



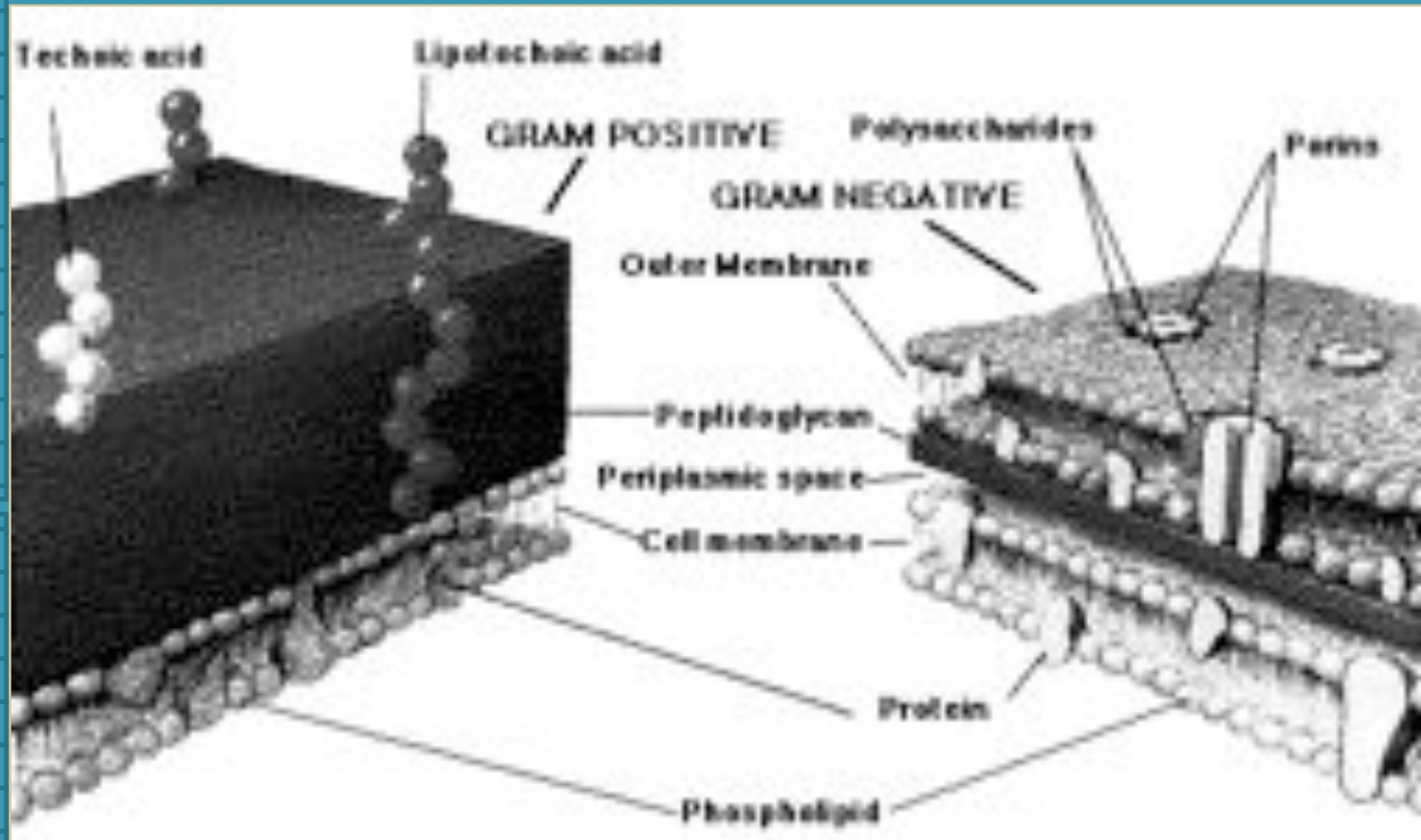
Introduction à la Microbiologie

Cours proposé par

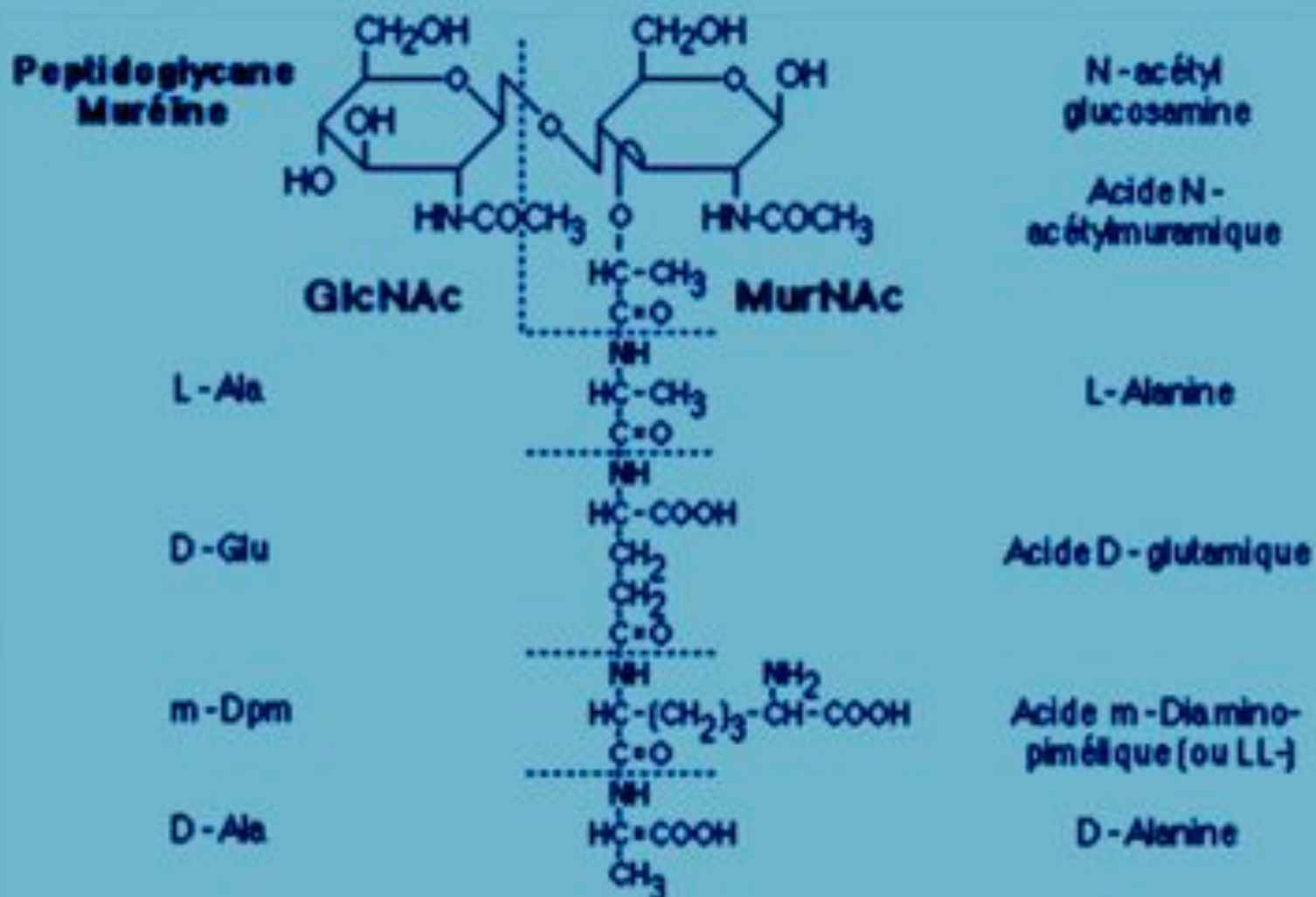
José Edmundo NAVA SAUCEDO

Aux étudiants L3-S5

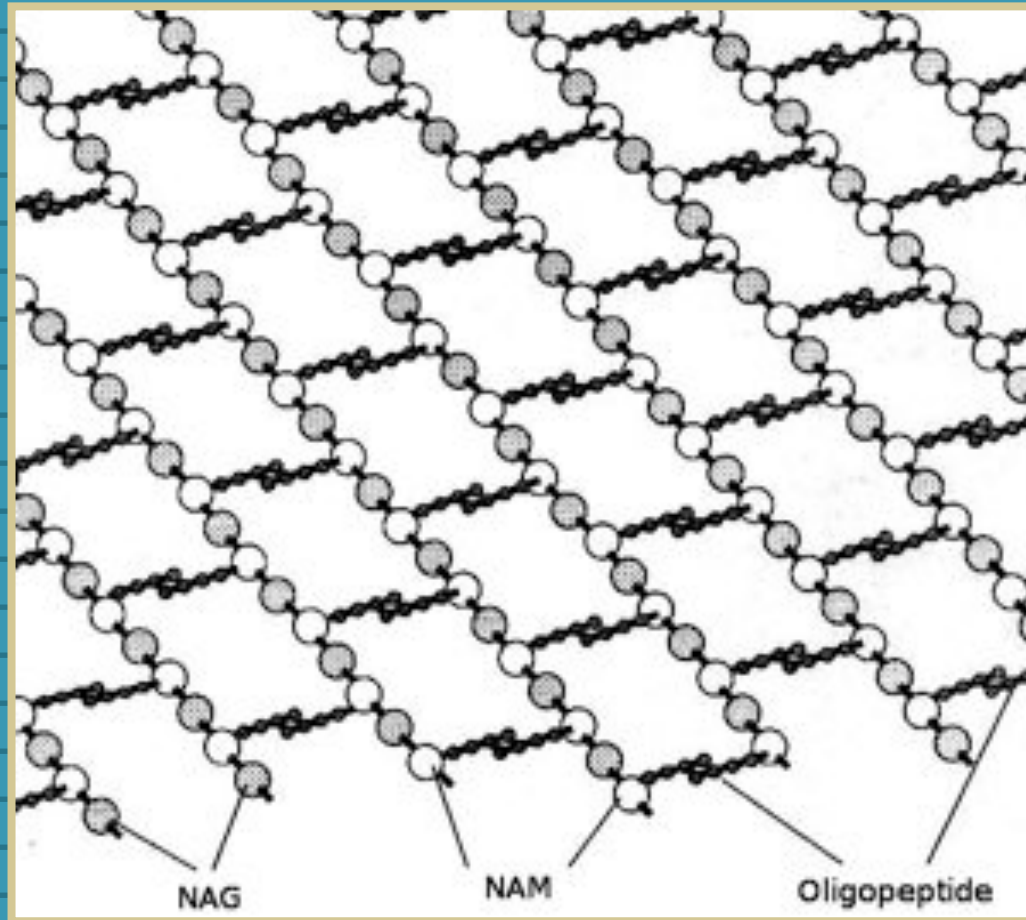
COLORATION DE GRAM



Peptidoglycane ou Muréine

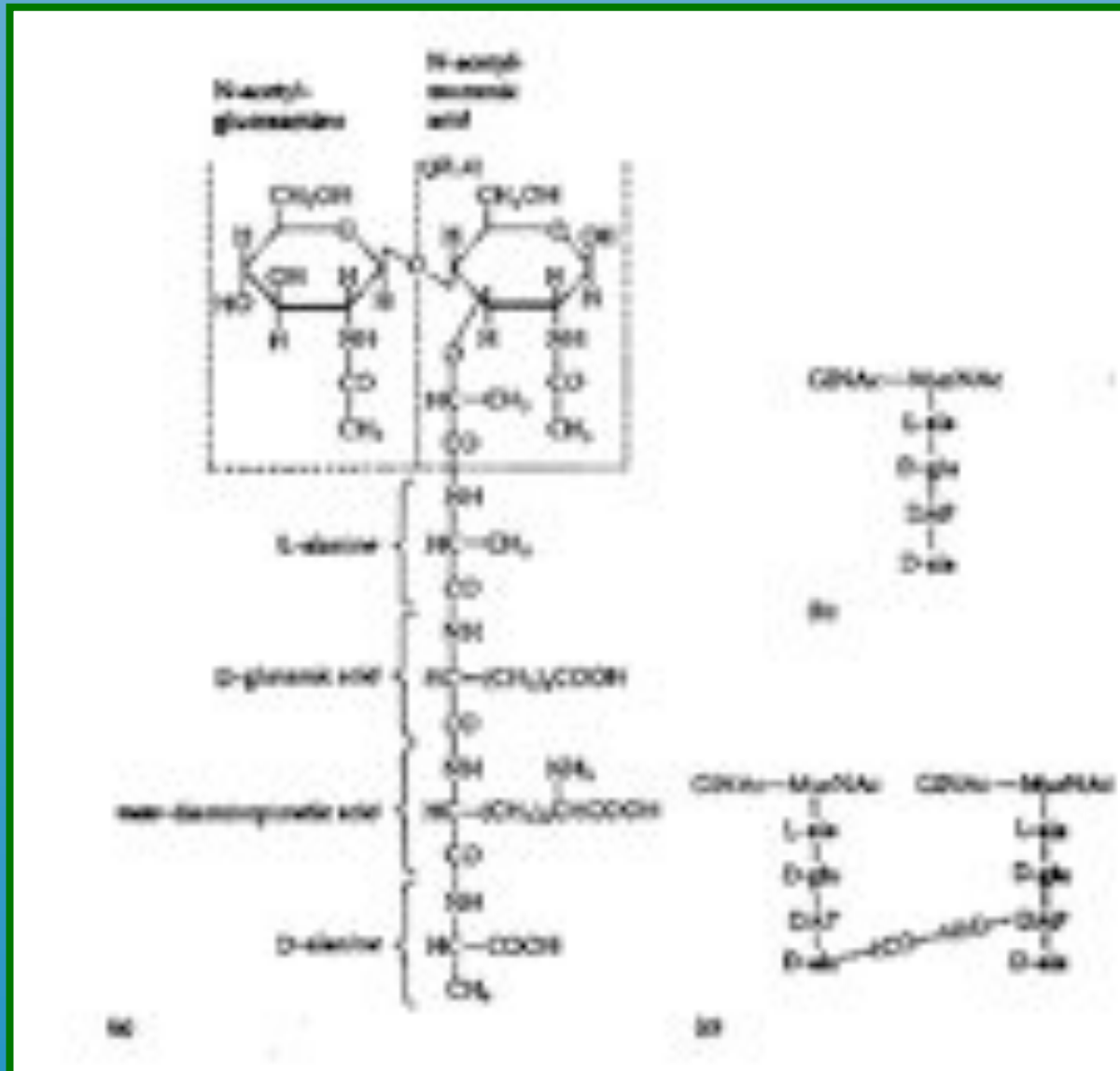


Peptidoglycane ou Muréine

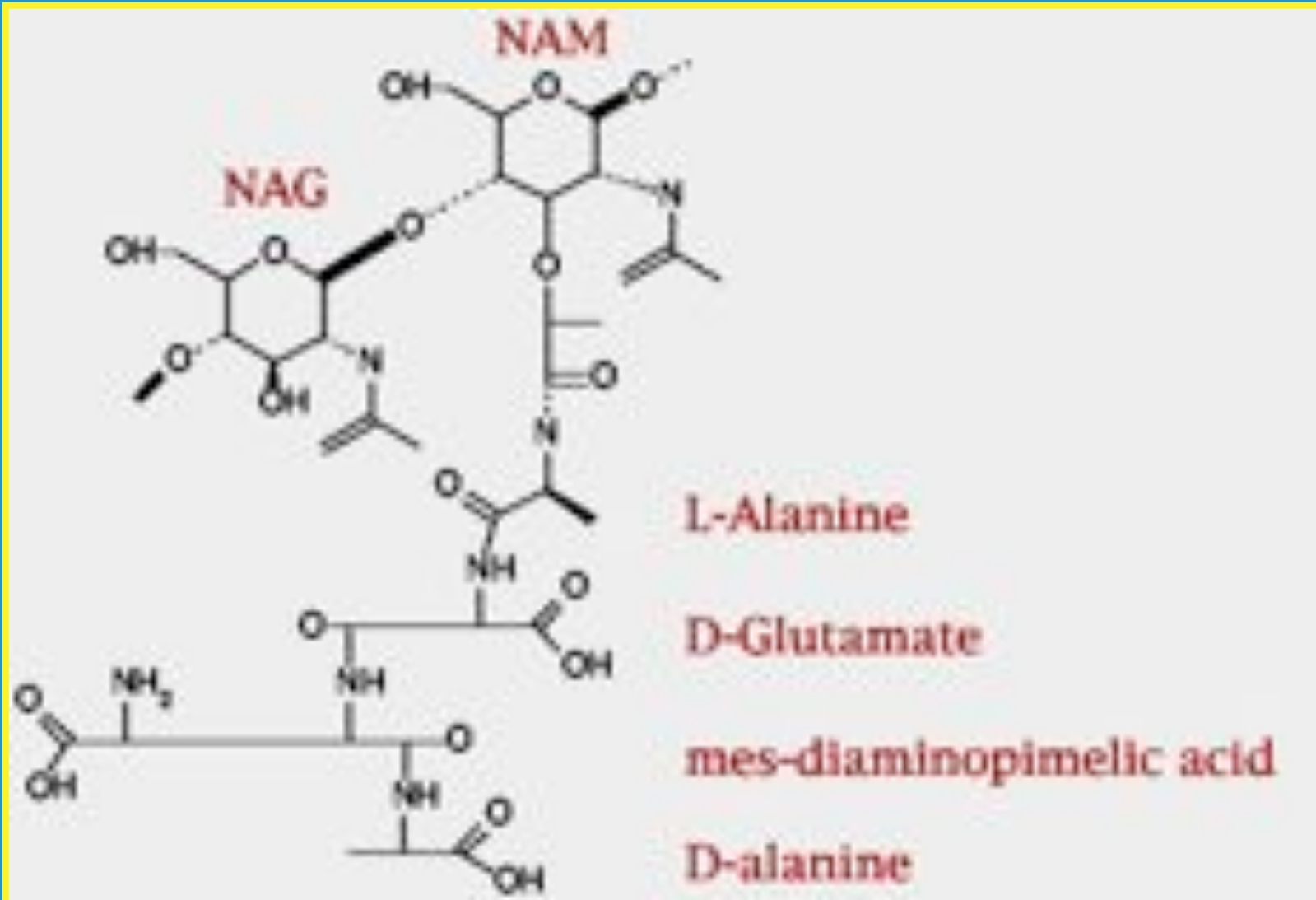


NAG = N-acétylglucosamine ; NAM = Acide N-acétylmuramique

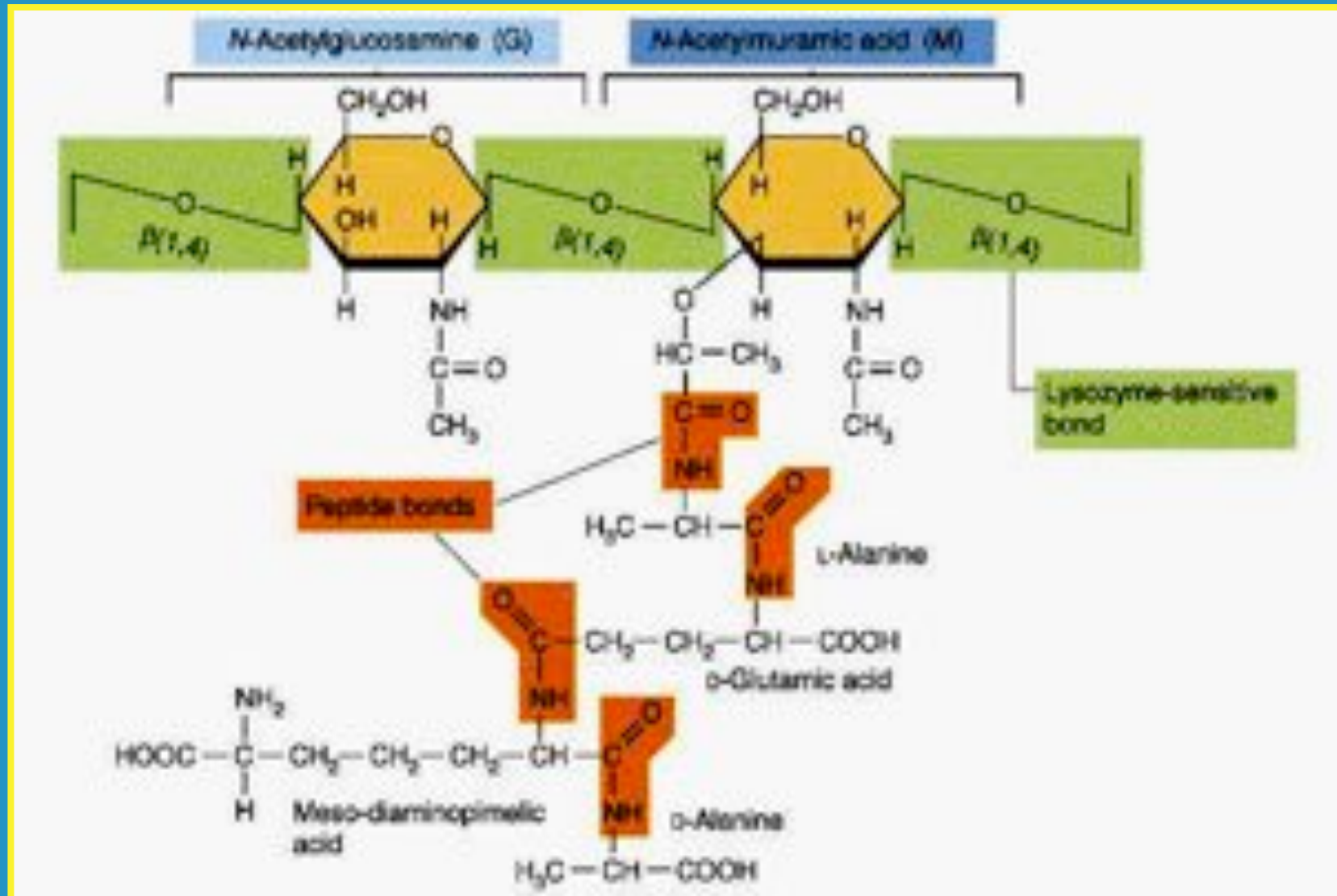
Peptidoglycane ou muréine



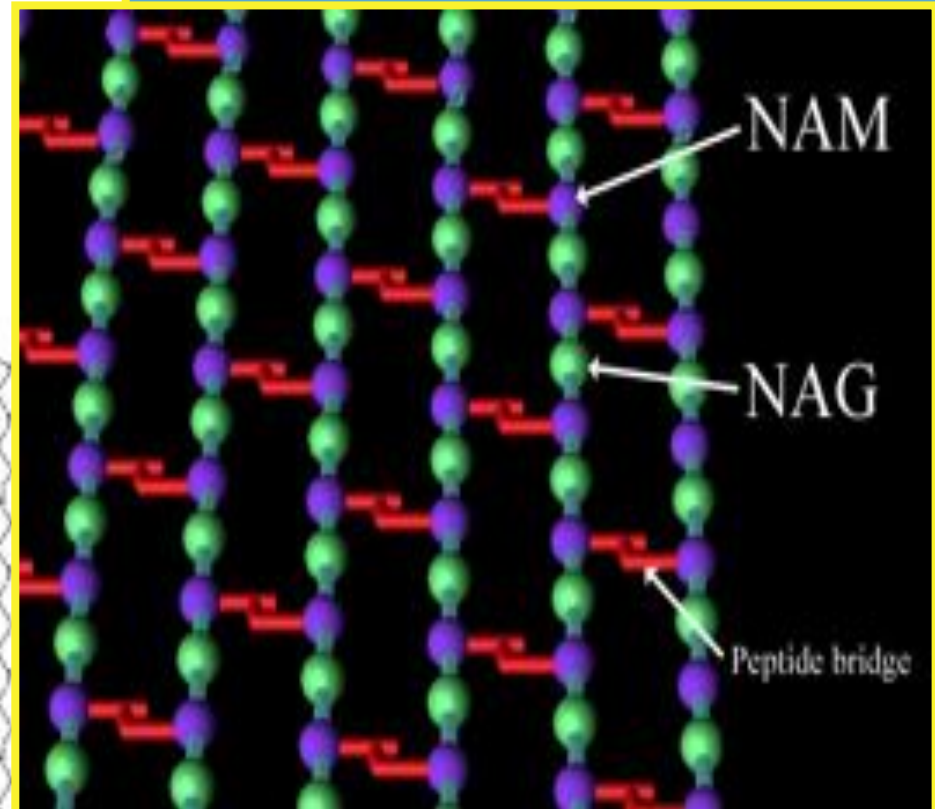
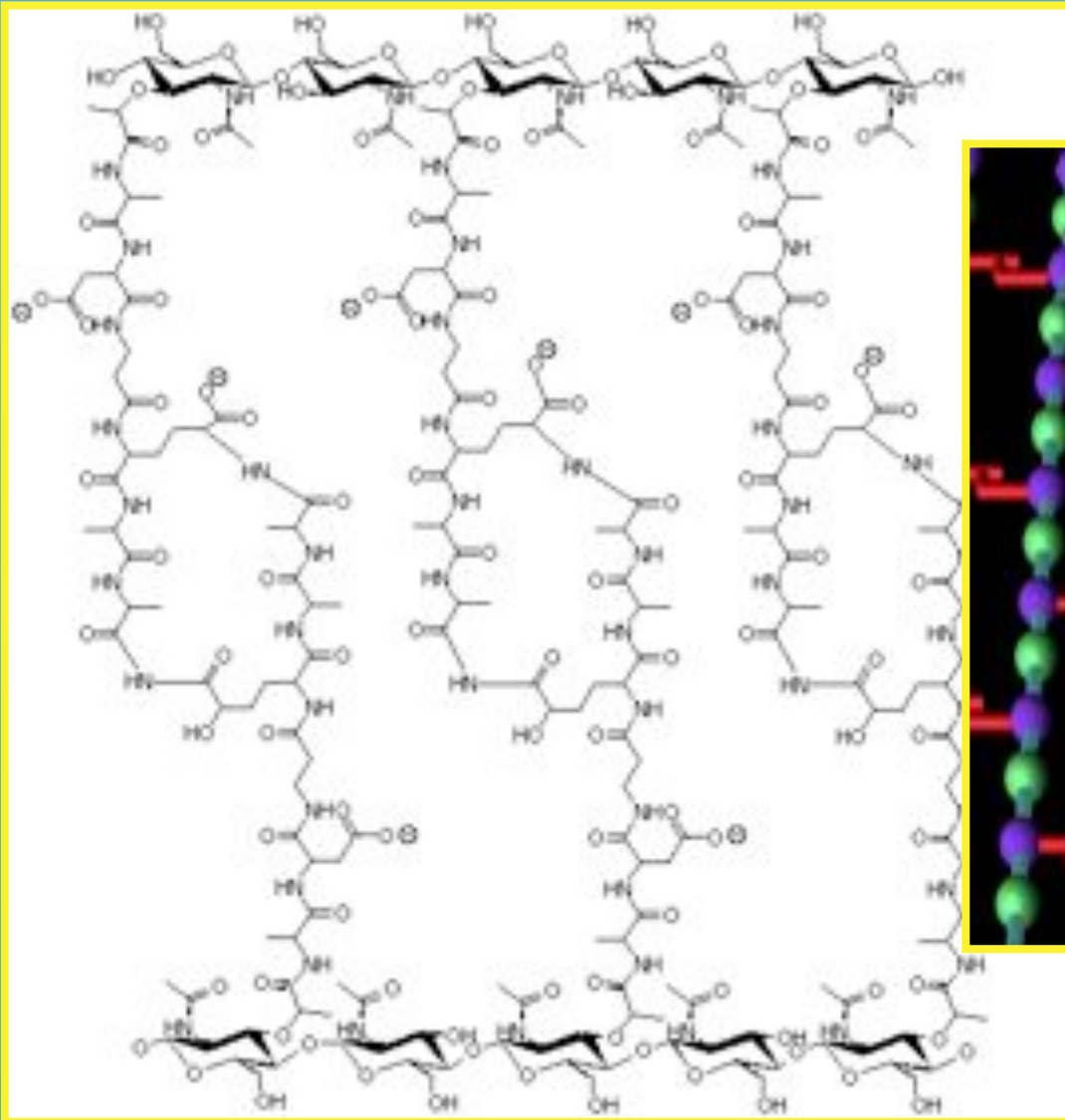
Peptidoglycane ou muréine



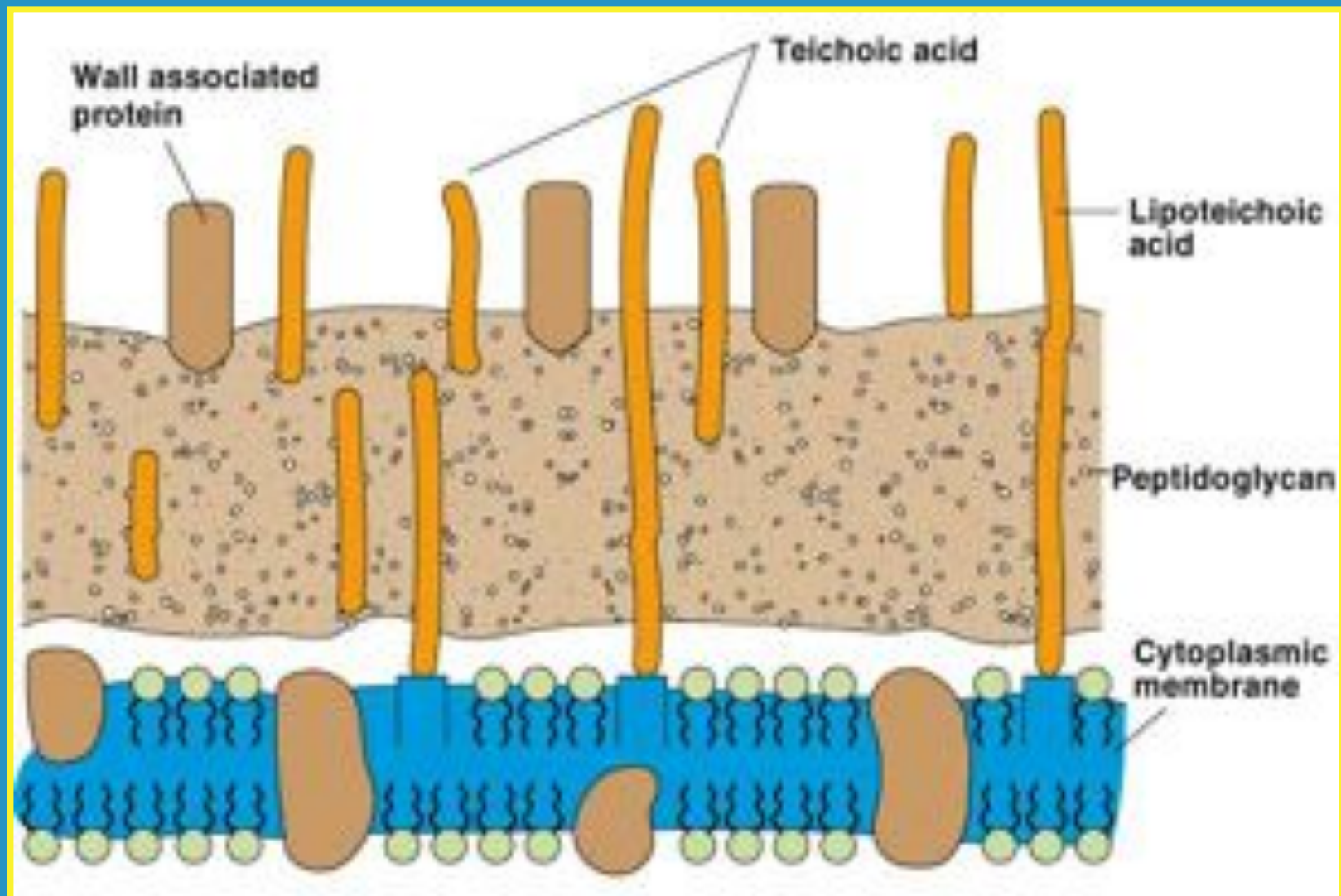
Peptidoglycane ou muréine



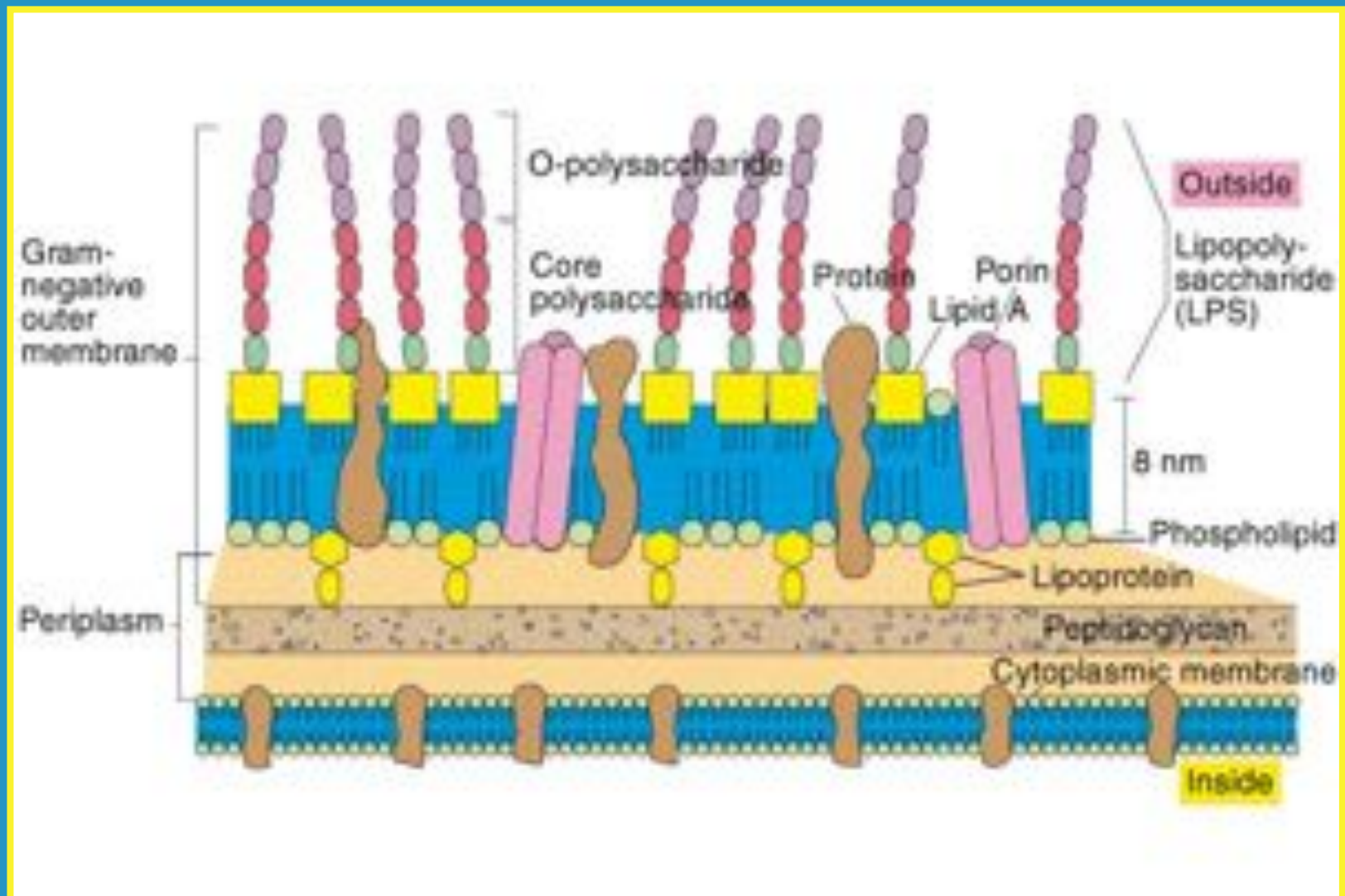
Peptidoglycane ou muréine



Paroi bactéries Gram +



Paroi bactéries Gram -

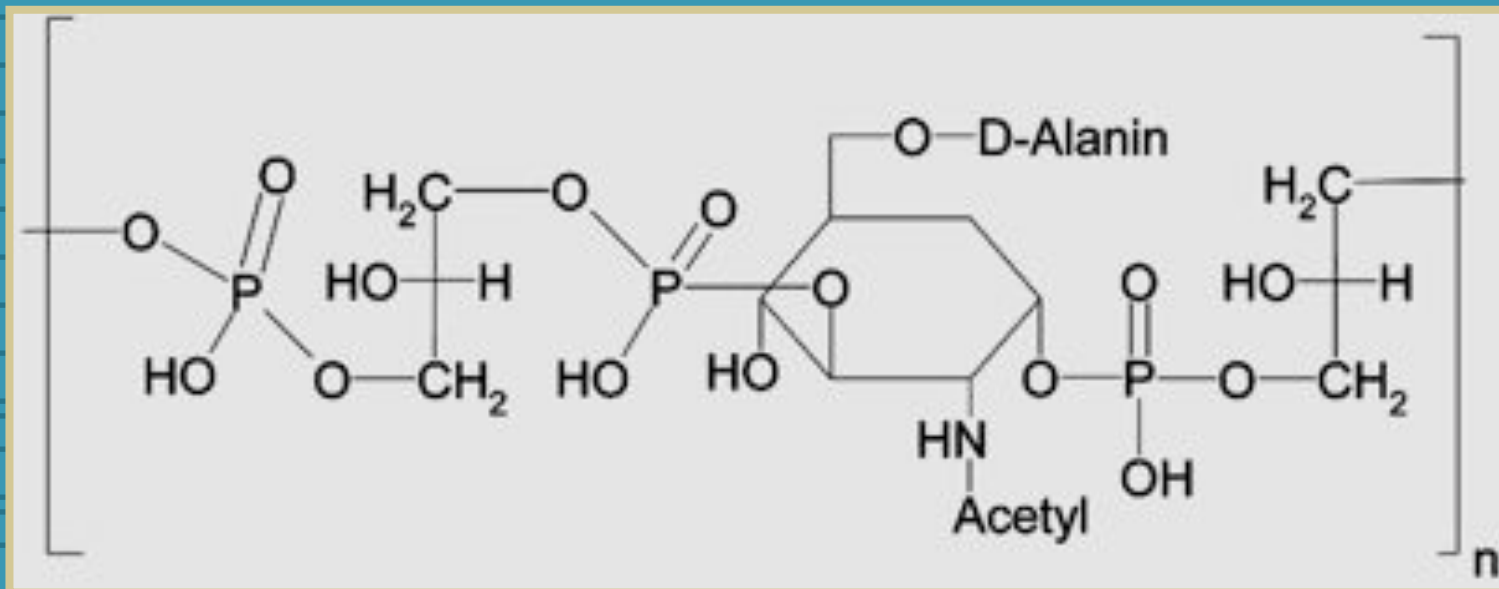


Peptidoglycane ou Muréine



▽ Lyszyme
△ Murendopeptidase

Acide Teichoïque



LES COLORATIONS

La Coloration de Gram

RESULTAT

ETAPES

PROCEDURE

Gram +

Gram -

**COLORATION
INITIALE**

Violet de gentiane
pendant 30 secondes

Violet

Violet

FIXATION

Lugol

Reste violet

Reste violet

DECOLORATION

Lavage à l'éthanol
95 % pendant 10 à
20 secondes

Reste violet

Deviens incolore

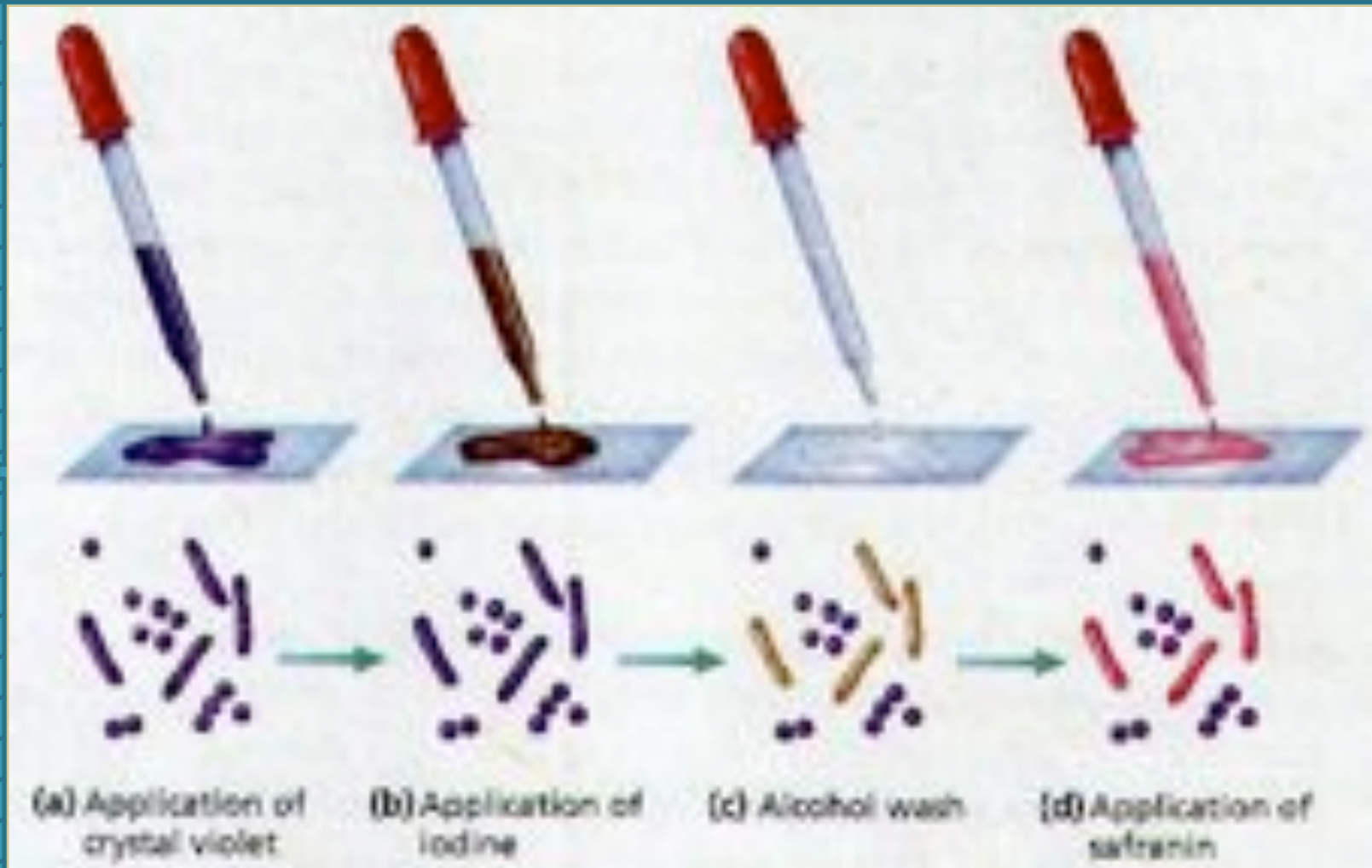
**CONTRE-
COLORATION**

Fuschine ou
Safranine pendant
20 à 30 secondes

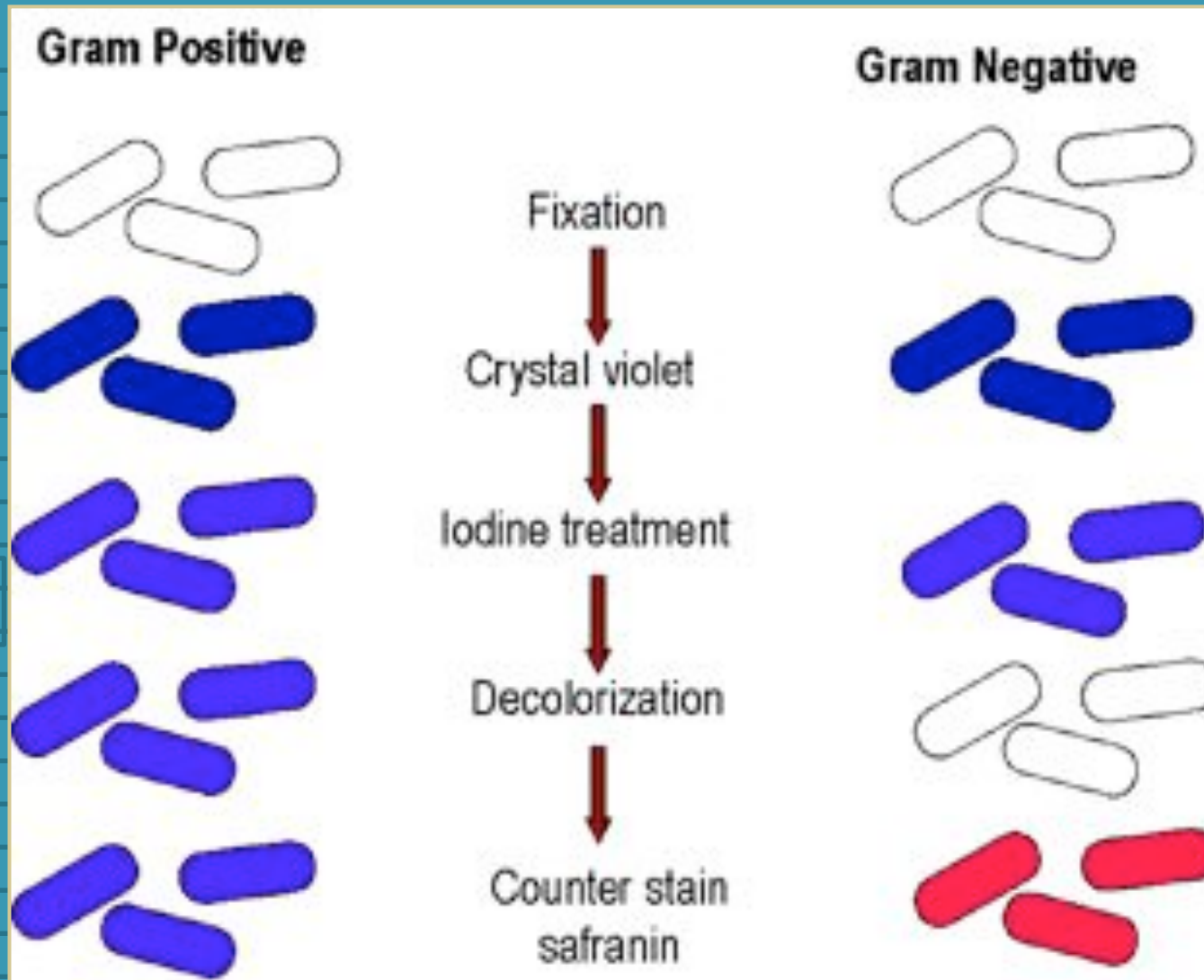
Reste violet

Coloration rose

COLORATION DE GRAM



COLORATION DE GRAM

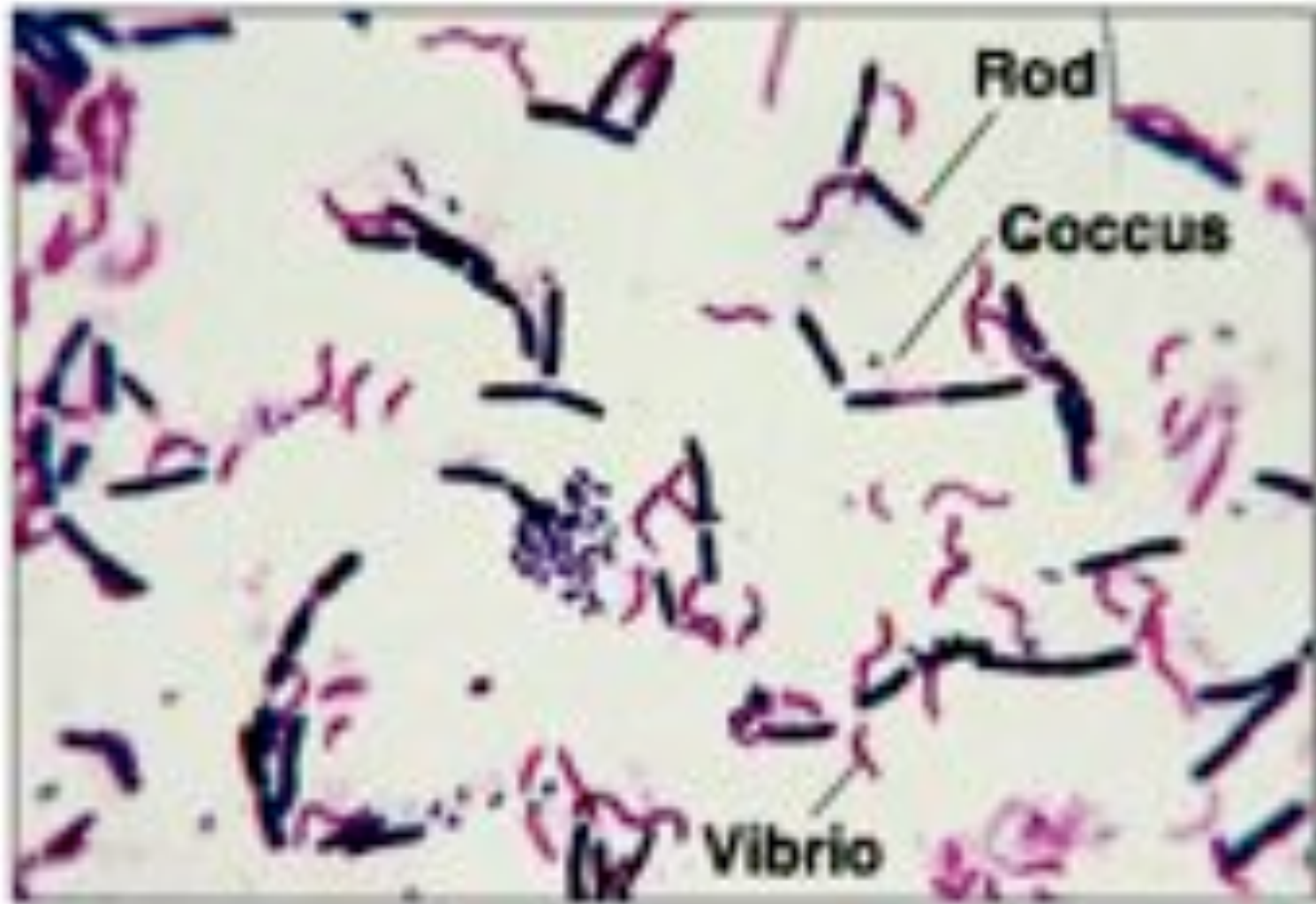


COLORATION DE GRAM

Mkriat Saint Exupéry
Marseille



COLORATION DE GRAM

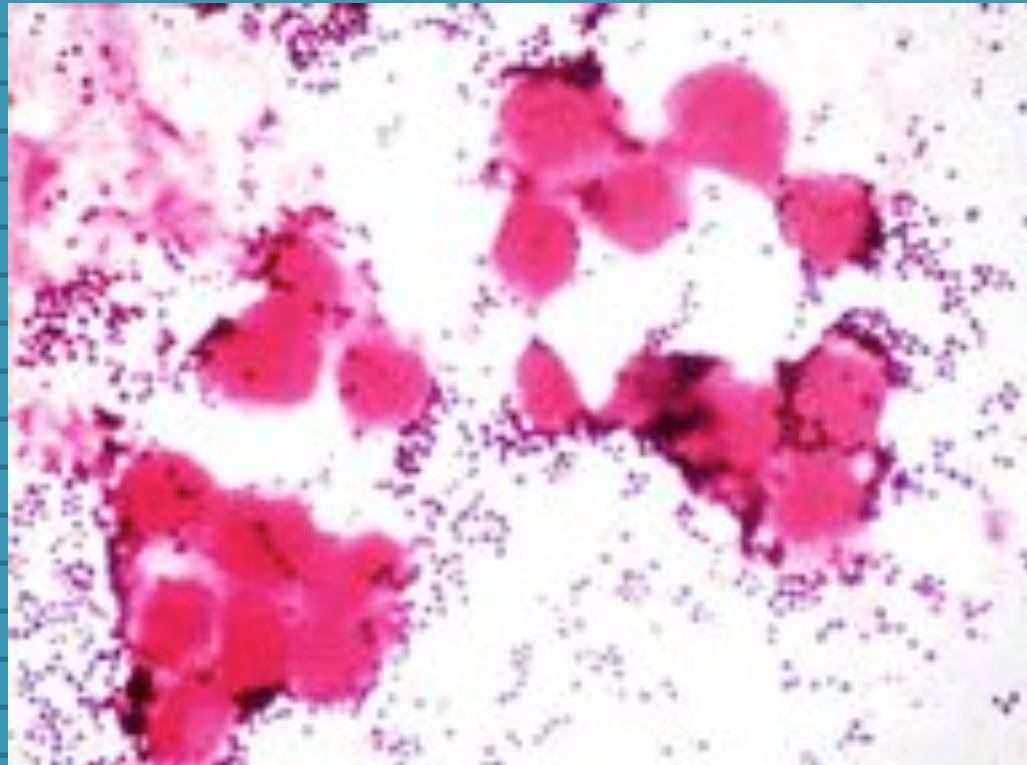


COLORATION DE GRAM

Bactéries
à
Gram positif

COLORATION DE GRAM

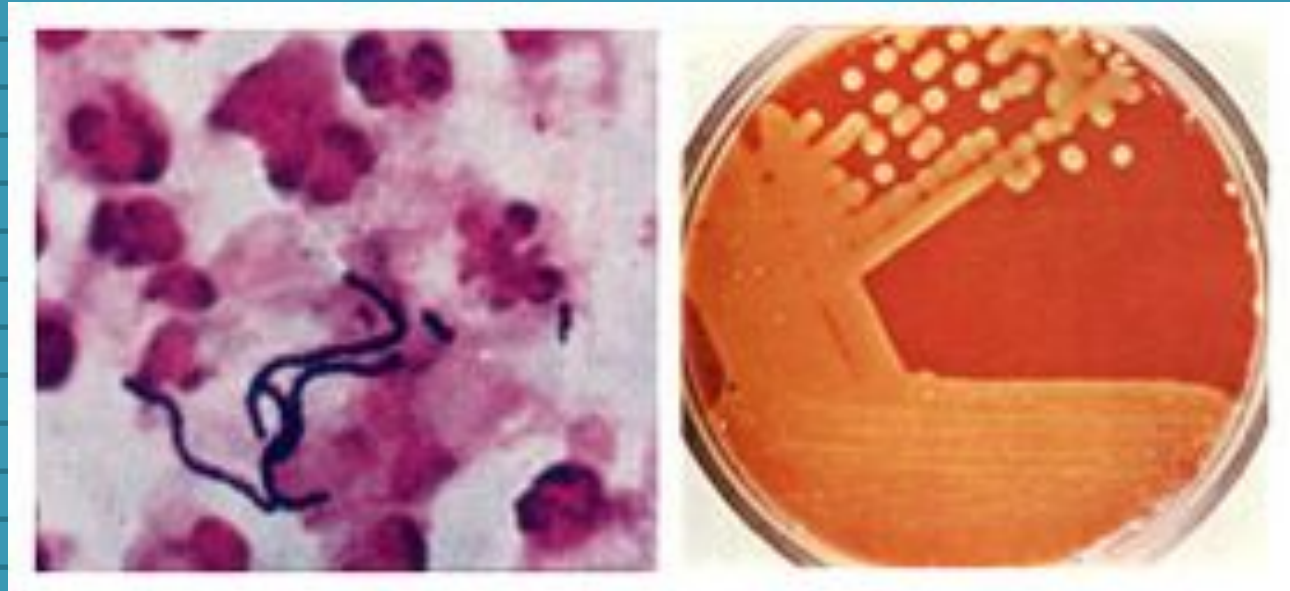
Bactéries à Gram positif



Coloration de Gram sur un exudat de pus avec
Staphylococcus aureus.

COLORATION DE GRAM

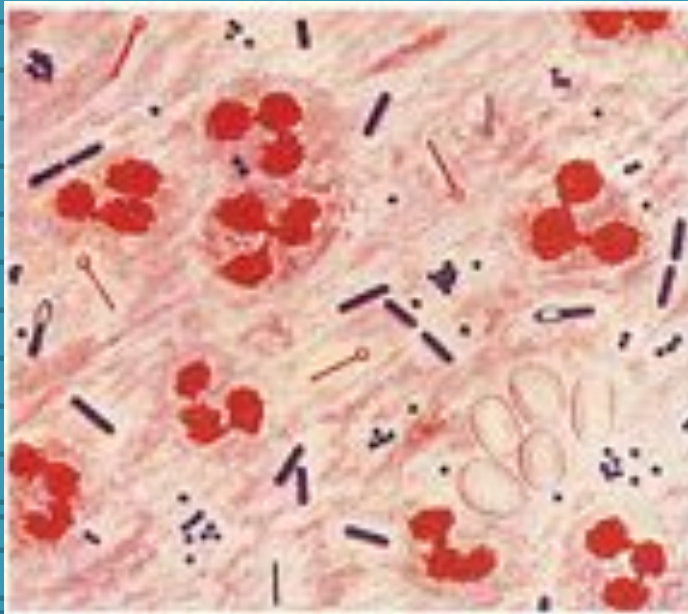
Bactéries à Gram positif



Streptococcus pyogenes. A gauche. Coloration de Gram de *Streptococcus pyogenes* sur un échantillon clinique. A droite. Colonies de *Streptococcus pyogenes* cultivées sur du agar au sang montrant une hémolyse de type beta (zones claires).

COLORATION DE GRAM

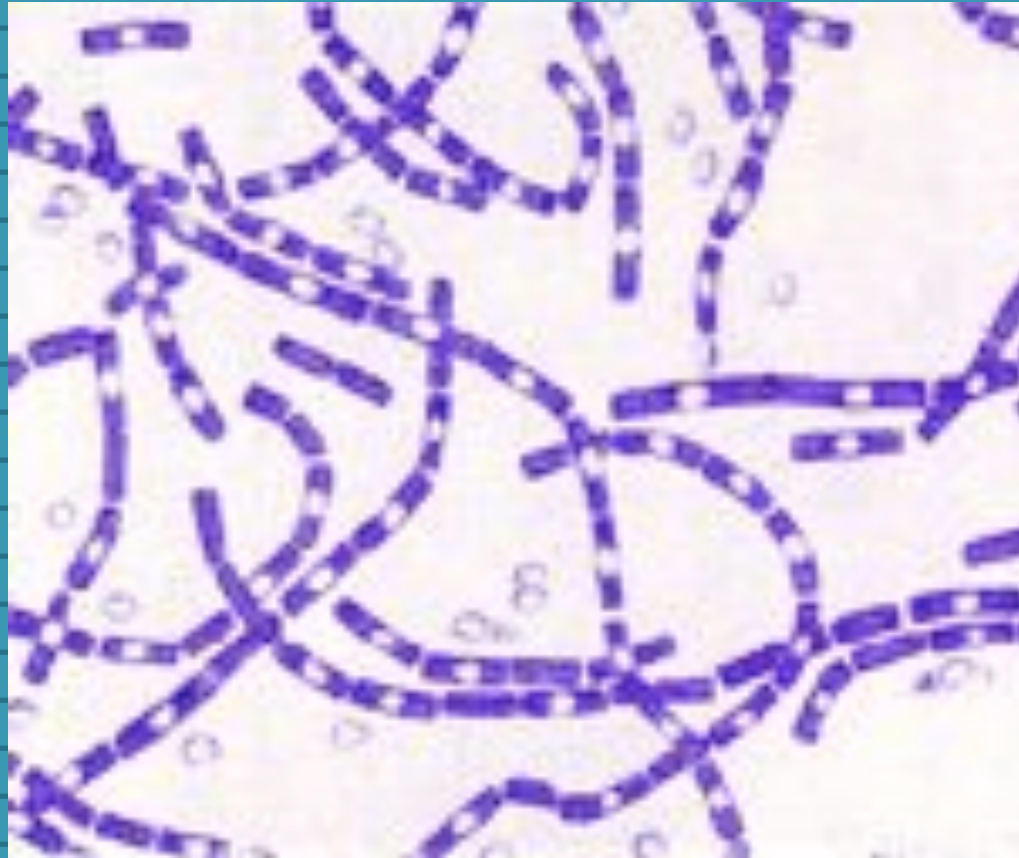
Bactéries à Gram positif



A gauche. Coloration de Gram sur un échantillon de pus dans une infection anaérobie mixte. Au moins trois différents *Clostridia* spp. sont visibles. A droite. Micrographie électronique de cellules de *Clostridium tetani*.

COLORATION DE GRAM

Bactéries à Gram positif



Bacillus anthracis

COLORATION DE GRAM

Bactéries à Gram positif



Bacillus anthracis



Bacillus cereus

COLORATION DE GRAM

Bactéries à Gram positif

Caractéristiques	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Besoin de thiamine pour la croissance</i>	+	-
<i>Hémolyse sur agar au sang de mouton</i>	-	+
<i>Capsule glutamyl-polypeptidique (colonies mucoïdes)</i>	+	-
<i>Lyse par le bactériophage gamma</i>	+	-
<i>Mobilité</i>	-	+
<i>Croissance sur agar au chlorhydrate</i>	-	+
<i>Test du collier des perles</i>	+	-

COLORATION DE GRAM

Bactéries
à
Gram négatif

COLORATION DE GRAM

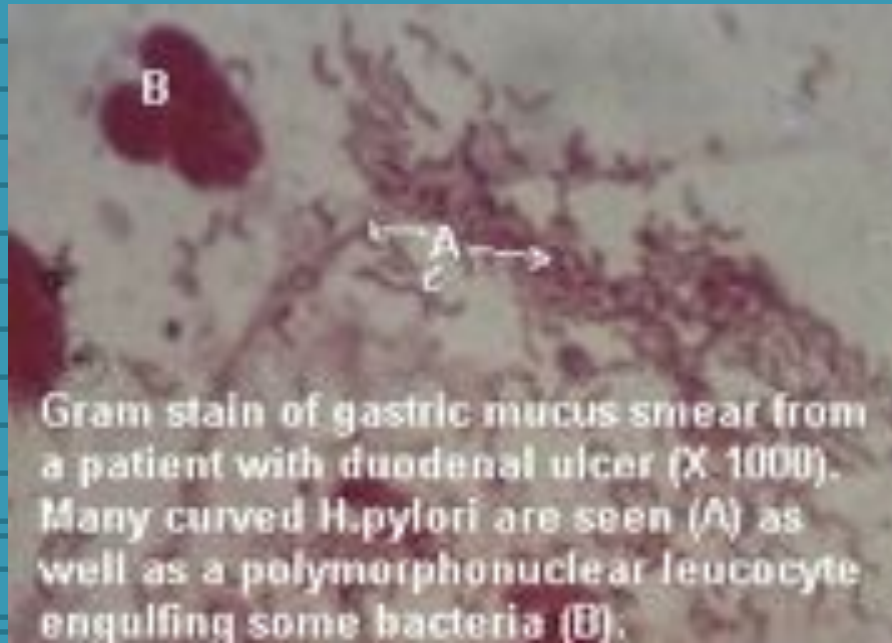
Bactéries à Gram négatif



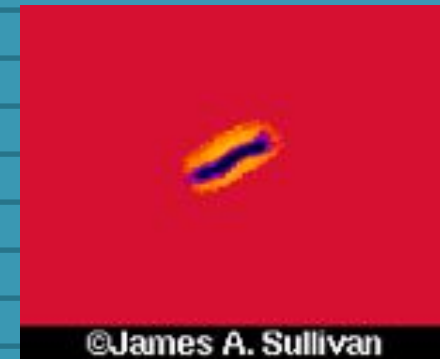
Pseudomonas aeruginosa

COLORATION DE GRAM

Bactéries à Gram négatif



Gram stain of gastric mucus smear from a patient with duodenal ulcer (X 1000). Many curved *H. pylori* are seen (A) as well as a polymorphonuclear leucocyte engulfing some bacteria (B).



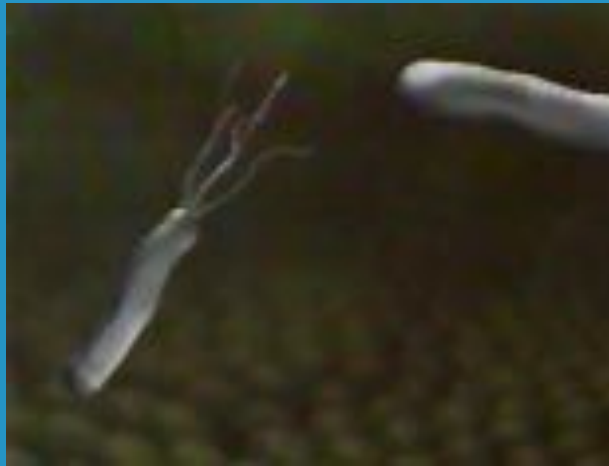
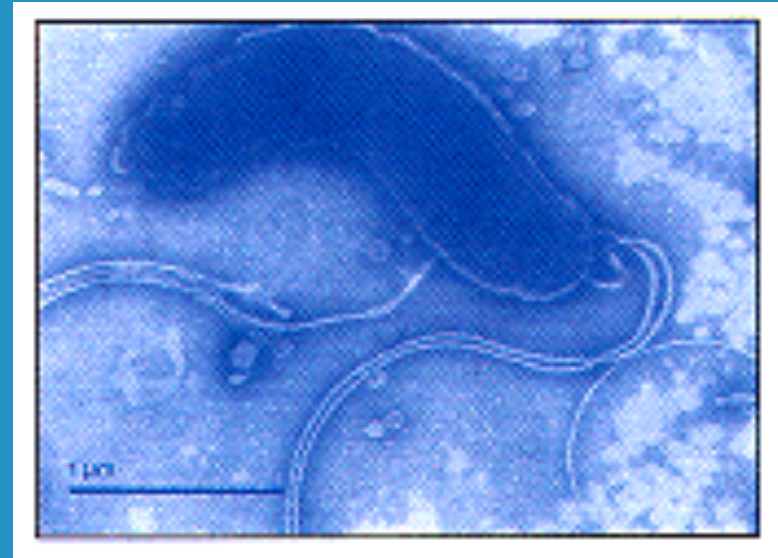
©James A. Sullivan

Coloration de Gram d'un échantillon de mucus gastrique d'un patient avec une ulcère duodénale. Plusieurs cellules courbées d'*Helicobacter pylori* sont observées (A) ainsi que des Leucocytes polymorphonucléaires avalant quelques bactéries (B).

Helicobacter pylori

Action de la bactérie

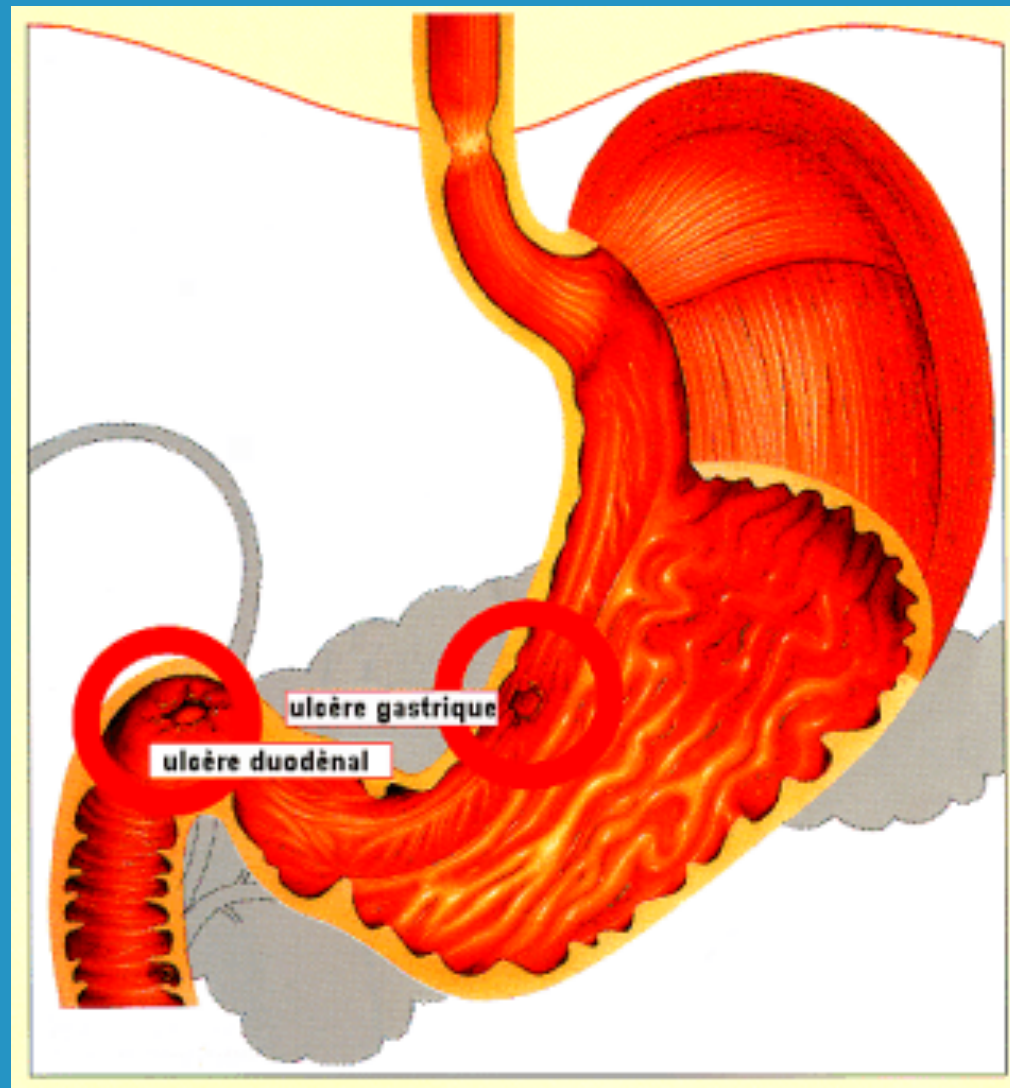
L'ulcère



Helicobacter pylori

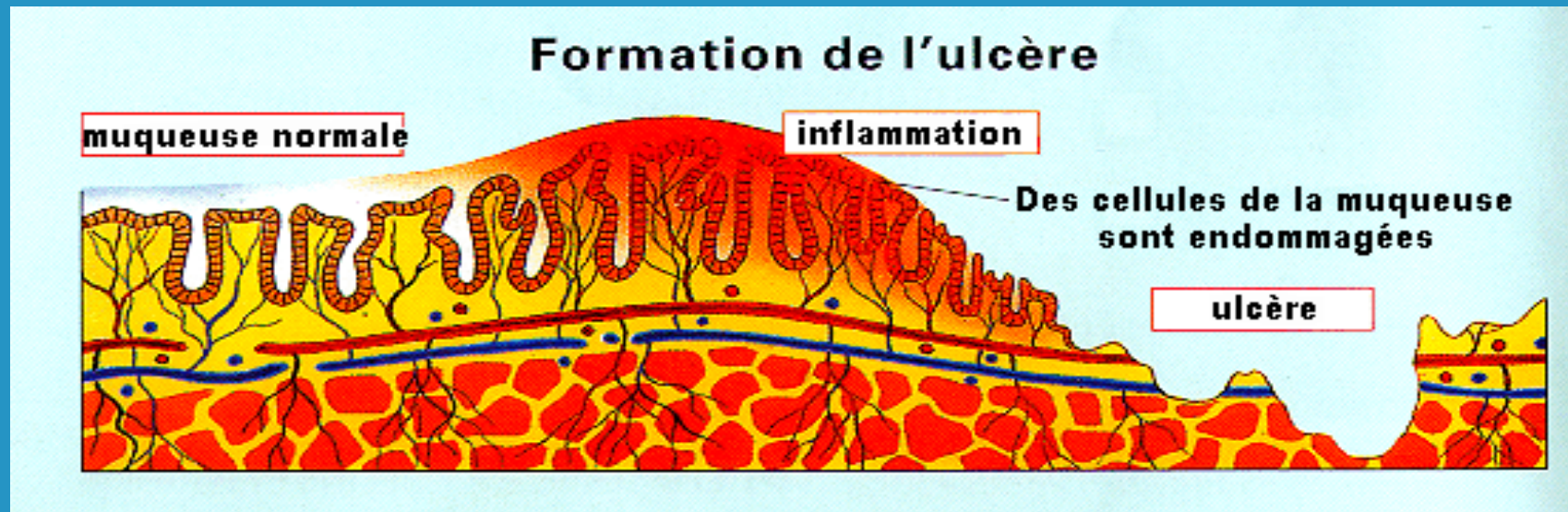
L'estomac

Ulcères



Action de la bactérie

L'ulcère gastrique



Helicobacter pylori

COLORATION DE GRAM

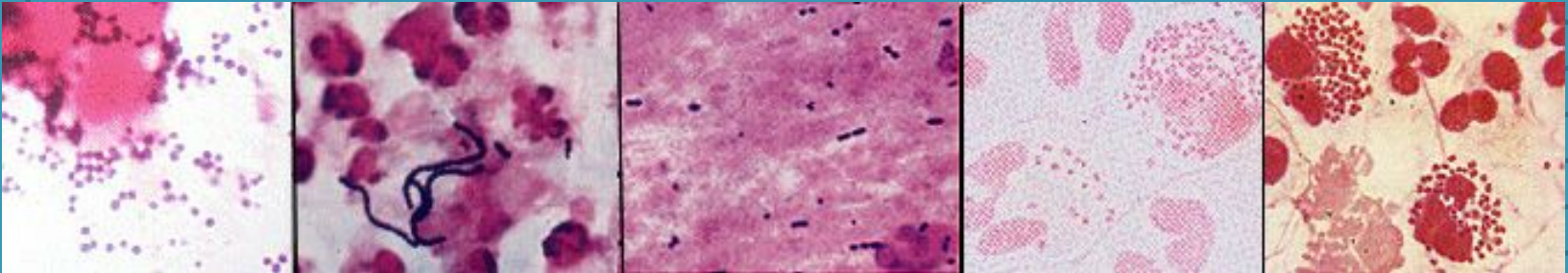
Bactéries à Gram négatif



Profil d'une Pseudomonade: Bâtonnet Gram -, mobiles par flagelles polaires. A) Microscopie électronique à transmission, coloration négative. B) Microscopie électronique à balayage. C) Coloration de Gram.

COLORATION DE GRAM

Bactéries à Gram positif et à Gram négatif



Galerie de coques pyogéniques, coloration de Gram d'échantillons cliniques (pus), De gauche à droite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* (blennorragie), *Neisseria meningitidis* (méningocoque).

Différences entre Bactéries Gram + et Gram -

- Les bactéries Gram + sont fréquemment sensibles à la pénicilline.
- Elles sont productrices d'exotoxines.
- Elles sont sensibles aux désinfectants à base de phénol.
- Exemples : *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium tetani* et *Corynebacterium diphtheriae*.

- Les bactéries Gram - sont fréquemment sensibles aux tétracyclines et aux aminoglycosides : gentamicine, néomycine et kanamycine.
- Elles sont productrices d'endotoxines.
- Elles sont sensibles au chlore, à l'iode et aux détergents.
- Exemples : *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Bordetella pertussis* et *Yersinia pestis*.

Différences entre Bactéries Gram + et Gram -

Comparaison des caractères physiologiques des bactéries Gram positif et négatif

<u>PROPRIETES</u>	<u>Gram +</u>	<u>Gram -</u>
Besoins nutritifs	Plutôt complexes	Plutôt simples
Tolérance à la déshydratation	Forte	Faible
Inhibition de la croissance par : - la pénicilline - les colorants	Forte Forte	Faible Faible
Destruction de la paroi par le lysozyme	Forte	Faible
Excrétion d'exoenzymes	Fréquente	Rare*
Libération d'exotoxines	Oui	Non
Production d'endotoxines	Non	Oui
Resistance aux chocs physiques	Forte	Faible

* Enzymes retenues dans le périplasme

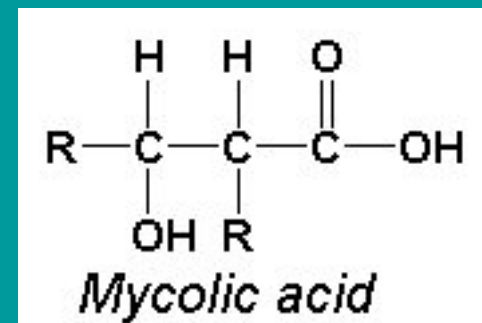
Les mycobactéries

Les **Mycobactéries** forment un groupe de bactéries particulières dont fait partie *Mycobacterium tuberculosis*. En plus du peptidoglycane, la paroi de ces bactéries contient des acides gras particuliers, les acides mycoliques, qui leur confèrent des propriétés particulières.

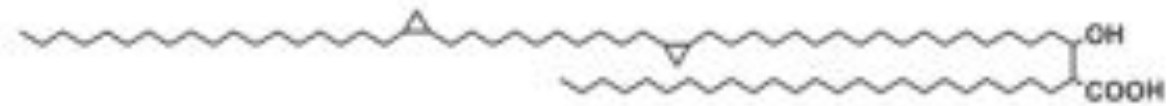
On peut noter :

- ✓ Une grande résistance à la dessiccation: le bacille tuberculeux peut survivre pendant des semaines dans les expectorations desséchées;
- ✓ Une résistance à l'action des alcalis et à celle de certains désinfectants;
- ✓ Une résistance à l'action des acides et de l'alcool qui leur est spécifique;
- ✓ Un comportement hydrophobe.

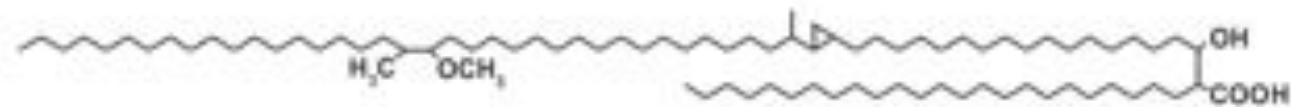
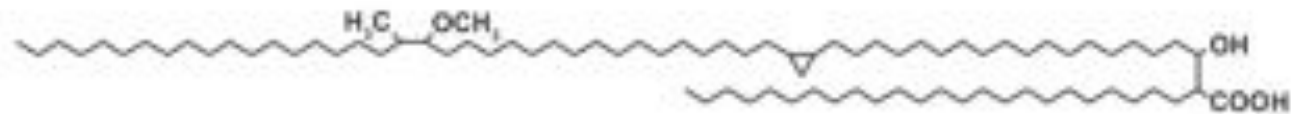
BAAR = Bacille acido-alcool résistant



α -Mycolates



Methoxymycolates



Ketomycolates

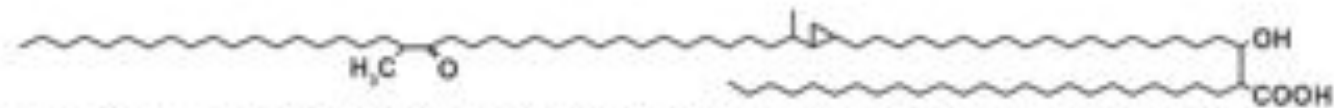
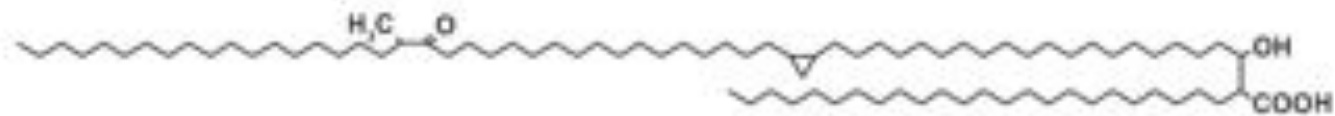
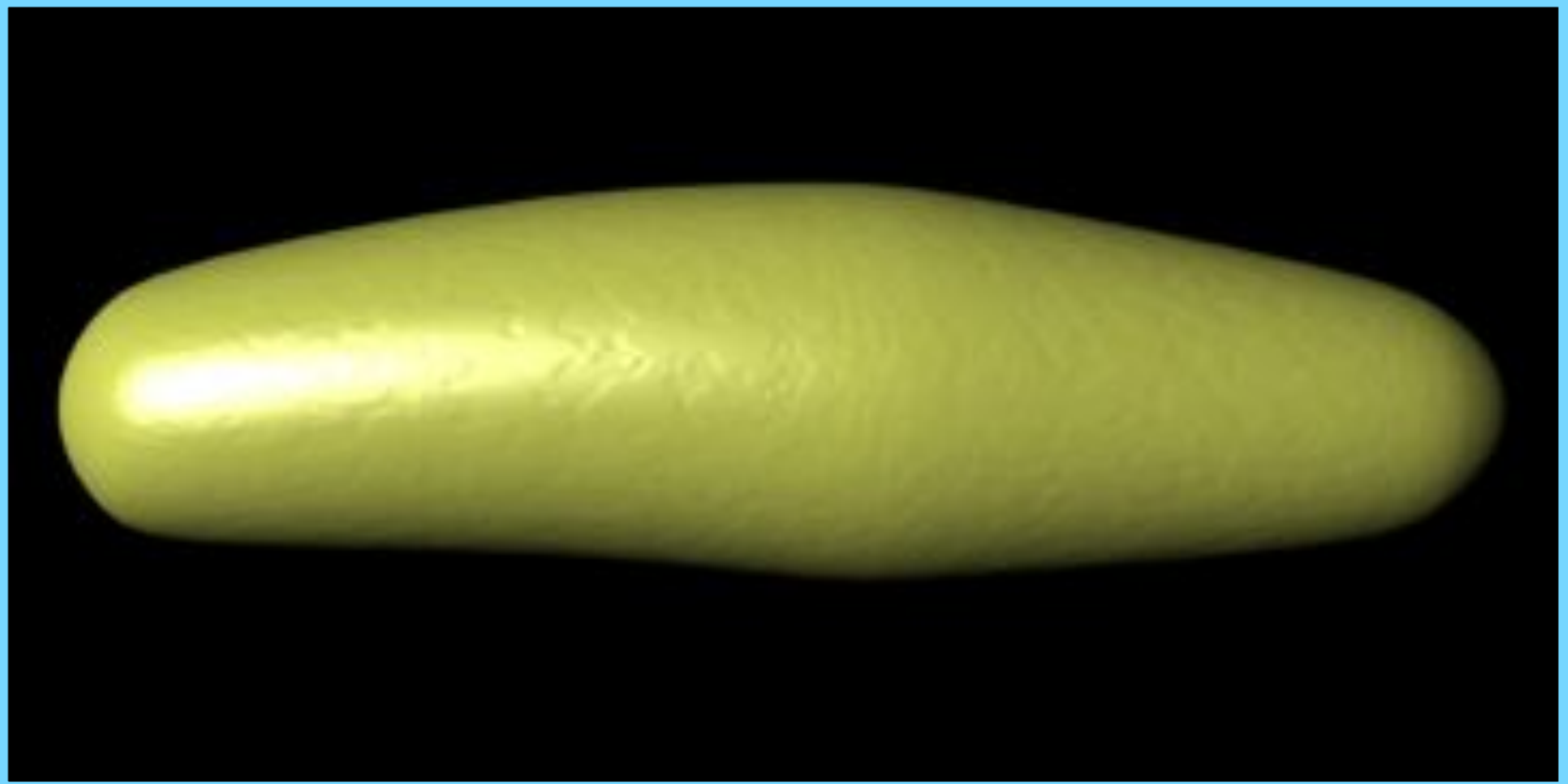


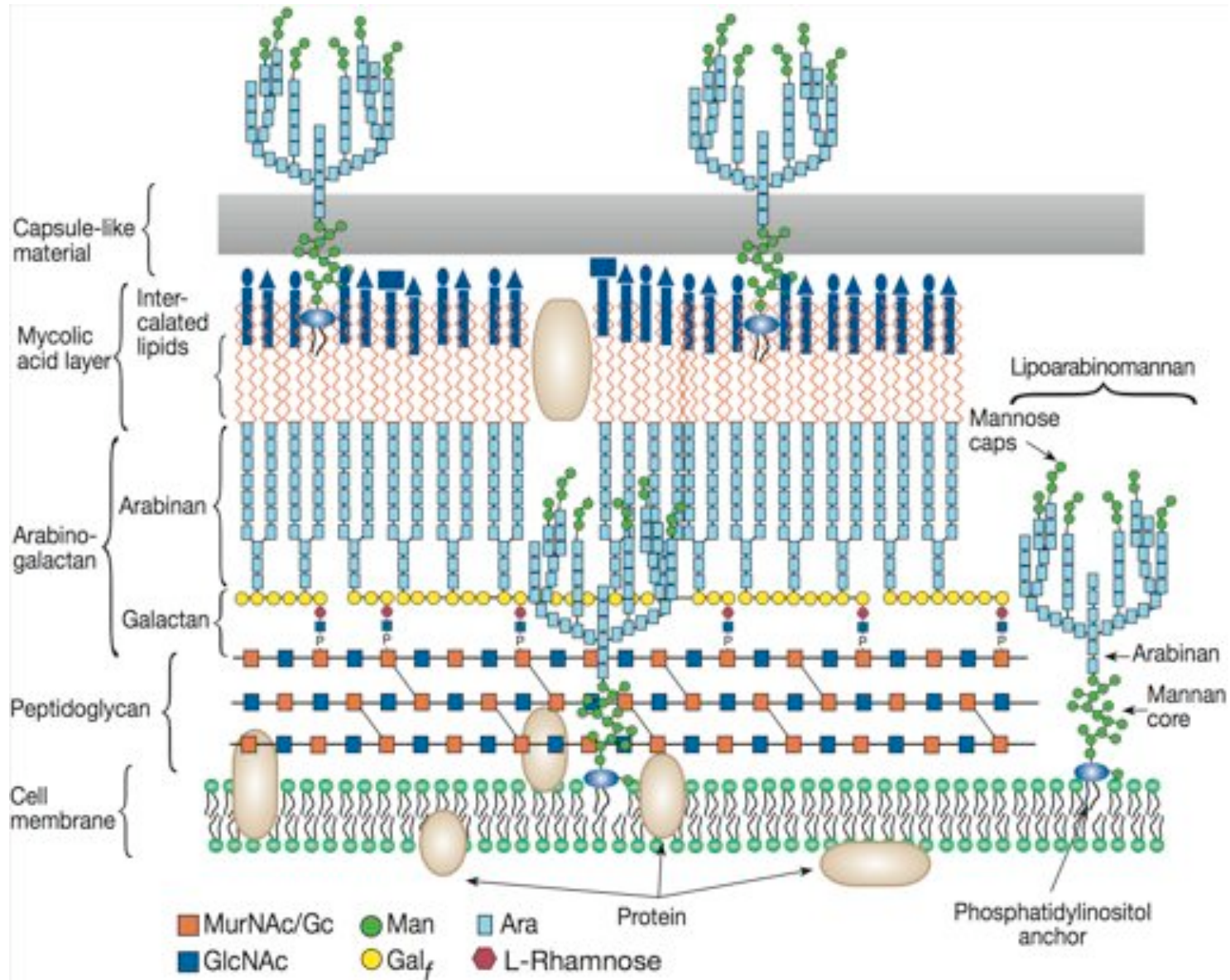
Fig. 2: the structures of mycolic acids identified in *Mycobacterium tuberculosis*. α -Mycolates: its meromycolate chain contains two cis-cyclopropanes; Methoxymycolates: its meromycolate chain contains an α -methyl methyl-ether moiety in the distal position and a cis-cyclopropane or an α -methyl trans-cyclopropane in the proximal position; Ketomycolates: its meromycolate chain contains an α -methyl ketone moiety in the distal position and proximal functionalities as in the methoxy series. It should be pointed out that, more recently, unsaturations have been detected in the meromycolate chain of *M. tuberculosis* (Watanabe et al. 2002), which are not shown here.

Les mycobactéries



Mycobacterium tuberculosis

Structure of the cell wall of mycobacteria



La Coloration de Ziehl-Neelsen

Quand les *Mycobacterium tuberculosis* sont cultivées en milieu liquide, elles restent difficilement en suspension. C'est pourquoi elles forment des voiles en surface et des agrégats difficiles à séparer dans de tels milieux. C'est aussi pourquoi on ajoute des substances tensio-actives dans les milieux de culture de ces espèces afin d'en permettre une dispersion plus uniforme.

Il faut signaler que la résistance à l'action des acides et de l'alcool (on dit que les *Mycobacterium tuberculosis* sont alcoolo-acido-résistantes) est à l'origine de la Coloration de Ziehl-Neelsen. Cette coloration est spécifique et permet de distinguer ces bactéries de toutes les autres.

La Coloration de Ziehl-Neelsen

1



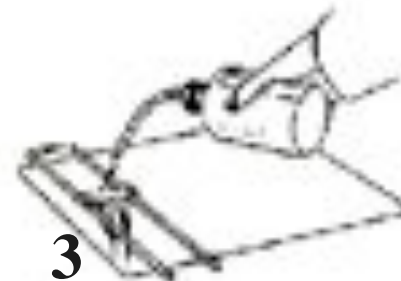
Recouvrir la lame de fuchsine de Ziehl. Chauffer sur de l'eau bouillante pendant 8 min. Ajouter du colorant s'il s'est dissipé.

2



Après que la lame est refroidie, décolorer avec la solution d'alcool acidifié pendant 10-20 s.

3



Arrêter la décoloration en rinçant brièvement avec de l'eau distillée.

4



Contre-coloration avec du bleu de méthylène pendant 30 s.

5



Rincer brièvement avec de l'eau distillée pour enlever l'excès de bleu de méthylène.

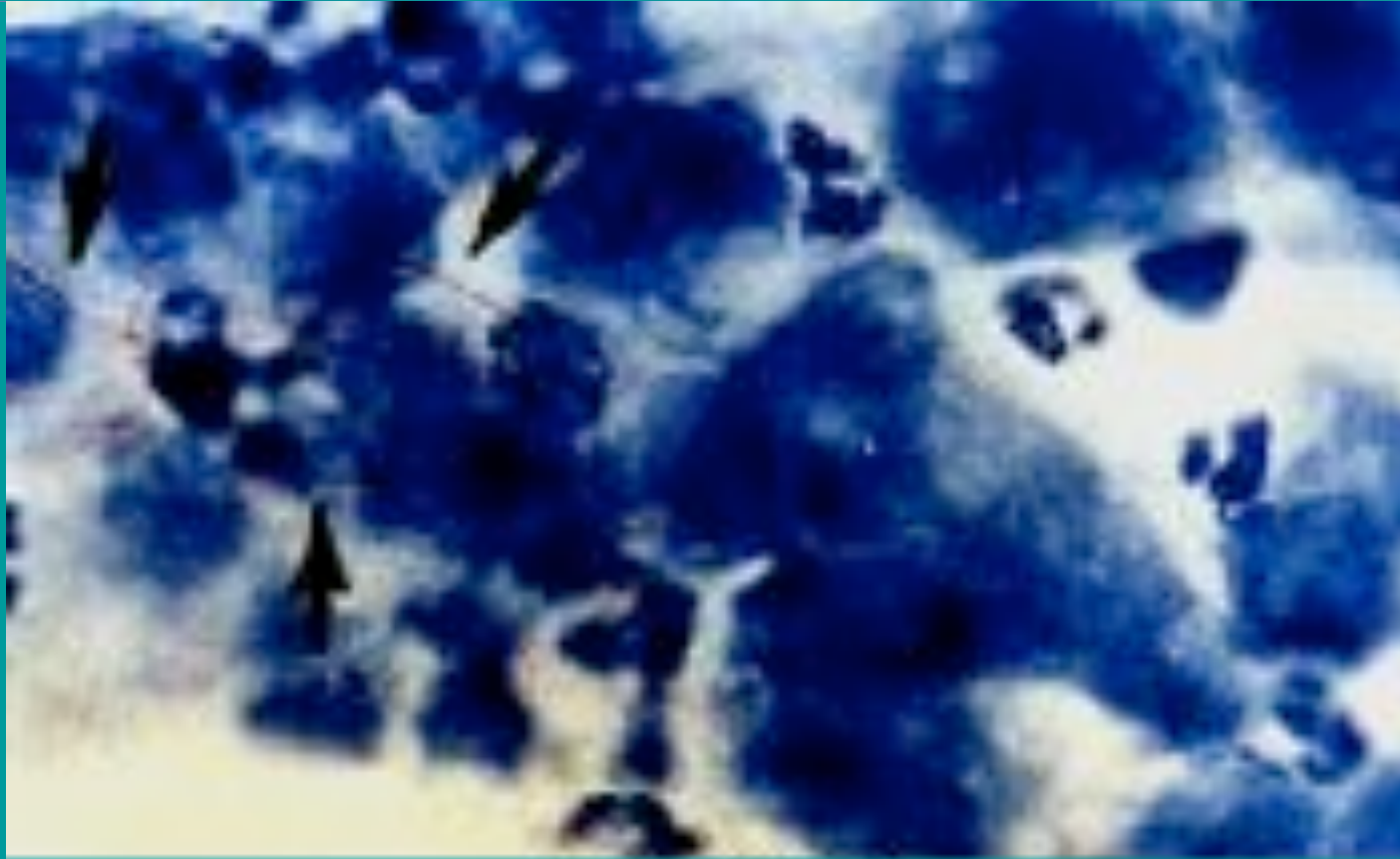
6



Sécher légèrement avec du papier bouvard et examiner directement avec l'objectif d'immersion.

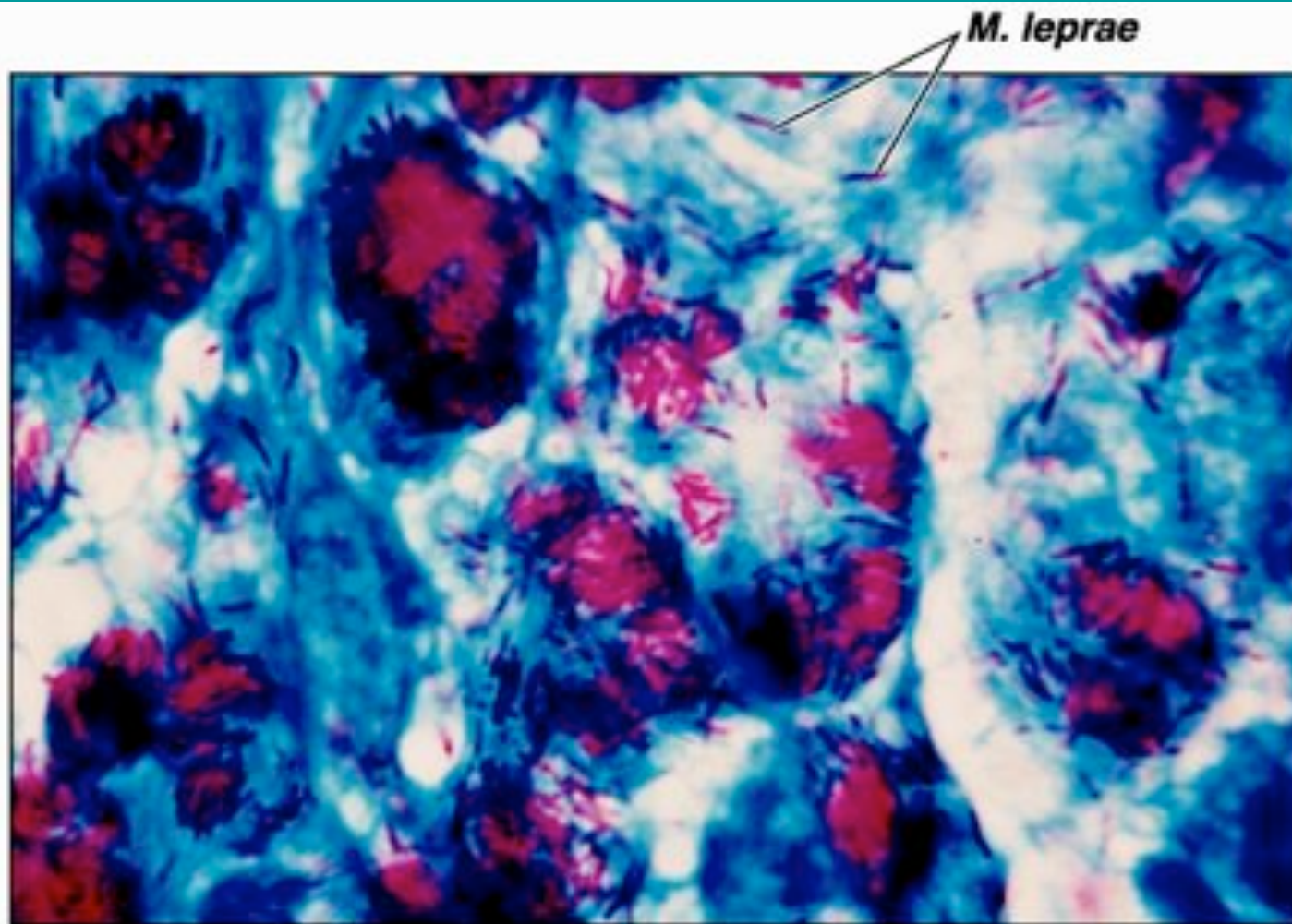
Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

La Coloration de Ziehl-Neelsen



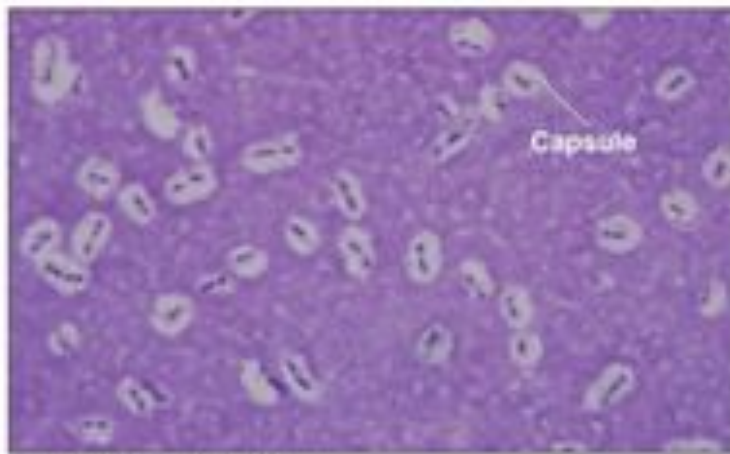
Mycobacterium
Acid Fast Stain

La Coloration de Ziehl-Neelsen

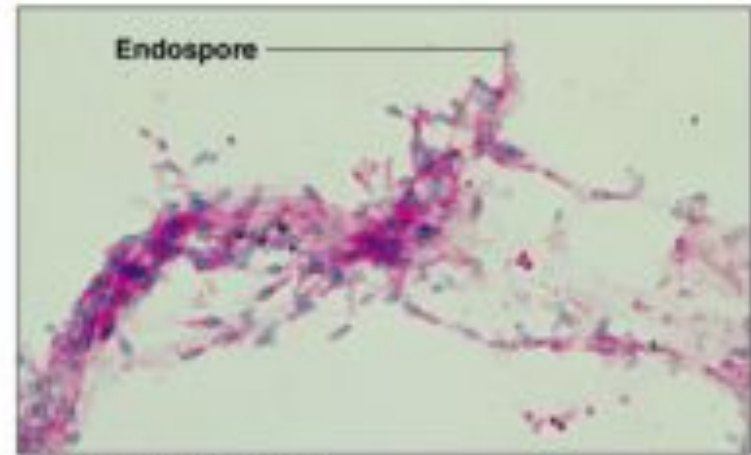


Autres colorations

- a) Négative à l'encre de Chine
- b) Coloration de spores (vert malachite)
- c) Coloration de flagelles (Rhodes)



(a) Negative staining.



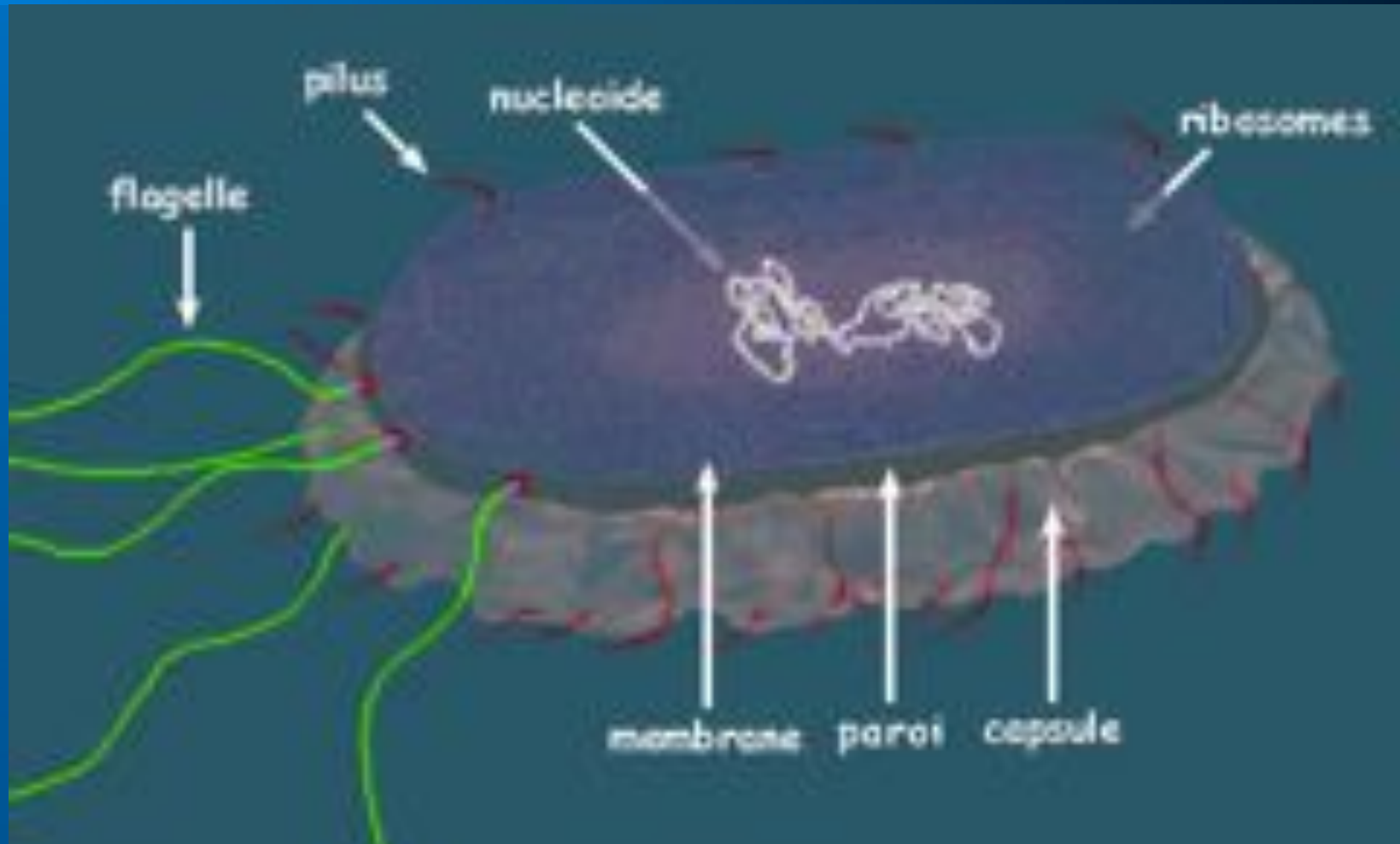
(b) Endospore staining.



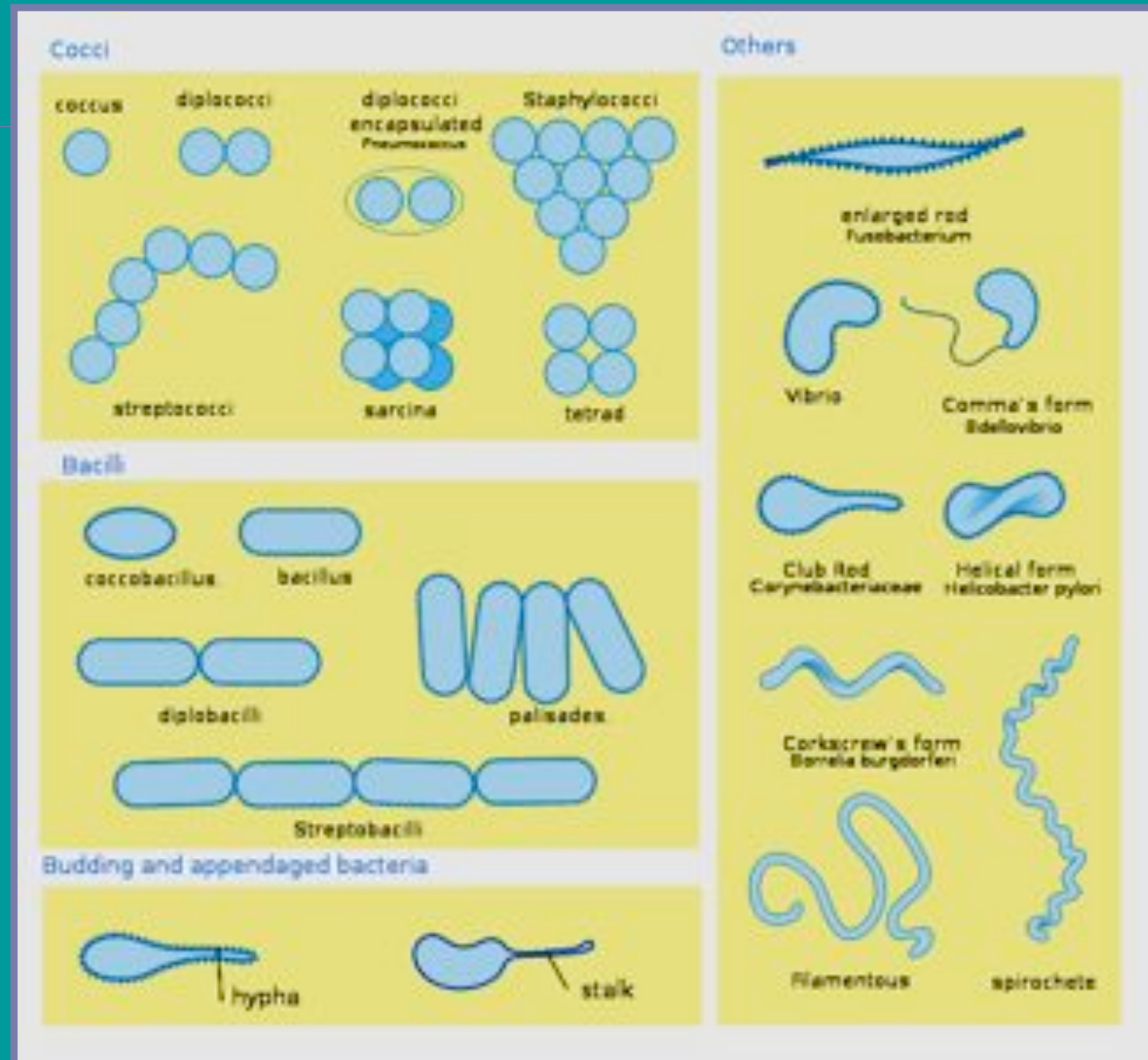
(c) Flagella staining.

Anatomie des Bactéries

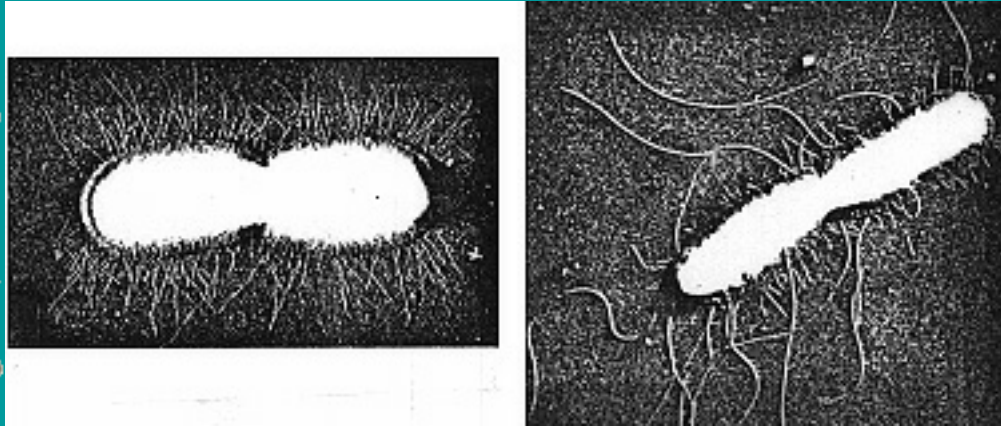
Structure



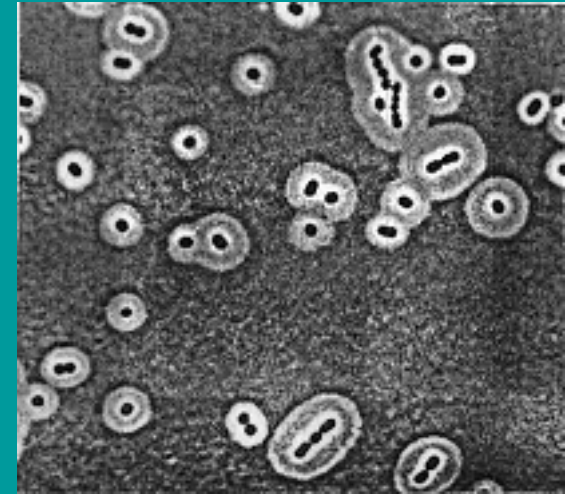
Morphologie des bactéries



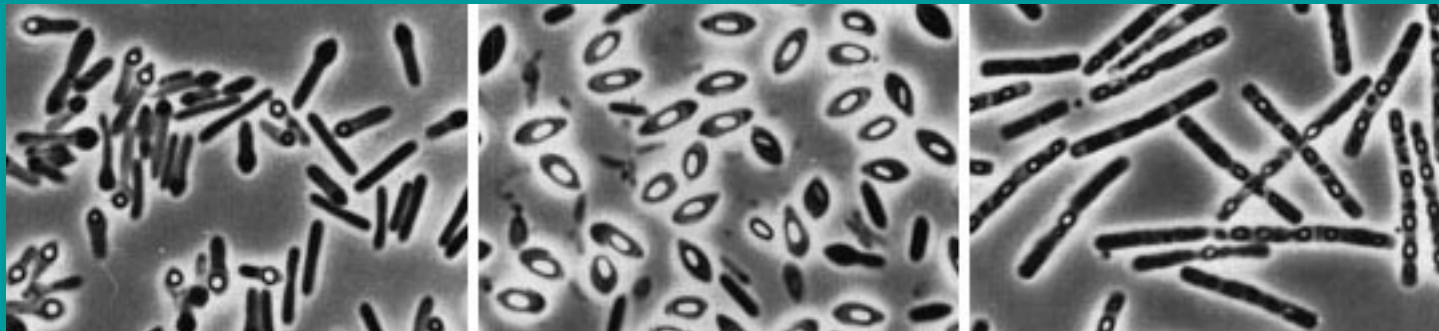
Morphologie des bactéries



Pili, fimbriae et flagelles



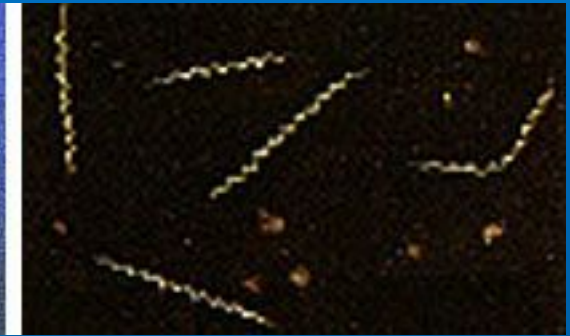
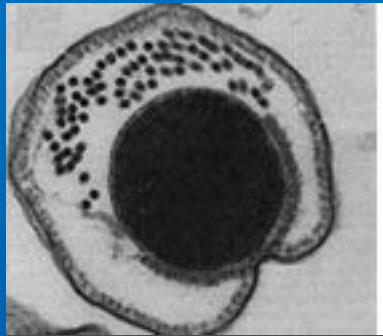
Capsules



Endospores

Anatomie des Bactéries

Exemples : flagelles et inclusions



Borrelia burgdorferi

Treponema pallidum



Salmonella typhi



Chromatium vinosum *Thiospirillum jenense* *Thiopedia rosea*

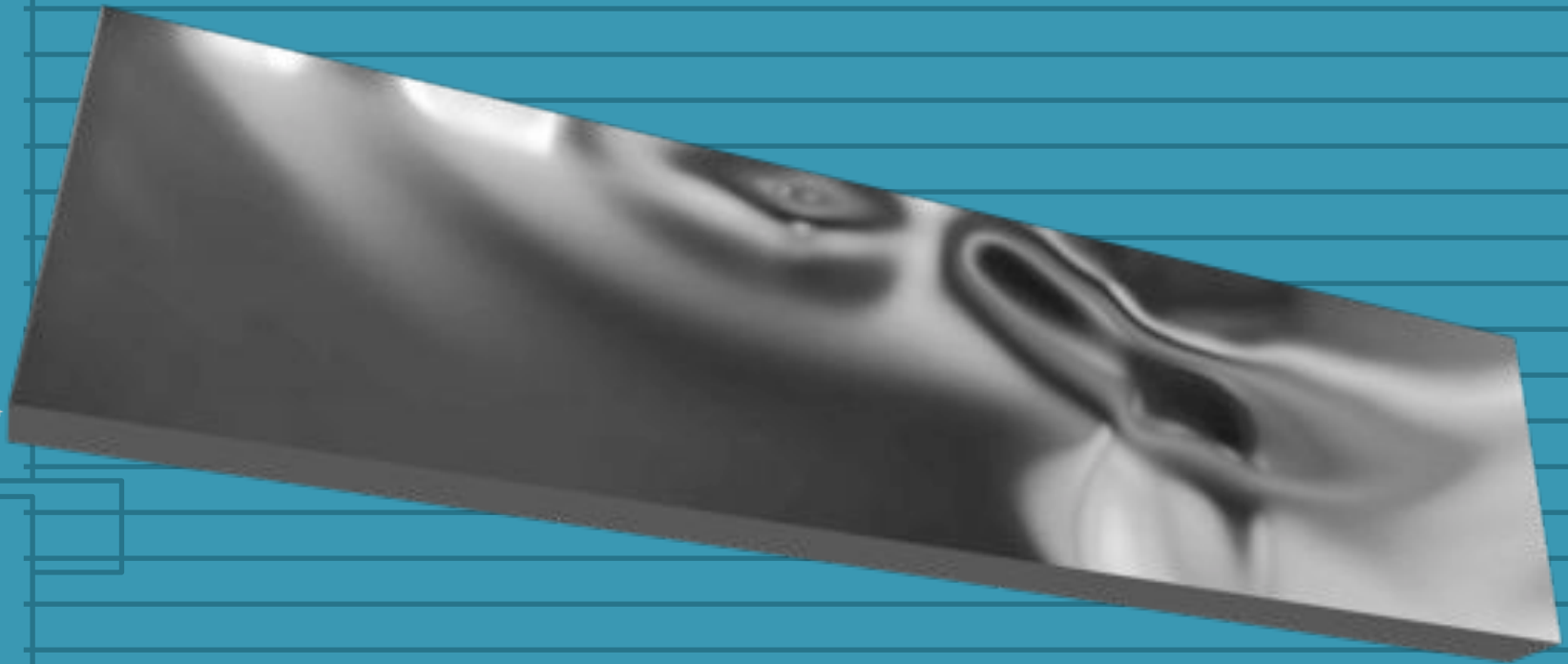
Anatomie des Bactéries

Structures diverses

Fonctions des inclusions et granulations chez les bactéries

Poly-β-hydroxy-butyrates (PHB)	La plupart des bactéries	Réserves en carbone et en énergie
Globules de Souffre	Bactéries oxydant le H ₂ S, photosynthétiques et pourpres	Réserves en énergie
Vacuoles gazeuses	Bactéries aquatiques	Flottabilité
Carboxysomes	Bactéries autotrophes	Site de la fixation du CO ₂
Chlorosomes	Bactéries photosynthétiques	Centre de réception de la lumière
Inclusions d'hydrocarbures	Bactéries métabolisant les hydrocarbures	Réserves en carbone et en énergie
Magnétosomes	Bactéries aquatiques	Magnétotaxie (Orientation)
Polyglycosides	La plupart des bactéries	Réserves en carbone et en énergie
Polyphosphate	La plupart des bactéries	Réserves en phosphate
Cyanophicine	La plupart des cyanobactéries	Réserves en azote
Phycobilisomes	La plupart des cyanobactéries	Centres de réception de la lumière

Introduction à la Microbiologie



A suivre ...