

Métabolites secondaires dans le mécanisme de défense des plantes

Analyse HPLC-MS/MS de jasmonates

Introduction :

Les plantes doivent pouvoir réagir aux variations climatiques, au rythme du jour et de la nuit, à l'offre en eau et en substances nutritives et aux attaques des insectes. Voilà pourquoi elles ont besoin d'un réseau de substances régulatrices, les phytohormones, qui leur permettent de réagir au stress biotique et abiotique grâce à des actions parfaitement adaptées les unes aux autres, mais aussi de déclencher des processus spécifiques à leur développement. Cet article présente une méthode d'analyse extrêmement sensible en vue de la détermination quantitative de phytohormones. Les principaux représentants des hormones végétales sont l'acide jasmonique (JA), les cytokines, les auxines, l'acide abscissique, l'acide salicylique, les gibbérellines et les strigolactones.

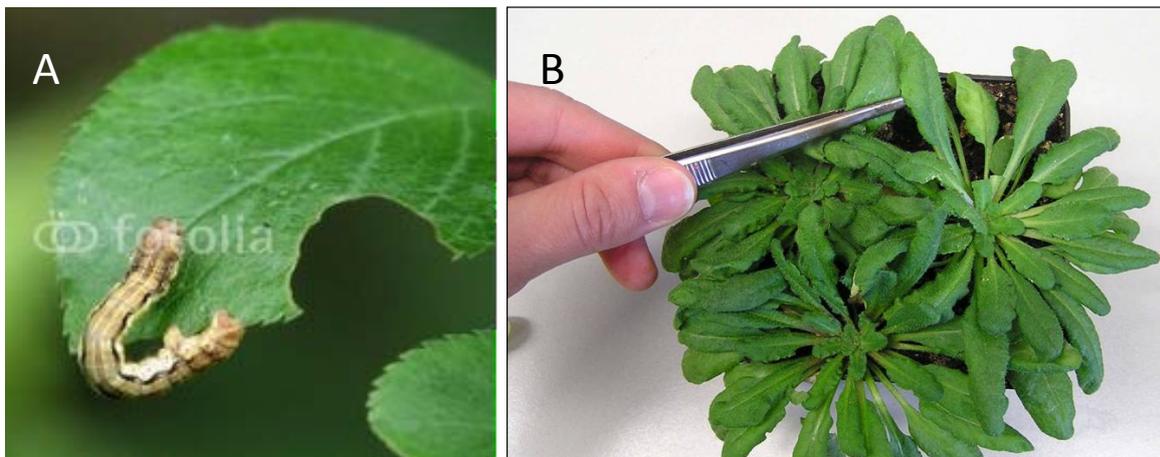


Fig. 1 : Des dommages causés sur la feuille par des insectes broyeur ou suceurs (A) induisent la biosynthèse de l'acide jasmonique qui sert de signal de blessure. Il est possible de simuler les dégâts causés par les insectes en blessant les feuilles de manière mécanique (B). Ce stimulus entraîne également une accumulation d'acide jasmonique dans les feuilles. (photo A : © Michael Martini - Fotolia.com, photo B : département de biochimie végétale, Albrecht-von-Haller-Institut, Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne).

La phytohormone JA joue un rôle essentiel entre autres en tant que signal de blessure dans le mécanisme de défense contre les insectes broyeur. Les insectes broyeur ou suceurs (**fig. 1**) induisent l'activation de la biosynthèse de JA dans la feuille et par conséquent l'accumulation de JA. Tous les dérivés de JA qui sont

formés par méthylation, glycosylation, hydroxylation ou estérification avec des acides aminés sont regroupés sous le terme de jasmonates. La jasmonyl-isoleucine (JA-Ile), qui est un dérivé estérifié avec l'isoleucine (un acide aminé), joue un rôle particulier. La JA-Ile représente la forme biologiquement active de la phytohormone (Wasternack et Hause, 2014). Elle déclenche diverses réactions de défense, telles que la production de substances localement toxiques ou inhibant la digestibilité. En cas d'attaque par des insectes, les plantes peuvent donc synthétiser des inhibiteurs de protéinase qui perturbent la digestion de la matière végétale ingérée par les insectes (Wasternack et Hause, 2014). Par ailleurs, des substances volatiles telles que le jasmonate de méthyle sont également libérées afin d'attirer les prédateurs des insectes présents sur les plantes, par exemple des animaux ou d'autres insectes prédateurs (Kessler et Baldwin, 2001). De plus, les jasmonates peuvent aussi représenter un signal mobile destiné à mettre les parties non touchées de la plante dans un état d'alerte accru destiné à activer les mécanismes de défense (Glauser *et al.*, 2008).

Toutefois, il est important pour la plante que les mécanismes de défense soient limités dans le temps étant donné que ce processus énergivore freine sa croissance et diminue sa capacité d'adaptation à d'autres situations de stress. La régulation de l'accumulation locale de JA et de la molécule signal biologiquement active JA-Ile exige un contrôle strict de la resynthèse, du transport et de l'élimination de ces substances. La caractérisation des substrats et des produits d'élimination du métabolisme du JA ainsi que leur quantification dans le tissu végétal blessé, stressé ou touché se trouvent donc au centre de la recherche actuelle.

Analyse HPLC-MS/MS

Pour examiner la manière dont les plantes réagissent aux blessures, il est nécessaire de réaliser une analyse extrêmement sensible, car les phytohormones ne sont présentes que dans de très faibles concentrations dans le tissu végétal (< 10 nmol/g de tissu frais). De plus, la matrice végétale est un mélange extrêmement complexe de substances, si bien qu'il est difficile de détecter et de quantifier des analytes peu abondants. La chromatographie en phase liquide à haute performance combinée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) est adaptée à ce type d'analyse complexe.

La chromatographie permet de séparer les liaisons chimiques de l'extrait de feuille dans le temps en fonction de leur structure chimique à l'aide d'une colonne de séparation. Grâce à la chromatographie en phase inverse utilisée ici, les substances sont liées à la phase stationnaire par des interactions hydrophobes et sont éluées de la colonne à l'aide du gradient croissant d'un solvant organique. La spectrométrie de masse permet ensuite de détecter les liaisons éluées. Pour identifier une liaison chimique, on utilise d'une part le temps de rétention spécifique pendant lequel une substance est éluee de la colonne de séparation et d'autre part le rapport masse/charge (valeur m/z) de la substance, qui est enregistré par le spectromètre de masse. Avec le spectromètre de masse en tandem utilisé ici en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM), la valeur m/z de la molécule déprotonée intacte ($[M-H]^-$) en relation avec la valeur m/z d'un fragment spécifique de cet ion permet d'identifier clairement la liaison chimique.

Au cours d'applications HPLC-MS, il est essentiel d'utiliser des éluants d'une grande pureté (grade LC-MS) ou de l'eau ultrapure étant donné que la sensibilité et la fiabilité de la méthode dépendent de manière significative de la pureté des éluants.

Quantification de jasmonates et de précurseurs

L'échantillon de matière congelée dans de l'azote liquide est extrait avec un système d'extraction à deux phases sur la base d'un mélange de méthyl *tert*-butyl éther, de méthanol et d'eau (Matyash *et al.*, 2008). Pour la quantification, on ajoute des étalons deutérés de phytohormones en quantités définies. Après l'extraction, la phase organique est utilisée pour effectuer l'analyse. Cette analyse est réalisée avec un système HPLC/nano-ESI-MS/MS composé d'un système HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Allemagne) combiné à un spectromètre de masse hybride triple quadripolaire/linéaire à trappe d'ions Applied Biosystems 3200 (MDS Sciex, Ontario, Canada) (Iven *et al.*, 2012). L'ionisation par nano-électrospray (nanoESI) est assurée par une source d'ions basée sur une puce (TriVersa NanoMate ; Advion BioSciences, Ithaca, NY, États-Unis) (**fig. 2**).



Fig. 2 : Système HPLC/nano-ESI-MS/MS pour l'analyse des jasmonates. Un appareil 3200 hybride triple quadrupolaire/linéaire à trappe d'ions de la société Applied Biosystems sert de spectromètre de masse. L'ionisation par nano-électrospray (nanoESI) est assurée par la source d'ions basée sur une puce TriVersa NanoMate (Advion BioSciences). Le système HPLC d'Agilent n'est pas représenté. (photo : département de biochimie végétale, Albrecht-von-Haller-Institut, Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne)

La séparation HPLC en phase inverse est effectuée avec une colonne C18 (« EC 50/2 Nucleodure C18 gravity 1,8 μm » ; 50 x 2,1 mm, taille des particules 1,8 μm ; Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) et avec un gradient de solvant binaire d'acétonitrile (Fisher Scientific, Leics, Royaume-Uni) et de l'eau ultrapure produite par le système arium pro VF TOC (Sartorius, Goettingen, Allemagne), respectivement mélangés avec 0,1 % d'acide acétique. Les espèces de phytohormones sont détectées dans le mode négatif d'ionisation par électrospray à l'aide d'un « Multiple Reaction Monitoring ». Pour la quantification, des courbes d'étalonnage sont créées sur la base des rapports d'intensité des valeurs m/z des substances non marquées par rapport aux substances correspondantes marquées du deutérium vs. les quantités molaires des substances non marquées.

Production d'eau ultrapure



Fig. 3 : *Système d'eau ultrapure Sartorius arium pro VF TOC (photo Sartorius).*

Le système arium pro VF TOC (Sartorius, Goettingen, Allemagne, **fig. 3**) a été utilisé afin de produire de l'eau ultrapure pour l'analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS. Il permet d'éliminer les contaminations encore présentes dans de l'eau potable prétraitée. La production d'eau ultrapure exige une recirculation continue de l'eau dans le système ainsi qu'un débit d'eau constant, ce qui est garanti par un système de pompe doté d'un dispositif de régulation de la pression. La conductivité de l'eau est mesurée à l'entrée de l'eau d'alimentation et à la sortie de l'eau produite. Le taux de COT (carbone organique total = ensemble du carbone lié organiquement) est contrôlé par un TOC-Monitor spécial. Le système arium pro VF TOC utilisé pour les analyses décrites ici fonctionne avec deux cartouches différentes. Ces cartouches sont remplies d'un adsorbant de charbon actif spécial et de résines échangeuses d'ions à lit mélangé qui sont en mesure de fournir de l'eau extrêmement pure avec un taux de COT inférieur à 2 ppb. De plus, une lampe UV qui a un effet oxydant et germicide grâce à des longueurs d'onde de 185 nm et 254 nm est intégrée. Le système arium pro VF TOC est également équipé d'un module ultrafiltrant qui fonctionne comme filtre de filtration tangentielle. La membrane d'ultrafiltration utilisée retient les colloïdes, les microorganismes, les endotoxines ainsi que l'ARN et l'ADN.

Lors du soutirage, un filtre final de 0,2 µm installé à la sortie de l'eau élimine les particules et les bactéries de l'eau ultrapure produite. Le procédé de production d'eau spécifique à l'appareil est représenté sur la **figure 4**.

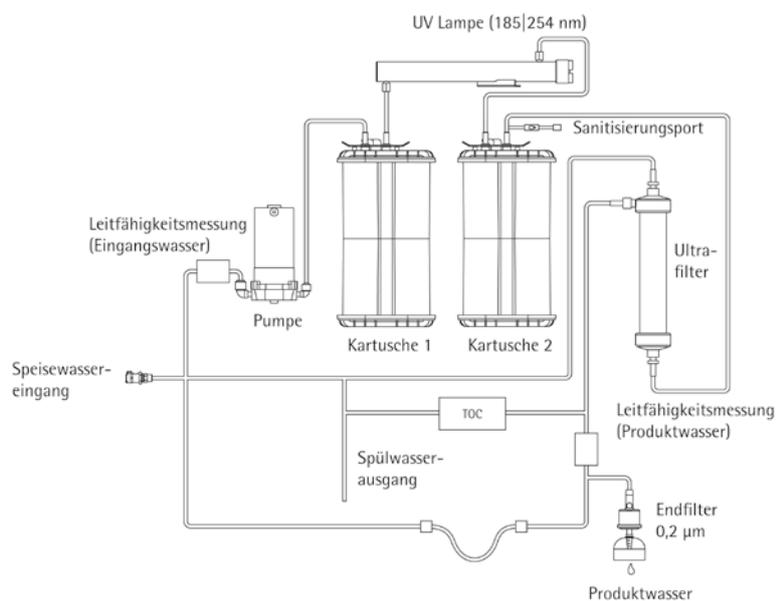


Fig. 4 : Représentation schématique du diagramme de flux du système de production d'eau ultrapure arium pro VF TOC. Pour plus de clarté, les vannes et leur système de commande ne sont pas représentés.

Pour effectuer l'analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS, on a utilisé de l'eau ultrapure avec un taux de COT < 5 ppb et une conductivité de 18,2 MΩ x cm (compensée à 25°C).

Résultats

La réaction des plantes en cas de blessure est analysée de manière intensive sur de nombreuses espèces végétales, par exemple la tomate (*Lycopersicum esculentum*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) et l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*). Pour nos analyses, nous utilisons la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. À cet effet, les rosettes d'*Arabidopsis* ont été blessées avec une pincette dentée au niveau de la nervure centrale de la feuille (fig. 1B) et récoltées 30 ou 120 minutes après la blessure. Les rosettes de plantes non blessées ont servi de plantes de contrôle.

Outre le JA et le dérivé biologiquement actif JA-Ile, l'analyse a également pris en compte leurs précurseurs de biosynthèse, c'est-à-dire l'acide 12-oxophytodiénoïque (OPDA) et le 3-oxo-2-(2-pentényl)-cyclopentane-1-tétra-acide (OPC-4) (**fig. 5**).

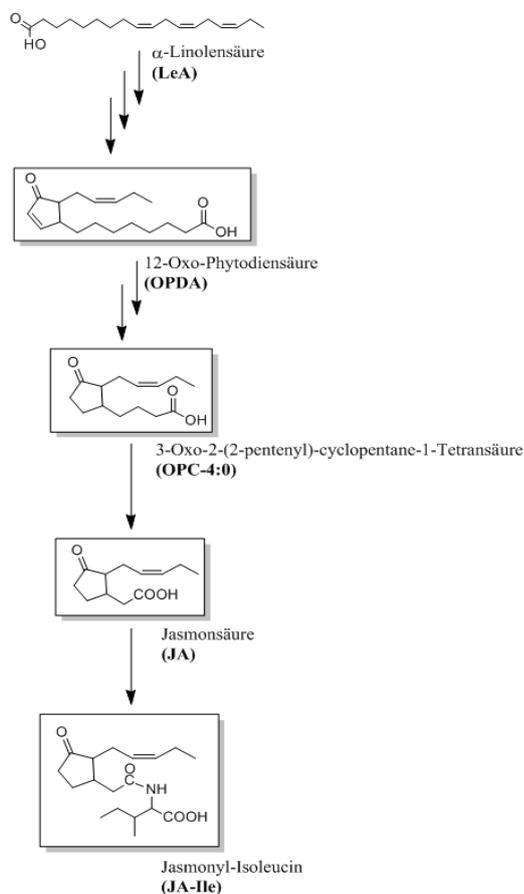


Fig. 5 : Biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) et du dérivé actif jasmonyl-isoleucine (JA-Ile) via les précurseurs, c'est-à-dire l'acide alpha-linolénique, l'acide 12-oxophytodiénoïque (OPDA) et le 3-oxo-2-(2-pentényl)-cyclopentane-1-tétra-acide (OPC-4).

Pour déterminer les quantités de ces métabolites présents dans le tissu végétal à l'aide de l'analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS, il est nécessaire d'ajouter, pour l'extraction, une quantité définie de substances deutérées de structure chimique identique ou très semblable (D_5 -OPDA, D_6 -JA, D_3 -JA-Ile) et d'utiliser ces substances comme étalons internes. À cet effet, on a ajouté avant l'extraction 30 ng (D_5 -OPDA) et 10 ng (D_6 -JA et D_3 -JA-Ile) de ces substances étalons à 200 mg de matière végétale.

Les signaux des analytes (OPDA, OPC-4, JA, JA-Ile) et des substances étalons deutérées correspondantes, qui ont été détectés à l'aide de l'analyse HPLC/nanoESI-MS/MS, sont représentés sur la **figure 6** sous la forme de

chromatogrammes d'ions extraits (EIC). OPC-4, JA et JA-Ile n'ont pas pu être détectés dans les plantes de contrôle non blessées. Seuls les étalons deutérés respectifs et de faibles quantités d'OPDA ont pu y être détectés (**fig. 6A**). En revanche, des signaux clairs des jasmonates endogènes (JA et JA-Ile) ainsi que des signaux moins forts des précurseurs OPC-4 et OPDA ont pu être mesurés dans les plantes blessées (2 h après la blessure) (**fig. 6B**).

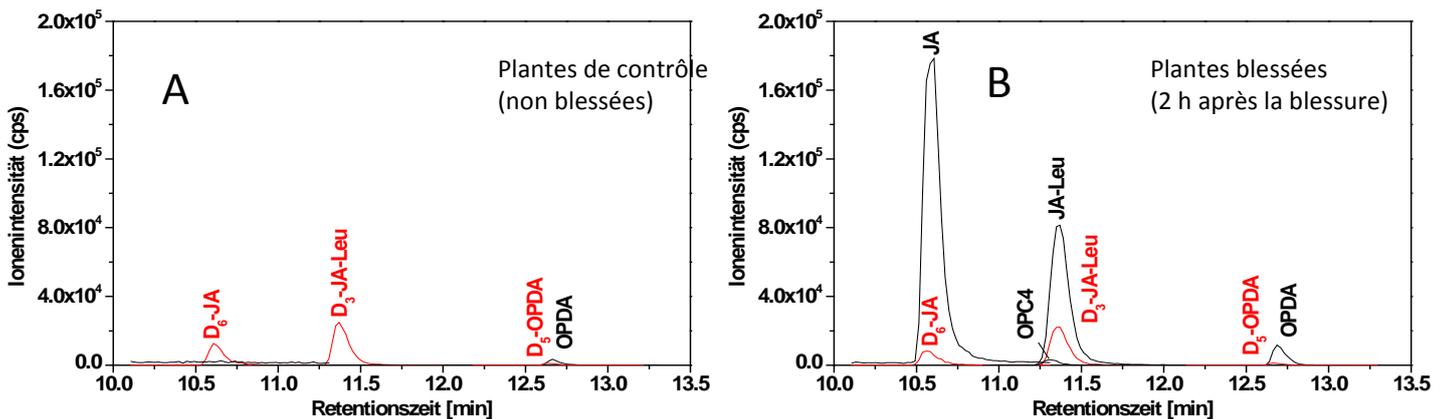


Fig. 6 : Chromatogrammes d'ions extraits (EIC) de l'analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS pour OPDA, OPC-4, JA et JA-Ile et pour les substances étalons deutérées correspondantes (D₅-OPDA, D₆-JA, D₃-JA-Ile). A) EIC des plantes de contrôle non blessées. B) EIC des plantes blessées (2 h après la blessure).

Grâce à l'utilisation des étalons deutérés respectifs, l'analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS permet de quantifier de manière exacte les jasmonates et leurs précurseurs dans les extraits de feuilles. Étant donné qu'en l'espace de quelques minutes, les plantes perçoivent et traitent un stimulus de blessure (Glauser *et al.*, 2008), les précurseurs de JA (OPDA et OPC-4), JA et JA-Ile se sont déjà fortement accumulés dans les rosettes d'*Arabidopsis* 30 minutes après la blessure (**fig. 7**). Dans cette expérience, la concentration de JA est maintenant de 2,2 nmol/g de tissu frais. JA-Ile est présent dans des concentrations de 0,8 nmol/g de tissu frais. La concentration de ces deux jasmonates augmente encore légèrement au cours des 90 minutes qui suivent pour atteindre 2,5 ou 1,2 nmol/g de tissu frais. Parallèlement à cette évolution dans le temps, les précurseurs OPDA et OPC-4 s'accumulent aussi (**fig. 7**). Dans l'analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS présentée ici qui utilise de l'eau ultrapure produite par le système arium pro VF TOC, la limite de détection des jasmonates et de leurs précurseurs dans le tissu des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* est de 1 pmol/g de tissu frais pour OPDA et JA-Ile et de 15 pmol/g de tissu frais pour OPC-4 et JA.

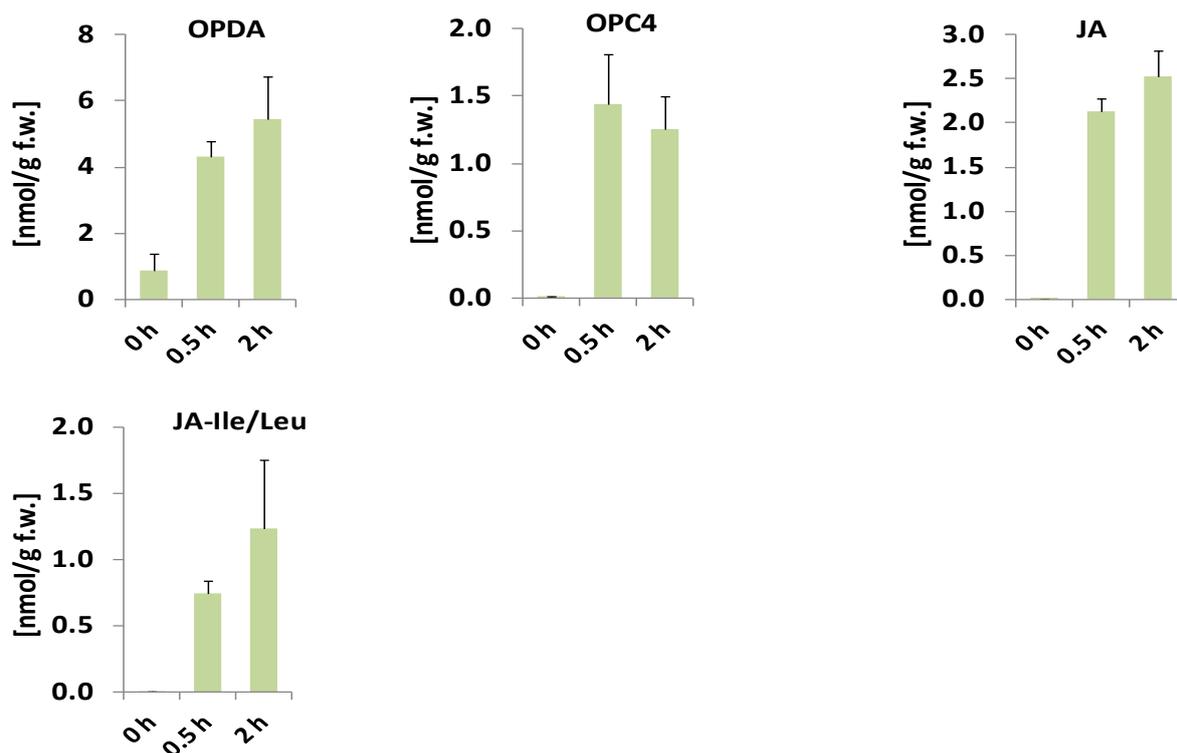


Fig. 7 : Analyse quantitative d'acide jasmonique (JA) et du dérivé actif d'acide aminé, le jasmonyl-isoleucine (JA-Ile), ainsi que des précurseurs OPDA et OPC-4 dans des extraits de feuilles de plantes blessées et de plantes de contrôle correspondantes d'*Arabidopsis thaliana*. Les rosettes des plantes à analyser ont été récoltées non blessées au début de l'expérience ainsi que 30 minutes ou 2 heures après la blessure et immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Après l'extraction, les analytes ont été quantifiés à l'aide d'une analyse HPLC/nano-ESI-MS/MS.

Discussion

La méthode décrite ici de la spectrométrie de masse en tandem associée à l'HPLC permet d'effectuer l'analyse quantitative d'hormones végétales dans une plage de concentration picomolaire. La sensibilité et la spécificité élevées nécessaires constituent également des exigences particulières au niveau de la qualité des solvants utilisés. Pendant la séparation chromatographique, le gradient respectivement utilisé des solvants est responsable de l'élution progressive des analytes de la colonne. Dans la source du spectromètre de masse, les solvants s'évaporent alors par un courant de gaz et les analytes sont transférés dans la phase gazeuse sous la forme d'ions libres. Dans l'idéal, les analytes sont protonés ($[M+H]^+$) quand l'ionisation est positive et ils sont déprotonés ($[M-H]^-$) quand l'ionisation est négative. Toutefois, avec l'ionisation par électrospray, des ions de

quasi-molécules qui sont également dirigés dans le spectromètre de masse par le champ de tension et qui créent des signaux au niveau du détecteur peuvent également apparaître suite à l'absorption d'ions étrangers (par ex. Na^+ , NH_4^+ , Cl^- , CH_3COO^-). La présence d'ions dans le solvant sous la forme de contaminations qui entraînent alors une multitude d'adduits possibles au niveau de l'analyte est donc un problème. Notamment les cations de sodium jouent un rôle important lors de la formation d'adduits. En concurrence avec $[\text{M}+\text{H}]^+$ ou $[\text{M}-\text{H}]^-$, ils forment entre autres des adductions de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ou de $[\text{M}+\text{Na}+\text{acide acétique}-2\text{H}]$. En cas de formation intensive d'adduits, la quantité d'ions protonés ou déprotonés (qui sont en général utilisés pour l'analyse) est fortement réduite. La formation d'adduits peut ainsi considérablement réduire la sensibilité d'une méthode et influencer négativement la limite de détection pour les analytes. Si de l'eau, même de pureté élevée (par ex. grade LC-MS), est conservée de manière prolongée dans des bouteilles en verre, des cations de sodium peuvent se détacher du verre, ce qui entraîne une production croissante d'adduits pendant l'analyse. Ce problème a pu être évité par l'utilisation du système arium pro VF TOC, car de l'eau ultrapure toujours fraîchement produite était disponible pour les analyses HPLC/nano-ESI-MS/MS. Au cours d'essais préliminaires, on a également constaté que le taux de COT de l'eau ultrapure produite par le système arium était en moyenne de 3,82 ppb, c'est-à-dire sensiblement plus faible que celui de l'eau (grade LC-MS) provenant de bouteilles fraîchement ouvertes de fournisseurs habituels sur le marché, qui s'élevait en moyenne à 45,5 ppb (mesures du 23 avril 2013). Ce résultat a également été confirmé par les analyses de Tarun *et al.* (2014) qui pour l'analyse HPLC ont révélé des valeurs élevées de contaminations organiques dans de l'eau en bouteille en vente dans le commerce, comparée à de l'eau ultrapure fraîchement produite.

Bibliographie :

1. Wasternack C. et Hause B. : Jasmonsäure – ein universelles Pflanzenhormon, *Biol. Unserer Zeit*, 3/(2014) (44)
2. Kessler A. et Baldwin I.T. : Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* 291, 2141 (2001)
3. Glauser G., Grata E., Dubugnon L., Rudaz S., Farmer E. E. et Wolfender J.-J. : Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in Arabidopsis in Response to Wounding, *Journal of Biological Chemistry* Volume 283, No. 24, June 13, (2008)

4. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T.V., Shevchenko A., Schwudke D. : Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49: 1137-1146 (2008)
5. Iven T., König S., Singh S., Braus-Stromeyer S.A., Bischoff M., Tietze L.F., Braus G.H., Lipka V., Feussner I., Dröge-Laser W. : Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in Arabidopsis roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol Plant.* 5(6):1389-1402 (2012) Informations in den Supplementary Data de cet article
6. Tarun M., Monferran C. Devaux C. und Mabic S. :“Vor Gebrauch beachten - Wie wichtig ist Reinstwasser für die HPLC ?“, LaborPraxis LP 7/8, 38ème année, août 2014

Remerciements :

Les auteurs remercient particulièrement le professeur Dr Ivo Feussner, Sabine Freitag, Pia Meyer et Hanno Resemann (département de biochimie végétale de l'Albrecht-von-Haller-Institut de la Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne) pour leur aide au cours de ces travaux.

Auteurs :

Dr Tim Iven, département de biochimie végétale, Albrecht-von-Haller-Institut, Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne

Dr Kirstin Feussner, département de biochimie végétale, Albrecht-von-Haller-Institut, Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne

Dr Cornelia Herrfurth, département de biochimie végétale, Albrecht-von-Haller-Institut, Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne

Dr Elmar Herbig, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Goettingen, Allemagne

www.sartorius.com