**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.**

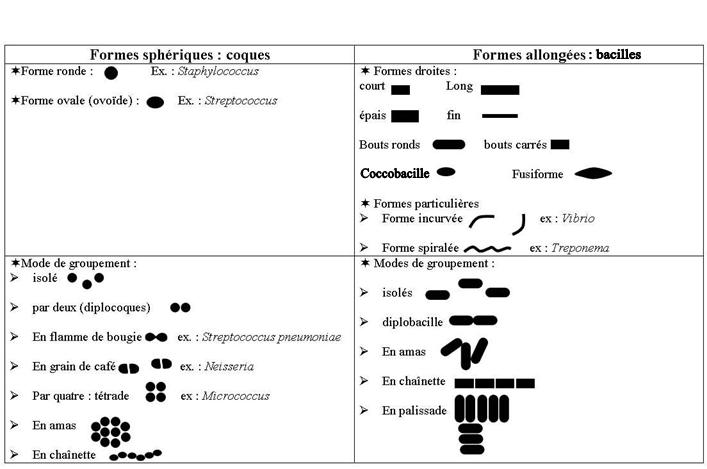
Noter:

* 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 | | |