



Réunion du club de CCM, Toulouse, 05-06 Octobre 2016

L'HPTLC, un outil au service de la caractérisation d'enzymes du métabolisme des lipides végétaux

Laure Aymé

Équipe "Dynamique et structure des corps lipidiques"
Institut Jean-Pierre Bourgin (UMR 1318 INRA-AgroParisTech)
78026 Versailles cedex

Sommaire

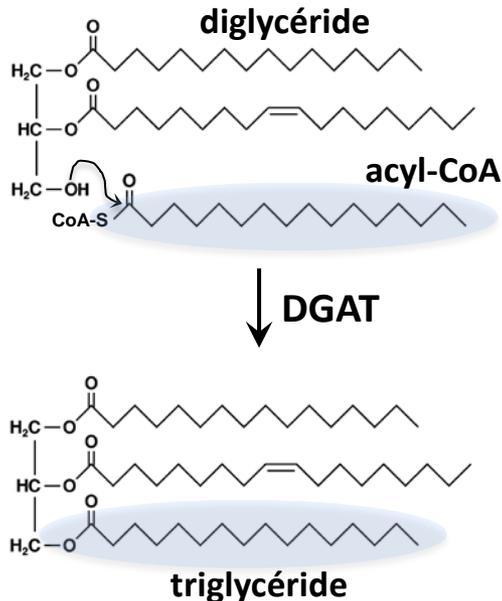
- Introduction : les diacylglycérol acyltransférases (DGATs), enzymes clefs de la synthèse des triglycérides (TGs)

- I) Étude fonctionnelle de DGATs d'*Arabidopsis thaliana* par expression en levure
- II) Production d'une huile microbienne enrichie en acides gras à chaînes moyennes par la DGAT d'un arbre tropical
- III) Caractérisation de la spécificité d'une DGAT de levure

- Conclusion

Les diacylglycérol acyltransférases (DGATs), enzymes clefs de la synthèse des triglycérides (TGs)

 tape finale de la synthèse des TGs catalysée par une DGAT



Contexte :

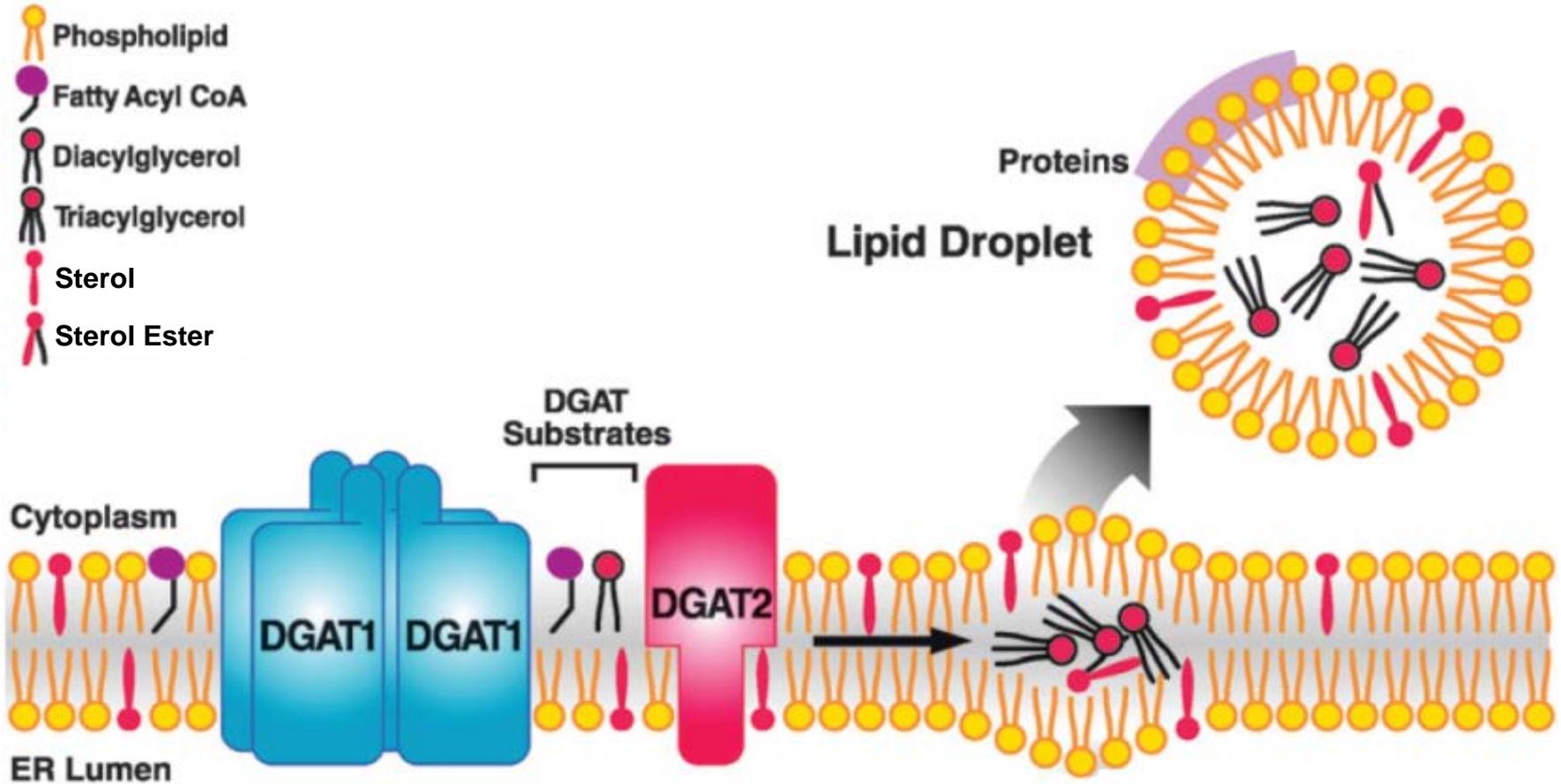
- enzymes communes à **tous les eucaryotes**, également retrouvées chez certains **procaryotes** (Liu *et al.*, 2012)
- enzymes **limitantes** pour l'accumulation des TGs (Millar *et al.*, 2006; Jako *et al.*, 2001)

Enjeux :

- **santé** : DGAT = cible thérapeutique (obésité, diabète) impliquée dans l'absorption et le stockage des TGs
- industrie **agro-alimentaire** : rendement, qualité des huiles végétales
- **lipochimie** : carburants, peintures et plastiques biosourcés



Les DGATs participent à l'accumulation des TGs stockés au sein des corps lipidiques

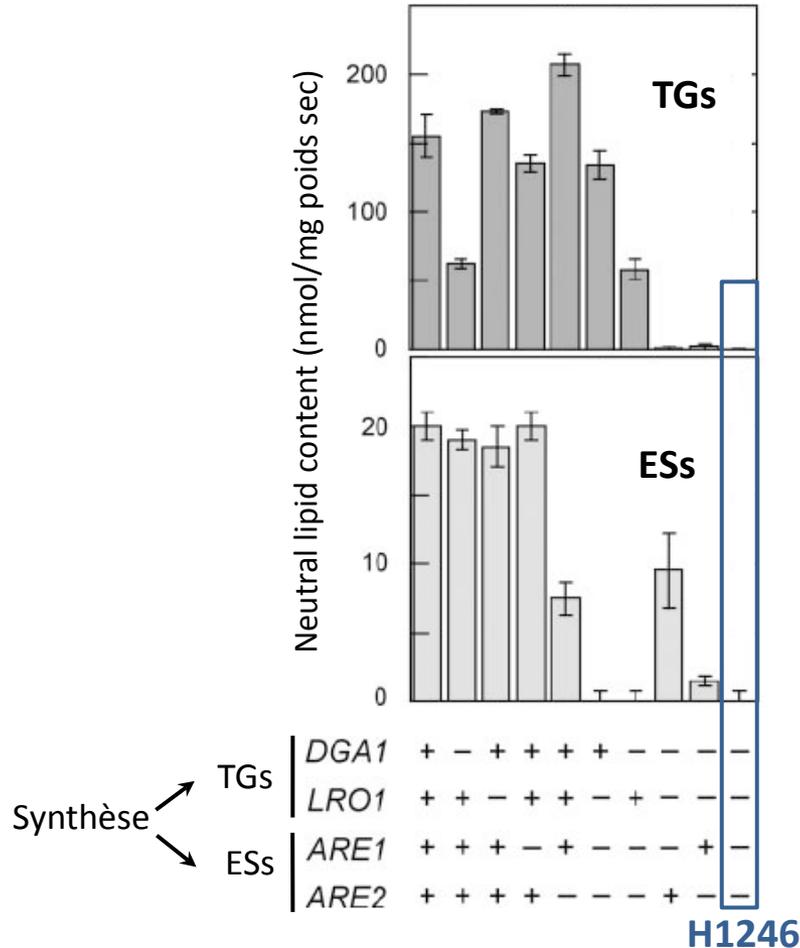


Modèle de bourgeonnement des corps lipidiques (Yen *et al.*, 2008)

Expression hétérologue chez le quadruple mutant H1246 de *S. cerevisiae*

Souche H1246 incapable de catalyser l'étape finale de synthèse des TGs et des esters de stérols (ES), dépourvue de corps lipidiques

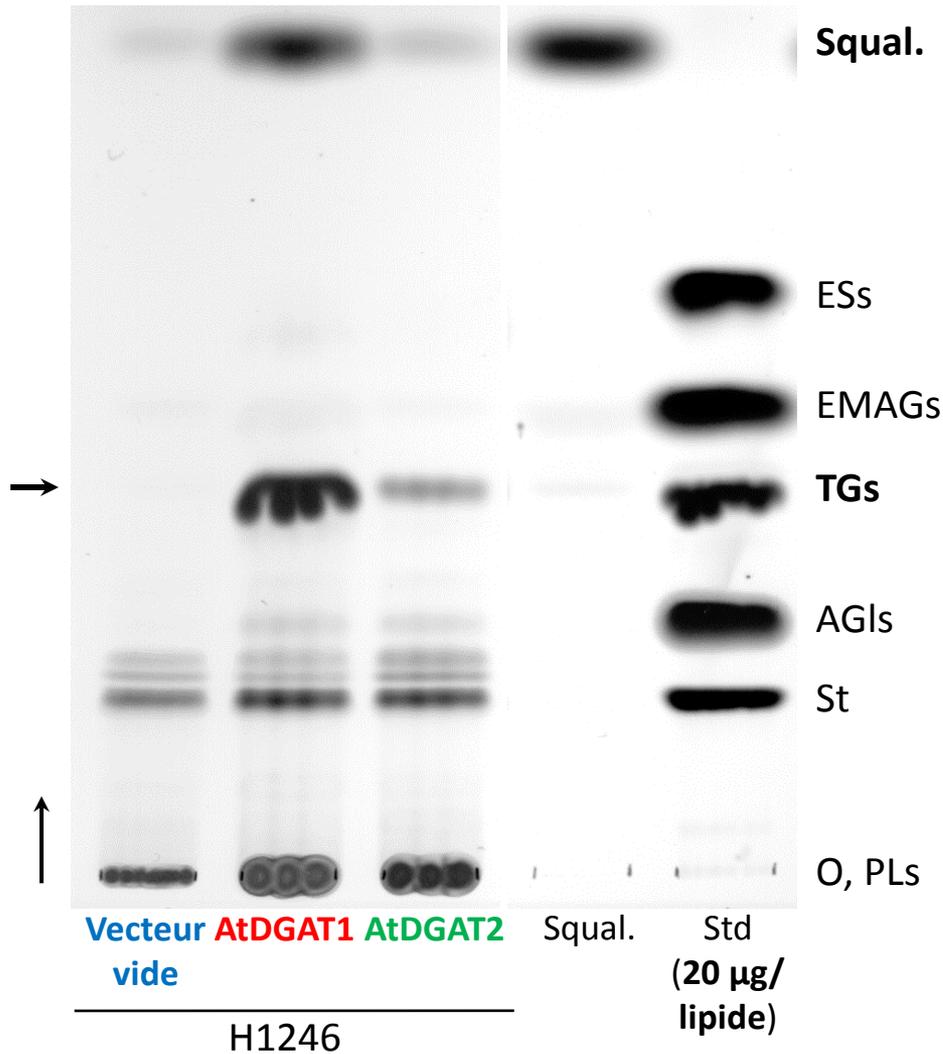
Contenu en lipides neutres des souches sauvage, simple, double, triple et quadruple mutantes



II) Étude fonctionnelle de DGATs d'*Arabidopsis thaliana* par
expression en levure

Complémentation fonctionnelle de la souche H1246 par AtDGAT2 ou AtDGAT1

Séparation des classes de lipides totaux par TLC

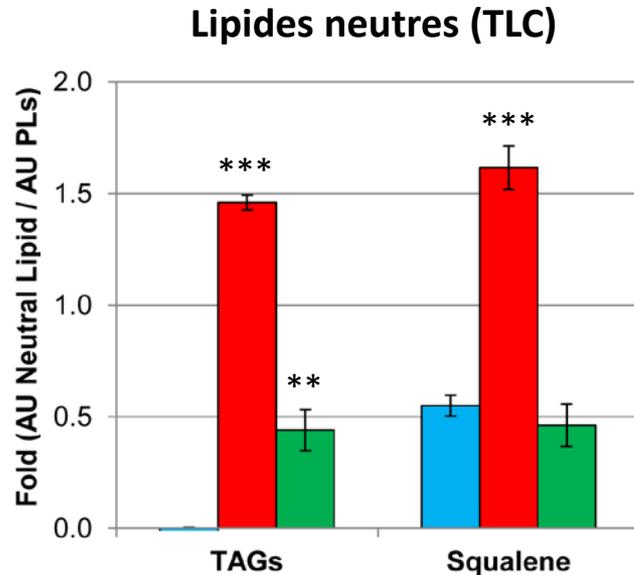


- Cultures de levures induites puis lyophilisées
- Extraction des lipides totaux par la méthode de Folch *et al.*, 1957
- Prémigration au $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1/1 (v/v) d'une plaque TLC Silica gel 60 (feuille d'aluminium, Merck)
- Dépôt manuel de **2 mg** de poids sec
- Développement par double migration : éther de pétrole/ éther diéthylique / acide acétique 50/50/2 (v/v/v) et éther de pétrole/ éther diéthylique 49/1 (v/v) à 7 et 12 cm de la ligne de dépôt
- Coloration à l'acide phosphomolybdique 5% (m/v) et incubation 30 min à 100°C

Std, standard; O, dépôt; PL, phospholipide; St, stérol;
AGI, acide gras libre; EMAG, ester méthylique d'AG;
Squal., squalène

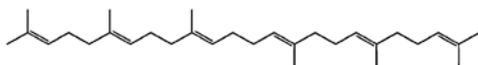
Quantification par densitométrie et analyse des AG des tâches de TGs

- H1246 + Empty vector
- H1246 + AtDGAT1
- H1246 + AtDGAT2

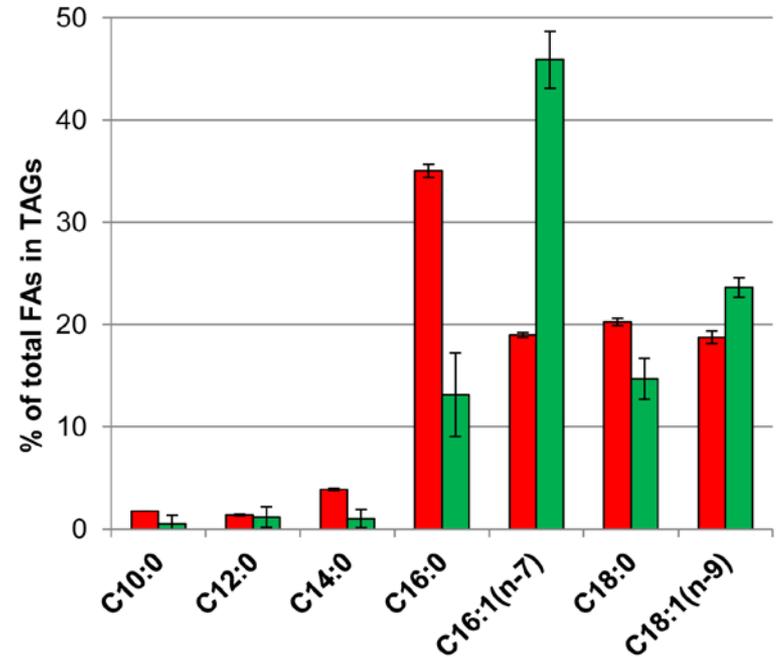


PLs (Phospholipides) : "standard interne"

- Biosynthèse des TGs restaurée par **AtDGAT1** ou **AtDGAT2**
- **AtDGAT1** : accumulation de **squalène**



Acides gras des TGs (GC-FID)



Incorporation préférentielle au sein des TGs :

- **AtDGAT1** : **C16:0** et **C18:0**
- **AtDGAT2** : **C16:1** et **C18:1**

II) Production d'une huile microbienne enrichie en acides gras à chaînes moyennes par la DGAT d'un arbre tropical

Analyse comparative de l'activité de DGATs aux spécificités de substrat contrastées chez la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*

Analyse exploratoire « **Data/text mining** » à la recherche de DGATs aux spécificités contrastées :

- **DGAT1-1** d'*Elaeis guineensis* : enzyme **putative**, gène exprimé lors de l'incorporation de C12:0 dans l'**albumen** (Dussert *et al.*, 2013)
- **DGAT1** d'*A. thaliana* incorporant des chaînes longues et insaturées (C18:1 et de C20:1, Katavic *et al.*, 1995), témoin positif [activité démontrée chez la levure (Bouvier-Navé *et al.*, 2000)]



A. thaliana
Arabette



E. guineensis
Palmier à huile



Albumen (huile de palmiste, riche en C12:0)

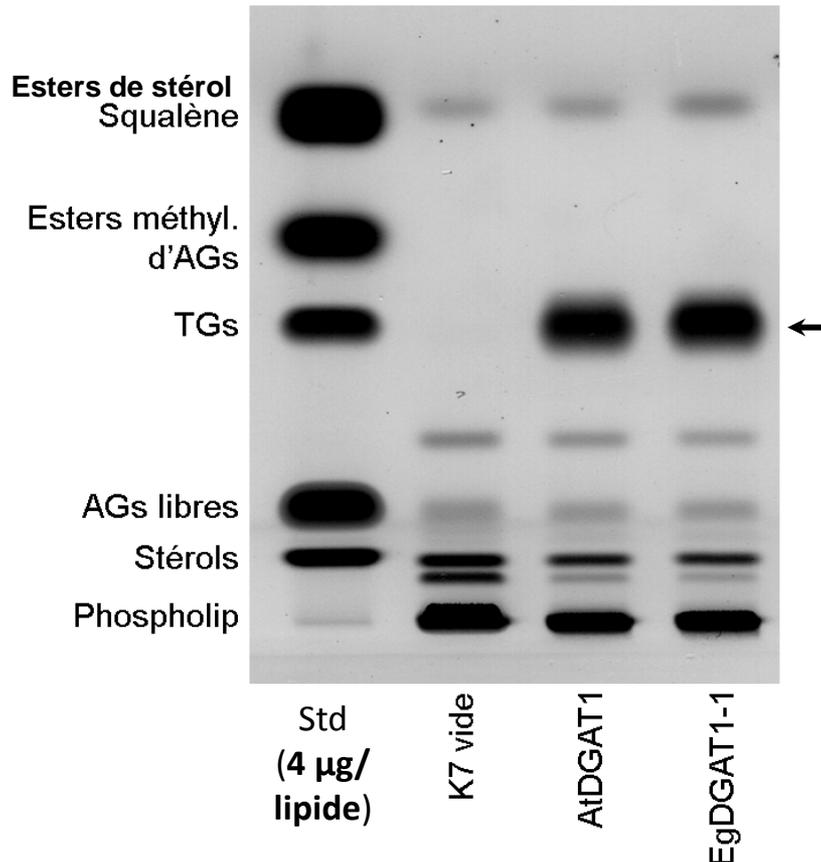
Mésocarpe (huile de palme, riche en C16:0)

Surexpression chez *Y. lipolytica* [collaboration équipe BIMLip (INRA Grignon)] :

Intégration des séquences codantes **dans le génome** de la souche mutante **Q4** (Beopoulos *et al.*, 2012) **ne produisant plus de TGs** ($\Delta dga1 \Delta lro1 \Delta dga2 \Delta are1$)

Complémentation fonctionnelle de la souche Q4 par AtDGAT1 ou EgDGAT1-1

Séparation des classes de lipides totaux par HPTLC



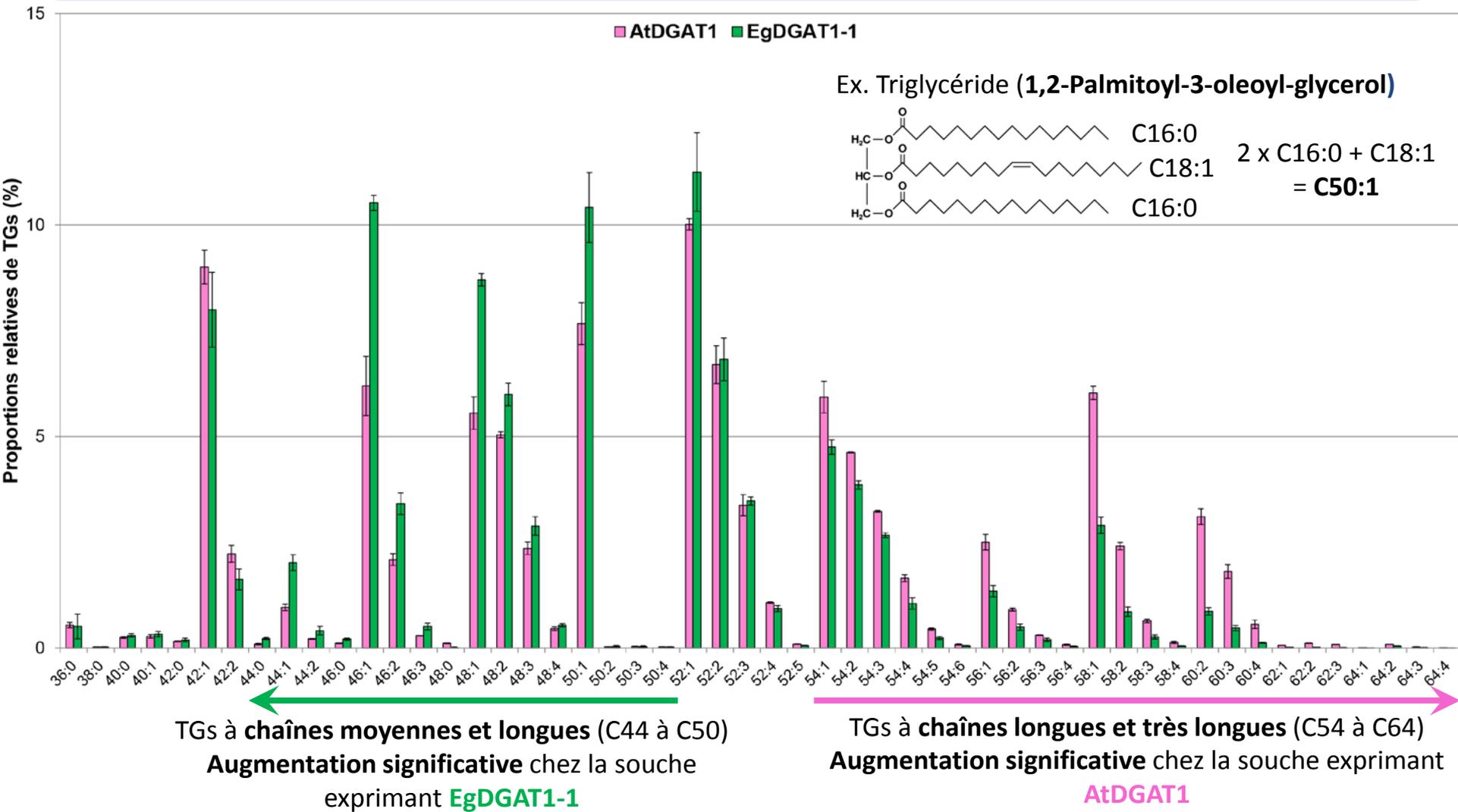
Biosynthèse des TGs rétablie par
AtDGAT1 ou **EgDGAT1-1**

- Cultures de levures puis lyophilisation
- Extraction des lipides totaux par la méthode de Folch *et al.*, 1957
- Prémigration à l'isopropanol d'une plaque TLC Silica gel 60 (en verre, Merck)
- Dépôt automatique (CAMAG TLC sampler ATS3) de **0,4 mg** de poids sec
- Développement automatique (CAMAG developing chamber ADC2) : hexane/ éther diéthylique/ acide acétique 80/20/2 (v/v/v)
- Coloration à l'**acide phosphomolybdique** 5% (m/v) et incubation 30 min à 100°C (sensibilité = 0,2 µg)

→ L'HPTLC permet de diviser par 5 la quantité de lipides déposée

Étude comparative des spécificités de substrat des 2 DGATs en présence de C12:0

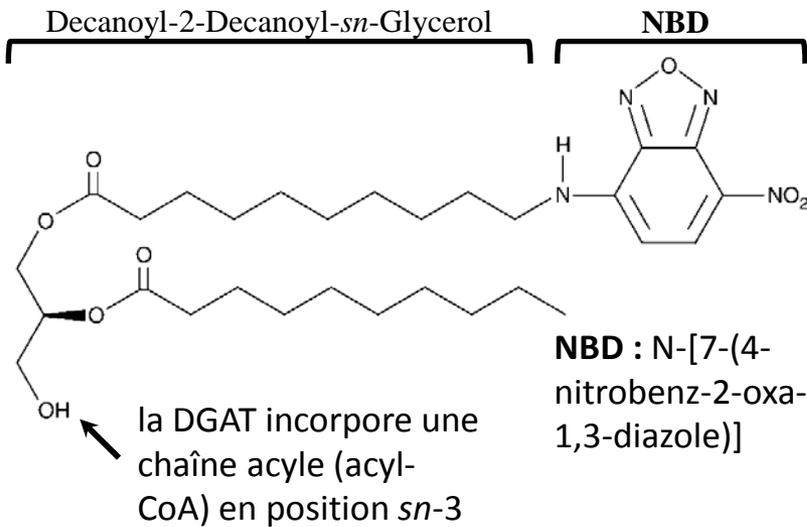
Y. lipolytica est capable d'extraire des lipides de son milieu de culture (Papanikolaou *et al.*, 2002)
 → culture sur milieu YP-C12:0 et étude comparative de la composition des TGs en UPLC-MS/MS



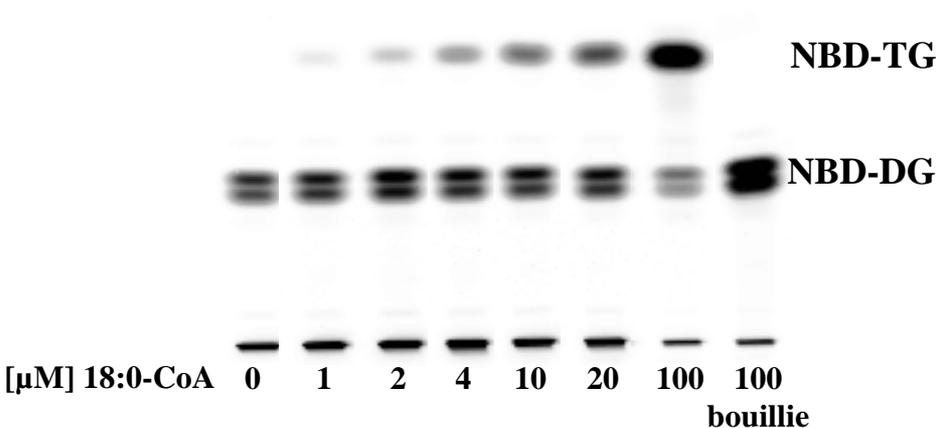
III) Caractérisation de la spécificité d'une DGAT de levure

Test d'activité *in vitro* sur une DGAT de levure purifiée

Un substrat fluorescent, le NBD-Diacylglycérol (20:0)

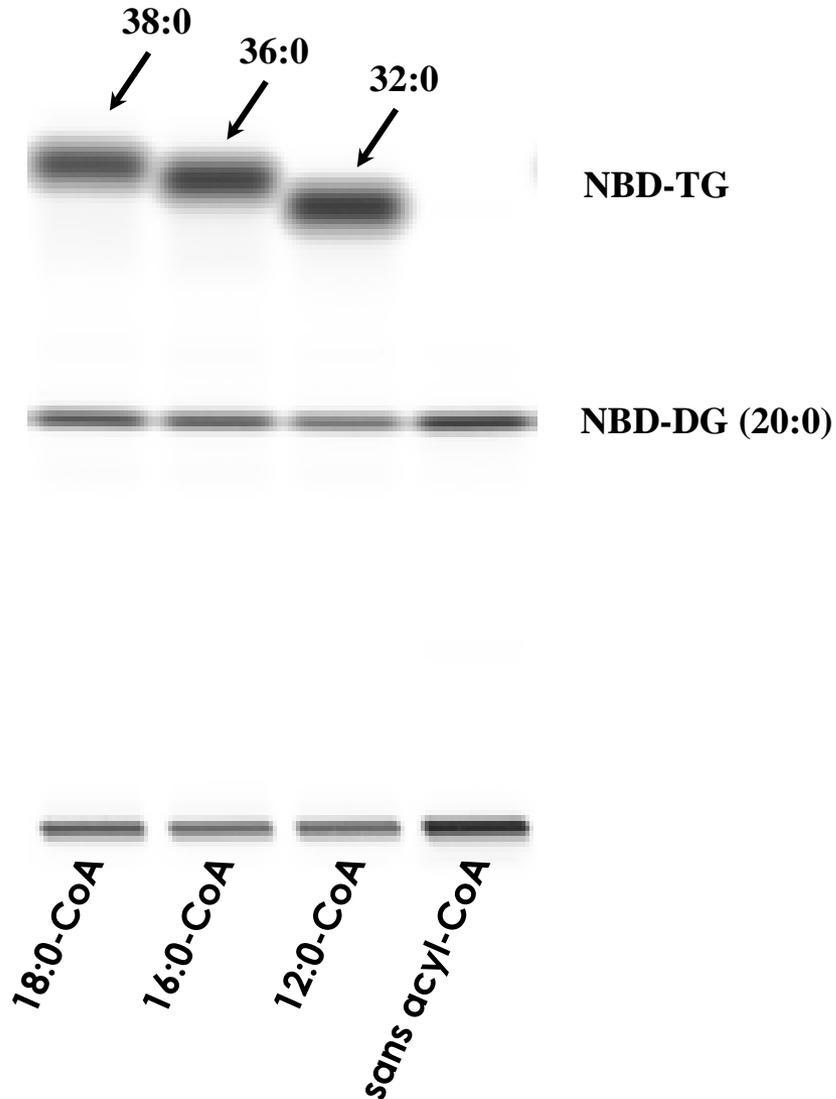


Séparation des substrats et produits de la réaction par HPTLC



- Test d'activité DGAT selon Sanderson *et al.*, 2012 avec modifications : 8 μ g de protéine purifiée, 100 μ M de NBD-DG, 0-100 μ M d'acyl-CoA en tampon HEPES 100 mM, incubation 1h à 30°C
- Extraction des lipides par la méthode de Folch *et al.*, 1957
- Prémigration à l'isopropanol d'une plaque TLC Silica gel 60 (en verre, Merck)
- Dépôt automatique (CAMAG TLC sampler ATS3) d'une fraction des lipides (1/13^e)
- Développement automatique (CAMAG developing chamber ADC2) : éther diéthylique/ hexane/ méthanol/ acide acétique 60/40/5/1 (v/v/v)
- Visualisation de la fluorescence par excitation avec le laser 473 nm d'un Typhoon multi-purpose imager (GE Healthcare) (**sensibilité = 5 ng**)

Variation de migration du TG en fonction de la longueur de chaîne totale



Conclusion générale

Au laboratoire, l'**HPTLC** a contribué à

- **caractériser finement la fonctionnalité** de 5 DGATs
- mettre en place **un test d'activité *in vitro* non radioactif** simple et rapide
- Publications : **4 articles** sont publiés (3) ou en cours de soumission (1) sur les 3 dernières années

Autres applications courantes de l'**HPTLC** au laboratoire:

Séparation de phospholipides de plantes, séparation des lipides et pigments de microalgues

Remerciements

Institut Jean-Pierre Bourgin:

- Directeur de thèse : T. Chardot
- Équipe de « Dynamique et structure des corps lipidiques »
- Équipe « Développement et qualité des graines » : S. Baud, B. Dubreucq, M. Miquel



Plateforme :

J. Bertrand-Michel [lipidomique (Toulouse)]

