

TD 3

Colorations usuelles en microbiologie

I- Introduction

Le diagnostic bactériologique repose sur plusieurs étapes nécessaires pour mettre en évidence et identifier les germes impliqués dans les infections ou les contaminations.

Deux étapes fondamentales dans ce processus sont l'examen direct à l'état frais et l'examen après coloration. L'examen direct permet d'observer les échantillons sans traitement supplémentaire, tandis que l'examen après coloration nécessite l'utilisation de techniques de coloration pour améliorer le contraste et faciliter l'observation des bactéries au microscope. La plupart des bactéries n'ont pas de couleur intrinsèque, c'est pourquoi l'application d'un réactif de coloration est nécessaire pour les rendre visibles. Une fois colorées, les bactéries peuvent être étudiées en termes de leur forme, leur taille et leur disposition. La réalisation de frottis de bonne qualité est une **condition préalable** à toute coloration.

II- Réalisation de frottis fixé

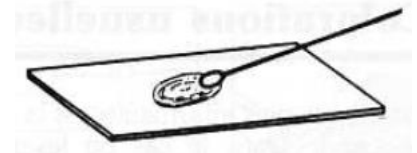
Un frottis bactérien est une fine couche de bactéries placée sur une lame de verre et « fixées » par la chaleur ou autres, pour s'assurer qu'elles restent attachées au verre, pour la coloration. Il doit être réalisé le plus rapidement possible après le prélèvement. Il peut être préparé à partir d'un milieu solide ou de bouillon selon les étapes suivantes :

II.1. Étalement des frottis

La surface d'une lame de verre est dégraissée avec de l'alcool sur un bec Bunsen, et déposée ensuite sur un support de coloration avec la surface dégraissée vers le haut, laisser refroidir.

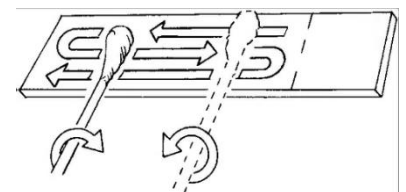
À partir d'un milieu solide (culture bactérienne)

Une goutte d'eau stérile est placée dans une zone sur la lame. Avec une anse de platine, on mélange complètement l'échantillon (colonies bactériennes) avec l'eau et on étale le mélange pour couvrir environ la moitié de la surface totale de la lame.



À partir d'un milieu liquide (prélèvement ou suspension bactérienne)

L'écouvillon est immergé dans le liquide pendant plusieurs secondes, puis utilisé pour faire un frottis sur la lame de verre en faisant rouler l'écouvillon d'avant en arrière sur les zones contiguës de la lame de verre.

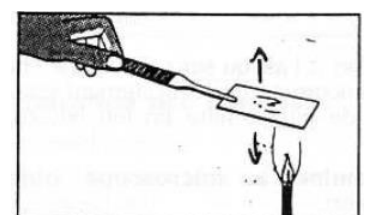


II.2. Séchage du frottis

Le séchage doit précéder la fixation. Il doit se faire autant que possible à la température du laboratoire, à la rigueur en posant la lame sur une platine chauffante réglée à 37°, ou en la maintenant dans l'air chaud **au-dessus** de la veilleuse d'un bec Bunsen.

II.3. Fixation du frottis

La fixation est souvent obtenue soit par **chauffage** (Ex : en passant rapidement la lame trois fois à travers le bec Bunsen), soit par traitement **chimique** (alcool méthylique absolu, alcool éthylique absolu ou à 95° ou l'alcool-éther). En plus de fixer l'échantillon à la lame, la fixation tue également les micro-organismes dans l'échantillon, arrêtant leur mouvement et leur métabolisme tout en préservant l'intégrité de leurs composants cellulaires pour l'observation.



Fixation par la chaleur.

Quelle que soit la technique de fixation employée, la lame doit être rincée à l'eau distillée, égouttée et séchée avant d'être colorée.

III- Colorations

La surface et le cytoplasme des cellules bactériennes, l'ADN, l'ARN, les protéines et le chromosome sont chargés négativement, pour les colorer un colorant chargé positivement est appliqué. On distingue :

III-1. Coloration simple (coloration au bleu de Méthylène)

Le **bleu de méthylène**, ou **chlorure de méthylthioninium** utilisé pour la première fois en 1886 dans le domaine médical par Dr Paul Ehrlich, est un composé organique, solide cristallisé inodore soluble dans l'eau et, dans une moindre mesure, dans l'éthanol. Il est largement utilisé dans les indicateurs chimiques, les colorants, les colorants biologiques et les médicaments

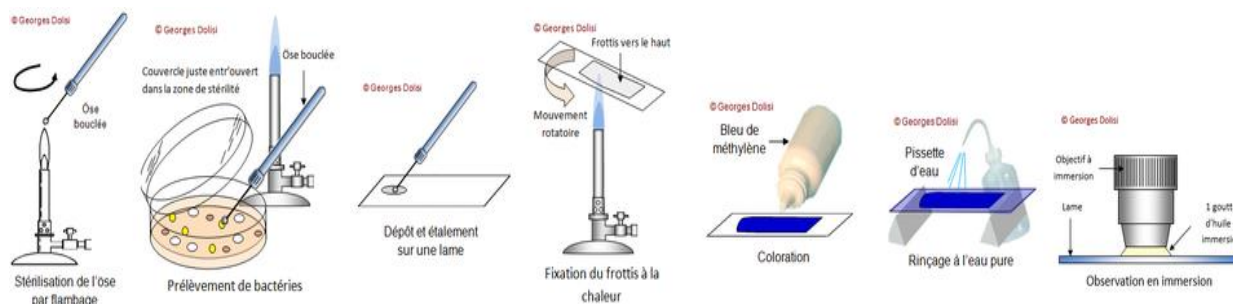
La **coloration au bleu de méthylène** est une coloration rapide, économique et d'usage courant.

Principe : Étant donné que les cellules ont généralement des parois cellulaires chargées négativement, les chromophores des colorants basiques, chargés positivement, ont tendance à coller aux parois cellulaires, ce qui en fait des taches positives.

La **coloration au bleu de méthylène** est une **coloration simple** où un seul colorant est utilisé pour souligner des structures particulières dans l'échantillon, la forme (la taille et la disposition des bactéries). Les organismes d'un échantillon seront de la même couleur, même si l'échantillon contient plus d'un type d'organismes.

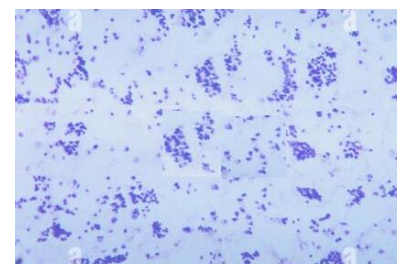
Réalisation de la coloration au bleu de méthylène

- Après avoir effectué le frottis bactérien (étalement, fixation)
- Placer la lame sur un support de coloration et l'inonder de bleu de méthylène. Laisser agir pendant 1-3 minutes
- Rincer doucement la lame avec de l'eau distillée, égoutter l'excès d'eau, éponger (ne pas frotter) avec du papier absorbant et laisser les lames sécher complètement à l'air.
- Examiner à l'objectif x100 à immersion (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert)



Interprétation : Les **structures colorables apparaissent bleues**, la coloration permet de détecter la morphologie de ces structures, leur mode de groupement et dans certains cas le type cellulaire

Coloration des bactéries *Francisella tularensis* au bleu de méthylène



III. 2. Colorations différentielles

Les colorations différentielles sont utilisées pour étudier la morphologie bactérienne et pour diviser les cellules bactériennes en groupes distincts. La méthode de coloration différentielle nécessite généralement plusieurs colorants et plusieurs étapes de coloration. Lorsqu'elle est utilisée pour l'identification bactérienne, la coloration différentielle peut être combinée avec d'autres méthodes.

III.2.1. Coloration de Gram

C'est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, publiée par Hans Christian Gram en 1884, elle permet de différencier les bactéries selon les critères suivants :

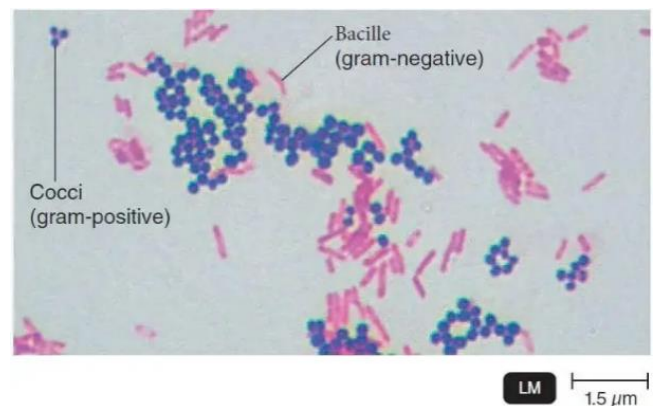
- **Forme** : Cocci, bacilles,
- **Arrangement** : Paires, tétrades, amas, chaînettes, ...
- **Affinité pour les colorants** : Gram positif ou Gram négatif

Principe de la coloration de Gram

Qu'est-ce qui fait que certaines bactéries retiennent le violet gentiane (Gram positif) tandis que d'autres libèrent facilement le colorant lorsqu'on ajoute de l'alcool (Gram négatif) ?

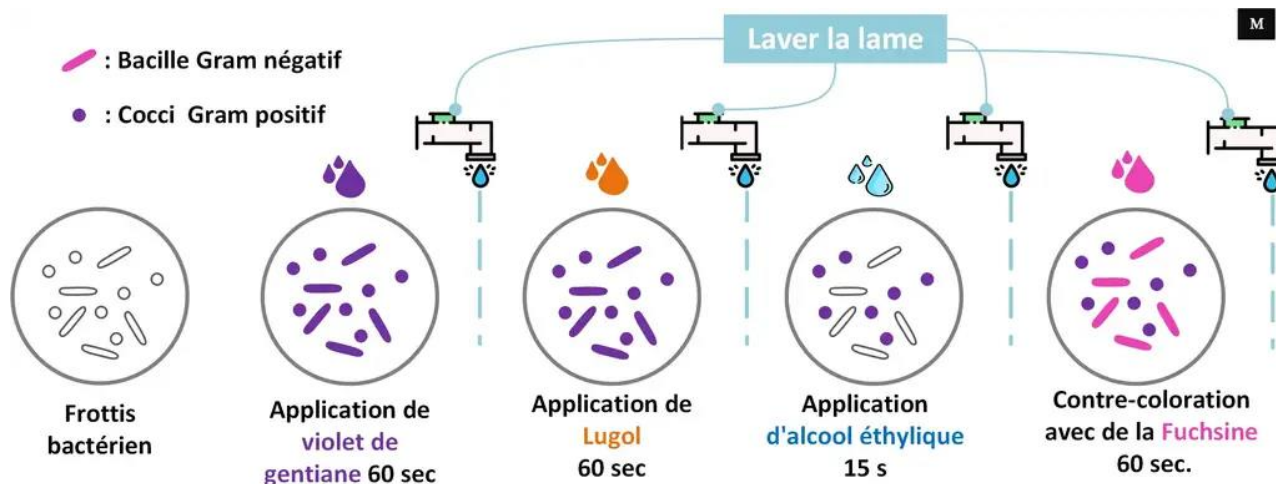
- Les parois des bactéries à **Gram négatif** ont un taux élevé de lipides (à cause de la membrane externe) et une fine couche de peptidoglycane. L'alcool contenu dans le décolorant extrait le lipide, ce qui rend la paroi des bactéries à Gram négatif plus poreuse, et incapable de retenir le complexe violet-lugol, décolorant ainsi la bactérie.

- Le peptidoglycane plus épais avec un degré de réticulation plus élevé piège le complexe violet-lugol plus efficacement, ce qui rend la paroi **Gram positif** moins sensible à la décoloration.



Les étapes de la coloration de Gram

- Inonder le frottis séché à l'air et fixé (à la chaleur) pendant 1 minute avec le réactif de coloration au cristal violet. Veuillez noter que la qualité du frottis (concentration cellulaire trop lourde ou trop légère) affectera les résultats de la coloration.
- Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes
- Inondation avec le lugol. Attendez 1 minute
- Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes.
- Inondation la lame avec agent décolorant. Attendre 15 secondes ou ajouter goutte à goutte pour faire sortir l'agent de décoloration
- Inondation de la lame avec un contre-colorant, 'safranine' ou fuschine. Patienter 30 secondes à 1 minute.
- Laver la lame dans un jet d'eau douce et indirecte de l'eau du robinet jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse dans l'effluent, puis sécher avec du papier absorbant.
- Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile. Examiner au microscope, objectif x100
- À la fin, les bactéries à GRAM négatif apparaissent en rose et les bactéries à Gram positif apparaissent en violet.



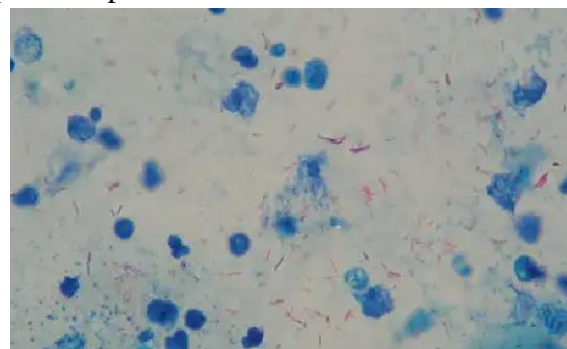
III.2.2. Coloration de Ziehl-Neelsen (ZN)

C'est l'une des techniques de coloration les plus utilisées pour détecter les *Mycobacterium tuberculosis*, également connu sous le nom de bacille de Koch, la bactérie responsable de la tuberculose (TB).

Elle représente la méthode de choix pour la bacilloscopie des frottis d'expectoration car elle est la seule à fournir régulièrement de bons résultats sans nécessiter un équipement spécial.

Lorsque l'échantillon suspecté de contenir *Mycobacterium tuberculosis* est prélevé, il est fixé sur une lame de microscope, puis coloré et observé sous microscope.

Les mycobactéries, si présentes, apparaissent comme des bâtonnets rouges ou roses caractéristiques.



Principe de la coloration de ZN

La présence d'acides mycoliques dans les parois cellulaires des **bactéries acido-alcool-résistantes** est la base cytologique de cette coloration.

L'acide mycolique donne à ces bactéries une plus grande affinité pour le colorant primaire et une résistance à la décoloration par une solution d'acide-alcool.

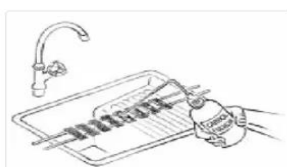
La fuch sine est utilisée comme colorant primaire parce qu'elle est liposoluble et pénètre la paroi cellulaire cireuse. La coloration est encore améliorée en chauffant jusqu'à émission de vapeur la préparation pour faire fondre la cire et permettre au colorant de se déplacer dans la cellule.

Le mélange acide-alcool est utilisé pour décolorer les cellules non acido-alcool-résistantes. Une contre-coloration, telle que le bleu de méthylène, est ensuite appliquée. Une fois terminées, les bactéries acido-alcool-résistantes sont colorées en rouge-violet sur un fond bleu.

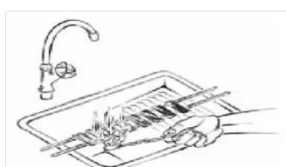
Les étapes de la coloration de ZN

- Etaler l'expectoration régulièrement sur la zone centrale de la lame grâce à un mouvement continu de rotation ; on recommande un étalement d'environ 20 mm sur 10mm.
- Placer les lames sur le séchoir avec la surface d'étalement vers le haut et laisser **sécher à l'air durant environ 30 minutes**
- Procéder à la fixation des lames séchées en les tenant avec une pince et en les passant sur la flamme 5 fois pendant environ 4 secondes, la face d'étalement tournée vers le haut. **Ne pas fixer par la chaleur les lames humides et éviter un échauffement excessif.**
- **Coloration :**

- ✓ Placer les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames devraient être séparées par un intervalle d'1 cm et ne jamais se toucher l'une l'autre.
- ✓ Recouvrir les lames l'une après l'autre au moyen de la solution de travail de **fuchsine phéniquée de Ziehl à 0,3 % filtrée**
- ✓ En plaçant une bande de papier absorbant comme un papier filtre ou même du papier journal, on retiendra la solution de coloration et on évitera le dépôt de cristaux de fuchsine sur le frottis.
- ✓ Chauffer les lames par le dessous au moyen de la flamme d'un bec Bunsen, d'une lampe à alcool ou d'un tampon d'ouate imbibé d'alcool, **jusqu'à émission de vapeur**. Il ne faut jamais aller jusqu'à l'ébullition de la solution de colorant. Ne pas laisser le colorant se dessécher
- ✓ Laisser les lames recouvertes d'une solution chaude et fumante de fuchsine phéniquée pendant 5 minutes en repassant la flamme si c'est nécessaire
- ✓ Rincer les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de fuchsine phéniquée
- ✓ Evacuer l'excès d'eau de rinçage des lames. Les frottis d'expectoration ont une couleur rouge.
- **Décoloration:**
 - ✓ Recouvrir les lames au moyen **d'acide sulfurique à 25 % ou d'une solution d'alcool-acide** et laisser agir pendant 3 minutes, après cela la coloration rouge devrait avoir presque disparu. En cas de nécessité, répéter cette séquence durant deux minutes supplémentaires.
 - ✓ Laver délicatement l'acide sulfurique ou l'alcool-acide et l'excès de colorant à l'eau . Evacuer des lames l'excès d'eau de rinçage.
- **Contre-coloration :**
 - ✓ Recouvrir les lames l'une après l'autre avec la solution de **contre-coloration (bleu de méthylène à 0,3 %)** et laisser agir pendant 1 minute
 - ✓ Rincer les lames à l'eau individuellement
 - ✓ Evacuer l'eau des lames et les laisser sécher à l'air



1. Recouvrir les lames par de fuchsine phéniquée



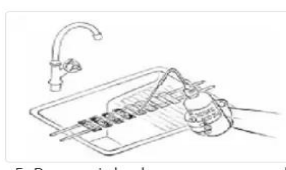
2. Chauffer les lames par le dessous



3. Rincer



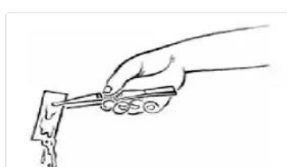
4. Evacuer l'excès d'eau de rinçage



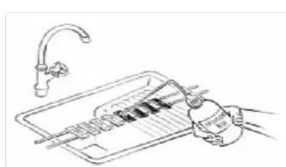
5. Recouvrir les lames au moyen d'acide sulfurique



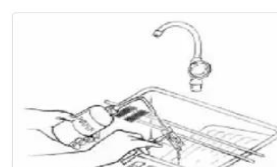
6. Rincer



7. Evacuer l'excès d'eau de rinçage



8. contre-coloration (bleu de méthylène à 0,3 %).

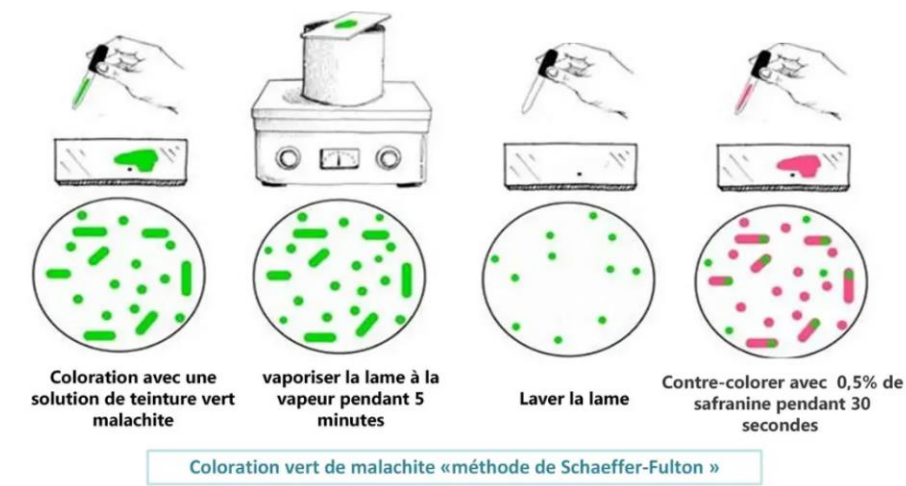


9. Rincer

En conclusion, la **coloration de Ziehl-Neelsen** demeure une méthode importante dans le domaine de la microbiologie, en particulier pour la détection des bacilles acido-alcool-résistants tels que *Mycobacterium tuberculosis*.

Bien que d'autres méthodes aient émergé, la **Ziehl-Neelsen** conserve sa place prédominante en raison de sa simplicité, de sa fiabilité et de son coût relativement bas.

III.2.3. Coloration des spores par le Vert de Malachite "méthode de Schaeffer-Fulton"



Principe de la coloration des endospores

Dans la méthode de **Coloration au Vert de Malachite « méthode de Schaeffer-Fulton »**, une teinture primaire verte de malachite est forcée dans la spore par vaporisation de l'émulsion bactérienne. Le vert de malachite est soluble dans l'eau et a une faible affinité pour le matériel cellulaire, de sorte que les cellules végétatives peuvent être décolorées avec de l'eau.

La safranine est ensuite appliquée pour contre-colorer les cellules qui ont été décolorées. À la fin du processus de coloration, les cellules végétatives seront roses et les endospores seront vert foncé.

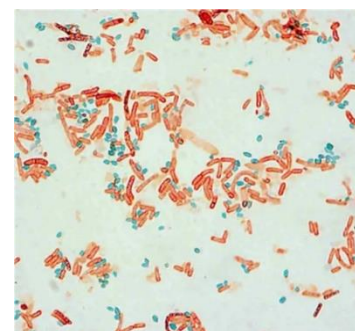
Procédure de coloration des endospores

1. Prenez une lame propre sans graisse et faites un frottis
2. Sécher à l'air et fixer l'organisme sur une lame de verre et couvrir d'un carré de papier buvard ou d'essuie-tout coupé pour s'adapter à la lame.
3. Saturer le papier buvard avec une solution de teinture vert malachite et le vaporiser à la vapeur pendant 5 minutes, en gardant le papier humide et en ajoutant plus de colorant au besoin. En variante, la lame peut être vaporisée sur un récipient d'eau bouillante.
4. Lavez la lame à l'eau du robinet
5. Contre-colorer avec 0,5% de safranin pendant 30 secondes. Laver à l'eau du robinet, séchez.
6. Examinez la lame au microscope pour la présence d'endospores:

Endospores : Les endospores sont vert clair.

Cellules végétatives : Les cellules végétatives sont rouge brunâtre à rose.

Exemples de coloration d'endospore positive : *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Desulfotomaculum spp*, *Sporolactobacillus spp*, *Sporosarcina spp*,



III.2.4. Coloration Négative (Encre de Chine ou Nigrosine)

La **coloration négative** colore toute la préparation **SAUF** les éléments qu'on veut observer, Le but principal de la **coloration négative** est d'étudier la forme morphologique, la taille et la disposition des cellules bactériennes **difficiles à colorer** ou trop **déliçats** pour être fixés à la chaleur

La **coloration négative** est la seule technique de coloration dans laquelle les cellules bactériennes ne sont pas colorées mais elles sont rendues visibles sur un **fond sombre** sous forme de **corps incolores**.

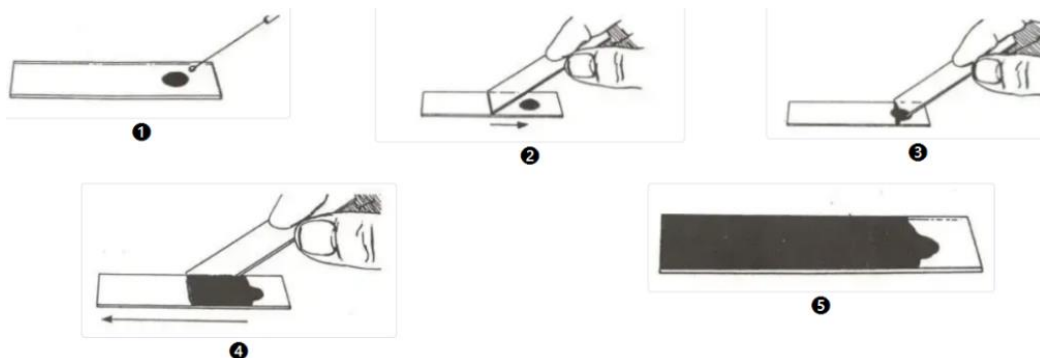
- Principe de la coloration négative

On utilise un colorant acide tel que l'**encre de Chine** ou la **Nigrosine**

La **coloration négative** est une coloration acide. Cela signifie que le colorant cède facilement un ion hydrogène (proton) et le chromophore du colorant devient **chargé négativement**. Étant donné que la surface de la plupart des cellules bactériennes est **chargée négativement**, la surface cellulaire **repousse le colorant**. Les bactéries apparaîtront sous forme de points clairs sur un fond sombre.

- Procédure de la coloration négative

1. Placer une goutte (25µl) d'une solution de Nigrosine à 7% ou d'encre de Chine près d'une extrémité d'une lame bien nettoyée (selon le spécimen, parfois l'encre de Chine doit être diluée avec de l'eau distillée)
2. Retirez une petite quantité de culture à l'aide d'une boucle d'inoculation et dispersez-la dans la goutte de colorant sans étaler la goutte.
3. Prenez une autre lame de verre microscopique, placez-la près du mélange échantillon-colorant à un angle d'environ 30 ° - 45 °
4. Déplacez la lame vers la goutte du mélange échantillon-colorant jusqu'à ce que le contact soit établi avec la goutte à l'angle spécifique. Ensuite, déplacez la lame doucement et rapidement vers l'avant sur la lame d'échantillon, en attirant le mélange de colorants derrière elle en un film mince.
5. Laisser le frottis sécher à l'air, puis observer au microscope sur des objectifs à haute puissance (45X) et à immersion dans l'huile (100X).



Exemples



Coloration negative staphylococcus



Coloration negative C. neoformans