

Etudes métabolomiques par RMN sur différents organes de Lin

francois.mesnard@u-picardie.fr

EA 3900 – BIOPI – BIOlogie des Plantes et Innovation - UPJV

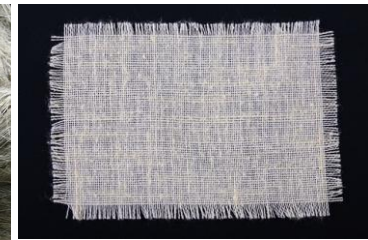
Contexte

Le lin (*Linum usitatissimum*) : une plante d'intérêt
2 types de lin pour des domaines d'application différents



* lin fibre :

- industrie textile
- construction (isolation)



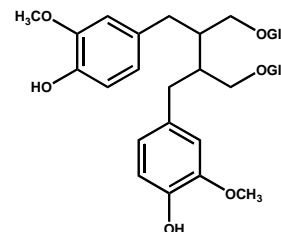
* lin oléagineux :

- construction (huile, peinture)
- industrie agroalimentaire (acides gras polyinsaturés)
- industrie pharmaceutique et cosmétique (lignanes)



Secoisolaricirésinol digluco-side (SDG)

- propriétés dans la prévention contre les cancers hormono-dépendants,
- phytoestrogènes,
- action antiradicalaire



Etude des graines

✓ Projet régional METADYN

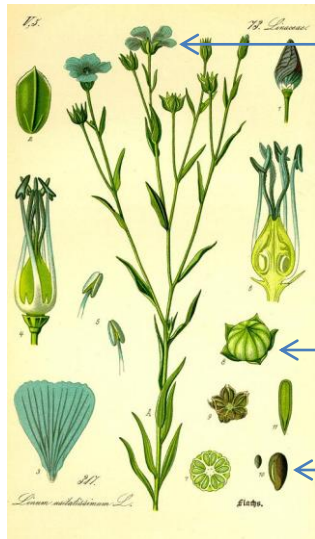
Partenaires : GEC, LG, Plateformes UPJV, Laboulet Semences, MPI Jena



✓ Les graines de lin

Après floraison, formation du fruit (capsule), à l'intérieur duquel, il y a les graines (~8 -10 par capsule)

Graine : embryon (huile) et tégument avec plusieurs couches cellulaires (lignanes, mucilage)



fleur

capsule

graine



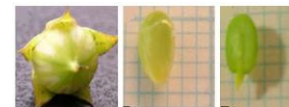
graine
mature



coupe de
graine

partie interne :
embryon

partie externe :
tégument



Etude des graines

✓ Mise au point d'un protocole de préparation d'échantillons adaptés à l'analyse métabolomique par RMN

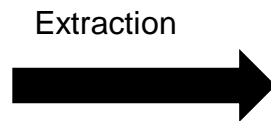
Considération des contraintes expérimentales propres aux études métabolomiques en fonction des contraintes propres au matériel végétal:

- ❑ Graine de lin (mucilage, huile, métabolites complexés)
- ❑ Analyse métabolomique (maximum de métabolites détectés, protocole rapide et reproductible)

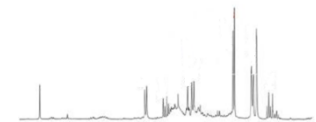
✓ Application à différentes variétés de lin



HT : High content in omega 3 fatty acids,
FT : Weak content in omega 3 fatty acids
TI : Average content in omega 3 fatty acids



Analyse par RMN ^1H



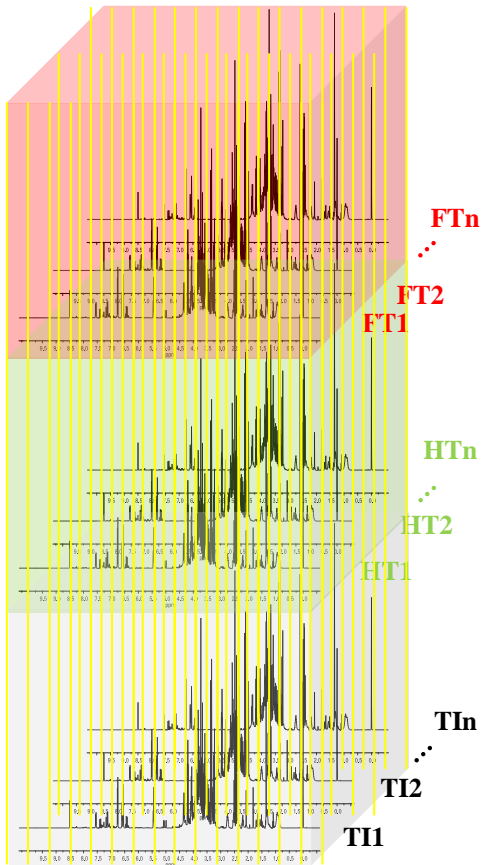
spectres

Modifications du contenu en
autres métabolites?

Etude des graines

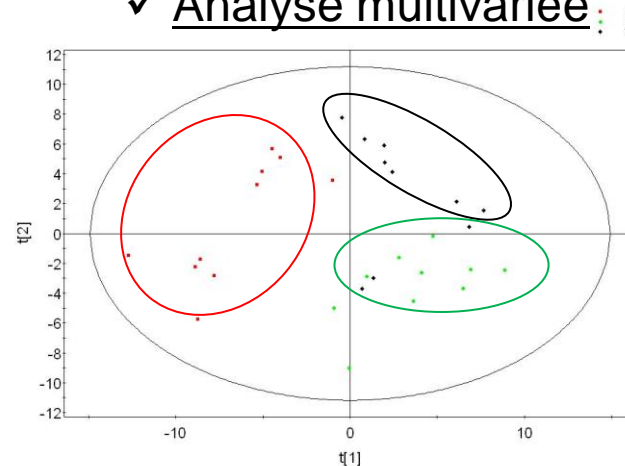
✓ Découpage des spectres et intégration

✓ Génération d'une matrice de données



ppm	FT	FT	FT	HT	HT	HT	TI	TI	TI
-0.48226	-0.127424	-0.0300475	-0.0353806	0.0638466	0.236487	0.0983232	0.0583065	0.143433	0.197317
-0.442104	-0.241539	-0.0768318	-0.0455758	0.037622	0.310559	0.14205	0.283255	0.202784	0.304014
-0.401948	0.0252702	-0.0217774	-0.0454519	-0.100814	-0.0386402	0.0458529	0.0970842	0.00279558	0.159951
-0.361791	0.00690592	0.429927	0.599574	0.237024	0.278574	0.0993229	0.292397	0.0969406	0.261016
-0.321635	-0.283444	0.00749474	-0.0177874	0.0813148	0.200645	0.0895787	-0.0435649	0.296977	0.0988321
-0.281479	-0.213461	-0.0211594	-0.198867	-0.0201786	0.182978	0.135664	-0.00856326	0.147246	0.361015
-0.241323	-0.0971256	0.40019	-0.157604	0.140149	0.177931	0.0339688	0.454134	0.337236	0.382694
-0.201166	-0.932479	-0.339542	-0.170063	-0.290741	-0.0121055	-0.0940321	-0.291783	0.00530684	-0.0072944
-0.16101	-0.689967	-0.538908	-0.498176	-0.328488	-0.610462	-0.436835	-0.431529	-0.37196	0.0111927
-0.120854	4.55711	4.75329	4.43635	4.88858	4.70692	4.50379	4.4444	4.88873	4.9621
-0.0806977	2.2014	0.0468816	0.559972	0.382601	-0.5042	-0.264439	-0.0291405	-0.346116	-0.557645
-0.0405415	26.8639	9.38107	20.7548	13.6578	5.57178	7.16943	7.26907	-0.6525	-2.64788
-0.00038521	981.932	990.374	985.024	988.386	992.375	993.11	991.932	998.082	999.034
0.039771	10.6354	18.5356	13.8145	16.8247	20.7528	24.4667	21.0865	31.5653	37.7129
0.0799273	-2.87402	-1.03937	-1.86323	-1.38436	-0.568294	-1.16714	-0.762385	-0.156828	0.759558
0.120084	4.36316	4.60185	4.86441	4.44667	4.55514	4.38939	4.49358	4.47082	4.58077

✓ Analyse multivariée



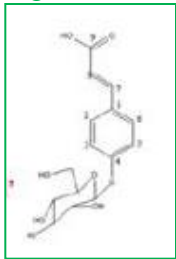
→ Discrimination entre les trois groupes de graines



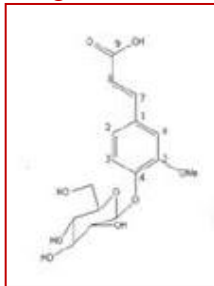
Etude des graines

✓ Détermination des déplacements chimiques discriminants et identification de molécules

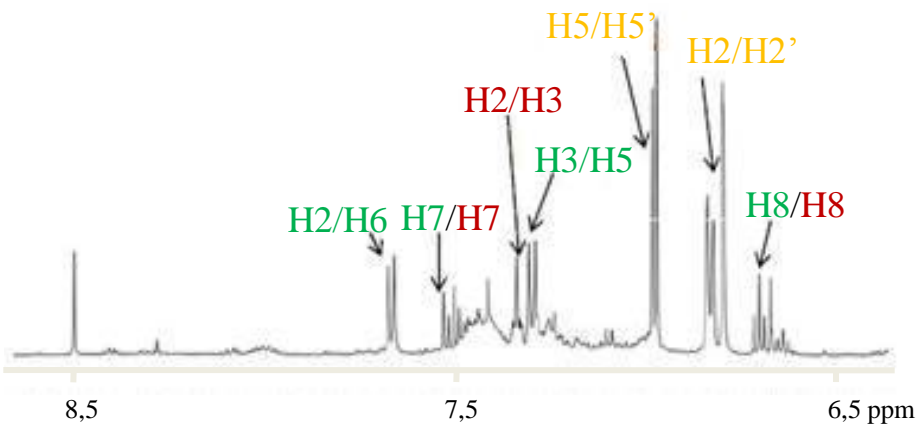
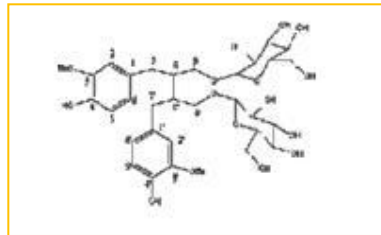
Acide coumarique glucoside



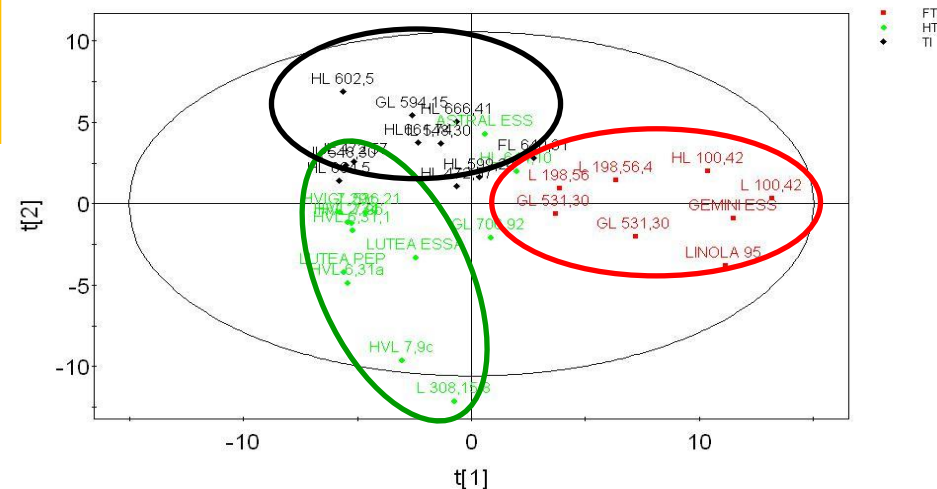
Acide férulique glucoside



Sécoisolaricirésinol diglucoside



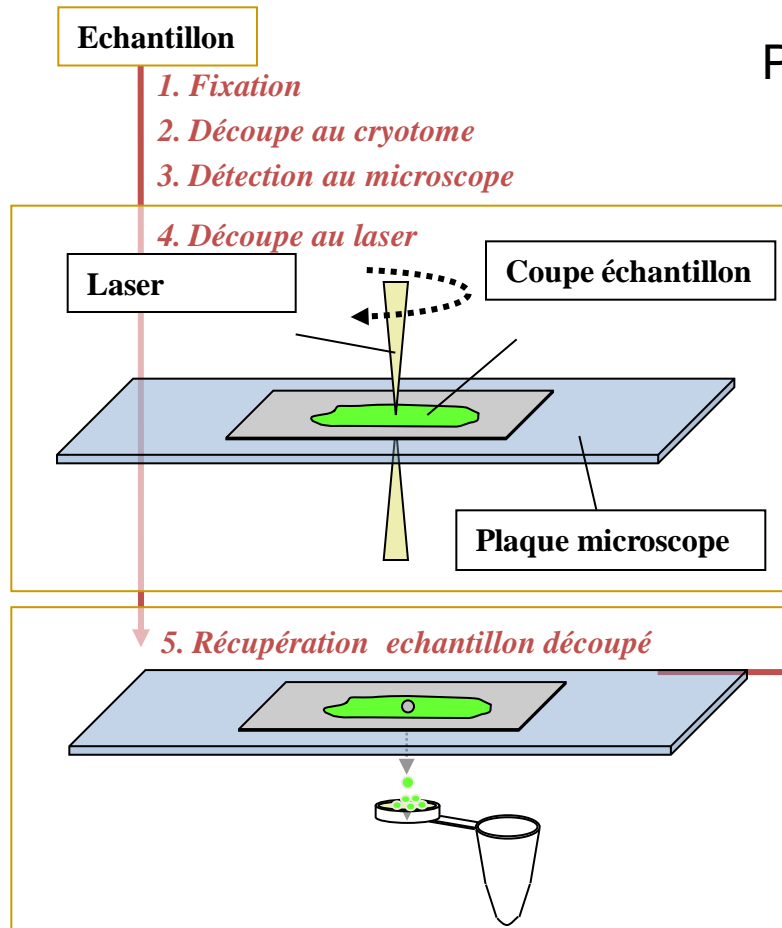
✓ Constitution d'une base de données



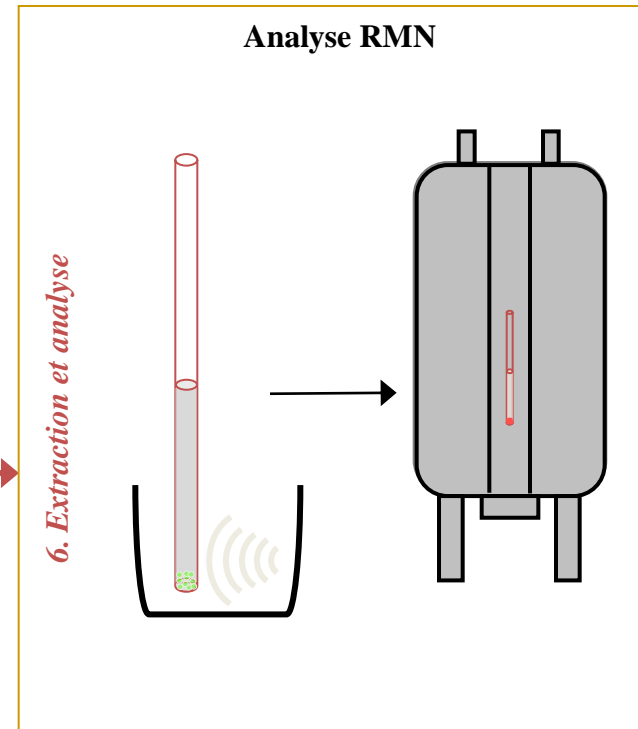
✓ Développement d'un outil pour la sélection variétale

Etude des graines

✓ Micrométabolomique

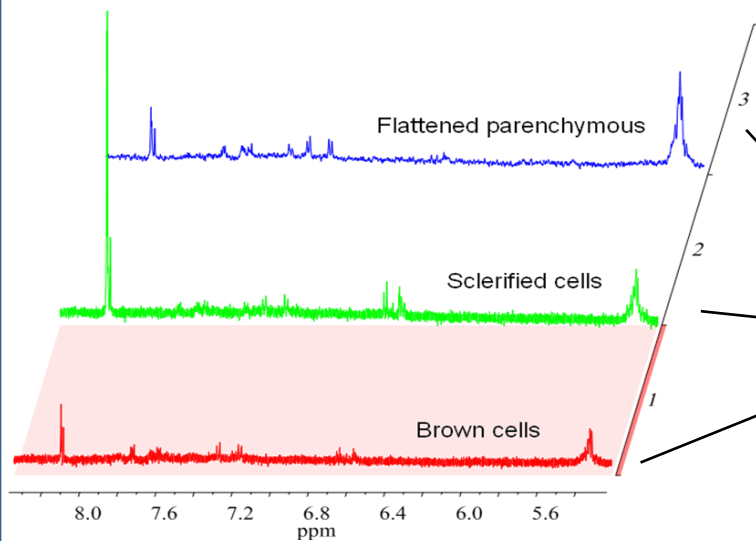


Principe de la microdissection laser

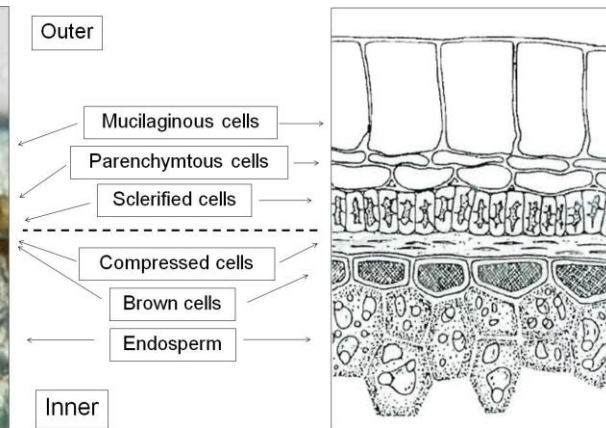
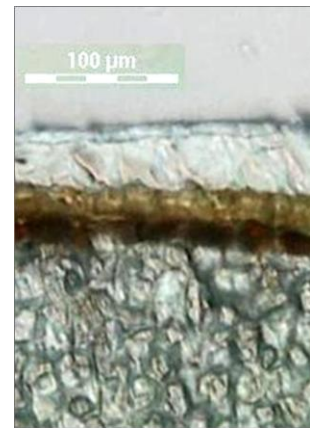


Etude des graines

✓ Découpe de différentes couches du tégument et analyse RMN des échantillons



Spectre RMN 1H d'extrait des différentes couches du tégument microdisséqué



→ Localisation tissulaire de l'accumulation du SDG

Etude des graines

✓ Suite du travail

Projet FUI Granolin :
évaluer l'influence des conditions
pédoclimatiques sur le contenu
de la graine de lin



De projet est cofinancé par l'Union européenne
L'Europe s'engage en Picardie avec le Fonds européen de développement régional



COSMETIC VALLEY



*Programme GENESYS du projet
PIVERT :* étude métabolomique et
transcriptomique de la graine de lin
au cours de son développement:
interaction tégument-embryon



Etude des tiges

✓ Partenaires

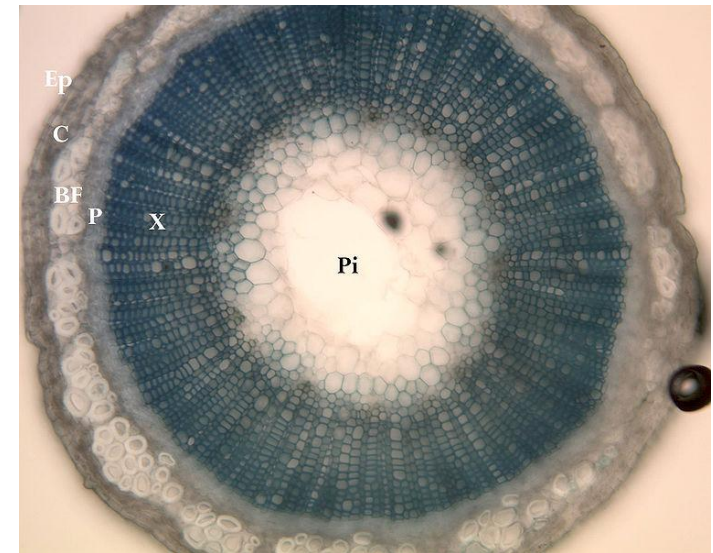
USTL, UMR INRA 1281 SADV - S Hawkins,
URCA, UMR INRA 614 FARE - B Chabbert

✓ La tige de lin

CT tige → 2 types de tissus bien distincts :

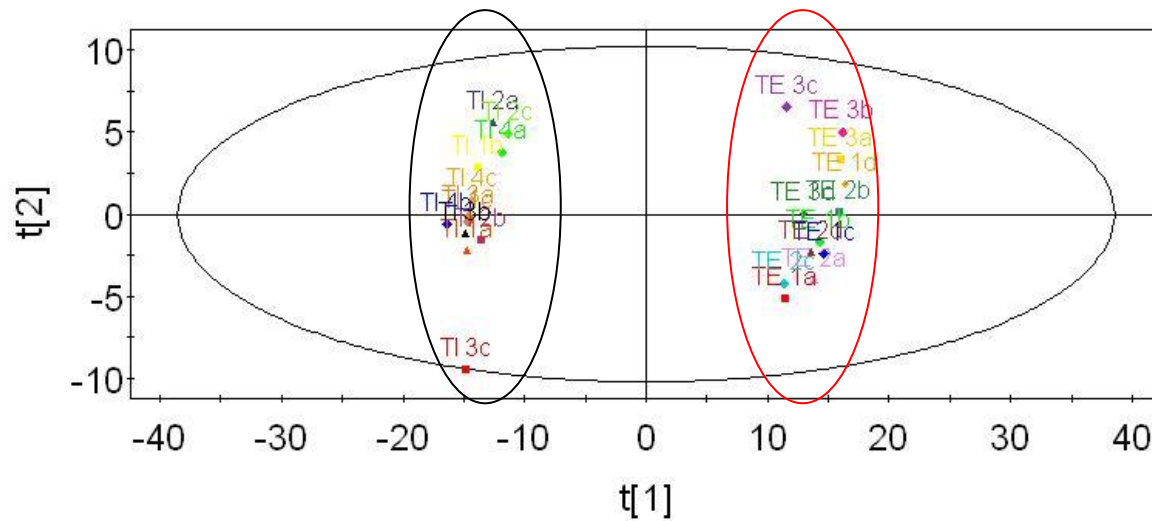
- tissus interne (riche en lignine)
- tissus externe (pauvre en lignine, riche en cellulose)
- modèle intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires de régulation de la biosynthèse de la lignine (intérêt biofuel)

Différences métaboliques entre ces deux types tissulaires?



Etude des tiges

✓ ACP

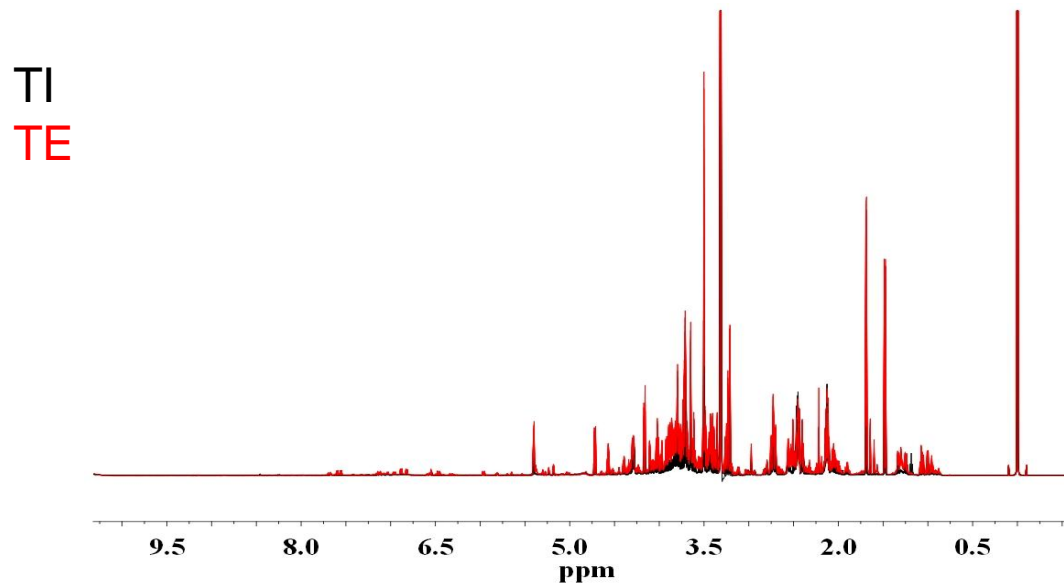


Distinction des groupes TI et TE



Etude des tiges

→ Recherche des métabolites discriminants

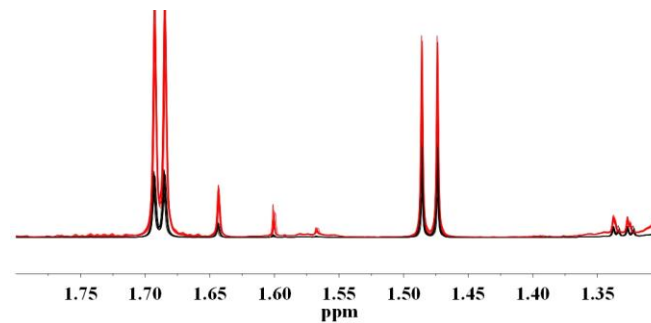
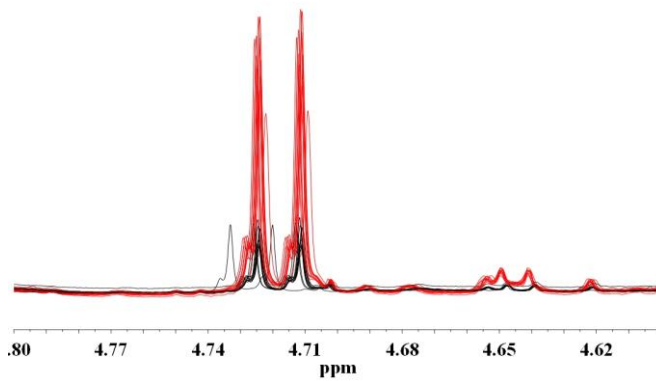
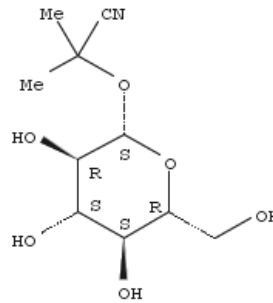


tissus externes plus riches en métabolites (semi-)polaires que tissus internes

Etude des tiges

✓ Exemple de métabolite discriminant

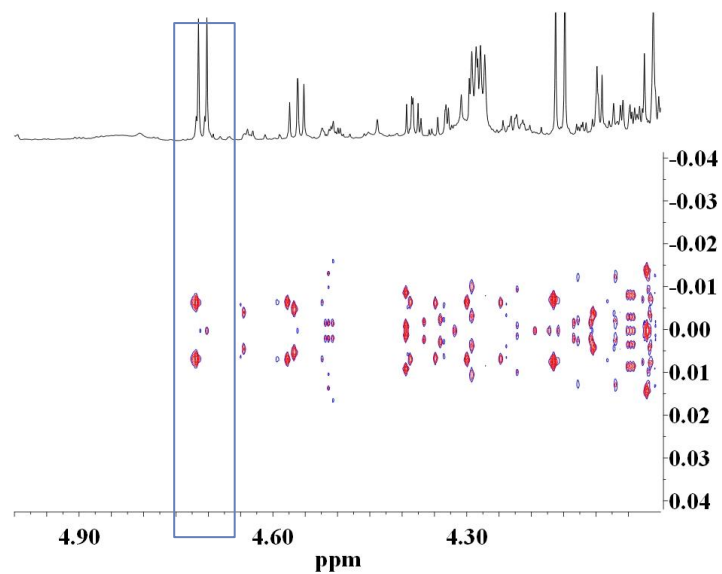
Linamarin > pour TE



Etude des tiges

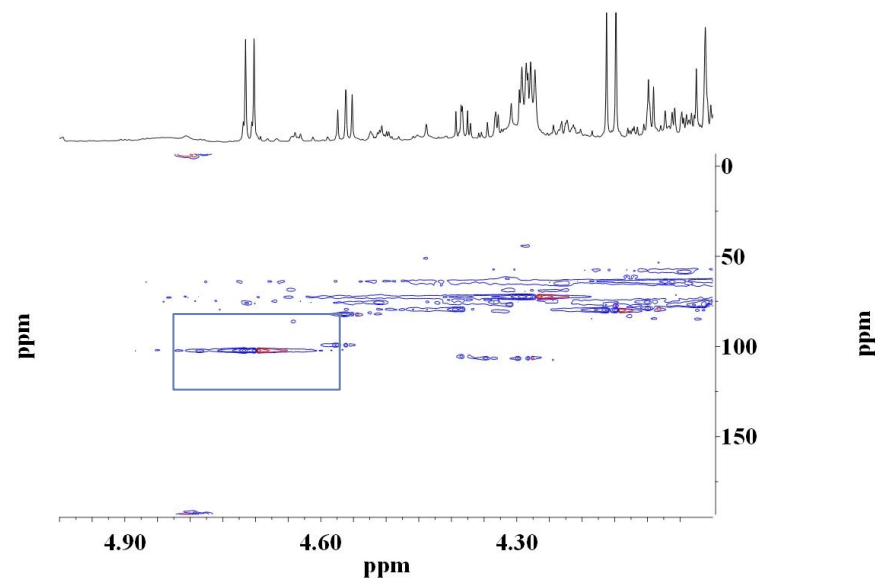
Linamarin

✓ Spectre J-Res



d à 4.72 ppm, $J=7.7\text{Hz}$

✓ Spectre HSQC



corrélation $^1\text{H}/^{13}\text{C}$
4.72 ppm/102 ppm

Etude des tiges

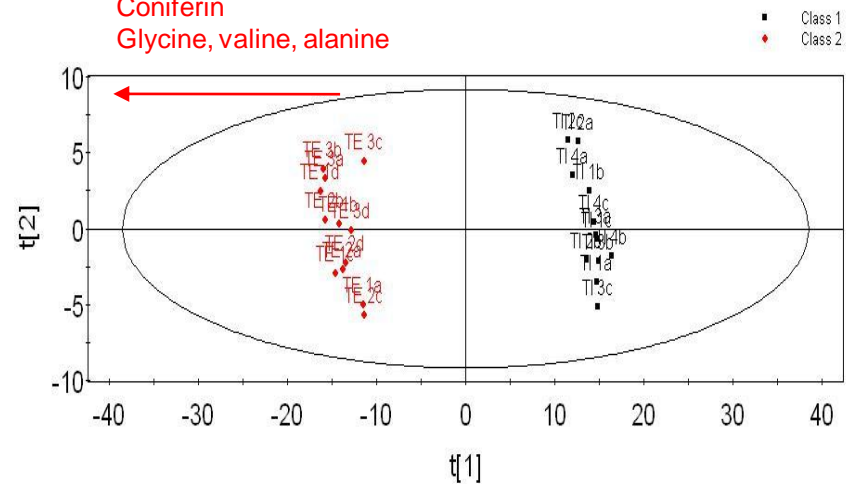
metabolite	Chemical shift (ppm)	Type of signal	J (Hz)				
isoleucine	0.95	t	7.5	Proline	2.00	m	
	1.02	d	7		2.09	m	
Linoleic acid	0.96	t	7.6		2.34	m	
	1.00	d	7		3.41	m	
valine	1.05	d	7.1		4.07	dd	6.5/8.7
	1.01	t	7.6	Glutamine	2.13	m	
Linolenic acid	1.07	t	7.6		2.45	m	
	1.60	s			3.71	t	6.2
	1.64	s		Aspartic acid	2.64		
	1.89	dd	7.4/13.7		2.81		
	1.98 and/or 2.00 and/or 2.02	dd	7.4/13.7		3.83	dd	3.6/9.4
Lactate	1.33	d	5.4	Choline	3.21	s	
Threonine	1.33	d	5.4		Sucrose	3.43	t
	3.51	d	5.1	3.50		dd	3.9/9.9
	4.22	m		3.65		S	
Alanine	1.48	d	7.3	4.02		t	8.4
	3.72	q	7.3	4.17		d	8.6
linamarin	1.69	s		5.40	d	3.8	
	1.69	s		Glycine	3.50	s	
	3.25	dd	7.8/9.3		Coniferin	3.90	s
	3.39	t	9.4	4.24		dd	
	3.49	t	9.1	5.01		m	
	3.87	dd	2/12	6.32		td	5.8/16
	4.72	d	7.7	6.57		d	16
				7.03		dd	2/8.3
			7.12	d		8.4	
			7.14	d		2	

Etude des tiges

metabolite	Chemical shift (ppm)	Type of signal	J (Hz)
Trigonelline	4.45	s	
	8.10	m	
	8.86	m	
	9.14	s	
Glucose-b	4.58	d	8
Glucoside coumarylic alcohol	5.00	d	
	6.29	td	5.8/16
	6.58	d	16
	7.07	d	8.7
	7.42	d	8.7
Glucose-a	5.18	d	3.7
Fumaric acid	6.55	s	
Tryptophan	7.13	t	
	7.21	t	
	7.28	s	
	7.46	d	
	7.71	d	
Formic acid	8.46	s	

✓ PLS

Cyanogen glycosides
Fatty acids
Sucrose
Coniferin
Glycine, valine, alanine



➔ Hypolignification est associée à l'accumulation intensive d'oligolignols

Plant Physiology, 2012 (158) 1893-1915

Etude des feuilles

✓ Les feuilles de lin



✓ Le stress hydrique

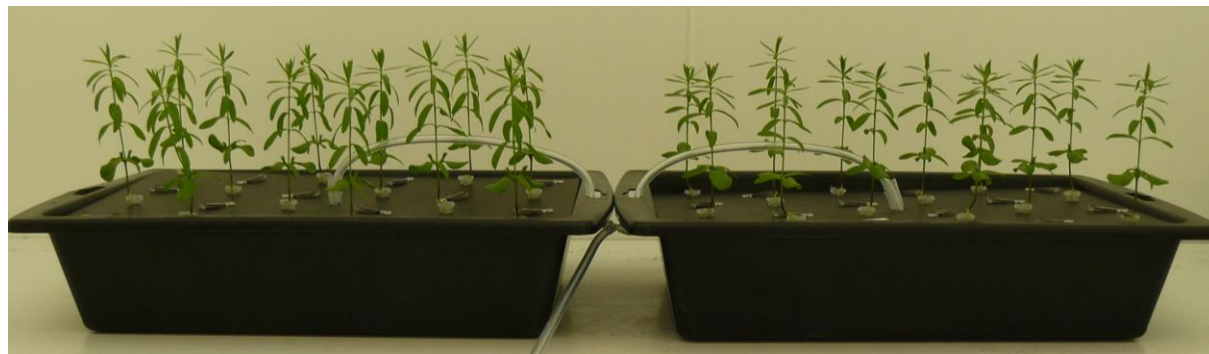
depuis 50 ans, BABA : action élicitrice reconnue, protection des plantes contre pathogènes récemment, rôle dans la tolérance au stress hydrique (*Arabidopsis*)



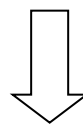
Modifications métaboliques induites par BABA chez le lin?

Etude des feuilles

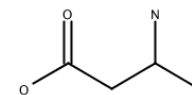
✓ Réalisation de cultures de lin avec ou sans BABA



✓ Extraction des feuilles à différents temps de culture

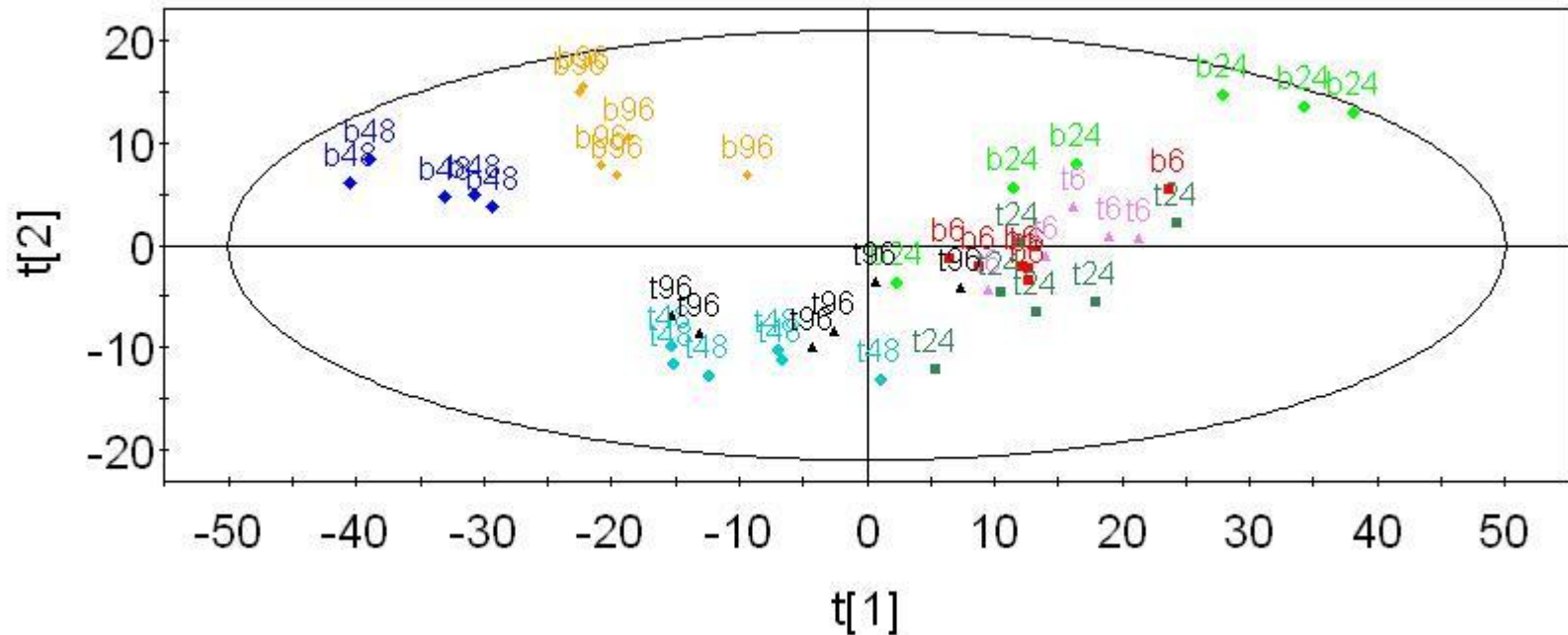


BABA



Etude des feuilles

✓ ACP



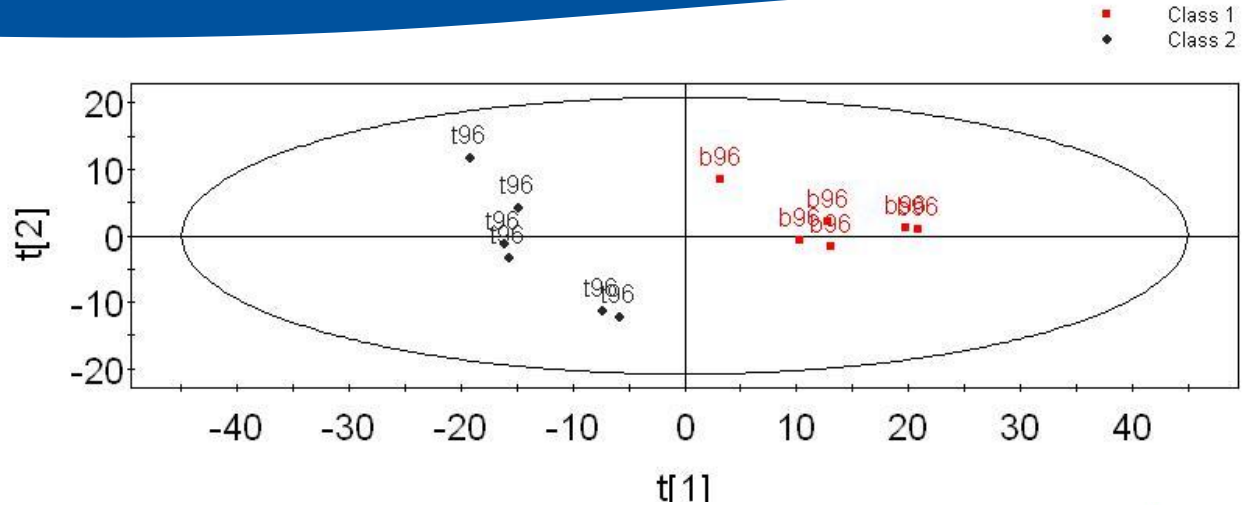
Oy : distinction des groupes BABA et témoin

Ox : distinction des durées de culture

Temps longs : distinction + forte

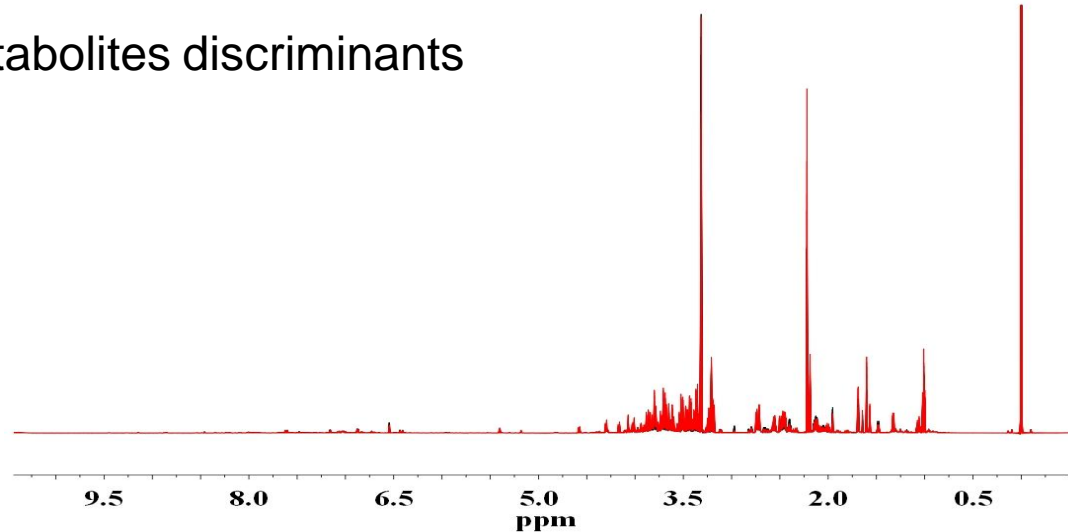
Etude des feuilles

✓ PLS 96H



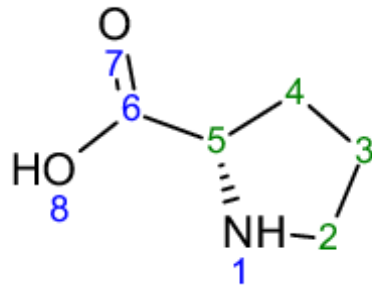
→ Recherche des métabolites discriminants

Témoin
BABA



Etude des feuilles

Proline >
pour BABA



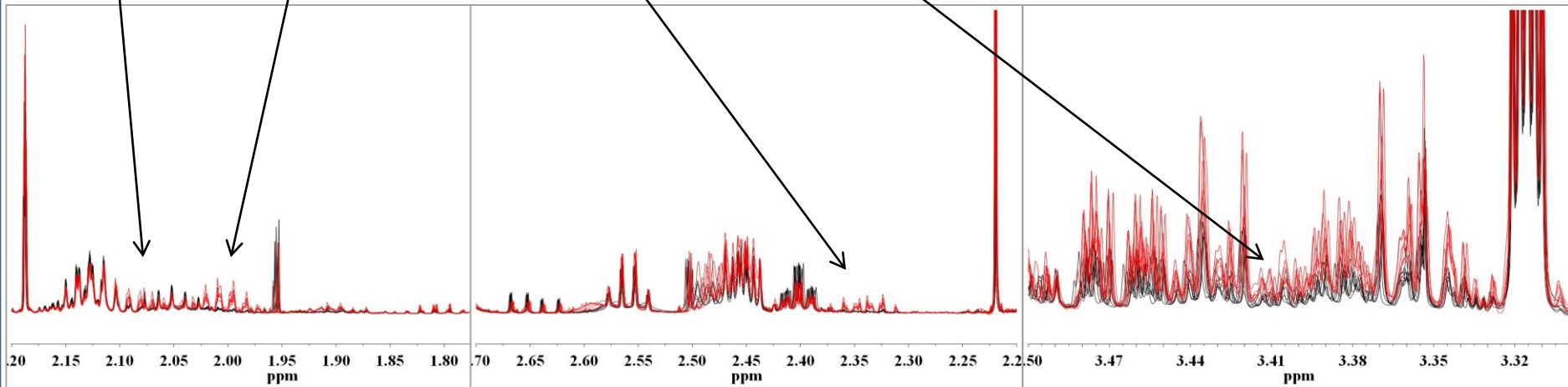
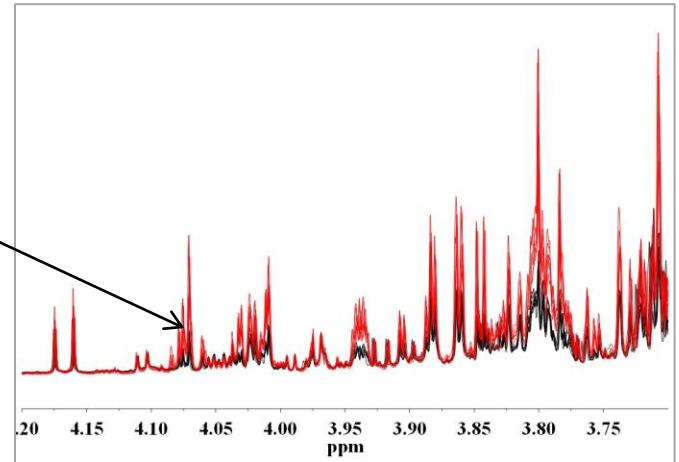
H5, dd à 4.12 ppm

H3, m à 2.00 ppm

H4, m à 2.08 ppm

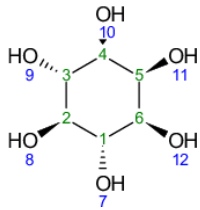
H2, dt à 3.41 ppm

H4', m à 2.34 ppm



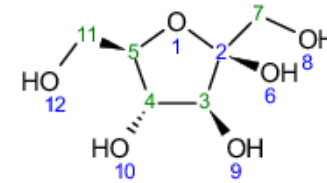
Etude des feuilles

Myoinositol > pour BABA

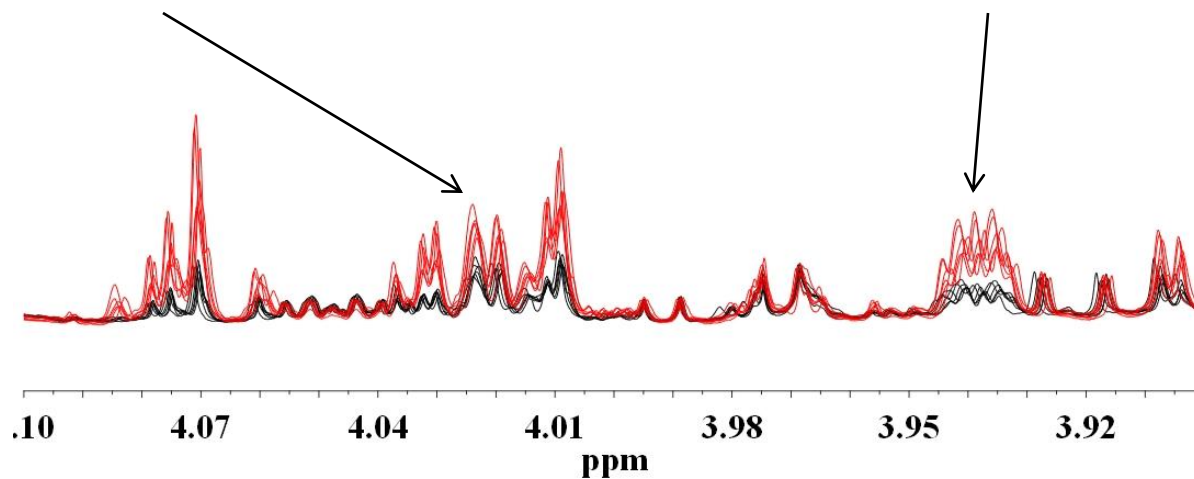


H5, t à 4.02 ppm

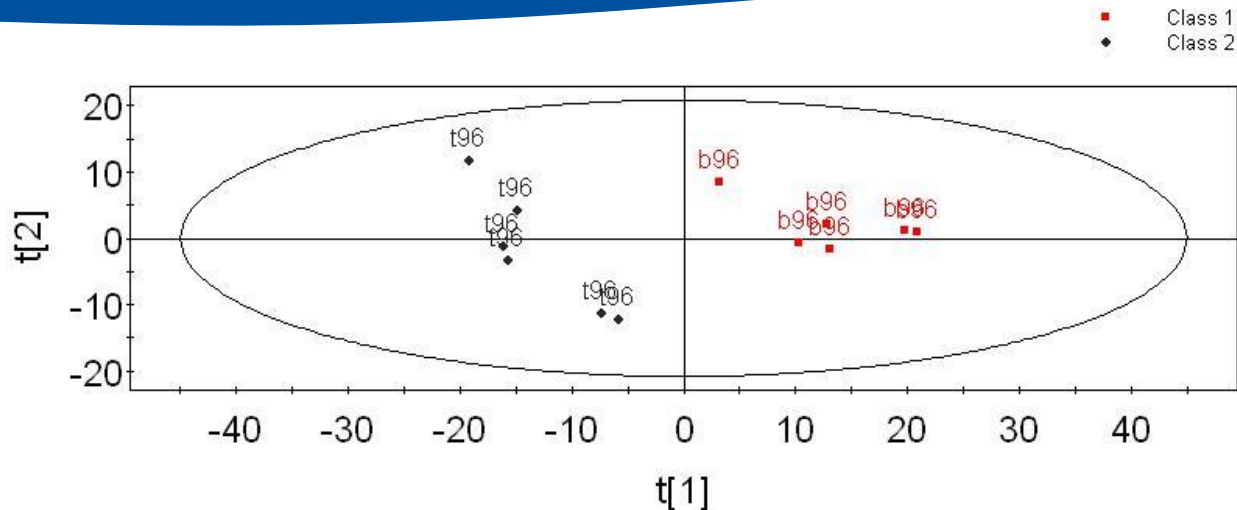
Fructose > pour BABA



H4, m à 3.94 ppm



Etude des feuilles



Accumulation de sucres, d'acides aminés, de polyols avec traitement BABA → métabolites de la réponse à la perte de turgescence lors d'un stress osmotique rôle du BABA dans la tolérance au stress hydrique chez le lin

✓ Suite du travail





Remerciements

- ✓ Tous les membres de l'unité BIOPI,
- ✓ Partenaires de l'UPJV
LG, GEC, plateformes
- ✓ Partenaires nationaux
UMR INRA 1281 SADV; UMR INRA 614 FARE ; LBLGC EA1207
- ✓ Partenaires internationaux
Research Group Biosynthesis / NMR - MPI for Chemical Ecology - Jena
Dpt of Pharmacognosy - Institute of Biology, Leiden University
- ✓ Partenaires industriels
Laboulet Semences, Linéa, Lesieur, Alban Muller, Aegilops