



**Université de Batna 2**

**Faculté de sciences de la nature et de la vie**

**Tronc commun SNV**



**Matière :**

**Microbiologie Générale**

**TD01**

**Enseignantes :**

Dr. Zaatout Nawel

Dr. Bouaziz Amira

**Année universitaire : 2020-2021**

## TD1. La paroi bactérienne et le test de Gram

En 1884, un médecin danois, Christian **GRAM** a fait la distinction entre deux types de bactéries: **Gram+** et **Gram-**. Ceci a été possible après avoir coloré un frottis bactérien.

### 1. La paroi bactérienne:

C'est une enveloppe rigide assurant l'intégrité de la bactérie, donc responsable de la forme des cellules. Elle protège des variations de pression osmotique (5-20 atmosphères). Elle est absente chez les Mollicutes (*Mycoplasma*), la partie commune à toutes les parois bactériennes est le peptidoglycane (ou muréine).

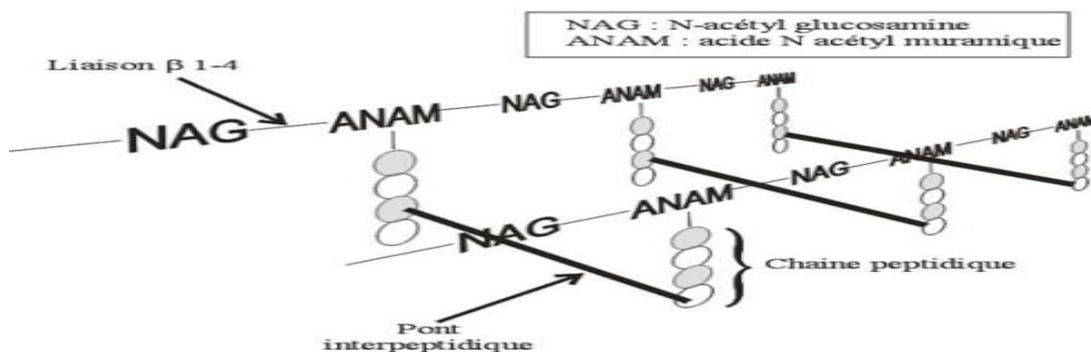
### 2. Rôle de la paroi

Un bacille à Gram positif traité par le lysozyme donne une forme cellulaire sphérique. Ceci montre que c'est la paroi qui confère la forme à la bactérie. Elle constitue, en effet, une enveloppe rigide qui évite aux bactéries de s'éclater malgré la forte pression osmotique qui règne à l'intérieur du cytoplasme. Elle constitue le squelette externe de la bactérie et représente environ 30 % du poids total de la bactérie.

### 3. Structure de la paroi

L'un des constituants essentiels qui caractérisent les parois bactériennes est la **muréine** (peptidoglycane ou mucopeptide). Il s'agit d'un hétéropolymère complexe formé de 3 éléments différents :

1. une structure composée d'une alternance de molécules de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétyl muramique ;
2. des chaînes latérales peptidiques, composées de 4 acides aminés et attachées à l'acide N-acétyl muramique ;
3. un ensemble de ponts inter-peptidiques.



**Tableau 1 : Comparaison de la paroi Gram positif et Gram négatif.**

	<b>Paroi Gram<sup>+</sup></b>	<b>Paroi Gram<sup>-</sup></b>
<b>Epaisseur</b>	20 à 80 nm	10 à 15 nm
<b>Aspect en microscopie électronique</b>	Une couche épaisse	Deux couches séparées par un espace clair
<b>Membrane externe</b>	-	+
<b>Espace périplasmique</b>	-	+
<b>Muréine</b>	Épais	Mince
<b>Acides téichoïques</b>	+++	-
<b>Osamines</b>	++	+
<b>Acides aminés :</b> - Nombre - Pourcentage	- 4 à 10 AA différents - 24 à 35 %	- 16 à 17 AA différents - 50 %
<b>Lipides</b>	<b>1 à 2,5 %</b>	<b>10 à 22 %</b>

### 3.1. Paroi des bactéries à Gram positif :

Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est le constituant majeur (90% des constituants de la paroi). La paroi est caractérisée par la présence d'acides teichoïques (A.T.); on trouve aussi les acides lipoteichoïques qui s'enchaînent dans la membrane cytoplasmique. Les acides teichoïques sont connectés au peptidoglycane ou aux lipides de la membrane plasmique (lipoteichoïques). Ils sont chargés négativement. Leur fonction est inconnue mais maintiennent la structure de la paroi. Alors que les acides lipoteichoïques retiennent le violet lors de la coloration de Gram.

### 3.2. Paroi des bactéries à Gram négatif :

Les bactéries à Gram négatif ont (sauf exception) une structure bimembranée qui s'organise en trois grandes parties, soit, de l'extérieur vers l'intérieur :

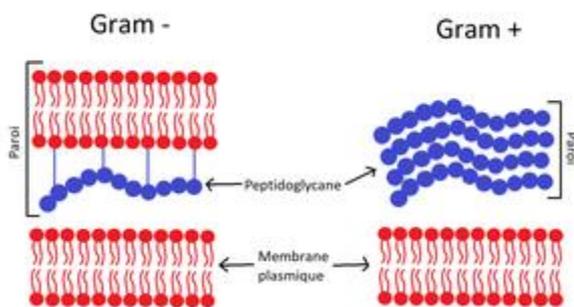
- La membrane externe,
- L'espace périplasmique, comportant notamment la paroi,
- La membrane plasmique.

La membrane externe est en contact direct avec le milieu extérieur. Elle est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur) mais contient aussi de nombreuses protéines intrinsèques, notamment les protéines de transport appelées porines. Beaucoup de bactéries Gram négatif (par exemple *Salmonella*) possèdent aussi un composé non protéidique appelé lipopolysaccharide ou LPS ; ce composé peu immunogène, dont le

pouvoir pathogène (lipide A) est inclus dans la membrane externe, s'active lors de la lyse de la bactérie. La membrane externe est reliée au peptidoglycane par la lipoprotéine de Braun.

L'espace périplasmique est un espace de stockage d'enzymes, de nutriments. Il se situe entre la membrane externe et la membrane plasmique et il contient une couche de peptidoglycane. La couche de peptidoglycane (appelé aussi muréine) est relativement mince chez les Gram négatif contrairement aux Gram positif.

La membrane plasmique est semblable à la membrane externe (excepté le LPS). Elle possède des protéines poreuses aboutissant dans l'espace périplasmique (biosynthèse des protéines).



Le **lipopolysaccharide (LPS)** est un composant essentiel de la face externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

#### 4. La coloration de Gram :

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries. Son avantage est de donner une information rapide, facile et bon marché sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la forme.

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, ensuite

1. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau
2. Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée

pour stopper la décoloration. Attention, l'utilisation abusive de l'alcool aura pour conséquence de rendre toutes les bactéries Gram négatif.

4. Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.
5. Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement  $\times 1000$ ).

Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

L'étape 3 (alcool) sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycanes - donc plus fine - qui va laisser passer l'alcool (molécule hydrophile) ou le mélange alcool-acétone, et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une « couche » de peptidoglycanes plus importante, donc de ce fait plus épaisse. Elles resteront alors de couleur violette.

L'étape 4 est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme