**TP N°4 :**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **RÉALISATION D'UN FROTTIS - COLORATIONS**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **BUT:** étaler une culture bactérienne ou un produit pathologique sur une lame afin de pouvoir réaliser une coloration permettant l'observation au microscope.**TECHNIQUE**

|  |
| --- |
| les étapes de la réalisation d'unfrotti |

**1. Préparation et/ou homogénéisation de l’échantillon et étalement**Utiliser des lames **neuves**, ou propres et dégraissées (passage à la flamme)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|   | **Préparation et/ou homogénéisation de l’échantillon** | Etalement en spirales du centre vers l’extérieur, puis de l’extérieur vers le centre |
| **Culture en milieu liquide (bouillon)**

|  |
| --- |
| Culture en milieu liquide (bouillon) |

 | **Homogénéiser la culture.**Prélever une goutte de liquide avec une anse de platine ou une öse à usage unique, et la déposer au centre d’une lame.En fonction du trouble de la culture, étaler **plus (trouble important) ou moins (trouble moyen)** le frottis. Eventuellement, faire **plusieurs dépôts** si le trouble est faible**.** | Réalisation d'un frottis |
| **Culture en milieu solide (colonies)**

|  |
| --- |
| Culture en milieu solide (colonies) |

 | Réaliser une **suspension dense** en eau distillée ou physiologique stérile : mettre plusieurs colonies isolées dans un tube contenant 2 mL d’eau stérile.**Homogénéiser**.Prélever une goutte de suspension avec une anse de platine ou une öse à usage unique, et la déposer au centre d’une lame.

|  |
| --- |
| Réalisation d'un frottis |

 | Réalisation d'un frottis |
| **OU**Déposer une goutte d’eau distillée ou physiologique stérile sur une lame et **y dissocier une colonie bien isolée** (ou **parcelle de colonie**, suivant la taille). | Réalisation d'un frottis |
| **Produit pathologique** (urine, selles, pus...)

|  |
| --- |
| Produit pathologique (urine, selles, pus...) |

Ex : selles | Le prélèvement peut être utilisé :* Pur
* Après dilution dans de l’eau physiologique (si trop épais)
* Après centrifugation
 | Réalisation d'un frottis |

**2. Séchage:**De préférence **à la température du laboratoire** (un séchage trop brutal altère souvent la structure bactérienne) Un frottis est **sec** quand il prend un aspect **mat.**NB : le séchage est rapide si le frottis est **mince et régulier**.**3. Fixation:**C'est le procédé qui consiste à **tuer les bactéries sans altérer leur structure et à les fixer sur la lame**.Il existe plusieurs techniques mais la seule applicable dans **tous les cas** (cultures bactériennes et produits pathologiques) et qui présente des **risques limités** (de brûlure et de contamination) est la **technique de fixation à l’alcool à froid :** Recouvrir la lame d'alcool pendant 3 min au minimum. Éliminer l'excès. Laisser sécher.**Quelle que soit la technique de fixation employée, la lame doit être rincée à l'eau distillée et égouttée avant d'être colorée.** |

 |
|   |

TP N°4(suite)

**COLORATION AU BLEU DE MÉTHYLENE**

**1.TECHNIQUE**

* Réaliser un frottis et le fixer
* Le recouvrir de **bleu de méthylène et laisser agir 3 min**
* Rincer à l'eau distillée
* Sécher entre 2 feuilles de papier essuie-tout.

**2.OBSERVATIONS**

Examiner à **l'objectif x100 à immersion** (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

**Toutes les cellules apparaissent colorées en bleu.**

Noter:

* La morphologie des bactéries: bacilles, coques...(voir fiche correspondante)
* Leur mode de groupement: isolées, par 2, en amas, en chaînettes.
* La présence de cellules  (polynucléaires, cellules épithéliales...)

**3. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS**

* Coloration simple et rapide qui permet d'apprécier la morphologie des bactéries
* Peu d'échecs possibles
* Ne permet pas de différencier les bactéries de même morphologie.

**MORPHOLOGIE BACTERIENNE**



**TP N° 5**

**COLORATION DE GRAM**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  La **coloration de Gram** (mise au point par Christian Gram) est une **coloration de base** en bactériologie. C'est une "coloration double", qui permet de différencier les bactéries:* D'après leur forme
* D'après leur affinité pour les colorants.

**1. TECHNIQUE**Il existe de **nombreuses variantes de la coloration de Gram** qui diffèrent par la composition des réactifs et leur temps d'action.

|  |
| --- |
| Variantes de la coloration de Gram |

**2.OBSERVATIONS**Examiner à l**'objectif x100, à l'immersion** (avec une goutte d'huile), avec un éclairage important (**diaphragme ouvert**).Noter:* **La morphologie**: voir fiche correspondante.
* **Indication sur la taille**: taille moyenne, petite taille, grande taille
* **Le Gram**: bactéries à Gram positif (violet) ou à  Gram négatif (rose)
* **Le groupement**: par 2, amas, chaînettes...
* **La proportion de chaque type de bactéries** (quand il y en a plusieurs...)

NB: il peut exister des **situations intermédiaires** en ce qui concerne la couleur des bactéries:* **"Gram faible"**: bactéries à Gram positif qui se décolorent très facilement
* **"Gram variable"**: présence dans une même souche de bactéries à Gram positif et de bactéries à Gram négatif.
* "**Gram hétérogène":** différences d'intensité de coloration dans une même bactérie

Ex: bacilles à Gram négatif à **coloration bipolaire****L'interprétation de la coloration de Gram n'est possible que si la confiance en la technique réalisée est totale.** En cas de doute, **une vérification s'impose.****3. PRINCIPE DES ÉTAPES DE LA COLORATION DE GRAM**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ETAPES** | **Bactéries à Gram positif** | **Bactéries à Gram négatif** |
| **Etape 1**Coloration Par Le Violet De Gentiane | Action combinée du **violet de gentiane** et du **lugol**(appelé **mordanceur**  ou mordant ,car il renforce l'action du violet de gentiane) a il se forme un complexe chimique qui colore **le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.**

|  |
| --- |
| z |

 |
| **ETAPE 2**Décoloration Par L’alcool | La **paroi** bactérienne est **imperméable à l'alcool**: les bactéries restent colorées en violet.

|  |
| --- |
| z |

 | La **paroi** bactérienne est **perméable à l'alcool** (du fait de sa constitution chimique différente et d'une différence d'épaisseur): l'alcool pénètre dans les bactéries et **décolore** leur cytoplasme: les bactéries deviennent "incolores".

|  |
| --- |
|   |

 |
| **ETAPE 3**Recoloration Par La Fuchsine | Les bactéries à **paroi imperméable** à l'alcool « ne prennent pas » la fuchsine, elles restent **colorées en violet et sont dites à Gram positif.**

|  |
| --- |
| z |

 | Les bactéries à **paroi perméable à l'alcool,** qui ont été décolorées, sont **recolorées par la fuchsine.** Elles sont **colorées en rose et sont dites à Gram négatif.**

|  |
| --- |
| z |

 |

 |