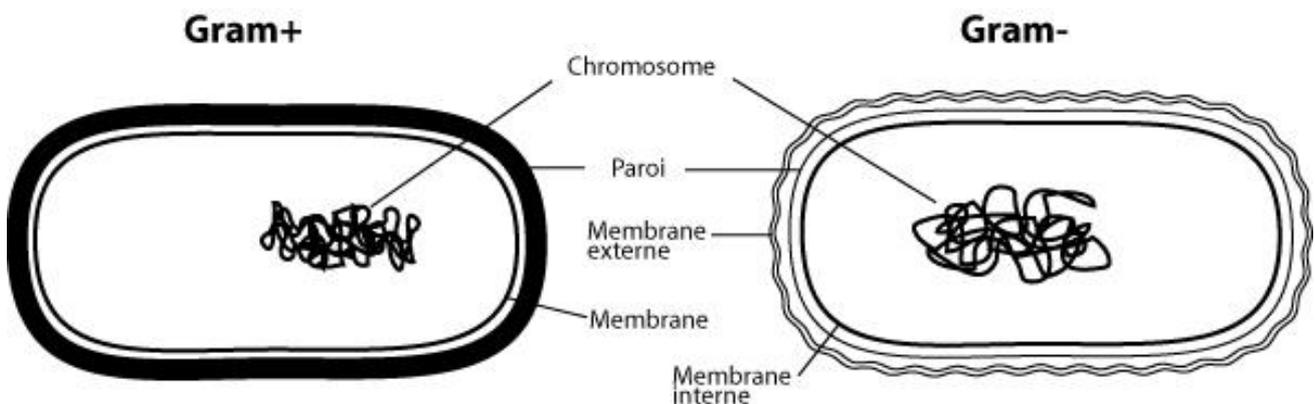


5. La coloration de Gram

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram, un bactériologiste danois. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries. En outre, la coloration de Gram reste une étape essentielle dans l'analyse médicale pour la détermination des pathogènes. Elle permet de visualiser facilement les bactéries et de donner des indications sur leurs formes et leurs tailles.

Thème : Coloration de Gram, bactéries, paroi bactérienne, frottis, analyses médicales, yogourt.

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram+ gardent la coloration violette. Les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries Gram-, on recolore avec de la fuschine (rose). Les bactéries Gram+ resteront violettes alors que les Gram- seront maintenant teintées en rose. Bien que le résultat de la coloration de Gram puisse dépendre de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissances...) elle reste cependant la technique de coloration de base de la bactériologie.



L'EXPERIENCE

PROTOCOLE

A partir des boîtes de pétri:

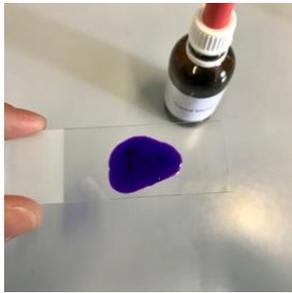
Vous recevez 5 boîtes de pétri contenant 5 souches de bactéries différentes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*. Observer l'aspect, la couleur et la forme des colonies.

1) Faire un frottis

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une pointe jaune ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur

2) Coloration et explications (attention aux éclaboussures, mettez des gants)

- Déposer quelques gouttes de solution de **violet de gentiane** (cristal violet) sur le frottis fixé.



- Laisser agir 1 minute. *Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.*
- Jeter l'excès de colorant dans un bêcher.



- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis)



- Déposer quelques gouttes de **Lugol** sur le frottis. *Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.*
- Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bêcher et rincer brièvement à l'H₂O comme précédemment décrit.
- Décolorer en faisant couler la solution de **décoloration** sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).

La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette.

- Rincer à l'H₂O.
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Rincer à l'H₂O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x).

A partir d'un yogourt :

- Prendre un yogourt nature.
- Mélanger en le secouant avant de l'ouvrir.
- Prélever une petite goutte de yogourt et la déposer dans une goutte d'eau sur une lame préalablement nettoyée à l'alcool.
- Faire le frottis et la coloration de Gram comme décrit auparavant.

A partir de cellules de la bouche :

- A l'aide d'un écouvillon stérile se frotter l'intérieur des joues (assez au fond de la bouche).
- Frotter l'écouvillon sur une lame préalablement nettoyée à l'alcool.
- Faire le frottis et la coloration de Gram comme décrit précédemment.

3) Résultats

Voici quelques informations sur les bactéries observées et des images de colorations de Gram:

Escherichia coli

Bâtonnet Gram- de 2 à 3 µm de long pour 0.7 µm, également dénommé colibacille. Elle peut apparaître parfois sous forme de filament dans les vieilles cultures. Cette bactérie fut découverte en 1855 par Theodore Escherich. Elle est un hôte important de l'intestin des animaux à sang chaud. Nos propres germes d'E. coli peuvent être la cause de diverses infections, souvent des infections urinaires. Bien que la majorité des souches d'E. coli soient sans danger, certaines sont cependant

enterohémorragiques et peuvent générer de grave cas d'infections alimentaires. Cette bactérie fut à l'origine de nombreuses découvertes en biologie moléculaire et reste un organisme fort utile à presque tous les laboratoires de recherche.

Pseudomonas fluorescens

Bâtonnet Gram- de 1 à 3 μm de long pour 0.6 μm de large. On trouve *P. fluorescens* dans l'eau, le sol et à la surface des plantes. Cette bactérie est capable de coloniser les racines des plantes et de les protéger contre certaines maladies par différents mécanismes. *P. fluorescens* produit un pigment hydrosoluble fluorescent de couleur jaune, la fluoresceine qui diffuse dans le milieu de culture.

Micrococcus luteus

Coque (forme sphérique) Gram+ de 0.9 à 1.8 μm de diamètre. On trouve *M. luteus* dans le sol, la poussière, l'eau et sur la peau des êtres humains et des animaux. Les coques sont souvent associées par 2 ou 4, en chaînette ou en grappe. *M. luteus* produit un pigment jaune lipophile, qui ne diffuse pas dans le milieu.

Bacillus subtilis

Bâtonnet Gram+ de 1.5 à 3 μm de long pour 0.8 μm de large. Très commun dans le sol et sur les végétaux. *B. subtilis* fut décrite pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn. Cette bactérie produit diverses enzymes utilisées en industries (amylase, cellulase) ainsi qu'un antibiotique, la bacitracine. *B. subtilis* possède la capacité de former des spores de résistance lorsque les conditions deviennent défavorables (appauvrissement du milieu, température extrême...). Ces spores sont visibles dans des vieilles cultures par la coloration de Gram. Elles apparaissent comme des sphères claires à l'intérieur de la bactérie (endospore).

Bacillus megaterium

Bâtonnets Gram+, de taille impressionnante : 2 à 9 μm de long pour 1.2 à 1.5 μm de large. Tout comme *B. subtilis*, on retrouve cette bactérie dans le sol. Elle est fort utile pour la production de la pénicilline amidase, une enzyme nécessaire à la fabrication de pénicillines synthétiques ainsi que d'autres enzymes utilisées pour modifier des corticostéroïdes. *B. megaterium* produit des endospores visibles dans des vieilles cultures.

Le yogourt

Le yogourt est fabriqué par fermentation du lait effectuée par l'action de 2 bactéries lactiques : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Ces bactéries transforment le lactose (sucre du lait) en glucose et galactose. Elles produisent de l'acide lactique qui provoque la floculation des protéines du lait et ainsi l'épaississement du yogourt. *Streptococcus thermophilus* (en forme de coques, sphériques) et *Lactobacillus bulgaricus* (en forme de bâtonnet) sont des bactéries Gram+. Elles apparaissent en violet sur un fond rose de protéines du lait dans une coloration de Gram d'un frottis de yogourt.

Bactéries de la bouche

La flore buccale comporte environ 10 milliards de bactéries diverses (environ 300 espèces différentes). Elles sont importantes pour notre digestion et surtout comme protection contre différents pathogènes. Un frottis de bouche permet de visualiser ces bactéries ainsi que des cellules épithéliales buccales (avec le noyau en rose).