



Isolement et caractérisation des membranes de mycobactéries

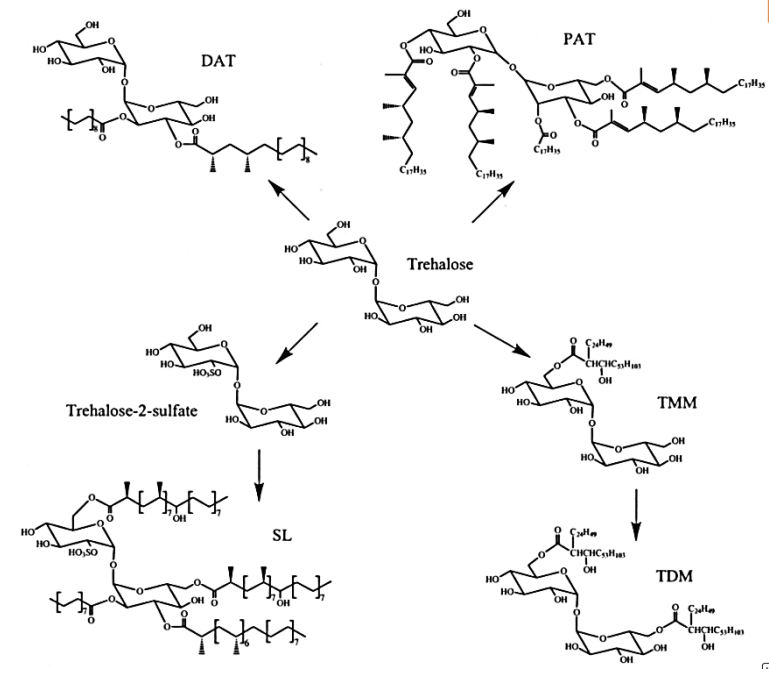
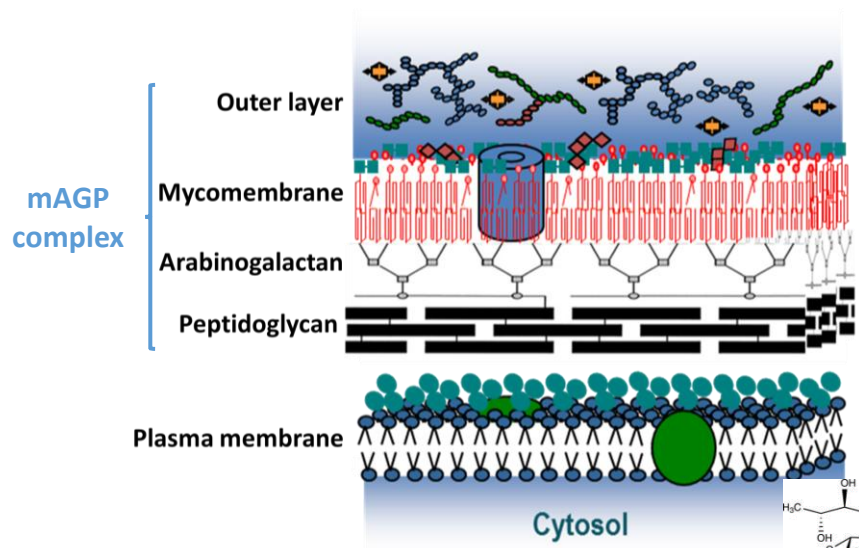
Equipe « Enveloppes mycobactériennes : Structure, biosynthèse et rôles » Dr Daffé

Laura CHIARADIA (2nd année Doctorat)

Mycobacteries :

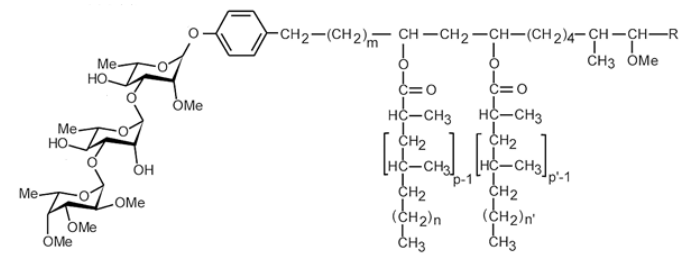
170 espèces > 2/3 pathogènes pour les hommes
 Enveloppe cellulaire complexe et atypique:

- Très imperméable
- 40 % de lipides (poids sec)



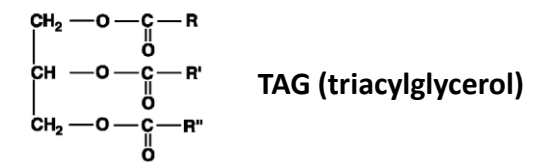
Lipides dérivés de tréhalose

Lipides retrouvés dans l'enveloppe mycobactérienne

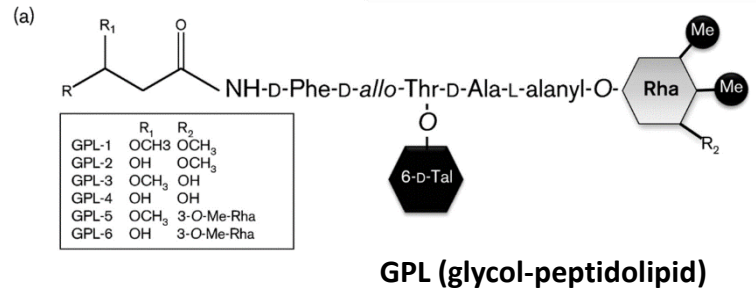


PGL (phenolic glycolipid)

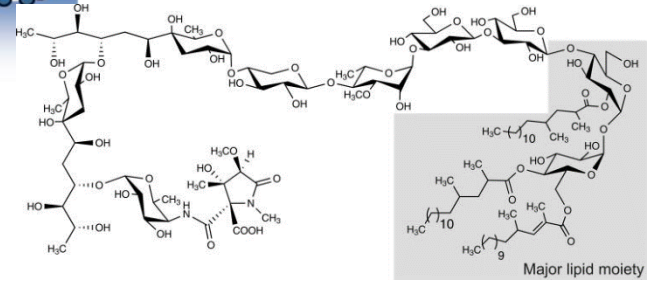
Phospholipides classiques : PE, PG, PI



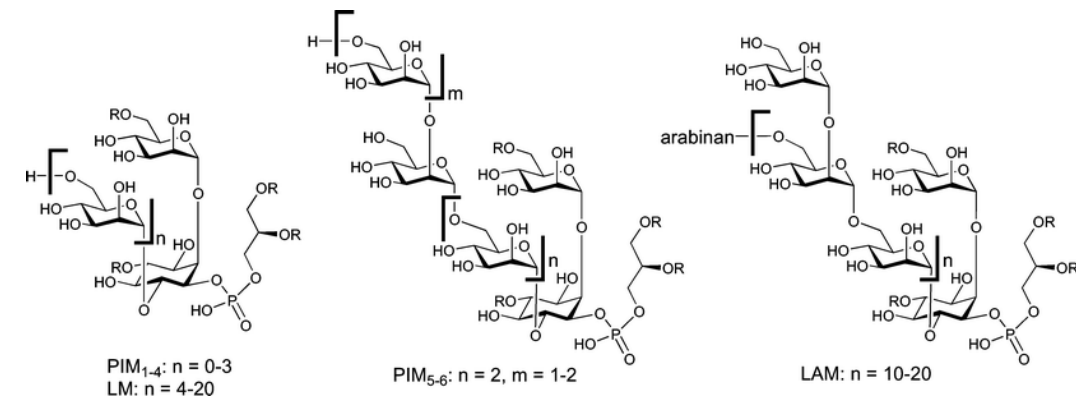
TAG (triacylglycerol)



GPL (glycol-peptidolipid)



LOS (lipooligosaccharide)



PIM (phosphatidylinositol mannoside) and LAM (lipoarabinomannane)

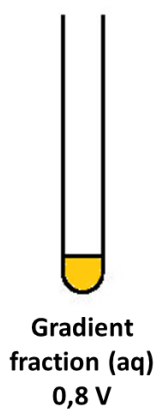
Composition de la mycomembrane :

➤ Séparation physique des membranes

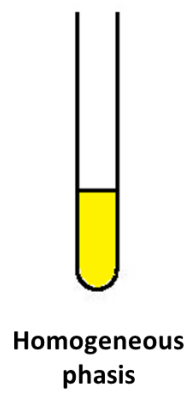


Plasma Membrane

mAGP complex



+ 1 V CHCl₃
+ 2 V MeOH
1 h at RT

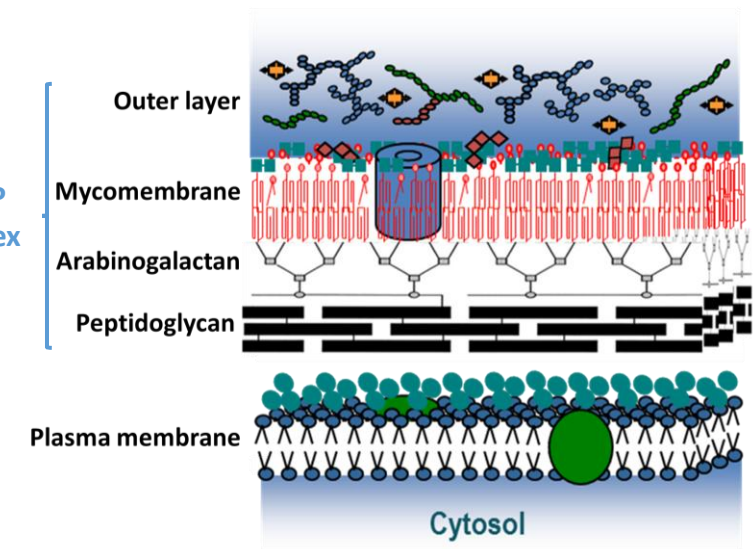


+ 1 V CHCl₃
+ 1 V water



Organic phasis: lipids

mAGP complex



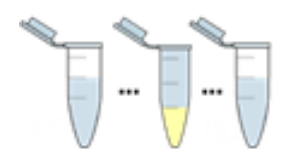
Fractions collectées



Extraction des lipides :
Bligh and Dyer



Lipides analysés par HPTLC



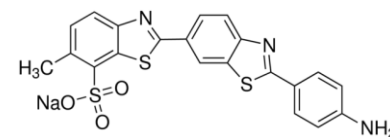


ATS 4 : dépôt de l'échantillon

10 μ L à 10 mg / mL



ADC 2 : Développement de la plaque



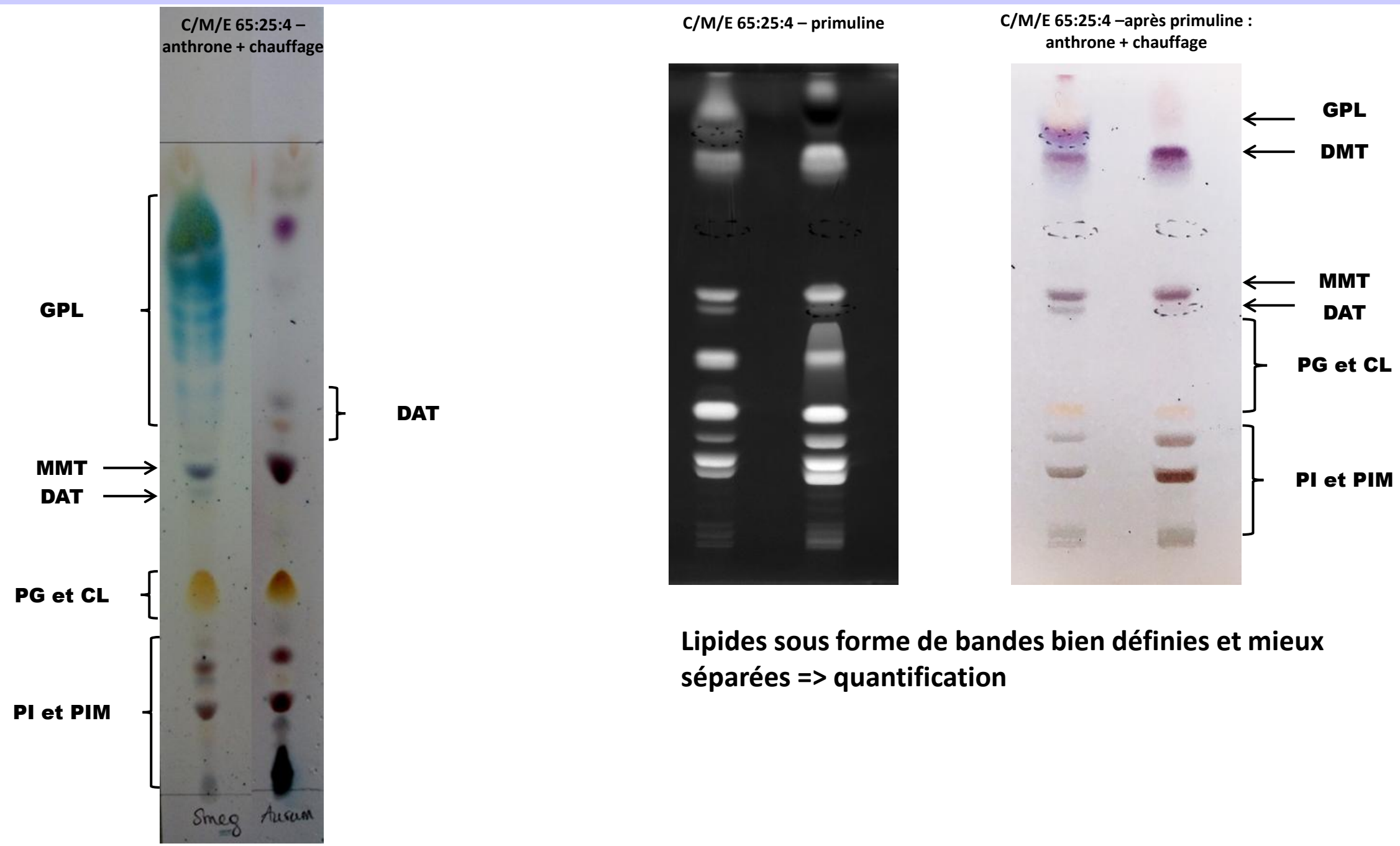
Révéléteur : primuline

Immersion de la plaque (5 mg in 100 ml acetone/water, 80/20, v/v)

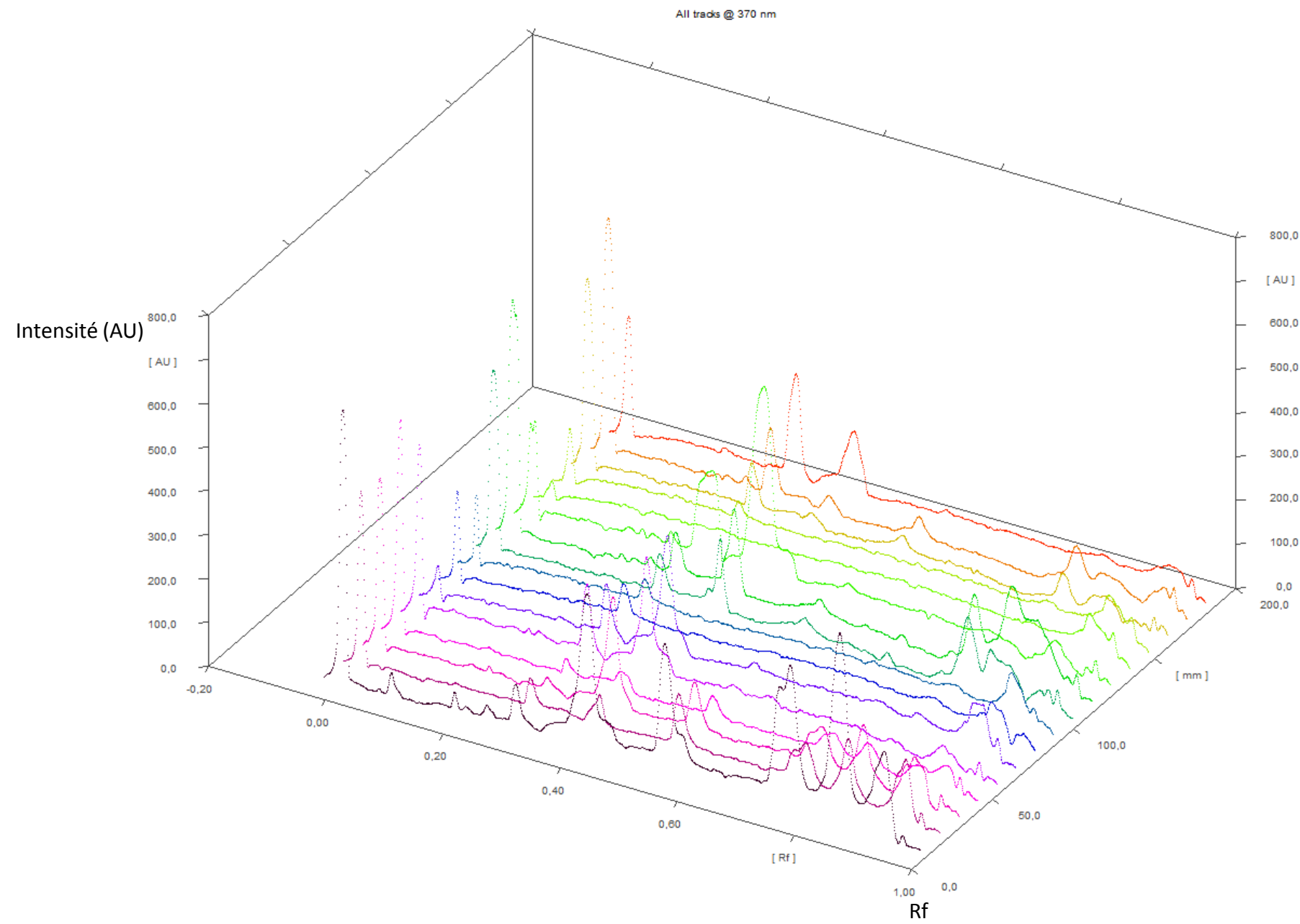


Scanner 3 : détection

Quantification relative des lipides présents dans chaque fraction



Lipides sous forme de bandes bien définies et mieux séparées => quantification



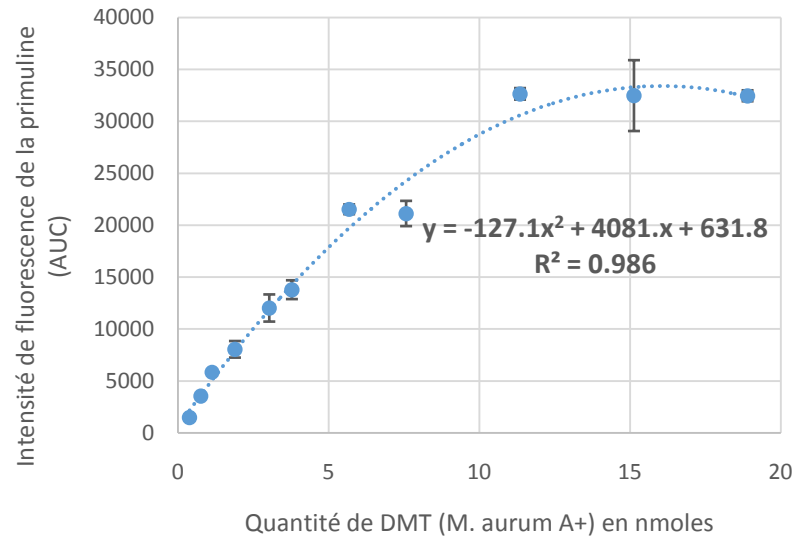
- Choix du pic d'intérêt = lipide
- Ajuster la ligne de base
- Corriger la largeur du pic

⇒ Calculer l'AUC (Area Under Curve) correspondant à la quantité relative de lipides

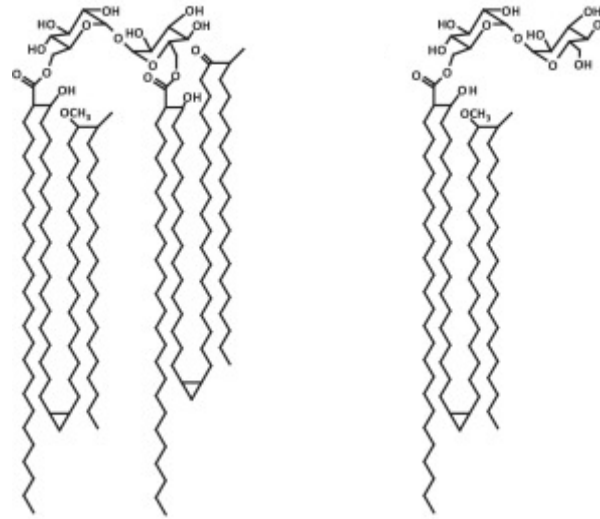
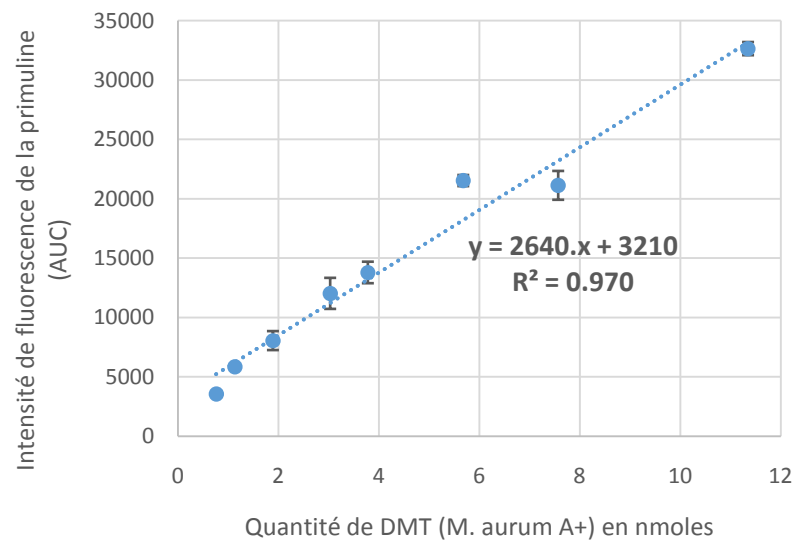
⇒ Facteur réponse du révélateur

- ✓ Lipides purifiés
- ✓ Test du facteur réponse du révélateur avec différentes quantités de lipides

Facteur réponse : DMT - primuline

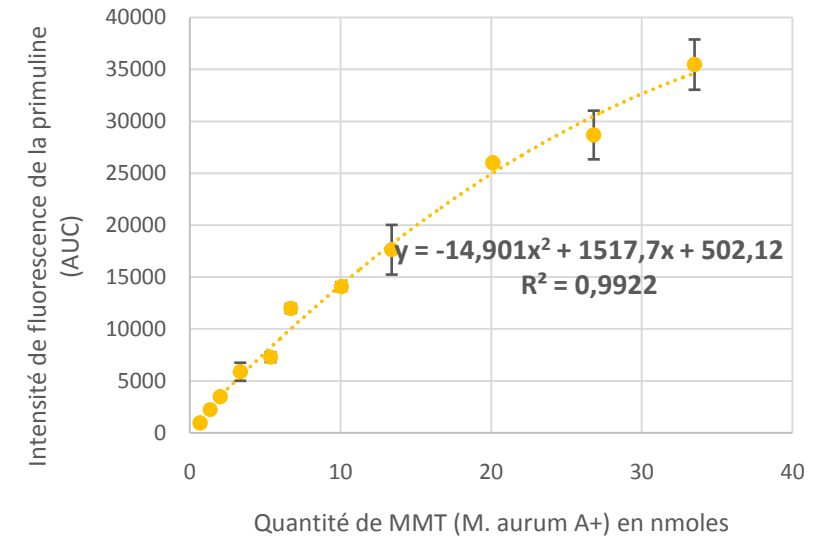


Facteur réponse : DMT - primuline

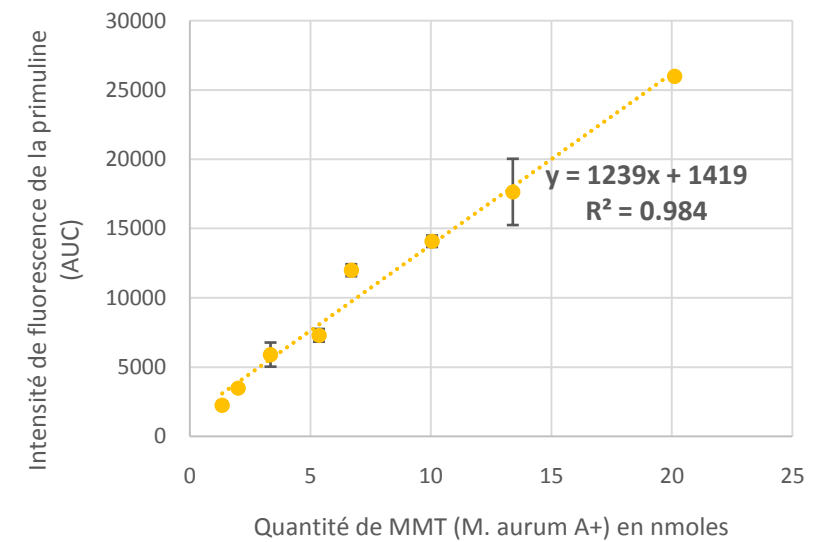


Travaux en cours pour les autres lipides ...

Facteur réponse : MMT - primuline

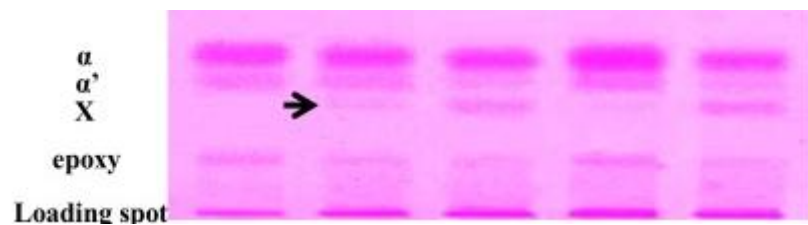


Facteur réponse : MMT - primuline



- Lavage avec du CHCl_3
- Séchage à 110 °C

Séparation des mycolates de *M. smegmatis* par HPTLC



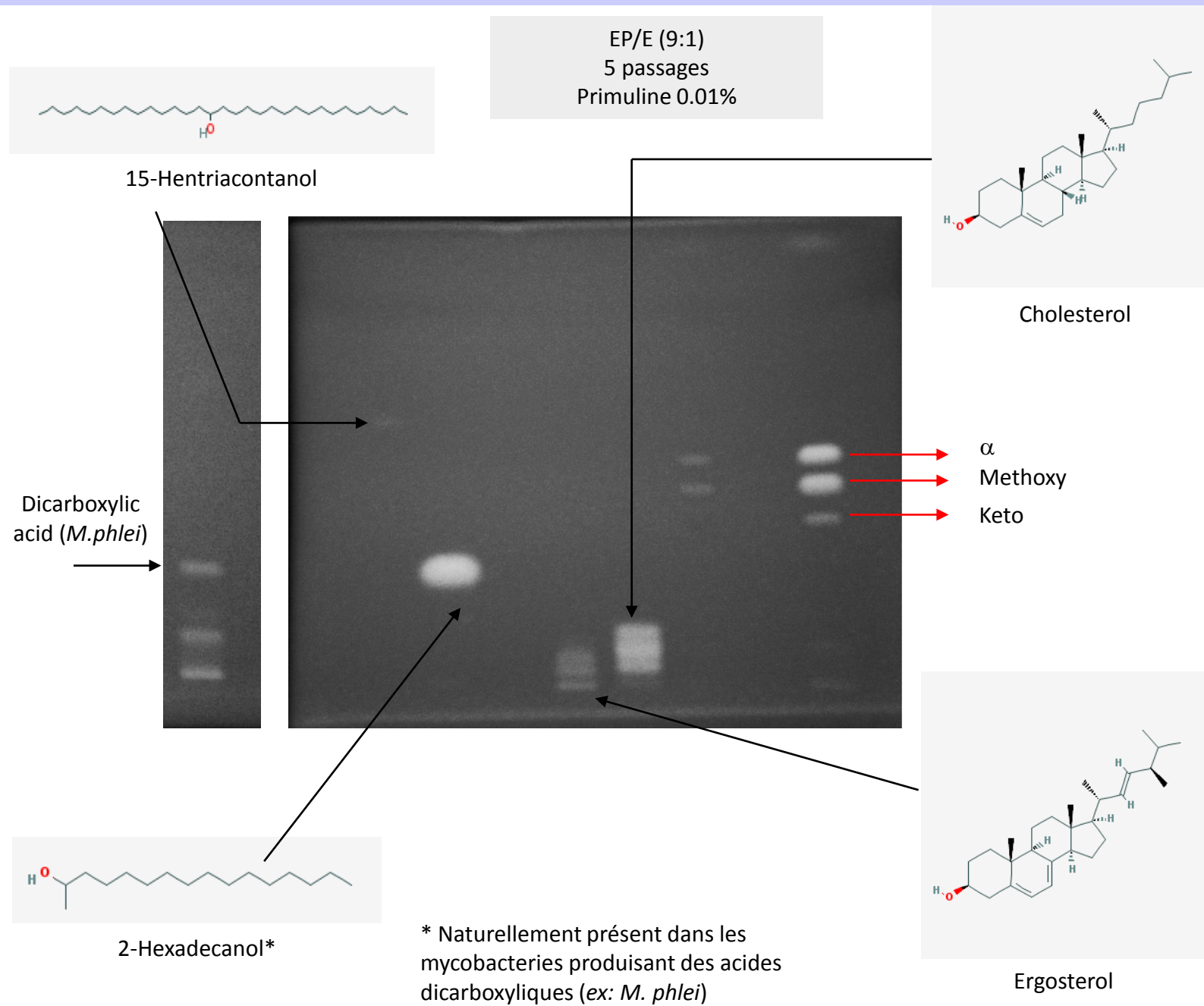
Jamet et al, 2015

Sans activation
Silica gel 60 (Merck)
PE/E (9:1 – 5 passages)
Rhodamine



Lefebvre, not published

Quantités croissantes de mycolates
Après activation
Silica gel 60 (Merck)
PE/E (9:1 – 5 passages)
 CuSO_4 + chauffage



* Naturellement présent dans les mycobacteries produisant des acides dicarboxyliques (ex: *M. phlei*)

		α	Methoxy	Keto
Gamme de linéarité	Rhodamine B	0.2µg - 1.5µg	0.2µg - 1.5µg	0.2µg - 1.5µg
	CuSO4	0.7µg - 1.7µg	0.7µg - 1.7µg	0.7µg - 1.7µg
	Primuline	0.3µg - 1.7µg	0.3µg - 1.7µg	0.3µg - 1.7µg
Limite de détection (µg)	Rhodamine B	1.1	0.8	0.7
	CuSO4	1.2	1.2	1
	Primuline	0.5	0.5	0.5
Limite de quantification (µg)	Rhodamine B	2.1	1.6	1.6
	CuSO4	1.9	1.9	1.7
	Primuline	0.9	0.9	1.1
Régression linéaire	Rhodamine B	yes	yes	yes
	CuSO4	yes	yes	yes
	Primuline	yes	yes	yes
r²	Rhodamine B	0.93	0.96	0.95
	CuSO4	0.97	0.97	0.98
	Primuline	0.99	0.99	0.98
Origine ?	Rhodamine B	no	no	no
	CuSO4	no	no	no
	Primuline	yes	yes	yes

Thank you

