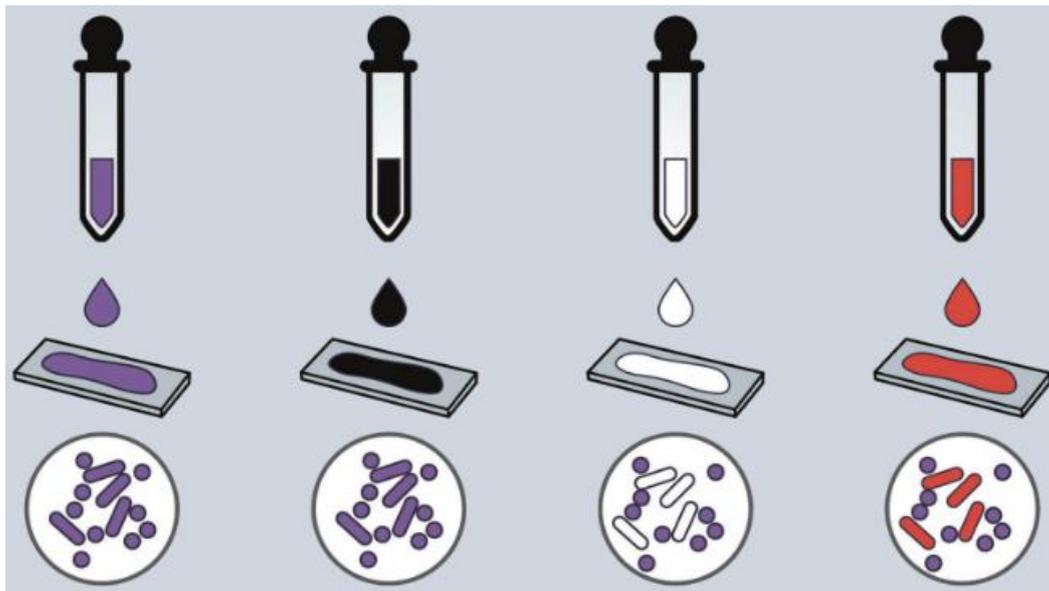


## Travaux Pratiques 9:

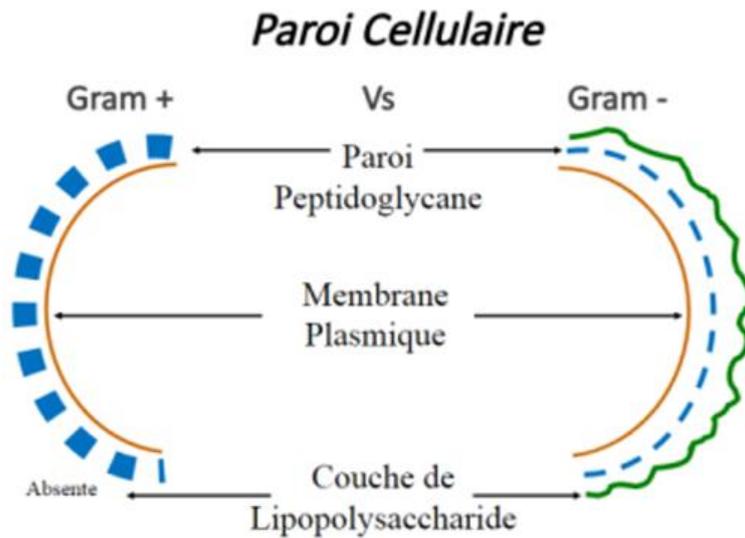
### Examen microscopique des microorganismes

#### -Coloration différentielle-



#### 1-Introduction :

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram (appelée également coloration double ou différentielle). Cette technique a été mise au point en 1884 par le bactériologiste Danois Hans Christian Gram. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- (selon leur affinité aux solvants) est un critère systématique important pour leur classification (Figure 1). Elle donner également des indications sur leurs formes et leurs mode de groupement.



	Gram+	Gram-
<b>Osamines : mucopeptides (peptidoglycane)</b>	<b>++</b>	<b>+</b>
Acides aminés	24 à 35%	50%
Acide diaminopimélique	+++ exclut la lysine	+ n'exclut pas la lysine
<b>Acides téichoïques</b>	<b>+++</b>	<b>-</b>
Oses	20-60%	20-60%
<b>Lipides (→membrane externe)</b>	<b>1 à 2.5%</b>	<b>10 à 22%</b>

**Figure 1 :** La paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

## 2-Objectif :

Le but de ce TP est d'apprendre à

- ✓ Réaliser la coloration différentielle afin de classer les bactéries selon leur type de Gram.

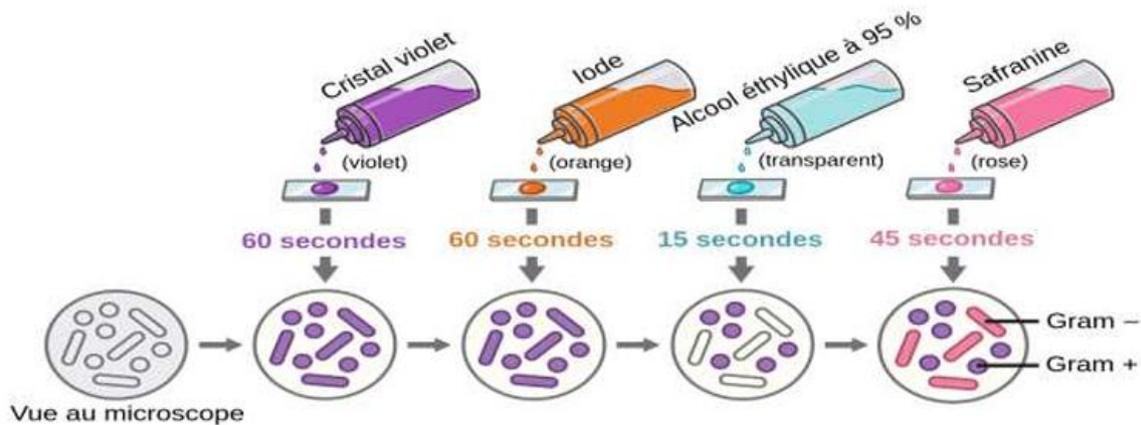
**3-La technique :** La coloration de Gram s'effectue selon les étapes suivantes (Figure 2) :

**1-**Réaliser un frottis bactérien.

**2-**Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir 1 minute ;

**3-**Rincer à l'eau ;

- 4-Recouvrir la préparation de Lugol, Laisser agir 1 minute ;
- 5-Rincer à l'eau ;
- 6-Décolorer à l'alcool 95°, laisser agir 30 sec ;
- 7-Rincer à l'eau courante ;
- 8-Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine, laisser agir 1 minute ;
- 9-Rincer abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres.
- 10-Observation au microscope.



**Figure 2 :** Etapes de coloration de Gram

**Conditions d'observation :**

- Examiner à l'objectif x100
- Ajouter une goutte d'huile à immersion
- Eclairage important : diaphragme ouvert.

**4-Résultat :** A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées en **violet foncé** : elles sont dites à **Gram positif** ;
- Des bactéries colorées en **rose** : elles sont dites à **Gram négatif**.

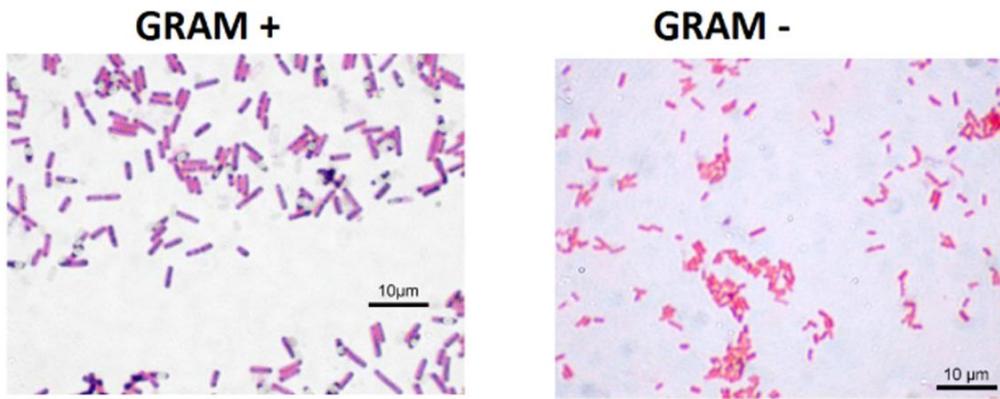


Figure 3 : Bactéries à Gram+ et à Gram-.

### 5-Explications :

Coloration primaire 1 : Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.

#### 1. Coloration avec le cristal violet

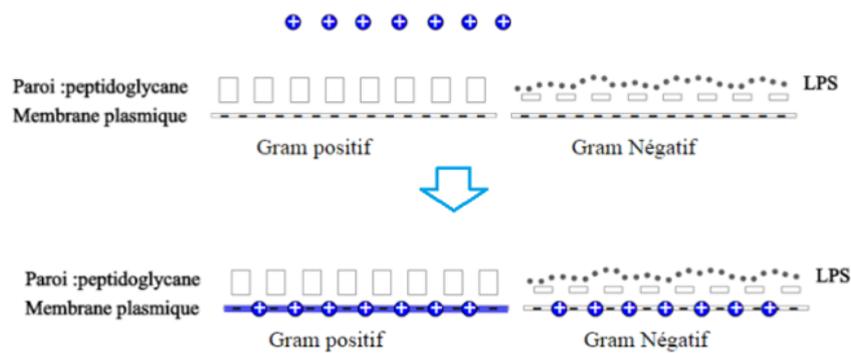


Figure 4 : Effet du premier colorant

2- Le Lugol permet de fixer cette coloration interne.

#### 2. Ajout d'iode de Gram (Mordant)

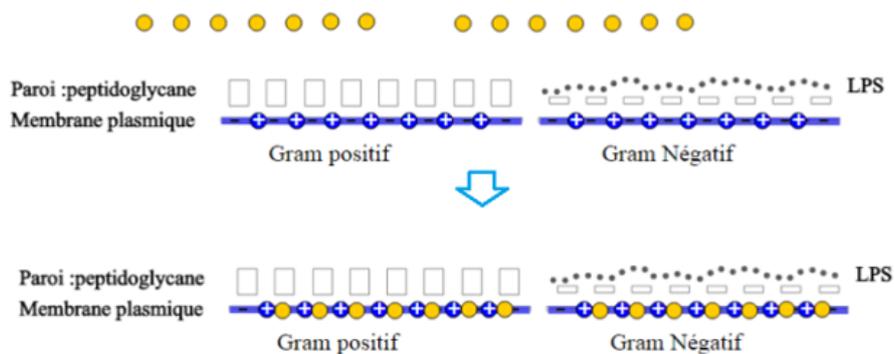
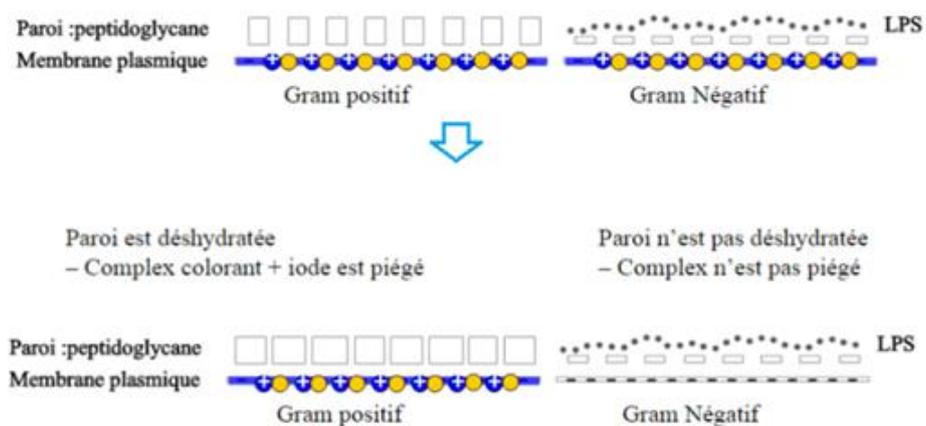


Figure 5 : Effet du mordant

**Étape différentielle 3 :** L'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries à Gram négatif : elles ont une paroi pauvre en peptidoglycanes (donc plus fine) qui va laisser passer l'alcool (molécule hydrophile), et qui décolorera le cytoplasme. Pour les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une couche importante de peptidoglycanes (donc plus épaisse). Elles resteront alors de couleur violette.

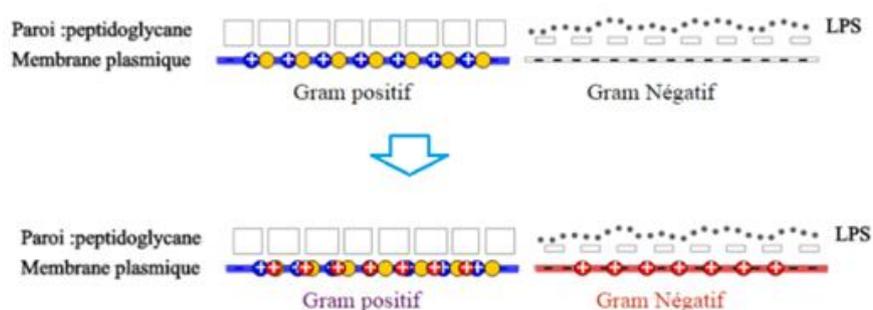
### 3. Lavage à alcool



**Figure 6 :** Effet de l'alcool

**Contre coloration 4 :** La recoloration à la Fushine (ou safranine) ou la contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries à Gram négatif décolorées une teinte rose permettant leur visualisation au microscope.

### 4. Coloration avec la Safranine



**Figure 7 :** Effet de la fushine ou la safranine

### **6-Avantages et inconvénients de la coloration différentielle :**

- C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.
- Certains germes restent insensibles à cette coloration, c'est le cas, entre autre, des mycobactéries (famille à laquelle appartiennent les agents de la tuberculose et de la lèpre (les mycobactéries)).