



HAL
open science

Réalisations phares en microscopie des colonies bactériennes en matrices fromagères

Chantal Cauty, Bruno Payre, Irina Kolotueva, Thomas Daniel, Agnès Burel,
Sophie Jeanson, Sylvie Lortal

► **To cite this version:**

Chantal Cauty, Bruno Payre, Irina Kolotueva, Thomas Daniel, Agnès Burel, et al.. Réalisations phares en microscopie des colonies bactériennes en matrices fromagères. 16. Journées de formation du RCCM (Réseau des Centres Communs de Microscopie) Cryo-méthodes en microscopie électronique, May 2017, Roscoff, France. hal-01529475

HAL Id: hal-01529475

<https://hal.science/hal-01529475>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

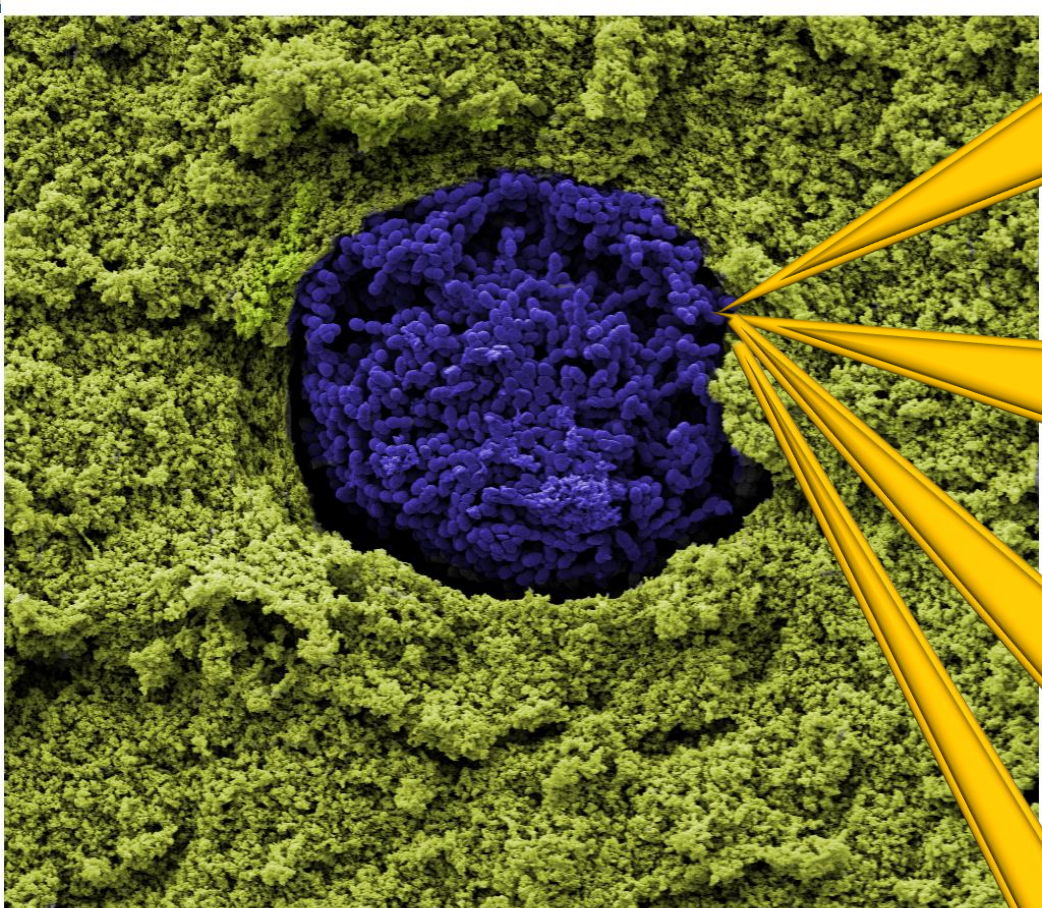
Réalisations phares en microscopie des colonies bactériennes en matrices fromagères

CAUTY CHANTAL*, PAYRE BRUNO¹, KOLOTUEVA IRINA², DANIEL THOMAS², BUREL AGNES², JEANSON SOPHIE*, LORTAL SYLVIE *

Contexte de l'étude : Les bactéries jouent un rôle clé dans l'affinage et la saveur du fromage et se développent en colonies.

Questions : Quels sont les outils et les méthodes les mieux adaptés en microscopie pour observer les interfaces entre colonies de bactéries (*Lactococcus Lactis* (coque de 1µm de diamètre)) et matrice solide ainsi que l'organisation des bactéries dans les colonies ?

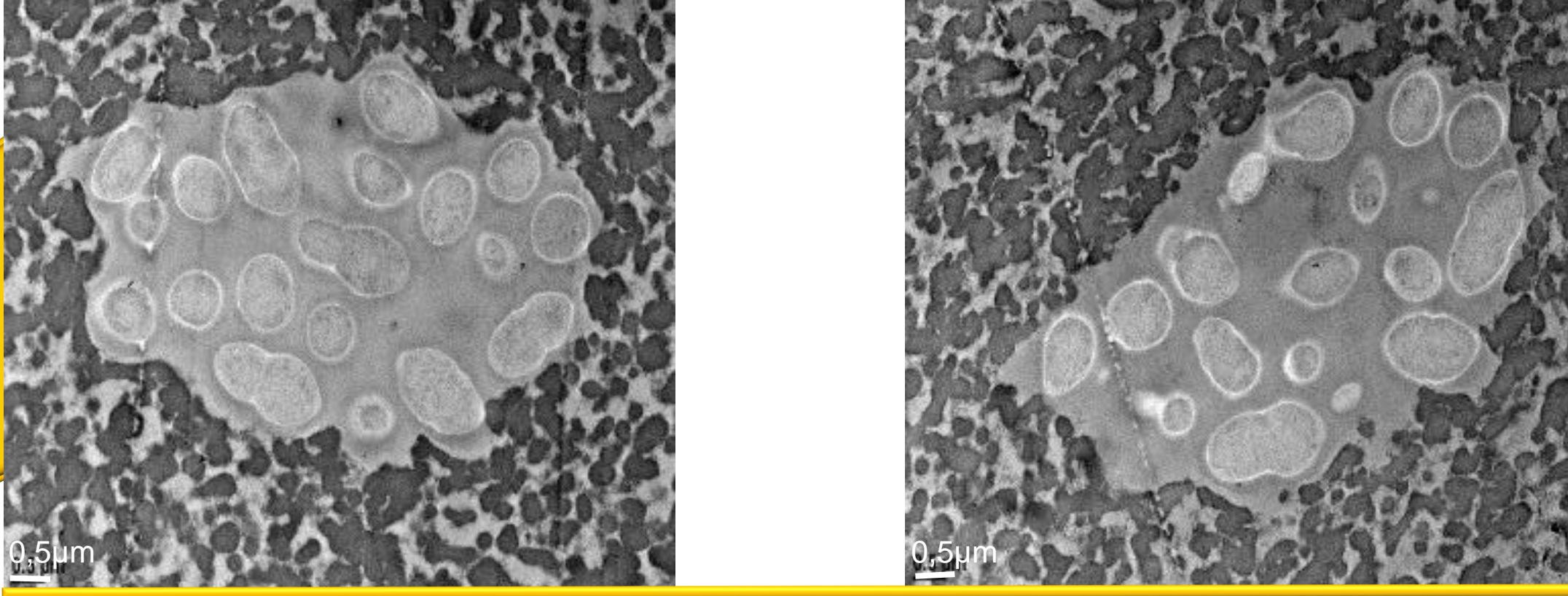
TEM et SEM



MATERIELS & METHODES

- 1- Préparer un gel laitier (mélange de lait et de présure)
- 2- Couler le gel dans une chambre d'observation et prise du gel à l'étuve
- 3- Inoculer les bactéries
- 4- Repérer en microscopie confocale les colonies bactériennes par le Syto 9 marqueur de l'ADN bactérien
- 5-Prélever
En TEM Coupelle pour la cryo-fixation HP
En SEM morceau de 2mm x 2mm

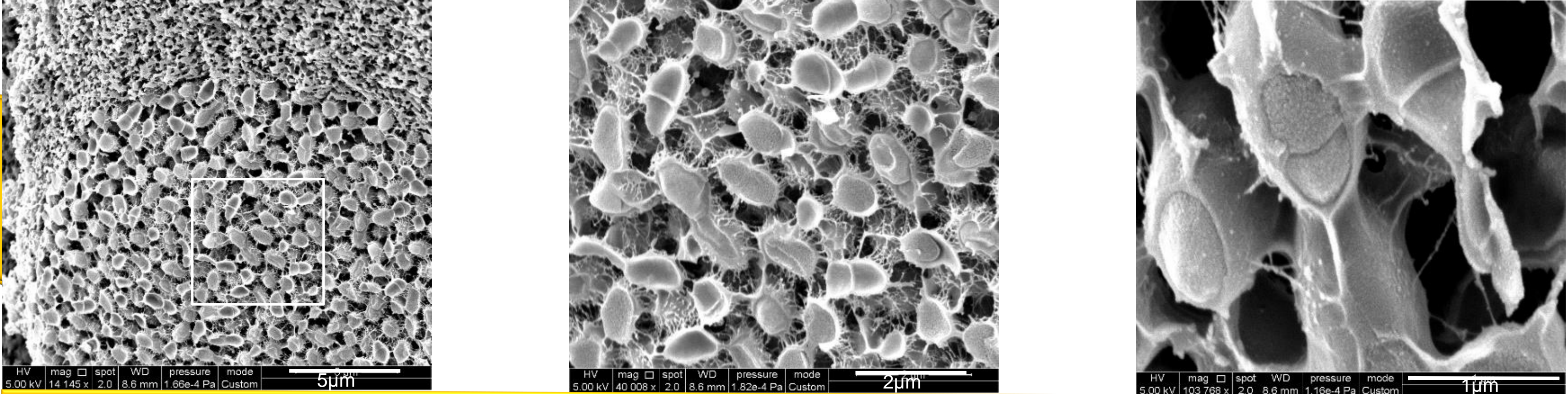
CRYO-FIXATION HP SUBSTITUTION-INCLUSION EPON-COUCHE



TEM CRYO-FIXATION

➕ La CRYO-FIXATION HP préserve l'état natif de la matrice mais la taille des échantillons (1,5 mm diamètre sur 200 µm épaisseur) réduit le champ d'observation des colonies et la tomographie apporte peu d'éléments supplémentaires sur les interactions entre bactéries.

CONGELATION AZOTE PATEUX -210°C -CRYOFRACTURE

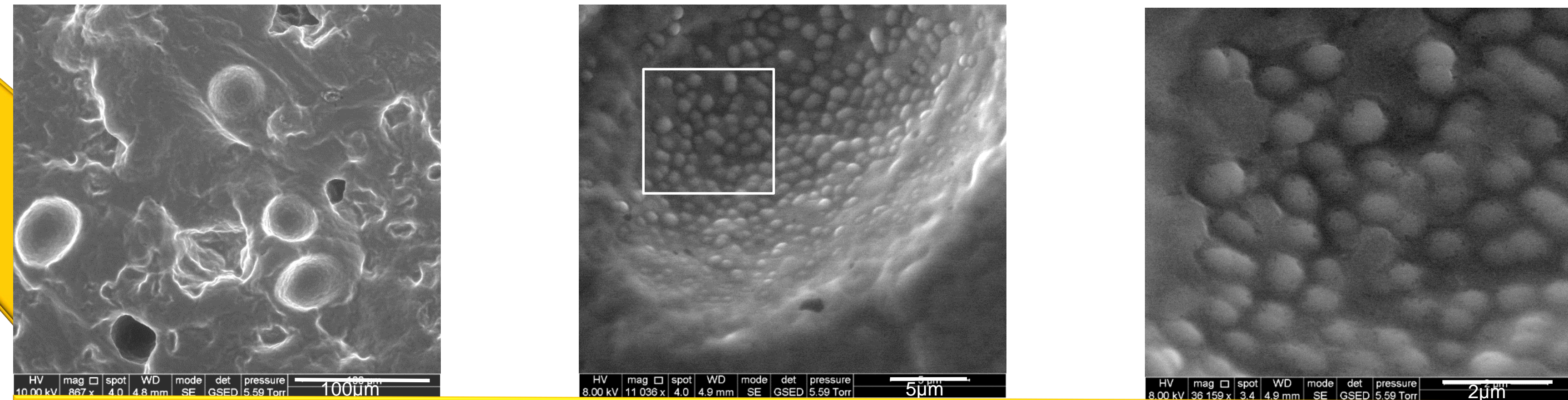


CRYO-SEM

➕ La cryo-MEB apporte une conservation de la matrice au plus près de l'état natif avec un volume de colonie supérieur sans observer de phénomène de compaction de la matrice.

➖ Les filaments entre bactéries seraient un artéfact de matériel lors de la cryo-MEB.

REFROIDI 5°C -VAPORISATION VAPEUR D'EAU 98%

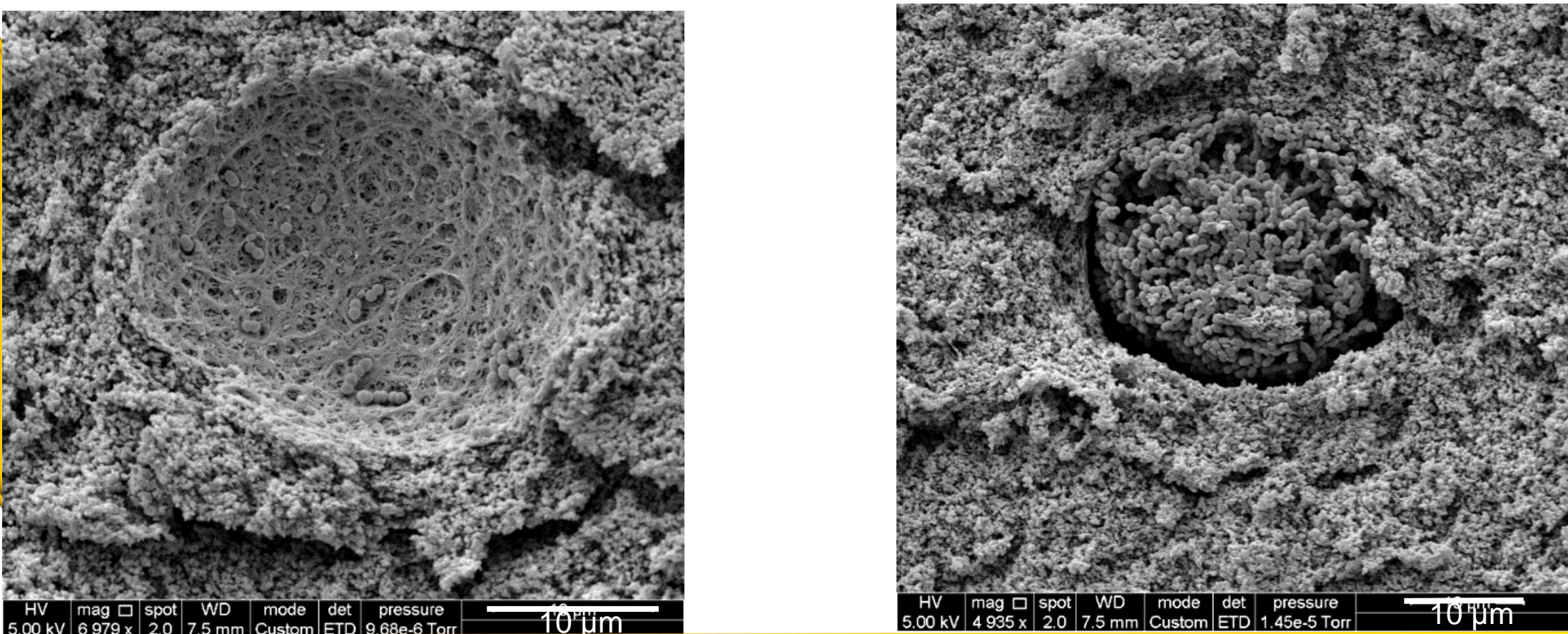


SEM ENVIRONNEMENTAL

➕ On apprécie mieux l'arrangement des bactéries dans la colonie et son intégralité sous forme de masses rondes sorties du gel. On manque de résolution à partir du grossissement x15000

➖ ce qui ne nous permet pas d'observer les interactions entre bactéries.

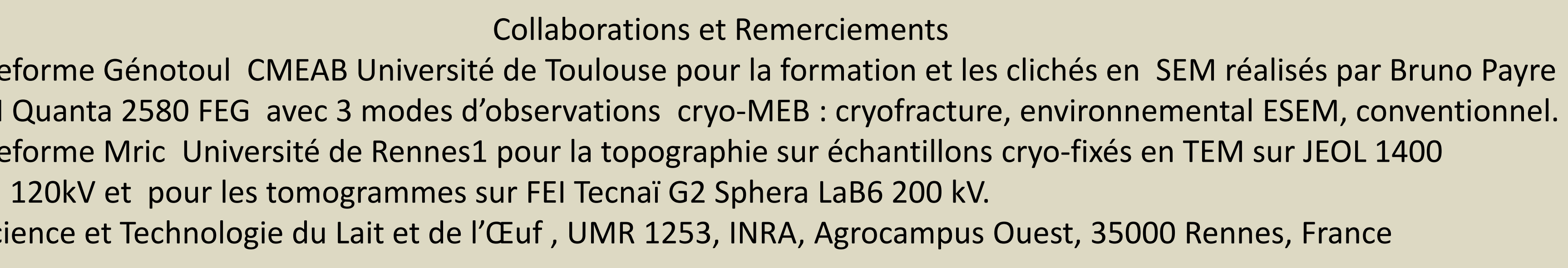
SEM CONVENTIONNEL



➕ Offre le plus de détails sur les interactions entre colonies bactériennes et matrice laitière malgré les

➖ artéfacts liés à la fixation chimique.

FIXATION CHIMIQUE DESHYDRATATION POINT-CRITIQUE



Collaborations et Remerciements

1 La Plateforme Génotoul CMEAB Université de Toulouse pour la formation et les clichés en SEM réalisés par Bruno Payre sur le FEI Quanta 2580 FEG avec 3 modes d'observations cryo-MEB : cryofracture, environnemental ESEM, conventionnel.
2 La Plateforme Mric Université de Rennes1 pour la topographie sur échantillons cryo-fixés en TEM sur JEOL 1400 tungsten 120kV et pour les tomogrammes sur FEI Tecnai G2 Sphera LaB6 200 kV.
*STLO Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, UMR 1253, INRA, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

CONCLUSION :

En SEM le mode conventionnel offre une qualité d'image supérieure aux autres modes d'observations. En outre, il permet d'observer des colonies de plus grosse taille susceptibles d'avoir impacté la structure de la matrice.

La complémentarité entre SEM et TEM permet de visualiser les interfaces entre colonies et matrice ainsi que les interactions entre les bactéries. Le mode Cryo-SEM n'est pas le mieux adapté, la méthode par cryo-fixation HP puis observation en mode cryo-SEM serait plus intéressante.