en évidence ou d’identification (colorations différentielles). Il faut faire la différence entre colorants vitaux et non vitaux. Les colorants utilisés sont en général des dérivés d'hydrocarbures aromatiques. On les divise en deux classes (Erlich) : colorants acides (éosine, acide picrique) qui colorent uniformément les germes, et colorants basiques (fuschine, violet de gentiane) qui ont une affinité pour le cytoplasme.*

*- Coloration des états frais*

*Elle nécessite l'utilisation de colorants vitaux : rouge neutre, bleu de méthylène, vert Janus. Une goutte de colorant est mélangée à la goutte de suspension entre lame et lamelle. Dans le cas de levures colorées par exemple au bleu de méthylène, les cellules vivantes sont colorées en bleu clair, les cellules mortes en bleu foncé : cette technique permet d'apprécier de façon assez précise le pourcentage de cellules mortes contenues dans une suspension de levure. Les colorations de moisissures s'effectuent à l'aide de bleu coton au lactophénol ou d'autres réactifs.*

*- Coloration des frottis*

*La coloration des frottis peut être simple ou différentielle.*

*Les colorations simples s'effectuent en recouvrant le frottis fixé par quelques gouttes de colorant que l'on laisse agir 30 secondes à 2 minutes, puis que l'on rince à l'eau. L'examen s'effectue, généralement à l'immersion, après séchage à la flamme du bec. Les colorants utilisés les plus couramment sont le bleu de méthylène phéniqué et la fuschine de Ziehl.*

*La coloration différentielle la plus connue est celle de Gram, qui permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : Gram + et Gram -. Celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage à l'alcool sont Gram + : celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant sont dites Gram -. Il est important d'utiliser des cultures jeunes, certains Gram + ayant tendance à devenir Gram - avec l'âge (Bacillaceae). L'inverse ne se produit pas.*

*Cette méthode est basée sur la différence de structure de la paroi chez les deux groupes : forte proportion de lipides (20 %) chez les Gram -, faibles traces chez les Gram +. Le traitement par l'alcool extrait les lipides chez les Gram -. Entraînant une augmentation de la perméabilité de la paroi et l'extraction du complexe iode/violet de gentiane : ceci provoque la décoloration des organismes. Les parois des Gram + au contraire sont déshydratées par l'alcool : leur perméabilité diminue et le colorant ne peut être extrait. La réversion Gram +/Gram - est due à l'apparition d'enzymes capables de dégrader la paroi et donc d'accroître sa perméabilité ou à l'altération des structures. La méthodologie est la suivante. Quelques gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane sont répandues sur le frottis puis l'excès de violet est jeté après une minute d'action. Le frottis est ensuite recouvert de lugol de Gram ; cette liqueur prend une teinte mordorée ; on la jette au bout de quelques secondes et on répète l'opération 1 ou 2 fois jusqu'à ce que la pellicule mordorée n’apparaisse plus. La lame est ensuite décolorée à l'alcool absolu goutte à goutte en l'inclinant au-dessus de l'évier, jusqu'à ce que l'alcool ajouté n'ait plus d'action décolorante. Après lavage à l'eau du robinet, le frottis est recoloré à la fuschine de Ziehl au 1/10e pendant une minute, puis lavé à*

*I’eau, séché au buvard (ou à l’air) et examiné a l'immersion. Les Gram + apparaissent en bleu noir et les Gram - en rouge.*

*Une alternative à la coloration de Gram consiste à détecter la L-alanine aminopeptidase qui n'existe pratiquement que chez les bactéries Gram – (Campylobacter fait partie des rares bactéries Gram + possédant cette enzyme). On réalise une suspension bactérienne et on y immerge une bandelette imprégnée de L-alaninenitroanilide (Merck) : après 10 à 30 minutes au bain-marie à 37 °C, une coloration jaune traduit l'hydrolyse de ce substrat et indique un caractère Gram - (il est prudent de réaliser des témoins avec des souches connues).*

*Il existe d'autres colorations différentielles : colo­ration de Ziehl Nielsen des mycobactéries, coloration des spores de bactéries et de levures, coloration des cils, des capsules, colorations cytochimiques diverses.*

*Certaines colorations peuvent être réalisées par des automates : Bio Color (AES).*