

## **Extraction, purification et localisation sub-cellulaire des arabinosides chez Arabidopsis thaliana L.**

**Auteur :** Vrielynck, Emilie

**Promoteur(s) :** Fauconnier, Marie-Laure

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2016-2017

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/3066>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**EXTRACTION, PURIFICATION ET  
LOCALISATION SUB-CELLULAIRE DES  
ARABIDOPSIDES CHEZ ARABIDOPSIS  
*THALIANA* L.**

**Vrielynck Emilie**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

**PROMOTEUR: FAUCONNIER MARIE-LAURE**

Copyright © Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de l'Université de Liège - Faculté Gembloux Agro-Bio Tech.  
Le présent document n'engage que son auteur.

**EXTRACTION, PURIFICATION ET  
LOCALISATION SUB-CELLULAIRE DES  
ARABIDOPSIDES CHEZ ARABIDOPSIS  
*THALIANA* L.**

**Vrielynck Emilie**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

**PROMOTEUR: FAUCONNIER MARIE-LAURE**

## Remerciements

À l'heure actuelle, un grand chapitre de ma vie se clôture mais un nouveau chapitre s'ouvre. Rien de tout cela n'aurait été possible sans le soutien et les encouragements de ma famille et de mes proches tout au long de mes études et surtout durant ces longs mois consacrés à ce travail de fin d'étude. Je les remercie du fond du cœur de m'avoir permis de mener à bien ces études.

Ensuite, je souhaiterais remercier mes amis gembloutois pour avoir fait de ces 5 années d'études des moments (in)oubliables. Particulièrement, je tiens à remercier les étudiants de la section Chimie et bio-industries de ma promotion pour les heures passées au labo dans la joie et la bonne humeur, et cela en toutes circonstances.

Je remercie tout particulièrement ma promotrice, Marie-Laure Fauconnier ainsi que Manon Genva pour leurs bons conseils, leur disponibilité et leur bonne humeur transmis tout au long de ce travail et surtout pour leur extraordinaire travail de relecture.

Merci aux autres membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer et juger ce travail. Je remercie également tous mes professeurs depuis la 1ère bachelier pour m'avoir offert une formation aussi complète au sein de notre belle faculté qu'est Gembloux Agro-Bio Tech.

Pour terminer, ce travail n'aurait pas pu voir le jour si je n'avais pas été bien entourée lors de sa réalisation. Ainsi je remercie l'équipe du CGO pour leur accueil, leur aide et leur bonne humeur. Un très grand merci à Manon pour ses bons conseils durant ces quelques mois passés ensemble au bureau. Pour les chouettes heures passées au labo et pour leur soutien à toute épreuve malgré les aléas des machines, je remercie tout particulièrement les autres TFistes : Chloë, Pauline et Loubna.

## Résumé et abstract

### Résumé

A une période où les gens se préoccupent de plus en plus des impacts écologiques et sanitaires des produits chimiques utilisés en grande quantité par l'agriculture conventionnelle, de nombreuses recherches voient le jour afin de développer des alternatives plus saines. Ainsi, des programmes tels que le projet FIELD valorisent la recherche de mécanismes de défense mis en place par les plantes lorsqu'elles subissent un stress ou lorsqu'elles sont attaquées par des ravageurs. Une meilleure connaissance de ces réactions de défense permettrait d'envisager de nouveaux moyens de protection des cultures. Des études ont permis de découvrir que certaines molécules produites en période de stress donnent la possibilité à la plante de mieux supporter le stress ou même de détruire le ravageur. Parmi ces substances, nous retrouvons les oxylipines qui, par leur possible inductivité, apparaissent comme des candidats prometteurs pour une agriculture plus verte.

Ce travail se concentre sur les oxylipines estérifiées qui, dans le cas d'*Arabidopsis thaliana* L., sont connues sous le nom d'arabidopsides. Ces molécules, peu étudiées jusqu'à présent, semblent jouer un rôle important dans les réactions au stress. Il est donc intéressant de déterminer leur localisation dans la cellule végétale. Pour cela, des méthodes efficaces d'extraction, de purification et de quantification sont nécessaires. Dans le cadre de ce travail, une méthode de purification par HPLC-préparative a été développée. Elle permet d'obtenir des fractions plus pures de ces molécules d'intérêt. A partir de ces solutions contenant des arabidopsides, une optimisation de la détection de ces molécules par HPLC-MS a été effectuée. L'utilisation d'une HPLC-MS permet l'analyse d'échantillons complexes tout en identifiant précisément les masses des composés présents. Afin de réaliser une étude plus complète de la présence de ces arabidopsides, une méthode de dosage par HPLC-UV a été menée. Elle aboutit à la détermination de la concentration en arabidopside A d'un échantillon. L'analyse de plusieurs paramètres tels que la répétabilité et la reproductibilité assure la validité de cette méthode. Afin de déterminer la localisation de ces molécules dans la cellule végétale, les différents types de membranes présentes dans la cellule ont été isolés et analysés par HPLC-MS et HPLC-UV. Ceci a permis de déterminer la présence d'arabidopsides dans les fractions contenant les thylakoïdes ainsi que dans celles contenant les membranes des chloroplastes même si leur concentration y est plus faible. L'analyse des membranes plasmiques n'a, quant à elle, pas permis de conclure à une présence ou une absence d'arabidopsides dû à la faible quantité de membrane analysable.

Les quantités d'arabidopside A purifiées durant ce travail permettent d'envisager l'étude des interactions entre cette molécule et les membranes végétales. Sur le long terme, cela pourrait nous apporter une meilleure compréhension des mécanismes de défense mis en place par les plantes.

Mots-clés : *Arabidopsis thaliana* L., arabidopsides, stress, quantification, localisation sub-cellulaire, HPLC-MS, HPLC-UV

## Abstract

In a time when people care more and more about environmental and health impacts of chemicals used in large quantities by conventional agriculture, many projects are implemented in order to develop healthier alternatives. Indeed, programs such as the FIELD project allow to enhance research on the mechanisms set up by plants when they are under stress or attacked by pests. A better understanding of these reactions of defence and of the molecules involved would open up new possibilities to protect crops. Studies show that some molecules are produced under stress conditions and allow the plant to resist the stress more efficiently and even to destroy the pest. These molecules include the oxylipines, which thanks to their possible inductivity appear to be promising for a greener agriculture.

This master thesis focuses on esterified oxylipines, which in the case of *Arabidopsis thaliana* L., are known as arabidopsides. These molecules, hardly studied so far, seem to play an important role in plant defence mechanisms. Therefore, it is interesting to determine their location in the plant cell. However, in order to do that, efficient methods of extraction, purification and quantification are necessary. Within the context of this master thesis, a method of purification by preparative HPLC has been developed, allowing us to obtain purer fractions of the molecules of interest. From these solutions containing arabidopsides, an optimization of their detection by HPLC-MS has been carried out. The use of HPLC-MS allows the analysis of complex samples while identifying precisely the masses of present compounds. In order to allow a more comprehensive study of the presence of these molecules, a dosage by HPLC-UV was performed. This allows to determine the concentration of arabidopside A in a sample. The study of several parameters such as the repeatability and reproducibility ensures the validity of this method. In order to determine the location of these molecules in the plant cell, different types of cell membranes were isolated and analyzed by HPLC-MS and HPLC-UV. These analyses show the presence of arabidopsides in fractions with thylakoides as well as in fractions with chloroplast membranes, even if their concentrations are the lowest. The analysis of plasmic membrane was not relevant for the presence or absence of arabidopsides because of the small amount of membrane tested.

The quantity of purified arabidopside A during this work allows further studies on the interactions between these molecules and vegetal membranes. In the long term, this could lead to a better comprehension of the defense mechanisms developed by plants.

Keywords : *Arabidopsis thaliana* L., arabidopsides, stress, subcellular location, quantification, HPLC-MS, HPLC-UV.

## Table des matières

Remerciements.....	II
Résumé et abstract .....	III
Résumé.....	III
Abstract .....	IV
Liste des figures .....	VIII
Liste des tableaux .....	XI
Liste des abréviations .....	XII
A. Etat de l'art .....	1
1 Cadre de l'étude.....	1
2 Les membranes végétales .....	2
2.1 La membrane plasmique .....	3
2.2 Les membranes des chloroplastes .....	5
2.2.1 Les membranes externes et internes des chloroplastes.....	5
2.2.2 La membrane des thylakoïdes.....	6
3 L'immunité des plantes .....	8
3.1 Introduction .....	8
3.2 L'immunité induite .....	8
3.2.1 <i>L'Effector-Triggered Immunity</i> .....	9
3.2.2 Le <i>PAMP-Triggered Immunity</i> .....	10
3.2.3 Les réponses de défense des plantes .....	10
3.2.4 La régulation des défenses des plantes .....	12
3.3 Les rôles des oxylipines dans les mécanismes de défenses des plantes .....	12
4 Les oxylipines .....	13
4.1 Introduction .....	13
4.1.1 Les oxylipines libres .....	13
4.1.2 Les oxylipines estérifiées.....	13
4.2 Les voies de synthèse des oxylipines.....	14
4.2.1 Les jasmonates .....	15
4.2.2 Les oxylipines estérifiées chez <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	17
B. Objectifs .....	22
C. Matériels et méthodes d'analyse .....	23

1	Détermination de la concentration des solutions standards d'arabidopsides A, B et D par RMN <sup>1</sup> H .....	23
2	Obtention des molécules d'intérêt .....	23
2.1	Production de plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....	23
2.2	Induction de la production d'arabidopsides et extraction des lipides. ....	24
2.3	Purification des glycolipides sur colonne de silice .....	24
2.4	Purification des arabidopsides par HPLC-préparative .....	25
3	Mise au point de la méthode de détection et de dosage par HPLC-MS et HPLC-UV.....	26
3.1	Optimisation des paramètres de détection des arabidopsides par spectrométrie de masse en infusion directe .....	26
3.2	Optimisation du gradient de la HPLC-MS .....	26
3.3	Dosage par HPLC-UV.....	27
3.4	Validation de la méthode de dosage .....	27
4	Localisation sub-cellulaire des arabidopsides chez <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	28
4.1	Analyse des membranes des chloroplastes .....	28
4.1.1	Production de plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....	28
4.1.2	Préparation de fractions de chloroplastes .....	28
4.1.3	Analyse des fractions obtenues par HPLC-MS et HPLC-UV .....	29
4.1.4	Analyse des fractions obtenues par GC-FID .....	29
4.2	Analyse des membranes plasmiques .....	30
4.2.1	Production de plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....	30
4.2.2	Extraction des membranes plasmiques .....	31
4.2.3	Analyse des fractions obtenues par LCMS et HPLC-UV .....	31
D.	Résultats et discussion .....	32
1	Détermination des concentrations des solutions standards en arabidopsides A, B, D et E par RMN <sup>1</sup> H .....	32
1.1	Solution standard d'arabidopside A .....	32
1.2	Solution standard d'arabidopside B .....	33
1.3	Solution standard d'arabidopside D .....	34
1.4	Solution standard d'arabidopside E .....	36
2	Optimisation des paramètres de détection des arabidopsides par spectrométrie de masse en infusion directe.....	36
3	Optimisation du gradient de la HPLC-MS .....	40
4	Mise au point de la méthode de quantification des arabidopsides par HPLC-UV .....	43
5	Validation de la méthode analytique .....	46

5.1	Linéarité .....	46
5.2	Répétabilité et reproductibilité.....	46
5.3	Spécificité.....	47
5.4	Effet de matrice.....	48
6	Optimisation et résultats obtenus par HPLC –préparative .....	50
6.1	Optimisation du gradient utilisé.....	50
6.2	Analyse des fractions 1 .....	51
6.3	Analyse des fractions 2 .....	53
7	Rendements d'extraction et de purification des arabidopsides.....	55
8	Localisation sub-cellulaire .....	56
8.1	Les membranes plasmiques.....	57
8.2	Les membranes des chloroplastes .....	57
8.2.1	La fraction contenant les thylakoïdes .....	58
8.2.2	Fraction contenant le stroma et les membranes des chloroplastes .....	60
E.	Conclusion et perspectives .....	63
F.	Bibliographie .....	65
G.	Annexes .....	68
1	Tableaux des fragments des arabidopsides.....	68
2	Spectres obtenus par HPLC-MS pour les arabidopsides B, D et E.....	69
3	Spectres HPLC-UV des standards utilisés pour la droite d'étalonnage .....	70
4	Tableau des données obtenues pour les rendements d'extraction .....	72

## Liste des figures

FIGURE 1 STRUCTURE DE LA CELLULE VÉGÉTALE ET DES MEMBRANES LA COMPOSANT (BUCHANAN ET AL., 2015)	2
FIGURE 2 LA MEMBRANE PLASMIQUE VÉGÉTALE (BUCHANAN ET AL., 2015) .....	3
FIGURE 3 STRUCTURE CHIMIQUE DES 3 CLASSES DE LIPIDES MAJORITYALEMENT PRÉSENTES DANS LA MEMBRANE PLASMIQUE VÉGÉTALE (ANGUS S. MURPHY, WENDY PEER, 2010).....	4
FIGURE 4 SCHÉMA DU CHLOROPLASTE ET DES DIFFÉRENTES MEMBRANES LE CONSTITUANT .....	5
FIGURE 5 COMPARAISON DE LA RÉPARTITION DES ENZYMES DANS LES ENVELOPPES DES CHLOROPLASTES (KEEGSTRA ET AL., 1986) .....	6
FIGURE 6 SYNTHÈSE DE MGDG ET DGDG DANS LES ENVELOPPES DES CHLOROPLASTES (DÖRMANN ET AL., 2002) .....	7
FIGURE 7 LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DES PLANTES LORS DE L'IMMUNITÉ INNÉE (HENRY ET AL., 2012)....	9
FIGURE 8 LES 3 CATÉGORIES DE PATHOGÈNES DES PLANTES (BUCHANAN ET AL., 2015) .....	10
FIGURE 9 RÉSISTANCE SYSTÉMIQUE INDUIITE.....	11
FIGURE 10 STRUCTURE DE LA LINOLIPINE A (CHECHETKIN ET AL., 2009) .....	14
FIGURE 11 OXYLIPINES PRODUITES PAR VOIE ENZYMATIQUE ET VOIE CHIMIQUE (GÖBEL ET AL., 2009).....	14
FIGURE 12 LES MOLÉCULES PRINCIPALES COMPOSANT LES JASMONATES .....	15
FIGURE 13 VOIE DE SYNTHÈSE DE L'ACIDE JASMONIQUE (SCHALLER ET AL., 2004) .....	17
FIGURE 14 LES DIFFÉRENTES ARABIDOPSIDES ÉTUDIÉES DANS CE TRAVAIL.....	18
FIGURE 15 PROFIL EN OXYLIPINES EN FONCTION DU STRESS APPLIQUÉ À LA PLANTE (VU ET AL., 2012) .....	20
FIGURE 16 STRUCTURE DU TÉTRAMÉTHYLSILANE (TMS) UTILISÉ COMME STANDARD INTERNE EN RMN .....	23
FIGURE 17 ETAPES NÉCESSAIRES À L'OBTENTION DES ARABIDOPSIDES CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA L. ....	23
FIGURE 18 GRADIENT FINAL DE L'HPLC-PÉPRATIVE .....	25
FIGURE 19 GRADIENT OPTIMISÉ DE L'HPLC-MS. LE SOLVANT A CORRESPONDANT À UNE SOLUTION ACN : H <sub>2</sub> O (85 :15) À 12MM DE FORMIATE D'AMMONIUM ET LE SOLVANT B À DE L'H <sub>2</sub> O MQ À 12 MM DE FORMIATE D'AMMONIUM.....	27
FIGURE 20 ETAPES NÉCESSAIRES À L'ANALYSE DES MEMBRANES DES CHLOROPLASTES.....	28
FIGURE 21 TUBES OBTENUS APRÈS CENTRIFUGATION CONTENANT DIFFÉRENTS COUCHES DE COMPOSITIONS DIFFÉRENTES. .....	29
FIGURE 22 ETAPES NÉCESSAIRES À L'ANALYSE DES MEMBRANES PLASMIQUES. .....	30
FIGURE 23 SPECTRE PROTON RMN OBTENU POUR L'ARABIDOPSIDE A .....	32
FIGURE 24 ZOOM DU PIC ENTRE 6,2 ET 6,15 PPM ET DU PIC CORRESPONDANT AU TMS .....	33
FIGURE 25 SPECTRE RMN OBTENU PAR L'ARABIDOPSIDE B .....	33

FIGURE 26 ZOOM DU PIC ENTRE 6,2 ET 6,15 PPM ET DU PIC CORRESPONDANT AU TMS .....	34
FIGURE 27 SPECTRE RMN OBTENU POUR L'ARABIDOPSIDE D.....	35
FIGURE 28 ZOOM DU PIC ENTRE 6,2 ET 6,15 PPM ET DU PIC CORRESPONDANT AU TMS .....	35
FIGURE 29 SPECTRE MS OBTENU PAR INFUSION DIRECTE POUR UNE SOLUTION 100 PPM D'ARABIDOPSIDE A ..	36
FIGURE 30 SPECTRE MS OBTENU PAR INFUSION DIRECTE POUR UNE SOLUTION 100 PPM D'ARABIDOPSIDE A APRÈS AJOUT D'ACÉTATE D'AMMONIUM DANS L'ÉCHANTILLON. ....	37
FIGURE 31 SPECTRES MS OBTENUS LORS DE L'ISOLATION ET DE LA FRAGMENTATION DU PIC À 792.5 M/z.....	38
FIGURE 32 PARAMÈTRES DE DÉTECTION DE LA MS OPTIMISÉS POUR ARABIDOPSIDE A EN INFUSION DIRECTE. ..	39
FIGURE 33 GRADIENT OPTIMISÉ EN FONCTION DE LA NOUVELLE COMPOSITION DES SOLVANTS POUR L'HPLC-MS. .....	41
FIGURE 34 SPECTRE HPLC-MS OBTENU POUR L'ARABIDOPSIDE A.....	41
FIGURE 35 SPECTRE HPLC-MS OBTENU POUR L'ARABIDOPSIDE B. ....	41
FIGURE 36 SPECTRE HPLC-MS OBTENU POUR L'ARABIDOPSIDE D.....	42
FIGURE 37 GRADIENT HPLC-MS OPTIMISÉ POUR PERMETTRE LA DÉTECTION DE L'ARABIDOPSIDE E.....	42
FIGURE 38 SPECTRES HPLC-MS OBTENU POUR UNE SOLUTION D'ARABIDOPSIDE E.....	43
FIGURE 39 GRADIENT UTILISÉ POUR L'HPLC-UV.....	44
FIGURE 40 SPECTRES UV OBTENUS LORS DE L'ANALYSE RÉPÉTÉE D'UNE SOLUTION STANDARD CONTENANT 100PPM D'ARABIDOPSIDE A.....	44
FIGURE 41 DROITE D'ÉTALONNAGE OBTENUE PAR HPLC-UV POUR L'ARABIDOPSIDE A. ....	46
FIGURE 42 SUPERPOSITION DES SPECTRES UV OBTENUS POUR LA RÉPÉTITION DE LA SOLUTION D'ARABIDOPSIDE A 50 PPM.....	48
FIGURE 43 SPECTRE UV OBTENU POUR UN TÉMOIN NÉGATIF DILUÉ 100X. ....	49
FIGURE 44 SPECTRE UV OBTENU POUR L'ANALYSE DE L'EFFET DE MATRICE .....	49
FIGURE 45 GRADIENT INITIAL DE L'HPLC-PÉPARATIVE. ....	50
FIGURE 46 GRADIENT FINAL DE L'HPLC-PÉPARATIVE.....	51
FIGURE 47 PROFIL OBTENU PAR PURIFICATION PAR HPLC-PÉPARATIVE POUR LA FRACTION 1 DE L'EXTRACTION 1.....	52
FIGURE 48 PROFIL OBTENU PAR PURIFICATION PAR HPLC-PÉPARATIVE DE LA FRACTION 1 DE L'EXTRACTION 4. .....	52
FIGURE 49 PROFIL OBTENU PAR PURIFICATION PAR HPLC-PÉPARATIVE DE LA FRACTION 1 DE L'EXTRACTION 7 RÉALISÉE SUR FEUILLES AYANT ÉTÉ STOCKÉES PLUSIEURS JOURS À -20°C. ....	53
FIGURE 50 PROFIL OBTENU PAR PURIFICATION PAR HPLC-PÉPARATIVE DE LA FRACTION 2 DE L'EXTRACTION 4. .....	54

FIGURE 51 PROFIL OBTENU PAR PURIFICATION PAR HPLC-PÉPARATIVE DE LA FRACTION 2 DE L'EXTRACTION 8 RÉALISÉE À PARTIR DE FEUILLES STOCKÉES PLUSIEURS JOURS À -20 °C.....	54
FIGURE 52 SPECTRE HPLC-MS OBTENU PAR ANALYSE DES MEMBRANES PLASMIQUES.....	57
FIGURE 53 CHROMATOGRAMME PROVENANT DE L'ANALYSE GC DE LA FRACTION CONTENANT LE STROMA ET LES MEMBRANES DE CHLOROPLASTES.....	58
FIGURE 54 SPECTRE HPLC-MS OBTENU POUR LA FRACTION THYLAKOÏDE PROUANT LA PRÉSENCE D'ARABIDOPSIDE A .....	58
FIGURE 55 SPECTRE HPLC-MS OBTENU POUR LA FRACTION THYLAKOÏDE PROUANT LA PRÉSENCE D'ARABIDOPSIDE B.....	59
FIGURE 56 SPECTRE HPLC-MS OBTENU POUR LA FRACTION THYLAKOÏDE PROUANT LA PRÉSENCE D'ARABIDOPSIDE E.....	59
FIGURE 57 SPECTRE HPLC-UV OBTENU POUR L'ÉCHANTILLON DE THYLAKOÏDES.....	59
FIGURE 58 SUPERPOSITION DES SPECTRES CORRESPONDANT À L'ARABIDOPSIDE E ET À LA FRACTION THYLAKOÏDE .....	60
FIGURE 59 SUPERPOSITION DES SPECTRES CORRESPONDANT À L'ARABIDOPSIDE A ET À LA FRACTION THYLAKOÏDE. .....	60
FIGURE 60 SPECTRE OBTENU PAR HPLC-MS POUR L'ÉCHANTILLON CORRESPONDANT À LA FRACTION CONTENANT LE STROMA ET LES MEMBRANES DES CHLOROPLASTES.....	61
FIGURE 61 SPECTRE OBTENU EN HPLC-UV POUR L'ÉCHANTILLON CORRESPONDANT À LA FRACTION CONTENANT LE STROMA ET LES MEMBRANES DES CHLOROPLASTES.....	61
FIGURE 62 SUPERPOSITION DES SPECTRES OBTENUS POUR LES ARABIDOPSIDES PURIFIÉES ET POUR LA FRACTION CONTENANT LE STROMA ET LES MEMBRANES DES CHLOROPLASTES.....	61

## Liste des tableaux

TABLEAU 1 INFLUENCE DE L'ESPÈCE VÉGÉTALE SUR LA COMPOSITION LIPIDIQUE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE (ANGUS S. MURPHY, WENDY PEER, 2010).....	4
TABLEAU 2 FRAGMENTS POUVANT ÊTRE FORMÉS À PARTIR DE L'ARABIDOPSIDE A.....	39
TABLEAU 3 COMPOSITION DES SOLVANTS UTILISÉS EN HPLC-MS. ....	40
TABLEAU 4 RÉSULTATS OBTENUS POUR LES TESTS DE RÉPÉTITION .....	45
TABLEAU 5 CV THÉORIQUES ET CALCULÉS PERMETTANT D'ÉTUDIER LA RÉPÉTABILITÉ DE LA MÉTHODE MISE AU POINT .....	47
TABLEAU 6 CV THÉORIQUES ET CALCULÉS PERMETTANT D'ÉTUDIER LA REPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE MISE AU POINT.....	47
TABLEAU 7 TEMPS DE RÉTENTION OBTENUS POUR L'ANALYSE DE LA SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE MISE AU POINT. .....	48
TABLEAU 8 AIRES OBTENUES POUR L'ANALYSE DE L'EFFET DE MATRICE. ....	49
TABLEAU 9 RÉCAPITULATIF DES QUANTITÉS D'ARABIDOPSIDE A DOSÉES POUR LES DIFFÉRENTES FRACTIONS DES EXTRACTIONS RÉALISÉES.....	56

## Liste des abréviations

13-HPOT	Acide 13(S)-hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E),15(Z)-triènoïque
AOC	Allene oxyde cyclase
AOS	Allene oxyde synthase
Av-R	Protéine de l'avirulence R
CV	Coefficient de variation
DAG	Diacylcycérol
DAM	Damage-Associated Molecular pattern
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DES	Divinyl ether synthase
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
dn-OPDA	Dinor-12-oxo-phytodienoic acid
EAS	Epoxy alcohol synthase
ESI	Electrospray Ionization
ET	Ethylène
ETI	Effector-triggered immunity
FIELD	Finding Interesting Elicitor LipiDs
GC-FID	Gaz Chromatography- Flame Ionization detector
HPL	Hydroperoxyde lyase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Hypersensitive cell death response
ISR	Induced systemic resistance
JA	Jasmonic acid
JAR1	JA conjugate synthetase 1
LAR	Localized Acquired Resistance
LOX	Lipoxygénase
MAMP	Microbial-associated molecular patterns
MeJa	Méthyljasmonate
MGD	MGDG synthase
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MS	Mass Spectrometry
NRP1	Nonexpressor of PR genes 1
OPDA	Oxo-phytodienoic acid
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
PR	Pathogenesis-related
PRR	Pattern recognition receptors
PTI	PAMP-triggered immunity
RMN1H	Résonance magnétique du proton
ROS	Reactive oxygen species
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic acquired resistance
SRM	selected reaction monitoring

TMS	Tétraméthylsilane
UV	Ultraviolet
VIPP1	Vesicle-Inducing Protein in Plastids 1

## A. Etat de l'art

### 1 Cadre de l'étude

Un grand nombre de pesticides chimiques ont été mis sur le marché sans réelle régulation pendant de nombreuses années. Leur efficacité spectaculaire contre de nombreux ravageurs (insectes, rongeurs, champignons, ...) a mené les agriculteurs à les utiliser de manière intensive et souvent non contrôlée sans s'interroger sur les conséquences que cette utilisation massive pouvait avoir. Il fallut attendre 1962, année de parution du livre « *Silent Spring* » de Rachel Carson, pour que la population s'interroge sur les impacts environnementaux et sanitaires de ces produits. Ainsi, des études toxicologiques ont été menées et arrivent aux conclusions que ces produits possèdent une toxicité chronique et aiguë pour l'homme, les animaux et l'environnement. Depuis lors, la population a pris conscience de la nécessité de développer de nouvelles méthodes agricoles moins nocives pour l'environnement et les individus. La lutte biologique et la lutte intégrée sont apparues comme de bonnes alternatives à l'agriculture conventionnelle. La lutte biologique consiste à combattre et limiter l'action d'un ravageur grâce à ses ennemis naturels (Pervanchon et al., 2002). La lutte intégrée, quant à elle, a pour objectif de gérer les maladies et les nuisibles en combinant des moyens chimiques à des moyens de lutte biologique de manière responsable pour l'environnement (Pervanchon et al., 2002).

Dans le contexte de recherche d'alternatives aux méthodes actuelles de lutte chimique contre les pathogènes et ravageurs, ce travail de fin d'études fait partie intégrante du projet FIELD (Finding Interesting Elicitor LipiDs). Celui-ci a pour objectif principal de développer des nouvelles méthodes de cultures durables permettant de limiter l'impact de l'utilisation des produits phytosanitaires sur l'environnement. Afin d'y parvenir, ce projet soutient la recherche et l'étude de nouveaux moyens de lutte biologique et naturelle. Une attention particulière est portée aux molécules issues de l'immunité innée des plantes ainsi qu'aux éliciteurs, tel que les microorganismes. D'après Delaunois et al. (2014), un éliciteur est défini comme toute molécule produite par des plantes hôtes (synthétisant ou accumulant la dite molécule), ou par des microorganismes (non)pathogènes capable d'induire ou de promouvoir la résistance naturelle des plantes face à un ou plusieurs pathogène(s) (Delaunois et al., 2014).

Dans le cadre de ce travail de fin d'études, un grand intérêt sera porté à des molécules semblant intervenir dans l'immunité innée des plantes. L'objectif principal consistera à localiser précisément ces molécules au sein des membranes des cellules végétales afin d'améliorer les connaissances actuelles concernant leur voie de biosynthèse et de comprendre leurs utilités pour la plante.

## 2 Les membranes végétales

Dans les cellules végétales, il existe approximativement 20 systèmes membranaires différents (**Figure 1**) qui consistent chacun en une bicouche composée de lipides polaires et de protéines. Cette bicouche possède de nombreux rôles. Elle est, par exemple, une barrière perméable car la plupart des molécules hydrosolubles ne sont pas capable de traverser la partie apolaire de la bicouche lipidique. De plus, les protéines présentes dans les membranes ont de nombreuses fonctions diversifiées qui définissent donc la spécificité de chaque système membranaire (Buchanan et al., 2015)

Dans le cadre de ce TFE, une attention particulière sera portée à la membrane plasmique, aux membranes externes des chloroplastes et aux membranes des thylakoïdes.

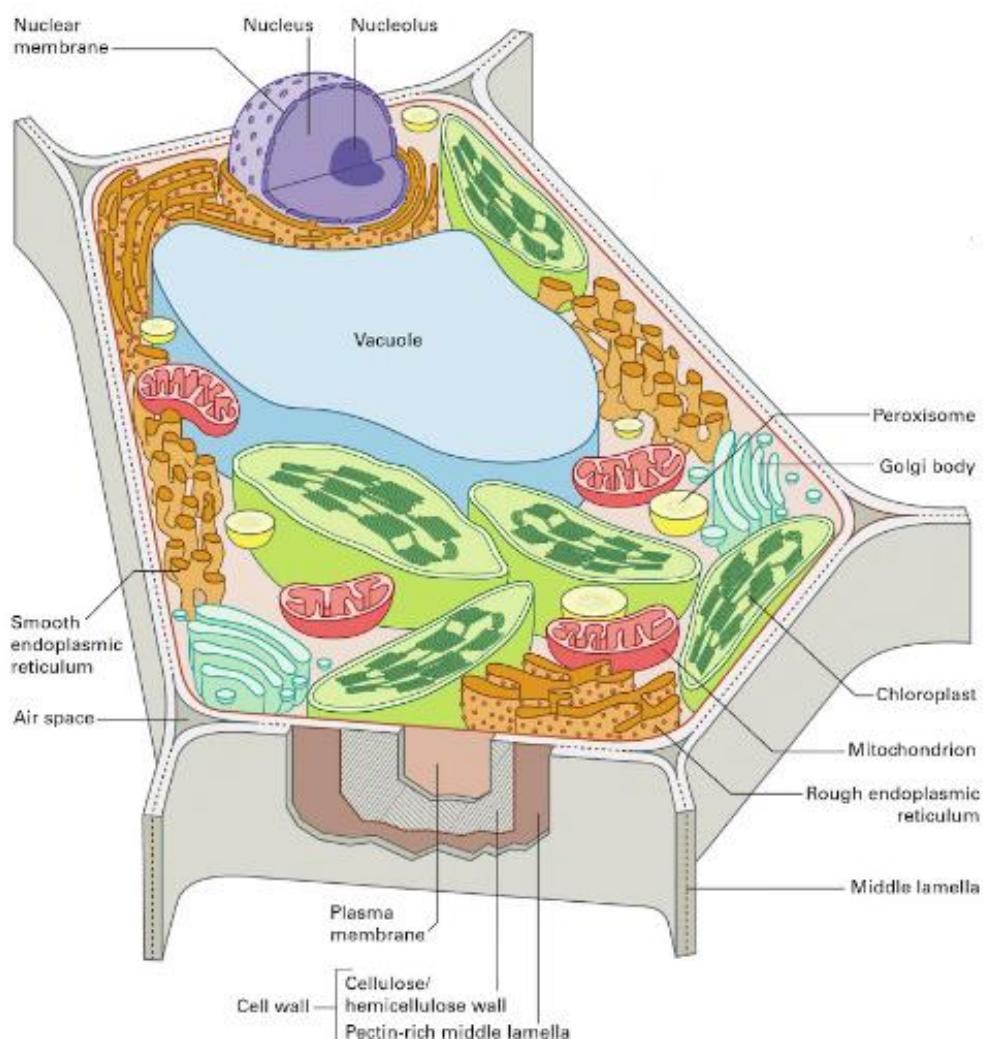


Figure 1 - Structure de la cellule végétale et des membranes la composant (Buchanan et al., 2015)

## 2.1 La membrane plasmique

La membrane plasmique (**Figure 2**) joue un rôle important dans la reconnaissance et la transduction de signaux car elle délimite l'interface entre la cellule et son environnement. Ainsi, elle est largement impliquée dans les mécanismes de défense des plantes. De plus, elle forme une barrière physique sélectivement perméable à certaines macromolécules, telles que les protéines et certains solutés (sodium, glucose, potassium...)(Angus S. Murphy, Wendy Peer, 2010; Buchanan et al., 2015)

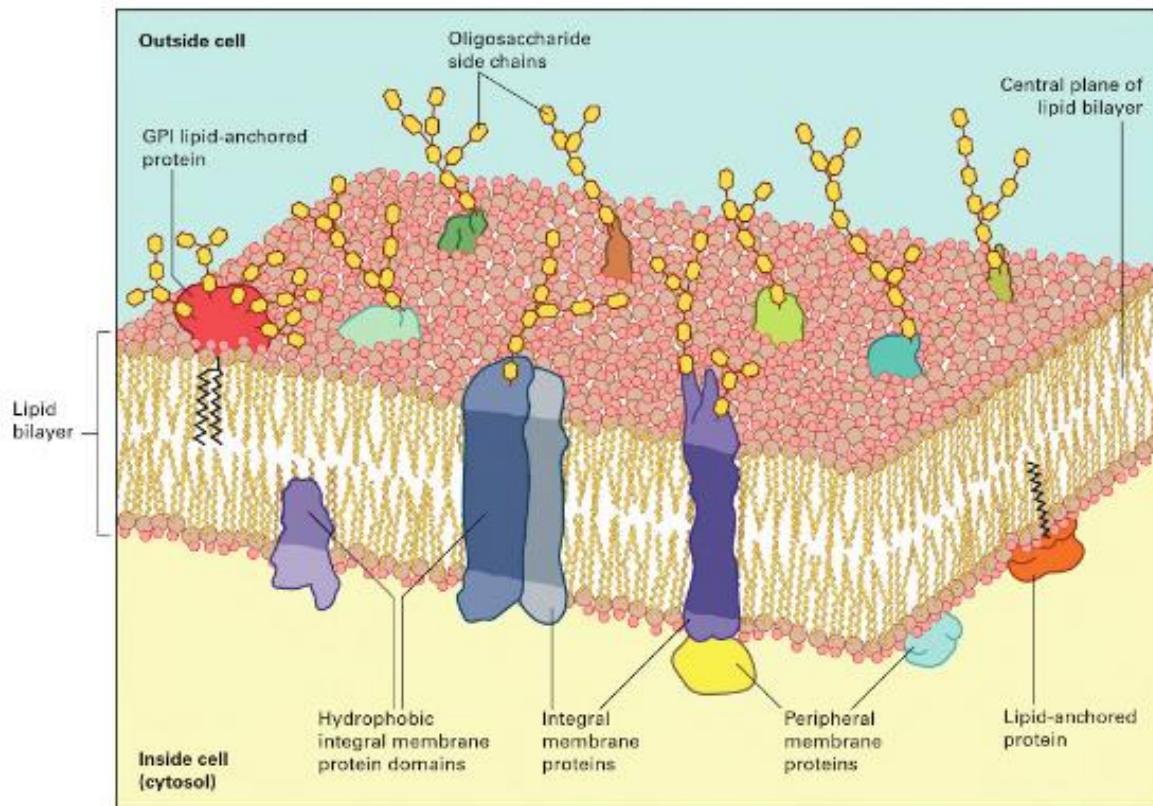


Figure 2 - La membrane plasmique végétale (Buchanan et al., 2015)

La membrane plasmique végétale est une membrane ayant une composition complexe qui dépend du type de cellule, de son stade de développement, des conditions de croissance de la plante et de l'espèce végétale étudiée (**Tableau 1**).

Tableau 1 - Influence de l'espèce végétale sur la composition lipidique de la membrane plasmique (Angus S. Murphy, Wendy Peer, 2010)

	<i>Secale cereale</i>	Avoine de printemps	Avoine d'hiver	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Solanum commersonii</i>
<b>Phospholipides</b>	36,6	28,2	28,9	46,8	46,4	48,3
<b>Sphingolipides</b>	16,4	27,2	30,4	7,3	6,5	6,1
<b>Stérols</b>	46,6	41,3	39,1	46	45	41,6
<b>Autre</b>	0,4	2,7	1,7	/	2,1	4
<b>Stérols/ Phospholipides</b>	1,3	1,5	1,3	1	1	0,9
<b>Références</b>	(Uemura et al., 1994)	(Uemura et al., 1994)	(Uemura et al., 1994)	(Uemura et al., 1995)	(Palta et al., 1993)	(Palta et al., 1993)

La membrane plasmique est principalement constituée de lipides et de protéines dans un ratio molaire pouvant aller de 50:1 à 100:1. Ainsi, 3 classes de lipides sont retrouvées en majorité dans cette membrane : les stérols, les sphingolipides et les glycérolipides (principalement des phospholipides) (**Figure 3**). La membrane plasmique possède un ratio stérols/phospholipides allant de 0,6 à 1,5 (**Tableau 1**) et, en fonction de sa composition lipidique, les différentes molécules s'associent différemment. En comparaison avec les autres membranes cellulaires, la membrane plasmique est riche en stérols et sphingolipides ce qui lui confère une meilleure résistance au stress mécanique (Angus S. Murphy, Wendy Peer, 2010; Deleu et al., 2014).

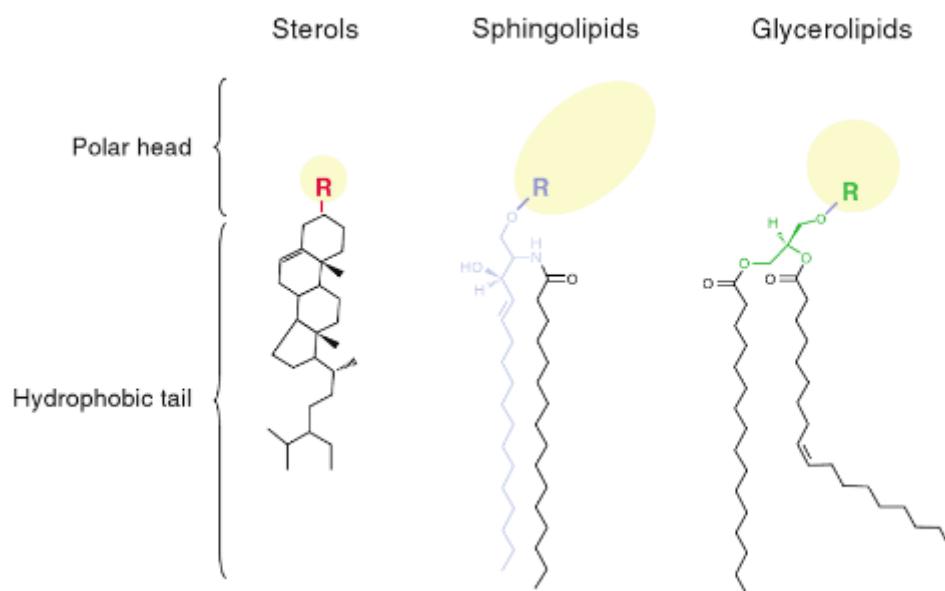


Figure 3 - Structure chimique des 3 classes de lipides majoritairement présentes dans la membrane plasmique végétale (Angus S. Murphy, Wendy Peer, 2010)

## 2.2 Les membranes des chloroplastes

Le chloroplaste est un organite assurant plusieurs fonctions essentielles pour les végétaux telles que la photosynthèse, la biosynthèse des caroténoïdes et des acides gras ainsi que l'assimilation de l'azote et du soufre. Chacune de ses fonctions est réalisée par des protéines spécifiquement localisées dans l'un ou l'autre des compartiments constituant le chloroplaste (**Figure 4**). (Chu et al., 2011)

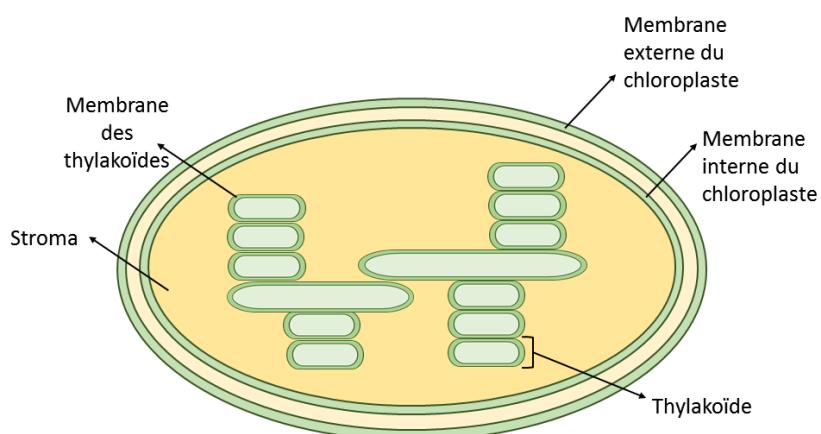


Figure 4 - Schéma du chloroplaste et des différentes membranes le constituant

### 2.2.1 Les membranes externes et internes des chloroplastes

L'enveloppe des chloroplastes est composée de deux de membranes lipidiques chacune structurée en double couche : la membrane externe et la membrane interne (**Figure 4**) (Keegstra et al., 1986).

La composition lipidique de ces 2 membranes varie très fortement. Ainsi, l'enveloppe interne contient une grande proportion de galactolipides, et principalement des monogalactosyldiacylglycerols (MGDG) et des digalactosyldiacylglycérols (DGDG) (Dörmann et al., 2002). Toutefois, elle ne contient que très peu de phospholipides dont la majorité est du phosphatidylglycérol. La membrane externe, quant à elle, se compose à proportion presque égale de galactolipides et de phospholipides. Dans ce cas-ci, c'est la phosphatidylcholine qui est la plus abondante (Keegstra et al., 1986). La composition des membranes des plantes varie en fonction de leurs conditions de croissance. En effet, lorsque les plantes se développent sur un milieu pauvre en phosphore, le ratio glycérolipides-phospholipides augmente et il y a accumulation de DGDG (Dörmann et al., 2002)(Härtel et al., 2000). D'autre part, certaines enzymes sont présentes de manière spécifique dans l'une ou l'autre des membranes du chloroplaste et cette répartition semble presque constante entre les espèces (**Figure 5**)(Keegstra et al., 1986)

LOCATION OF ENVELOPE ENZYMES		
Enzyme	Location	
	Pea <sup>a</sup>	Spinach <sup>b</sup>
UDP-Gal : diacylglycerol galactosyltransferase	Outer <sup>7</sup>	Inner <sup>8</sup>
Galactolipid : galactolipid galactosyltransferase	Outer <sup>7</sup>	Outer <sup>9</sup>
Acyl-CoA synthetase	Outer <sup>8</sup>	Outer <sup>9</sup>
Acyl-CoA thioesterase	Inner <sup>8</sup>	Inner <sup>9</sup>
Mg <sup>2+</sup> -dependent ATPase	Inner <sup>10</sup>	Inner <sup>8</sup>
Phosphatidic acid phosphatase	Inner <sup>11</sup>	Inner <sup>9</sup>
Monoacylglycerol 3-P acyltransferase	Inner <sup>11</sup>	

Figure 5 - Comparaison de la répartition des enzymes dans les enveloppes des chloroplastes (Keegstra et al., 1986)

## 2.2.2 La membrane des thylakoïdes

La membrane des thylakoïdes possède des rôles très importants car une grande diversité de réactions s'y déroule, et notamment la photosynthèse (Andersson, 1986).

La composition lipidique de cette membrane est similaire à celle de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. En effet, on y retrouve une grande proportion de galactolipides (Dörmann et al., 2002). Toutefois, la composition de la membrane des thylakoïdes est modifiée en fonction de l'intensité, de la durée et de la qualité de l'environnement lumineux des plantes. Cela influence les fonctions et la structure du thylakoïde (Andersson, 1986; Essigmann et al., 1998). Il est important de noter qu'il existe des interactions entre la membrane des thylakoïdes et les enveloppes des chloroplastes. En effet, les MGDG et les DGDG retrouvés dans les membranes des thylakoïdes sont synthétisés au niveau des enveloppes des chloroplastes à partir de diacylglycérols (DAG). Les MGDG sont formés dans les enveloppes internes et externes du chloroplaste par l'action de différentes *MGDG synthases* (MGD1, MGD2, MGD3) (Figure 6). La majeure partie de ceux-ci est synthétisée dans l'enveloppe interne alors que l'enveloppe externe est le 2<sup>e</sup> site de production. Une hypothèse avancée dans certains articles propose que les MGDG produits dans l'enveloppe externe servent de précurseurs pour la synthèse de DGDG par l'action d'une *DGDG synthase* (DGD1). Les DGDG ainsi produits sont alors probablement transportés vers l'enveloppe interne par un mécanisme encore inconnu. Les galactolipides quittent ensuite l'enveloppe interne pour rejoindre les thylakoïdes. Ce transport est facilité par une protéine, la *Vesicle-Inducing Protein in Plastids 1* (VIPP1). D'autre part, il a été montré que, lors d'une carence en phosphate, les DGDG peuvent être retrouvés dans des plastes racinaires. Toutefois, le site de synthèse et les mécanismes de transport sont pour le moment inconnus (Dörmann et al., 2002).

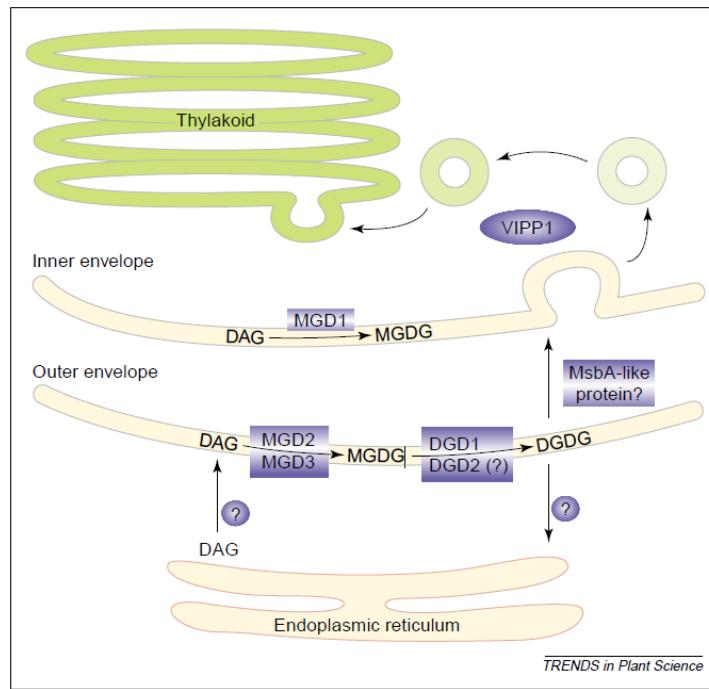


Figure 6 - Synthèse de MGDG et DGDG dans les enveloppes des chloroplastes (Dörmann et al., 2002)

La membrane plasmique étant à l'interface entre la cellule et son environnement, elle joue un rôle important dans la détection des pathogènes. En effet, la plupart des microorganismes produisent des molécules qui peuvent être reconnues par des récepteurs présents au niveau de la membrane cellulaire. Cette reconnaissance active les défenses de la plante.

### 3 L'immunité des plantes

#### 3.1 Introduction

Durant leur développement, les plantes sont soumises à de nombreux facteurs de stress que l'on peut classer en stress dits biotiques et stress dits abiotiques. Les premiers correspondent à des attaques de ravageurs ou de pathogènes, tels que les champignons, insectes herbivores, virus et bactéries. Les seconds font référence à des périodes de stress hydrique ou salin, à des moments de sécheresse, à des variations importantes de température ou à des carences en nutriments. En agriculture, la plupart de ces conditions impliquent une diminution importante des récoltes. Toutefois, il est important de savoir que même si les plantes ne possèdent pas de mécanismes de défense aussi complexes que ceux des animaux, leurs cellules sont capables de résister aux attaques par des défenses constitutives et des réponses induites. Dans le cas des stress biotiques, celles-ci tendent à limiter l'invasion, à affaiblir l'agresseur et permettent même parfois de détruire l'organisme pathogène. L'ensemble de ces mécanismes de défense constituent l'immunité innée de la plante (Blée, 1998).

Parmi les mécanismes de défense des plantes, il est nécessaire de distinguer les défenses constitutives et les défenses inductibles. Les premières incluent les barrières physiques (paroi et membrane) ainsi que la production de composés toxiques. En effet, la plupart des plantes synthétisent des métabolites secondaires possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces composés existent sous forme active ou sont stockées en tant que précurseurs inactifs qui seront activées par la plante en réponse à une attaque par un pathogène ou suite à des lésions tissulaires. En général, ces composés antimicrobiens sont stockés dans des vacuoles (Buchanan et al., 2015).

Les défenses inductibles, quant à elles, sont basées sur la perception de molécules ne provenant pas de la plante ou produites suite à une blessure. Cette perception induit une réponse de défense rapide de la plante.

#### 3.2 L'immunité induite

Deux mécanismes de résistance ont été recensés à ce jour : l'*Effector-Triggered Immunity* (ETI) et le *PAMP Triggered Immunity* (PTI) (**Figure 7**). Ceux-ci sont considérés comme faisant partie de l'immunité innée primaire et secondaire des plantes (Henry et al., 2012).

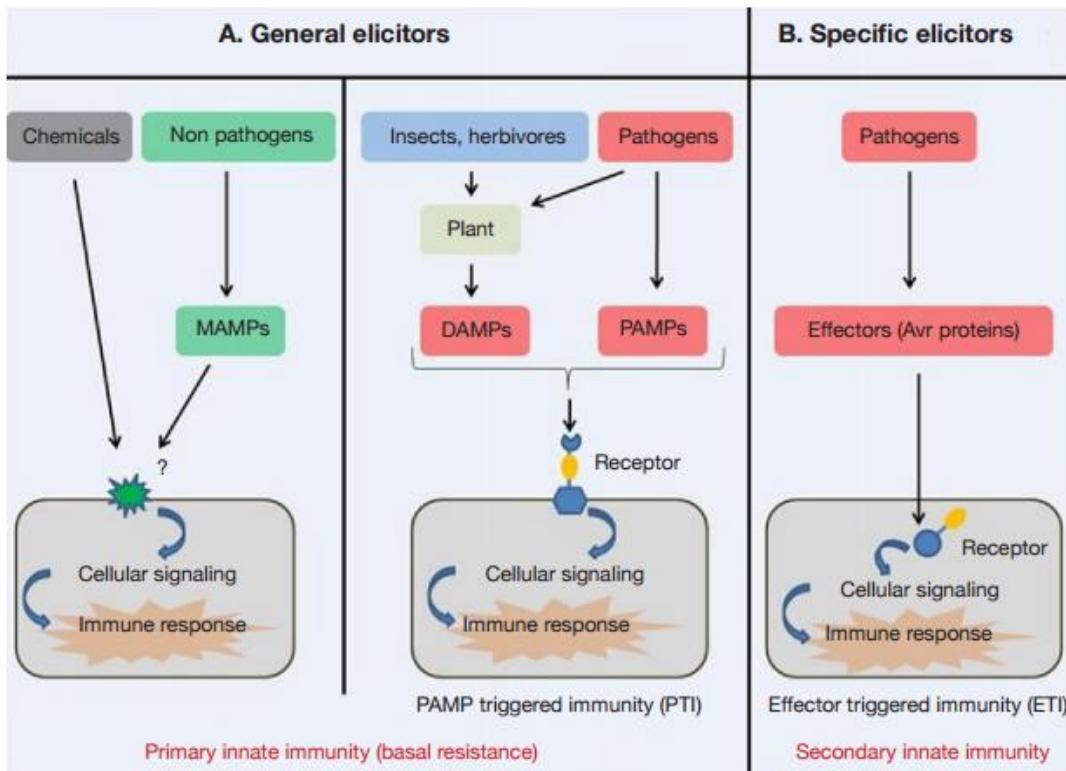


Figure 7 - Les mécanismes de résistance des plantes lors de l'immunité innée (Henry et al., 2012)

### 3.2.1 L'Effectuator-Triggered Immunity

L'ETI prend place au sein même de la cellule et utilise des gènes de résistance (R) présents chez la plante. Ces gènes codent pour des protéines capables de reconnaître des effecteurs produits par des pathogènes biotrophiques. Cette catégorie de pathogènes colonise les cellules végétales en causant un minimum de dommages à celles-ci (**Figure 8**). Une fois reconnu, l'effecteur est appelé protéine d'avirulence (Avr). Cette interaction cause une réaction protéine-effecteur et aboutit souvent à une réaction d'hypersensibilité (HR) qui se déroule en deux étapes. La première phase de la HR est la libération d'un flux d'ions à travers la membrane ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induite par l'activation des gènes R. Ces composés induisent une peroxydation des lipides de la membrane cellulaire ce qui va engendrer une mort des cellules infectées.

	Necrotrophy	Biotrophy	Hemibiotrophy
Attack strategy	Secreted cell wall-degrading enzymes, host toxins, or both	Intimate intracellular contact with plant cells	Initial biotrophic phase
Specific features of interaction	Plant tissue killed and then colonized by the pathogen; extensive tissue maceration	Plant cells remain alive throughout infection; minimal plant cell damage	Plant cells alive only in the initial stages of infection; extensive plant tissue damage at later stages
Host range	Broad	Narrow; often only a single species of plant is attacked	Intermediate
Examples	Rotting bacteria (e.g., <i>Erwinia</i> spp.); rotting fungi (e.g., <i>Botrytis cinerea</i> )	Fungal mildews and rusts; viruses and endoparasitic nematodes; <i>Pseudomonas</i> spp. bacteria	<i>Phytophthora infestans</i> (causal agent of potato late blight disease)

Figure 8 - Les 3 catégories de pathogènes des plantes (Buchanan et al., 2015)

### 3.2.2 Le PAMP-Triggered Immunity

Le PTI, quant à lui, utilise des molécules appelées *pathogen- ou microbe-associated molecular patterns* (PAMP/MAMPs), produites par la plupart des microorganismes. Ces molécules sont reconnues par des récepteurs présents à la surface de la cellule végétale, les *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). D'autres molécules peuvent également être reconnues par le PRRs, il s'agit des *Damage-Associated Molecular patterns* (DAMs). Ces composés sont produits par les plantes ayant subi des dommages suite à l'action d'organismes pathogènes. Lorsqu'une PAMP/MAMP/DAMP est détectée par les PRRs, des mécanismes de défense de la plante sont activés (Henry et al., 2012).

### 3.2.3 Les réponses de défense des plantes

Lorsqu'un mécanisme de défense de type ETI ou PTI est activé autour de la zone d'infection, ce phénomène est nommé *Localized Acquired Resistance* (LAR). Via l'émission de molécules signal, des mécanismes de défense peuvent également être induit dans d'autres organes de la plante localement infectée. Ce phénomène a été appelé *Systemic Acquired Resistance* (SAR). De nombreuses molécules, telles que les jasmonates et l'acide salicylique (SA), sont impliquées dans l'activation du SAR qui implique une accumulation de SA et l'expression de gènes *pathogenesis-related* (PR). Cette voie de défense est utile contre les pathogènes biotrophiques et hémibiotrophiques (Mariutto et al., 2011; Henry et al., 2012; Buchanan et al., 2015).

Le système de défense de la plante est discriminatoire car il permet de distinguer les organismes bénéfiques des pathogènes nuisibles. En effet, la plante est continuellement en contact avec des microorganismes bénéfiques vivant dans la rhizosphère qui sont appelés *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). Ceux-ci ont un impact positif sur le développement et la survie de la plante (Kloepper et al., 1980). Les PGPR assurent une protection externe de la plante en sécrétant des antibiotiques et des enzymes lytiques. De plus, ils sont impliqués dans un mécanisme appelé *résistance systémique induite* (ISR) grâce à leur action indirecte qui permet d'étendre l'immunité innée de la plante au-delà de la zone colonisée (Figure 9). L'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA) sont des molécules nécessaire

pour induire des réponses de défense dans des tissus foliaires. Cette forme de défense ne cause pas d'accumulation de PR et ne nécessite pas de SA (Buchanan et al., 2015). Cependant, en 2014, Pieterse et al. ont démontré que l'ISR pouvait parfois être induite par un mécanisme dépendant de SA. Ces 2 mécanismes de résistance sont donc étroitement liés (Buchanan et al., 2015). Une étude a également montré que ces deux mécanismes de résistance peuvent agir de manière synergique ou antagoniste en fonction des conditions environnementales (Buchanan et al., 2015). L'ISR est efficace contre les pathogènes nécrotropes et certains insectes herbivores (Buchanan et al., 2015). De plus, des tests réalisés sur des plants de *Solanum tuberosum* L. ont démontré que l'absence de PGPRs est préjudiciable pour la plante. En effet, la colonisation de la rhizosphère par des PGPR améliore le rendement de la culture de 17 pourcent (Klopper et al., 1980).

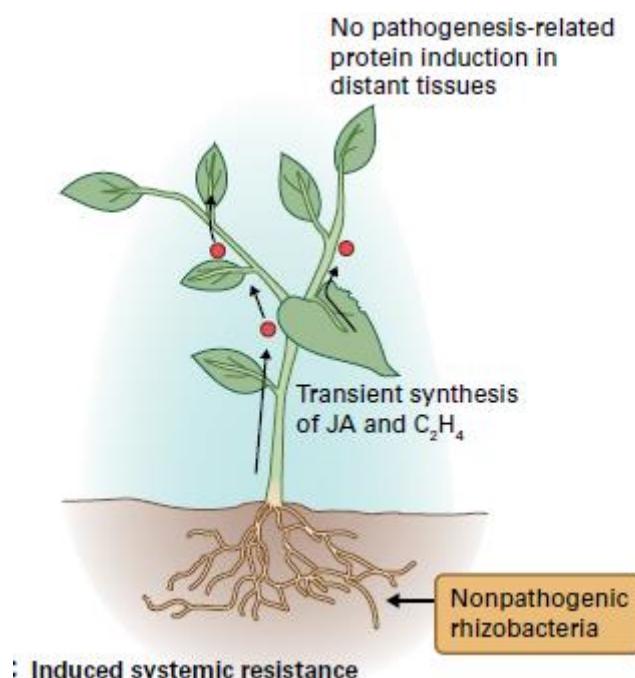


Figure 9 - Résistance systémique induite

La plante réagit rapidement à une infection par un pathogène ou un contact avec un éliciteur. Les premières défenses induites sont la production de molécules appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS) (ex : peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et oxyde nitrique (NO)). Les ROS induisent une peroxydation des acides gras libres de la membrane des plantes ainsi qu'une réponse d'hypersensibilité menant à une mort programmée des cellules proches de la zone infectée(Buchanan et al., 2015).

D'autres défenses sont également mises en place plus tardivement, comme l'accumulation de composés antimicrobiens et un renforcement de la paroi cellulaire. Une série de gènes de régulation, tel que le facteur de régulation de la transcription de la protéine *nonexpressor of PR genes 1* (NRP1), sont activés par l'ISR et le SAR (Pieterse et al., 2014). Cette activation induit l'expression d'un mélange complexe de molécules parmi lesquelles sont retrouvées

des composés impliqués dans la voie de synthèse de JA et dans la régulation de l'interaction entre JA et SA (Mariutto et al., 2011).

#### **3.2.4 La régulation des défenses des plantes**

Les phytohormones, telles que l'acide jasmonique et l'acide salicylique, sont des molécules connues pour leurs rôles en tant que régulateurs de la croissance et du développement des plantes. Il est apparu récemment qu'elles jouaient également un rôle majeur dans la régulation de la défense innée. En effet, SA et JA sont des hormones majeures impliquées dans l'immunité innée. Ainsi, la présence de JA a un impact positif sur l'activité des voies de biosynthèses des oxylipines. D'autres hormones, telles que l'éthylène, l'acide abscissique, la gibbérelline ainsi que les auxines, possèdent également un rôle de modulateurs dans la signalisation de la défense innée (Pieterse et al., 2012; Buchanan et al., 2015).

### **3.3 Les rôles des oxylipines dans les mécanismes de défenses des plantes**

Depuis quelques années, de plus en plus d'études insistent sur l'implication centrale de la voie de la lipoxygénase (LOX) dans les mécanismes de défense des plantes. En effet, il a été prouvé que lors d'un stress, biotique ou abiotique, de nombreuses molécules issues de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés sont formées. Celles-ci sont connues sous le nom d'oxylipines (Fauconnier et al., 2008; Buchanan et al., 2015). Les phyto-oxylipines jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense des plantes car elles agissent en tant que molécules de signalisation (ex : les jasmonates) mais aussi comme des composants protecteurs, tels que des agents antibactériens ou des constituants de la cutine. Les plantes peuvent répondre de différentes manières aux stimuli résultant de lésions tissulaires. Toutefois, la plupart de ces réponses entraînent la production de certaines oxylipines spécifiques (Blée, 2002). De plus, il a été démontré que la voie de la LOX pouvait être induite par l'application d'éliciteurs (Croft et al., 1993).

Grâce à leur diversité d'action et leur possible inductibilité, l'étude des oxylipines apparait comme étant essentielle à la compréhension des mécanismes de défense des plantes.

## 4 Les oxylipines

### 4.1 Introduction

Ces dernières années, les oxylipines végétales ont suscité un intérêt croissant. Cette famille de molécules regroupe des composés aux structures très diversifiées issus de l'oxydation d'acides gras insaturés comme, par exemple, l'acide  $\alpha$ -linolénique. Ces acides gras proviennent de l'hydrolyse de lipides complexes présents dans les membranes végétales par des lipases lorsque, par exemple, une plante est soumise à un stress (Blée, 1998).

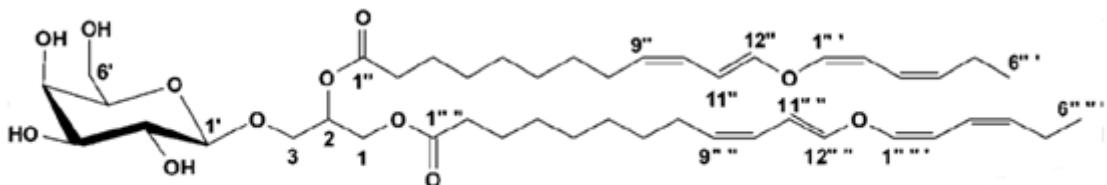
Deux types d'oxylipines peuvent être observés chez les plantes : les oxylipines libres et les oxylipines dites estérifiées.

#### 4.1.1 Les oxylipines libres

Les oxylipines libres formées dans les plantes comprennent les hydroperoxydes d'acides gras, les hydroxy-, oxo- ou keto- acides gras, les éthers divinyliques, les aldéhydes volatils et les jasmonates (Mosblech et al., 2009). Ces molécules sont présentes dans le cytosol de la cellule, le stroma des chloroplastes ou la matrice du peroxyosome (Mosblech et al., 2009). Les oxylipines libres les plus étudiées sont l'acide jasmonique et ses précurseurs cycliques (OPDA et dn-OPDA). Ces molécules portent le nom de jasmonates (Böttcher et al., 2007).

#### 4.1.2 Les oxylipines estérifiées

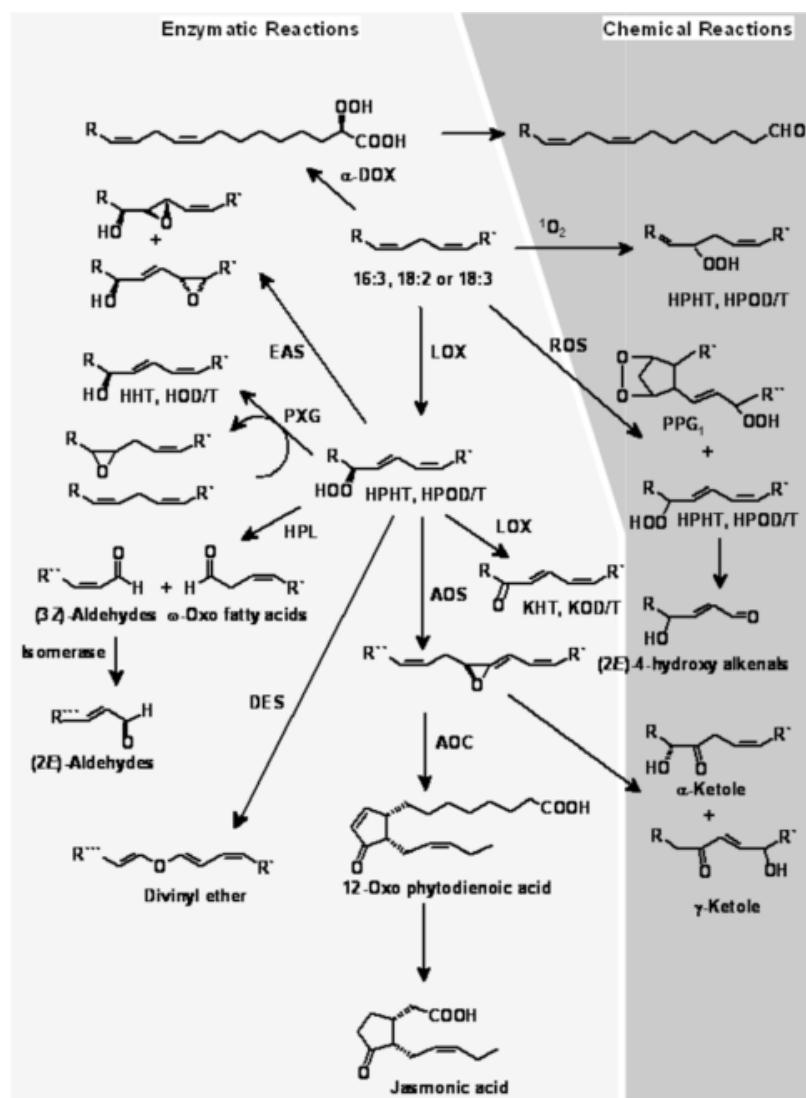
Les oxylipines estérifiées, quant à elles, sont des composés pour lesquels un acide gras oxydé se retrouve estérifié dans des glycérolipides complexes (phospholipides, glycolipides ou lipides neutres). Cette classe de molécules comprend également les acides gras oxydés conjuguées avec des acides aminés ou d'autres métabolites tels que du sulfate (Creelman et al., 2002; Göbel et al., 2009) La diversité en oxylipines estérifiées est très grande mais peu de ces molécules ont été caractérisées entièrement à l'heure actuelle. En effet, jusqu'à récemment, les méthodes analytiques disponibles ne permettaient pas de déterminer la structure de telles molécules. Ainsi, seule la partie « oxylipine » était analysée sous forme d'ester méthylique. Il n'était donc pas possible de savoir à quelle molécule elle était estérifiée dans la plante (Böttcher et al., 2007). Toutefois, depuis quelques années, la structure complète de plusieurs oxylipines estérifiées a pu être déterminée. Par exemple, une famille d'oxylipines estérifiées a été entièrement caractérisée dans les feuilles des plants de lin (*Linum usitatissimum* L.) : les linolipines. Ces molécules sont des galactolipides oxydés dont la partie oxydée est l'acide ethérolénique (Figure 10). Leur synthèse est induite par les feuilles de lin soumises à un stress (ex : attaque par le pathogène bactérien *E. carotovora atroseptica*) mais il a également été montré que le profil en linolipines diffère en fonction de l'état de développement des plantes. Il semble donc que ces molécules interviennent dans les processus de développement des plantes ainsi que dans leurs mécanismes de défense contre les pathogènes (Chechetkin et al., 2009). Toutefois, aucune étude n'a pu déterminer leurs rôles précis dans ces mécanismes.



**Figure 10 - Structure de la linolipine A (Chechetkin et al., 2009)**

## 4.2 Les voies de synthèse des oxylipines

Les oxylipines peuvent être produites par voie enzymatique ou par voie non enzymatique. Dans le deuxième cas, les ROS sont responsables de l'oxydation de lipides en molécules diverses dont les phytoprostanes et des hydroxy-acides gras (**Figure 11**) (Dave et al., 2012).



**Figure 11 - Oxylipines produites par voie enzymatique et voie chimique (Göbel et al., 2009)**

## 4.2.1 Les jasmonates

### 4.2.1.1 Introduction

Les jasmonates forment un groupe d'hormones végétales d'origine lipidique qui interviennent dans de nombreux processus biologiques essentiels tels que les réponses aux stress, la reproduction et la sénescence. (Schaller et al., 2004; Böttcher et al., 2007; Dave et al., 2012). Ces molécules sont toutes caractérisées par une structure pentacyclique (Schaller et al., 2008) et les plus étudiées sont l'acide jasmonique (JA), ses dérivés (le méthyljasmonate (MeJA) et le jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile)) ainsi que certains de ses précurseurs (l'acide 12-oxo-phytodienoic (OPDA, 18C) et l'acide dinor-12-oxo-phytodienoic (dnOPDA, 16C)) (**Figure 12**) (Nilsson et al., 2016).

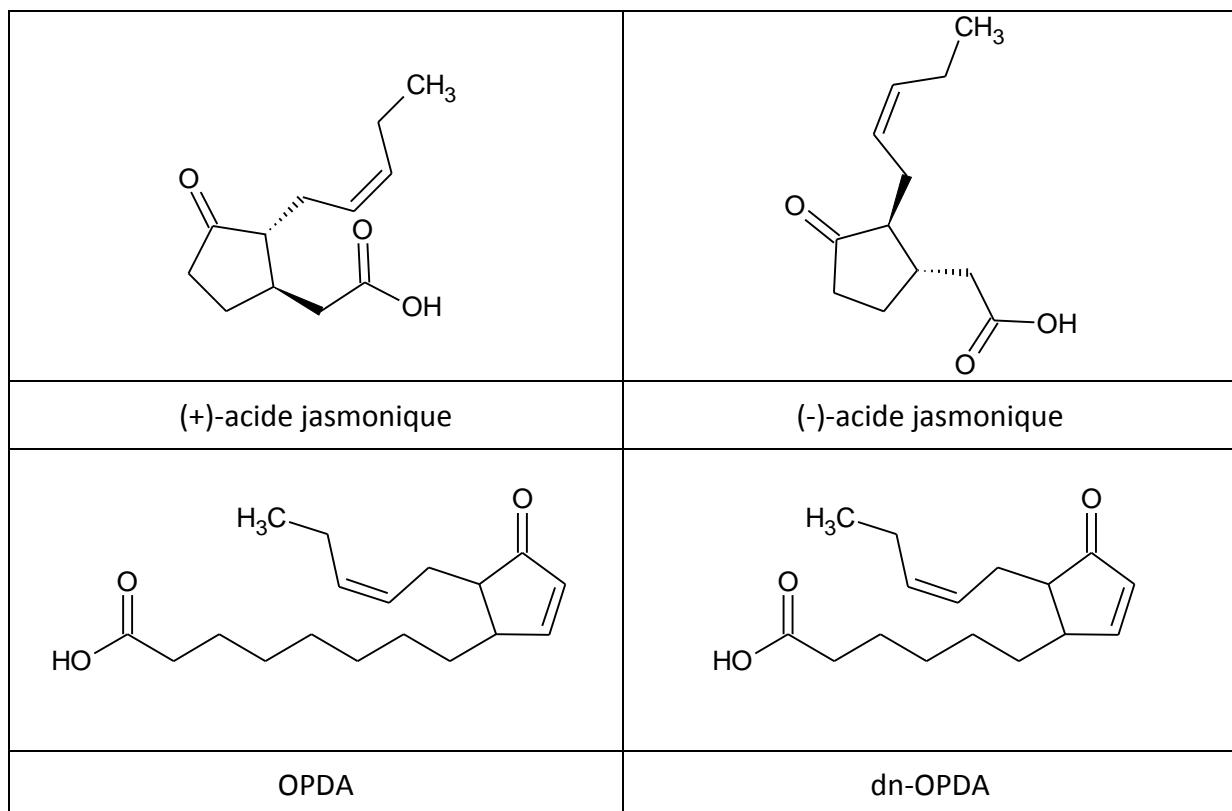


Figure 12 - Les molécules principales composant les jasmonates

De nombreuses études ont montré que l'acide jasmonique joue un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes (Howe et al., 1996; Penninckx et al., 1996; Weber, 1997). Par exemple, chez *Arabidopsis*, les dérivés d'acide jasmonique interviennent dans l'activation de l'expression de gènes de défense lorsque la plante est infectée par un pathogène (ex : *Alternaria brassicola*) (Penninckx et al., 1996). D'autre part, ces molécules possèdent également des rôles développementaux importants, tels que l'inhibition de la germination des graines non dormantes (Creelman et al., 1997).

Au cours des années, il a été montré que l'OPDA possède également des fonctions signalétiques dans les mécanismes de défense ainsi que dans d'autres processus de

régulation et de développement de la plante (Böttcher et al., 2007). L'OPDA est en effet capable d'activer des gènes de réponse aux stress différents de ceux activés par JA (Taki et al., 2005).

#### **4.2.1.2 Voie de synthèse de l'acide jasmonique**

La synthèse de l'acide jasmonique se déroule dans 3 compartiments différents de la cellule végétale (**Figure 13**). Elle est initiée dans le chloroplaste où des lipases hydrolysent de l'acide  $\alpha$ -linolénique (18 :3) à partir de lipides membranaires tels que les MGDG, les DGDG et les phospholipides. Ensuite, la 13-lipoxygénase (13-LOX) catalyse l'oxydation de la chaîne d'acide gras et produit de l'acide 13(S)-hydroperoxyde octadécatrienoïque (13-HPOT). Celui-ci est transformé en allèle oxyde par l'allèle oxyde synthase (AOS). Le produit formé subit une cyclisation spontanée ou catalysée par l'allèle oxyde cyclase (AOC) et est ainsi transformé en OPDA (Creelman et al., 2002; Schaller et al., 2004, 2008; Buseman et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007; Dave et al., 2012; Nilsson et al., 2016). D'autre part, les lipases peuvent également hydrolyser de l'acide hexadecatrienoïque (16 :3) à partir des lipides membranaires. Cet acide gras peut subir la même voie de synthèse que celle décrite ci-dessus, ce qui mène à la production de dnOPDA, qui possède deux carbones en moins que la molécule d'OPDA (Weber, 1997; Nilsson et al., 2016).

L'OPDA est ensuite transporté dans le peroxysome où il subit d'abord une réduction et ensuite 3  $\beta$ -oxydations afin d'être transformés en acide jasmonique. Le dn-OPDA, quant à lui, subit 2  $\beta$ -oxydations. Celui-ci quitte alors le peroxysome et se retrouve dans le cytosol où il subira des nouvelles modifications afin de former des dérivés : le MeJA et le JA-Ile (Schaller et al., 2004; Nilsson et al., 2016). Il est important de noter que les voies de transport de ces molécules entre les différents compartiments cellulaires ne sont pas encore clairement définies (Schaller et al., 2004).

D'autre part, les dérivés de la lipoxygénase (HPOTs) peuvent également être clivés par une hydroperoxyde lyase (HPL) pour former des aldéhydes à courtes chaînes. En effet, lors du clivage d'un 13-HPOT, il y a production d'un aldéhyde C6 et d'un oxo-acide gras C12. Les aldéhydes C6 sont des volatils ayant des rôles importants dans les réponses de défense chez les plantes. De plus, d'autres enzymes métabolisant les HPOTs ont été découvertes (ex : divinyl éther synthase (DES), peroxygénase, époxy-alcoo synthase). Ces diverses enzymes sont en compétition avec l'AOS pour l'utilisation d'un même substrat (les 13-HPOT), ce qui mène à la formation de nombreuses oxylipines différentes par diverses voies de synthèse (Nilsson et al., 2016).

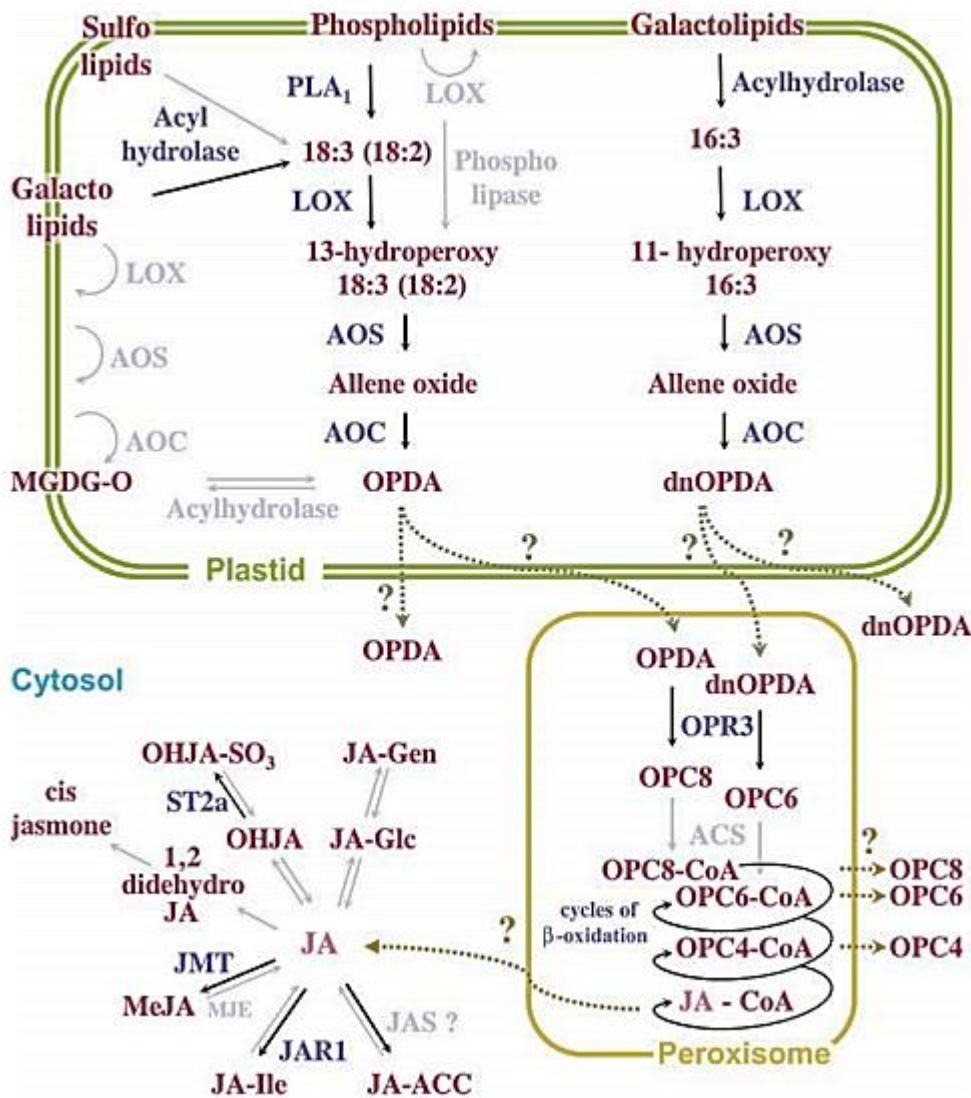


Figure 13 - Voie de synthèse de l'acide jasmonique (Schaller et al., 2004)

#### 4.2.2 Les oxylipines estérifiées chez *Arabidopsis thaliana* L.

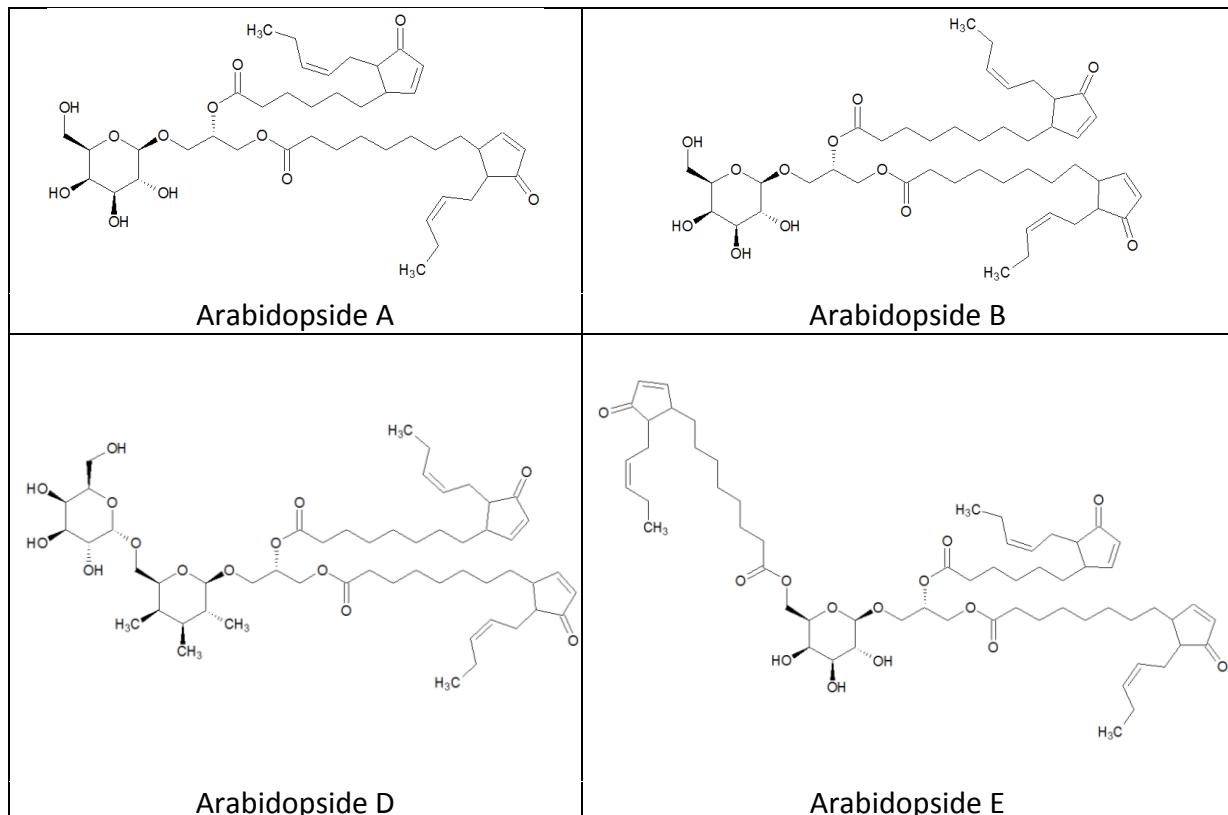
##### 4.2.2.1 Introduction

*Arabidopsis thaliana* L. (*A. thaliana*) est une plante de la famille des *Brassicaceae* qui est largement utilisée comme modèle en biologie végétale de par son cycle de vie court, son génome compact et sa petite taille (Bolle et al., 2011).

Des études récentes ont montré que lorsqu'*A. thaliana* subit un stress biotique ou abiotique, la synthèse de phospholipides oxydés et de galactolipides oxydés contenant des esters d'OPDA et de dnOPDA est induite. Le stress en question peut être une blessure, l'attaque par un pathogène bactérien, l'exposition à une photopériode inadéquate ou encore une trop grande exposition au froid (Dave et al., 2012; Vu et al., 2014; Nilsson et al., 2016).

Les galactolipides oxydés qui s'accumulent ainsi dans la plante sont connus sous le nom d'arabidopsides (Dave et al., 2012; Nilsson et al., 2016). Ceux-ci sont caractérisés par la

même structure de base (**Figure 14**). Ils possèdent tous au moins un galactose, un glycérol ainsi qu'une molécule d'OPDA ou de dnOPDA. En fonction de la présence d'un ou plusieurs galactoses et de molécules d'OPDA/dnOPDA, ils sont nommés différemment (ex : arabidopside A) (Mosblech et al., 2009).



**Figure 14 - Les différentes arabidopsides étudiées dans ce travail**

Les phospholipides oxydés produits, quant à eux, sont des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylglycérols et des phosphatidylcholines contenant du dnOPDA, de l'OPDA, de l'acide 9-hydroxypéroxylinoléique ou de l'acide 9-hydroxylinolénique (Buseman et al., 2006; Vu et al., 2012).

#### 4.2.2.2 *Les arabidopsides*

Les arabidopsides ont été caractérisées chez *A. thaliana* où ils sont produits en grande quantité (Böttcher et al., 2007). Ils sont également synthétisées par *Cirsium arvense*, une plante de la famille des *asteraceae*, lorsque celle-ci est infectée par un pathogène fongique (*Chaetomium cochlioides*) (Hartley et al., 2014). Enfin, il a été montré que ces molécules sont retrouvées en faible quantité dans les plants de blé et de tomate ayant subi un stress (Vu et al., 2014). Cependant, peu d'études se sont intéressées à ces molécules, il est donc possible qu'elles soient présentes dans d'autres espèces végétales.

##### 4.2.2.2.1 Voies de synthèse des arabidopsides

Les arabidopsides sont synthétisés suite à l'oxydation enzymatique des chaînes d'acides gras des MGDG et des DGDG qui sont retrouvés dans les différentes membranes des chloroplastes (membrane externe, interne et membranes des thylakoïdes). Leur voie de

synthèse n'est pas clairement définie et deux hypothèses sont actuellement proposées. La proposition selon laquelle leur formation pourrait être causée par l'estérification rapide, dans les lipides chloroplastiques, d'OPDA nouvellement synthétisé à partir d'acides gras libres n'a pas été infirmée (Mosblech et al., 2009). Cependant, deux études récentes ont montré que les acides gras des MGDG et des DGDG peuvent être directement transformés en OPDA et dnOPDA par les enzymes LOX, AOS et AOC (Nilsson et al., 2012). Cette découverte est très intéressante car la plupart des LOX ne sont capable d'oxyder que des substrats libres. Dans ce cas-ci, la LOX responsable de cette activité a été identifiée, c'est la LOX2 (Nilsson et al., 2016).

Chez *A. thaliana*, l'AOS, codée par un seul locus, est strictement nécessaire à la synthèse d'arabidopsides et de jasmonates. Cette enzyme a été localisée dans l'enveloppe externe des chloroplastes chez l'épinard (Creelman et al., 2002). L'AOC est, quant à elle, codée par 4 gènes. Celles-ci, en collaboration avec l'AOS, permet la synthèse de l'OPDA à partir d'HPOT libre ou estérifié.(Nilsson et al., 2016).

Des études récentes ont montré que la capacité de synthèse et d'accumulation des arabidopsides diffère en fonction des différents écotypes d'*A. thaliana*. En effet, certains d'entre eux accumulent les arabidopsides en plus grande quantité et plus rapidement. La capacité de production d'arabidopsides est en fait influencée par l'activité de certaines enzymes telle que l'*hydroperoxyde lyase 1* (HPL1) qui régule l'accumulation de galactolipides contenant de l'OPDA chez Arabidopsis (Nilsson et al., 2016).

Certaines études ont montré que le profil en arabidopsides varie au cours du temps. Les taux d'arabidopsides A et B augmentent durant les premières minutes après le stress avant de décroître lentement. D'autre part, la concentration en arabidopsides E et G dans la plante augmente pendant les 30 premières minutes après le stress avant d'atteindre un seuil maximal au détriment des arabidopsides A et B (Nilsson et al., 2016).

#### 4.2.2.2 Rôles des arabidopsides

Les rôles des arabidopsides ne sont pas clairement définis. Toutefois, ces molécules sont produites par les plantes soumises à un stress (Böttcher et al., 2007) et en fonction du stress le profil en molécules produites est différent. Par exemple, la quantité de MGDG oxydés produites lors d'une blessure (wounded 45 min) est presque 10 fois plus importante que lors qu'un stress dû à une congélation (freezing). De plus, lors d'une blessure, 2 composés sont majoritairement produits alors que lors d'une congélation, le profil obtenu est plus diversifié (**Figure 15**) (Vu et al., 2012). Il est donc fortement probable qu'elles interviennent dans les mécanismes de défense des plantes.

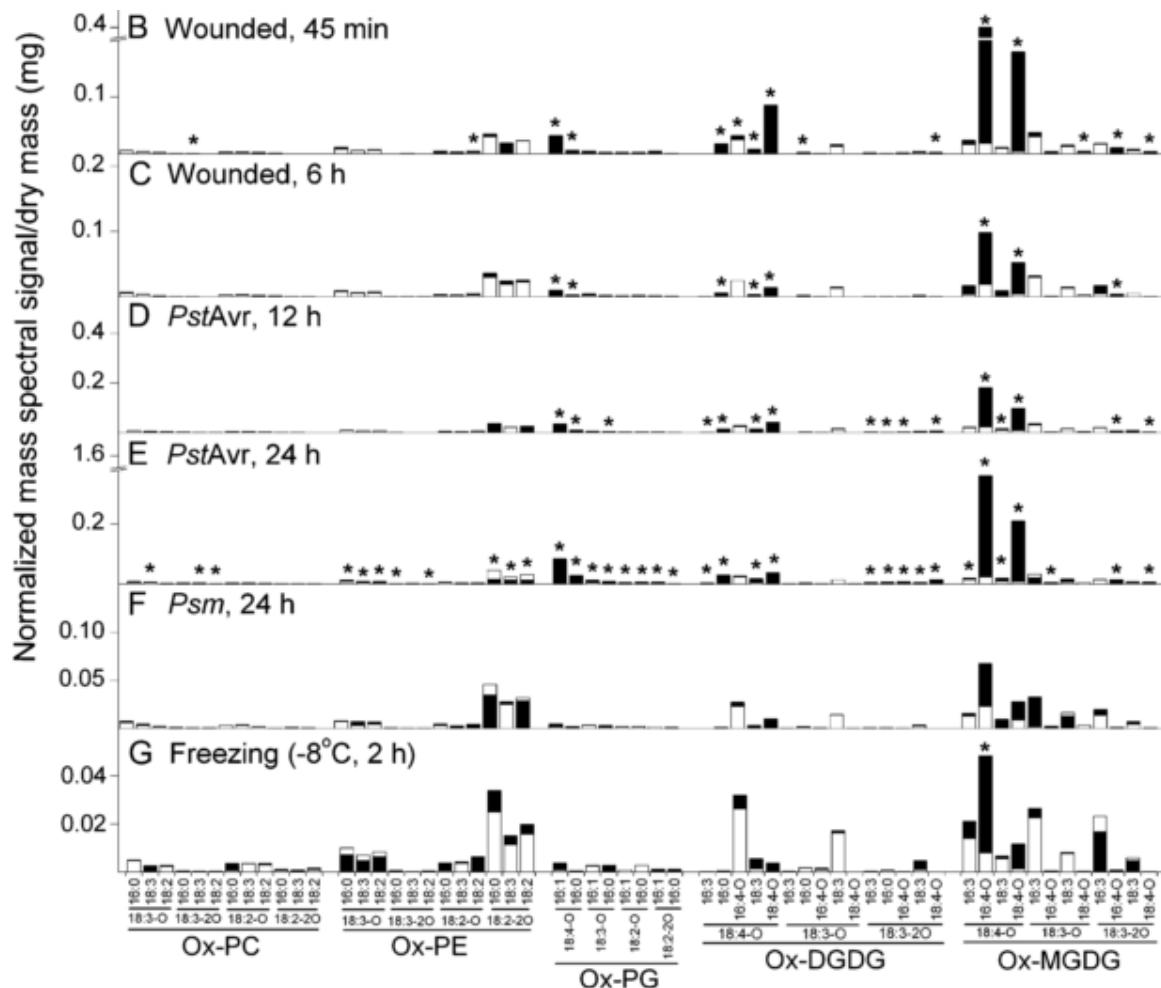


Figure 15 - Profil en oxylipines en fonction du stress appliqué à la plante (Vu et al., 2012)

Une première hypothèse est proposée selon laquelle ces molécules pourraient servir de réserve d'OPDA et/ou de dnOPDA qui, soit activeraient directement des voies de signalisation, soit serviraient de substrat pour la production d'acide jasmonique (Dave et al., 2012). D'autre part, des études ont montré que certains arabidopsides ont une action directe sur la croissance de pathogènes. Il est donc possible que lors d'une infection, les pathogènes se retrouvent en contact avec les molécules qui affecteraient leur croissance. L'arabidopside E est, par exemple, capable d'inhiber la croissance de la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* (Andersson et al., 2006). De plus, il a été montré que la croissance du champignon pathogène *Botrytis cinerea* est réduite de moitié lorsque celui-ci se trouve en présence d'arabidopsides E et G alors que l'OPDA libre n'a aucun effet (Kourtchenko et al., 2007).

Les arabidopsides jouent également des rôles divers dans la croissance et le développement des plantes. Par exemple, l'arabidopside A possède un rôle de promoteur de sénescence. En effet, la présence de cette molécule induit une diminution de la quantité de chlorophylle contenue dans les chloroplastes des feuilles (Hisamatsu et al., 2006).

Hisamatsu et al. (2005) ont également mis en évidence l'effet d'inhibition de la croissance des racines lors de la présence d'arabidopsides A, B et D. Ces molécules sont en effet capable de réduire de 30 pourcents la croissance des racines de cresson à une concentration de  $5 \times 10^{-5}$  mol/L (Hisamatsu et al., 2005).

Les arabidopsides semblent avoir des rôles diversifiés dans la régulation du développement des plantes ainsi que dans leur immunité. Cependant, peu d'entre elles ont été caractérisées. Des études plus précises semblent donc nécessaire afin de mieux connaître les mécanismes d'action de ses molécules et d'ainsi mieux comprendre les défenses mises en place par les plantes

## B. Objectifs

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet FIELD qui a pour but de promouvoir la recherche concernant les mécanismes de défense des plantes afin de mieux comprendre ceux-ci. Un autre objectif du projet est de découvrir de nouvelles molécules végétales permettant d'améliorer la résistance des plantes aux pathogènes et aux ravageurs. Une meilleure connaissance des mécanismes de défense, des molécules produites et de leurs voies de synthèse est importante dans la mise au point d'alternatives aux pesticides chimiques utilisés de nos jours. En effet, cette connaissance pourra permettre la conception de produits plus ciblés ayant moins d'effets secondaires sur l'environnement et sur la santé humaine.

Dans le cadre de ce travail de fin d'études, une attention particulière a été portée à des molécules produites par *A. thaliana* lors d'un stress, les arabidopsides. Ces molécules spécifiques ont été peu étudiées jusqu'à présent. Aucune méthode analytique permettant d'analyser ces molécules par hplc n'a été développée et validée. De plus, les seules méthodes validées se basaient sur l'analyse des esters méthyliques d'OPDA et de dn-OPDA nécessitant une dérivatisation. Ce type de méthode ne permet donc pas de faire la différence entre les différents arabidopsides.

Le premier objectif de ce travail est donc de permettre une meilleure détection ainsi qu'une quantification de ces molécules sans étape de dérivatisation. Cela permettra de détecter les arabidopsides et non pas leurs esters méthyliques. La mise au point de cette méthode de quantification nécessite une extraction et une purification efficaces de ces molécules, celles-ci n'étant pas disponibles commercialement. L'étape de purification va donc être optimisée afin d'isoler ces molécules de manière efficace.

Afin de localiser ces molécules dans la cellule, différents types de membranes sont purifiés et analysés. Une fois la méthode de quantification mise au point, il est possible de déterminer dans quels types de membranes cellulaires les arabidopsides sont présents. La connaissance de leur localisation est une information essentielle qui permettra de mieux cibler et de mieux comprendre leurs voies de synthèse.

## C. Matériels et méthodes d'analyse

### 1 Détermination de la concentration des solutions standards d'arabidopsides A, B et D par RMN<sup>1</sup>H

L'analyse RMN<sup>1</sup>H des solutions standards d'arabidopsides préparées par l'année précédente par Manon Genva a été réalisée dans le Laboratoire de Chimie Biologique Structurale de l'Université de Liège. Le spectromètre utilisé est un Avance III HD brucker 400 mHz.

La fenêtre spectrale est de 8012 Hz, le temps d'acquisition de 4 secondes et le temps de relaxation de 10 secondes. Le nombre de scans effectué est de 64. La température utilisée pour les analyses quantitatives est de 25 °C. Le tétraméthylsilane (TMS), à une concentration de 0.03 % en masse, est utilisé comme standard interne (**Figure 16**).

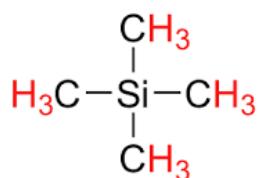


Figure 16 - Structure du tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme standard interne en RMN

### 2 Obtention des molécules d'intérêt

Les différentes étapes nécessaires à l'obtention des arabidopsides sont reprises dans la figure ci-dessous (**Figure 17**) et détaillées dans les points suivants.

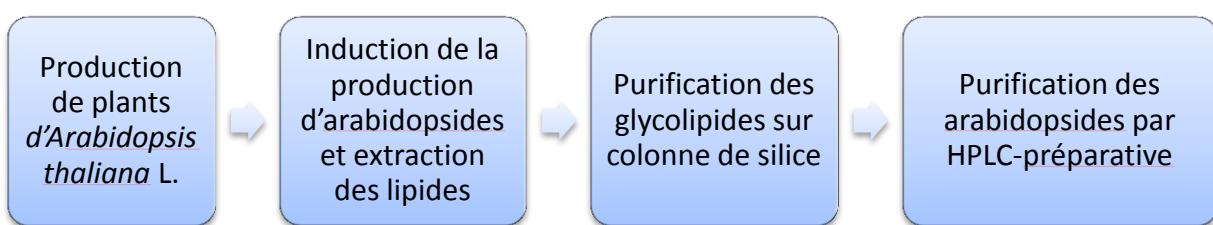


Figure 17 - Etapes nécessaires à l'obtention des arabidopsides chez *Arabidopsis thaliana* L.

#### 2.1 Production de plants d'*Arabidopsis thaliana* L.

Les plants d'*A. thaliana* Columbia 0 (col 0) utilisés lors de ce travail ont été cultivés dans la serre du département de Biologie Végétale de la faculté de Gembloux Agro Bio-Tech. Les plants ont été cultivés sous conditions lumineuses contrôlées afin d'avoir 10 heures de

luminosité par jour dans du terreau *DCM ECOTERRA semis et bouture*. Après 8 à 10 semaines de culture, les feuilles sont prélevées.

## 2.2 Induction de la production d'arabidopsides et extraction des lipides.

Environ 100 g de feuilles d'*A. thaliana* col 0 sont congelées pendant 30 secondes par mise en contact avec de l'azote liquide. Les feuilles décongèlent ensuite pendant 30 minutes. Une fois décongelées, les feuilles sont broyées avec 200 mL de mix BuMe conservé à 4°C (butanol (LiChrosolv): méthanol (Biosolve)(3 :1) + 0.05 %(w : v) butylhydroxytoluène (Sigma)) pendant 3 fois 10 secondes en chambre froide. Le mélange est mis sur un agitateur orbital en chambre froide pendant 30 minutes puis filtré sur Büchner à température ambiante. Le liquide est récupéré et soumis à une séparation liquide-liquide. Lors de celle-ci, il y a ajout de 200 mL d'heptane (Acros) : acétate d'éthyle (Acros) (3 :1) puis de 200 mL d'une solution ddH<sub>2</sub>O contenant 2% d'acide acétique (v : v). La phase aqueuse est ensuite ré-extraiet avec 300 mL d'heptane : acétate d'éthyle (3 :1). Les deux phases organiques obtenues sont mélangées et évaporées au rotoévaporateur avec le bain à 40°C. Après évaporation, les résidus sont suspendus dans 30 mL de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) (Scharlau).

Pour des raisons pratiques, certaines extractions ont été réalisées sur les feuilles congelées par mise en contact avec de l'azote liquide et conservées plusieurs jours à -20 °C.

Le même mode opératoire a été suivi pour les échantillons servant de blanc. Cependant, pour ne pas induire la production d'arabidopsides, les feuilles n'ont pas été décongelées avant l'étape de broyage.

## 2.3 Purification des glycolipides sur colonne de silice

Les glycolipides présents dans les échantillons sont purifiés sur une colonne constituée de 6 g de silice (Lichroprep Si60 15-25 µm) ayant préalablement été conditionnée par le passage de 50 mL de chloroforme.

L'échantillon dissous dans du chloroforme est ensuite déposé sur la colonne. L'élution des glycolipides se réalise par passage de plusieurs éluants. Tout d'abord, il y a élution de 150 mL de CHCl<sub>3</sub> : acétone (Scharlau) (9 :1) permettant d'éliminer les lipides non polaires non désirés. 100 mL de CHCl<sub>3</sub> : acétone (7 :3) sont ensuite passés sur la colonne permettant la récupération de la fraction 1. La fraction 2, quant à elle, est récupérée lors de l'élution de 100 mL d'acétone : méthanol (9 :1). Pour finir, l'élution de 100 mL de méthanol permet la récupération des phospholipides et le lavage de la colonne.

Les différentes fractions sont séchées sous flux d'azote, diluées dans quelques mL de méthanol et conservées au congélateur à -20 °C.

## 2.4 Purification des arabidopsides par HPLC-préparative

Les fractions 1 et 2 obtenues précédemment ont été évaporées, remises dans un volume connu de méthanol afin d'obtenir une concentration entre 50 et 100 mg/mL puis filtrées à l'aide de filtres PTFE 0,45 µm. Ensuite, elles ont été purifiées par HPLC-préparative.

L'HPLC-préparative utilisée (PuriFlash 430) est équipée d'un détecteur UV permettant une détection entre 200 et 600 nm. Elle s'équipe également d'une colonne à adapter selon les molécules étudiées.

Dans ce cas-ci, il s'agit d'une colonne upisphere C18-2 15 µm. L'élution, 20 mL/min, est réalisée à l'aide d'un gradient d'acétonitrile (ACN) (Scharlau) et d'H<sub>2</sub>O mQ (**Figure 18**). La détection, quant à elle, est réalisée à 220 nm.

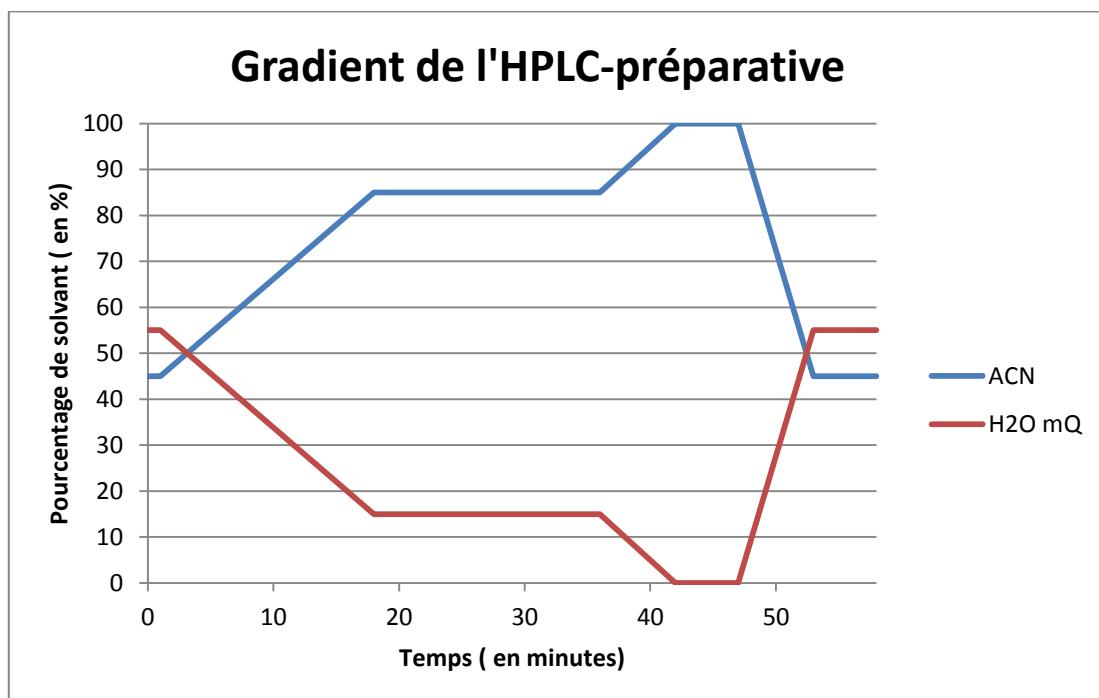


Figure 18 - Gradient final de l'HPLC-préparative

La purification par HPLC-préparative a été optimisée lors de ce travail. Les différentes étapes de cette optimisation seront donc détaillées dans la partie résultats et discussion.

### **3 Mise au point de la méthode de détection et de dosage par HPLC-MS et HPLC-UV**

#### **3.1 Optimisation des paramètres de détection des arabinosides par spectrométrie de masse en infusion directe**

Un spectromètre de masse (esquire HCT, Bruker) à orbitrap a été utilisé pour détecter les arabinosides. Celui-ci étant un MSMS, il est possible de sélectionner les ions possédant une masse particulière (ion précurseur) dans la première partie du spectromètre et les ions résultants de sa fragmentation dans la deuxième partie du spectromètre. Cette méthode est connue sous le nom de SRM (selected reaction monitoring).

Les échantillons, dissous dans du méthanol contenant 0,1 % d'acide formique, sont ionisés par ESI.

Lors de l'analyse en infusion directe, le débit de la pompe est de 200 µL/h.

L'identité des arabinosides a été confirmée par spectrométrie de masse (MS). Comme dit plus haut, il est possible d'isoler un pic et de le fragmenter. Cette fragmentation permet de confirmer l'identité du pic en analysant les fragments obtenus par MSMS et les fragments composants la molécule.

Afin de fragmenter la molécule détectée tout en gardant le pic correspondant à l'ion moléculaire, la fragmentation ne doit pas être trop violente. C'est pourquoi l'amplitude servant à la fragmentation a été fixée à 0,40.

Les paramètres de détection de la MS ont été optimisés afin de permettre la détection des arabinosides.

#### **3.2 Optimisation du gradient de la HPLC-MS**

Une HPLC (Agilent 1100) équipée d'une colonne en phase inverse C18 GL Inertsil ODS-3, 100 x 3,0 mm et 3 µm de granulométrie est couplée avec la MS utilisée plus haut. Le volume d'injection est de 2 µL. L'élution à un débit de 0,250 mL est réalisée grâce à un gradient d'ACN : H<sub>2</sub>O mQ (85 :15) à une concentration de 12mM de formiate d'ammonium (solvant A) et d'H<sub>2</sub>O mQ à une concentration de 12mM de formiate d'ammonium (solvant B) (**Figure 19**).

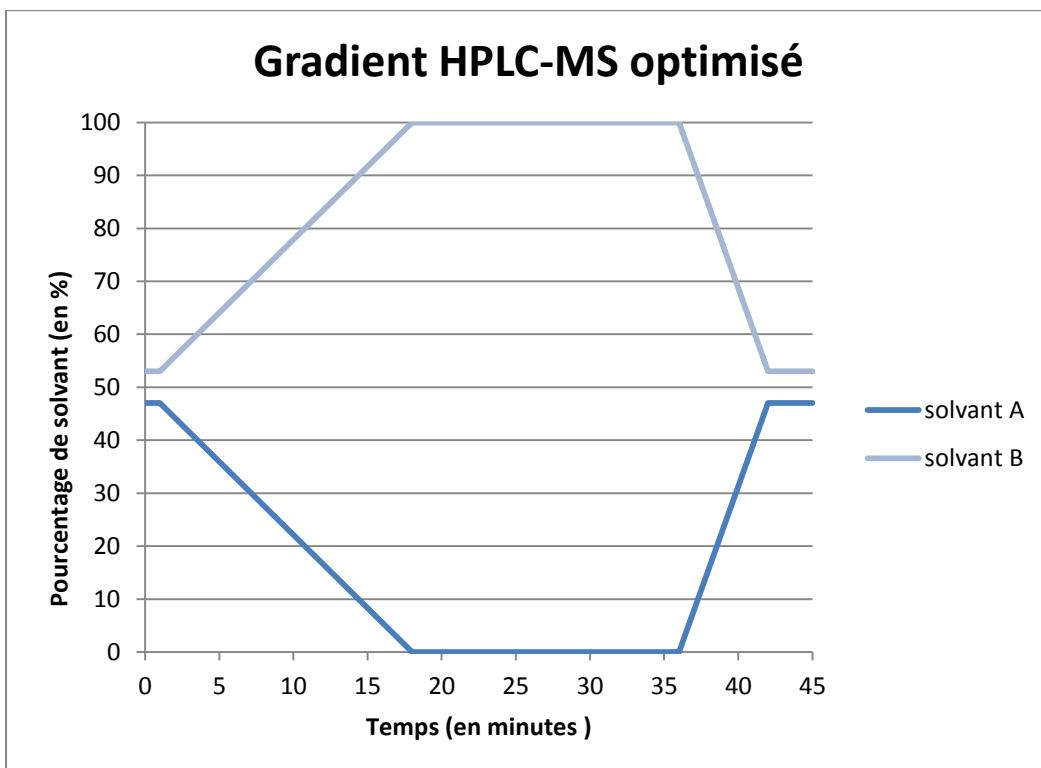


Figure 19 - Gradient optimisé de l'HPLC-MS. Le solvant A correspondant à une solution ACN : H<sub>2</sub>O (85 :15) à 12mM de formiate d'ammonium et le solvant B à de l'H<sub>2</sub>O mQ à 12 mM de formiate d'ammonium.

Le gradient ainsi que les solvants utilisés ont été optimisés afin de permettre une meilleure séparation et ainsi une meilleure détection des arabidopsides. Les optimisations apportées pour obtenir ce gradient seront donc détaillées dans la partie D « résultats et discussion ».

### 3.3 Dosage par HPLC-UV

L'HPLC utilisée pour le dosage des arabidopsides est une Agilent Technologies 1260 Infinity équipée d'une colonne en phase inverse C18 (GL Inertsil ODS-3, 100 x 3,0 mm et 3 µm de granulométrie). L'élution est réalisée grâce à un gradient d'ACN et d'H<sub>2</sub>O à un débit de 0,250 mL/min. Le gradient utilisé est celui résultant de l'optimisation de la détection par HPLC-MS. (voir Figure 19). La détection est réalisée à 220 nm et le volume d'injection est de 2 µl.

Afin de permettre la quantification de l'arabidopside A dans les différentes matrices, une droite d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution standard dont la concentration a été déterminée par analyse RMN (voir point 4.1.).

### 3.4 Validation de la méthode de dosage

La validation des performances analytiques de la méthode de dosage mise au point a été réalisée selon la directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996. Ainsi, la gamme de linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la sélectivité ainsi que l'effet de matrice ont été étudiés.

## 4 Localisation sub-cellulaire des arabinosides chez *Arabidopsis thaliana* L.

### 4.1 Analyse des membranes des chloroplastes

Les différentes étapes nécessaires à l'analyse des membranes des chloroplastes sont reprises dans la **Figure 20**.

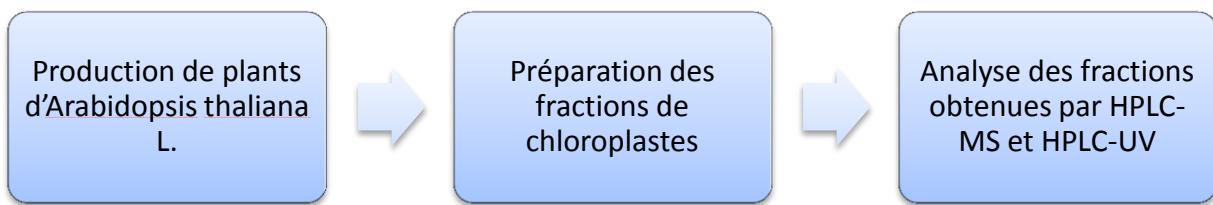


Figure 20 - Etapes nécessaires à l'analyse des membranes des chloroplastes.

#### 4.1.1 Production de plants d'Arabidopsis thaliana L.

Les plants utilisés pour l'analyse des membranes des chloroplastes sont cultivés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (1.1.1). Cependant, dans ce cas-ci, les plants utilisés sont âgés de 4 à 6 semaines. De plus, les plantes ont été stockées en chambre noire pendant la nuit avant l'extraction afin de forcer la plante à consommer l'amidon présent dans ses feuilles. En effet, sans cette étape, il est très difficile d'obtenir des chloroplastes entiers.

#### 4.1.2 Préparation de fractions de chloroplastes

La veille de l'extraction, une solution de 2X AGR (Arabidopsis grinding buffer), 100mM MOPS-KOH pH 8 (Fisher bioreagent), 4mM EGTA (VWR Chemical), 0.66M mannitol (VWR Chemical) et 1 % BSA (Sigma), doit être préparée et conservée à -20°C.

Toutes les étapes suivantes ont été réalisées en chambre froide ou sur glace afin d'éviter toute dégradation due aux enzymes présentes dans les cellules végétales. De plus, les solutions utilisées étaient préalablement refroidies à 4°C.

Le jour de l'extraction, des gradients de percoll sont obtenus en mélangeant 15 mL de percoll (GE Healthcare) avec 15 mL de 2XAGR et en centrifugeant le mélange pendant 30 minutes à 38700 g à 4°C sans frein (centrifugeuse Avanti J-E, Beckman Coulter) (rotor JA-14, Beckman).

Les feuilles sont congelées avec de l'azote liquide durant 30 secondes puis sont laissées à décongeler pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être broyées plusieurs fois pendant 5 secondes avec du 1X AGR en chambre froide. Le mélange obtenu est ensuite filtré sur Büchner avec un filtre en tissu. Le filtrat est centrifugé pendant 3 minutes à 3000 g à 4°C (avec frein). Les pellets sont suspendus dans 1 à 2,5 mL de 1XAGR puis déposés sur le gradient de percoll préparé précédemment (pas plus de 10 mL par gradient).

Les tubes ainsi préparés sont centrifugés 10 minutes à 4°C à 7700g sans frein. Différentes fractions sont ainsi obtenues (**Figure 21**).

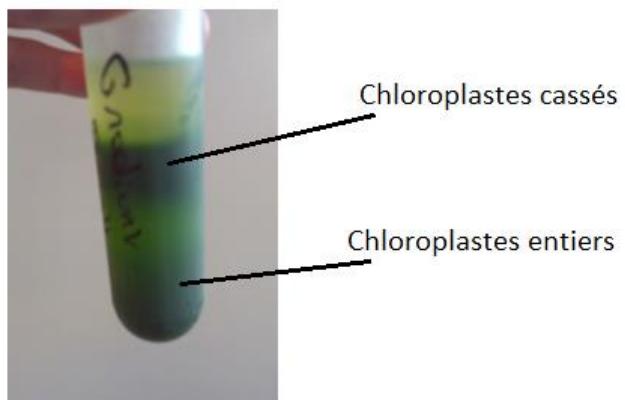


Figure 21 - Tubes obtenus après centrifugation contenant différents couches de compositions différentes.

La première fraction verte foncée dans le haut du tube contient les chloroplastes cassés et est éliminée. La couche de chloroplastes intacts se trouvant plus bas est récupérée à la pipette et transférée dans un tube de centrifugation. De l'1XAGR est ajouté dans le tube pour obtenir un volume de plus ou moins 30 mL. Le tout est centrifugé 5 minutes à 1500g à 4°C.

Les culots obtenus sont suspendus et mélangés dans, au total, 6 mL de tampon d'éclatement à pH 7.6 contenant 0.021 g MOPS, 0.0038 g MgCl<sub>2</sub> (Sigma), 0.0017 g PMSF (AppliChem) et 0.0058 g d'acide caproïque.

Du sucre (Sigma) est ajouté au mélange afin d'obtenir une concentration de 0,2 M et le tout est centrifugé 3 minutes à 3000g à 4°C. Le surnageant contient le stroma et les membranes externes et internes des chloroplastes. Le pellet contient, quant à lui, les thylakoïdes. Ce-dernier est lavé avec 1 mL de tampon d'éclatement et est recentrifugé.

#### 4.1.3 Analyse des fractions obtenues par HPLC-MS et HPLC-UV

Les lipides contenus dans les deux fractions obtenues précédemment ont été extraits par une séparation liquide-liquide. Celle-ci est effectuée avec une solution d'heptane : acétate d'éthyle (3 :1) et une solution ddH<sub>2</sub>O contenant 2% d'acide acétique (v : v).

Les fractions obtenues sont tout d'abord analysées en HPLC-MS afin de détecter la présence potentielle d'arabidopsides. Une analyse par HPLC-UV est ensuite effectuée afin de doser les arabidopsides présents dans l'échantillon.

#### 4.1.4 Analyse des fractions obtenues par GC-FID

L'analyse par GC-FID des fractions obtenues permet de mettre en évidence la présence de lipides dans celle-ci. En effet, les membranes étant composées de lipides et de protéines dans un ratio molaire pouvant aller de 50:1 à 100:1, les fractions obtenues doivent contenir

des lipides (Buchanan et al., 2015). Si des lipides ne sont pas présents dans une des fractions, cela signifie que le fractionnement a mal été effectué. Cette étape permet donc d'avoir la certitude que les fractions contiennent bien des membranes végétales.

Il s'agit, dans ce cas-ci, d'une analyse qualitative et non pas d'un dosage ou d'une détermination de la composition des fractions.

#### 4.1.4.1 Dérivatisation

Les lipides présents dans les échantillons doivent être dérivatisés avant leur analyse par GC afin de les rendre volatils. Ainsi, les acides gras seront analysés sous la forme d'esters méthyliques.

Une goutte de la phase organique des fractions obtenues précédemment est mélangée à 0,2 mL d'hexane et à 0,5 mL de solution A (méthanol : hexane (Biosolve) : BF<sub>3</sub> (Aldrich) à 14 % massique (55 : 20 : 25) (v : v)). Après une incubation de 90 minutes à 75°C, 0,5 mL de NaCl saturé (Fisher Chemical), 0,2 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10 % (v:v) (Sigma) sont ajoutés. Quelques millilitres d'hexane ajoutés permettent de diluer l'échantillon afin d'obtenir la concentration voulue. La phase hexane est récupérée et sera analysée par GC-FID par la suite.

#### 4.1.4.2 Analyse par GC-FID

L'appareil utilisé est une GC-FID (Agilent 6890) équipée d'une colonne varia CP9205, 0,25µm x 250 mm x 30 m. Le débit est de 1,7 mL/min.

Le détecteur FID est à une température de 260 °C et le volume d'injection est de 0,5 µL.

### 4.2 Analyse des membranes plasmiques

Les différentes étapes permettant l'analyse des membranes plasmiques sont reprises dans la **Figure 22** et sont détaillées par la suite.

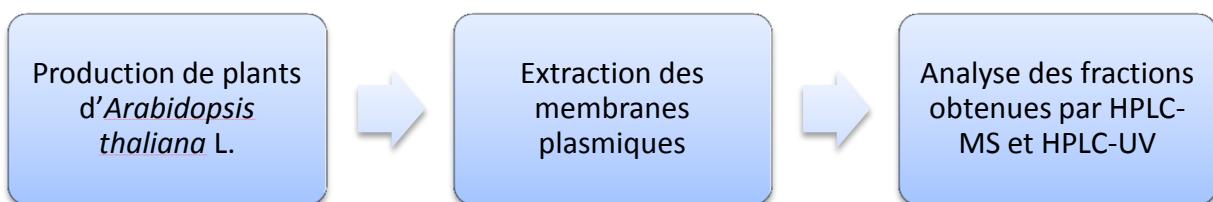


Figure 22 - Etapes nécessaires à l'analyse des membranes plasmiques.

#### 4.2.1 Production de plants d'Arabidopsis thaliana L.

Les plants utilisés pour l'analyse des membranes plasmiques sont cultivés dans les mêmes conditions que celle du point 4.1.1. Cependant, dans ce cas-ci, les plants utilisés sont âgés de 4 à 6 semaines. En effet, il est important d'utiliser des plants « jeunes » pour réaliser un fractionnement cellulaire.

#### **4.2.2 Extraction des membranes plasmiques**

L'extraction des membranes plasmiques a été réalisée dans le Laboratoire de Biogenèse Membranaire associé avec le CNRS et l'Université de Bordeaux.

#### **4.2.3 Analyse des fractions obtenues par LCMS et HPLC-UV**

Les fractions obtenues sont tout d'abord analysées en LCMS afin de détecter la présence potentielle d'arabidopsides. Une analyse par HPLC-UV est ensuite effectuée afin de doser les arabidopsides s'ils sont présents dans l'échantillon.

## D. Résultats et discussion

### 1 Détermination des concentrations des solutions standards en arabidopsides A, B, D et E par RMN<sup>1</sup>H

L'ajout de TMS à une concentration connue dans les échantillons permet de déterminer leur concentration en utilisant la formule ci-dessous (Equation 1):

$$\text{Concentration en molécules} = \frac{N_{TMS}}{N_{\text{molécule}}} \times \frac{\text{Aire pic choisi pour la molécule}}{\text{Aire pic du TMS}} \times \text{Concentration en TMS}$$

Le pic présent à 1 ppm correspond au TMS et sert de référence pour déterminer les aires des autres pics. L'aire du pic de TMS est donc fixée à 1.

Le pic choisi pour la détermination de la concentration des arabidopsides en solution et le pic présent entre 6,2 et 6,15 ppm. Il correspond aux protons des carbones éthyléniques du cycle présent dans l'OPDA et le dn-OPDA.

Le N correspond au nombre d'hydrogène équivalent à ceux du pic analysé dans la molécule. Pour le TMS, N vaut 12 et pour les arabidopsides étudiées dans ce travail, N vaut 2.

#### 1.1 Solution standard d'arabidopside A

Le spectre proton obtenu pour l'arabidopside A correspond à la **Figure 23**. La **Figure 24**, quant à elle, correspond aux pics utilisés pour déterminer la concentration de la solution.

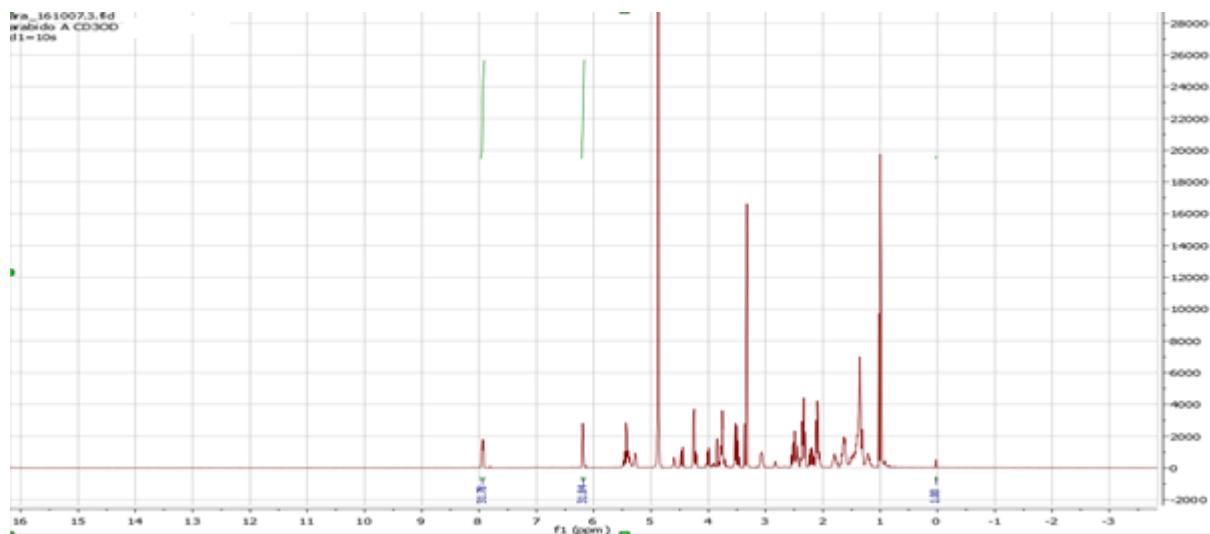


Figure 23 - Spectre proton RMN obtenu pour l'arabidopside A

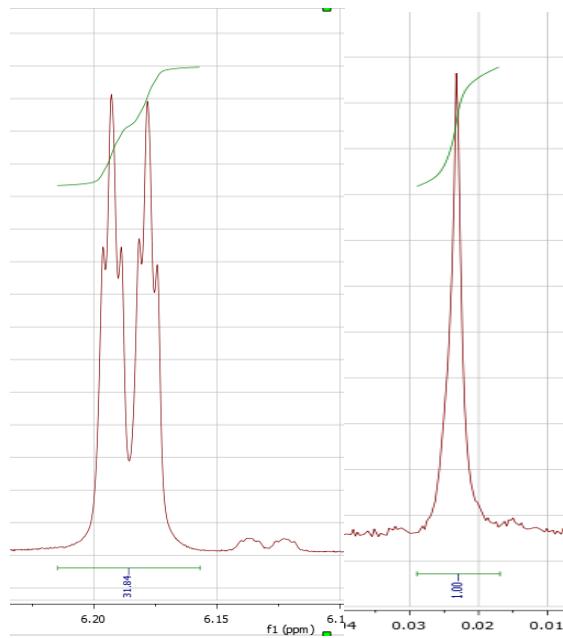


Figure 24 - Zoom du pic entre 6,2 et 6,15 ppm et du pic correspondant au TMS

$$\text{Concentration en arabidopside A} = \frac{12}{2} \times \frac{31.84}{1} \times 301,96 \times 10^{-6} = 0,05769 \text{ mole/L}$$

Afin d'obtenir une concentration en g/L, la concentration molaire calculée est multipliée par la masse molaire du composé qui est de 774,98 g/mole. La concentration de la solution standard d'arabidopside A est de 44,7 g/litre.

## 1.2 Solution standard d'arabidopside B

Le spectre proton obtenu pour l'arabidopside B correspond à la Figure 25. La Figure 26, quant à elle, correspond aux pics utilisés pour déterminer la concentration de la solution.

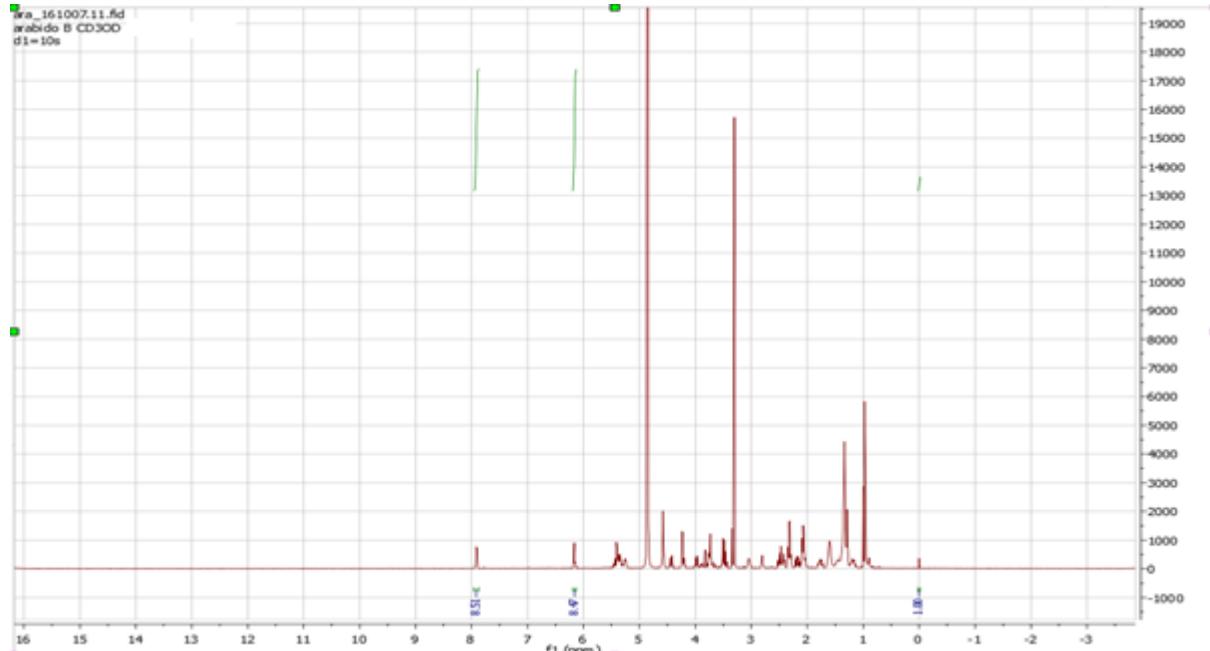
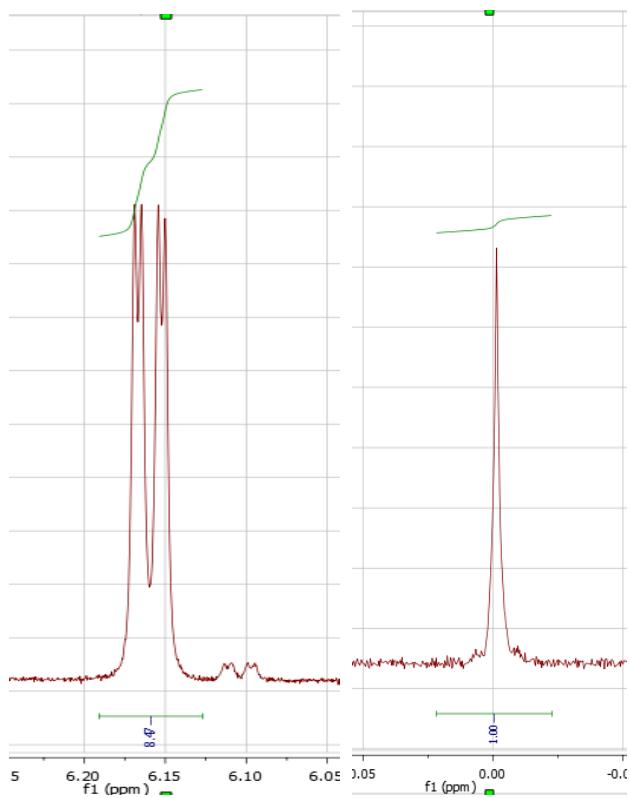


Figure 25 - Spectre RMN obtenu par l'arabidopside B



**Figure 26 - Zoom du pic entre 6,2 et 6,15 ppm et du pic correspondant au TMS**

$$\text{Concentration en arabidopside B} = \frac{12}{2} \times \frac{8,47}{1} \times 301,96 \times 10^{-6} = 0,01535 \text{ mole/L}$$

La masse molaire de l'arabidopside B étant de 803,3 g/mole, la concentration de la solution standard d'arabidopside B est de 12,32 g/L.

### 1.3 Solution standard d'arabidopside D

Le spectre proton obtenu pour l'arabidopside D correspond à la **Figure 27**. La **Figure 28**, quant à elle, correspond aux pics utilisés pour déterminer la concentration de la solution.

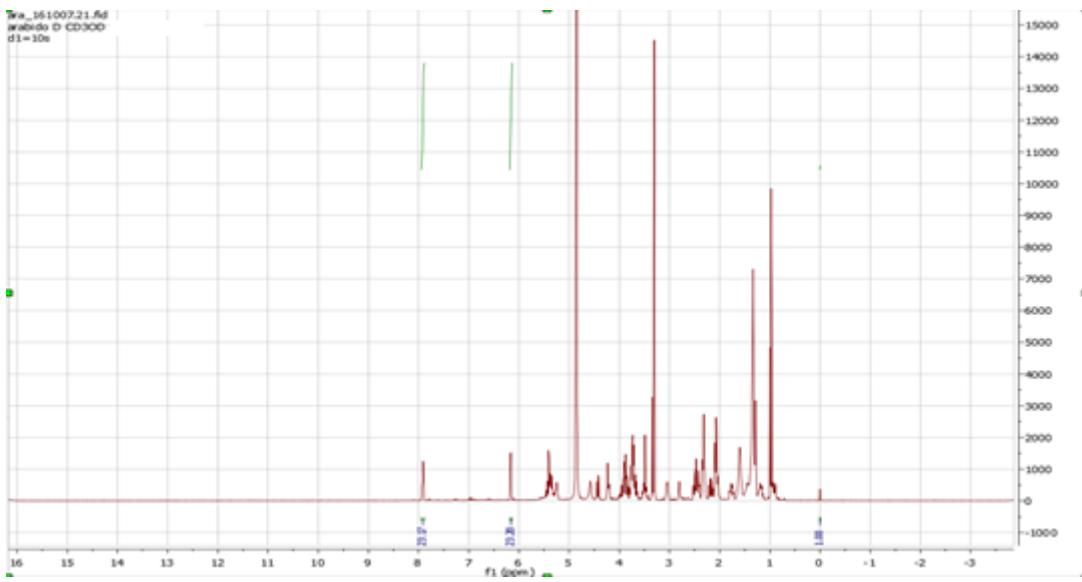


Figure 27 - Spectre RMN obtenu pour l'arabidopside D

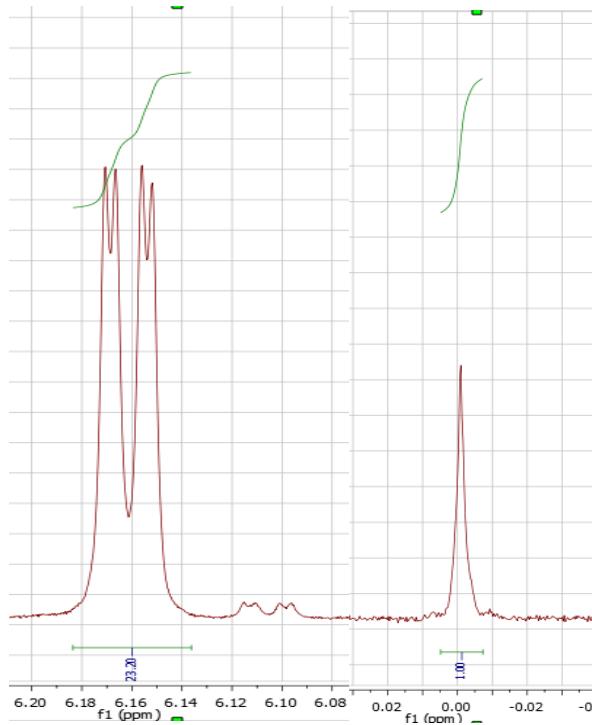


Figure 28 - Zoom du pic entre 6,2 et 6,15 ppm et du pic correspondant au TMS

$$\text{Concentration en arabidopside D} = \frac{12}{2} \times \frac{23,2}{1} \times 301,96 \times 10^{-6} = 0,04203 \text{ mole/L}$$

La masse molaire de l'arabidopside D étant de 965,14 g/mole, la concentration de la solution standard d'arabidopside D est de 40,57 g/L.

## 1.4 Solution standard d'arabidopside E

La solution standard d'arabidopside E n'était malheureusement pas assez pure pour pouvoir être analysée en RMN. Cette solution ne peut donc être utilisée qu'à titre indicatif mais pas à titre quantitatif. Elle sera tout de même utilisée pour déterminer le temps de rétention de cette molécule lors d'analyses HPLC-MS et HPLC-UV.

## 2 Optimisation des paramètres de détection des arabidopsides par spectrométrie de masse en infusion directe

Dans un premier temps, des échantillons d'arabidopside A purs ont été analysés par spectrométrie de masse en infusion directe afin d'optimiser les paramètres de détection de la trappe à ion. Comme le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de notre composé avec un adduit d'hydrogène est de 775,5  $m/z$ , les paramètres ont été optimisés pour cette masse précise dans un premier temps. Cependant, malgré des concentrations assez importantes en arabidopside A (100 ppm), le pic lui correspondant n'était pas présent sur les spectres obtenus (**Figure 29**).

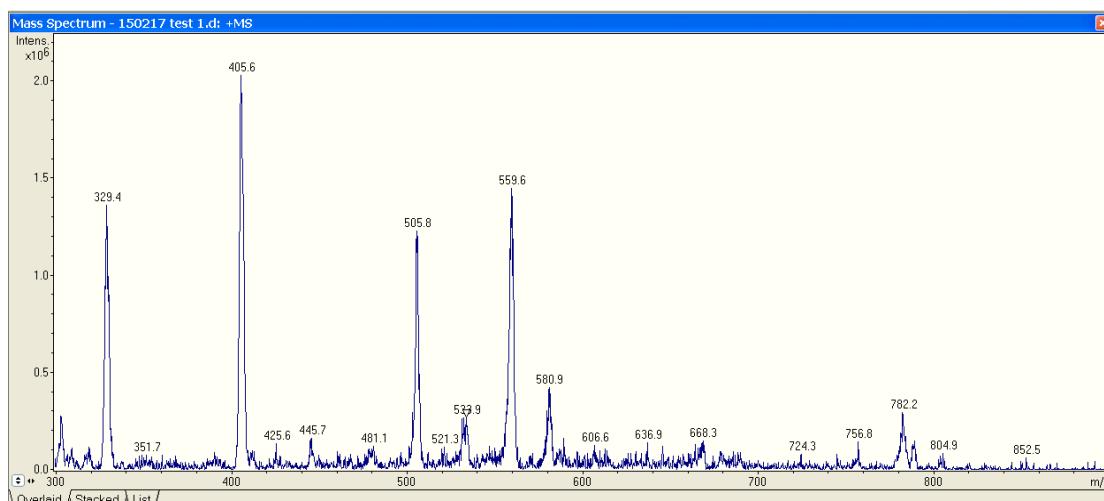
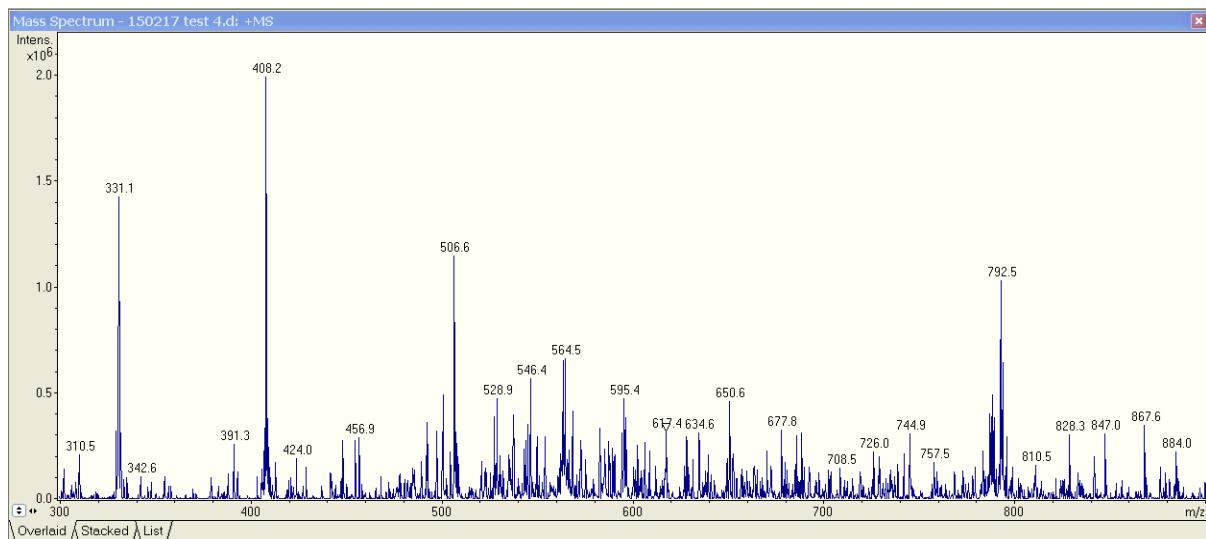


Figure 29 - Spectre MS obtenu par infusion directe pour une solution 100 ppm d'arabidopside A.

Ce résultat peut être expliqué par la possibilité que les arabidopsides ne s'ionisent pas assez bien pour être détectées. En effet, d'après Vu et al., les galactolipides ont besoin de la présence de  $\text{NH}_4^+$  dans leur environnement pour s'ioniser. De l'acétate d'ammonium (UCB) a donc été ajouté aux échantillons d'arabidopside A à une concentration de 15 mM (Vu et al., 2014). De plus, la trappe à ions a été optimisée pour un rapport masse sur charge de 792.5  $m/z$  correspondant à l'arabidopside A avec un incrément de  $\text{NH}_4^+$ . La **Figure 30** montre que l'ajout d'acétate d'ammonium permet l'ionisation de l'arabidopside A et sa détection par la MS.



**Figure 30 - Spectre MS obtenu par infusion directe pour une solution 100 ppm d'arabidopside A après ajout d'acétate d'ammonium dans l'échantillon.**

L'utilisation d'une MSMS permet de fragmenter les pics détectés. Le pic détecté à une  $m/z$  de 792.5 a été fragmenté afin de vérifier qu'il s'agissait bien de l'arabidopside A. La **Figure 31** montre l'ion parent (**A**) et les fragments obtenus suite à la fragmentation (**B**). Les fragments et la structure à laquelle ils correspondent sont présentés dans le tableau suivant (**Tableau 2**).

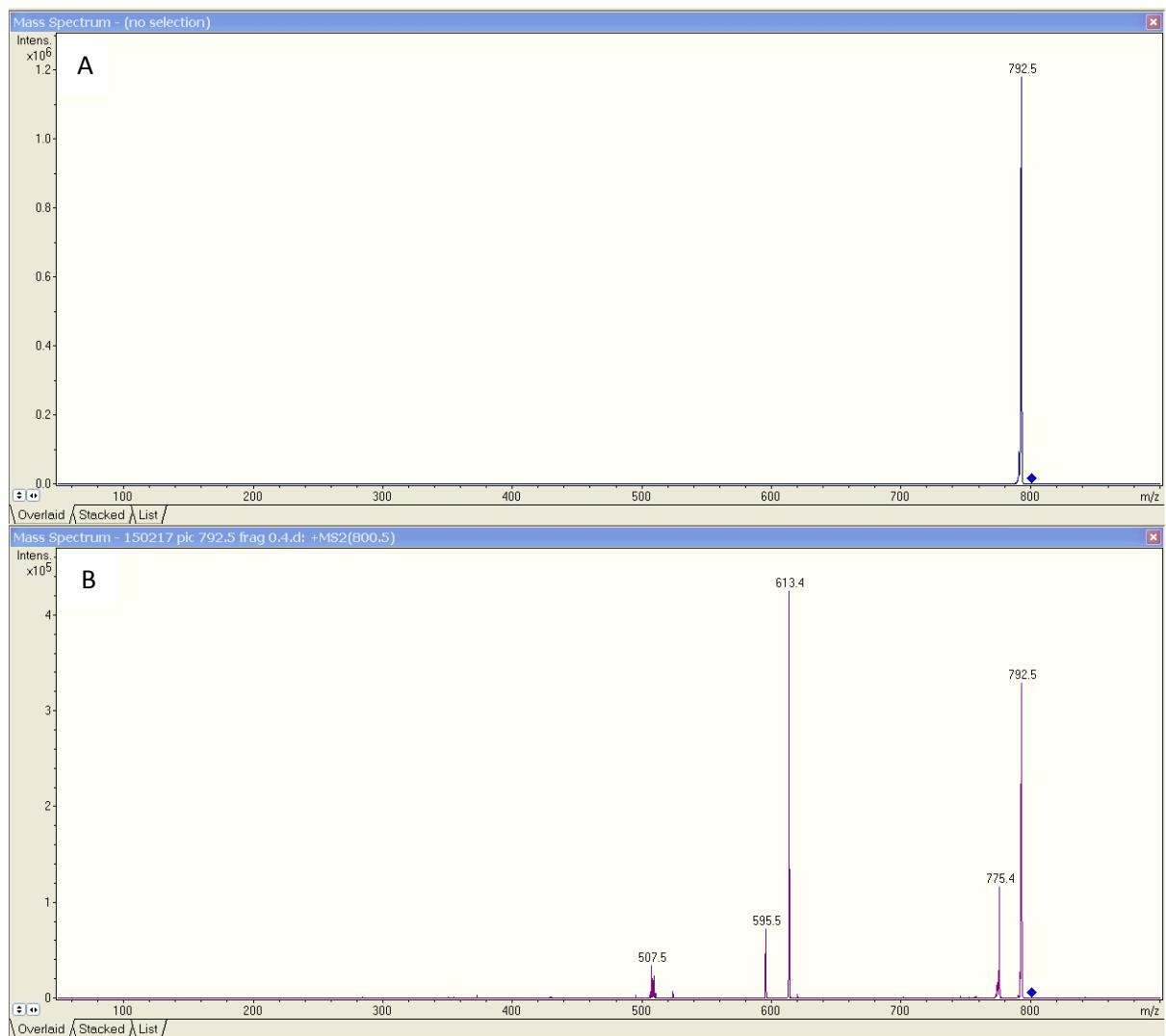


Figure 31 - Spectres MS obtenus lors de l'isolation et de la fragmentation du pic à 792.5 m/z

Tableau 2 - Fragments pouvant être formés à partir de l'arabidopside A

Masse détectée	Formule	Fragment
<b>813.487</b>	C <sub>43</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub> K <sup>+</sup>	[M+K <sup>+</sup> ]+
<b>797.447</b>	C <sub>43</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub> Na <sup>+</sup>	[M+Na <sup>+</sup> ]+
<b>792.465</b>	C <sub>43</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]+
<b>775.465</b>	C <sub>43</sub> H <sub>67</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	[M+H <sup>+</sup> ]+
<b>613.418</b>	C <sub>37</sub> H <sub>57</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ]+
<b>595.405</b>	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O]+
<b>367.250</b>	C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	M- C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> ]+
<b>349.238</b>	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M- C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O]+
<b>339.221</b>	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	[M- C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> ]+
<b>321.221</b>	C <sub>19</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M- C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>1</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O]+
<b>293.214</b>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O <sub>9</sub> ]+
<b>275.203</b>	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[M- C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O]+
<b>265.186</b>	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> ]+
<b>247.171</b>	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O]+

Une fois la molécule d'intérêt détectée efficacement par la machine, les paramètres de la trappe à ions ont été optimisés afin de diminuer le bruit de fond et d'augmenter l'intensité des pics caractéristiques de l'arabidopside A. La température de la source d'ionisation a également été étudiée afin d'obtenir l'ionisation la plus efficace possible.

Les paramètres obtenus sont repris dans la **Figure 32**.

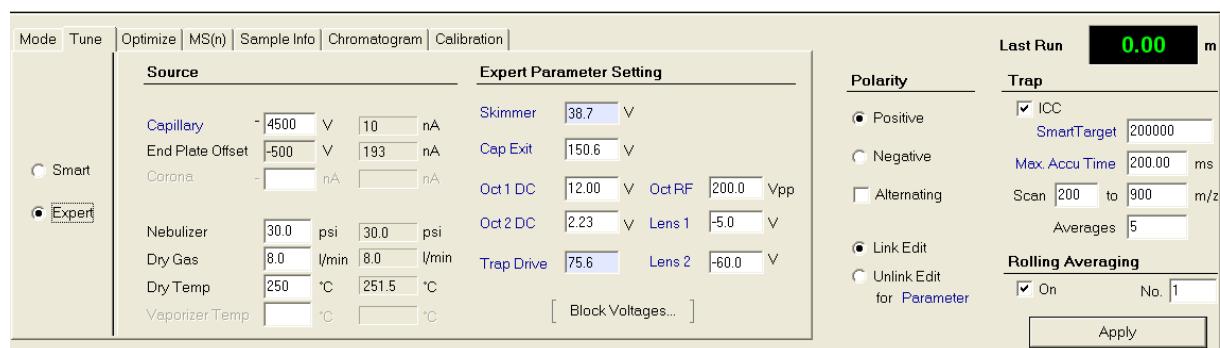


Figure 32 - Paramètres de détection de la MS optimisés pour arabidopside A en infusion directe.

Il était important de vérifier que la méthode mise au point permettait également la détection des arabidopsides B, D et E. C'est pourquoi des solutions standards de ces molécules ont également été analysées en infusion directe. Les arabidopsides D et E ayant un ion moléculaire de masse supérieure à 900 m/z, il a été nécessaire d'agrandir la fenêtre

de détection de la MS afin de pouvoir les analyser. La fenêtre d'analyse couvre maintenant les masses allant de 200 à 1100 m/z.

Chaque molécule a été fragmentée afin de vérifier qu'il s'agissait bien de la molécule voulue. Les résultats ont confirmé la détection des 3 autres arabidopsides ainsi que leur identité. Les spectres obtenus pour les solutions standards ainsi les tableaux comprenant les fragments se trouvent en annexe.

### 3 Optimisation du gradient de la HPLC-MS

Une fois les arabidopsides correctement détectées par la trappe à ion, l'HPLC a été raccordé à la MS. L'objectif étant d'être capable d'analyser des échantillons complexes en séparant les différents constituants sur la colonne et en donnant une indication sur leur masse afin d'y détecter la présence d'arabidopsides.

Afin de permettre l'ionisation des molécules, de l'acétate d'ammonium a été ajouté aux solvants. Celui-ci n'étant pas soluble dans l'acétonitrile, un mélange eau : acétonitrile a été utilisé. De l'acide formique (Fluka Analytical) est également ajouté.

Lors des analyses, il est apparu que les solvants n'étaient pas stables au cours du temps et que la préparation de mélanges tampons était nécessaire. Du formiate d'ammonium a donc été utilisé à la place de l'acétate d'ammonium (Analar). La composition finale des solvants est reprise dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 - Composition des solvants utilisés en HPLC-MS.

Solvant A	Solvant B
H <sub>2</sub> O mQ à 15mM de formiate d'ammonium + 0,2 % acide formique (v : v)	ACN : H <sub>2</sub> O mQ 85 :15 (v:v) à 15mM de formiate d'ammonium + 0,2 % acide formique (v : v)

La composition des solvants ayant été optimisée, il fut nécessaire de mettre au point le gradient (**Figure 33**).

## Gradient HPLC-MS optimisé par rapport à la composition des solvants

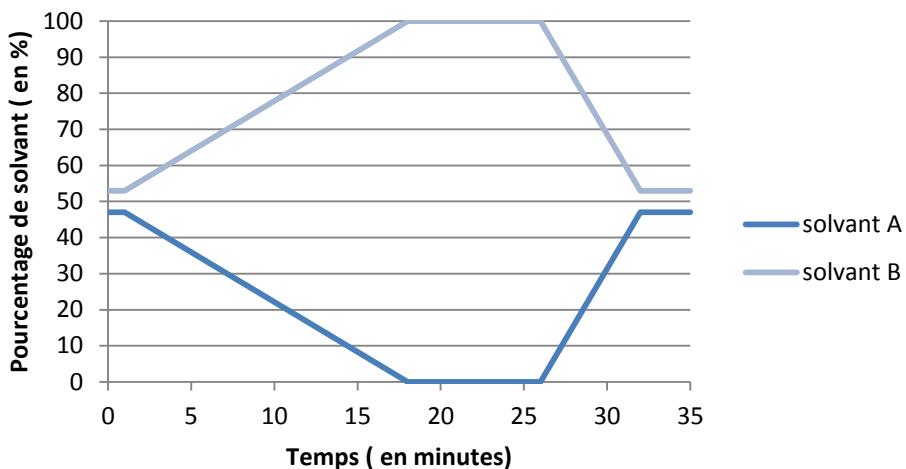


Figure 33 - Gradient optimisé en fonction de la nouvelle composition des solvants pour l'HPLC-MS.

En utilisant ce gradient, les arabidopsides A, B et D peuvent respectivement être détectés après 17,1 minutes (Figure 34), 17,7 minutes (Figure 35) et 15,6 minutes (Figure 36).

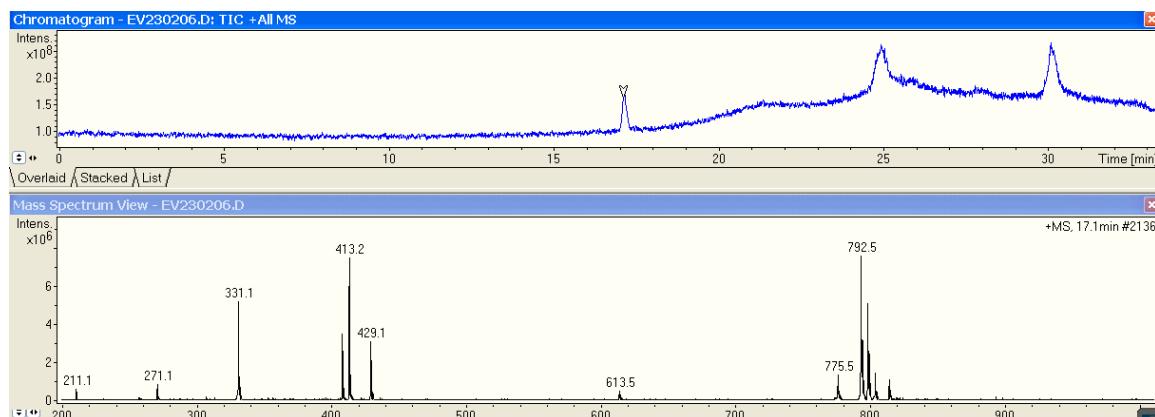


Figure 34 - Spectre HPLC-MS obtenu pour l'arabidopside A.

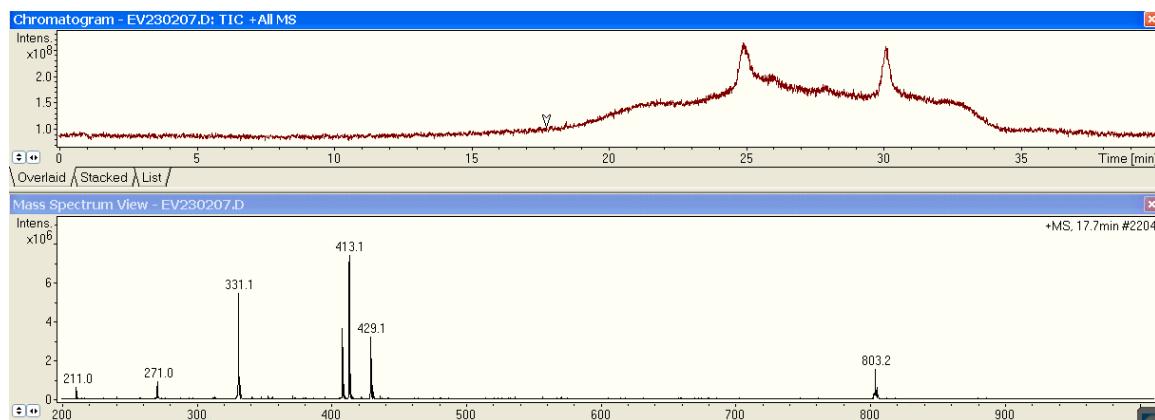


Figure 35 - Spectre HPLC-MS obtenu pour l'arabidopside B.

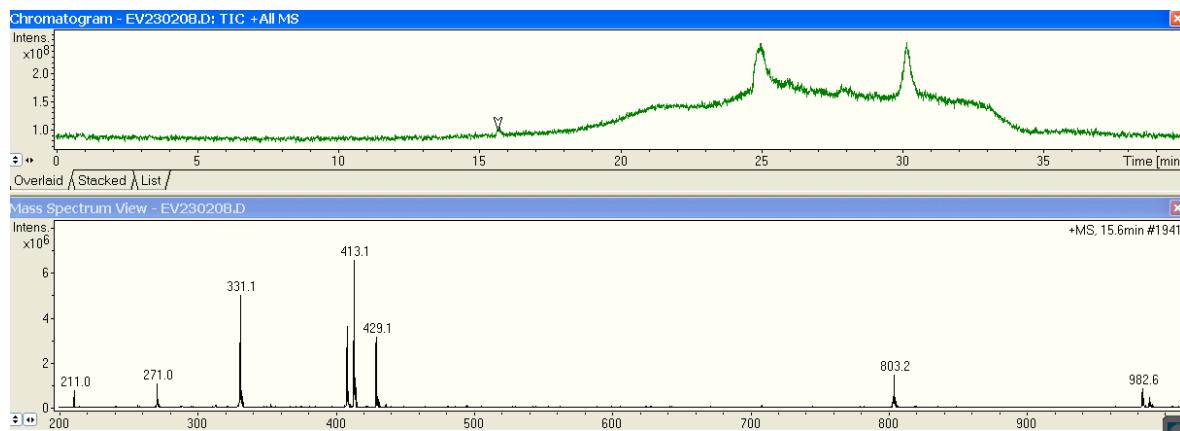


Figure 36 - Spectre HPLC-MS obtenu pour l'arabidopside D.

Cependant, le gradient utilisé n'a pas permis l'élution de l'arabidopside E. La méthode a donc dû être modifiée pour permettre la détection de cette molécule et un nouveau gradient a donc été mis au point (**Figure 37**).

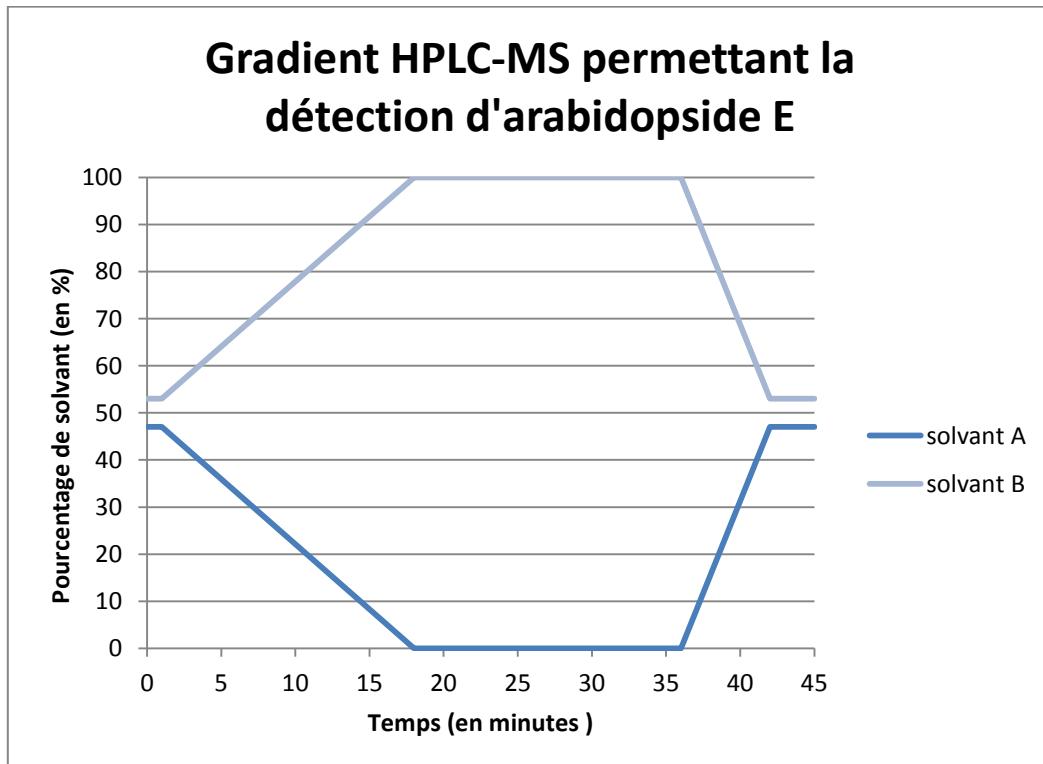


Figure 37 - Gradient HPLC-MS optimisé pour permettre la détection de l'arabidopside E.

L'utilisation de ce gradient permet la détection de l'arabidopside E après 33,6 minutes d'élution (**Figure 38**). De plus, la méthode ayant seulement été allongée, les temps de rétention des arabidopsides A, B et D n'ont pas été modifiés.

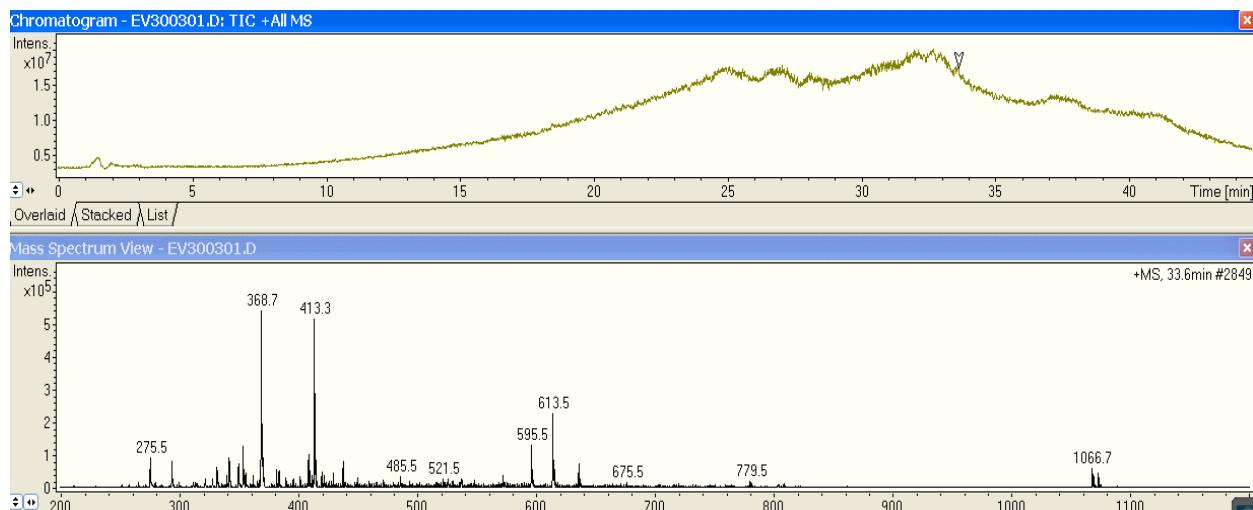


Figure 38 - Spectres HPLC-MS obtenu pour une solution d'arabidopside E.

Grâce à la méthode HPLC-MS mise au point, il est désormais possible de détecter les arabidopsides A, B, D et E dans des matrices variées. Il n'est cependant pas encore possible de les quantifier. En effet, L'HPLC-MS étant très sensible, elle est également relativement instable et ne permet pas de conserver des paramètres fixes sur de longues périodes. C'est pourquoi le dosage des arabidopsides est réalisé par HPLC-UV.

#### **4 Mise au point de la méthode de quantification des arabidopsides par HPLC-UV**

Afin de permettre la quantification des arabidopsides, il était important de déterminer comment les détecter. La spectrométrie de masse étant trop instable, il a été décidé d'utiliser une détection par UV. En effet, les arabidopsides absorbent en UV (220 nm) grâce au cycle présent dans leur structure ainsi qu'aux doubles liaisons conjuguées présentes dans leurs chaînes. Dans le cadre de ce travail, une méthode a été mise au point afin de quantifier l'arabidopside A.

Le gradient utilisé est basé sur celui de l'HPLC-MS (**Figure 38**) afin de garder les mêmes temps de rétention pour les molécules étudiées tout en tenant compte de la modification de la composition des solvants (**Figure 39**).

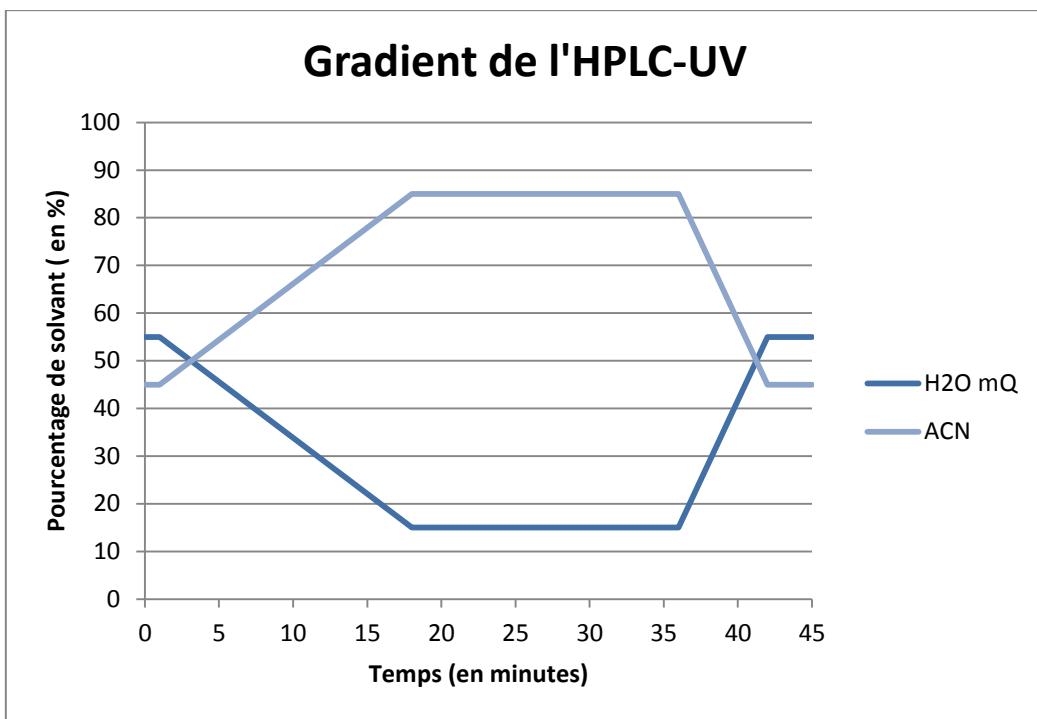


Figure 39 - Gradient utilisé pour l'HPLC-UV.

Les arabidopsides étant des molécules complexes et difficilement synthétisables, il est difficile de trouver une molécule pouvant servir de standard interne. En effet, il n'existe pas de forme deutérée commercialisée de ces molécules. De plus, il est délicat de trouver une molécule pouvant servir de standard et n'étant pas présente dans les échantillons, ceux-ci étant relativement complexes. Un test a donc été réalisé afin de déterminer si le signal détecté en UV est assez stable afin de ne pas devoir utiliser de standard interne.

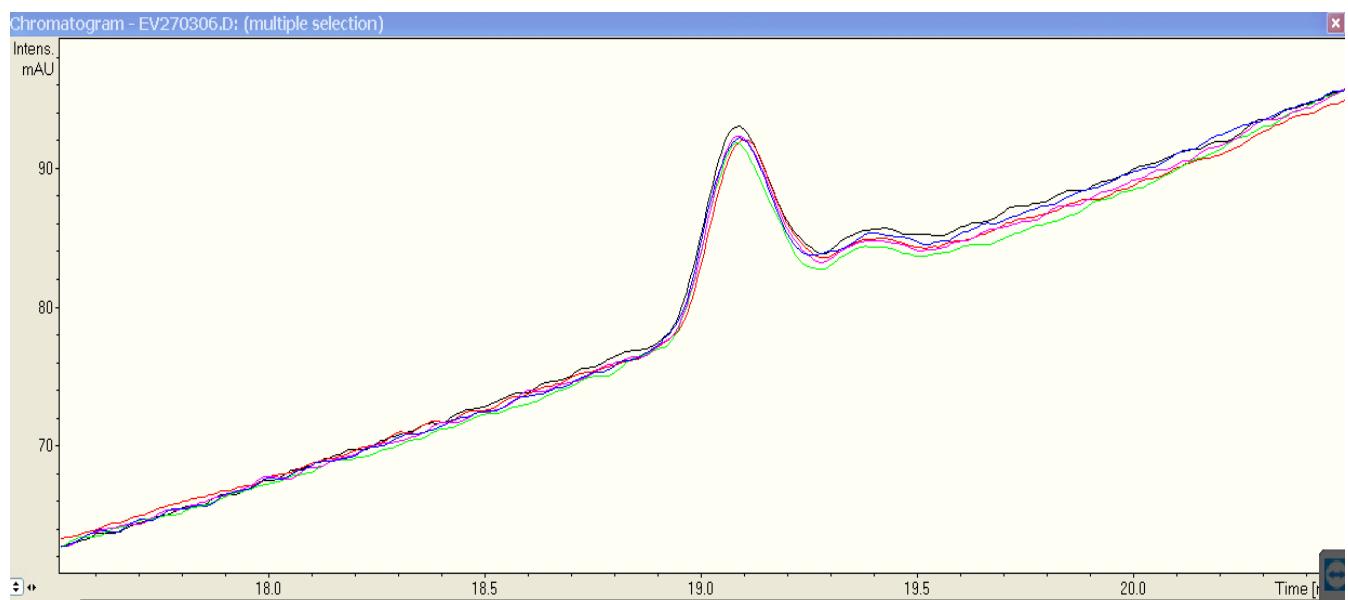


Figure 40 - Spectres UV obtenus lors de l'analyse répétée d'une solution standard contenant 100ppm d'arabidopside A.

**Tableau 4 - Résultats obtenus pour les tests de répétition**

Répétitions	Aire du pic
1	191
2	185
3	179
4	187
5	189
6	186
<b>Moyenne</b>	186
<b>Écart-type</b>	4

La superposition des spectres obtenus pour la même concentration en arabidopside A indique que le signal obtenu en UV est assez stable pour être utilisé comme moyen de quantification (**Figure 40**) (**Tableau 4**). Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser de standard interne.

Une droite d'étalonnage a été établie à partir de la solution standard d'arabidopside A dont la concentration a été déterminée précédemment. Sept solutions à des concentrations connues d'arabidopside A ont été préparées (0 ;12,5 ;25 ;50 ;100 ;150 ;200 ppm) afin d'obtenir une droite d'étalonnage (**Figure 41**).

## 5 Validation de la méthode analytique

### 5.1 Linéarité

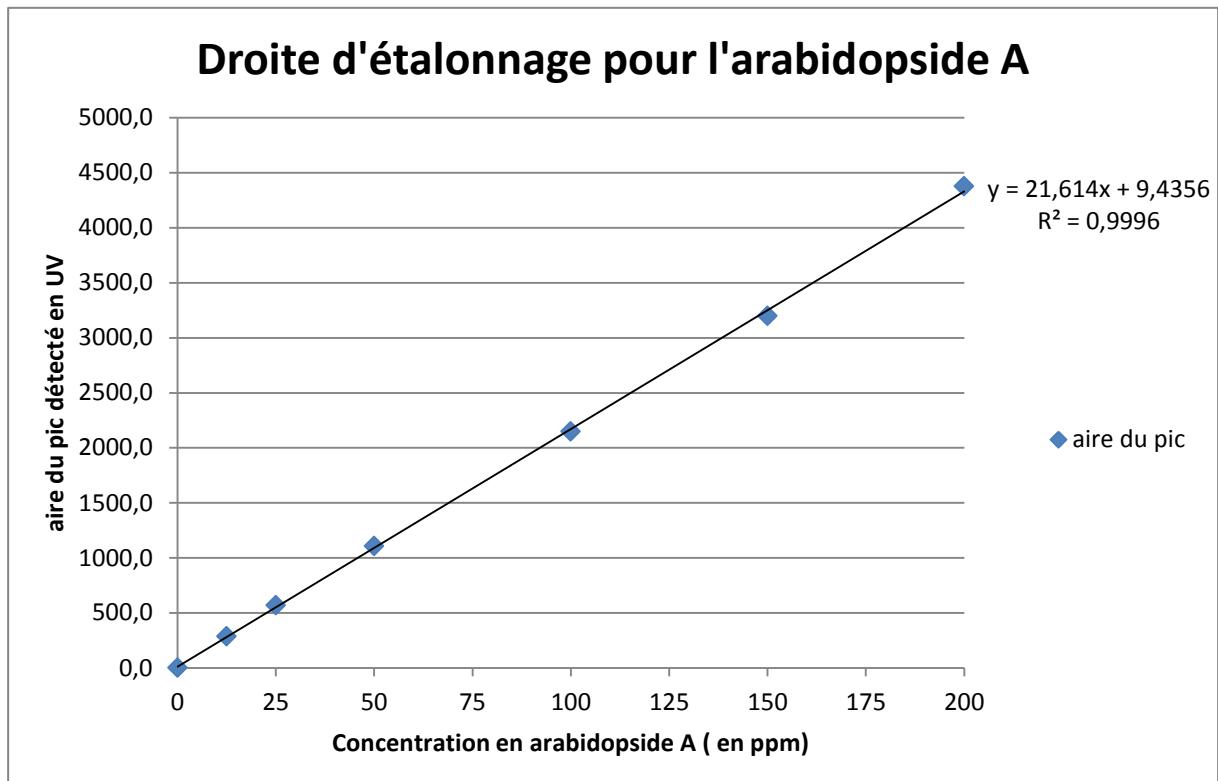


Figure 41 - Droite d'étalonnage obtenue par HPLC-UV pour l'arabidopside A.

La linéarité d'une droite d'étalonnage est reflétée par son coefficient de détermination ( $R^2$ ). En effet, pour être dans le domaine de linéarité, il est nécessaire d'obtenir un  $R^2$  supérieur à 0,995. Pour la droite d'étalonnage correspondant à l'arabidopside A, le  $R^2$  obtenu est de 0,9996. Les concentrations choisies sont donc comprises dans le domaine de linéarité.

### 5.2 Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité est déterminée, pour chaque concentration de la droite de calibrage présentée plus haut, en étudiant les coefficients de variations (CV), rsd en anglais, obtenus sur des analyses ayant eu lieu le même jour, à partir de la même solution-mère, par le même opérateur et sur la même machine.

Les coefficients de variation théoriques à ne pas dépasser sont obtenus grâce à la formule suivante :

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Dans laquelle C représente la fraction pondérale exprimée en puissance. Par exemple, 1mg/kg correspond à un C de  $10^{-6}$ .

Dans le **Tableau 5** ci-dessous sont repris les CV théoriques acceptables et les CV obtenus lors des analyses.

**Tableau 5 - CV théoriques et calculés permettant d'étudier la répétabilité de la méthode mise au point**

Concentration en arabidopside A (en ppm)	CV théoriques	CV obtenus
0	/	/
12,5	10,94	6,7
25	9,86	6,4
50	8,88	5,4
100	8	7,2
150	7,53	3,7
200	7,21	6,0

Les résultats montrent que les CV obtenus pour la répétabilité sont en dessous de valeurs maximales tolérées. Les critères de répétabilité sont donc remplis.

La reproductibilité est également déterminée en étudiant les coefficients de variation obtenus mais dans ce cas-ci, les CV calculés se rapportent à des droites ayant été effectuées des jours différents (**Tableau 6**).

**Tableau 6 - CV théoriques et calculés permettant d'étudier la reproductibilité de la méthode mise au point**

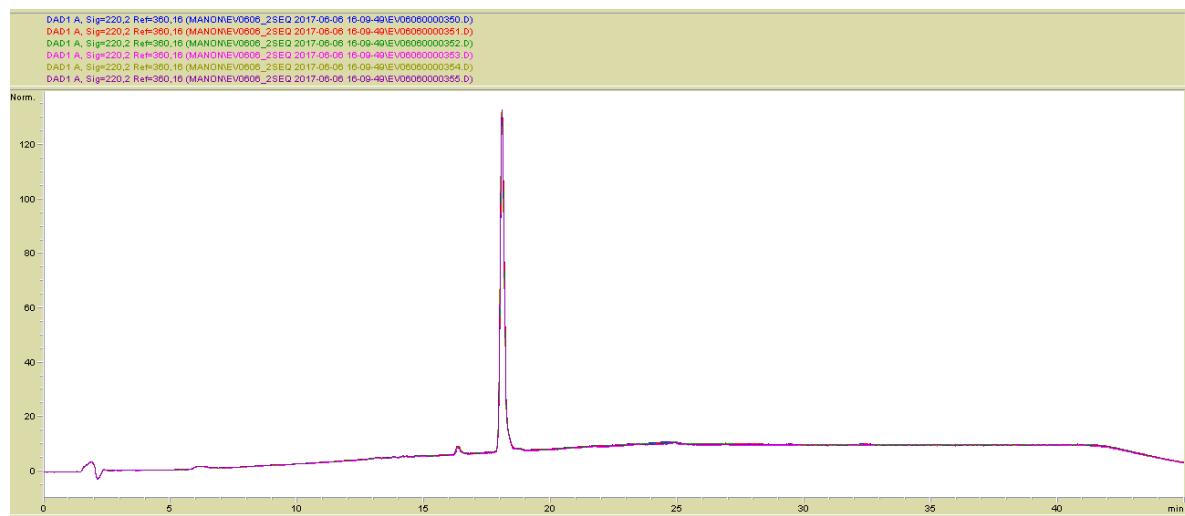
Concentration en arabidopside A (en ppm)	CV théoriques	CV obtenus
0	/	/
12,5	10,94	5,9
25	9,86	2,3
50	8,88	6,2
100	8	3,8
150	7,53	7,4
200	7,21	2,8

Les CV obtenus pour la reproductibilité sont également en dessous des valeurs maximales tolérées. Les résultats montrent donc que la méthode de quantification développée dans ce travail est répétable et reproductible.

### 5.3 Spécificité

La spécificité est déterminée par la précision avec laquelle la méthode mise au point parvient à détecter la molécule étudiée. Pour cela, il est nécessaire que le temps de rétention correspondant à la molécule d'intérêt ne varie pas d'une analyse à l'autre. En effet, si le temps de rétention de la molécule à doser varie de trop, il peut être difficile de doser celle-ci dans des matrices plus complexes.

Afin de déterminer cette spécificité, une solution standard à 50 ppm d'arabidopside A a été analysée plusieurs fois par HPLC-UV afin de définir les variations de temps de rétention (**Figure 42**). Ceux-ci ont été déterminés par analyse des spectres obtenus et sont repris dans le **Tableau 7**.



**Figure 42 - Superposition des spectres UV obtenus pour la répétition de la solution d'arabidopside A 50 ppm.**

**Tableau 7 - Temps de rétention obtenus pour l'analyse de la spécificité de la méthode mise au point.**

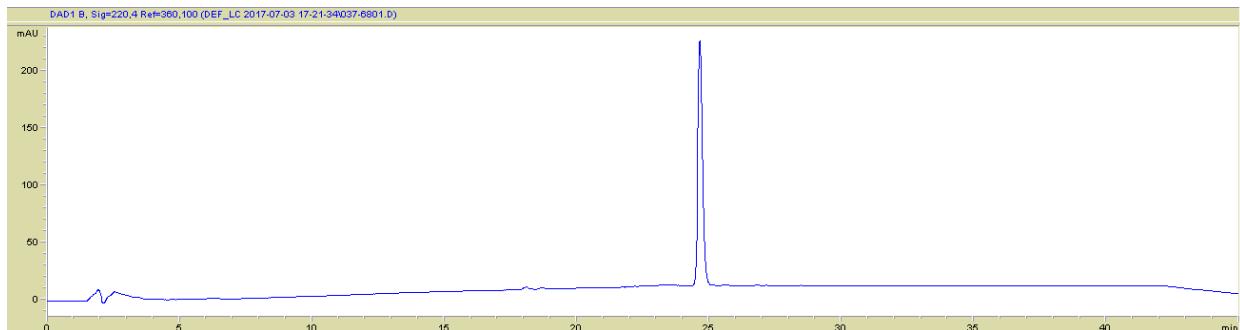
Répétitions de l'échantillon à 50 ppm	Temps de rétention (min)
<b>1</b>	18,056
<b>2</b>	18,051
<b>3</b>	18,056
<b>4</b>	18,059
<b>5</b>	18,063
<b>6</b>	18,063
<b>moyenne</b>	18,058
<b>écart-type</b>	0,005
<b>CV (%)</b>	0,027

Le CV obtenu est sous les 0,03 %. Les variations du temps de rétention sont donc négligeables. Le temps de rétention obtenu pour l'arabidopside A est assez stable pour que la méthode puisse être exploitée.

#### 5.4 Effet de matrice

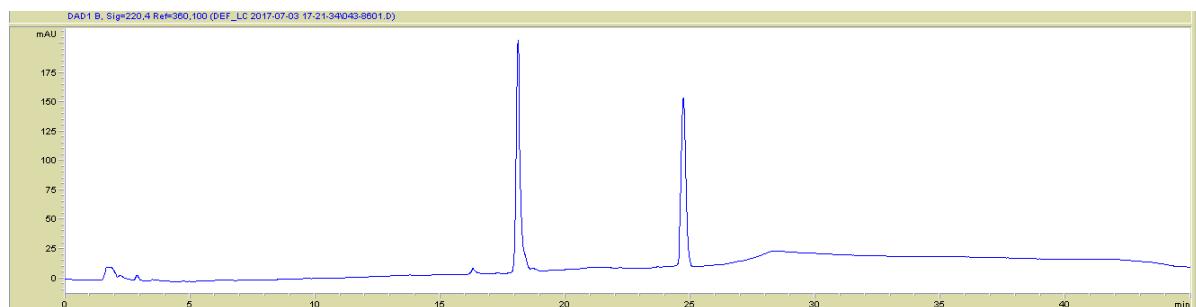
Afin de déterminer l'effet de matrice, des extractions ont été réalisées sur des feuilles non décongelées. Ces extraits servent également de témoins négatifs et permettent de déterminer s'il y a présence d'arabidopsides dans des plants non stressés. L'analyse des résultats obtenus par HPLC-MS et par HPLC-UV indique que ces molécules ne peuvent pas

être détectées par les méthodes analytiques utilisées. En effet, le pic détecté en HPLC-UV ne correspond pas au temps de rétention des arabinosides. De plus, l'analyse HPLC-MS n'a pu mettre en évidence aucun pic aux masses correspondant aux arabinosides. Elles sont donc soit absentes, soit présentes en très faibles quantités (**Figure 43**).



**Figure 43 - Spectre UV obtenu pour un témoin négatif dilué 100x.**

Afin de déterminer si un effet de matrice était présent, de l'arabinoside A à une concentration de 100 ppm a été ajouté dans un témoin négatif. L'échantillon a été analysé par HPLC-UV (**Figure 44**). Les aires mesurées sont reprises dans le **Tableau 8**.



**Figure 44 - Spectre UV obtenu pour l'analyse de l'effet de matrice**

**Tableau 8 - Aires obtenues pour l'analyse de l'effet de matrice.**

Répétitions	Aire mesurée
1	2569,2
2	2573,5
3	2539,8
moyenne	2560,8
écart-type	18,3

L'aire moyenne du pic d'arabinoside A est de 2506,8. En utilisant la droite d'étalonnage mise au point précédemment, la concentration en arabinoside A est évaluée à 118,04 ppm. La quantité d'arabinoside A déterminée par la droite d'étalonnage est supérieure à la valeur prédictive. Le signal détecté en présence de matrice est donc 18% supérieur à celui qui aurait dû être détecté.

La présence de matrice influence donc la quantification de l'arabidopside A. Il faut tenir compte de cet effet de matrice lors de dosage de l'arabidopside A dans des échantillons bruts, tels que les échantillons de membranes.

Pour les analyses des fractions purifiées par colonne de silice et HPLC-préparative, il n'est pas nécessaire de tenir compte de cet effet de matrice car les fractions analysées sont pures.

## 6 Optimisation et résultats obtenus par HPLC -préparative

### 6.1 Optimisation du gradient utilisé

Les solvants utilisés pour l'HPLC-préparative sont les mêmes que ceux de l'HPLC-UV.

Dans un premier temps, le gradient utilisé était un gradient basé sur celui de l'HPLC-UV (**Figure 45**) afin de garder les mêmes temps de rétention pour les arabidopsides.

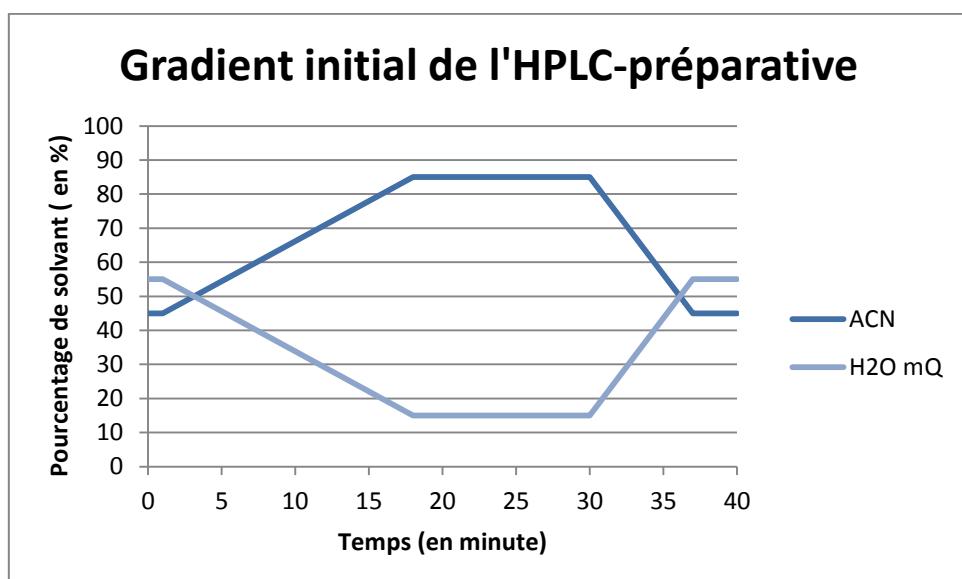


Figure 45 - Gradient initial de l'HPLC-préparative.

Celui-ci a, par la suite, été légèrement modifié (**Figure 46**) afin de permettre un nettoyage optimal de la colonne entre chaque injection. En effet, en passant de l'ACN pur sur la colonne, la plupart des composés retenus sur la colonne sont éliminés. De plus, après chaque analyse, un nettoyage avec de l'isopropanol (Scharlau) est également réalisé.

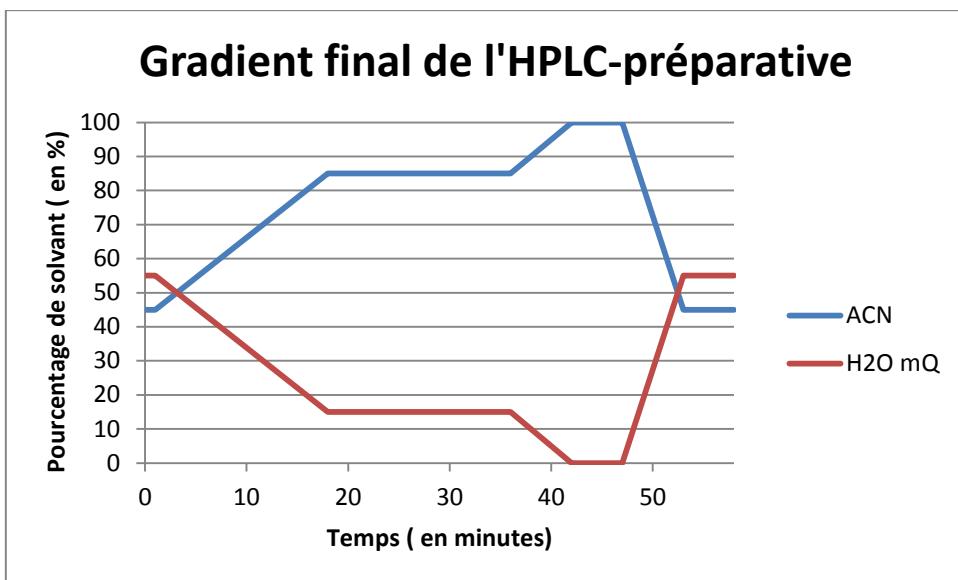


Figure 46 - Gradient final de l'HPLC-préparative.

Les fractions 1 et 2 obtenues lors de la purification sur colonne de silice ont été purifiées par HPLC-préparative. Cette nouvelle étape de purification permet d'isoler plus précisément les molécules détectées par l'UV grâce au collecteur de fractions. Après cette purification, les pics obtenus ayant des temps de rétention proches des arabidopsides sont analysés par HPLC-MS afin de déterminer la présence ou non de ces molécules. Une fois les tubes contenant les arabidopsides déterminés, ils sont analysés par HPLC-UV afin de déterminer les quantités d'arabidopside A purifiées. Les résultats de cette partie de quantification seront détaillés dans le point 7.

## 6.2 Analyse des fractions 1

Les profils en glycolipides des fractions 1 étaient relativement variables, comme le montre les **Figure 47** et **48**. En effet, l'intensité des pics variaient fortement d'un échantillon à l'autre.

Les fractions 1 étant obtenues lors de l'élution du mélange CHCl<sub>3</sub> : acétone (7 :3), elles sont supposées contenir les arabidopsides E et G dû à leur polarité. Cependant, l'arabidopside A et B sont les molécules les plus souvent présentes dans cette fraction, comme le montre les spectres ci-dessous. La purification sur colonne de silice n'est donc pas optimale et ceci peut expliquer une partie des variations observées. Il serait intéressant d'optimiser les éluants utilisés afin de permettre une meilleure séparation des arabidopsides. Cette étape n'a pas pu être réalisée durant ce travail.

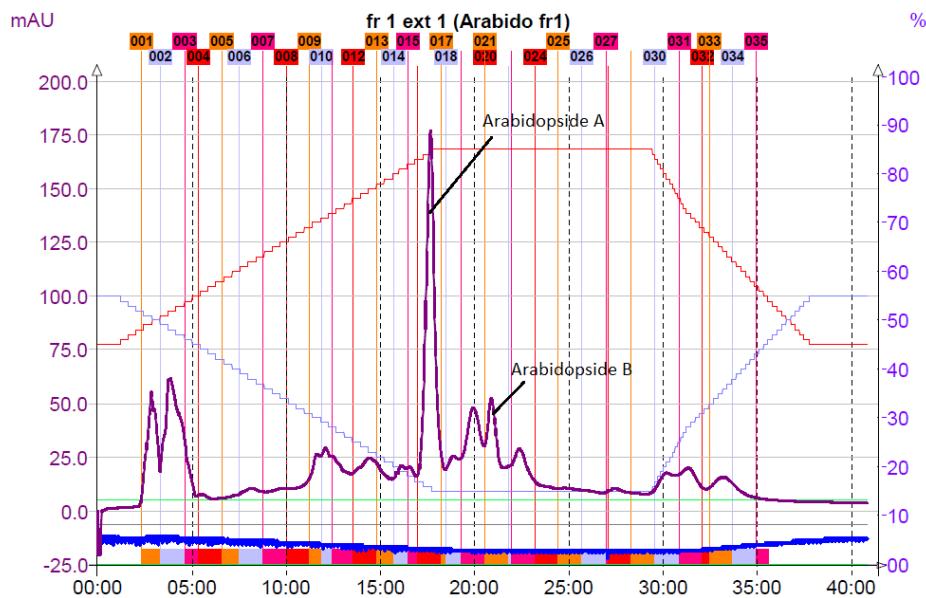


Figure 47 - Profil obtenu par purification par HPLC-préparative pour la fraction 1 de l'extraction 1.

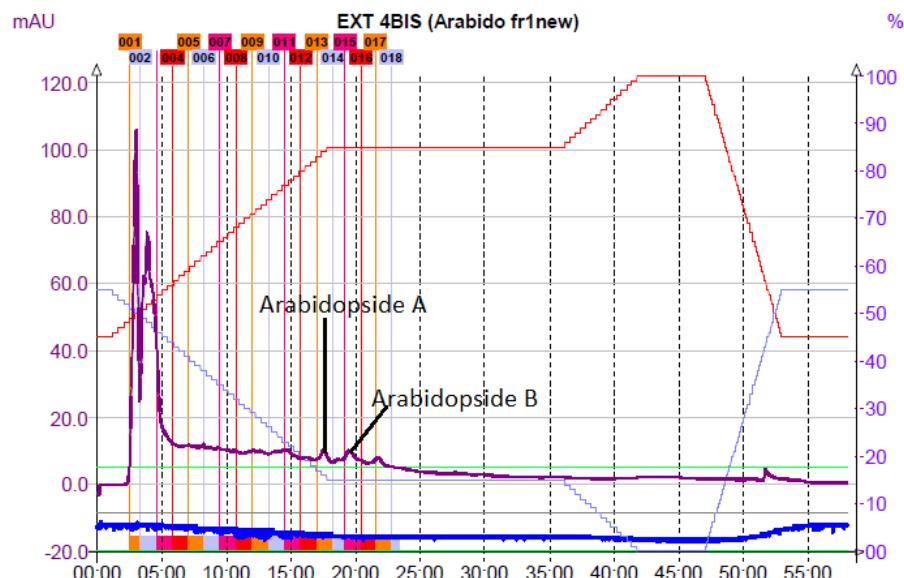


Figure 48 - Profil obtenu par purification par HPLC-préparative de la fraction 1 de l'extraction 4.

L'arabidopside E est également détectée, notamment pour l'extraction 7 réalisée sur des feuilles maintenues au congélateur pendant plusieurs jours (**Figure 49**). Il est donc envisageable que la congélation prolongée des feuilles avant extraction modifie le profil en arabidopsides. Une étude plus complète de l'impact du temps de stockage à -20°C doit être envisagée.

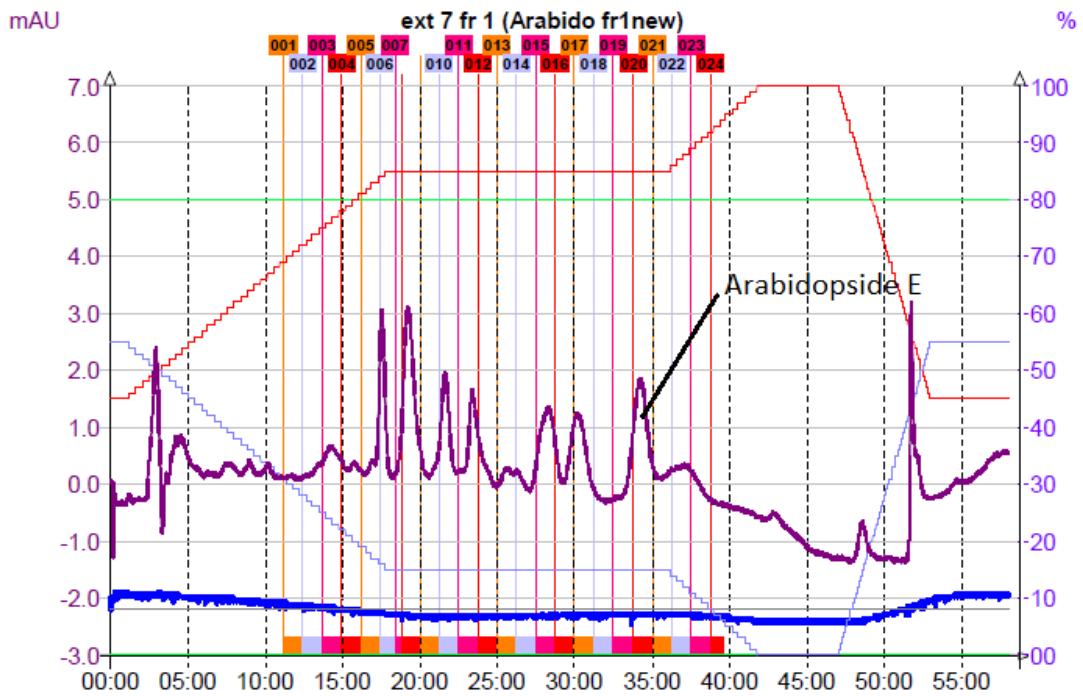


Figure 49 - Profil obtenu par purification par HPLC-préparative de la fraction 1 de l'extraction 7 réalisée sur feuilles ayant été stockées plusieurs jours à -20°C.

Le manque de répétabilité peut provenir des différences de concentrations des fractions. En effet, les impuretés présentes dans les fractions ont pu fausser l'estimation de la concentration et conduire à l'analyse d'échantillons trop dilués.

Une autre source de variation peut être la plante en elle-même. En effet, en fonction de son stade de développement certains arabidopsides sont présents en plus ou moins grandes quantités (Hisamatsu et al., 2005, 2006). De plus, le laboratoire où a été effectuée l'induction n'étant pas climatisé, les paramètres de décongélation n'étaient pas totalement fixes. Or il a été démontré plus le temps après la décongélation était court, plus la concentration en arabidopside A et B était importante. A contrario, au plus le temps était long, au plus les arabidopsides E et G étaient synthétisées (Nilsson et al., 2016).

Ces molécules étant synthétisées par la plante lors d'un stress, il est également possible que la plante ait manqué d'eau ou que les températures extérieures aient été trop élevées. La culture en chambre de culture sous température contrôlée n'ayant pas été possible pour ce travail, les conditions météorologiques ont pu avoir un impact sur le développement de la plante ainsi que sur les molécules synthétisées.

### 6.3 Analyse des fractions 2

Les profils obtenus pour les fractions 2 (Figure 50 et 51) sont, quant à eux, beaucoup plus répétables. Cette fraction est sensée contenir les arabidopsides A, B et D. L'analyse des spectres HPLC-MS obtenus pour ces fractions confirme cette hypothèse.

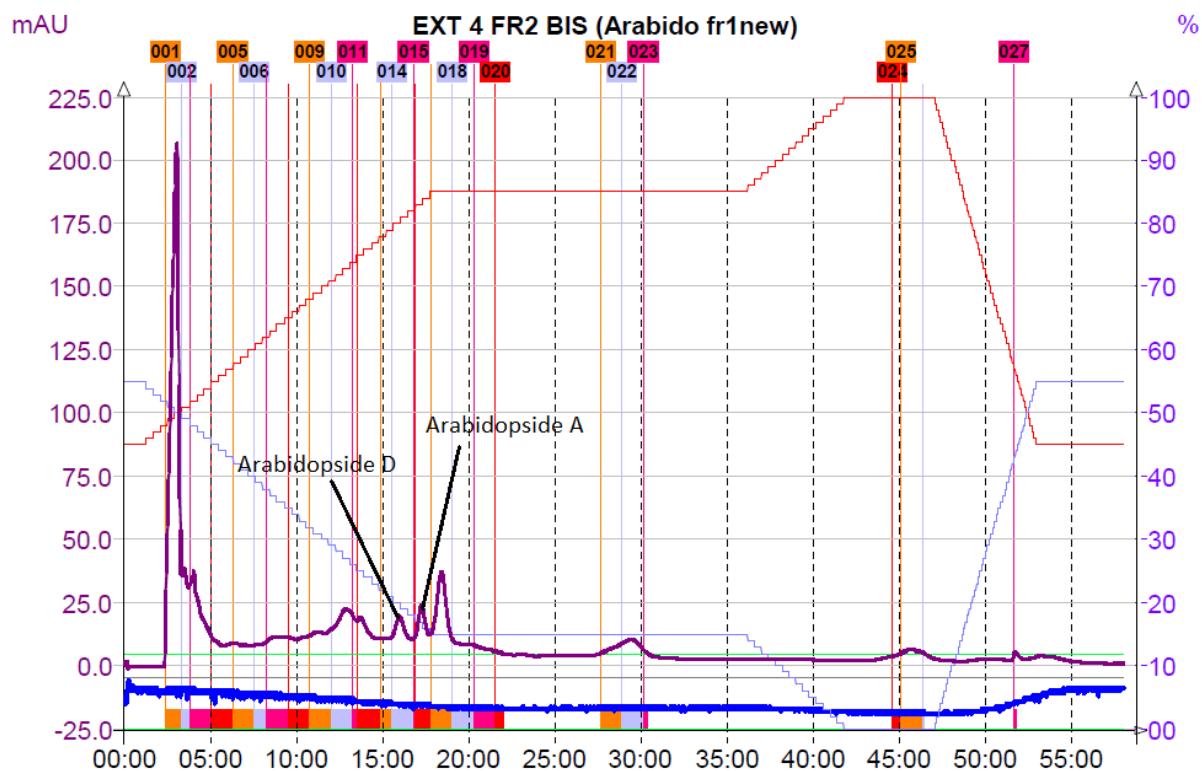


Figure 50 - Profil obtenu par purification par HPLC-préparative de la fraction 2 de l'extraction 4.

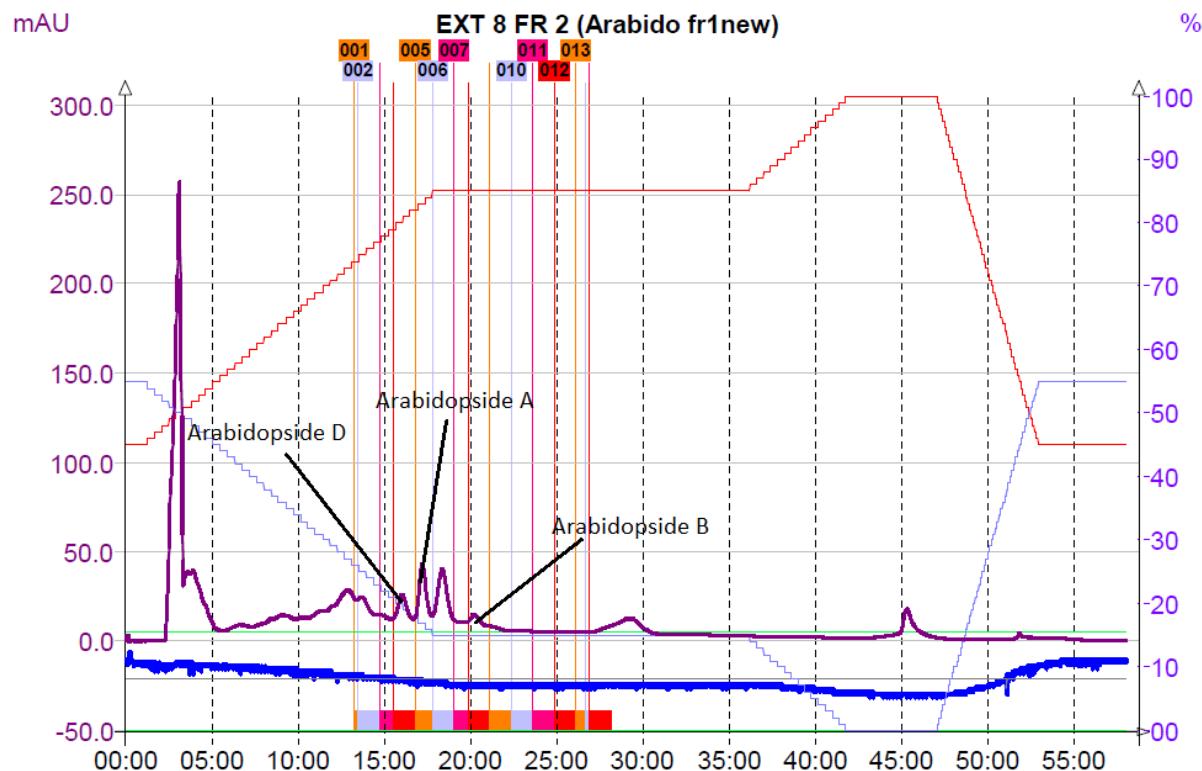


Figure 51 Profil obtenu par purification par HPLC-préparative de la fraction 2 de l'extraction 8 réalisée à partir de feuilles stockées plusieurs jours à -20 °C.

Dans le cas des fractions 2, il n'y a pas de différence significative entre les extractions réalisées sur feuilles fraîches (**Figure 50**) et celles réalisées sur feuilles congelées (**Figure 51**). En effet, les arabidopsides détectées sont les mêmes dans les deux cas.

L'intensité du pic correspondant à l'arabidopside A varie également d'une extraction à l'autre pour les fractions 2. Comme expliqué plus haut, la concentration des échantillons, la séparation sur colonne de silice, l'état de la plante au moment de l'extraction ainsi que la température lors de l'étape de décongélation sont des paramètres pouvant expliquer une partie de cette variation d'intensité.

## 7 Rendements d'extraction et de purification des arabidopsides

Les rendements d'extraction et de purification ont été déterminés pour l'arabidopside A grâce à la méthode de détection et de quantification mise au point ci-dessus (**Tableau 9**). Comme pressenti lors de l'étude des profils obtenus par HPLC-préparative, les rendements varient fortement d'une extraction à l'autre. De plus, dans le cas de certaines extractions, l'analyse par HPLC-préparative ne permettait pas d'isoler le pic correspondant à l'arabidopside A car la concentration en cette molécule n'était pas assez élevée pour être bien détectable par l'HPLC-préparative. Les rendements obtenus pour ces extractions donnent donc pas d'indication sur la quantité d'arabidopside A réellement produite.

Tableau 9 - Récapitulatif des quantités d'arabidopside A dosées pour les différentes fractions des extractions réalisées.

extraction	mg d'arabidopside A dans la fraction 1	mg d'arabidopside A dans la fraction 2	Masse totale d'arabidopside A en mg	Rendement en mg d'arabidopside A par g de feuilles fraîches
<b>Extraction 1</b>	45,75	15,03	60,78	0,49
<b>Extraction 2</b>	/	14,72	14,72	0,12
<b>Extraction 3</b>	/	22,56	22,56	0,22
<b>Extraction 4</b>	0,08	29,66	29,74	0,29
<b>Extraction 5</b>	0,35	6,60	6,95	0,07
<b>Extraction 6</b>	0,17	0,07	0,24	0,002
<b>Extraction 7</b>	/	2,08	2,08	0,02
<b>Extraction 8</b>	/	8,92	8,92	0,08
<b>Extraction 9</b>	/	0,65	0,65	0,006

Ces variations très importantes dans les quantités d'arabidopsides qui ont été obtenues lors des différentes extractions mettent en évidence la nécessité de travailler avec des plants d'*A. thaliana* cultivés dans des conditions bien définies ainsi que de contrôler la température de décongélation. Il est également indispensable d'optimiser la purification sur colonne de silice afin de limiter les pertes de molécules.

Les résultats obtenus tendent à indiquer un possible impact de la congélation sur le rendement en arabidopside A. En effet, les rendements des extractions réalisées sur plantes conservées au congélateur, extractions 7 à 9, sont inférieurs à la majorité des rendements des extractions réalisées sur plantes fraîches, extractions 1 à 6. Néanmoins, la variabilité des plants étudiés ne permet pas de tirer de réelles conclusions des rendements calculés.

## 8 Localisation sub-cellulaire.

Les différents fractionnements réalisés ont permis d'obtenir des échantillons de membranes plasmiques, de membranes de chloroplastes ainsi que des échantillons contenant des thylakoïdes.

Les différentes fractions ont été analysées par HPLC-MS afin de déterminer la présence d'arabidopsides. Par la suite, une analyse HPLC-UV a été réalisée sur les fractions contenant les molécules d'intérêt.

## 8.1 Les membranes plasmiques

Les lipides présents dans les membranes plasmiques de plantes ayant préalablement été stressées ont été analysés par la méthode HPLC-MS mise au point précédemment (**Figure 52**). Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la présence d'arabidopsides dans les fractions. En effet, les échantillons obtenus n'étaient pas assez concentrés pour déterminer la présence de ces molécules. Il y a néanmoins présence d'un pic pouvant correspondre à l'arabidopside A (avec un incrément de  $\text{NH}_4^+$ ). Toutefois, il n'est pas possible de l'isoler et de le fragmenter pour en analyser les fragments car l'intensité du pic est trop faible.

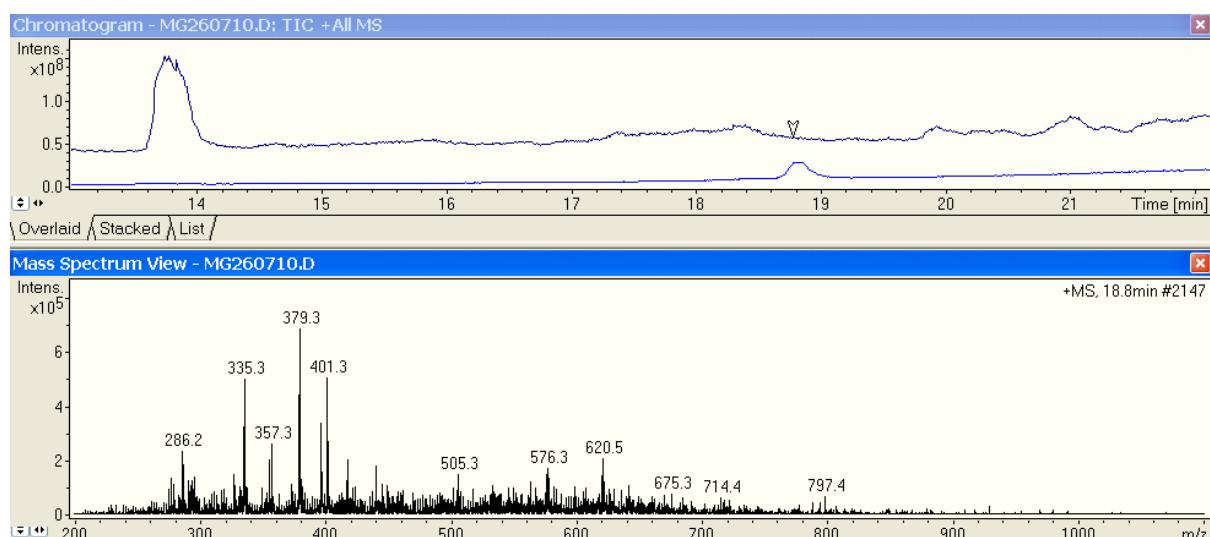


Figure 52 - Spectre HPLC-MS obtenu par analyse des membranes plasmiques.

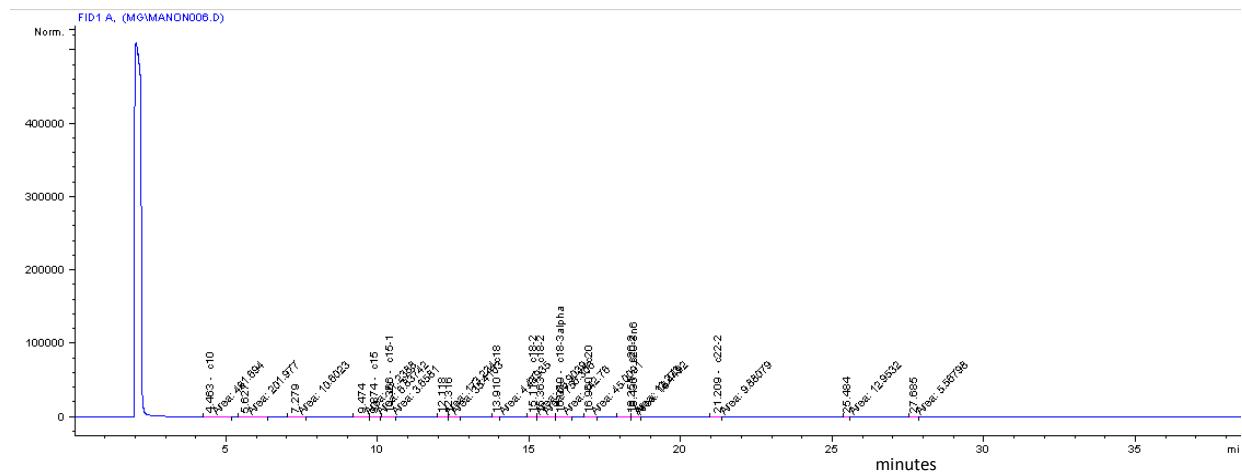
Dû à la faible quantité de matériel obtenu, il n'a pas été possible de réaliser un Western Blot afin de vérifier la pureté de l'échantillon de membranes obtenu. Si le pic détecté correspond bien à de l'arabidopside A, il faut donc envisager que cela provienne d'une contamination par d'autres types de membranes cellulaires.

D'autre part, si la présence d'arabidopside A est avérée dans les membranes plasmiques, cela signifierait qu'il existe un transport de cette molécule entre le chloroplaste, où elle est synthétisée, et la membrane plasmique.

## 8.2 Les membranes des chloroplastes

Les membranes des chloroplastes sont séparées en deux fractions distinctes : une fraction contenant les thylakoïdes (de couleur verte) et une autre contenant les membranes des chloroplastes ainsi que le stroma (fraction transparente).

Afin de vérifier que la séparation a bien été réalisée et que la fraction transparente contient bien des membranes de chloroplastes, une analyse GC a été réalisée sur cette fraction. Cette analyse permet l'analyse des acides gras présents dans l'échantillon.



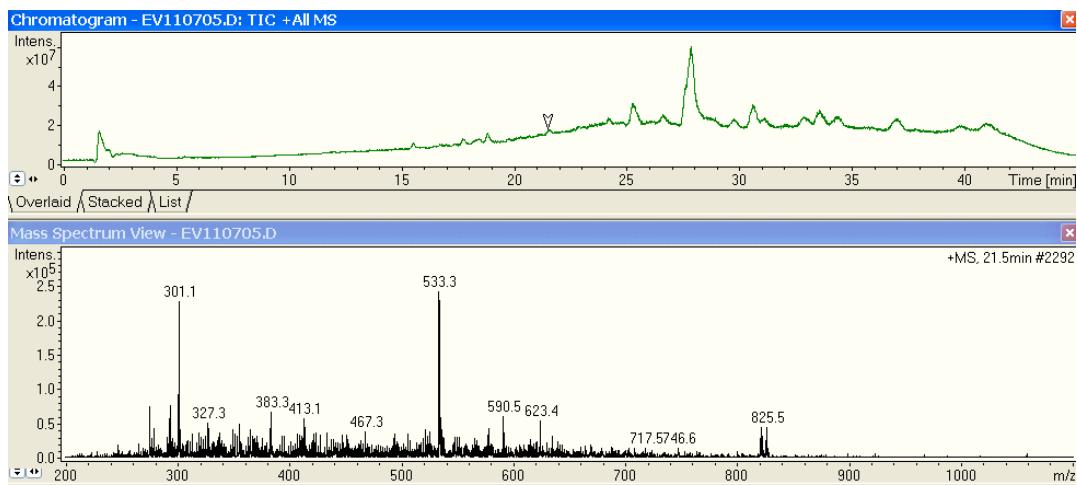


Figure 55 - Spectre HPLC-MS obtenu pour la fraction thylakoïde prouvant la présence d'arabidopside B

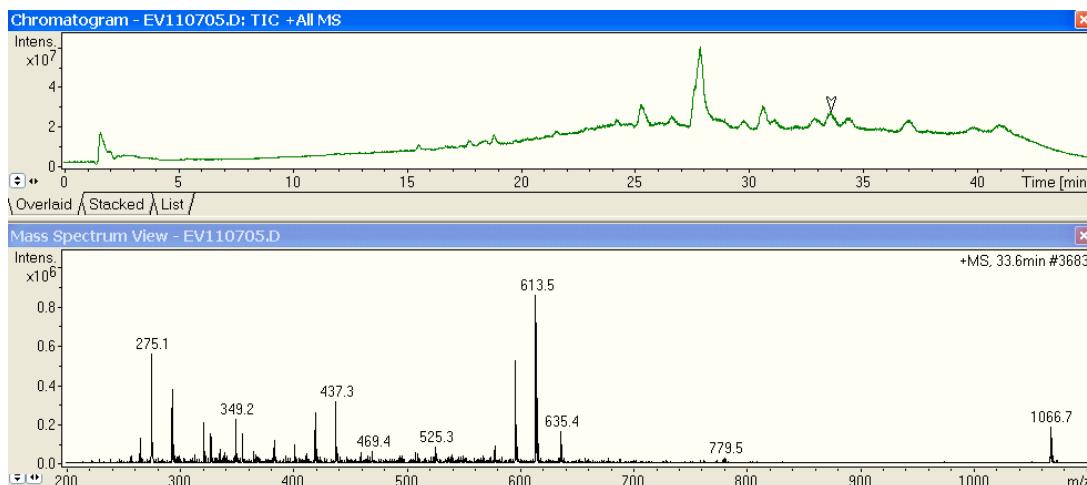


Figure 56 - Spectre HPLC-MS obtenu pour la fraction thylakoïde prouvant la présence d'arabidopside E

L'échantillon de thylakoïdes a également été analysé en HPLC-UV afin de confirmer la présence des arabidopsides. Le spectre correspondant est présenté à la Figure 57.

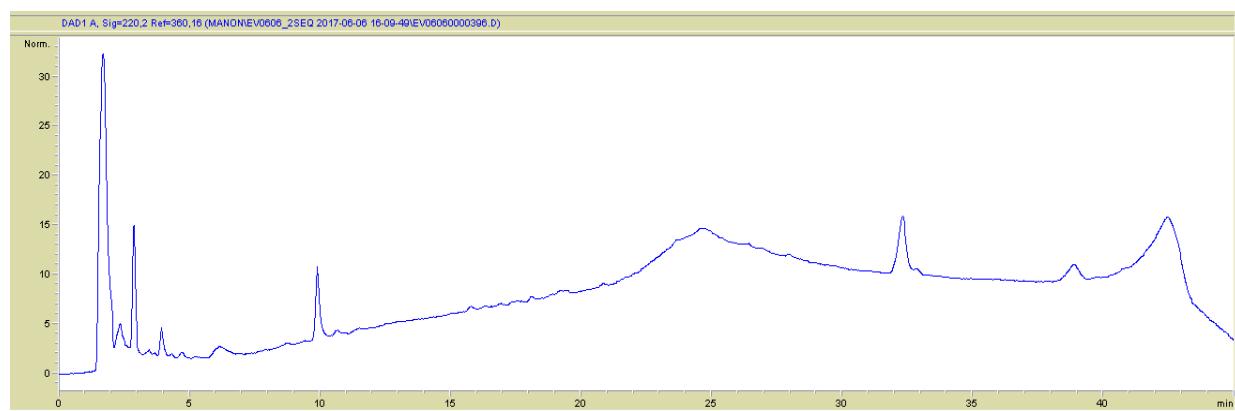


Figure 57 - Spectre HPLC-UV obtenu pour l'échantillon de thylakoïdes.

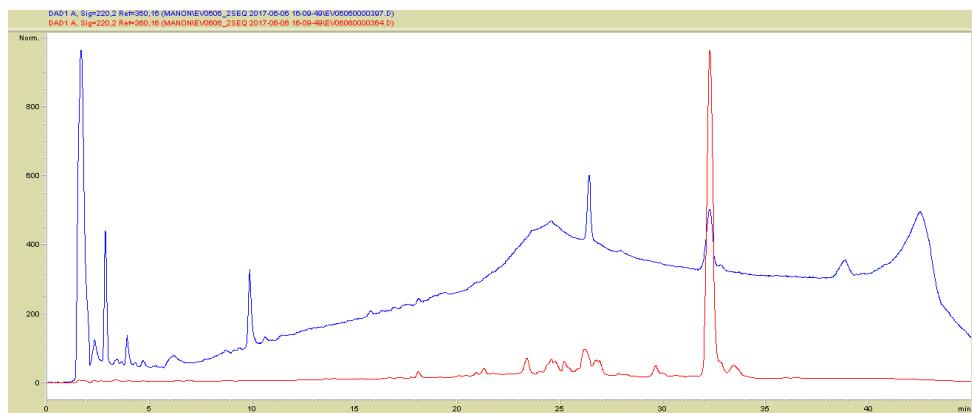


Figure 58 - Superposition des spectres correspondant à l'arabidopside E et à la fraction thylakoïde

La superposition du spectre d'arabidopside E (en rouge) et de la fraction contenant les thylakoïdes (en bleu) met en évidence la présence de cette molécule dans l'échantillon analysé (**Figure 58**).

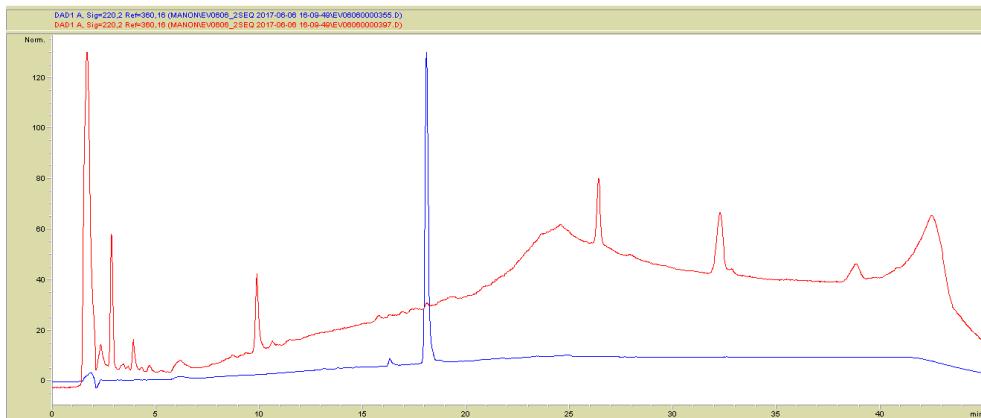


Figure 59 - Superposition des spectres correspondant à l'arabidopside A et à la fraction thylakoïde.

La superposition du spectre obtenu pour arabidopside A (en bleu) et de la fraction contenant les thylakoïdes (en rouge) met en évidence la présence de cette molécule dans la fraction analysée (**Figure 59**).

Les spectres obtenus confirment donc la présence d'arabidopsides A et E dans l'échantillon. Les autres molécules détectées en HPLC-MS ne sont pas détectables en utilisant l'UV. Ceci peut s'expliquer par la différence de sensibilité entre la MS et l'UV. En effet, la MS est très sensible par rapport à un détecteur UV.

### 8.2.2 Fraction contenant le stroma et les membranes des chloroplastes

Cette fraction a également été analysée par HPLC-MS. Le pic sortant à 18 minutes indique la présence d'arabidopside A dans l'échantillon. Cette information est corroborée par le spectre obtenu par spectrométrie de masse (**Figure 60**). En effet, un pic à 775,5 m/z est détecté.

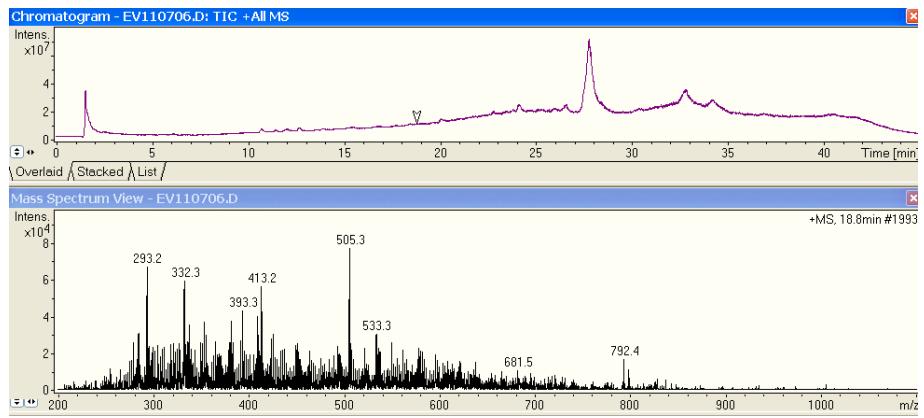


Figure 60 - Spectre obtenu par HPLC-MS pour l'échantillon correspondant à la fraction contenant le stroma et les membranes des chloroplastes.

L'échantillon est ensuite passé en HPLC-UV afin de quantifier les arabidopsides présents (**Figure 61**).

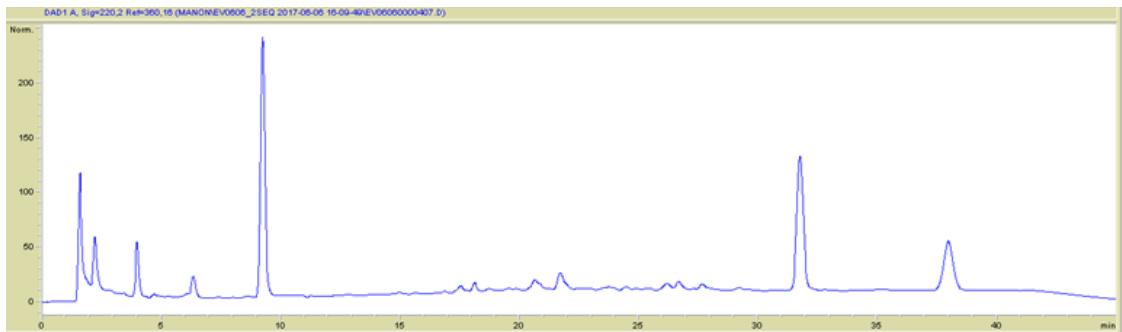


Figure 61 - Spectre obtenu en HPLC-UV pour l'échantillon correspondant à la fraction contenant le stroma et les membranes des chloroplastes.

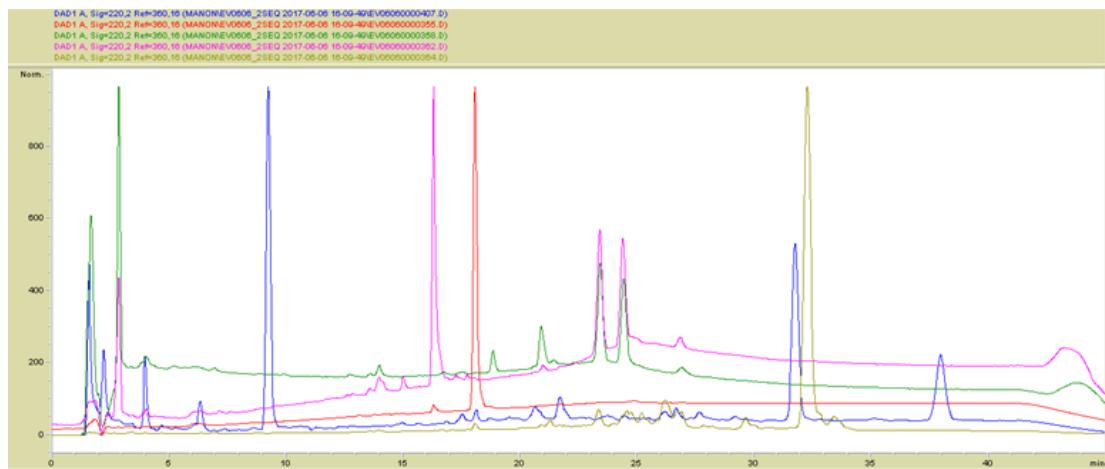


Figure 62 - Superposition des spectres obtenus pour les arabidopsides purifiées et pour la fraction contenant le stroma et les membranes des chloroplastes

La superposition des spectres pour les arabidopsides isolées ainsi que de la fraction contenant le stroma et les membranes des chloroplastes (en bleu) permet la mise en évidence de la présence d'arabidopside A (en rouge) (**Figure 62**).

Les résultats obtenus montrent que de l'arabidopside A est présent dans les membranes des chloroplastes. Cela confirme l'étude réalisée par Böttcher and al. mettant en évidence la présence d'OPDA estérifié dans les thylakoïdes ainsi que dans les membranes des chloroplastes (Böttcher et al., 2007). Dans le cadre de cette étude, l'OPDA étant analysé sous forme d'esters méthyliques, il n'était pas possible de déterminer si l'OPDA détecté était un des constituants d'arabidopsides. Ce travail a permis de confirmer la présence d'arabidopsides grâce à la méthode d'analyse mise au point.

Cependant, il est également possible que la présence d'arabidopside A dans cet échantillon provienne d'une mauvaise séparation entre cette fraction et celle contenant les thylakoïdes riche en arabidopsides. Ainsi, il aurait été intéressant de pratiquer un western-blot avec des anticorps spécifiques aux différents éléments composants les fractions afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de contamination. En effet, il existe des anticorps spécifiques aux membranes des chloroplastes et d'autres spécifiques aux thylakoïdes. Par manque de temps, cette analyse n'a pas pu être réalisée.

## E. Conclusion et perspectives

Lors de ce travail de fin d'études, une méthode HPLC-MS permettant de détecter les arabidopsides A, B, D et E a été mise au point. Une méthode permettant le dosage de l'arabidopside A par HPLC-UV a également été mise au point et validée. Combinées, ces méthodes permettront de détecter et de doser les arabidopsides dans des matrices diverses. En perspective, il serait intéressant de compléter la méthode de quantification en mettant au point une méthode de dosage des arabidopsides B, D et E par HPLC-UV. Pour cela, une droite d'étalonnage doit être réalisée à partir de solution standard contenant ces molécules. Ceci permettrait d'avoir une connaissance plus globale de la production d'arabidopsides par *A. thaliana* lors d'un stress.

Ce travail a également permis d'améliorer les méthodes d'extraction et de purification des arabidopsides. Toutefois, afin d'obtenir des échantillons d'une plus grande pureté, il serait intéressant d'optimiser les techniques de purification utilisées. En effet, lors des analyses des différentes fractions obtenues après purification sur colonne de silice, il a été observé que celle-ci ne se déroulait pas de façon optimale. Il est nécessaire de modifier les eluants afin de permettre une séparation plus efficace des différents composés lors de cette étape. Le profil obtenu lors de la purification par HPLC-préparative de ces fractions devrait être plus répétable. Il serait ainsi possible d'optimiser une nouvelle fois le gradient utilisé afin de permettre une séparation plus optimale des différentes molécules présentes dans les échantillons.

Concernant la localisation sub-cellulaire, de nouvelles extractions de membranes plasmiques sur de plus grandes quantités de plantes sont nécessaires afin de pouvoir concentrer assez les échantillons pour déterminer la présence ou non d'arabidopsides dans ce type de membrane. Il serait également intéressant de vérifier qu'il n'y a pas de contamination par d'autres constituants cellulaires afin de pouvoir certifier que les arabidopsides proviennent de la membrane plasmique. Cette vérification serait également pertinente afin de vérifier que les arabidopsides détectées dans les membranes des chloroplastes ne proviennent pas de contamination par des thylakoïdes. Il est donc primordial de s'assurer que le fractionnement est correctement effectué. Ceci est possible par Western blot. En effet, il existe des anticorps spécifiques aux différents types de membranes extraites. Cette analyse permettrait donc de s'assurer que la séparation des différents types de membranes est bien effectuée.

Les résultats obtenus lors de ce travail ont montré que les arabidopsides sont présents dans les membranes des thylakoïdes ainsi que dans les membranes des chloroplastes. Comme ces molécules sont produites par la plante uniquement en cas de stress (Böttcher et al., 2007), il serait intéressant d'étudier l'impact de la présence de celles-ci sur l'organisation des membranes. En effet, les membranes sont des systèmes complexes dans lesquels se

trouvent des récepteurs. Lorsque certaines molécules sont détectées par ceux-ci, la membrane se réorganise et cela peut entraîner une modification de ses propriétés et de ses fonctions.

Ce travail a permis l'obtention d'une quantité suffisante d'arabidopside A pour envisager des études bio-physiques. De plus, des études bio-informatiques peuvent être réalisées afin de déterminer, de manière théorique, avec quels types de membranes les arabidopsides pourraient interagir. Une fois cette première étape réalisée, des études par ITC et balance à film de Langmuir pourraient être menées afin de déterminer si des interactions existent entre la molécule et les types de membranes étudiés(Deleu et al., 2014).

## F. Bibliographie

- Andersson B., 1986. Characterization of the Thylakoid Membrane by Subfractionation Analysis. *Methods Enzymol.* **118**, 325–338.
- Andersson M.X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnstro Å., Mcphail K.L., Gerwick W.H., Feussner I. & Ellerstro M., 2006. Oxylipin Profiling of the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* FORMATION OF A NOVEL OXO-PHYTODIENOIC ACID-CONTAINING GALACTOLIPID ,*ARABIDOPSIDE E* **281**(42), 31528–31537.
- Angus S. Murphy,Wendy Peer B.S., 2010. *The Plant Plasma Membrane*, 494.
- Blée E., 1998. Biosynthesis of phytooxylipins: the Peroxygenase pathway. *Eur. J. lipid Sci. Technol.* **100**(4–5), 121–127.
- Blée E., 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense **7**(7), 315–322.
- Bolle C., Schneider A. & Leister D., 2011. Perspectives on Systematic Analyses of Gene Function in *Arabidopsis thaliana* : New Tools , Topics and Trends 1–14.
- Böttcher C. & Weiler E.W., 2007. cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: Occurrence and dynamics. *Planta* **226**(3), 629–637.
- Buchanan B.B., Gruissem W. & Jones R.L., 2015. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 1280.
- Buseman C.M., Tamura P., Sparks A.A., Baughman E.J., Maatta S., Zhao J., Roth M.R., Esch S.W., Shah J., Williams T.D. & Welti R., 2006. Wounding Stimulates the Accumulation of Glycerolipids Containing Oxophytodienoic Acid and Dinor-Oxophytodienoic Acid in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiol.* **142**(1), 28–39.
- Chechetkin I.R., Mukhitova F.K., Blufard A.S., Yarin A.Y., Antsygina L.L. & Grechkin A.N., 2009. Unprecedented pathogen-inducible complex oxylipins from flax – linolipins A and B **276**, 4463–4472.
- Chu C.-C. & Li H., 2011. Chloroplast Research in *Arabidopsis*. *Methods Mol. Biol.* **774**(1), 339–350.
- Creelman R.A. & Mullet J.E., 1997. BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS.
- Creelman R.A. & Mulpuri R., 2002. The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **1**(January 2002), e0012.
- Croft K.P.C., Jiittner F., Slusarenko A.J. & Ch- Z., 1993. Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (1.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* 13–24.
- Dave A. & Graham I. a, 2012. Oxylipin Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA). *Front. Plant Sci.* **3**(March), 42.
- Delaunois B., Farace G., Jeandet P., Clément C., Baillieul F., Dorey S. & Cordelier S., 2014. Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine ? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard 4837–4846.
- Deleu M., Crowet J.M., Nasir M.N. & Lins L., 2014. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**(12), 3171–3190.

- Dörmann P. & Benning C., 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* **7**(3), 112–118.
- Essigmann B., Güler S., Narang R. a, Linke D. & Benning C., 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(4), 1950–1955.
- Fauconnier M., Rojas-beltran J., Dupuis B., Delaplace P., Frettinger P. & Gosset V., 2008. Changes in oxylipin synthesis after *Phytophthora infestans* infection of potato leaves do not correlate with resistance **46**, 823–831.
- Göbel C. & Feussner I., 2009. Phytochemistry Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry* **70**(13–14), 1485–1503.
- Härtel H., Dörmann P. & Benning C., 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis* **97**(19), 10649–10654.
- Hartley S.E., Eschen R., Horwood J.M., Gange A.C., Hill E.M. & Hill E.M., 2014. Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopside-based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*.
- Henry G., Thonart P. & Ongena M., 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others : an update on the diversity of plant immunity elicitors **16**(2), 257–268.
- Hisamatsu Y., Goto N., Hasegawa K. & Shigemori H., 2006. Senescence-Promoting Effect of Arabidopside A 363–366.
- Hisamatsu Y., Goto N., Sekiguchi M., Hasegawa K. & Shigemori H., 2005. Oxylipins arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *J. Nat. Prod.* **68**(4), 600–603.
- Howe G.A., Lightner J., Browse J. & Ryan C.A., 1996. An Octadecanoid Pathway Mutant (JL5) of Tomato 1 s Compromised in Signaling for Defense against Insect Attack **8**(November), 2067–2077.
- Keegstra K. & Yousif A.E., 1986. These methods yielded a mixture of the two envelope membranes which could not be further resolved into the two membranes known to be present in the envelope. 2 Although much valu- **118**(1976), 316–325.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. & Miller T.D., 1980. Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield.
- Kourtchenko O., Andersson M.X. & Hamberg M., 2007. Oxo-Phytodienoic Acid-Containing Galactolipids in *Arabidopsis* : Jasmonate Signaling Dependence **145**(December), 1658–1669.
- Mariutto M., Duby F., Adam A., Bureau C., Fauconnier M., Ongena M., Thonart P. & Dommes J., 2011. The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms.
- Mosblech A., Feussner I. & Heilmann I., 2009. Oxylipins : Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation LOX LOX. *Plant Physiol. Biochem.* **47**(6), 511–517.
- Nilsson A.K., Fahlberg P., Ellerström M. & Andersson M.X., 2012. Oxo-phytodienoic acid (OPDA) is formed on fatty acids esterified to galactolipids after tissue disruption in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **586**(16), 2483–2487.
- Nilsson A.K., Fahlberg P., Johansson O.N., Hamberg M. & Andersson M.X., 2016. The activity of HYDROPEROXIDE LYASE 1 regulates accumulation of galactolipids containing 12-oxo-

- phytodienoic acid in *Arabidopsis* **67**(17), 5133–5144.
- Palta J.P., Whitaker B.D. & Weiss L.S., 1993. Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species ' (1993), 793–803.
- Penninckx A.M.A., Eggermont K., Terras F.R.G. & Bart P., 1996. Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway **8**(December), 2309–2323.
- Pervanchon F., Blouet A., Nguyen G., Sarthou J. & Féret S., 2002. Lexique des qualificatifs de l'agriculture 117–136.
- Pieterse M.J., Does D. Van Der, Zamioudis C., Leon-reyes A. & Wees S.C.M. Van, 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity.
- Pieterse M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Wees S.C.M. Van & Bakker P.A.H.M., 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes.
- Schaller F., Schaller A. & Stintzi A., 2004. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* **23**(3), 179–199.
- Schaller F., Zerbe P., Reinbothe S., Reinbothe C. & Hofmann E., 2008. The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* – localization and cyclization **13**, 2428–2441.
- Taki N., Sasaki-sekimoto Y., Obayashi T., Kikuta A. & Kobayashi K., 2005. 12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in *Arabidopsis* 1 [ w ] **139**(November), 1268–1283.
- Uemura M. & Joseph R.A., 1995. Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* 'Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions (1995), 15–30.
- Uemura M. & Steponkus P.L., 1994. A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Temperature 479–496.
- Vu H.S., Roth M.R., Tamura P., Samarakoon T., Shiva S. & Honey S., 2014. Head-group acylation of monogalactosyldiacylglycerol is a common stress response , and the acyl-galactose acyl composition varies with the plant species and applied stress 517–528.
- Vu H.S., Tamura P., Galeva N.A., Chaturvedi R., Roth M.R., Williams T.D., Wang X., Shah J. & Welti R., 2012. Direct Infusion Mass Spectrometry of Oxylipin-Containing *Arabidopsis* Membrane Lipids Reveals Varied Patterns in Different Stress Responses. *Plant Physiol.* **158**(1), 324–339.
- Weber H., 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid : A new hexadecanoid signal in the jasmonate family **94**(September), 10473–10478.

## G. Annexes

### 1 Tableaux des fragments des arabidopsides

Annexe 1 - Tableau des fragments pouvant être obtenus pour l'arabidopside B

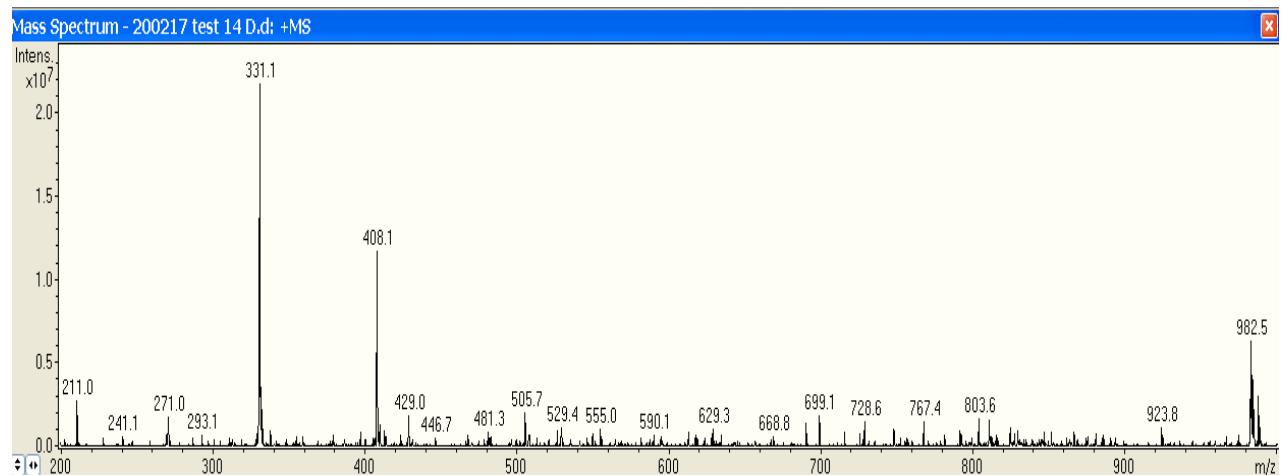
Mass	Formula	Fragment
<b>841.6</b>	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>12</sub> K <sup>+</sup>	[M+ K] <sup>+</sup>
<b>825.6</b>	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>12</sub> Na <sup>+</sup>	[M+ Na] <sup>+</sup>
<b>820.6</b>	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>12</sub> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M+ NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
<b>803.49</b>	C <sub>45</sub> H <sub>71</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	[M+ H] <sup>+</sup>
<b>641.463</b>	C <sub>39</sub> H <sub>61</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>
<b>623.444</b>	C <sub>43</sub> H <sub>59</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>367.260</b>	C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
<b>349.247</b>	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>293.222</b>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>+</sup>
<b>275.221</b>	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>257.196</b>	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>1</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> -2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>247.213</b>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> <sup>+</sup>	[M-2dn-OPDA] <sup>+</sup>

Annexe 2 - Tableau des fragments pouvant être obtenus pour l'arabidopside D

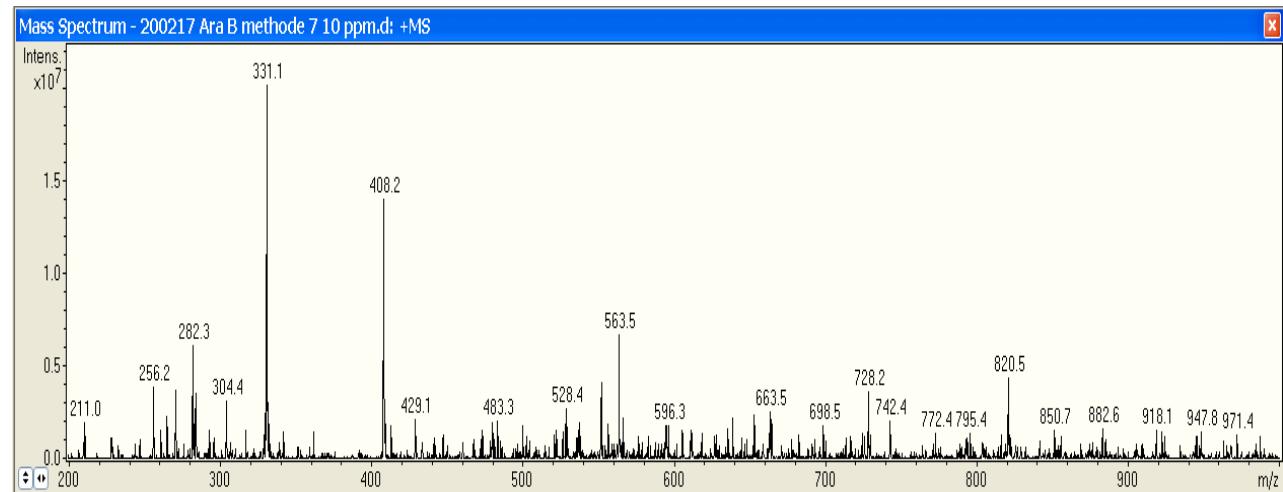
Mass	Formula	Fragment
<b>1003.5</b>	C <sub>51</sub> H <sub>80</sub> O <sub>17</sub> K <sup>+</sup>	[M+ K] <sup>+</sup>
<b>987.5</b>	C <sub>51</sub> H <sub>80</sub> O <sub>17</sub> Na <sup>+</sup>	[M+ Na] <sup>+</sup>
<b>982.5</b>	C <sub>51</sub> H <sub>80</sub> O <sub>17</sub> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M+ NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
<b>965.723</b>	C <sub>51</sub> H <sub>81</sub> O <sub>17</sub> <sup>+</sup>	[M+ H] <sup>+</sup>
<b>641.504</b>	C <sub>39</sub> H <sub>61</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	[M-2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>
<b>623.489</b>	C <sub>39</sub> H <sub>57</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	[M-2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>367.212</b>	C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	[M-2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
<b>349.196</b>	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M-2C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>293.156</b>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub> ] <sup>+</sup>
<b>275.142</b>	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[M-C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>257.13</b>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sup>+</sup>	[M-C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub> -2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>

## 2 Spectres obtenus par HPLC-MS pour les arabidopsides B, D et E

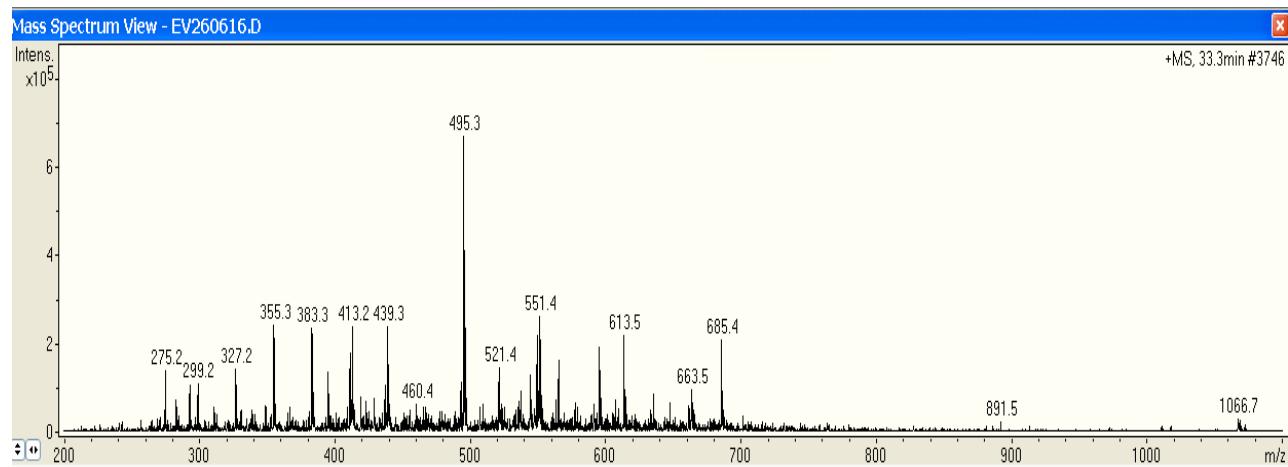
Annexe 3 - Spectre HPLC-MS obtenu pour l'arabidopside D avec  $[M+ NH_4]^+ = 982.5 \text{ m/z}$



Annexe 4 - Spectre HPLC-MS obtenu pour l'arabidopside B avec  $[M+ NH_4]^+ = 820.5 \text{ m/z}$

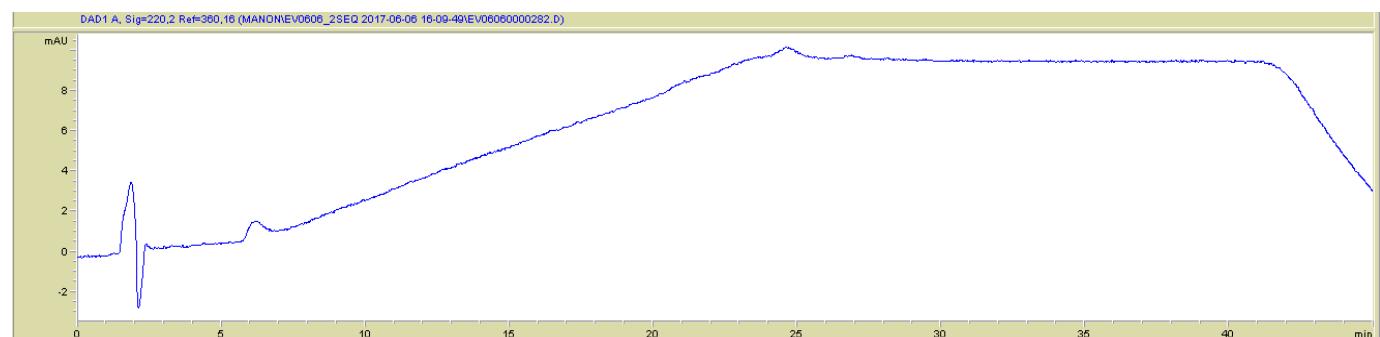


Annexe 5 - Spectre HPLC-MS obtenu pour l'arabidopside E avec  $[M+ NH_4]^+ = 1066.7 m/z$

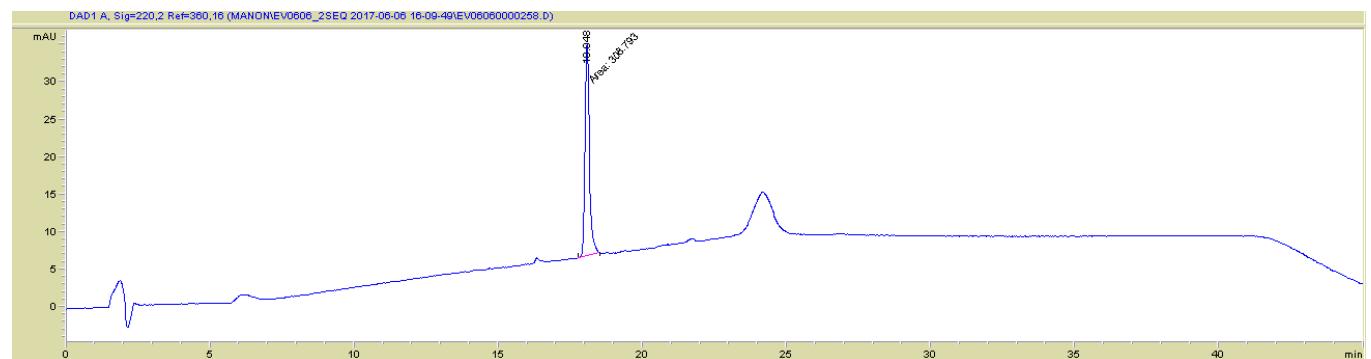


### 3 Spectres HPLC-UV des standards utilisés pour la droite d'étalonnage

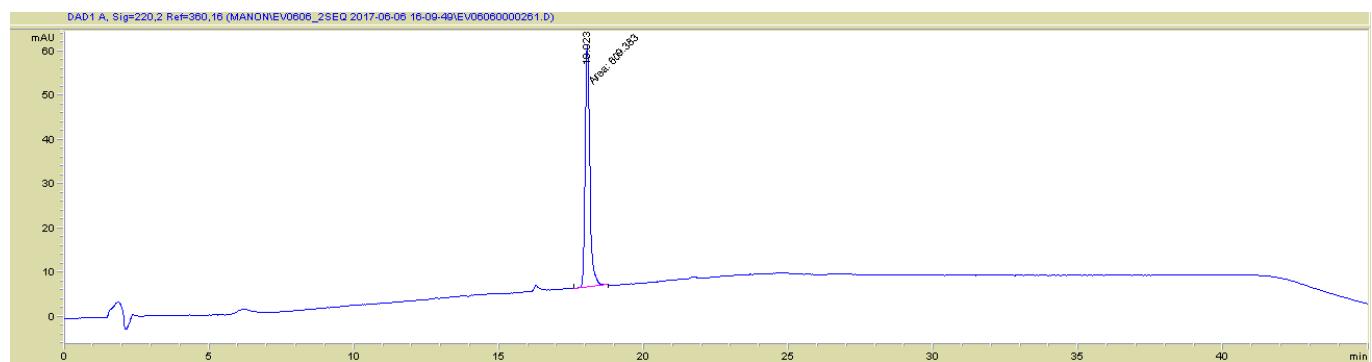
Annexe 6 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 0ppm d'arabidopside A



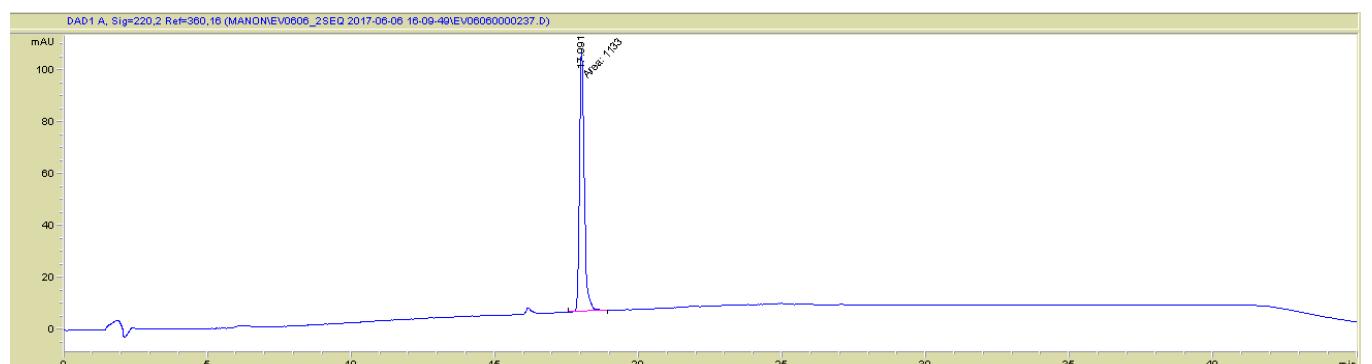
Annexe 7 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 12,5ppm d'arabidopside A



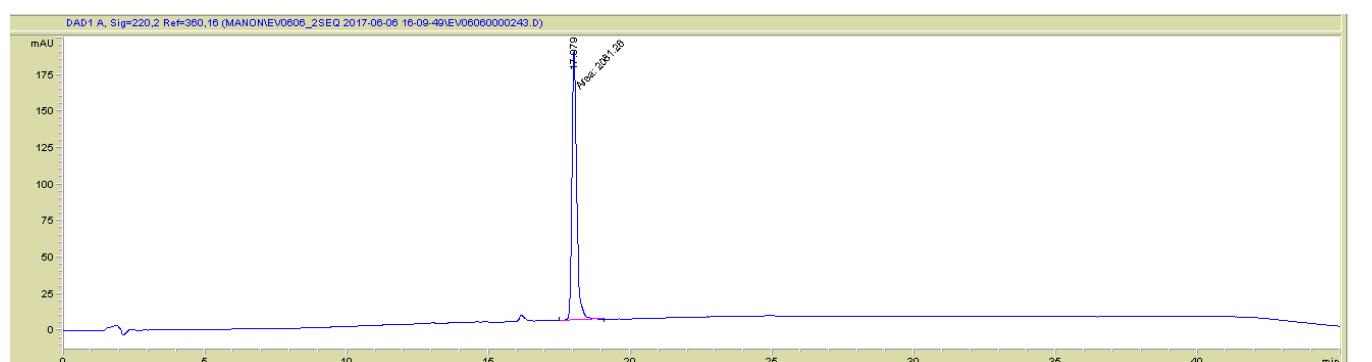
**Annexe 8 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 25ppm d'arabidopside A**



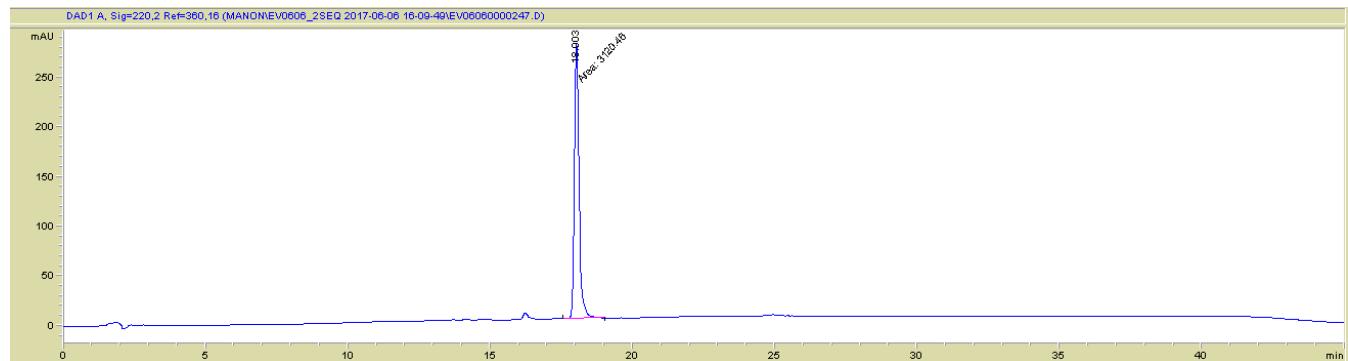
**Annexe 9 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 50ppm d'arabidopside A**



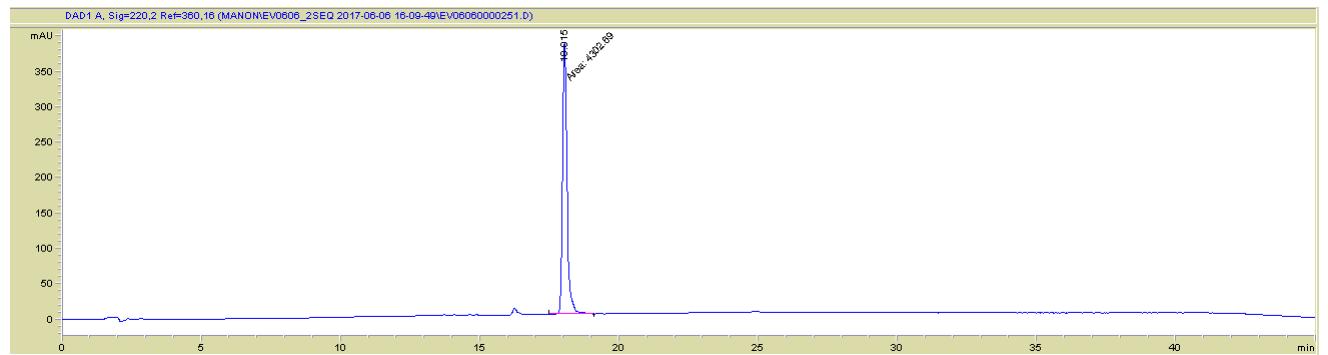
**Annexe 10 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 100ppm d'arabidopside A**



**Annexe 11 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 150ppm d'arabidopside A**



**Annexe 12 - Spectre HPLC-UV obtenu pour la solution 200ppm d'arabidopside A**



## 4 Tableau des données obtenues pour les rendements d'extraction

**Annexe 13 - Tableau des données brutes obtenues pour les rendements d'extraction**

extraction	fraction	tube	molécules	aire 1	aire 2	aire 3	moyenne
1	1	16	ara A	3944,4	3940,4	3961,4	3948,7
1	1	21	ara B	725,3	713,6	699,9	712,9
1	2	6	ara D	737,3	740	740,7	739,3
1	2	8	ara A	1014,6	1025	981,9	1007,2
2	2	6	ara D	518,9	524,4	524,2	522,5
2	2	8	ara A	834,9	845,2	882,9	854,3
2	2	10	ara D	12,8	12,9	13,3	13,0
2	2	12	ara B	63,2	62,6	62,1	62,6
3	2	6	ara D	248,4	290,4	281,4	273,4
3	2	7	ara A	1126,6	1125,8	1055,4	1102,6
4	1	13	ara A	10,7	12	10,8	11,1666667
4	1	15	ara B	0	0	0	0
4	1	16	ara B	0	0	0	0
4	2	14	ara D	17,2	16,8	15,2	16,4
4	2	16	ara A	21,6	21	22,3	21,6

<b>4</b>	2	17	ara A	0	0	0	0,0
<b>5</b>	1	14	ara A	46,5	45,7	45,7	46,0
<b>5</b>	1	15	ara B	6,3	8,1	8,1	7,5
<b>5</b>	1	16	ara B	7,3	7,1	5,3	6,6
<b>5</b>	2	5	ara D	160,8	158,4	176,2	165,1
<b>5</b>	2	7	ara A	158,1	154,4	156,6	156,4
<b>5</b>	2	8	ara A	183,3	182,9	170,8	179,0
<b>6</b>	1	13	ara A	0	0	0	0,0
<b>6</b>	1	15	ara a	19,4	20	19	19,5
<b>6</b>	1	17	ara B	0	0	0	0,0
<b>6</b>	1	18	ara B	0	0	0	0,0
<b>6</b>	2	5	ara D	13,8	15,6	11,8	13,7
<b>6</b>	2	6	ara A	12,4	11,9	11,3	11,9
<b>7</b>	1	20	ara E	54,5	59,4	56,1	56,7
<b>7</b>	2	5	ara D	41,9	43,7	42,8	42,8
<b>7</b>	2	7	ara A	263,8	223,8	261,6	249,7
<b>7</b>	2	10	ara B	43,2	43,2	47,3	44,6
<b>8</b>	2	4	ara D	325,1	321,1	319,3	321,8
<b>8</b>	2	5	ara A	629,6	620,6	588,8	613,0
<b>8</b>	2	8	ara B	57,7	58,9	50,1	55,6
<b>9</b>	2	6	ara D	250	234,4	189,6	224,7
<b>9</b>	2	7	Ara A	76,6	73,4	71	73,7
<b>9</b>	2	9	ara E	92,3	56,8	/	74,6