HAL
open science

Optimisation d'une méthode d'extraction et d'analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) de microorganismes telluriques

Rachid Benabdallah, Cédric Repinçay, Romain Linard, Sylvie Nelieu, Christian Mougin

To cite this version:

Rachid Benabdallah, Cédric Repinçay, Romain Linard, Sylvie Nelieu, Christian Mougin. Optimisation d'une méthode d'extraction et d'analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) de microorganismes telluriques. 9ème congrès de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages, Mar 2011, Toulouse, France. 2011. hal-02744596

HAL Id: hal-02744596

https://hal.inrae.fr/hal-02744596v1

Submitted on 20 Mar 2023

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.

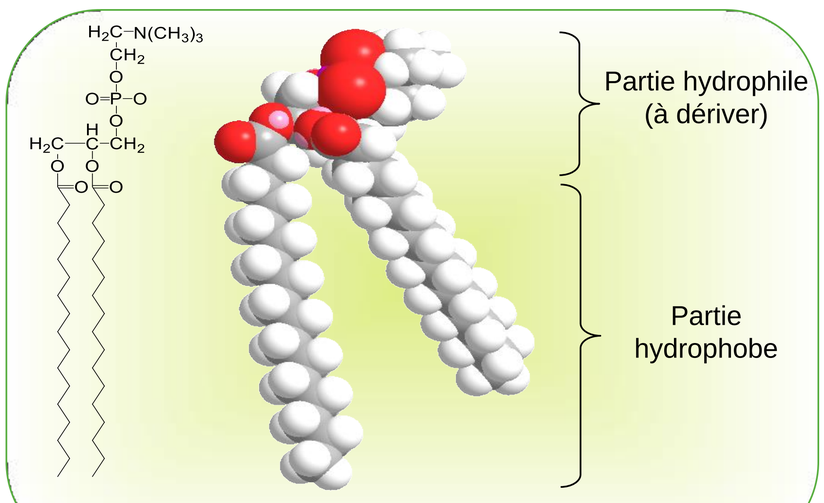
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Optimisation d'une méthode d'extraction et d'analyse des acides gras phospholipides (PLFA) de microorganismes telluriques

Rachid Benabdallah, Cédric Repincay, Romain Linard, Sylvie Nélieu, Christian Mougin

INRA, Unité de Physicochimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés, route de St-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.

Les acides gras phospholipidiques (PLFA) sont des constituants essentiels des membranes cellulaires des microorganismes [1]; ils sont considérés comme un marqueur de la biomasse dans les sols. Leurs profils sont utilisés comme des indicateurs permettant d'observer des évolutions de biomasse, que celles-ci soient temporelles, spatiales ou liées aux pratiques culturales [2].
La méthodologie analytique classique est d'extraire les lipides du sol puis les séparer en lipides neutres, glycolipides et PLFAs [3]. Ces derniers subissent ensuite une transméthylation par méthanolyse alcaline afin d'obtenir les esters méthyliques correspondants, facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse (GC). Cependant, cette méthode comporte de nombreuses étapes qui limitent considérablement sa répétabilité et rendent longue sa mise en œuvre.
Nous avons identifié les points critiques de la méthode. Ceci nous a conduits à optimiser l'étape d'extraction par l'utilisation d'ultrasons et l'étape de dérivation par une méthode en ligne : la transméthylation *in-situ* dans l'injecteur du GC. Par ailleurs, le couplage avec la spectrométrie de masse nous a permis d'obtenir une bonne spécificité dans les extraits complexes de sols.
Les différents points d'amélioration ont été testés par comparaison statistique avec la méthode classique.

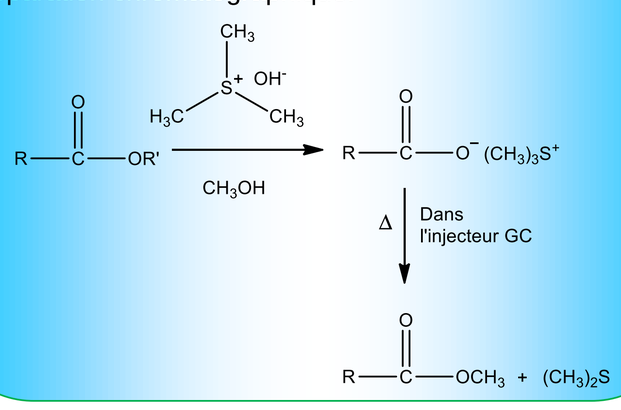


Structure des PLFAs

	Ancienne méthode	Nouvelle méthode
Jour -1	Détermination du taux d'humidité	Lyophilisation pendant 24 heures
Jour 1	-Peser 2 g de sol humide -Ajuster avec le solvant Bligh and Dyer selon le taux d'humidité de l'échantillon -Agiter 2 heures ↓ Décantation à 4°C	-Peser 2 g de sol lyophilisé -Ajouter le solvant Bligh and Dyer -Ultrasons 30 min -Centrifuger puis prélever le surnageant -Laver le culot avec le solvant Bligh and Dyer -Centrifuger puis prélever le surnageant ↓ Décantation à 4°C
Jour 2	-Centrifuger puis prélever le surnageant -Laver 2 fois le culot avec le solvant Bligh and Dyer -Centrifuger puis prélever le surnageant -Ajouter du chloroforme et du tampon citrate pour obtenir un système di-phasique -Laisser à 4°C pendant une nuit ↓ Séparation des 2 phases	- Ajouter du chloroforme et du tampon citrate pour obtenir un système di-phasique -Centrifuger pour séparer les phases -Éliminer la phase aqueuse (phase du haut) -Évaporer à sec la phase organique et reprendre avec du chloroforme SPE -Conditionnement des **colonnes SPE 500 mg** -Élution avec: -chloroforme (lipides neutres) -acétone (Glycolipides) -méthanol (PLFA) -Évaporation à sec de la fraction PLFA -Stocker à -18°C jusqu'à l'analyse
Jour 3	-Éliminer la phase aqueuse (phase du haut) -Évaporer à sec la phase organique et reprendre avec du chloroforme SPE -Conditionnement des **colonnes SPE 2 g** -Élution avec: -chloroforme (lipides neutres) -acétone (Glycolipides) -méthanol (PLFA) -Évaporation à sec de la fraction PLFA -Stocker à -18°C	**Dérivatisation *in-situ* dans l'injecteur du GC** -Reprendre l'extrait sec avec du Methyl Tert Butyl Ether (MTBE) -Ajouter du Trimethylsulfonium Hydroxide solution (TMSH) -Laisser réagir 30 min à température ambiante -Ajouter le standard interne -Analyse par GC-MS mode SIM Analyse par GC-MS mode SIM
Jour 4	**Dérivatisation par méthanolyse alcaline** -Reprendre l'extrait sec avec un mélange toluène/méthanol -Ajouter une solution de méthanol/KOH -Incuber pendant 30 min à 37°C -Quencher la réaction avec un solvant (hexane +chloroforme) -Centrifuger -Éliminer la phase aqueuse (phase du bas) -Laver en ajoutant une solution de NaOH -Centrifuger -Prélever et filtrer la phase organique -Laver 2 fois la phase aqueuse avec le solvant (hexane+chloroforme) -Évaporer à sec -Stocker à -18°C jusqu'à l'analyse	
Jour 5	Analyse par GC-MS	

Principe de la dérivatisation *in-situ*

L'hydroxyde de triméthylsulfonium permet une trans méthylation des PLFAs pour donner les acides gras méthyliques correspondants. Aucune isomérisation n'est observée.
La réaction passe par la formation d'un sel sulfonium en présence de méthanol qui est ensuite pyrolisé directement dans l'injecteur de GC pour former l'ester méthylique correspondant. Le sous-produit diméthyle sulfide a un faible point d'ébullition et ne modifie pas la séparation chromatographique.

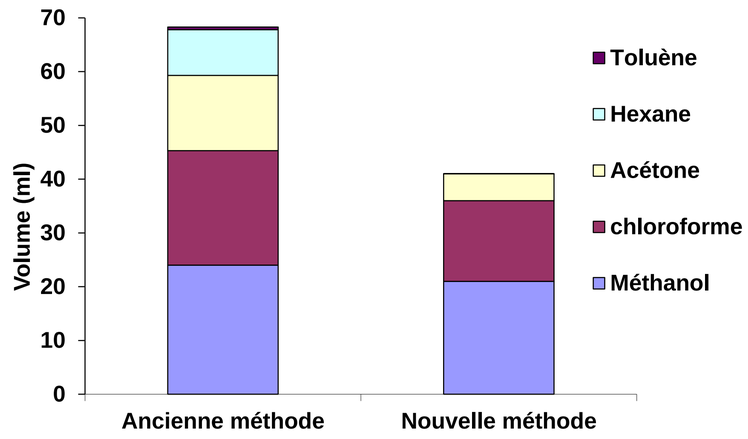


Comparaison des 2 méthodes

Nombre d'étapes manuelles et temps

Voir ci-contre

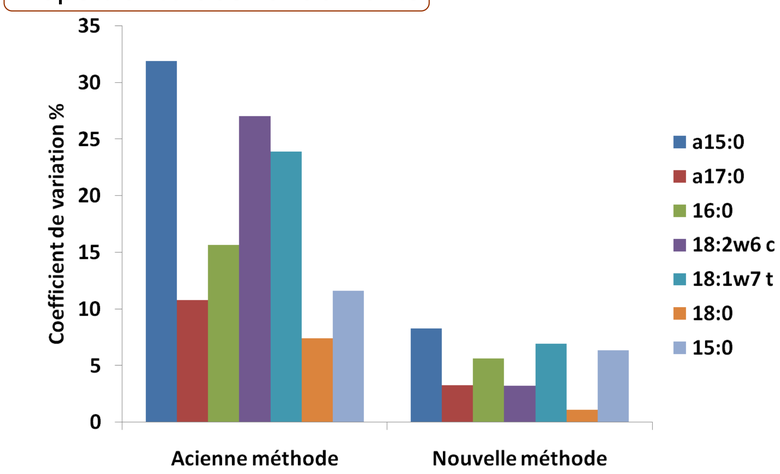
Consommation en solvant par échantillon



Différence qualitative et quantitative

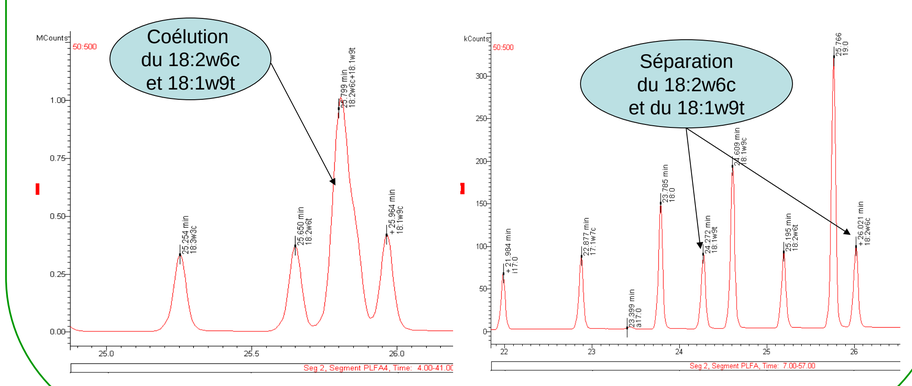
Un test de comparaison de Wilcoxon ($p < 0.05$) sur les concentrations moyennes des PLFAs n'a montré aucune différence entre les méthodes.

Répétabilité des rendements



Amélioration de la séparation chromatographique

Ancienne Colonne Apolaire (30 m) — ***Nouvelle Colonne Polaire (60 m)***



Analyse des PLFAs dans les sols de deux parcelles faiblement et moyennement contaminées par des métaux lourds et HAPs d'un même site

L'analyse des PLFAs permet d'accéder aux compartiments microbien et fongique du sols pour évaluer l'impact de la contamination. Certains PLFAs sont des marqueurs des groupes fongique et bactériens gram+ ou gram-. La figure 1 montre que la quantité de PLFAs (donc de bactéries et de champignons) est fortement diminuée dans la parcelle moyennement contaminée. La figure 2 présente une analyse ACP sur les % molaires des PLFAs majoritaires. Les PLFAs 16:1w7c, 16:0, a17:0, 17:0, 18:2w6t, 20:4w6c sont fortement corrélés au premier axe qui permet la différentiation des deux parcelles (figure 3). Le PLFA marqueur fongique 18:2w6c n'est pas impacté par la contamination (axe secondaire).

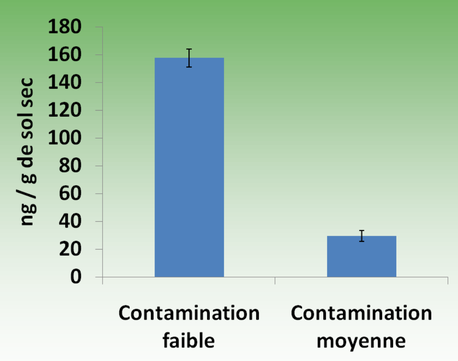


Figure 1: Total des PLFAs quantifiés

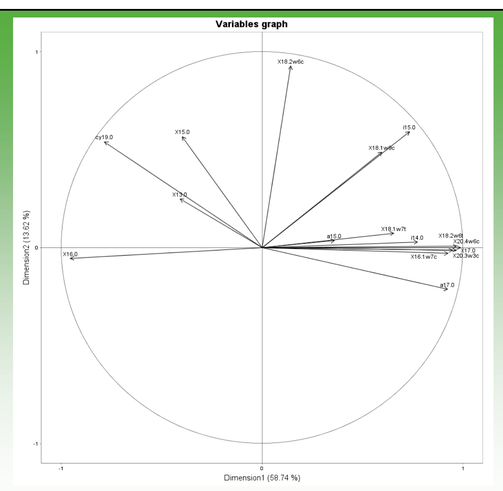


Figure 2: ACP des PLFAs majoritaires, cercle des corrélations

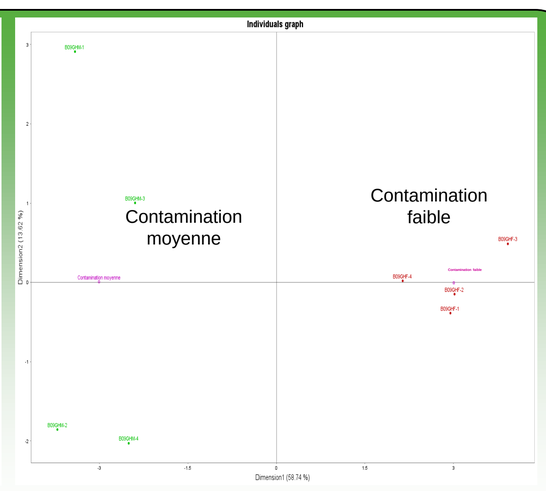


Figure 3: ACP des PLFAs majoritaires, graphique des individus

CONCLUSION

La nouvelle méthode présente de nombreux avantages par rapport à la précédente : le protocole est plus rapide, moins consommateur en solvants organiques (il évite notamment le toluène, toxique). De plus, les performances obtenues sont supérieures à la fois en répétabilité de l'étape d'extraction et en spécificité de l'analyse GC-MS. La meilleure séparation chromatographique des PLFAs a en particulier permis de diminuer les limites de quantification et d'augmenter le nombre de composés quantifiés (passage de 26 à 44 PLFAs).
La nouvelle méthode a été appliquée avec succès sur des échantillons de sols de texture variable, provenant de forêts, prairies, cultures, friches, etc. Le traitement statistique des profils d'acides gras a permis de démontrer que les PLFAs sont utilisables comme bioindicateurs en écotoxicologie.

REFERENCES :

[1] V.L. Bailey, A.D.Peacock, J.L. Smith, H.Bolton, Jr. *Soil Biol. Biochem*. 34, 1385-1389 (2002)
[2] M. Klamer, E. Baath, *Soil Biol. Biochem*. 36, 57-65 (2004)
[3] E.G. Bligh, W.J.Dyer, *Canad. J. Biochem. Physiol*. 37, 911-917 (1959)

REMERCIEMENTS :
Les auteurs remercient l'ADEME pour son soutien financier, dans le cadre du projet "Bioindicateurs".