

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

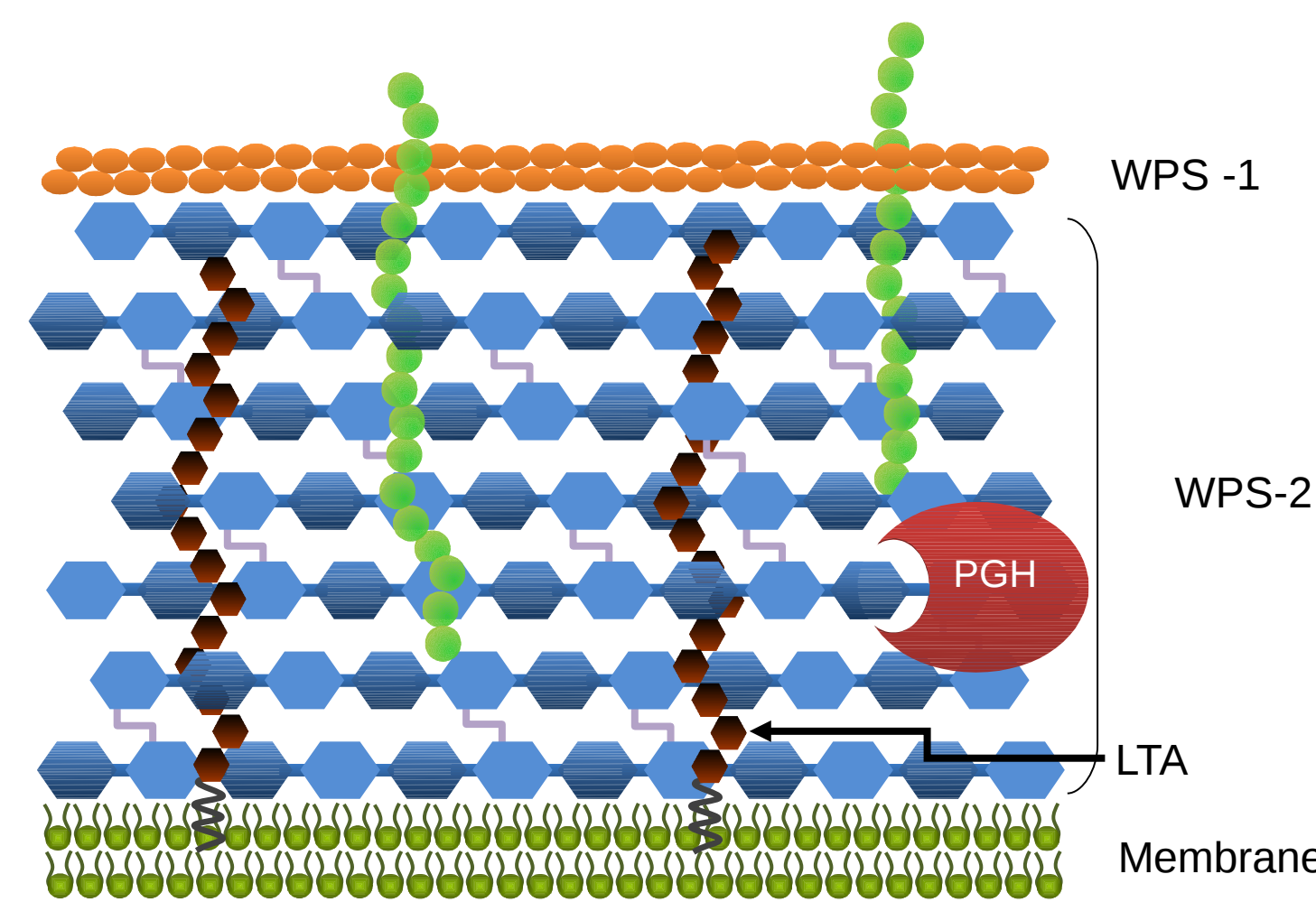


Introduction

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)

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 Contrastant

- 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%

Procédure 1		Procédure 3		<i>Bacillus Plantarum</i>	<i>Lactococcus Lactis</i>
Tampon cacodylate de Na 0,1M Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1H Déshydratation Substitution Inclusion Epon		OTE 0,5% Cacodylate Na 0,1M – 1H Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1H Déshydratation Substitution Inclusion Epon			
Procédure 2		Procédure 2		<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Enterococcus Faecalis</i>
Post-fixation OsO4 1% + C6FeK4Na 1,5% - 1H Ac Uranyle 2% H2O - 1H Déshydratation Substitution Inclusion Epon Plomb sur grilles - 3 min					

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% +
 Déshydratation
 Substitution
 Inclusion Epon
 OTE 0.05% H2O sur grille - 30 min
 Plomb sur grille - 3 min

CGFeK4Na 1.5% - 1h

La molécule de bi phénol (très polaire) contient des groupements OH qui vont pouvoir participer à des liaisons H2 avec les molécules dans la paroi (PG et AT) et les stabiliser dans des configurations stables, que l'on voit par la trace de leur densité électronique en MET

L'AU utilise le support nucléo-protéique phosphate de l'ADN (chaîne sucro-phosphate) pour décorer l'ADN UO2+ stabilise la chaîne sucro-phosphate (PO4 3-)

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

AU : affinité avec les ac nucléiques

Vu sur enterococcus, subtilis pas chez plantarum

Cl: on voit bcp mieux la couche avec OTE, donc bon colorant pour les G+, On voit 4 couches 1) ext : PSP

