

Titre : Importance des métabolites secondaires en santé des plantes: une diversité des modèles et un challenge technologique

Speaker : Aurélie Seassau

UMR Institut Sophia Agrobiotech (INRAE, CNRS, UCA), 400 Route des Chappes, BP167, 06903 Sophia Antipolis

Biographie :

Aurélie Seassau est diplômée l'Ecole Supérieure d'Ingénieur de Luminy en 2007 (ESIL, polytech Marseille). Ses précédentes expériences en biochimie, lui ont permis d'être recrutée en 2008 à l'INRAE en tant qu'Ingénieur d'Etudes pour créer et animer un plateau de Biochimie Analytique (PtBA). Depuis elle met à disposition des équipes de recherches les équipements (LC, LCMS, Biacore) et ses compétences en protéomique (*caractérisation et identification de protéines, études de modifications post-traductionnelles, quantification*) et en métabolomique (*identification de métabolites secondaires de plantes, profiling*). Elle a été proactive pour ouvrir le PtBA à des utilisateurs privés et académiques externes à l'unité. Elle veille à maintenir la compétitivité de PtBA avec l'arrivée d'un Assistant Ingénieur en 2016, et le renouvellement de la LC/HRMS (arrivée programmée pour juin 2021). Conjointement à ses activités, elle organise des événements autour de la protéomique « Ecole-chercheur », « journée ProtéoPACA ». Elle s'est investie dans la structuration de l'unité avec à la mise en place de la plateforme PlantBIOs (Infrastructure Scientifique Collective - label INRAE), ainsi que de celui des plateformes de métabolomique et protéomique de PACA-EST (PF-CAPABIO, prélabélisation IBISA). Enfin depuis 9 ans, elle dispense des enseignements de protéomique à l'école d'ingénieur Polytech'Sophia et à l'Université de Nice Sophia Antipolis.

Abstract :

Le plateau de biochimie analytique (PtBA) de la plateforme multisites CAPABIO UCA, présentera une partie de ses activités en métabolomique au travers de 3 analyses de métabolites secondaires de plantes et de champignon.

Les plantes cultivées sont en interaction permanente avec leur environnement qui représente une intégration complexe de mécanismes bénéfiques ou défavorables ayant un impact sur le développement et les rendements. On classe les paramètres défavorables en 2 catégories : les stress abiotiques (température, sécheresse, salinité, nutrition...) et les stress biotiques (agents pathogènes, ravageurs ...). Pour faire face à ces stress, les plantes disposent de moyens de défenses ou d'adaptation avec par exemple la production de métabolites secondaires. Des micro-organismes associés aux plantes (rhizosphère, phyllosphère) peuvent également contribuer à ces mécanismes de défense en sécrétant des métabolites capables d'éloigner les ravageurs ou de limiter les maladies voire de participer ou stimuler le développement (symbioses, Plant Growth Promoting agents). L'usage de mécanismes naturels afin d'améliorer la protection des cultures est regroupé sous le vocable biocontrôle. L'Institut Sophia Agrobiotech est leader au niveau national dans ce domaine. La compréhension de ces mécanismes naturels passe par l'identification, la quantification et la caractérisation des molécules impliquées et dans le contexte de cette présentation de métabolites secondaires. Les couplages LC/HRMS sont des outils de choix pour l'étude de ces molécules. **La 1ere étude** concerne la défense constitutive des plantes et a pour objectif de montrer comment les conditions environnementales, de culture (eau, azote, salinité) font varier la teneur en certains métabolites de défenses comme les glycoalcaloïdes. Ces métabolites sont connus pour leurs propriétés antifongiques, antibactériennes et de défense contre différents insectes herbivores. Une approche ciblée de quantification relative a permis de mesurer le niveau de production de ces

glycoalcaloïdes foliaires chez 2 variétés de tomate en fonction du niveau d'irrigation, de fertilisation, et de salinité. **Une 2^{ème} étude**, sur la défense induite lors de l'interaction avec un oomycète phytopathogène, vise à comprendre les mécanismes enzymatiques mis en jeu par la plante pour stocker et déstocker une phytohormone majeure régulant la résistance (l'acide salicylique). Pour cela une approche ciblée, d'identification et de quantification de cette phytohormone et de ses conjugués glycosylés de stockage (SAG et SGE) a été mise en place. Enfin **la dernière étude**, illustrera le procédé mis en œuvre pour l'identification de nouvelles molécules naturelles de type biopesticide secrétées par des champignons. Ce processus fait appel à de la purification bioguidée couplée à de l'identification par spectrométrie de masse qui nécessite également de l'élucidation structurale par RMN en collaboration avec la PF de l'ICN.

Mots clefs : Spectrométrie de masse, métabolomique ciblée, identification, quantification, métabolites secondaires, plantes, champignons, défense des plantes

Références bibliographiques (3 max):

- P. Han & al (Journal of Chemical Ecology, 2016). Does plant cultivar difference modify the bottom-up effects of resources limitation on plant-insect herbivore interaction?
- P. Han, et al. (Scientific Reports, 2016). Increased water salinity applied to tomato plants accelerates the development of the leaf miner *Tuta absoluta* through bottom-up effects
- D. Bowles & al (The Annual Review of Plant Biology, 2006). Glycosyltransferases of Lipophilic Small Molecules

Plateau de Biochimie Analytique : PtBA de l'Infrastructure Scientifique PlantBIOS

Métabolomique et Protéomique

Le [plateau de biochimie analytique](#) (PtBA) de [l'Institut Sophia Agrobiotech](#) (ISA) est une des cinq composantes de l'Infrastructure Scientifique Collective [PlantBIOS](#) : **Biocontrôle et Biostimulation des Plantes, Equipements et Expertise**, certifiée Infrastructure Scientifique Collective par INRAE. Les thématiques de recherche de l'ISA s'inscrivent dans le domaine de la santé des plantes et de l'environnement : Etude des interactions entre plantes et organismes nuisibles ou bénéfiques, étude de la dynamique des populations d'insectes, écologie chimique, ingénierie agroécologique, etc. Ces différents items font partie du biocontrôle, stratégie visant à utiliser des produits, organismes ou mécanismes naturels pour protéger les cultures contre des organismes nuisibles.

Le PtBA est spécialisé dans l'analyse des protéines et métabolites secondaires par spectrométrie de masse et propose expertise et équipements associés pour répondre en priorité aux enjeux scientifiques précédents.

La plateforme dispose :

- **d'un couplage UHPLC-HRMS** : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) combinant micro et nano débits (Ultimate 3000 RSLC - NCS, Thermo) en couplage avec un spectromètre de masse haute résolution (ESI microTOF QII, Bruker Daltonic).
- **d'une chromatographie liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) munie d'un détecteur DAD et d'un détecteur ELSD**, non couplée au spectromètre de masse, pour des adaptations de méthodes et l'analyse de routine de protéines entières et de métabolites (métabolites secondaires, acides aminés, sucres...), (Nexera X2 - Shimadzu, Sedex 90- SEDERE).

Le PtBA réunit 3 agents, un assistant ingénieur (Marc Magliano), une ingénieure d'étude (Aurélie Seassau) et un chargé de recherche (Michel Ponchet).



Domaines d'expertises

Le ptBA propose son expertise en protéomique, métabolomique et préparation d'échantillons.

- **En protéomique**, les applications proposées en routine sont :

- Identification de protéines (après digestion enzymatique) à partir de gel SDS PAGE ou d'échantillons complexes.
- Quantification relative et sans marquage de protéines (après digestion enzymatique). Comparaison d'une ou plusieurs conditions. Approche ciblée ou non ciblée.
- Recherche, identification et localisation dans les séquences de modifications post traductionnelles (acétylation, méthylation, S-nitrosylation, S-gluthationylation ...)
- Analyse de protéines entières natives ou recombinantes (contrôle, mesure de masse exacte, appariement de ponts dissulfure).

- **En métabolomique**, les applications proposées en routine sont :

- Identification de métabolites secondaires de manière ciblée (glycoalcoïdes, cardénolides, phytohormones, tiophènes, composés phénoliques...) et non ciblée (traitement statistique). Si de l'élucidation structurale s'avère nécessaire, elle se fait en partenariat avec la Plateforme Technologique de l'Institut de Chimie de Nice PFTC-CAPABIO).
- Quantification relative et sans marquage de métabolites secondaires

- **Pour la préparation d'échantillon**, nous apportons nos conseils et pouvons également prendre en charge certaines des étapes (selon des protocoles préalablement établis avec les utilisateurs) :

- Réduction, alkylation, digestion enzymatique des échantillons protéiques sur gel ou en liquide.
- Décomplexification des échantillons protéiques sur phase inverse par exemple.
- Extraction des métabolites secondaires (extraction en solvant, décomplexification SPE sur phase inverse).

A noter que d'autres types d'analyses (non listées) sont possibles sur demande.

Les analyses peuvent être effectuées en mode MS et MSMS. Selon la complexité des échantillons, les analyses s'effectuent en infusion (introduction directe dans le spectromètre de masse) ou en couplage LC-MS. Dans le cadre du couplage nous disposons de différentes colonnes LC à adapter en fonction de la nature des échantillons (C18, CN, C8, HILIC).

Concernant l'exploitation des données LC-MS, nous utilisons (i) **en protéomique** les interrogateurs de séquence Mascot (serveur en local et donc possibilité d'intégrer et d'interroger des banques de données personnalisées sans limite de taille), les logiciels de retraitement Bruker (data analysis, proteinScape...), Maxquant, Perseus ... et (ii) **en métabolomique** les logiciels MetaboScape (Bruker), Metfrag ...

Les matrices travaillées et analysées sur le plateau sont par exemple des extraits de plantes, de micro-organismes (nématodes, oomycètes, champignons, bactéries) et d'insectes.

Implication de la Plateforme : de la conception à la valorisation

Le PtBA travaille en collaboration avec les équipes de recherche de l'Institut, des utilisateurs extérieurs académiques et privés. Le PtBA réalise également des prestations de service.

Dans les projets, le PtBA intervient à différents niveaux :

- dans la conception du projet en proposant nos outils et notre savoir-faire ainsi qu'en orientant vers d'autres PF spécialisées si besoin,
- dans l'élaboration du *design* expérimental en proposant des expériences en adéquation avec la problématique posée et les performances de l'appareil (réplicats, type d'échantillon, contrôle expérimentaux, type d'analyse, quantification, identification ...),
- dans la préparation des échantillons, la réalisation des analyses LC-MS et le retraitement des données obtenues. Nous proposons des pré-études afin d'évaluer la faisabilité, d'effectuer les mises au points et les adaptations ou développement méthodologique nécessaires. Dans certains cas (besoin particulier, stagiaires, demande de l'utilisateur ...), le PtBA peut initier l'utilisateur au retraitement des données sur les logiciels du plateau,
- dans la valorisation des résultats en participant à l'écriture des publications.

Le PtBA privilégie une discussion préalable avec les utilisateurs en amont des projets et expérimentations pour aider à la réflexion ainsi que tout au long du projet et des analyses pour répondre au mieux aux attentes de l'utilisateur jusqu'à la restitution des résultats. Pour chaque projet ou demande d'analyse, un rapport d'analyse reprenant les conditions expérimentales et les résultats est fourni et expliqué si nécessaire.

En moyenne le plateau de biochimie analytique participe annuellement à une dizaine de projets, protéomique et métabolomique confondus et d'envergure différente (de l'analyse de contrôle au projet d'envergure). Cela représente environ 1500 injections LC-MS, 6 équipes/labo utilisateurs et une occupation machine variant entre 50% et 60 % (hors retraitement des données). Le plateau a depuis quelques années une occupation machine quasiment équivalente entre la protéomique et la métabolomique.

Exemples d'études et résultats

- **Protéomique ciblée: Etude de modifications post traductionnelles**

Dans le cadre de la symbiose fixatrice d'azote, le plateau a pu contribuer à comprendre la régulation et l'implication de la glutathion peroxidase Gpx1 dans les voies de signalisation liées au stress oxydatif chez la luzerne. Pour cette étude le PtBA a identifié et localisé par spectrométrie de masse les sites **de S-nitrosylation et de S-glutathionylation** de cette protéine. La préparation des échantillons a été mise au point avec l'équipe de recherche par l'utilisation de la technique de *biotin switch*. L'analyse par spectrométrie de masse de cette protéine a révélé que 3 cystéines libres (thiols) peuvent être différemment modifiées par S-nitrosylation ou S-glutathionylation. Le PtBA s'investit actuellement dans un nouveau projet où il est question d'identifier et quantifier des protéines différemment **glutathionylées** chez 2 souches bactériennes fixatrices d'azote. L'objectif est de

caractériser de nouvelles protéines glutathionylées impliquées dans la différenciation de la bactérie en bactéroïde, étape clef de la symbiose fixatrice d'azote. **[projet INRAE]**. D'autres analyses ont porté sur la localisation de site de glycosylation sur une protéine *mucin-like* impliquée dans la formation de biofilm de l'oomycète *Phytophthora parasitica*, ou encore sur la localisation de site de **méthylation et acétylation** sur les histones du nématode *Meloidogyne incognita*.

C. Castella & al (Nitric oxide, 2017). Post-translational modifications of Medicago truncatula glutathione peroxidase 6 by nitric oxide

M. Larousse & al (Protist, 2014). Characterization of PPMUCL1/2/3, Three Members of a New Oomycete-specific Mucin-like Protein Family Residing in Phytophthora parasitica Biofilm.

- **Protéomique non ciblée : Identification et quantification relative de protéines de tomates**

L'utilisation de la résistance induite chez les plantes est une alternative aux traitements phytosanitaires conventionnels. Les études du « full » transcriptome, du protéome soluble et du métabolome secondaire menées en parallèle aident à comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance induite.

Sur le modèle tomate, nous avons pu identifier par LC-MS 200 protéines dont 50 sont différenciellement accumulées après induction de la résistance (protéines de défense et protéases). L'analyse des métabolites secondaires a permis de mettre en évidence l'accumulation de conjugués connus pour leur activité antifongique (feruloylputrescine, feruloylagmatine...). La biosynthèse de ces molécules requiert deux voies métaboliques distinctes, ce qui implique la mobilisation coordonnée de dizaines d'activités enzymatiques (gènes). L'originalité de cette étude était de combiner des résultats de transcriptomique, de protéomique et de métabolomique sur un même matériel biologique de départ afin de mettre en lien ces approches omiques.

Poster : Intérêt des approches protéomique et métabolomique pour la caractérisation de la résistance induite chez la tomate. A. Seassau & al (Janvier 2014, JJC, Aussois)

BABA-induced resistance to pathogens: the multi-omics analysis of tomato response emphasizes a hyper-receptive status strongly involving ethylene (to be submitted)

- **Métabolomique ciblée : Identification et quantification relative de glycoalcaloïdes chez la tomate**

Ces métabolites secondaires connus comme composés de défense ont été étudiés chez deux variétés de tomates soumises à herbivorie dans différentes conditions abiotiques (variation de l'apport d'azote, d'eau et de sel). L'analyse par LCMS du contenu en 3 glycoalcaloïdes (tomatine, tomatidine et déhydrotomatine) chez la tomate entre les différents traitements a permis de démontrer que 1) la quantité de ces glycoalcaloïdes augmentait dans des conditions limitantes (diminution de l'irrigation + stress salin); 2) les variations de glycoalcaloïdes selon les conditions abiotiques sont cultivar-dépendantes. De plus, les modulations de concentration de ces composés de défense dans les feuilles pourraient expliquer en partie les effets *bottom-up* identifiés sur les herbivores consommant ces plantes exposées aux diverses conditions abiotiques. **Projet Région et Européen**

P. Han & al (Journal of Chemical Ecology, 2016). Does plant cultivar difference modify the bottom-up effects of resources limitation on plant-insect herbivore interaction?

P. Han, et al. (Scientific Reports, 2016). Increased water salinity applied to tomato plants accelerates the development of the leaf miner Tuta absoluta through bottom-up effects

- **Métabolomique non ciblée : Identification et quantification de molécules actives à partir d'exsudats racinaires**

Ce projet a pour objectif d'identifier les molécules sécrétées par les racines d'une « plante de service », l'œillet d'Inde, qui seraient responsables d'une réduction du niveau d'infection des plantes cultivées par les nématodes phytoparasites. Pour ce projet, nous avons mis au point avec l'équipe de

recherche le protocole de préparation des échantillons à partir de la rhizosphère. Nous travaillons actuellement sur l'identification et la quantification différentielle par spectrométrie de masse de ces molécules d'intérêts agronomiques. **Projet INRAE metaprogramme SumCrop « MultiServ » (2020-2022).**

Publications

- Castella C, Mirtziou I, Seassau A, Boscaro A, Montrichard F, Papadopoulou K, Rouhier N, Puppo A, Brouquisse R. Post-translational modifications of *Medicago truncatula* glutathione peroxidase 1 induced by nitric oxide. **Nitric Oxide**. 2017 Aug 1;68:125-136. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.004
- Rodiuc N, Barlet X, Hok S, Perfus-Barbeoch L, Allasia V, Engler G, Seassau A, Marteu N, de Almeida-Engler J, Panabières F, Abad P, Kemmerling B, Marco Y, Favory B, Keller H. Evolutionarily distant pathogens require the Arabidopsis phytoalexin signalling pathway to establish disease. **Plant Cell Environ**. 2016 Jul;39(7):1396-407. doi: 10.1111/pce.12627.
- Han P, Desneux N, Michel T, Le Bot J, Seassau A, Wajnberg E, Amiens-Desneux E, Lavoit AV. Does Plant Cultivar Difference Modify the Bottom-Up Effects of Resource Limitation on Plant-Insect Herbivore Interactions? **J Chem Ecol**. 2016 Dec;42(12):1293-1303.
- Han P, Wang ZJ, Lavoit AV, Michel T, Seassau A, Zheng WY, Niu CY, Desneux N. Increased water salinity applied to tomato plants accelerates the development of the leaf miner *Tuta absoluta* through bottom-up effects. **Sci Rep**. 2016 Sep 13;6:32403. doi: 10.1038/srep32403.
- Larousse M, Govetto B, Seassau A, Etienne C, Industri B, Theodorakopoulos N, Deleury E, Ponchet M, Panabières F, Galiana E. Characterization of PPMUCL1/2/3, three members of a new oomycete-specific mucin-like protein family residing in *Phytophthora parasitica* biofilm. **Protist**. 2014 May;165(3):275-92. doi: 10.1016/j.protis.2014.03.003.
- Baron OL, van West P, Industri B, Ponchet M, Dubreuil G, Gourbal B, Reichhart JM, Coustau C. Parental transfer of the antimicrobial protein LBP/BPI protects *Biomphalaria glabrata* eggs against oomycete infections. **PLoS Pathog**. 2013;9(12):e1003792. doi: 10.1371/journal.ppat.1003792.

Tarifification et contact

Le PtBA dispose d'une politique de tarification à plusieurs niveaux selon que vous dépendiez d'un laboratoire académique ou privé. Cette tarification est adaptée à la nature de votre projet (identification, quantification, contrôle ...) ainsi qu'au type de partenariat souhaité (collaboration à prestation de service). Le PtBA propose également une tarification sous forme de forfait développement/étude de faisabilité en fonction de votre questionnement et des mises au point nécessaires.

Responsable

Aurélié Seassau
Ingénieur d'étude
Institut Sophia Agrobiotech,
INRAE PACA, CNRS, UCA
Plateau de Biochimie Analytique (ISC PlantBIOs)
400 route des chappes, 06903 Sophia Antipolis cedex, BP 167
☎ : +33 (0)4 92 38 64 29
✉ aurelie.seassau@inrae.fr

Financements

