

Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains

G Branlard, E. Pujos , I, Nadaud , E, Bancel, A, Piquet



ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Quelques rappels

Les méthodes d'analyse par spectrométrie de masse

Quelques outils

Les challenges

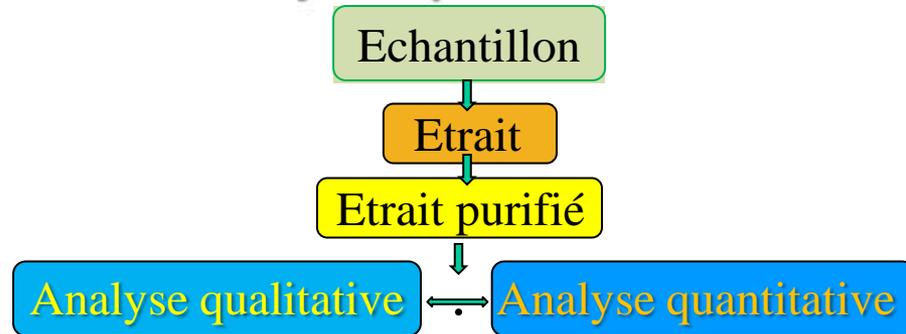
Quelques résultats d'analyse métabolomique sur le blé

L'approche génétique

Intérêt de la protéomique de la couche à aleurone

Conclusion

Quelques rappels sur les méthodes analytiques des constituants nutritionnels



Nombreuses méthodes

Chimiques
Enzymatiques
Spectrophotométriques
Chromatographiques
Absorption
Echange d'ion
Affinité, d'exclusion
Gazeuse
Liquide
HPLC

Vitamines liposolubles

		Méthode	Ref
A	Trans et Cis rétinol	HPLC	EN
Provit A	bêta carotène	HPLC	EN
D2/D3	Calciférol	HPLC	EN
E	Tocophérols	HPLC	EN
K1	Phylloquinone	HPLC	EN

Vitamines hydrosolubles

B1	Thiamine	HPLC	EN
B2	Riboflavine	HPLC	EN
B6	Pyridoxine, Pyrodoxale	HPLC	USP
B12	Cyanocobalamine	HPLC MB	AOAC
Niacine	Acide Nicotinamide	HPLC MB	EN
Acide Pantothénique		HPLC MB	AOAC
Biotine		HPLC MB	FDA
Acide folique		HPLC	AOAC
C	Ac Ascorb. DehydroAsc	HPLC	EN

 AOAC Méthode Assoc of official Analytical Chemists
 EN Comité européen de Normalisation
 FDA US Food and Drug Administration
 MB Méthode Microbiologique
 USP US Pharmacopée

Quelques dates marquantes

- *Karas et Hillenkamp, Anal. Chem. (1988) 60, 2299-2301*
et travaux approchant de Tanaka
Développement du MALDI, application aux macromolécules biologiques
- *Fenn, Mann et al., Science (1989) 246, 64*
Développement de l'ESI, application aux macromolécules biologiques
-
-
-

Pionniers de la Spectrométrie de masse appliquée à l'analyse protéomique

Nobel chimie 2002

John Fenn

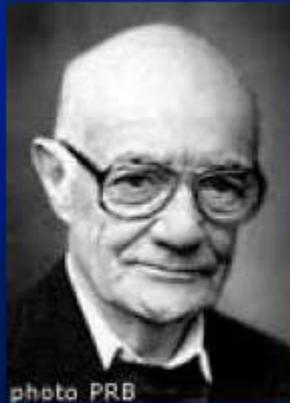


photo PRB

Electrospray

Koichi Tanaka



photo PRB

Maldi

Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains

Quelques rappels

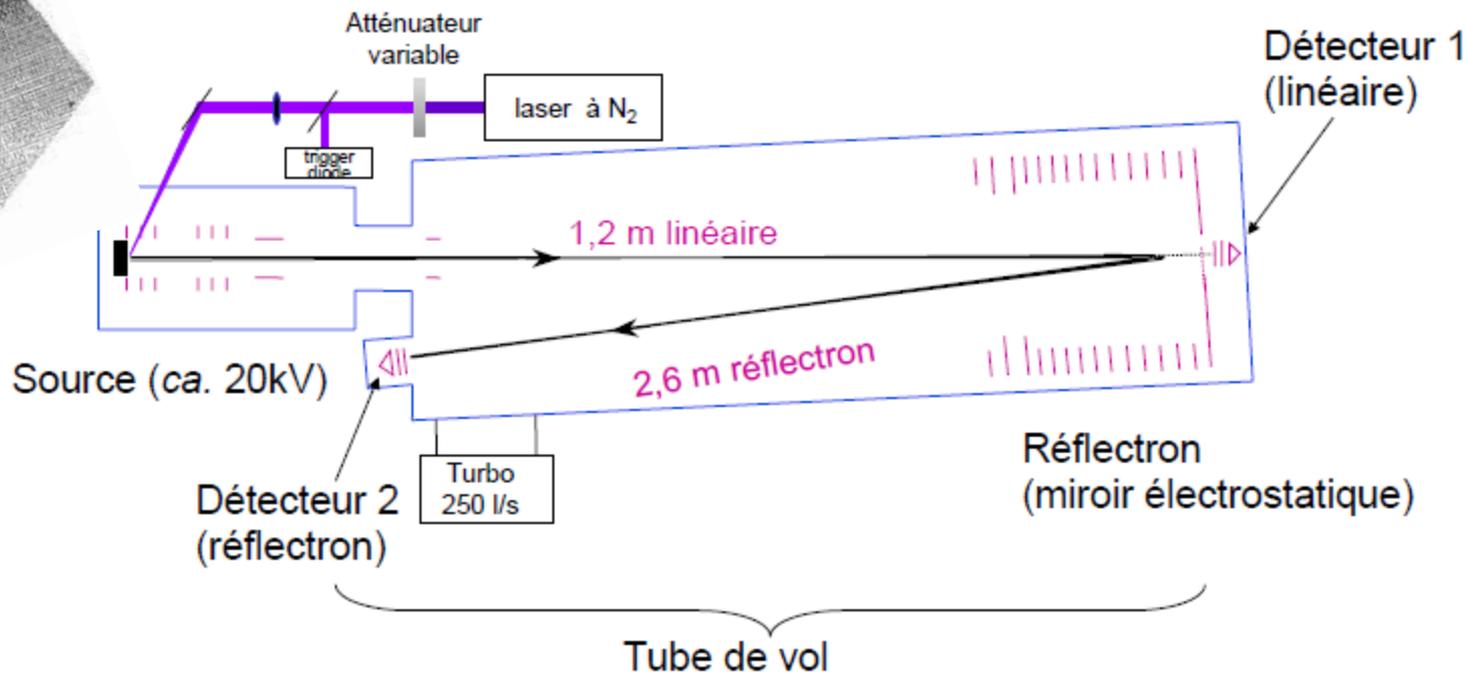
Les méthodes d'analyse par spectrométrie de masse

Quelques outils

Les challenges

Le MALDI ToF

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight

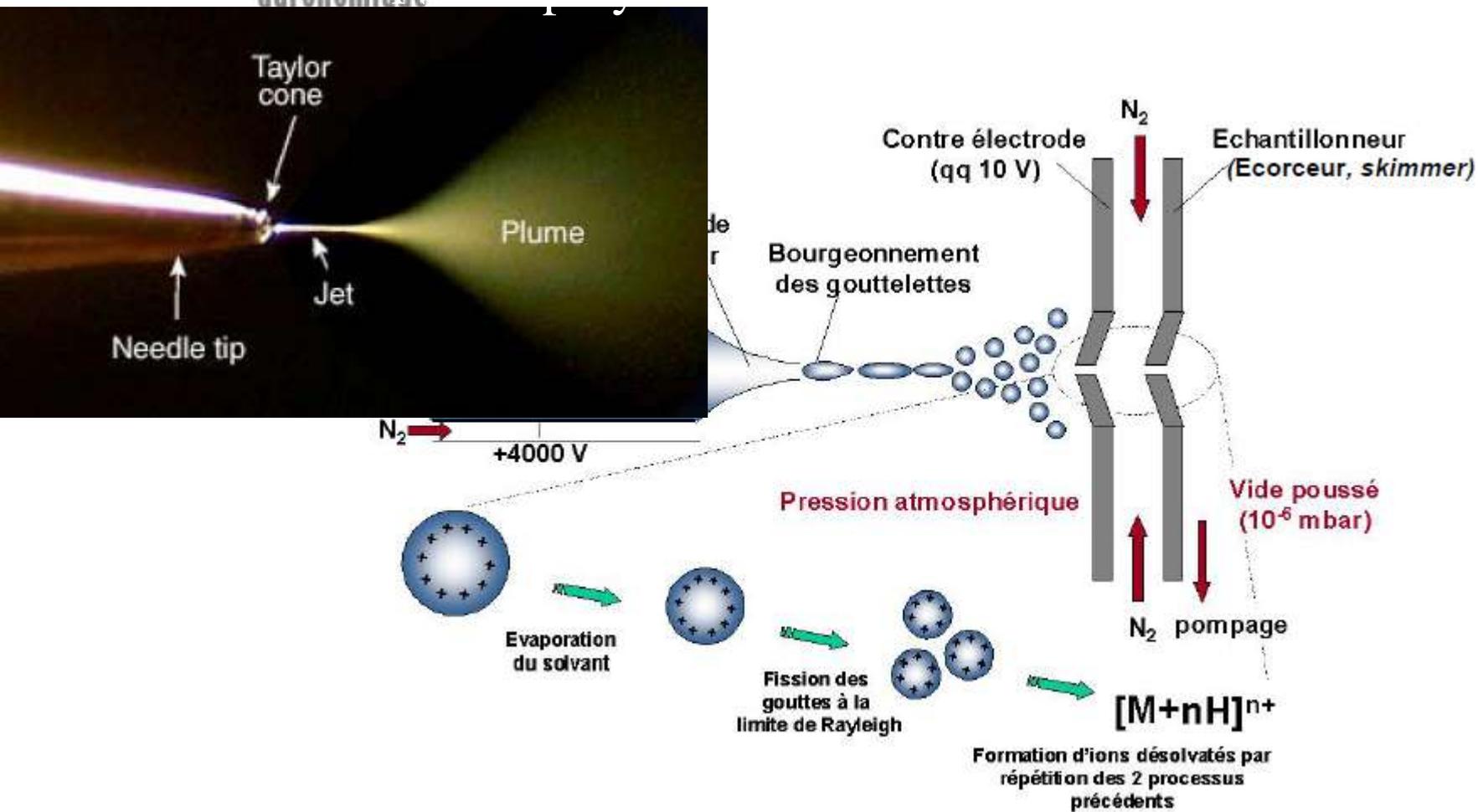


$$F = m\gamma$$
$$F = Q(E + v \times B)$$

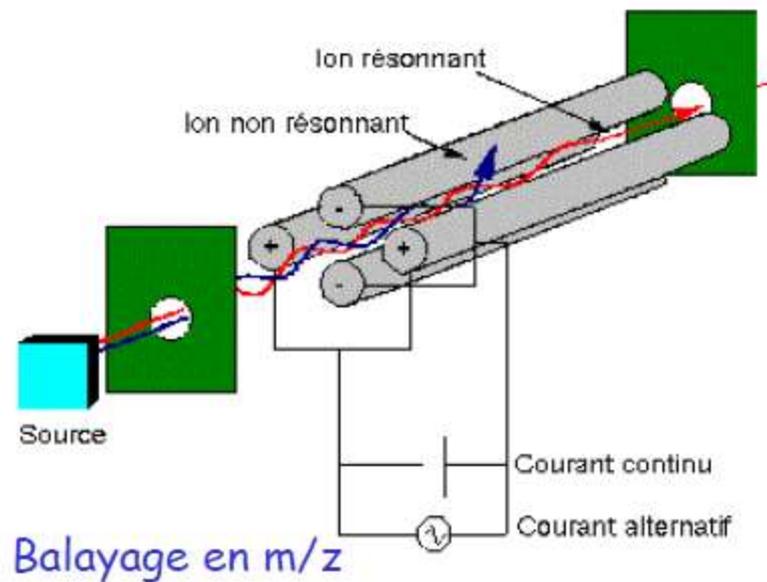
Source: N Sommerer

L'ESI-MS

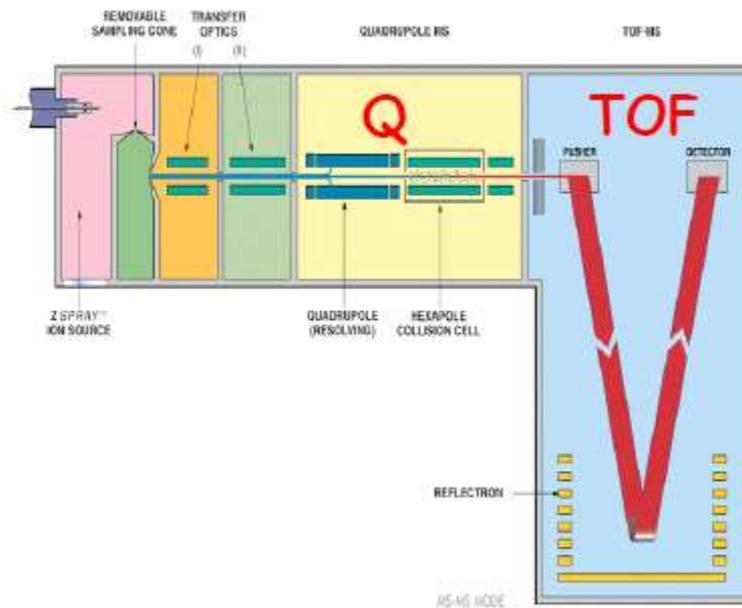
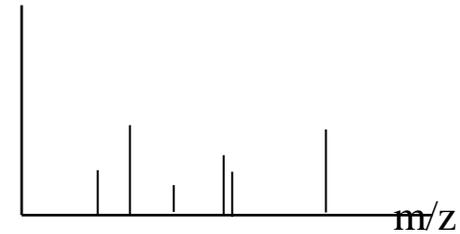
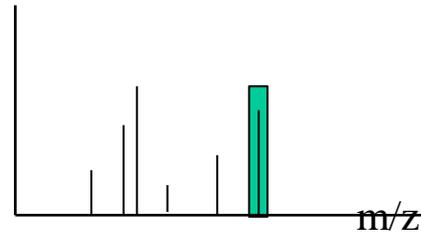
L'ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry



Le quadripôle



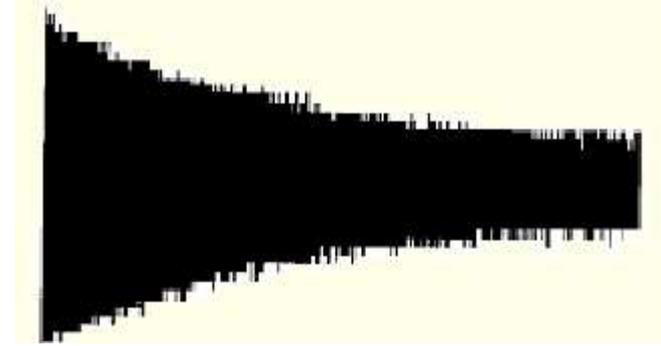
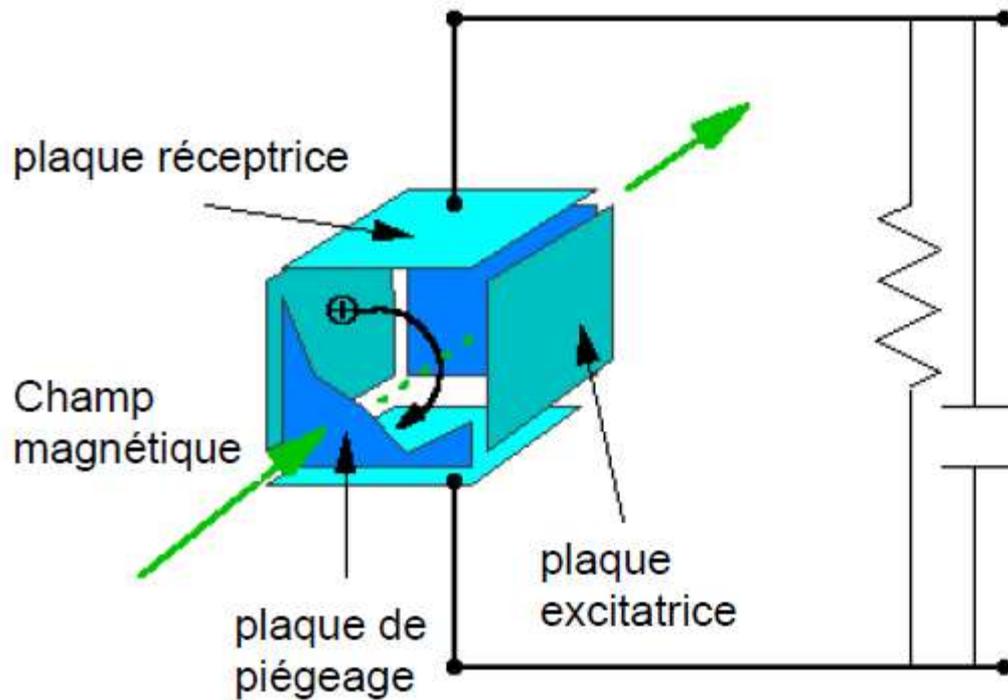
Quelques spectromètres hybrides



quadripôle - temps de vol (Q-TOF™)

Analyseur FT-ICR

Transformée de Fourier - Résonance cyclotronique de l'ion



Electric Field:

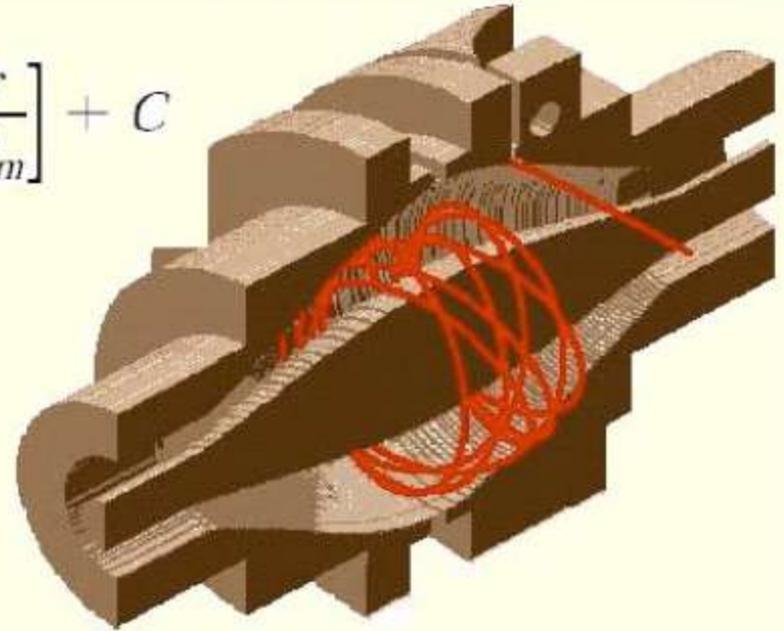
$$U(r,z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$

La trajectoire est composée de deux mouvements : axial et radial

Ion axial motion:

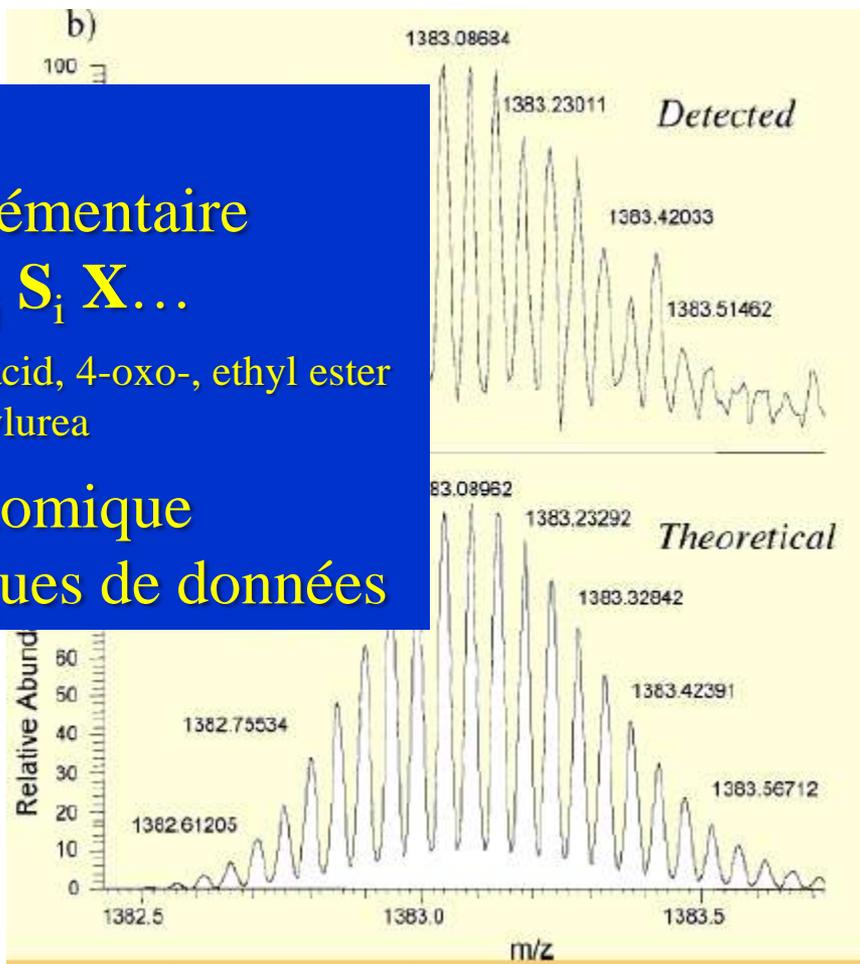
$$\omega = \sqrt{kq/m}$$

Distribution quadro-logarithmique du potentiel électrique responsable du champ électrostatique



Qizhi Hu , Robert J. Noll , Alexander Makarov , Guangxiang Wu , Wolfgang Plass and R. Graham Cooks

Source J C Tabet ,UMR7613, Jussieu



Très haute résolution $R > 100\ 000$

Masse précise : composition élémentaire

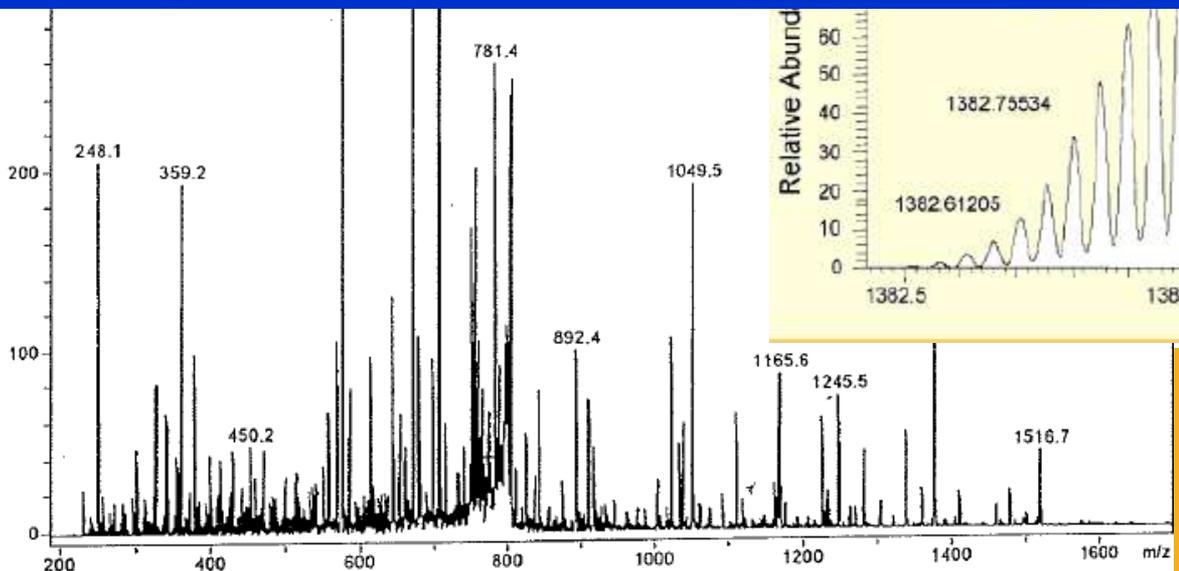
→ $C_n H_m N_l O_k P_j S_i X...$

198.1256 $C_{11}H_{18}O_3$ Cyclohexanepropionic acid, 4-oxo-, ethyl ester

198.1732 $C_{11}H_{22}N_2O$ Cyclooctyl-1, 1-dimethylurea

Utilisation d'isotope stable : fluxomique

Mesures rapides, création de banques de données



Domaines de Masses et molécules accessibles

De quelques dizaines à plusieurs millions d'unités de masse atomique (u)

Polluants, pesticides, xénobiotiques,

Lipides, phospholipides, glycolipides, acides organiques,

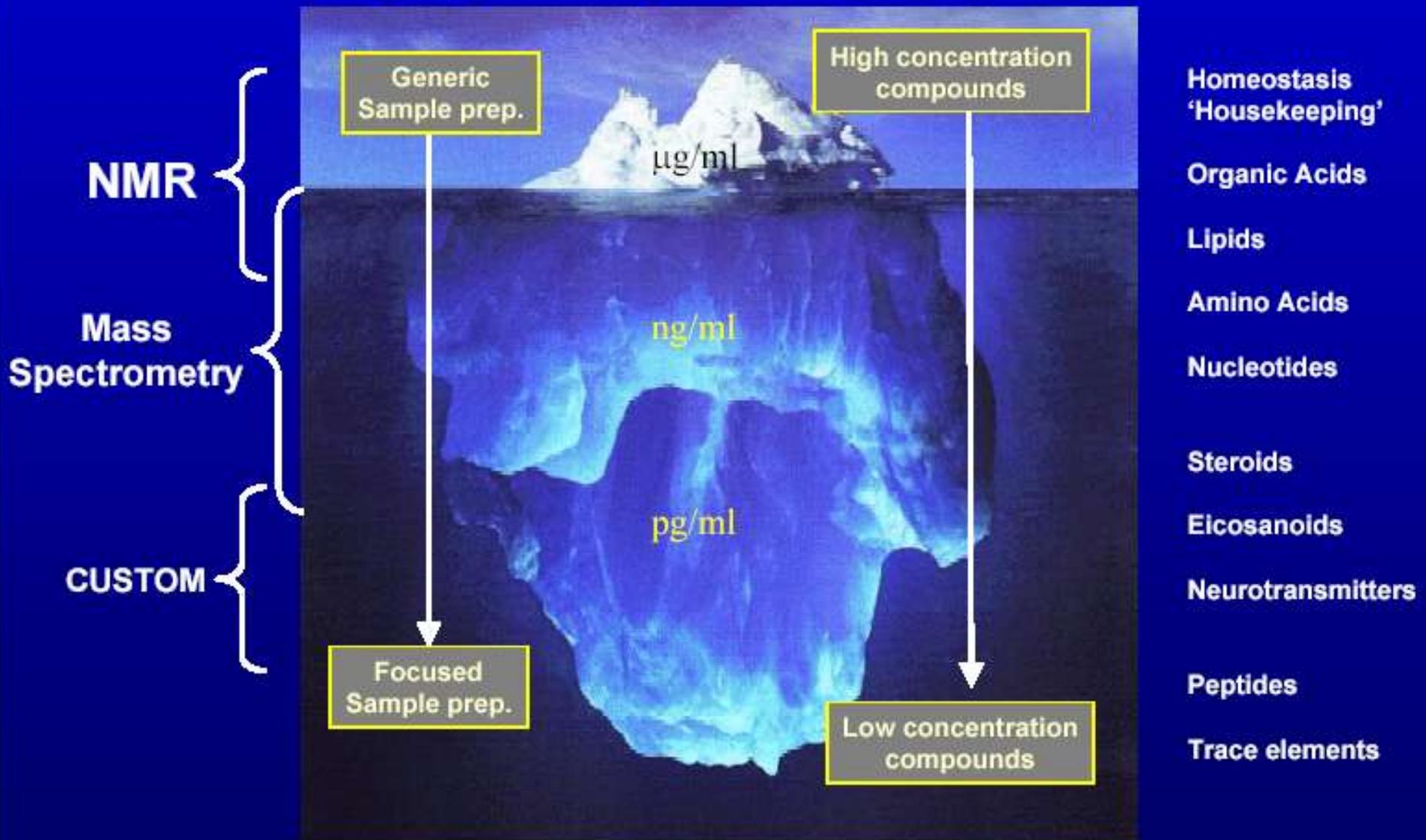
Oligosaccharides, hydrates de carbones,

Des peptides aux protéines,

Métabolites secondaires, vitamines,

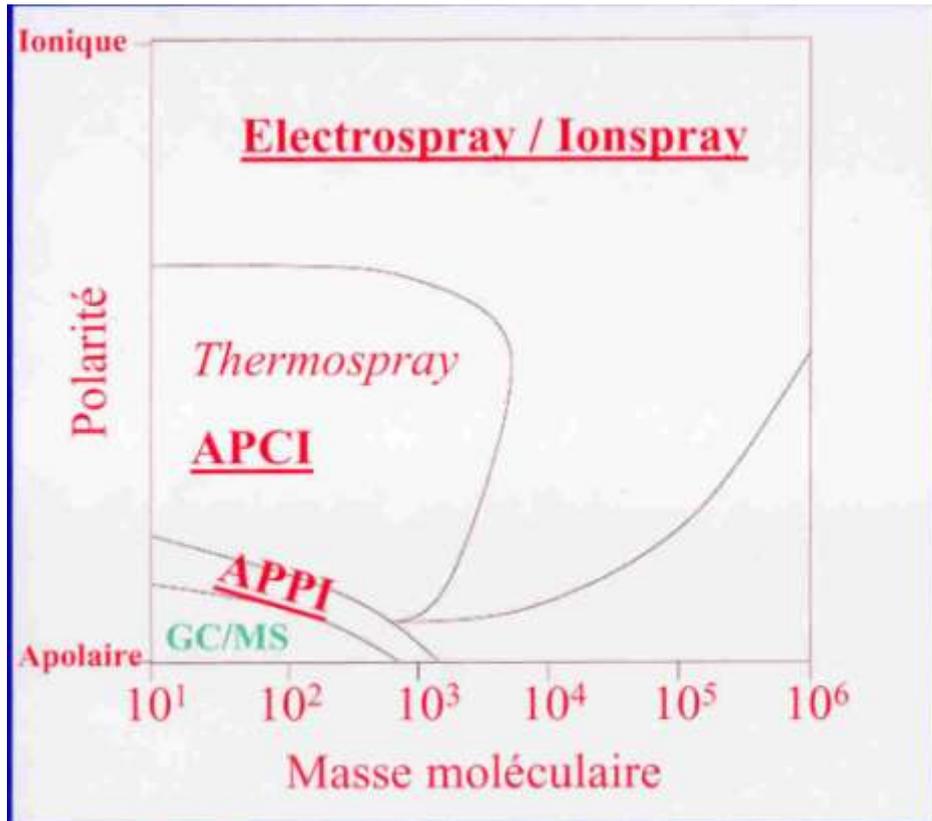
Des brins d'ADN avec ou sans adduits covalents,

Les challenges de l'analyse métabolomique



Comprehensive bioanalysis requires multiple techniques to cover wide concentration range

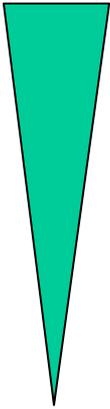
Les contraintes analytiques



Nécessité d'ioniser les molécules
optimisation de leur analyse
fonction de leur polarité
et de leur masse

Les contraintes analytiques

Précision

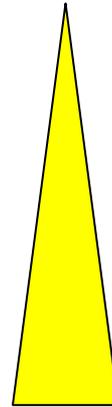


1.

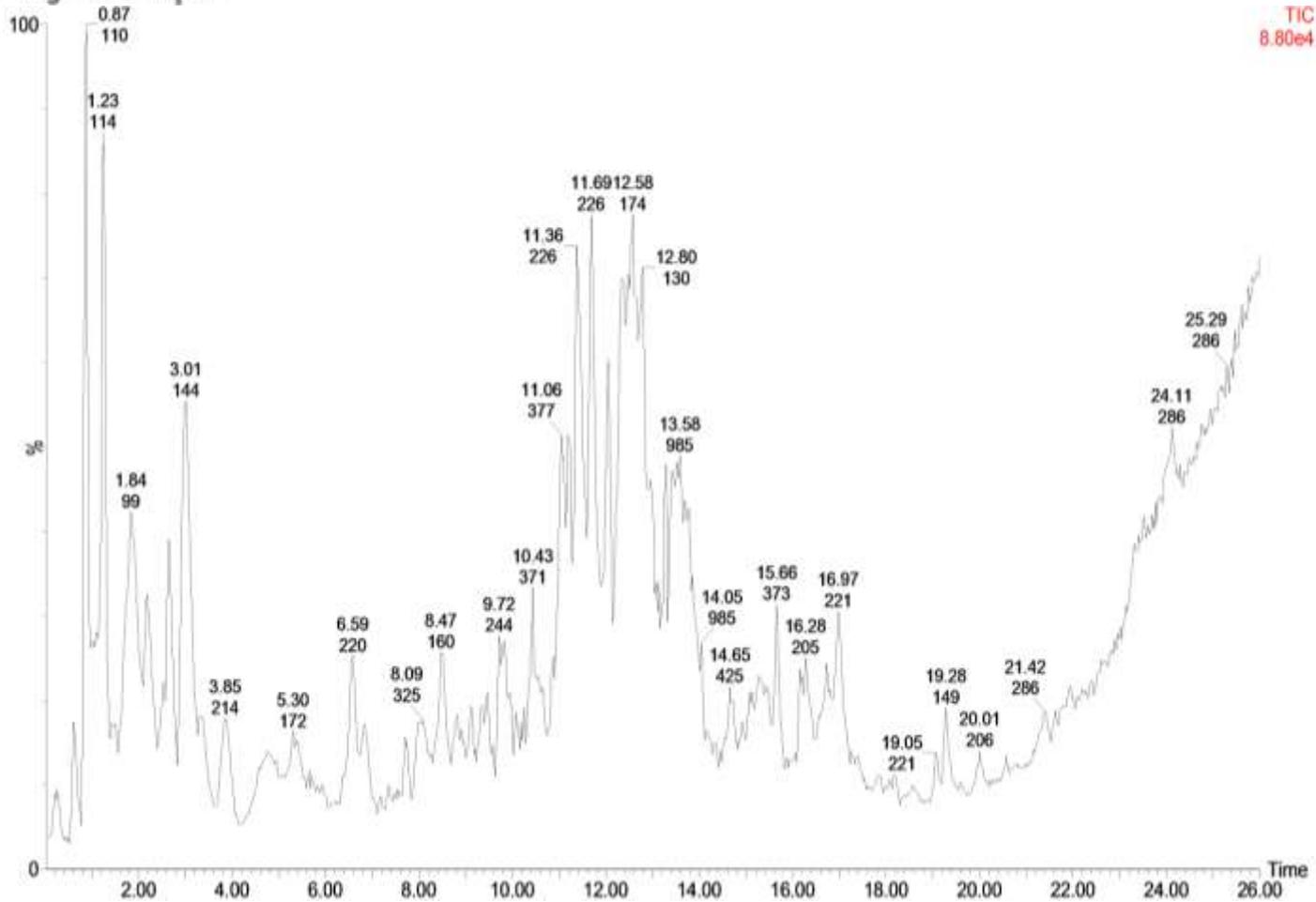
Analyse ciblée

Quelques métabolites

Étendue des
métabolites analysés



Exemple de profil métabolique



Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains

Quelques rappels

Les méthodes d'analyse par spectrométrie de masse

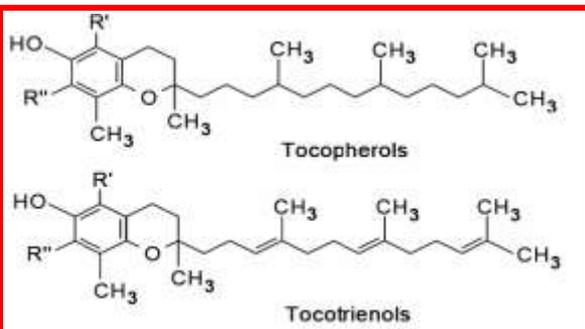
Quelques outils

Les challenges

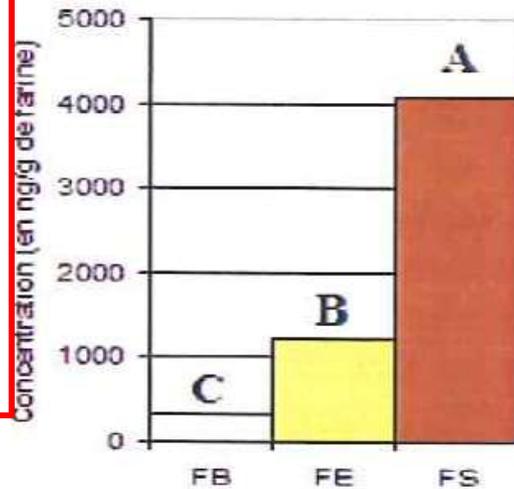
Quelques résultats d'analyse métabolomique sur le blé

Quelques résultats analytiques sur le blé

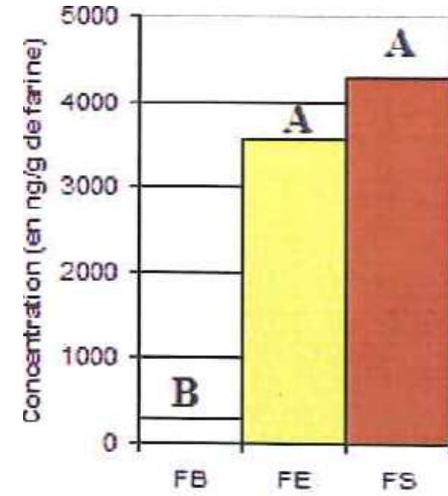
Les tocophérols



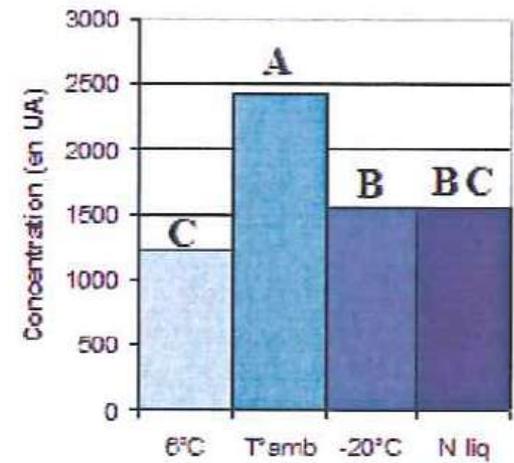
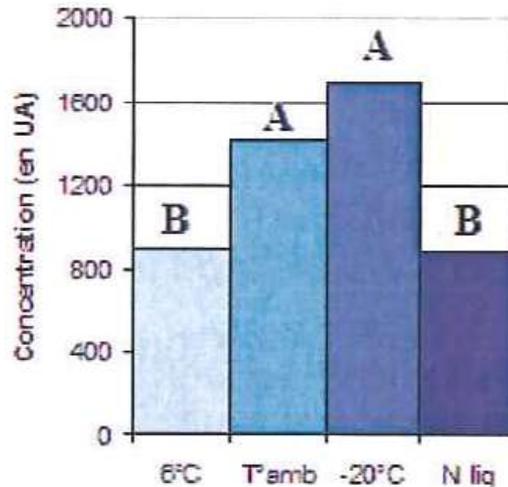
Les tocols: groupe vitamine E.
Sont des anti oxydants, ils s'opposeraient à l'oxydation du LDL-cholestérol, protègent l'organisme contre l'effet des radicaux libres



α -TP

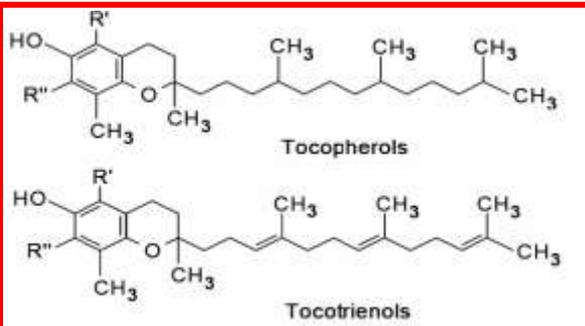


γ -TP

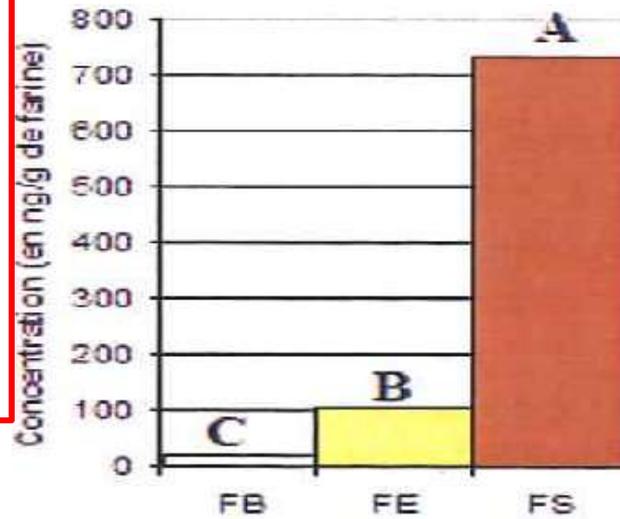


Quelques résultats analytiques sur le blé

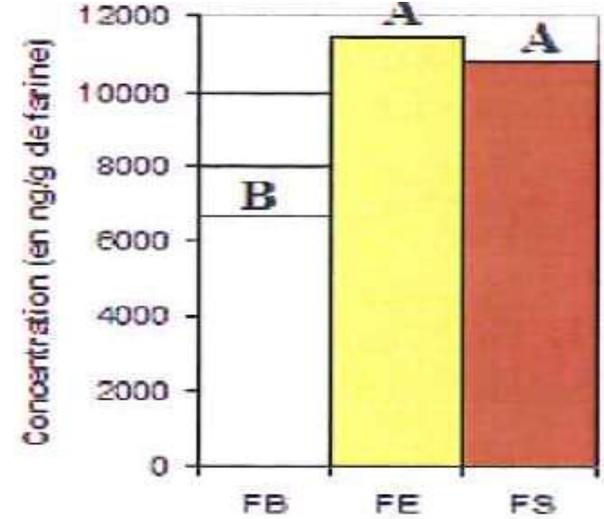
Les tocotrienols



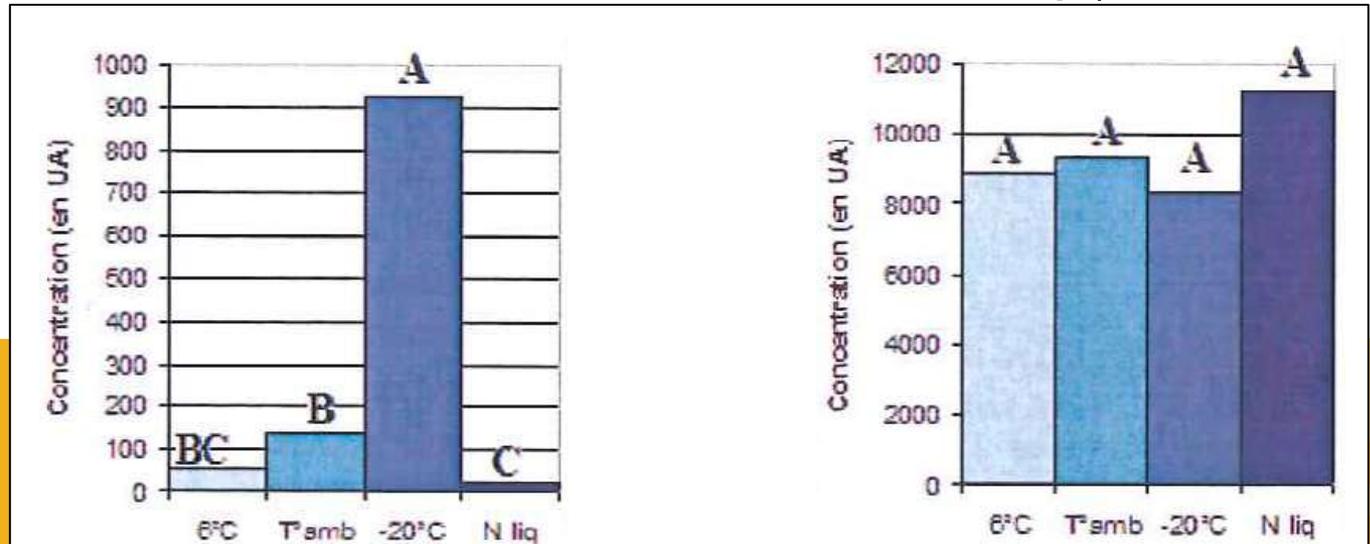
Les tocols: groupe vitamine E.
Sont des anti oxydants, ils s'opposeraient à l'oxydation du LDL-cholestérol, protègent l'organisme contre l'effet des radicaux libres

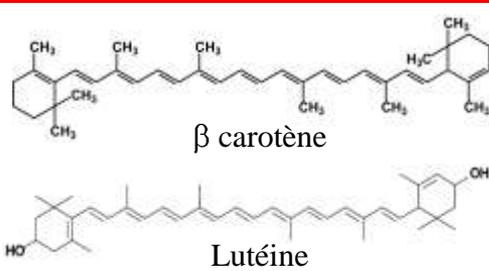


α -T3



$\beta\gamma$ -T3

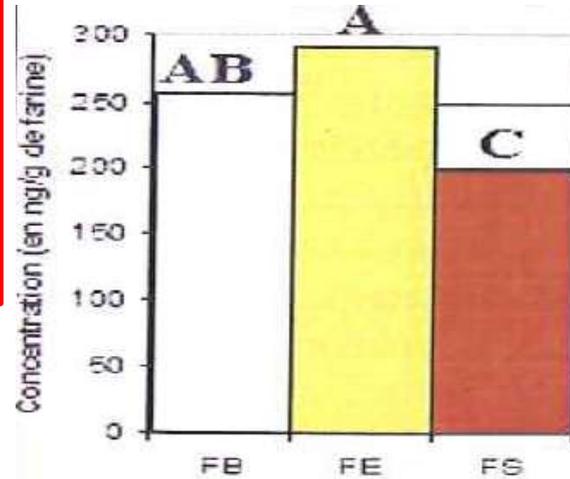




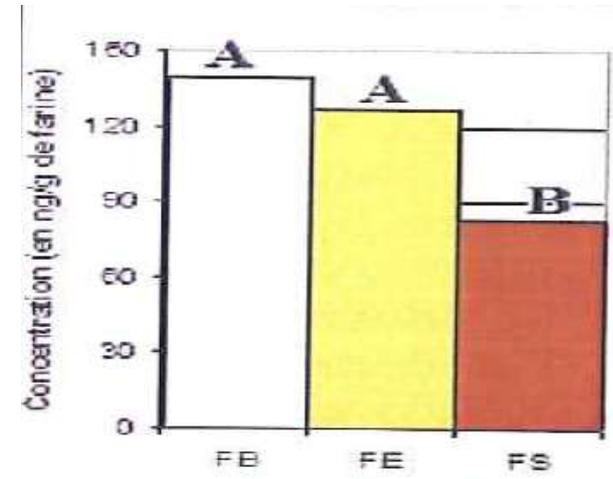
Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la nutrition et la santé, certains présentent aussi des activités antioxydantes, stimulent la synthèse d'anticorps.

Quelques résultats analytiques sur le blé

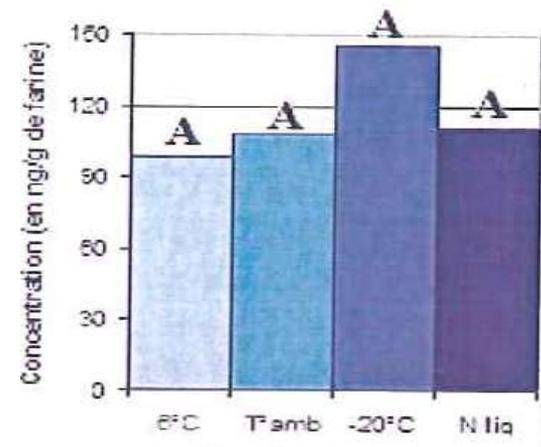
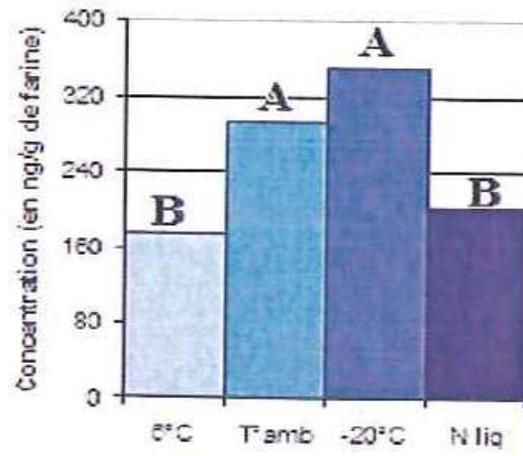
Lutéine, Carotène



Lutéine



Bêta Carotène

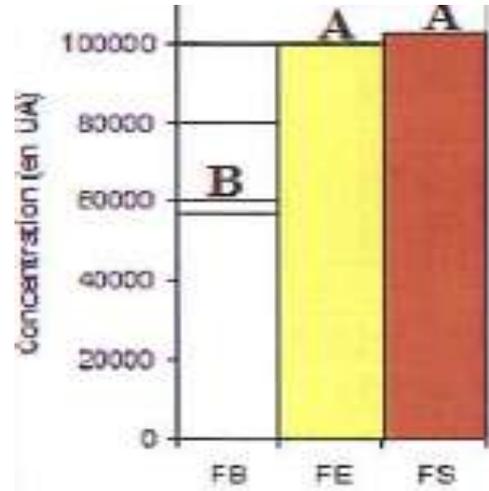


Quelques résultats analytiques sur le blé

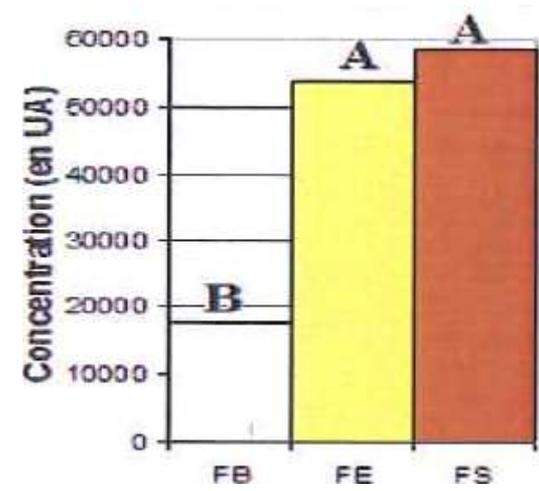
Les sitostérols

Sitosterol

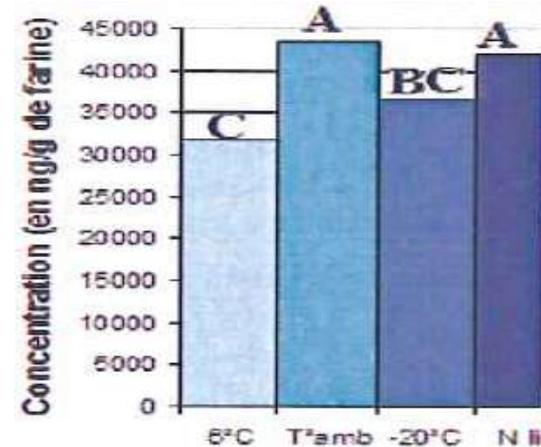
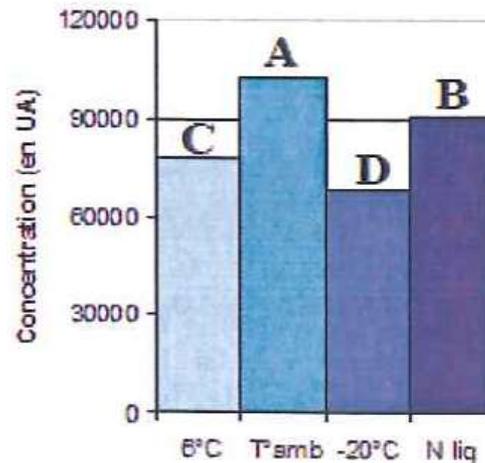
Les stérols et stanols:
s'opposent à l'absorption du
cholestérol et seraient ainsi
utiles pour la santé
cardiaque



Beta sitostérol



Beta sitostérol
forme libre



Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains

Quelques rappels

Les méthodes d'analyse par spectrométrie de masse

Quelques outils

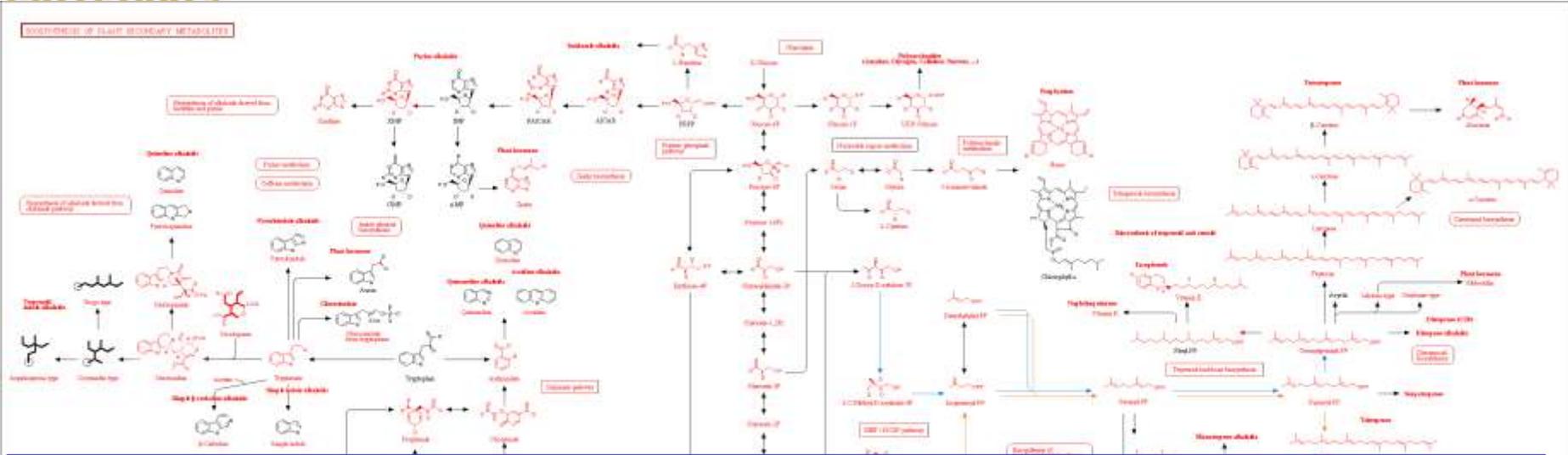
Les challenges

Quelques résultats d'analyse métabolomique sur le blé

L'approche génétique

Intérêt de la protéomique de la couche à aleurone

Biosynthèse des métabolites secondaires chez les plantes



Enzymes à pister pour les vitamines du groupe B

Vit B1: thiamine kinase, thiamine triphosphatase, nucléoside tri phosphate phosphohydrolase

Vit B2: acide phosphatase, riboflavine synthase

Vit B3: purine-nucléoside phosphorylase, inosine phosphorylase, nicotinamidase

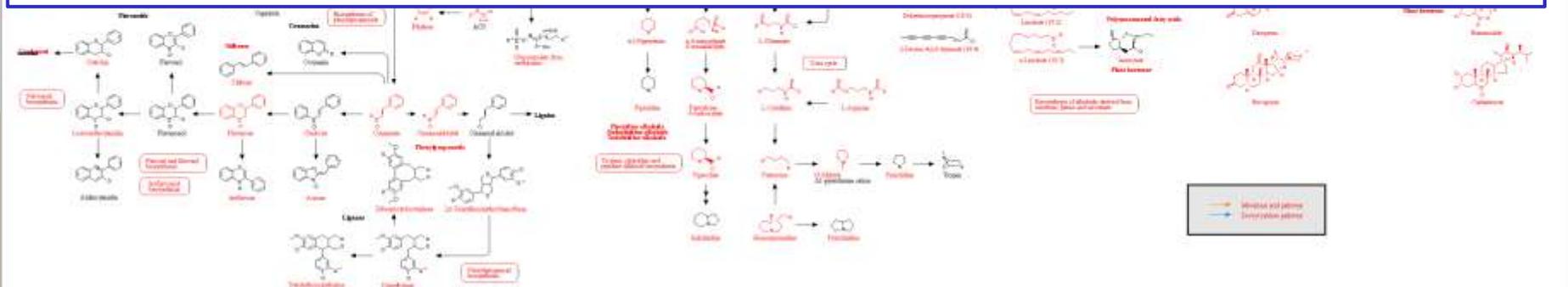
Vit B5: panthotenate kinase/synthetase, pantoate beta alanine kinase, panthotenate

Vit B6: pyridoxal kinase, pyridoxine kinase, pyridoxine 5 deshydrogenase, pyridoxal phphosphatase, pyridoxine 4 hydrolase

Vit B8: biotinidase, amidohydrolase biotinidase, biotin synthase

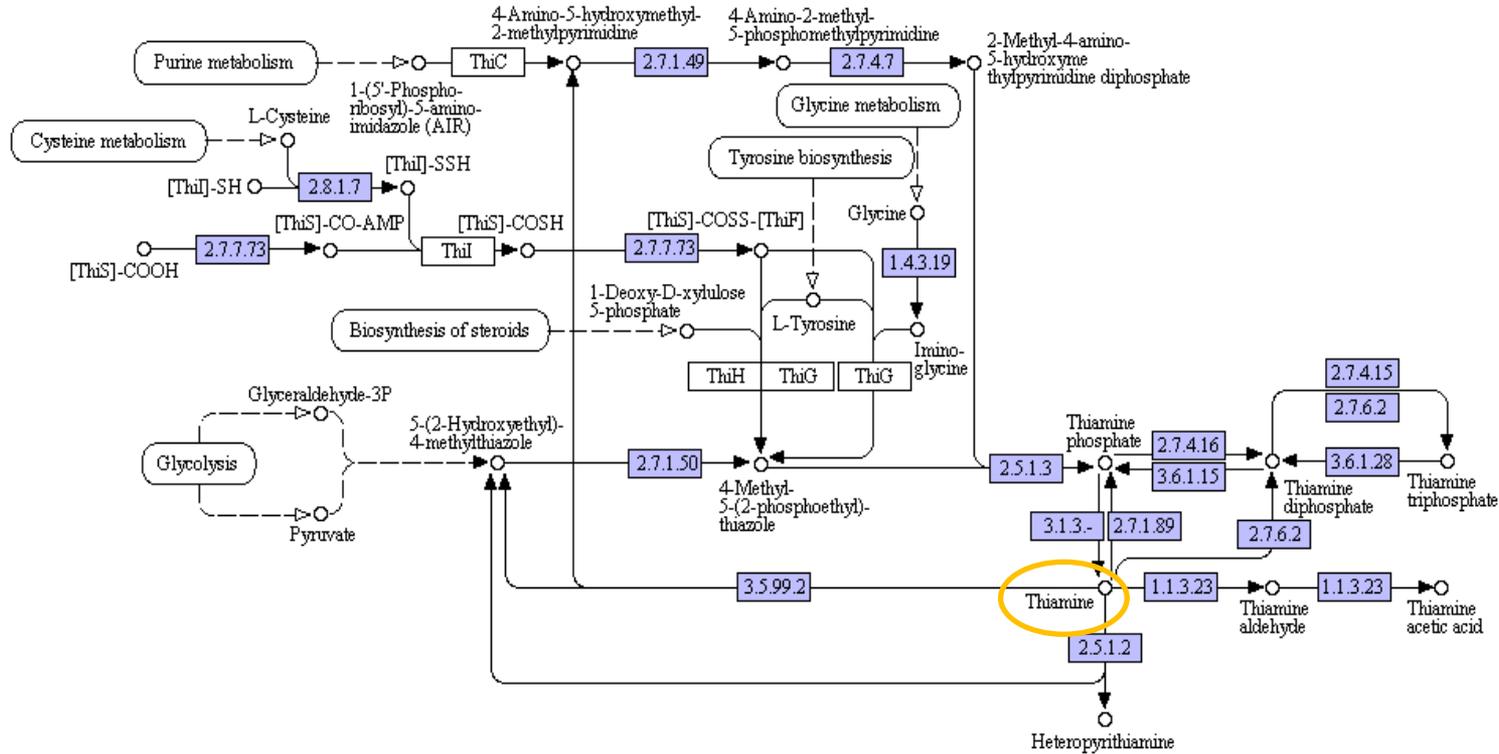
Vit B9: dihydrofolate reductase, tetrahydrofolate reductase, gamma-glutamyl hydrolase, folate conjuguae

Vit B12: dihydropteroate synthase, desoxyadénosyl cobalamine, methylmalonyl CoA mutase, N5N10 méthylène tétrahydrofolate



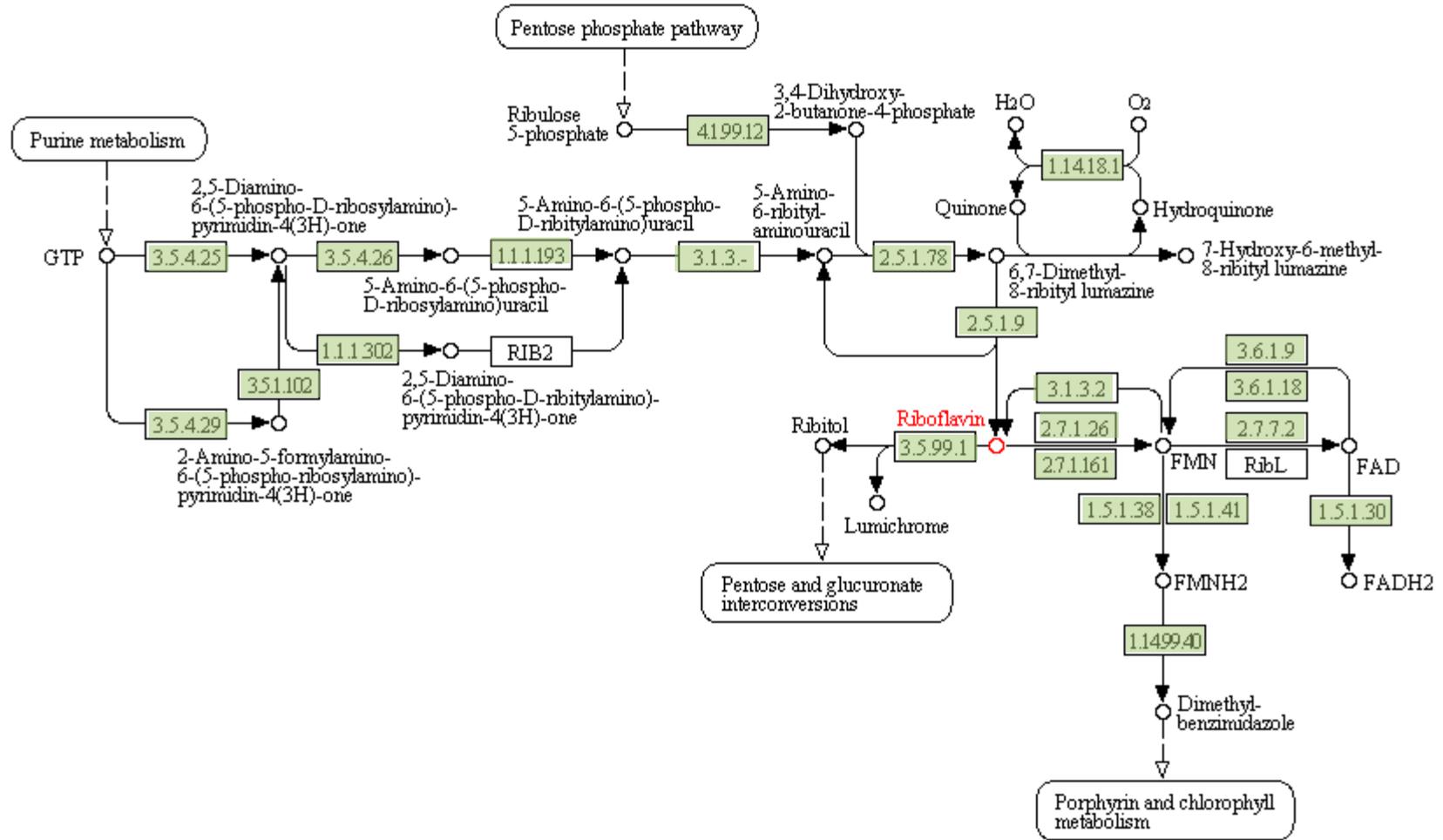
Vitamine B1: Thiamine

KEGG database



Vitamine B2: Riboflavin

KEGG database



Les bases de données chez les plantes

Ex: Plant Metabolic Network: www.plantCyc.org

DataBases	Pathways (total)	Enzymes	Reactions	Compounds	Citations	Release date
AraCyc 9.0	502	7100	3320	3210	3933	mars 2012
CornCyc 1,0	341	10519	2156	1731	2240	mars 2012
GrapeCyc 1,0	330	5338	2101	1540	1933	mars 2012
PoplarCyc 4,0	354	8691	2220	1956	2013	mars 2012

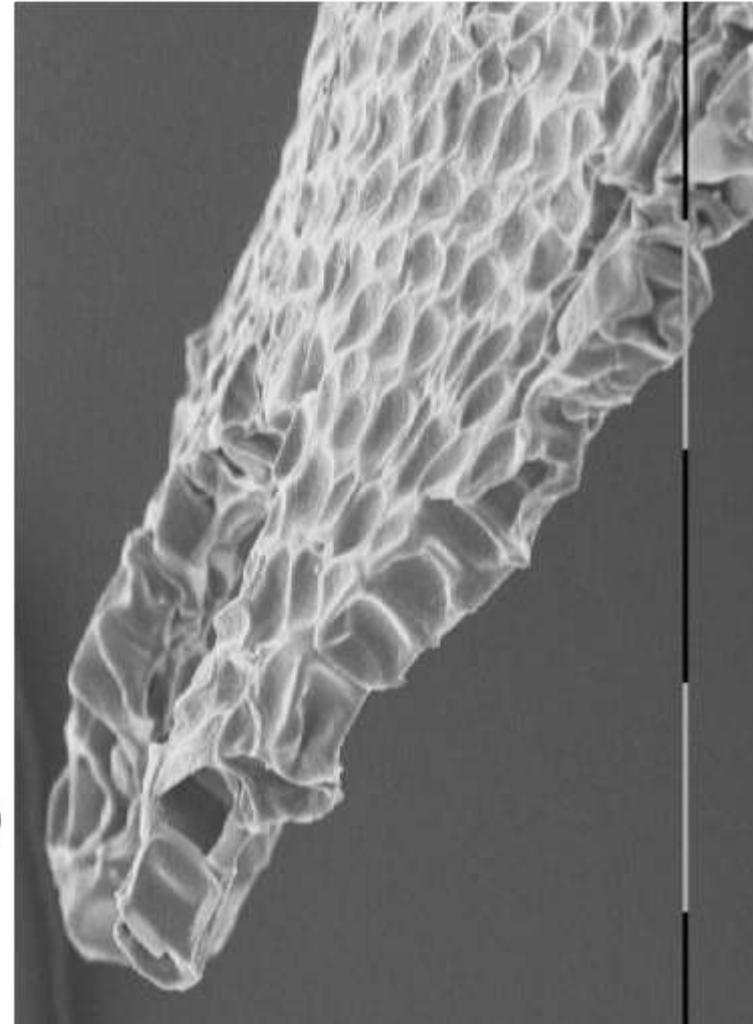
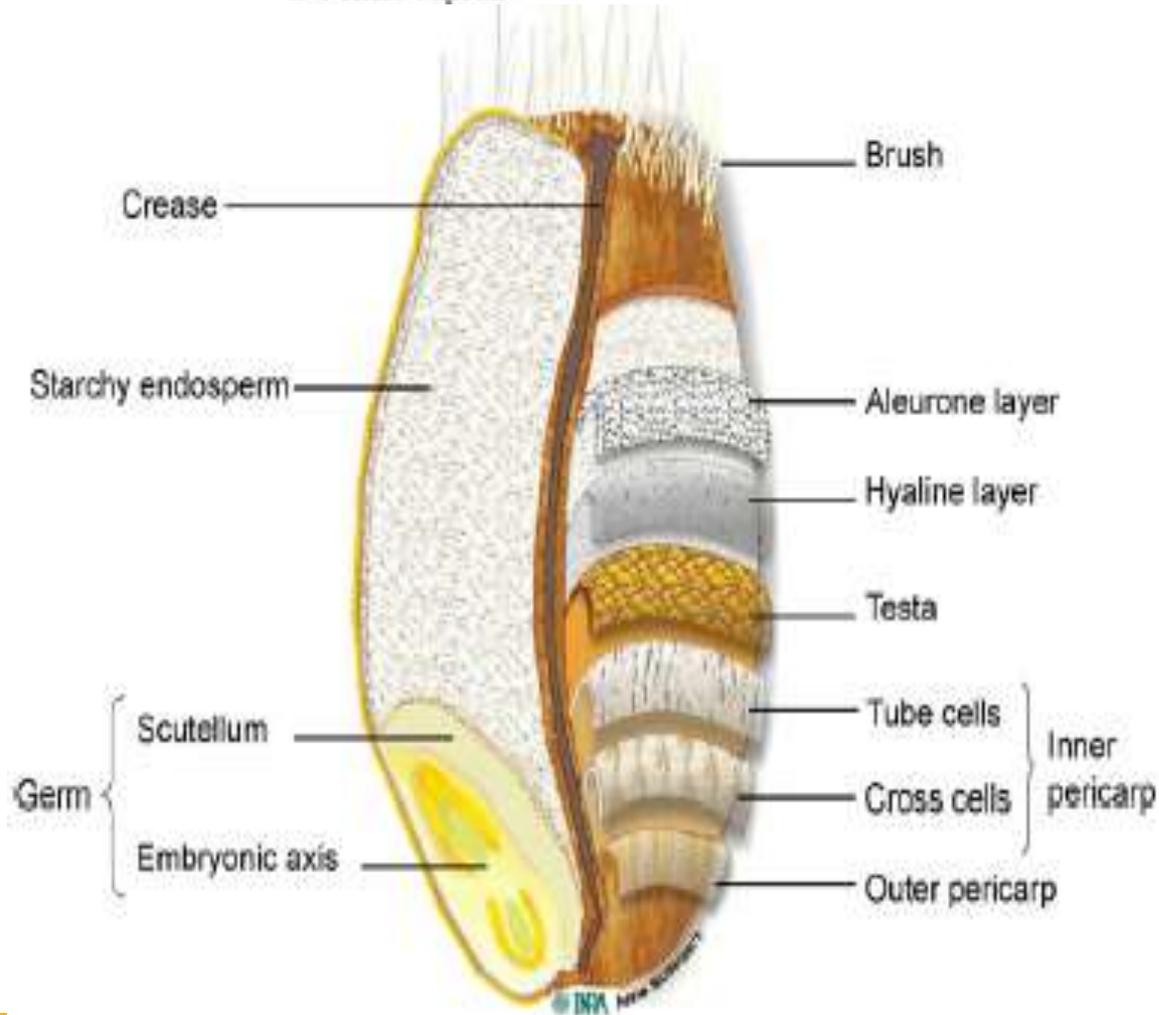
Arabidopsis Metabolomics Consortium (NSF, USA)

Basil J Nikolau Iowa State University, Ames, IA

Plateforme 1800 métabolites détectés dont 900 identifiés (mol. chimiques)

Analyse des fonctions de gènes inconnus par T- DNA silencing

L'approche Protéomique de la Couche à aleurone

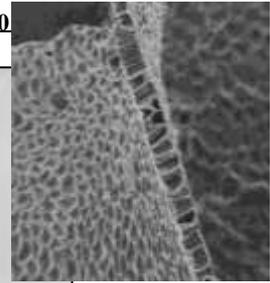
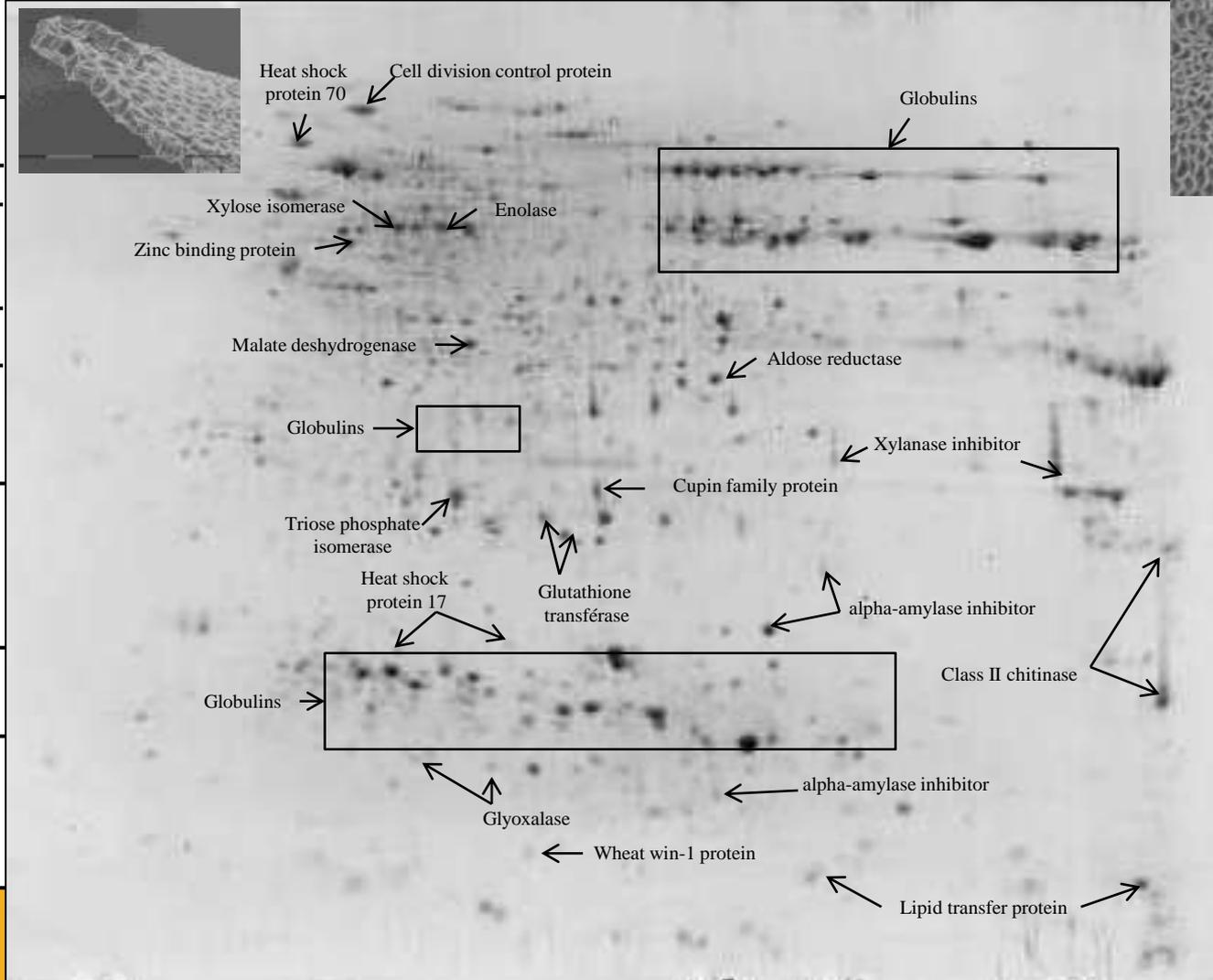


PM
(kDa)

pI

10

100
76
66
43
36
31
21
17
10

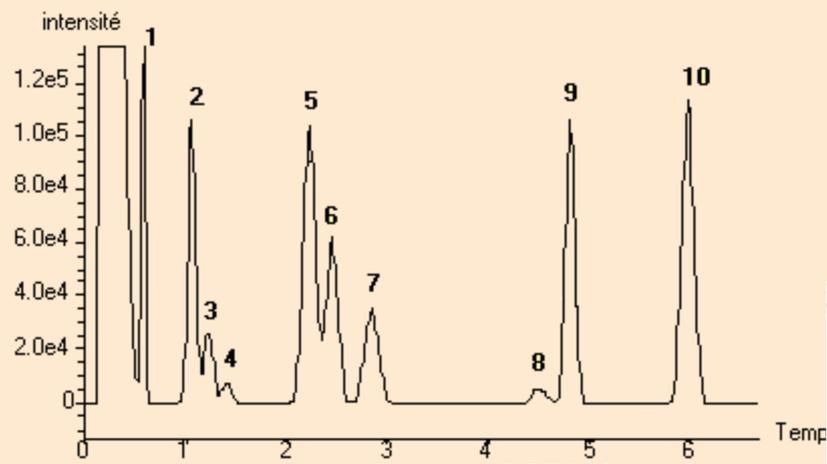


CA de Courtot

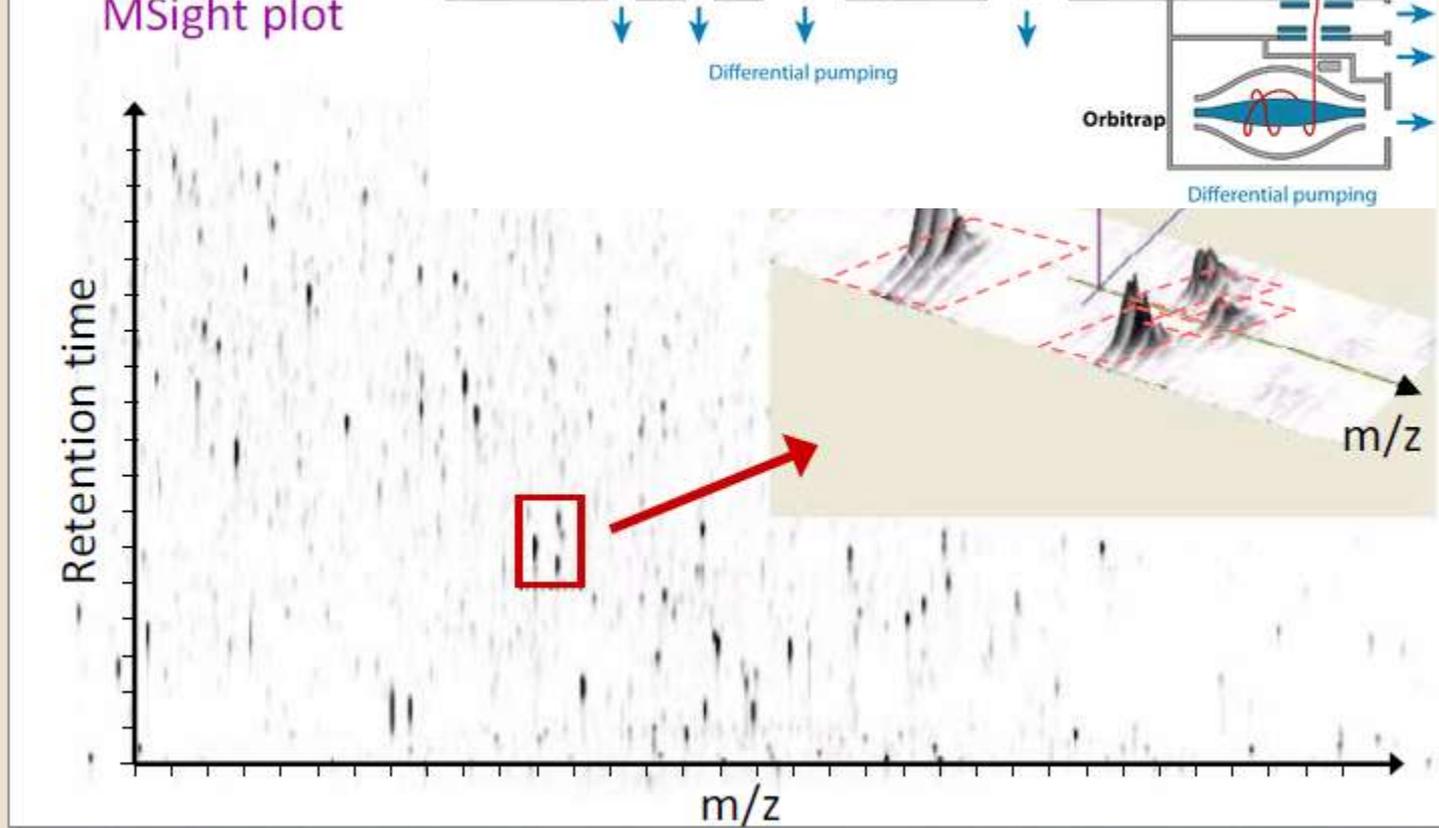
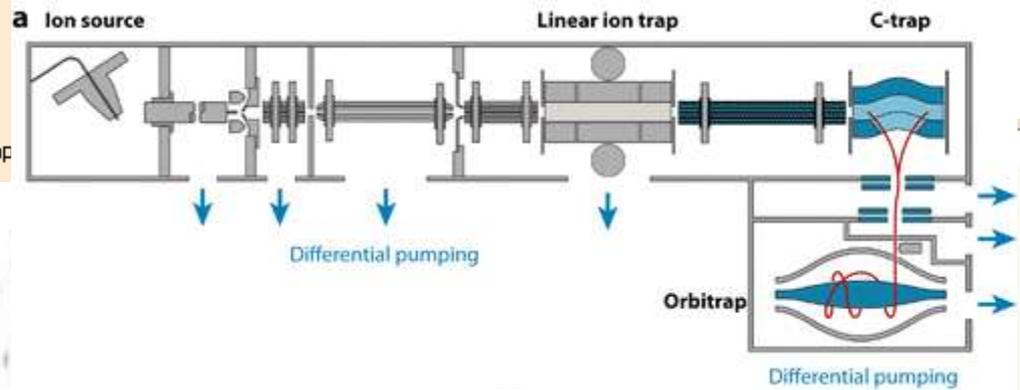
Master Aleurone Layer: stages 309-597-1003 °Cj



« Gel free » MS

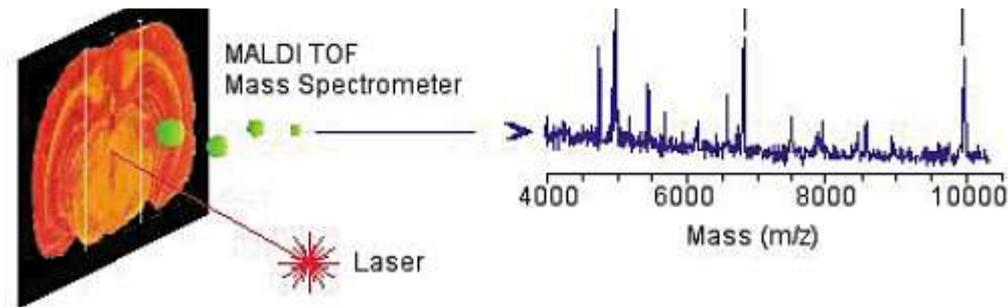
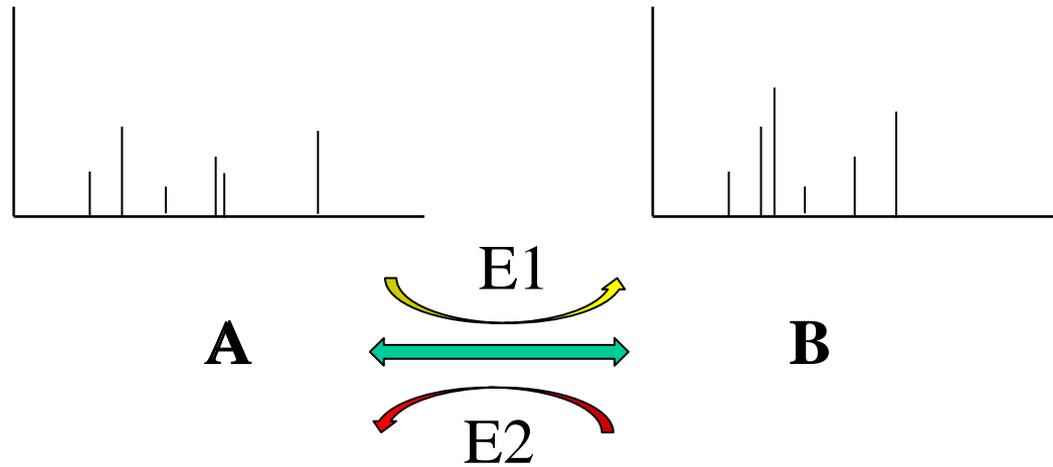


MSight plot



« Maldi imaging » ou l'analyse *in situ* de la composition des tissus

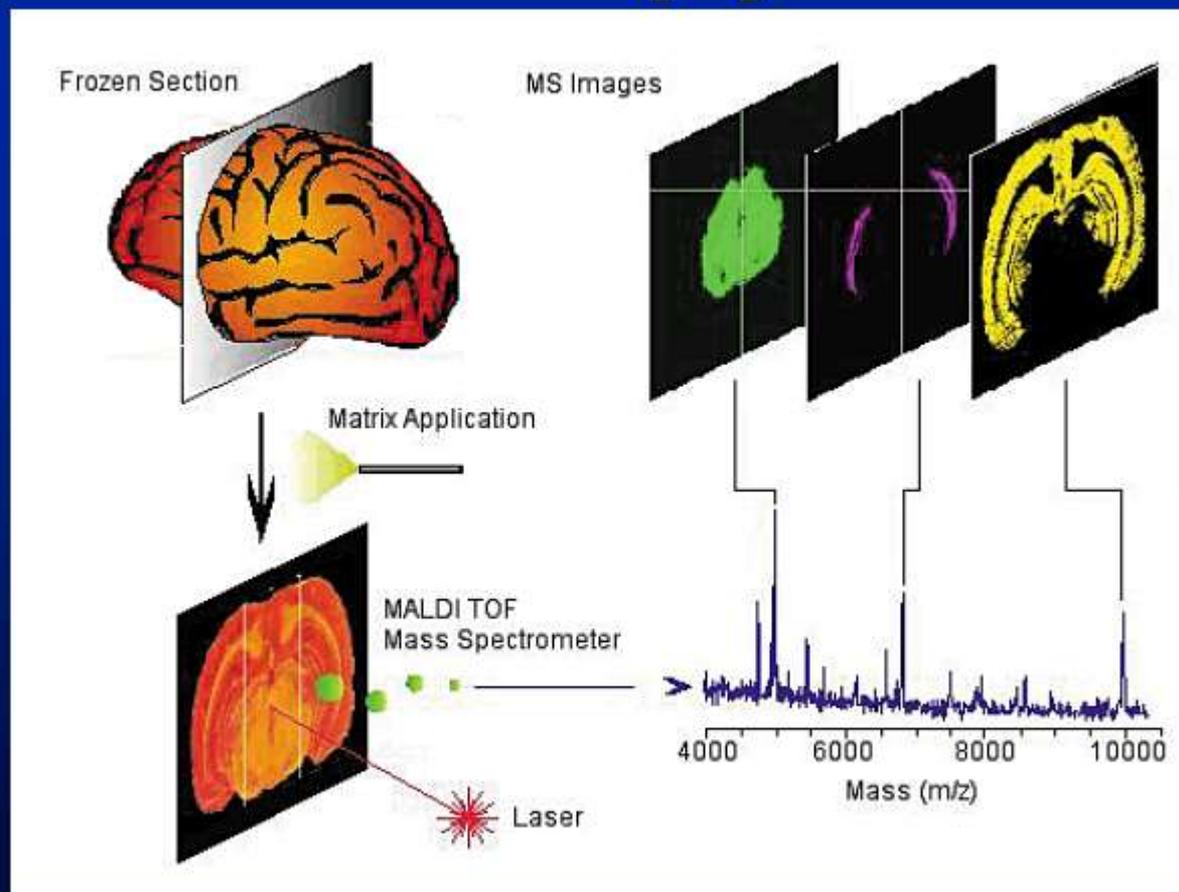
MS imaging



(réf: Capriolo *et al.*, 1997, *Anal. Chem.*, 69, 4751-4760 ; Stoekli *et al.*, 2001, *Nat. Med.*, 7, 493-496)

« Maldi imaging » ou l'analyse *in situ* de la composition des tissus

MS imaging

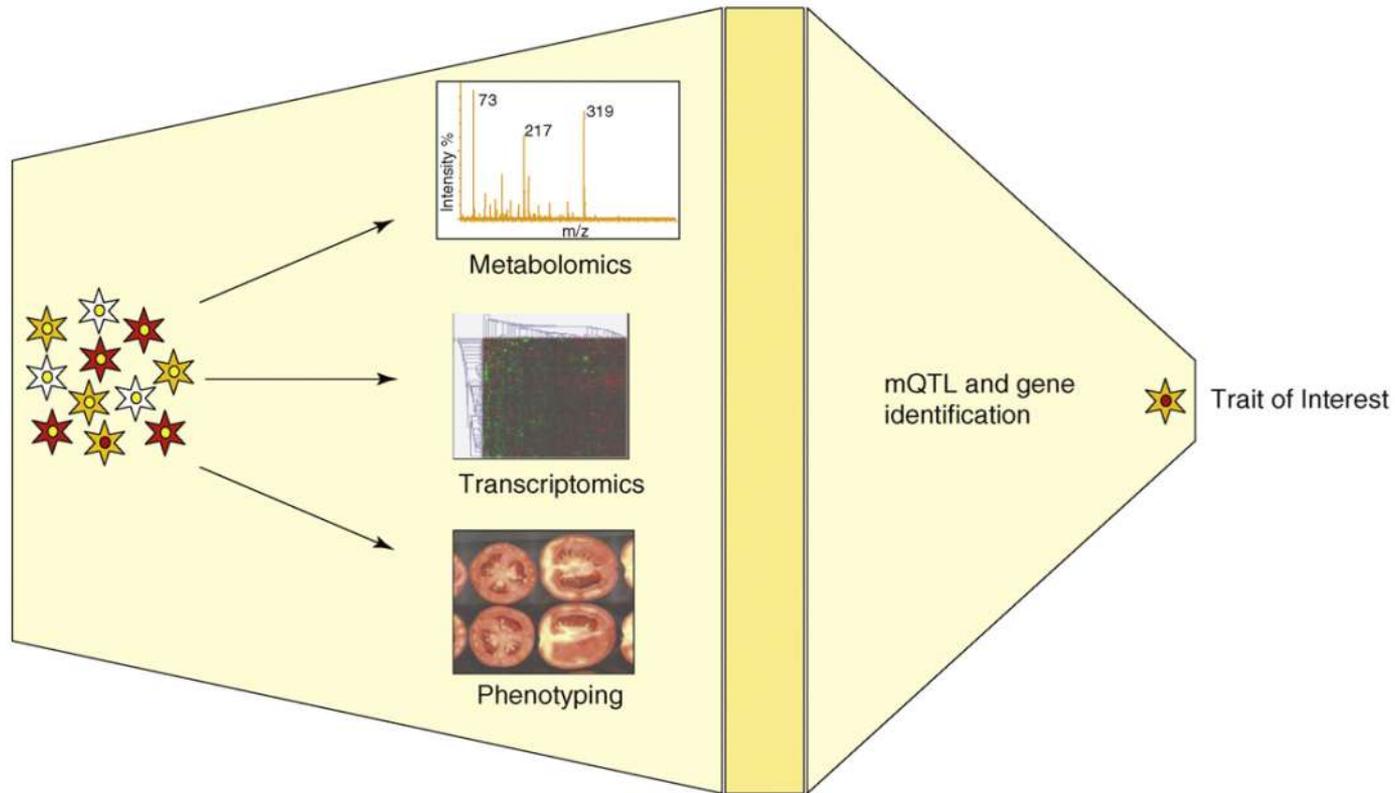


(réf: Capriolo *et al.*, 1997, *Anal. Chem.*, 69, 4751-4760 ; Stoekli *et al.*, 2001, *Nat. Med.*, 7, 493-496)

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

L'analyse métabolomique comme moyen d'approcher la fonction des gènes



Source: **A. R. Fernie, N. Schauer** Trends in Genetics, 2008 , 25,39-48,

Conclusion

Les progrès dans la séparation, l'ionisation et la mesure des masses moléculaires sont en passe de révolutionner la biologie.

L'analyse de la composition fine des tissus (protéome et MPT, phosphoprotéome, lipidome, métabolome) initialement abordée de manière comparative est désormais réalisable de façon quantitative pour de très nombreux composés.

Ces outils arrivent à temps pour connaître la fonction des gènes car la seule connaissance du génome donne une approche incomplète des fonctions des protéines et encore moins de la diversité des métabolites secondaires

Des progrès sont attendus dans l'analyse métabolomique :

- Automatisation des extractions, interchangeabilité des mesures entre laboratoires
- Constitution de bases de données, traitement des données etc...

Mais sans attendre ces avancées l'analyse métabolomique peut être conduite par exemple dans::

- l'exploration des ressources génétiques et l'analyse de facteurs agro-écologiques potentiellement associés à la composition en métabolites d'intérêts nutritionnels,
- l'analyse génétique de constituants impliqués dans la valeur nutritionnelle,
- l'aide au choix des procédés de conservation et de transformation des aliments.

Remerciements

Estelle Pujos-Guillot
Bernard Lyan

PFEM Inra Theix

Isabelle Nadaud
Emmanuelle Bancel
Samira Meziani

GDEC Inra Clermont Fd

Agnès Piquet
Eric Nurit

VetAgroSup

Catherine Esnouf

DS Alimentation Inra Paris