



HAL
open science

Utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme tube à essai vivant pour l'étude fonctionnelle des corps lipidiques de plante

Marine Froissard, Thierry Chardot

► To cite this version:

Marine Froissard, Thierry Chardot. Utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme tube à essai vivant pour l'étude fonctionnelle des corps lipidiques de plante. Rencontres des Microbiologistes de l'INRA, Jun 2006, Dourdan, France. 2006. hal-02752196

HAL Id: hal-02752196

<https://hal.inrae.fr/hal-02752196>

Submitted on 3 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.

Utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme "tube à essai vivant" pour l'étude fonctionnelle des protéines de surface des corps lipidiques de plantes



M. Froissard et T. Chardot
UMR 206 Chimie Biologique, CBAI, 78 850 Thiverval-Grignon, France



INTRODUCTION

Les corps lipidiques : nouvelles cibles des industries agroalimentaires, cosmétiques et de la médecine

Au sein de la cellule, les lipides neutres (triacylglycérols et esters de stérols) sont stockés dans des granules de réserves, les corps lipidiques

Ces **granules lipidiques** sont présents, chez les eucaryotes supérieurs, dans les **graines de plantes** (ils sont alors appelés **oléosomes**), et aussi chez certains unicellulaires comme les levures [1].



Quelques exemples de graines contenant des oléosomes

Ces oléosomes font l'objet d'un intérêt grandissant

Pour les biologistes

- Observations récentes : le **corps lipidique** n'est pas un sac à lipides inerte mais un **organite dynamique** à part entière

Pour les industriels

- en **agroalimentaire** : les huiles alimentaires (colza, tournesol, noix) sont extraites des oléosomes contenus dans les graines
- en **cosmétique** : les oléosines, protéines des oléosomes, ont des propriétés de réduction de la tension de surface et peuvent être utilisées comme **agents émulsifiants**

Pour le monde médical

- Il a été montré que les **oléosines** d'arachide étaient **allergisantes**.

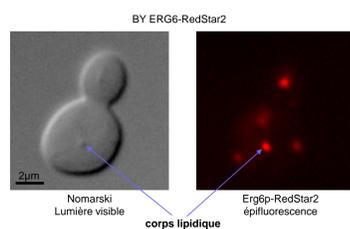
La levure *S. cerevisiae*, modèle cellulaire d'étude fonctionnelle des oléosines

Avantages du modèle *S. cerevisiae*

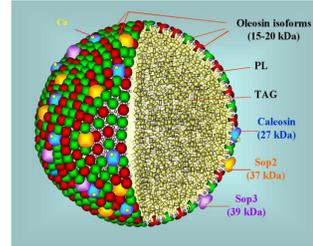
- Faible coût
- Disponibilité des outils de génie génétique et d'analyse
- Système éprouvé pour l'étude fonctionnelle de protéines hétérologues [3]

Avantages pour l'étude de la dynamique des corps lipidiques

- Présence de corps lipidiques [4]
- Conservation des voies métaboliques de stockage des lipides
- Bibliographie sur oléosines de plantes et levure [5, 6]



L'oléosome et ses protéines associées, les oléosines



Les oléosines, protéines majoritaires à la surface de l'oléosome

Structure :

- Extrémités N-terminale et C-terminale exposées à la surface et baignant dans le cytoplasme
- Segment central hautement hydrophobe permettant l'ancrage dans la monocouche de phospholipides et/ou les TAG

Questions posées

Rôles sur :

- Remplissage en lipides ?
- Stabilisation du globule lipidique ?
- Interactions avec des protéines cytoplasmiques (ex : lipases) ?
- Mobilisation des lipides de réserve ?

Constitution d'un oléosome [2]

- Matrice centrale de triacylglycérols (TAG) et d'esters de stérols
- Monocouche de phospholipides (PL)
- Protéines de surface

Développement d'outils pour l'étude des oléosines exprimées dans la levure

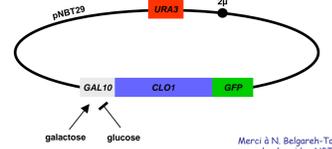
Souches avec marqueur fluorescent spécifique des corps lipidiques

- Postgénomique → identification des acteurs de la biosynthèse des lipides neutres [7]
- Systèmes rapides et efficaces de modification des gènes → PCR TOOLBOX [8]
- Erg6p** (Delta(24)-stérol C-méthyltransférase) fusionnée à la RedStar2 au locus chromosomique (voir photos à gauche)

Système d'expression inductible

Plasmide pNBT29 (2 microns, URA3, Promoteur GAL1, GFP en 3') permet :

- l'expression conditionnelle de l'oléosine en fonction de la source de carbone
- Le suivi cinétique *in vivo* par fluorescence de la quantité et de la localisation de l'oléosine.



Merci à N. Belgarh-Touzé pour le plasmide pNBT29

RESULTATS

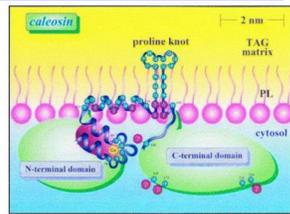
Etude fonctionnelle de la caléosine CLO1 d'*A. thaliana* chez *S. cerevisiae*

Caractéristiques de la protéine

- Identifiée uniquement par spectrométrie de masse [9]
- Fonction inconnue
- Structure originale de type oléosine mais avec domaine EF-Hand de fixation au calcium [2]

Questions pour lesquelles le système cellulaire peut apporter des réponses

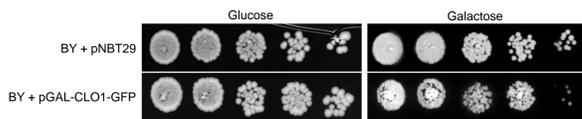
- Ciblage aux corps lipidiques ?
- Fonction sur la dynamique du corps lipidique et du métabolisme des lipides ?
- Rôle du calcium ?



La caléosine d'*A. thaliana* est exprimée et n'est pas toxique pour la levure

Tests de croissance sur boîtes

- Préculture de nuit en milieu glucose
- Dilutions en série des précultures
- Dépôts sur boîte gélosées avec glucose (pas d'expression de la caléosine-GFP) ou avec galactose (expression de la caléosine-GFP)

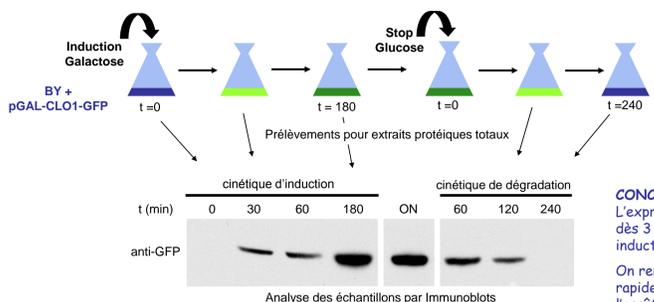


CONCLUSION

La taille des colonies isolées sur les boîtes contenant du galactose permet de montrer qu'il n'y a pas de toxicité importante de la caléosine chez la levure.

Suivi cinétique de l'expression et de la dégradation de la caléosine-GFP par immunodétection

- Culture de nuit dans du milieu contenant du raffinose
- Induction de l'expression par ajout de galactose dans le milieu
- Suivi de l'expression par analyse d'échantillons
- Arrêt de l'expression par ajout de glucose dans le milieu
- Suivi de la dégradation par analyse d'échantillons



CONCLUSION

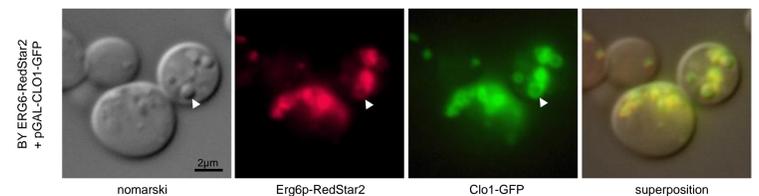
L'expression de Clo1-GFP est maximale dès 3 heures d'induction (équivalent à une induction sur la nuit, ON).

On remarque également une dégradation rapide de la protéine visible à t=120 après l'arrêt de la synthèse

La caléosine est correctement adressée aux corps lipidiques de levure

Image de levures en microscopie (lumière visible et épifluorescence)

- exprimant Erg6p-RedStar2 au locus chromosomique sous son propre promoteur
- cultivées une nuit dans du milieu contenant du galactose induisant ainsi l'expression de CLO1-GFP.



CONCLUSION

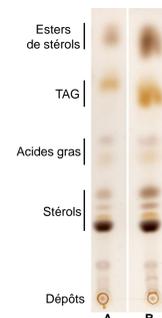
Les corps lipidiques (flèche) identifiables par la présence de Erg6-RedStar2 contiennent également la protéine CLO1-GFP montrant ainsi l'adressage correct de CLO1 aux corps lipidiques

L'expression de la caléosine favorise une accumulation de lipides dans la levure

Analyse du contenu en lipides des cellules

- Cultures de nuit des cellules en milieu avec galactose
- Lyophilisation des cellules

Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) après extraction des lipides par méthode de Folch



A : BY + pNBT29
B : BY + pGAL-CLO1-GFP

analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après méthylation des acides gras et extraction au pentane

Souche	Acides gras (µg/mg de matière sèche)	pourcentage
BY + pNBT29 (A)	84,2	100%
BY + pGAL-CLO1-GFP (B)	156,4	186%

CONCLUSION

L'analyse par CCM permet de visualiser, dans la souche exprimant Clo1-GFP, une accumulation de triacylglycérol (TAG) et d'esters de stérols qui sont les espèces présentes dans les corps lipidiques.

Cette accumulation est confirmée par CPG qui permet de quantifier les esters d'acides gras de ces lipides neutres

BIBLIOGRAPHIE [1] Martin and Parton (2006). Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. [2] Frandsen et al. (2001) Physiol. Plant. 112, 301-307. [3] Barbier-Brygoe et al. (2001). Trends Plant Sci. 6, 577-585. [4] Athenstaedt et al. (1999). J. Bacteriol. 181, 6441-8. [5] Ting et al. (1997). J. Biol. Chem. 272, 3699-706. [6] Beaudoin et al. (2000). Plant J. 23, 159-70. [7] Mullner and Daum (2004). Acta. Biochim. Pol. 51, 323-47. [8] Janke et al. (2004). Yeast. 21, 947-62. [9] Jolivet et al. (2004). Plant Physiol. Biochem. 42, 501-9.

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme système cellulaire d'expression hétérologue a permis de montrer que

- Clo1 entraîne une **augmentation** du nombre et une modification de la morphologie des **corps lipidiques** (microscopie)
- Clo1 entraîne une **augmentation** de la quantité de **triglycérides** et des **esters de stérols** (CPG + CCM)

Ces résultats indiquent que l'expression de protéines structurales de la surface des corps lipidiques de plantes est capable d'induire la production et/ou le stockage de lipides neutres chez la levure (résultats identiques obtenus pour l'oléosine S3).

PERSPECTIVES

Nous nous intéressons maintenant

- A la **stabilité** des corps lipidiques ainsi formés
- A l'influence de la présence des oléosines sur la capacité de la levure à **mobiliser** et **métaboliser** ces réserves lipidiques
- Aux **facteurs** intervenant dans la **biogenèse**, le **maintien** et la **mobilisation** des corps lipidiques (protéomique des corps lipidiques, mutants des corps lipidiques)

Les **données fonctionnelles** qui auront été collectées grâce aux expériences effectuées chez la levure permettront de proposer des **modèles** sur la **dynamique** des oléosomes et de tester ceux-ci sur un système homologue, que ce soit sur des cultures de cellules de plante ou sur plante entière.