

Observation et dénombrement des micro-organismes par DEFT **(Direct Epifluorescent Filter)**

Principe

Le dénombrement direct au microscope n'est pas possible pour des échantillons de faible concentration microbienne.

La DEFT consiste à filtrer l'échantillon à tester puis à dénombrer les cellules rendues fluorescentes directement sur la membrane de filtration au microscope à fluorescence.

Étape de filtration

Les filtres classiques en acétate de cellulose sont poreux et 50% des bactéries sont retenues au sein du filtre et non pas en surface. D'autre part, la surface est non plane et la lecture directe est donc impossible.

Il convient d'utiliser pour la DEFT un filtre microporeux en polycarbonate, de surface plane et donc le diamètre des pores n'est que de 0,2µm. Le diamètre du filtre est de 2 cm.

Observation

Pour améliorer le contraste et observer directement les cellules, on les colore avec un fluorochrome : généralement l'acridine orange ou le DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole).

Le microscope à épifluorescence (document 1)

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

- 1 - un filtre d'excitation permettant la sélection des radiations absorbées par le fluorochrome.
- 2 - un miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations émises par le fluorochrome.
- 3 - un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations émises.

Les fluorochromes

Ce sont des molécules capables de passer à un état excité (changement d'orbitale d'un électron) puis de revenir à l'état initial en restituant l'énergie captée sous forme d'énergie lumineuse (fluorescence). Un fluorochrome se caractérise donc par deux longueurs d'onde :

- celle de la lumière absorbée
- celle de la lumière émise

➤ L'acridine orange

Colorant fluorochrome métachromatique (plusieurs couleurs d'émissions de fluorescence possibles).

Excité à 490 nm (lumière bleue).

L'acridine pénètre dans les bactéries et s'intercale entre les bases azotées des acides nucléiques qui acquièrent ainsi une fluorescence.

- Les ADN bicaténaire fluorescent en vert et sont majoritaires dans les cellules inactives ou mortes.
- Les ARN monocaténaire fluorescent en orange et sont majoritaires dans les cellules en croissance.

Ainsi,

- Dans une cellule en croissance, le rapport ARN/ADN est élevé (beaucoup d'ARN messager, de transfert); ces cellules fluorescent en orange
- Dans une cellule inactive ou morte, le rapport ARN/ADN est faible (ARN hydrolyse rapidement) ; ces cellules fluorescent en vert.

➤ Le DAPI (4'6-diamidino-2-phénylindole)

Très utilisé actuellement à la place de l'acridine orange car minimisent les « interférences ».

Absorbe les radiations violettes (372nm) et émet une fluorescence bleue (456 nm).

Se lie spécifiquement à l'ADN, les complexes ADN-DAPI sont connus pour donner une fluorescence bleue intense. Si le DAPI se lie à d'autres molécules, la fluorescence serait jaune.

Exemples d'applications de la DEFT

Dénombrement de la flore totale dans le lait cru (méthode alternative)

Représentation schématique d'un microscope à épifluorescence

