



Institut Universitaire de Technologie de Douala

COURS DE MICROSCOPIE

Par:

Pr. LEOPOLD GUSTAVE LEHMAN

Immuno-parasitologue MSc, Dr. Rer. Nat.

Site Web: **www.ured-douala.com**

E-mail: **blehman@yahoo.fr**

Mars 2014

LA MICROSCOPIE

1- Définition

La microscopie est l'observation d'un échantillon (préparation microscopique) à travers le microscope. Elle permet de rendre visible les éléments invisibles à l'œil nu, soit par leur taille, soit par leurs couleurs.

2- Types de microscopie

On distingue plusieurs types de microscopie :

2-1. La microscopie optique

Le microscope optique permet d'observer les cellules qui sont généralement des corpuscules incolores et translucides. *L'unité de mesure communément utilisée en microscopie est le micron ou le micromètre = $10^{-6}m$, le nanomètre $1\text{ nm} = 10^{-9}m = 10\text{ Angströms}$.*

2-1-1. Description d'un microscope

Les différentes parties d'un microscope sont :

Le **pied** : partie (lourd, robuste et stable) sur lequel repose le microscope. Il comporte la potence et la platine.

La **platine** : surface plane sur laquelle est posé l'objet à observer. Elle est évidée en son centre pour permettre le passage des rayons lumineux et porte deux valets métalliques qui servent à tenir la lame porte objet à observer. Ronde ou le plus souvent carrée, la platine est équipée d'un chariot mobile qui permet les déplacements horizontaux de la préparation en tous sens et le repérage de sa position.

La **potence** ou bras du microscope est la partie rigide qui relie la platine au tube.

Le **statif** : ensemble formé du **pied** , la **platine** et la **potence** portant le tube.

Le **porte-oculaires ou tête** peut être simple dans le cas des microscopes monoculaires, ou équipé d'un système de prismes pour permettre la vision binoculaire. Dans ce cas, les deux oculaires sont réglables l'un par rapport à l'autre permettant la modification de l'écartement de deux yeux.

L' **oculaire** : joue le rôle d'une loupe qui grossit l'image.

Le **porte-objectifs ou revolver** : permet d'amener dans l'axe du tube l'objectif choisi et de le maintenir en place grâce à un cran d'arrêt.

Les **objectifs** : soit chromatiques pour une utilisation en lumière UV soit achromatiques pour utilisation d'une source lumineuse blanche. On les utilise soit à sec (état frais), soit à immersion (la lentille frontale trempe dans de l'huile synthétique dite « huile à immersion »).

Le **condenseur ou condensateur** : qui permet d'éclairer l'objet de façon uniforme et de moduler, grâce à un diaphragme, la quantité de lumière qui arrive sur l'objet. Il peut être réglé pour une utilisation en lumière directe, en contraste de phase, en fond noir. Les microscopes actuels ont un condenseur préréglé, pour une efficacité maximale, en position haute.

Le **diaphragme** : présent sur de nombreux modèles de microscopes, il permet de régler la quantité de lumière traversant la préparation microscopique.

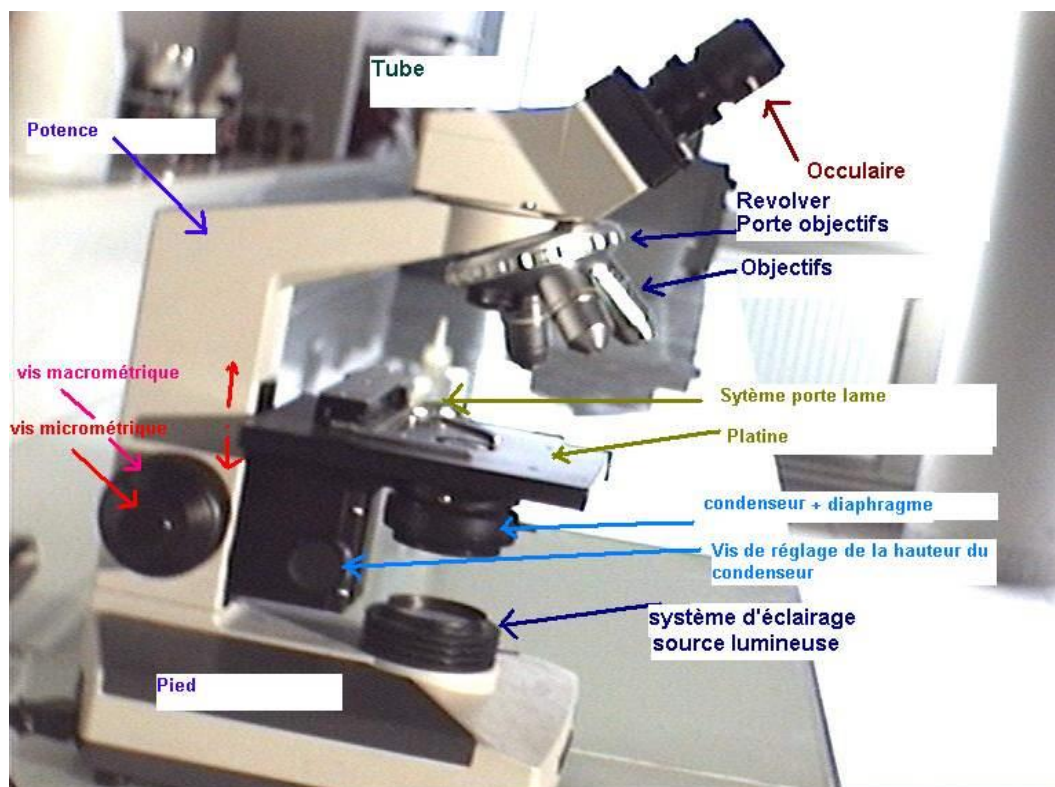


Figure 1 : Schéma annoté d'un microscope

On distingue plusieurs types de microscopie optique :

- La microscopie optique à fluorescence
- La microscopie optique à lumière transmise
- La microscopie optique à contraste de phase
- La microscopie confocale

2-2. La microscopie électronique

Le principal intérêt du microscope électronique par rapport au microscope optique est d'augmenter le grandissement. Au lieu d'être éclairé, l'objet est bombardé par un faisceau d'électrons. L'image mettra en évidence les structures plus ou moins opaques aux électrons. L'objet doit être préalablement coupé en tranches ultrafines puis imprégné de sels de métaux lourds qui vont se fixer différenciellement sur les différentes structures intracellulaire et les rendre plus ou moins opaques aux électrons.

3- La microscopie à fluorescence

La **microscopie à fluorescence** est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques en biologie.

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 (phénomène observé lorsqu'une matière continue à émettre de la lumière après avoir été éclairée) en ce que la production de lumière intervient immédiatement ou rapidement après l'excitation.

En microscopie à fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes. Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes (tableau I), comme par exemple le DAPI (Di Amidino Phényle Indole) qui marque l'ADN et fluoresce en bleu.

Tableau I: Les marqueurs fluorescents les plus courants et leur lumière d'excitation.

Fluorochromes	rhodamine	fluorescéine	FITC	orange d'acridine	DAPI
Couleur d'excitation	vert	bleu	bleu	bleu	UV

3-1- Principe de la microscopie à 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 à fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.

3-2. Fonctionnement du microscope à fluorescence

Pour fonctionner en fluorescence, un microscope comprend une source lumineuse adéquate et un bloc interchangeable situé sur le trajet lumineux. La source est constituée d'une lampe à vapeur de mercure dont le rayonnement est filtré en longueur d'onde par le filtre d'excitation qui conserve une bande étroite du spectre lumineux. Ce faisceau est dévié vers l'échantillon par un miroir dichroïque qui possède un fort coefficient de réflexion pour cette fenêtre de longueur d'onde et un fort coefficient de transmission pour la bande qui correspond au rayonnement fluorescent émis par l'échantillon. Ce rayonnement émis est sélectionné ensuite par un filtre barrière. Le filtre d'excitation, le miroir dichroïque et le filtre barrière, assemblés dans un seul bloc, peuvent être changés et choisis pour être spécifiques du fluorochrome utilisé.

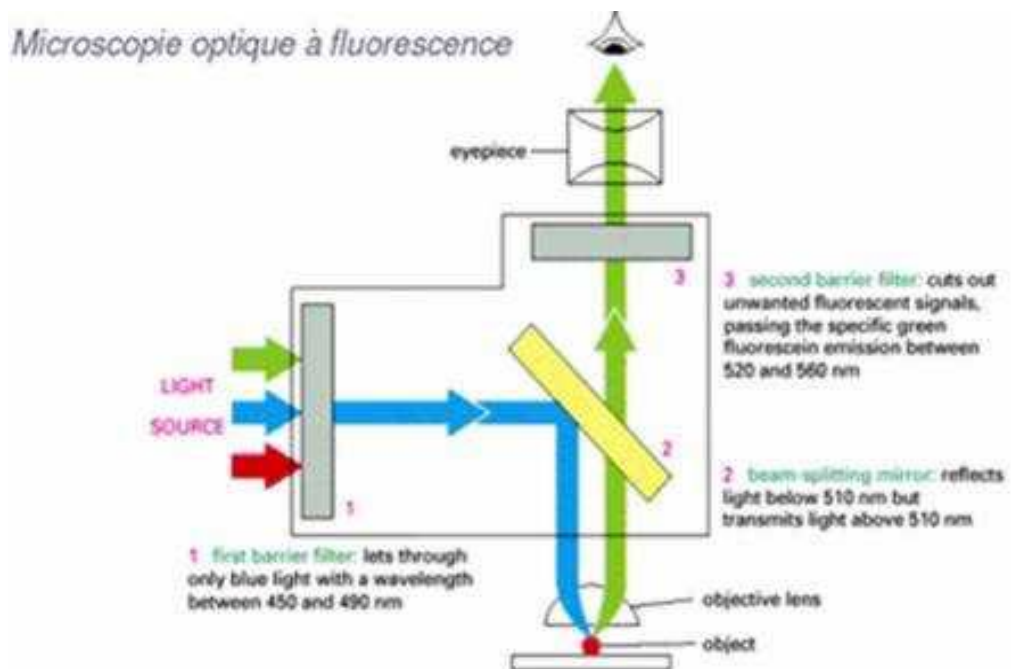


Figure 2: Schéma de fonctionnement d'un microscope en fluorescence

3-3. Modèle de microscopie à fluorescence : le CYSCOPE®

Le CyScope® (Partec, Görlitz, Germany) est développé et produit en Allemagne dans le respect des traditions allemandes en optique et microscopie de haute qualité. En combinaison avec les lames prêtes à l'emploi « Rapid de Malaria Test », il fournit un diagnostic fiable grâce à un protocole ultra-rapide et extraordinairement simple.

3-3-1- Caractéristiques du CyScope®

- Design ultracompact et robuste
- Dimensions : 295 (h) x 90/140 (l) x 170 (p) (mm) ; poids : 2,7 kg
- Puissance d'excitation lumineuse élevée, LED (*Light Emitting Diodes*) UV (longueur d'onde 365 nm) pour excitation de fluorescence
- LED lumière blanche pour éclairage en lumière directe
- Objectifs achromates : 20x, 40x, immersion : 100x
- Prise de connexion pour l'option caméra CCD (visualisation des lames sur PC avec interface Windows™)
- Oculaire : 10x champ large
- Alimentation par batterie rechargeable intégrée
- Chargeur de batterie contrôlé par microprocesseur

3-3-2. Les applications du microscope à fluorescence CyScope®

Les applications CyScope® portent sur :

- L'identification des parasites (*Plasmodium* sp, *Loa loa*, *Shistosoma haematobium*...)
- L'identification des leucocytes dans les échantillons de sang total.
- Recherche des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*...)

Les différentes étapes sont les suivantes :

- Connecter le chargeur de batterie à une prise électrique (100-240 V AC) pour charger l'appareil (le temps de charge est approximativement de 3 heures). La surcharge ne pose aucun problème. Après la charge complète, vous pouvez déconnecter le câble du CyScope®.

- Pour la détection du *Plasmodium* par exemple, il faut utiliser l'objectif 40x. Les deux autres objectifs (20x et à l'immersion 100x) peuvent être aussi bien sélectionnés. Allumer la lumière blanche en appuyant sur le premier interrupteur situé sur la face droite à la base du CyScope® Malaria. Ajuster l'intensité de la lumière en tournant sur le bouton proche de l'interrupteur

Pour la détection du *Mycobacterium tuberculosis*, le contraste élevé permet l'utilisation du grossissement 200x (objectif 20x et oculaire 10x) pour le screening

rapide. S'il ya des incertitudes sur la présence de bactéries acido-résistantes, utiliser un objectif plus puissant (40x ou 100x à immersion d'huile).

- Après avoir préparé la lame, il faut la fixer sur la platine au moyen des valets.
- La mise au point se fait de la façon suivante :
 - Après avoir choisi l'objectif approprié, faire descendre cet objectif jusqu'à la butée.
 - Faire descendre le bloc optique jusqu'à la butée en tournant la vis macrométrique. Dans cette position, l'objectif est à son niveau le plus bas.
 - Faire remonter maintenant de façon lente l'objectif en tournant la vis micrométrique. Vous observerez ensuite la couche des globules rouges.
- Allumer la lumière UV en appuyant sur le deuxième interrupteur situé sur le côté droit du CyScope®. La vis proche de l'interrupteur sert à régler l'intensité de la lumière UV. Faire roter la vis vers le haut pour avoir une intensité maximale. Eteindre ensuite la lumière blanche à son interrupteur, puis obturer son canal en poussant sur la barre horizontale (obturateur), et visualiser les globules blancs et les parasites.
- A la fin de l'analyse, enlever la lame et éteindre la source lumineuse. Recharger la batterie afin de préparer le microscope pour une manipulation ultérieure.

3-3-3. Manipulation en laboratoire

3-3-3- 1. Procédures de préparation des échantillons

A- Echantillons sanguins

1-1. Marquage

- Pipeter 10 µL de sang prélevé par ponction veineuse ou par piqûre au doigt. Déposer la goutte sur le réactif fixé sur la lame.
- Recouvrir le sang avec une lamelle et laisser incuber pendant 1 minute à température ambiante ; analysez directement (Figure 3)

1-2. Analyse

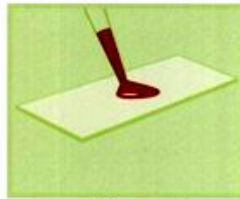
- Pour examiner la préparation, utiliser un microscope à fluorescence CyScope® Malaria ou CyScope® plus Malaria de PARTEC (LED bleu royal à 365nm, filtre d'excitation GG435, miroir dichroïque DM 420).

- Mettre en marche la lumière blanche et rechercher la couche de globules rouges.
- Mettre en marche la lumière UV (bleue) et confirmer la présence des parasites.

Diminuer l'intensité de la lumière blanche. Eteindre la lumière blanche si nécessaire et pousser l'obturateur pour atteindre une faible intensité lumineuse.



Etape 1
Piquer au bout du doigt



Etape 2
Déposer la goutte de sang sur la lame "P-DAPI" au-dessus du réactif. Recouvrir avec une lamelle et attendre 1 minute



Etape 3
Passer à l'observation sur le CyScope en lumière UV

Figure 3 : Protocole de réalisation d'un test rapide malaria Partec

1-3. Résultats

1-3-1. Cas de *Plasmodium*



Plasmodium

1-3-2. Cas des microfilaires



Loa loa

B- Echantillons de selles

2-1. Examen microscopique direct

- Déposer une goutte d'eau physiologique sur une lame prétraitée au DAPI (Partec GmbH, Görlitz, Germany).
- A l'aide d'une baguette, triturer environ 3 g de selles sur la lame jusqu'à homogénéisation complète.
- Recouvrir la préparation d'une lamelle couvre-objet.

2-2. Examen microscopique après concentration: Méthode diphasique de Ritchie modifiée

- Délayer environ 1 g de selles dans 7 ml de solution de formol à 10%.
- Tamiser le mélange dans un tube à centrifuger de 15 ml.
- Rajouter un volume de 3 ml d'éther au mélange.
- Agiter vigoureusement le mélange pendant 30 secondes.
- Centrifuger à 3000 tr/min pendant 1 minute.

2-3. Marquage

- Centrifuger le culot obtenu et déposer en une infime quantité sur la lame prétraitée au DAPI (Partec GmbH, Görlitz, Germany).

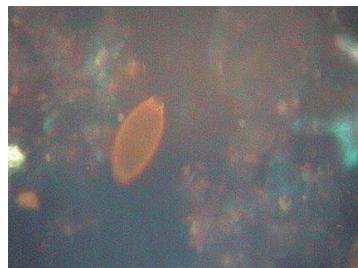
2-4. Analyse

- Pour examiner la préparation, utiliser un microscope à fluorescence CyScope® Malaria ou CyScope® plus Malaria de PARTEC (LED bleu royal à 365nm, filtre d'excitation GG435, miroir dichroïque DM 420).

2-5. Résultats : Quelques parasites intestinaux



Schistosoma mansoni



Trichuris trichiura



Ascaris lumbricoïdes

C- Echantillons d'urine

3-1. Etalement

- Homogénéiser l'urine et verser environ 15 ml dans un tube conique.
- Centrifuger à 1500 tours/min pendant 5 minutes.
- Rejeter complètement le surnageant et conserver uniquement le culot.

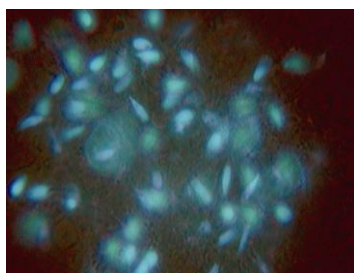
3-2. Marquage

- Déposer 10 µl du sédiment sur une lame prétraitée au DAPI (Partec GmbH, Görlitz, Germany) et recouvrir d'une lamelle couvre-objet.

3-3. Analyse

- Pour examiner la préparation, utiliser un microscope à fluorescence CyScope® Malaria ou CyScope® plus Malaria de PARTEC (LED bleu royal à 365nm, filtre d'excitation GG435, miroir dichroïque DM 420).

3-4. Résultats: Cas des Schistosomes



Schistosoma

D- Spécimens de crachats

4.1. Frottis de crachats

- Utiliser une nouvelle lame propre sans graisse et l'annoter correctement.
- Sélectionner si possible les parties purulentes de l'échantillon de crachats et placer les sur une lame avec la partie brute d'un bâtonnet applicateur mince
 - Etaler de façon égale le crachat sur une surface d'environ 2 x 1cm. l'épaisseur du frottis est approprié si un article de journal peut être lu à travers ce frottis non marqué.
 - Laisser sécher à l'air complètement, puis fixer à la chaleur d'une flamme.

4.2. Marquage

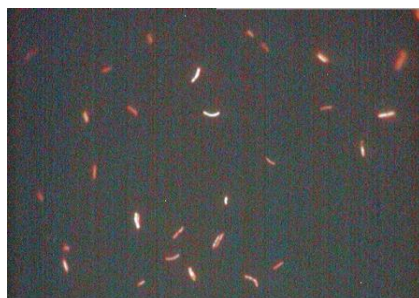
- Placer les lames sur un portoir de marquage au-dessus d'un évier et laisser un espace suffisant entre chaque. toujours ajouter une lame de contrôle positive et négative
 - Recouvrir complètement les lames avec la solution de coloration (*Staining solution*) fraîchement filtré et laisser agir pendant 15 min.
 - Rincer soigneusement les lames à l'eau pendant 30 secondes.
 - Egoutter l'eau.
 - Recouvrir les lames avec une solution de décoloration (*Destaining solution*) et laisser agir pendant 1 min.
 - Rincer à l'eau pendant 30 secondes.
 - Egoutter l'eau
 - Recouvrir les lames de la solution de contre-colorant (*Counterstaining solution*) et laisser agir pendant 5 min.
 - Rincer les lames à l'eau pendant 30 secondes.
 - Laisser sécher les lames à l'air sur le portoir.

4.3. Analyse

- Utiliser un microscope à fluorescence CyScope TB ou CyScope plus TB de Partec (LED bleu royal à 455nm, filtre d'excitation BG25, miroir dichroïque DM 500 et filtre d'émission OG 515).

4.4. Résultats : Cas des Mycobactéries

Les mycobactéries apparaissent sous forme de bâtonnets rouge-orange sur fond noir.



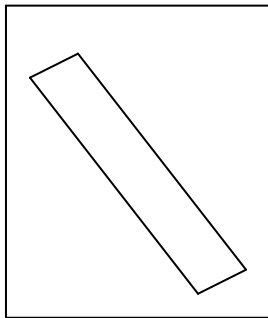
Mycobacterium tuberculosis

3-3-4. Maintenance

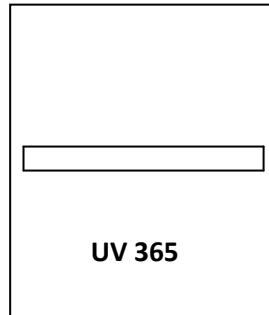
- Couvrir le CyScope avec une housse après utilisation.

- Nettoyer les poussières ou saletés à l'aide d'un pinceau
- Nettoyer les taches de saletés à l'aide d'un papier absorbant. Quelques gouttes d'eau et une solution de détergent peuvent être ajoutées.
- Nettoyer les autres saletés (huile à immersion, spécimens) à l'aide d'un papier absorbant imbibé d'un mélange d'alcool ou d'isopropanol.

Configuration des filtres du CyScope® malaria



GG 435



(vide)

