

## TD 01

### Le monde microbien et la microscopie

#### LE MONDE MICROBIEN

Les **microorganismes** communément aussi appelé **microbes**, forment un ensemble d'organismes vivants de **taille microscopiques**. Ils sont donc invisibles à l'œil nu et ne peuvent être observés qu'à l'aide d'un **microscope**. C'est en fait leur seule propriété commune car ils sont, par ailleurs, extrêmement variés et différents par leur **morphologie**, **physiologie**, **mode de reproduction** et leur **écologie**.

#### Découverte du monde microbien

- Plusieurs chercheurs suspectaient l'existence de microorganismes. Le médecin G. Fracastoro (1478-1553) avait suggéré que des êtres vivants invisibles provoquaient des maladies.
- L'histoire des microorganismes remonte à leur première observation par l'homme, réalisée vers 1667 par le Hollandais Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), à l'aide d'un microscope rudimentaire, relativement simple, composé de lentille maintenue entre deux plaques d'argent. Il s'est mis à observer toutes sortes d'échantillons : peau, salive, eau,....découvrant ainsi le **monde microbien** qualifiés « **animalcules** », ses nombreuses descriptions ont été publiées par le prestigieux Bulletin de la *Royal Society* de Londres.
- Louis Pasteur (1822-1895) et John Tyndall (1820-1893) ont défini le caractère ou la présence **ubiquitaire** de bactéries dans l'environnement.
- La première démonstration directe du rôle des bactéries dans les maladies vint de l'étude du **charbon** par le médecin allemand Robert Koch (1843-1910). Ces relations sont connues sous le nom de **Postulats de Koch**.

- 1- Le microorganisme doit être présent dans chaque cas de maladie, mais absent chez des organismes sains.
- 2- Le microorganisme suspect doit être isolé et cultivé en culture pure.
- 3- La maladie doit se développer quand le microorganisme isolé et inoculé à un hôte sain.
- 4- Le même microorganisme doit de nouveau être isolé de l'hôte malade.

#### Classification du monde vivant

Il existe plusieurs classifications du monde des organismes vivants qui selon le cas, répartis en **3, ou 5** sur la base de divers critères.

- Dès 1866, Ernest. HAEKEL propose de réunir l'ensemble des microorganismes dans le règne des **protistes**. Ce qui apporté une première réponse à leur répartition arbitraire entre animaux et végétaux et aboutit à la classification des organismes vivants en **3 règnes** : Le **règne des Animaux**, le **règne des végétaux** et le **règne des Protistes**. (les cellules sont différenciées en tissus, les protistes non)
- Cependant, la classification en **5 règnes** en 1969, proposée par Robert WITTAKER reste relativement répandue basée sur : **Type cellulaire ; niveau d'organisation cellulaire, et le type de nutrition**. Elle comprend :

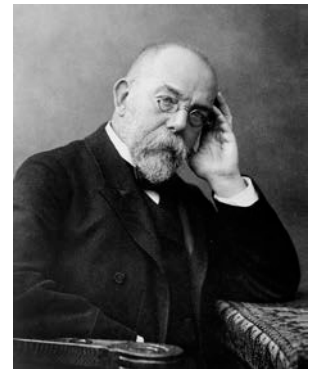
- Le **règne des Animaux** (*Animalia*) : Ensemble des organismes eucaryotes, hétérotrophes et dépourvus de paroi cellulaire.
  - Le **règne des Végétaux** (*Plantae*) : Ensemble des organismes eucaryotes, autotrophes et possédant une paroi cellulaire.
  - Le **règne des Mycètes** (*Fungi*) : Ensemble des organismes eucaryotes, hétérotrophes et possédant une paroi cellulaire
  - Le **règne des Protistes** (*Protista*) : Ensemble des organismes eucaryotes unicellulaires.
  - Le **règne des Monères** (*Monera ou procaryotae*) : Ensemble des organismes procaryotes, unicellulaires.
- Carl Woese et al. Proposent dès 1990 une nouvelle classification des organismes vivants en **3 domaines**, au rang taxinomique supérieur au règne basée sur le séquençage des molécules de l'ARNr:
- **Domaine des Archaea** regroupe l'ensemble des Archaeobactéries (protistes procaryotes primitif) qui un groupe évolutif à la fois homogène et très différents des Bactéries ;
  - **Domaine des Bacteria** formé des bactéries qui constituent un second groupe distinct ;
  - **Domaine des Eucarya** où sont réunis tous organismes vivants eucaryotes, répartis dans le règne des animaux (*Animalia*), le règne des plantes (*Plantae*), le règne des protistes (*Protistae*), le règne des mycètes (*Fungi*)



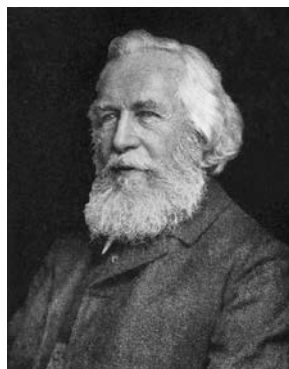
Antonie Van Leeuwenhoek



Louis Pasteur



Robert Koch



Ernest HAEKEL



Carl Woese

## LA MICROSCOPIE

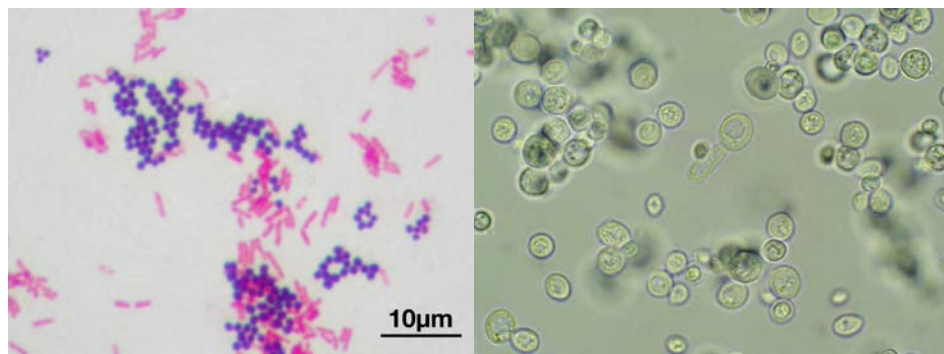
- **La microscopie** est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures à l'échelle microscopique. Utilisant des méthodes tel que : la **microscopie optique (ou photonique)** et la **microscopie électronique**.
- **Le microscope** est un système d'observation visuelle ou un instrument qui donne une image grossie d'un petit objet (**grossissement**), sépare les détails de celui-ci sur l'image (**résolution**) et rend les détails visibles à l'œil nu ou avec une caméra.

### I. MICROSCOPE OPTIQUE

- Les microbiologistes utilisent couramment divers microscopes optiques (photonique) : le microscope à **fond clair**, à **fond noir**, à **contraste de phase** et le microscope à **fluorescence**... Chaque sorte de microscope a son utilité pour des applications précises.
- Le principe de fonctionnement des microscopes optiques est basé sur l'utilisation de systèmes optiques à **lentilles de verre**

#### I.1. Microscope optique à fond clair

- C'est le plus simple des microscopes, utilisé en routine dans les laboratoires de microbiologie ou il peut être employé pour l'analyse des échantillons traités par des colorants **simple (coloration simple)** (ex. coloration au bleu de méthylène..) ou **différentiels (coloration différentielles)** (ex. coloration de Gram, Ziehl Neelsen...) pour **accentuer le contraste** entre les différentes structure cellulaires, et visualiser des objets vivants variés tels que les bactéries, les champignons microscopiques...),
- L'observation peut se faire directement à **l'état frais** (observation vitale) sans aucun traitement entre lame et lamelle (Morphologie générale), ou également l'échantillon est **fixés et coloré** (Structures cellulaire spécifiques).
- Ce microscope est ainsi appelé parce qu'il forme, en effet, une image foncée sur un fond clair. (L'échantillon biologique est placé sur lame de verre).
- Il permet de recueillir la lumière de la source dans les objectifs, après avoir été transmise par l'échantillon.
- L'échantillon est éclairé par dessous et observe par-dessus.



**Fig.** Cellule bactériennes fixées et colorées (à gauche) et levure (état frais)(à droite) sous microscope à fond clair

#### II.2. Microscope optique à fond noir

- Révèle la présence, mais pas la structure, des échantillons qui sont invisibles en fond clair (**trop transparents** ou **insuffisamment contrastés**), car ils sont transparents ou au-dessous du pouvoir de séparation du microscope.
- Les éléments observés apparaissent **brillants** (enveloppes bactériennes, flagelles, vacuoles...).

- est très indiqué pour l'observation à l'état frais (état vivant), mais pas pour une observation fixée et colorée.
- Utilise les rayons lumineux dans un fond noir.



Fig. Image d'une puce d'eau observée au microscope à fond noir.

### II.3. Microscope optique à contraste de phase

- Les objets à observer sont très fins et transparents et souvent invisibles. Néanmoins, la lumière qui est renvoyée par l'échantillon, même s'il est invisible à l'œil nu, contient son image.
- Nécessite un éclairage très précis dit de **Koehler**.
- L'observation de cellules à l'état frais non altérées.

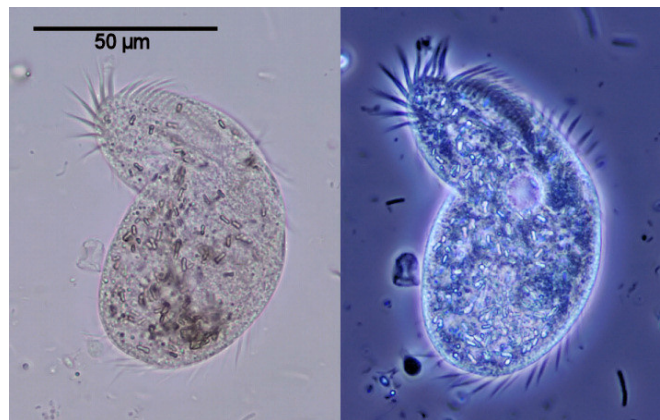


Fig. Cilié observé sous microscope à fond clair (à gauche) et à contraste de phase (à droite)

### II.4. Microscope optique à fluorescence

- C'est un microscope à fond clair doté d'un module lumineux spécial
- Utilise pour certaines molécules fluorescentes (**qui émettent une lumière**) quand on les éclaire avec une lumière de longueur d'onde supérieure (**ultraviolette, violette ou bleue**)
- Consiste à utiliser des colorants fluorescents tels que la rhodamine (**émet une lumière rouge**) et la fluorescéine (**lumière verte**)

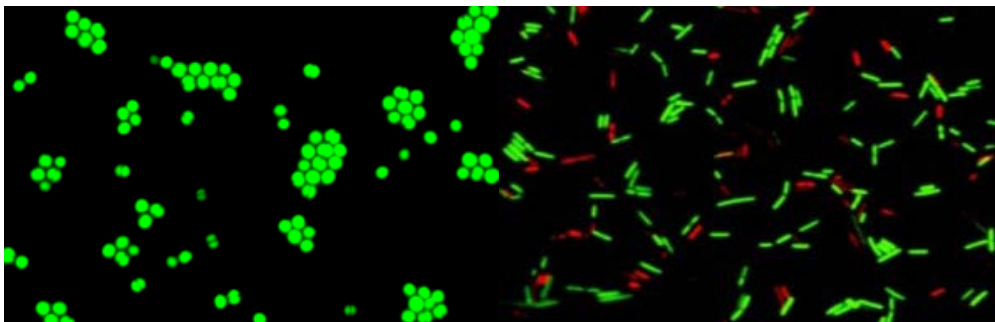


Fig. Bactéries de forme cocci (à gauche) et bacille (à droite) sous microscope à fluorescence.

## II. MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

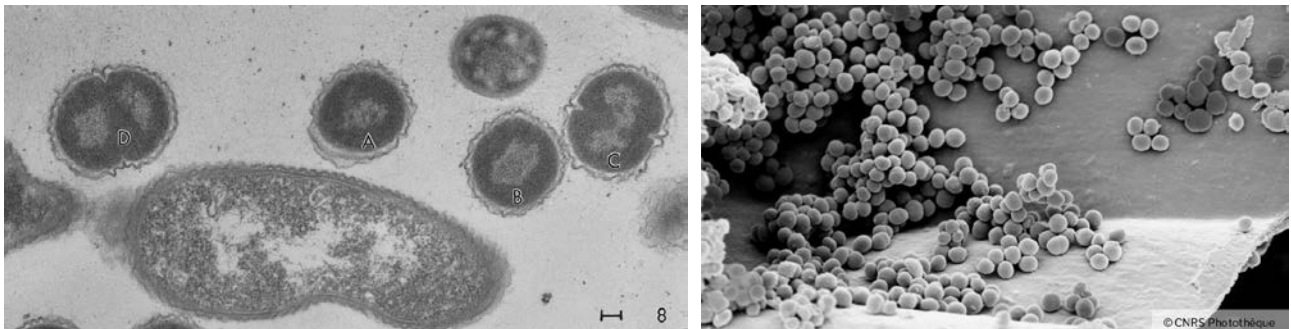
- Il est différent du microscope optique dans son principe de fonctionnement et par ses performances.
- Son utilisation a permis la caractérisation de toutes les structures internes de la cellule y compris à l'échelon moléculaire (**Ultrastructure**).
- Dans son principe est basé sur l'utilisation d'un **faisceau d'électrons**, au lieu d'un faisceau de photons
- Grâce à la longueur d'onde plus courtes d'électrons, les échantillons observés peuvent avoir des structure de taille inférieure à 0.2 $\mu$ .
- L'observation au microscope électronique est réalisée sur **des coupes ultrafines (préparation destructives)**.

### II.1. Microscope électronique à transmission (MET)

- Le MET génère un faisceau d'électrons de très courte longueur d'onde
- L'échantillon observé en coupe ultrafines est traversé par les électrons qui focalisent en restituant son image **bidimensionnelle**
- Le MET peut avoir une résolution 100.000 fois celle de l'œil humain
- Son utilisation a permis la caractérisation de toutes les structures internes de la cellule y compris à l'échelon moléculaire.

### II.2. Microscope électronique à Balayage (MEB)

- Les électrons ne traverse pas l'échantillon, ils ont dirigé vers la surface d'échantillon qui balayé (**image trois dimension**)
- Le résultat de l'émission d'électrons révèle une structure de résolution limité à 10nm avec l'observation des échantillons plus volumineux.



**Fig.** Observation microscopique électronique des cellules bactérienne au MET (à droite)  
au MEB (à gauche)

## III. Présentation du microscope optique

La plupart des microscopes optiques utilisent la lumière visible (d'autres utilisent rayon X, rayon infra rouge, ou ultraviolet). Le microscope classique est composé de **02 parties essentielles**

**A. Partie optique** : comporte l' (les) oculaire (s), l'objectif et le système d'éclairage (source lumineuse).

- **L'oculaire** : La partie ou on met l'œil. Comporte une lentille qui grossit l'image de l'objet, en général 10 fois, les microscopes plus évolués ont des oculaires pour les deux yeux et sont appelés microscopes binoculaires, comme il existe également des microscopes monoculaires.
- **L'objectif** : c'est la lentille inférieure qui nous rapproche de la préparation à examiner, il y a habituellement 03 à 05 objectifs correspondant aux grossissements 10X, 40X, 100X....

(Faible, moyenne et haute puissance), ils sont interchangeables par simple rotation de leur base commune (tourelle revolver)

- **Système d'éclairage** : il se compose d'une source lumineuse (**lampe ou miroir**). L'objet à examiner est éclairé par le **condensateur** qui est menu à sa base d'une **lampe**, un **diaphragme** permet de varier l'ouverture du faisceau éclairant.

### B. Une partie mécanique :

- **Le pied (corps métallique robuste)** : il permet d'assurer la stabilité du microscope, on maintient la distance qui convient entre l'oculaire et l'objectif.
- **La potence** : c'est le bras de l'appareil qui supporte le tube optique et la platine (Pour transporter un microscope, on le tient par la potence).
- **La platine** : c'est le plateau où l'on fixe la lame à examiner au moyen des valets. La platine est équipée d'une ouverture permettant le passage des rayons lumineux.
- **La vis macrométrique (bouton d'ajustement grossier)** : Élevé ou abaisse la platine pour faire la mise au point sur l'objet. Utiliser seulement avec l'objectif de faible puissance.
- **La vis micrométrique (bouton d'ajustement fin)** : Permet le réglage précis de l'objectif de moyenne ou haute puissance.
- **Le revolver porte-objectifs** : Tête pivotante qui tient deux ou plusieurs objectifs et qui tourne pour changer d'objectif.

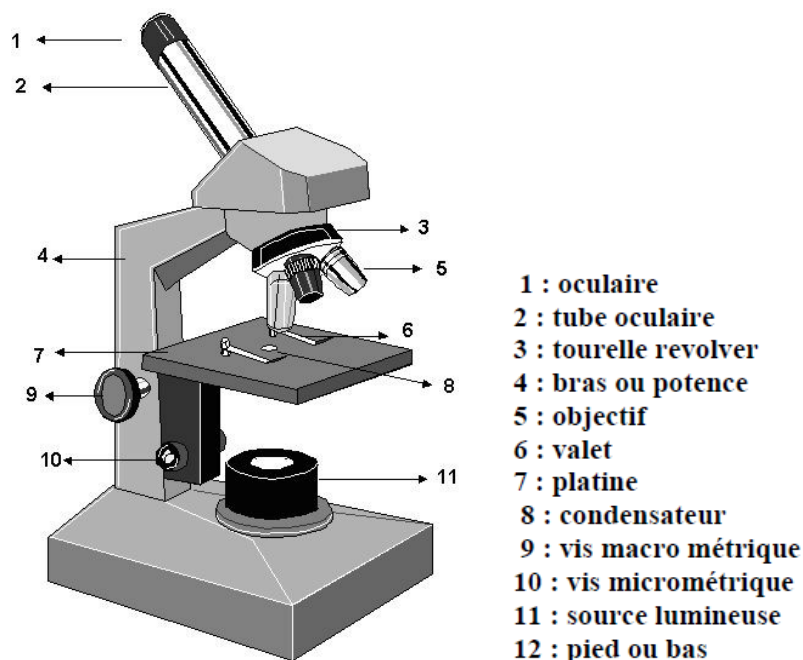


Fig. Schéma d'un microscope optique monoculaire

### IV. RÉOLUTION D'UN MICROSCOPE

- La partie la plus importante du microscope est l'objectif. Il doit produire une image nette et pas seulement un agrandissement.

- **La résolution** : est la capacité d'une lentille de séparer ou distinguer des petits objets proches l'un de l'autre, c'est la plus petite distance séparant deux objets que l'on peut distinguer à l'aide du microscope : elle dépend de la qualité des lentilles et de la nature même de la lumière : elle est au maximum de 0,2  $\mu\text{m}$ .
- **La distance de travail** : est la distance entre l'objectif et l'objet : elle doit être d'autant plus petite que le grossissement recherché est fort.

- C'est le physicien allemand Ernst Abbe qui, dans les années 1870, développa en grande partie la théorie de l'optique d'un microscope.

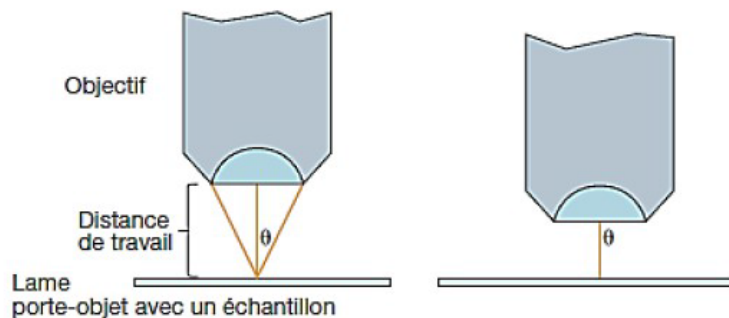
$$d = \frac{0,5\lambda}{n \sin \theta}$$

**d** : la distance minimale entre deux objets, qui permet de les discerner les uns aux autres.  
**λ** : (lambda) est la longueur d'onde de la lumière utilisée pour éclairer l'échantillon.  
**n sin θ** : est l'ouverture numérique (ON).  
**L'ouverture numérique** ( $n \sin \theta$ ) est définie par deux composants :  
**n** est l'indice de réfraction et **θ** est la moitié de l'angle du cône de lumière entrant dans l'objectif

**Note :**

- L'indice de réfraction de l'air est de **1,00**.
- L'indice de réfraction de l'huile à immersion et du verre est de **1,51**.
- ( $\theta$  maximum est  $90^\circ$  et  $\sin 90^\circ$  est 1,00). Aucune lentille utilisée dans l'air ne peut donc avoir une ouverture numérique supérieure à 1,00.

- Lorsque **d** (distance minimal) devient plus petite, la résolution **augmente** et les détails plus fins peuvent être discernés dans un échantillon.
- Le seul moyen pratique d'augmenter l'ouverture numérique au-dessus de 1,00 et donc d'atteindre une meilleure résolution, est d'**augmenter l'indice de réfraction** avec de l'huile à immersion (un liquide incolore dans laquelle la lumière se propage à la même vitesse que dans le verre) sur la préparation : on réalise alors une observation "à l'immersion", l'huile remplaçant l'air entre l'objet et l'objectif.
- d diminue lorsque la longueur d'onde de la lumière utilisée diminue et lorsque l'ouverture numérique (ON) augmente.
- La plus grande résolution est donc obtenue avec une lentille d'ouverture numérique la plus grande possible et une lumière de la longueur d'onde la plus courte dans le spectre visible (entre 450 et 500 nm).



**Fig.** L'ouverture numérique d'un microscope

**Remarques**

- Une lentille a une ouverture angulaire et numérique plus grande, sa résolution est plus grande et sa distance de travail est plus petite.
- La plupart des microscopes standards ont un oculaire de grossissement de 10x et le grossissement maximal avec l'huile à immersion est de 1 000x.
- Une augmentation supplémentaire du grossissement ne permettra pas de voir plus de détails.
- Seul le microscope électronique a une résolution suffisante pour permettre des grossissements plus importants.