



HAL
open science

Végétalisation du corps lipidique de *S. cerevisiae* pour l'étude structurale de protéines intégrales et la production de biomasse lipidique

Jean-David J.-D. Vindigni, Zoi Erpapazoglou, Yann Gohon, Pierre Briozzo, Franck Wien, Thierry Chardot, Marine Froissard

► To cite this version:

Jean-David J.-D. Vindigni, Zoi Erpapazoglou, Yann Gohon, Pierre Briozzo, Franck Wien, et al.. Végétalisation du corps lipidique de *S. cerevisiae* pour l'étude structurale de protéines intégrales et la production de biomasse lipidique. 9. colloque Levures, Modèles et Outils, Aug 2010, Strasbourg, France. 2010. hal-02757358

HAL Id: hal-02757358

<https://hal.inrae.fr/hal-02757358>

Submitted on 4 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.

Végétalisation du corps lipidique de *S. cerevisiae* pour l'étude structurale de protéines intégrales et la production de biomasse lipidique



Jean David Vindigni¹, Zoi Erpapazoglou², Yann Gohon¹, Pierre Briozzo¹, Franck Wien³, Thierry Chardot¹, Marine Froissard¹



¹ Equipe Dynamique et Structure des Corps Lipidiques, UMR 1318 IJPB, INRA AgroParisTech, 78 850 Thiverval-Grignon
² Equipe Ubiquitine et Trafic Intracellulaire, UMR 7592 IJM, CNRS Université Paris Diderot, 75 252 Paris Cedex 13 et ³ Synchrotron SOLEIL, 91 192 Gif-sur-Yvette

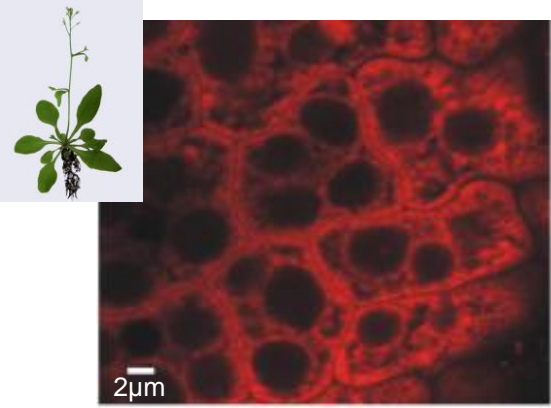
INTRODUCTION

Le corps lipidique : un organe complexe et dynamique

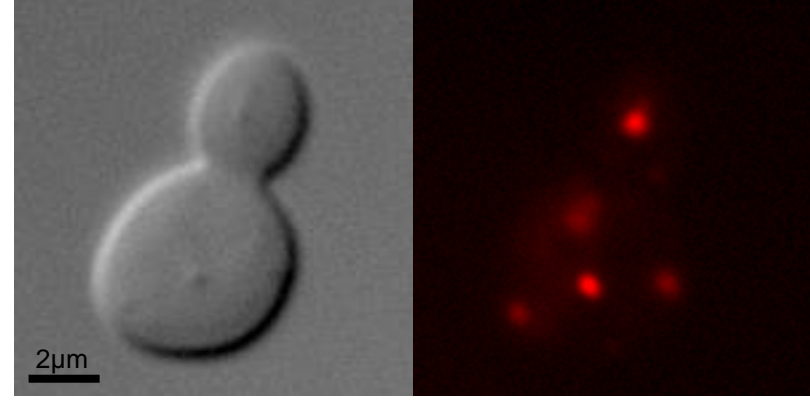
Au sein de la cellule, les lipides neutres (triacylglycérols et esters de stérols) sont stockés dans des organites de réserves, les corps lipidiques (CL). Ils sont présents, chez les eucaryotes supérieurs (mammifères, plantes) et aussi chez certains microorganismes (levures, bactéries) [1].

Les corps lipidiques sont visualisables au microscope photonique grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques (colorants des lipides neutres ou détection d'une protéine résidente)

Corps lipidiques de graines d'*A. thaliana* colorées au Rouge Nile [2]



Levure exprimant une protéine du corps lipidique étiquetée avec la RFP



Corps lipidiques de cellules de foie colorées à l'ORO (rouge) [3]

Le corps lipidique : structure peu connue mais d'intérêt croissant

Les corps lipidiques font l'objet d'un intérêt grandissant de la part

Des biologistes

Le corps lipidique n'est pas un sac inerte mais un organe dynamique qui régule la métabolisme et la signalisation cellulaire

Du monde médical

Les corps lipidiques ont un rôle important dans des maladies dont la prévalence augmente (obésité, diabète) [4]

Les oléosines (d'arachide et de noisette), protéines associées aux corps lipidiques de graines, étaient allergisantes [5].

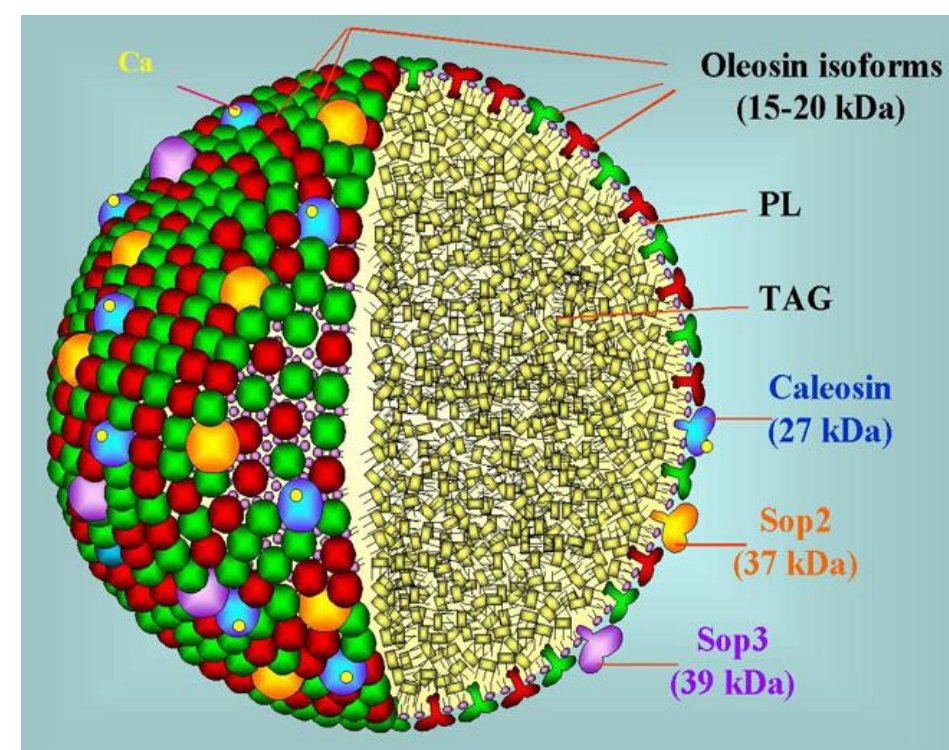
Des industriels

trituration : les huiles alimentaires et non alimentaires (agrobiorésiduels et chimie verte) sont extraites des corps lipidiques de graines

agroalimentaire, cosmétique et santé : les oléosines ont des propriétés de réduction de la tension de surface et peuvent être utilisées comme agents émulsifiants ou de vectorisation [6]

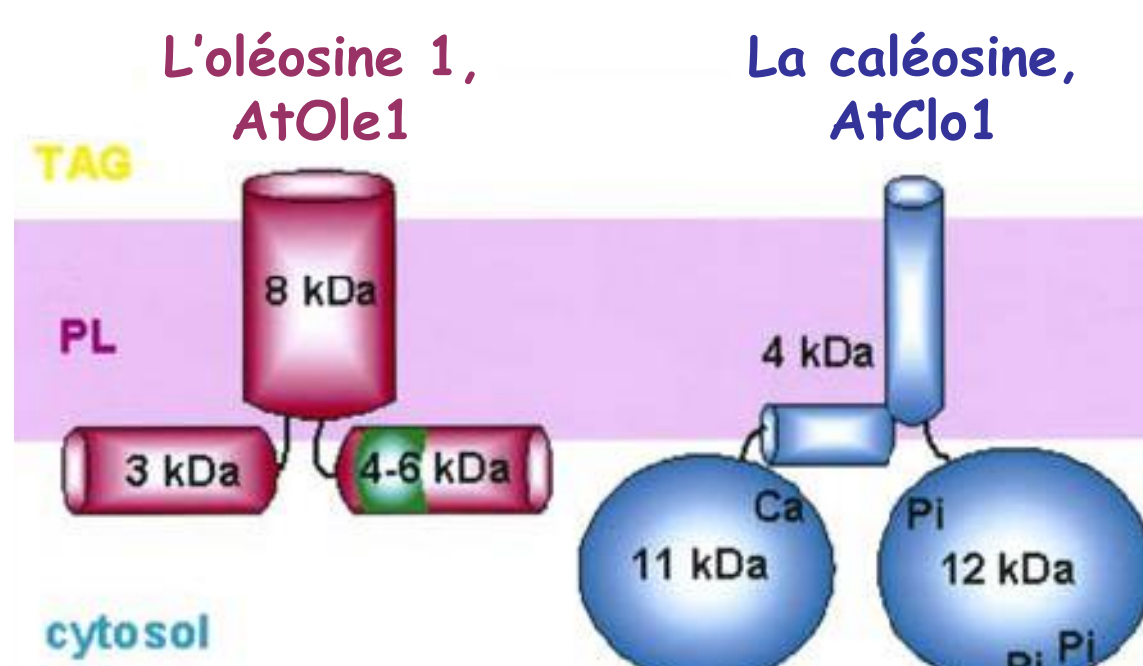


Un exemple, le corps lipidique végétal et ses protéines associées



Constitution d'un corps lipidique

- Matrice centrale de triacylgcérols (TAG) et d'esters de stérols
- Monocouche de phospholipides (PL)
- Protéines de surface (de 3 à plusieurs centaines selon le type cellulaire)



Les oléosines, protéines intégrales de l'oléosome

Structure prédite = organisation triblock :

- Extrémités N-terminale et C-terminale variables, 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

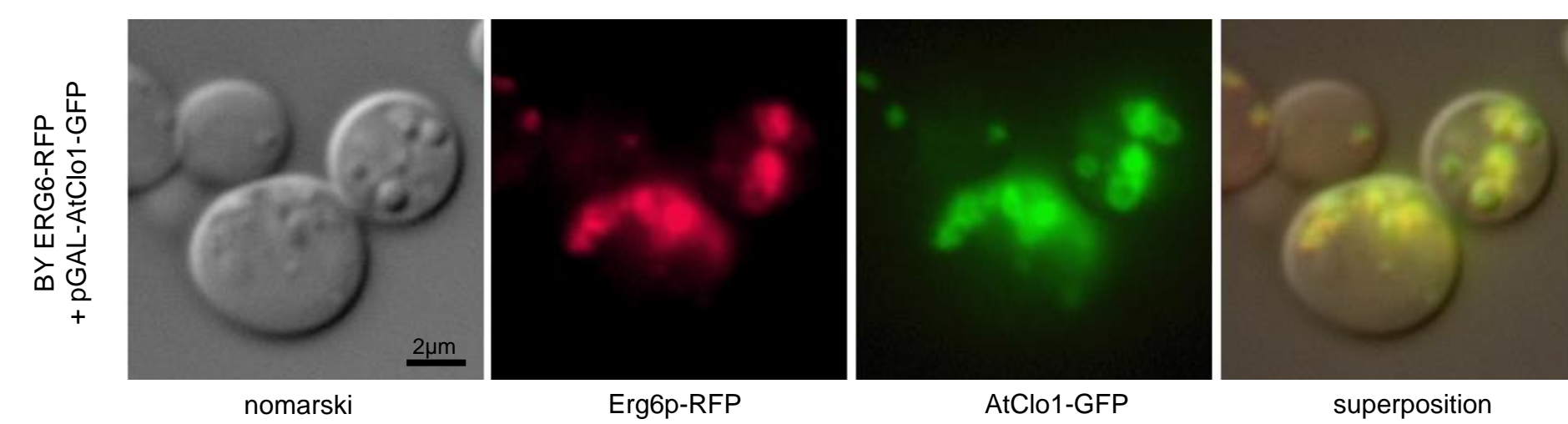
Questions posées et objectifs

- Rôle sur le remplissage en lipides
- Rôle sur la structure et la stabilisation du corps lipidique
- Données structurales sur les oléosines dans les corps lipidiques (environnement naturel)

RESULTATS

Les oléosines sont adressées aux corps lipidiques de *S. cerevisiae*

Image de levures en microscopie photonique (lumière visible et épifluorescence) exprimant Erg6p-RFP (Delta(24)-stérol C-méthyltransférase du corps lipidique) et AtClo1-GFP.

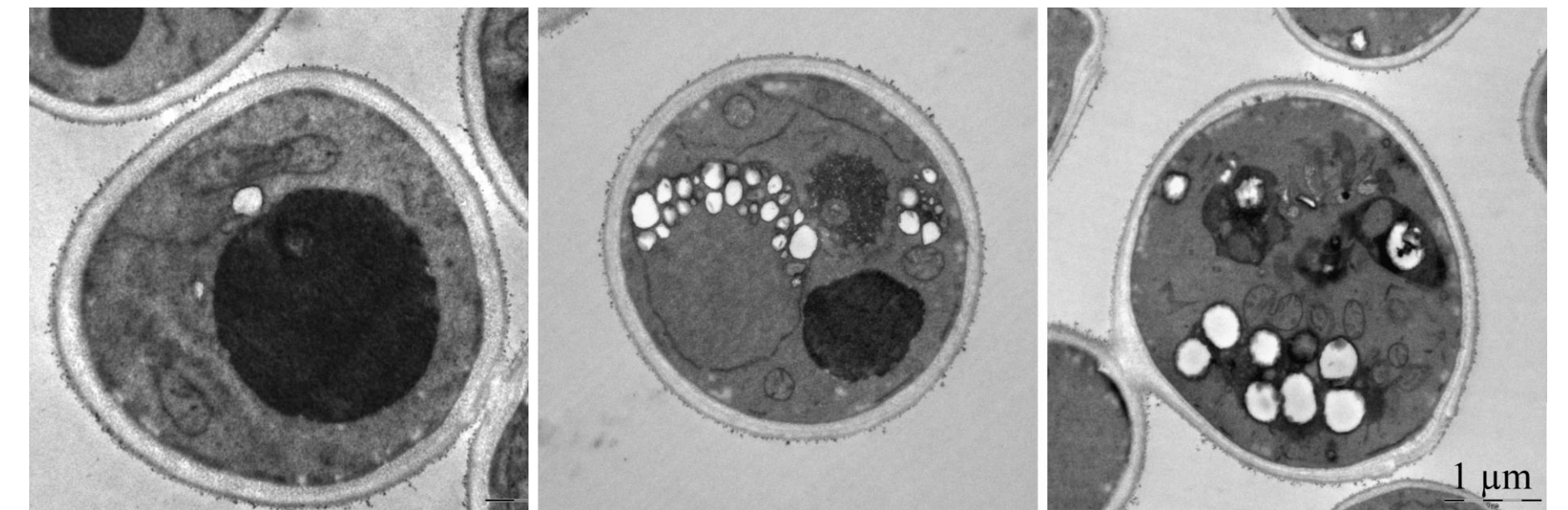


CONCLUSION

Les corps lipidiques, identifiables par la présence de Erg6-RFP, contiennent également la protéine AtClo1-GFP montrant ainsi l'adressage correct de la calcosine aux corps lipidiques.

Les oléosines induisent une augmentation du nombre et de la taille des corps lipidiques

Coupes de levures exprimant AtOle1-GFP et AtClo1-GFP (microscopie électronique à transmission)

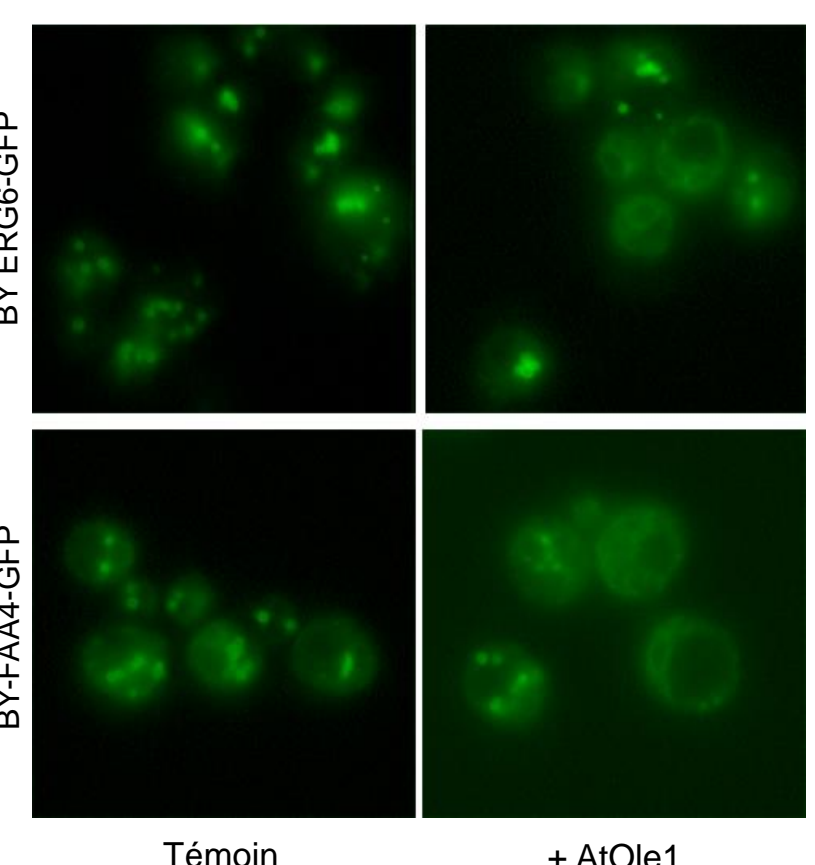


CONCLUSION

Les corps lipidiques, structures rondes et blanches sur les photos, sont plus nombreux et plus gros dans les souches exprimant les oléosines que dans la souche de référence. On observe également des modifications morphologiques des cellules au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries.

Les oléosines deviennent les protéines majoritaires du corps lipidique

Les oléosines bloquent l'accès au corps lipidique

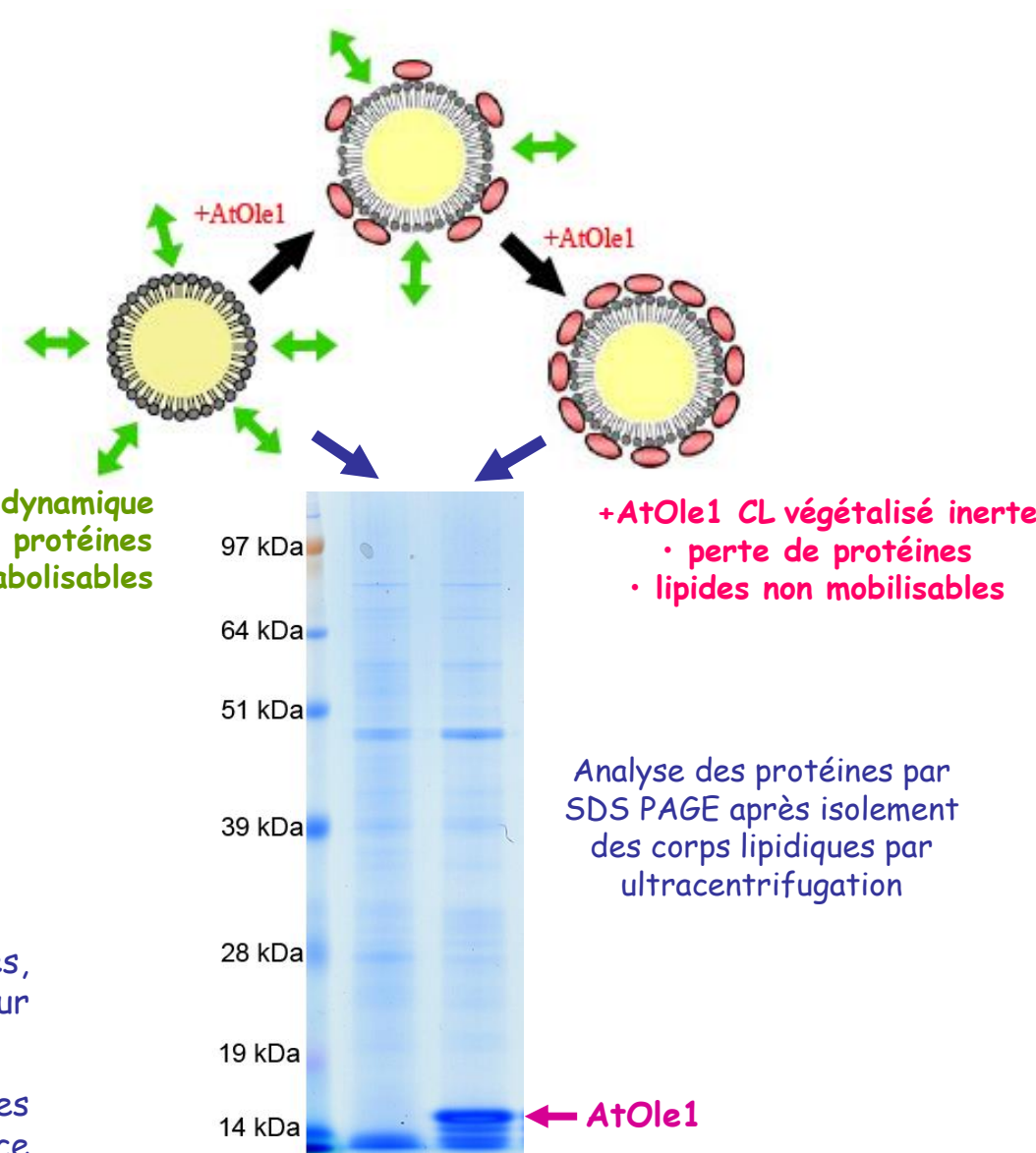


CONCLUSION

Les oléosines, protéines intégrales et hautement hydrophobes, s'associent fortement aux corps lipidiques, modifiant ainsi leur composition protéique.

On observe également une modification du statut métabolique des lipides stockés (perte de la mobilisation au démarrage de la croissance cellulaire après starvation).

Végétalisation du corps lipidique par les oléosines



Témoin = CL dynamique
 · Echanges de protéines
 · lipides métabolisables

+AtOle1 CL végétalisé inerte
 · perte de protéines
 · lipides non mobilisables

Analyse des protéines par SDS PAGE après isolement des corps lipidiques par ultracentrifugation

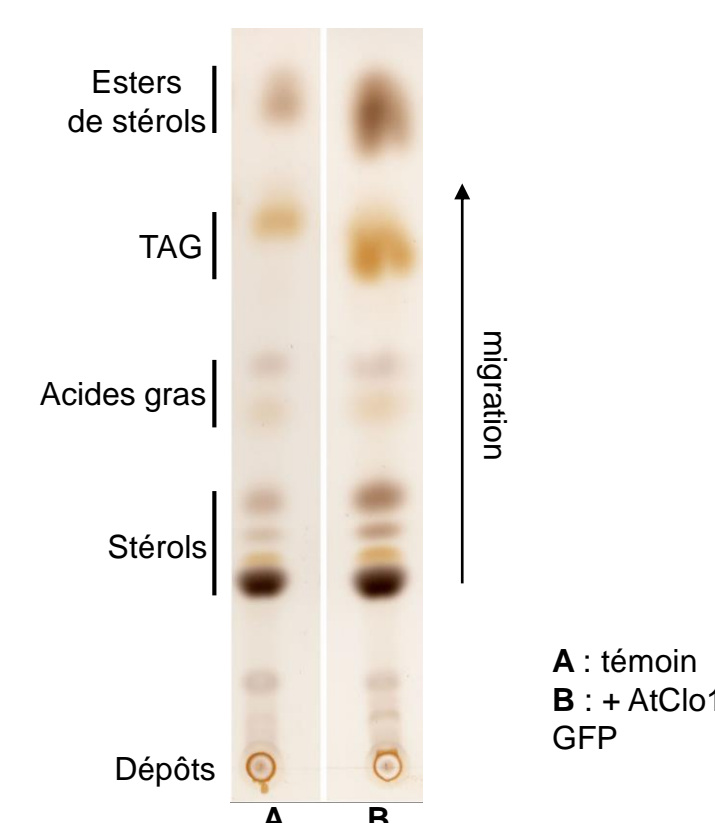
← AtOle1

L'expression des oléosines favorise une accumulation de lipides dans la levure

Analyse du contenu en lipides des cellules

Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)



Souche	Acides gras (µg/mg de matière sèche)	pourcentage
Témoin	40,3	
+ AtOle1-GFP	52,9	+ 32 %
+ AtClo1-GFP	59,0	+ 47 %

CONCLUSION

L'analyse par CCM permet de visualiser une accumulation de triacylgcérol (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

Les oléosines sont structurées en feuillets bêta dans le corps lipidique

Les corps lipidiques purifiés sont analysés par dichroïsme circulaire utilisant le rayonnement synchrotron (SRCD)



CONCLUSION

Nous avons obtenu un spectre de dichroïsme circulaire sur des corps lipidiques naturels.

Les protéines associées aux corps lipidiques, majoritairement AtOle1, sont essentiellement structurées en feuillets bêta.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La végétalisation du corps lipidique de *S. cerevisiae* par les oléosines a permis

- D'augmenter le stockage de lipides de réserves par la cellule qui est une conséquence de l'augmentation du nombre et de la taille des corps lipidiques.
- D'obtenir des corps lipidiques portant une oléosine végétale insérée biologiquement dans un environnement lipidique naturel permettant ainsi des analyses structurales de ces protéines très hydrophobes et peu manipulables.

Nous nous intéressons maintenant

- Aux mécanismes qui sont mis en jeu lors de l'accumulation de lipides de réserves dans ces souches végétalisées (régulation des flux de carbones de réserves et/ou contrôle transcriptionnel des voies métaboliques).
- A la structure d'autres protéines intégrales triblock des corps lipidiques issues de différents systèmes cellulaires (des protéines virales aux mammifères) pour déterminer une éventuelle convergence évolutive.