



L'Oolong Tea extract pour visualiser une architecture de la paroi des bactéries gram positif

Christine Longin, Sophie Chat, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Saulius Kulakauskas

► To cite this version:

Christine Longin, Sophie Chat, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Saulius Kulakauskas. L'Oolong Tea extract pour visualiser une architecture de la paroi des bactéries gram positif. 16. Journées de formation du RCCM (Réseau des Centres Communs de Microscopie), May 2017, Roscoff, France. hal-01608149

HAL Id: hal-01608149

<https://hal.science/hal-01608149>

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.

L'Oolong Tea Extract pour visualiser une architecture de la paroi des Bactéries Gram positif

Christine Péchoux¹ – Sophie Chat² - Marie-Pierre chapot-Chartier³ - Saulius Kulakauskas³

1- Inra, GABI, Agroparistech, Equipe Plateformes – MET ; 3- MICALIS, Agroparistech, Equipe Paroi
Jouy-en-Josas- France

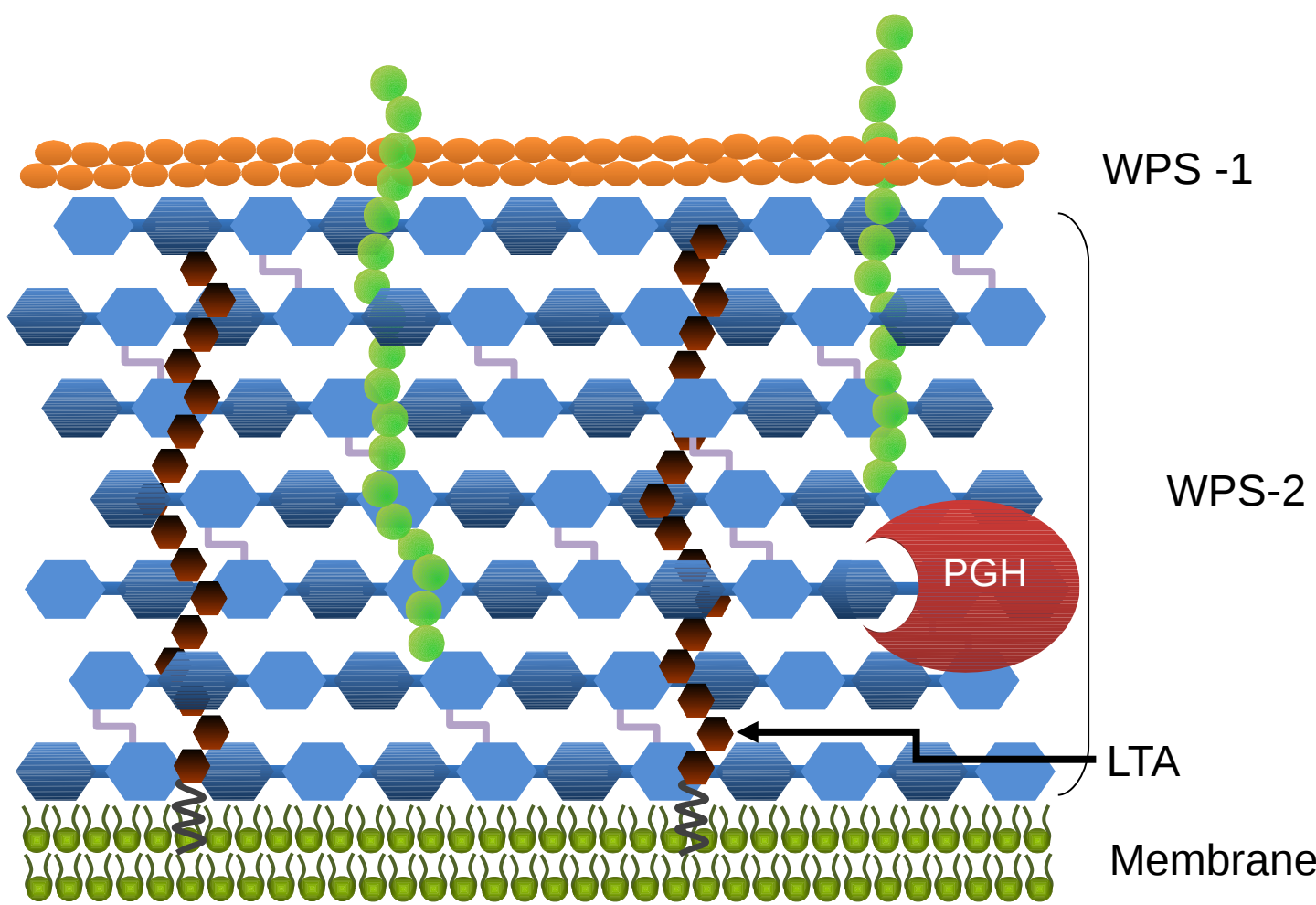


Introduction

1 – Le Modèle

- Les bactéries Gram-positif font de plus en plus l'objet de recherche en raison de leurs avantages potentiels pour la santé. Elles sont également utilisées pour la fermentation des aliments comme les bactéries lactiques.
- La paroi cellulaire des bactéries Gram-positif est un assemblage complexe de glycopolymères et de protéines. La paroi se compose d'une épaisseur de peptidoglycane sacculus (90%) qui entoure la membrane cytoplasmique. Elle est décorée d'acides teichoïques (WTA), de polysaccharides (WPS)

et de protéines (Figure). La paroi joue un rôle majeur dans la physiologie bactérienne car elle maintient la forme et l'intégrité des cellules pendant la croissance et la division; en outre, elle agit comme l'interface entre la bactérie et son environnement (Biblio : MPCC- SK)



2- Le Contraste

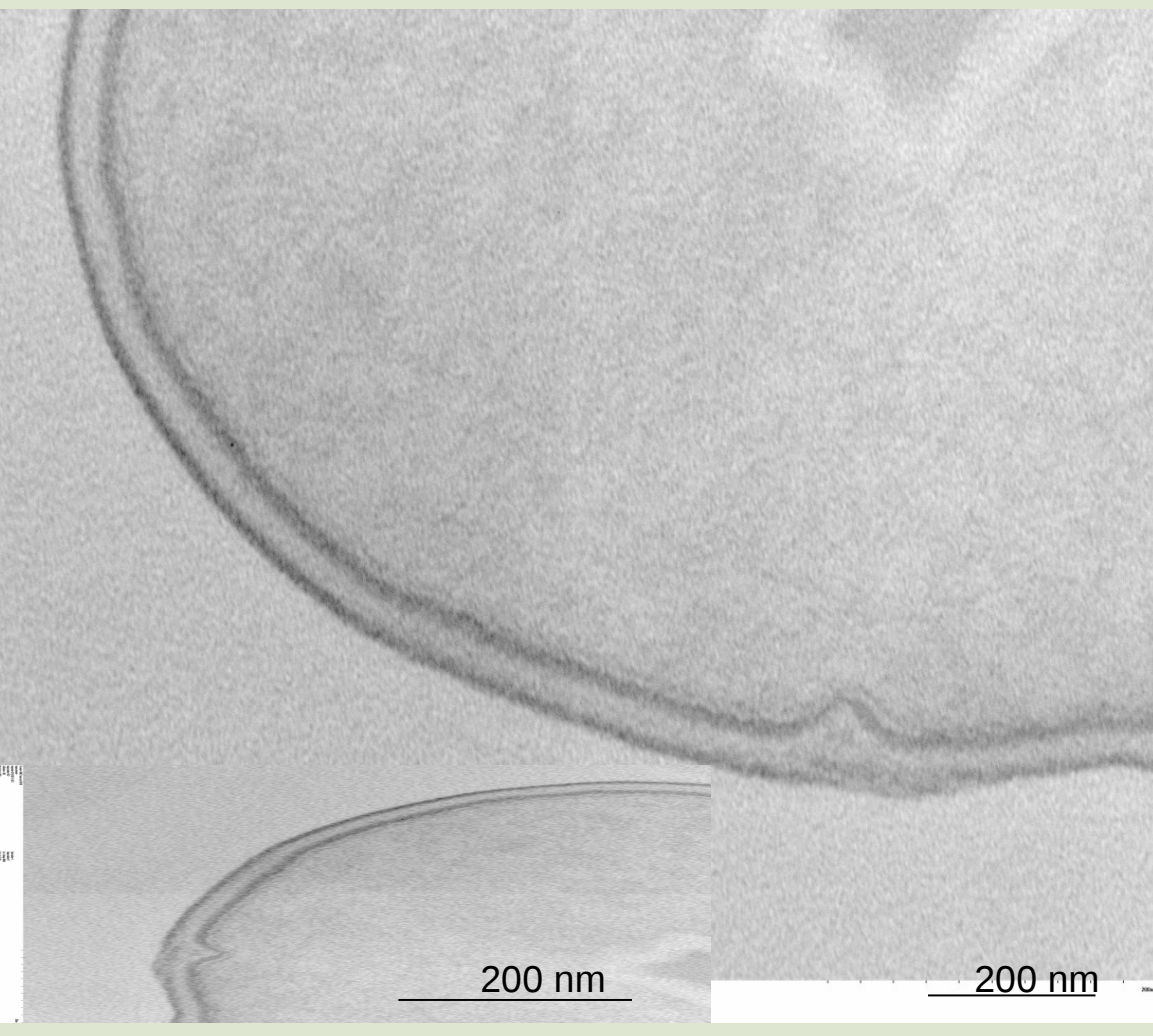
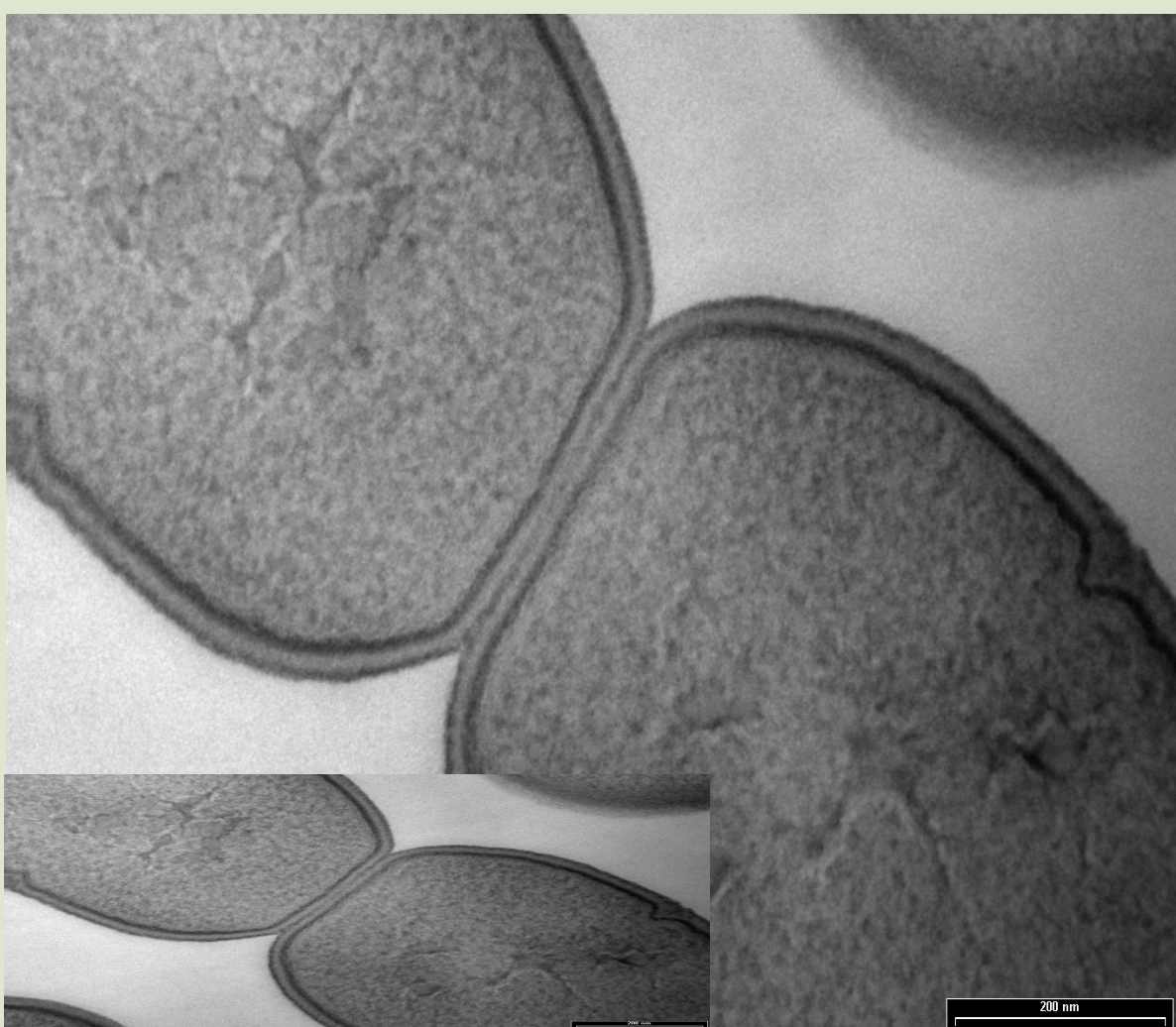
- L'extrait de thé d'Oolong (OTE) est un thé dont l'oxydation est incomplète (12 à 70%) ce qui lui donne ses arômes boisés.
- Sato (ref) a été un des 1er à évaluer pour son potentiel en tant que colorant pour remplacer l'acétate d'uranyle (très toxique) en microscopie électronique à transmission. L'OTE est décrit comme agent contrastant sur des structures telles que les fibres de collagène, les neurofilaments, la lame basale des fibres nerveuses, les microvillus ainsi que l'élastine dans les vaisseaux (Sato, He, Artigny).
- Classiquement la paroi des bactéries Gram+ apparaît constituée de 3 couches (1 claire entre 2 plus sombres), d'une épaisseur comprise entre 30-40 nm, limitant la membrane cytoplasmique bactérienne. (ref). Dans notre laboratoire nous utilisons l'OTE pour contraster des tissus animaux. Nous avons appliqué notre méthode de contraste en bloc sur des culots bactériens de différentes souches Gram +.

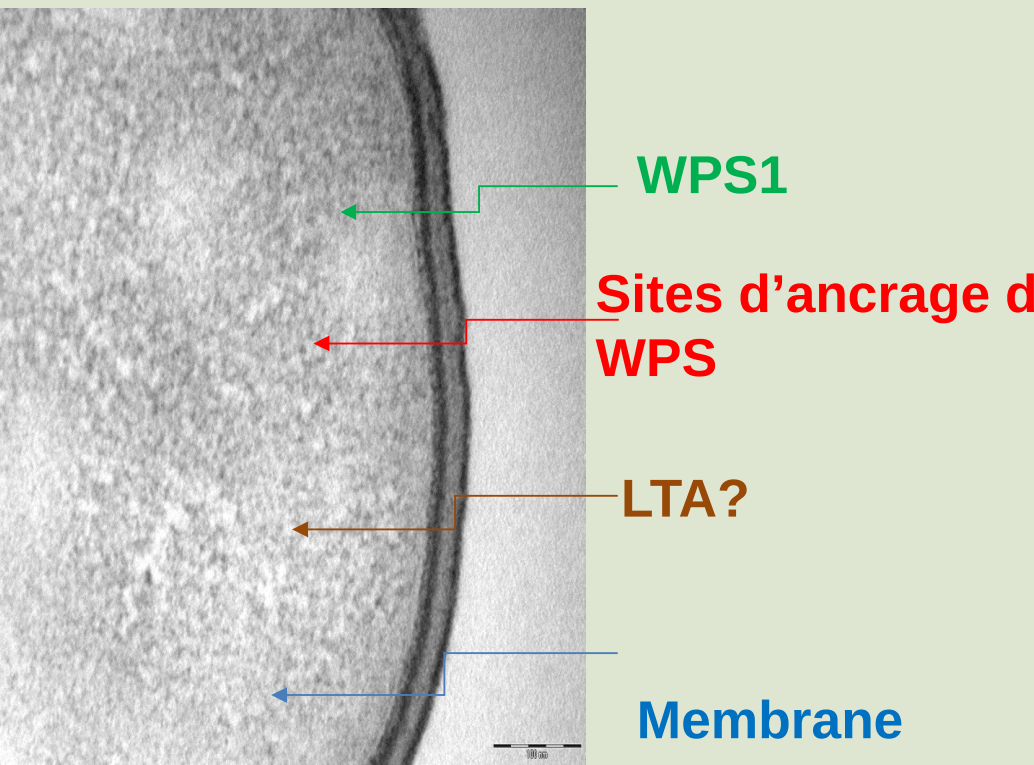
Sur les images obtenues après contraste à l'OTE nous avons observé en plus des différents composants connus de la paroi bactérienne, une structure fine de type membranaire non observée sans contrastant ou contrasté à l'acétate d'uranyle.

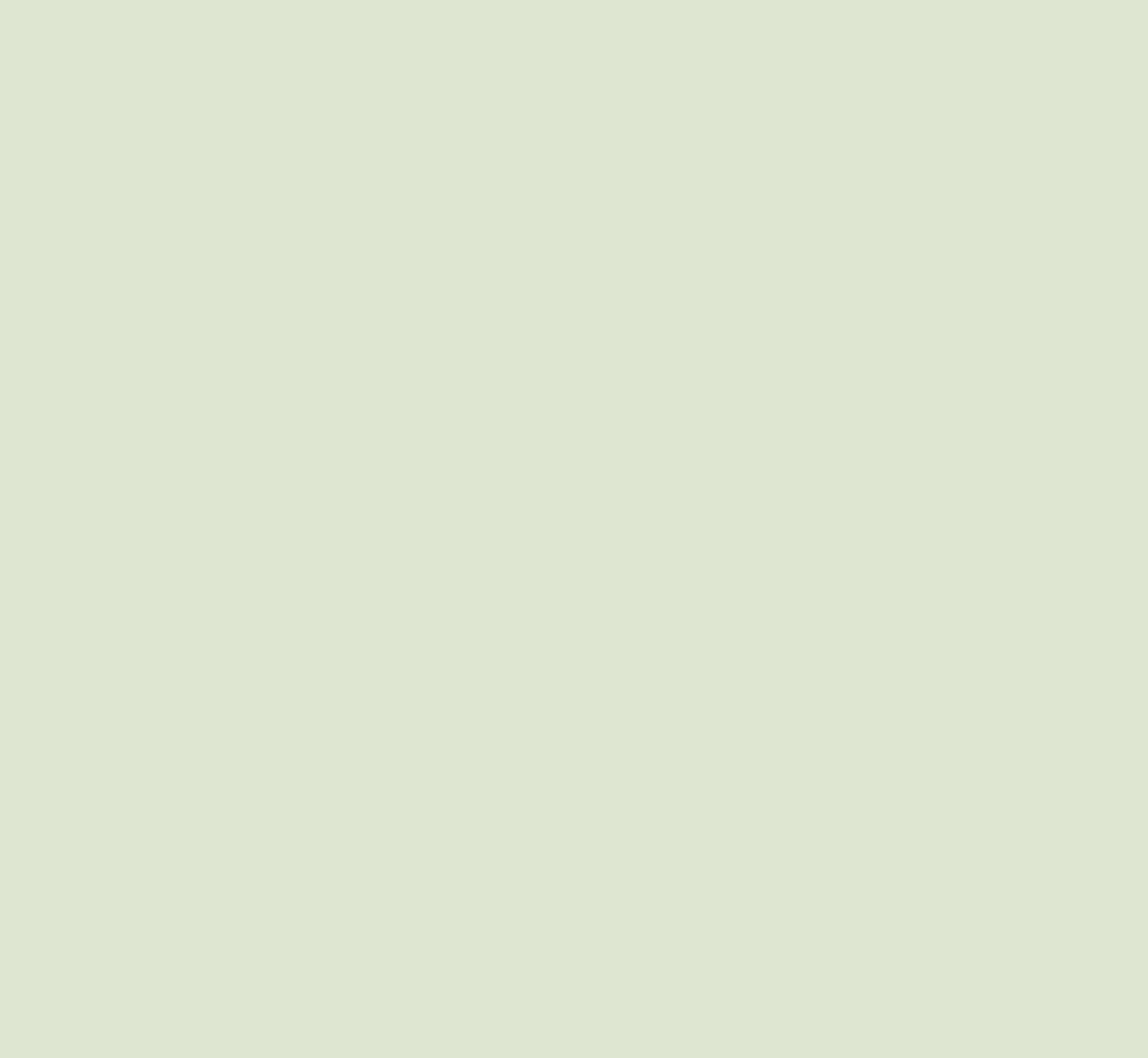
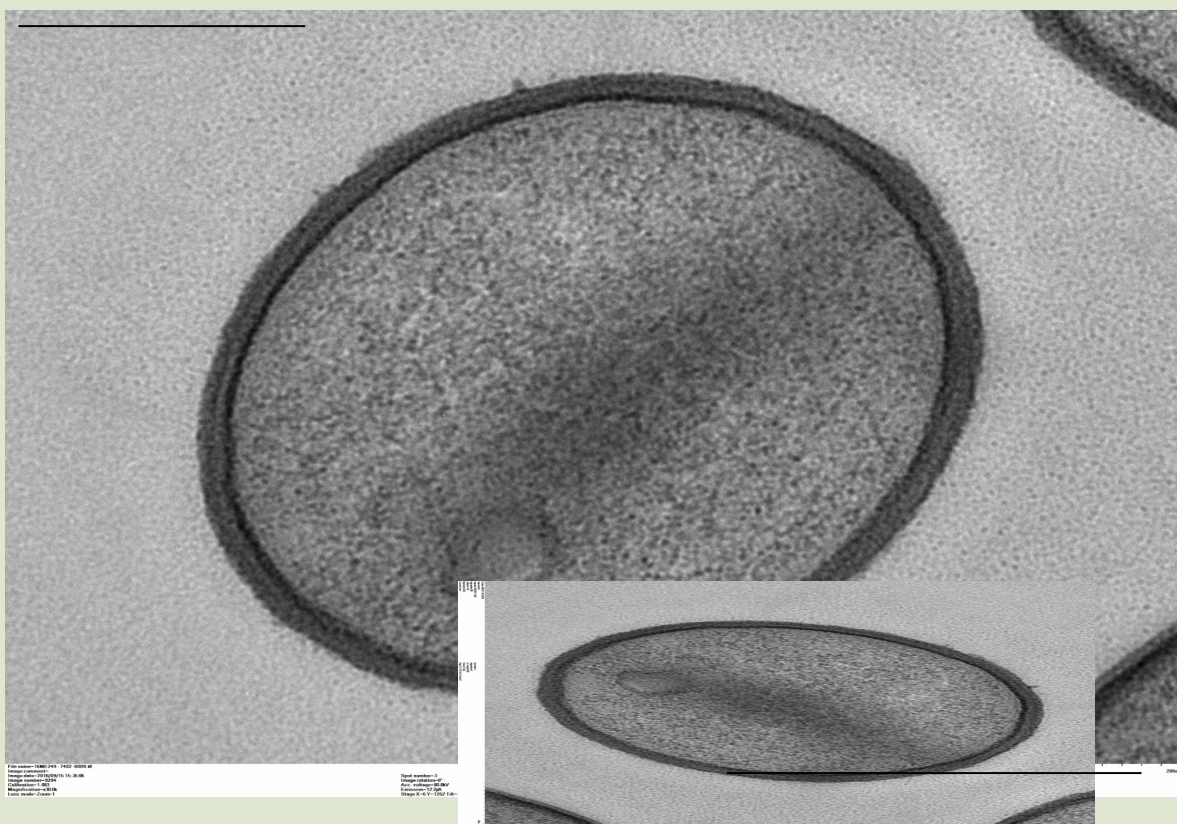
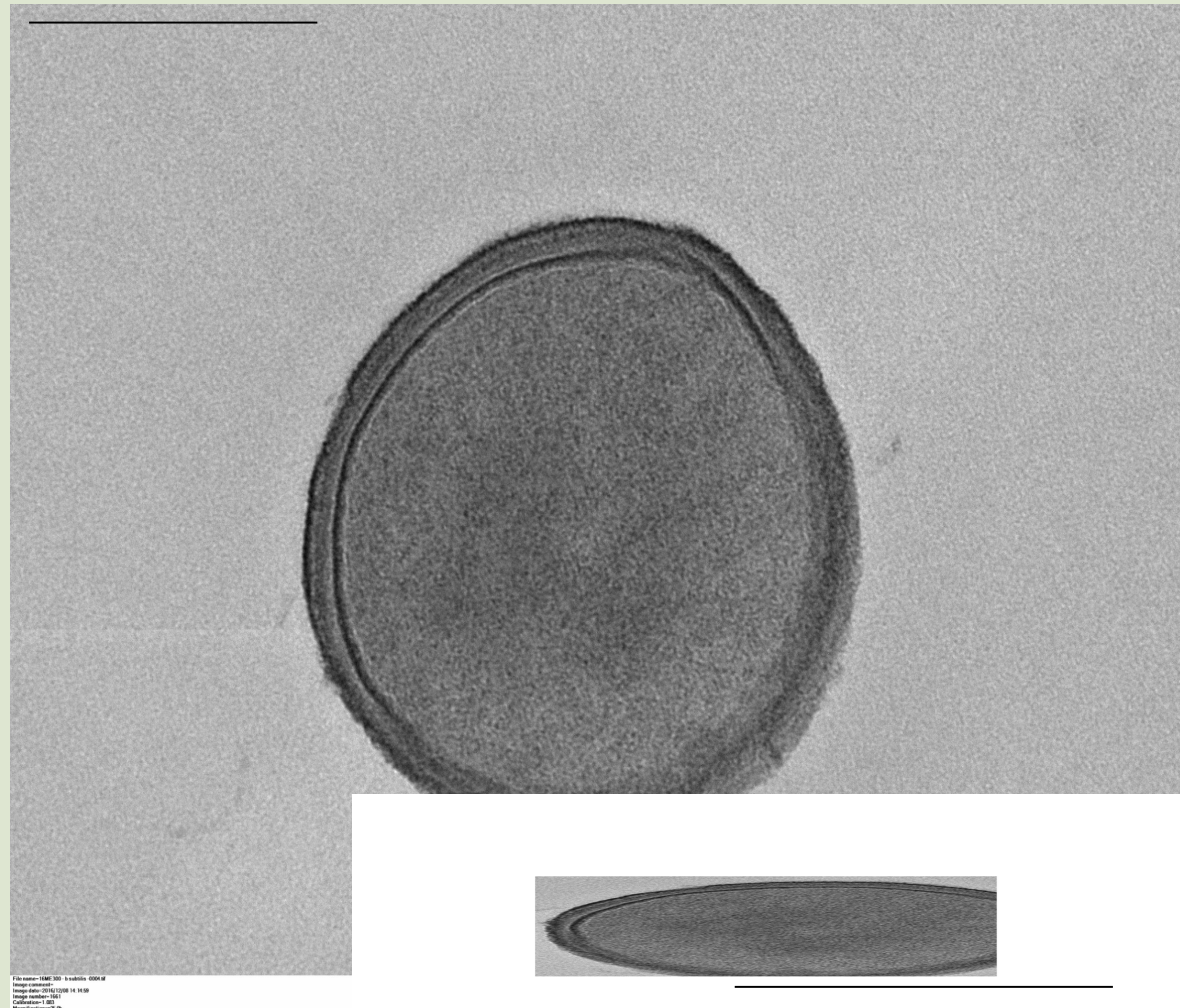
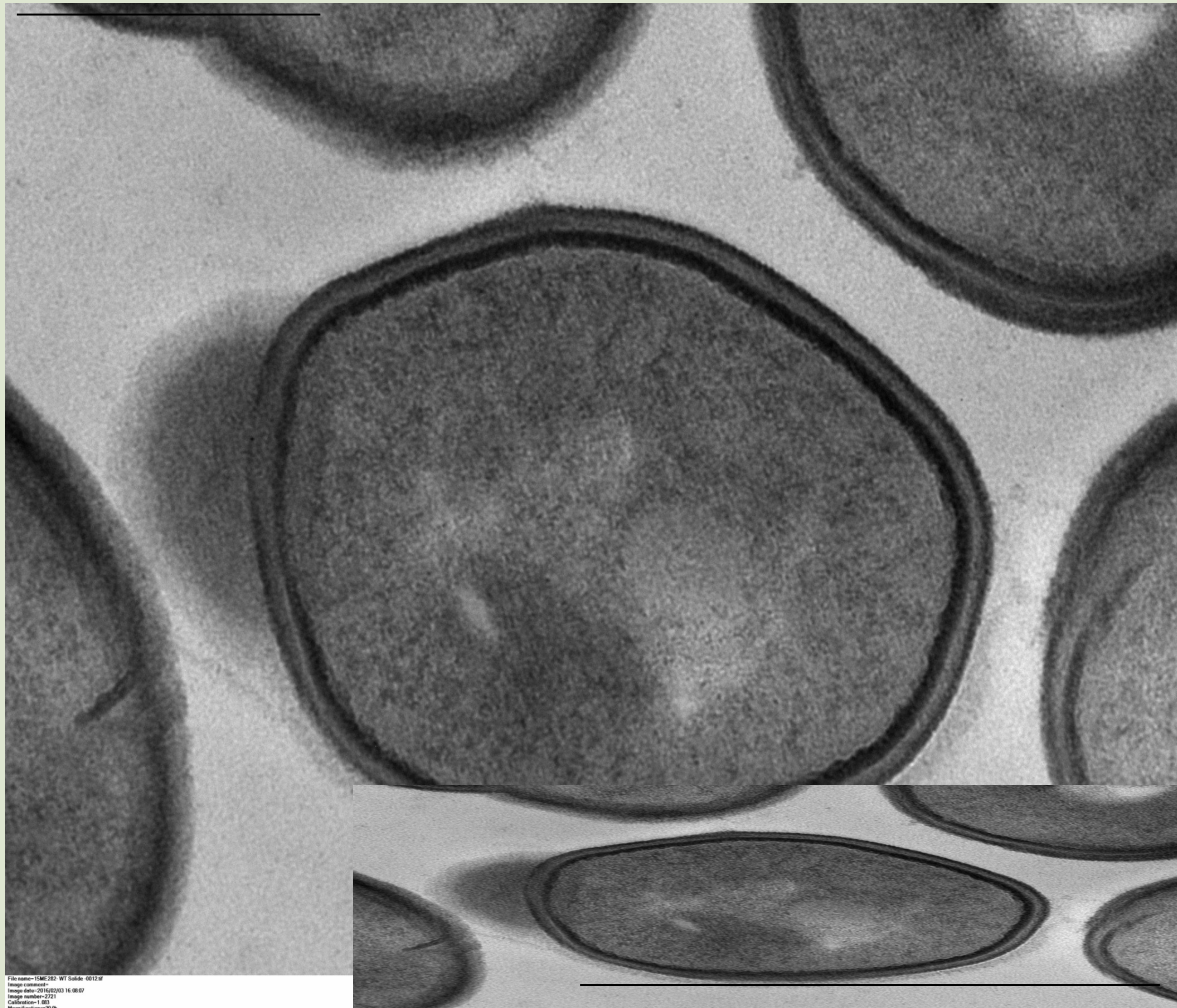
Le but de notre travail est d'évaluer le potentiel de l'Ote pour visualiser l'architecture de la paroi des bactéries G+

Méthodes - Résultats

Fixation des culots bactériens en glutaraldéhyde 2%

Tampon cacodylate de Na 0,1M Procédure 1	Procédure 2
- Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1H - Déshydratation - Substitution - Inclusion Epon	- Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1H - Ac Uranyle 2% H2O - 1H - Déshydratation - Substitution - Inclusion Epon - Plomb sur grilles - 3 min
	

Procédure 3
- OTE 0,5% Cacodylate Na 0,1M – 1H - Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1H - Déshydratation - Substitution - Inclusion Epon


<i>Bacillus Plantarum</i>	<i>Lactococcus Lactis</i>
	
<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Enterococcus Faecalis</i>
	

Discussion - Conclusion

- L'utilisation de l'OTE a pour principal avantage sa non toxicité et son coût réduit, de plus
- L'OTE est un bon contrastant de structures protéiques telle que l'élastine, ou le collagène
- Par sa nature chimique (polyphénol) il interagirait avec des groupements libres (phosphate ou ?) des sucres ou des peptides contenus dans les parois bactériennes Gram+. L'interaction est soit une liaison de type ionique ou entre des OH et des H libres ? Ces liaisons (quelque soit leurs natures) stabiliseraient les composants de la paroi et permettraient leur visualisation.

Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1h
Déshydratation
Substitution
Inclusion Epon
OTE 0,05% H2O sur grille - 30 min
Plomb sur grille - 3 min

La molecule de bi phenol (tres polaire) contient des groupements OH qui vont pouvoir participer à les liaisons H2 avec les molecules dans la paroi (PG et AT) et les stabilise
Dans des configurations stables, que l'on voit par la trace de leur densité electronique en MET
L'AU utilise les support nucleo-proteique phosphate de l' ADN (chaîne sucro-phosphate) pour decorer l'adn UO2+ stabilise la chaîne sucro-phosphate (PO4 3-)

Comme contrastant : Ac tannique agit sur ???? Nature chimique : polyphenol
Vu sur enterococcus, subtilis pas chez plantarum

AU : affinité avec les ac nucléiques
Vu sur enterococcus, subtilis pas chez plantarum
Cls : on voit bcp mieux la couche avec OTE, donc bon colorant pour les G+, On voit 4 couches 1) ext : PSP

