



**HAL**  
open science

# Identification et suivi par spectrométrie de masse de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées pour leur niveau de résistance au mildiou

Loïc Becker

## ► To cite this version:

Loïc Becker. Identification et suivi par spectrométrie de masse de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées pour leur niveau de résistance au mildiou. Autre. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0101 . tel-01750819

**HAL Id: tel-01750819**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750819v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

---

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Laboratoire de Chimie Physique – Approche Multi-échelles des Milieux Complexes

## THESE

Présentée par

**Loïc Becker**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Discipline Chimie-Physique

*Spécialité Chimie Analytique*

Identification et suivi par Spectrométrie de Masse de composés  
impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées par  
leur niveau de résistance au mildiou

Soutenue le 17 juin 2014 devant le jury composé de

Isabelle FOURNIER	Professeur	Université de Lille 1	Rapporteur
Laurence GENY	Maître de conférences HDR	Université de Bordeaux	Rapporteur
Philippe JEANDET	Professeur	Université de Reims	Examineur
Didier MERDINOGLU	Directeur de recherche	Université de Strasbourg	Examineur
Vincent CARRE	Maître de conférences	Université de Lorraine	Co-directeur
Patrick CHAIMBAULT	Professeur	Université de Lorraine	Co-directeur
Laurent CHARLIER	Ingénieur agronome	CIVB	Membre invité
Anne POUTARAUD	Ingénieur de recherche	Université de Strasbourg	Membre invité



# Remerciements

Ces travaux de recherche ont été effectués au sein du laboratoire de Chimie et Physique - Approche Multi-Echelle des Milieux Complexes (LCP-A2MC) de l'Université de Lorraine. Ce projet a été rendu possible grâce au soutien financier du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB). Je souhaite, ainsi, remercier en tout premier lieu, Monsieur Laurent CHARLIER, pour avoir fait confiance à ce projet.

Je tiens à remercier vivement mes co-directeurs, Patrick CHAIMBAULT et Vincent CARRE, pour la confiance qu'ils m'ont accordé en me proposant ce sujet. Leur investissement, leur soutien, ainsi que les connaissances qu'ils m'ont transmises au cours de nos nombreuses discussions m'auront permis d'aller au bout cette belle aventure.

Je prie le professeur Isabelle FOURNIER, ainsi que le docteur Laurence GENY, d'accepter mes remerciements pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ces travaux de recherche en tant que rapporteurs. Je témoigne également ma reconnaissance au professeur Philippe JEANDET et au directeur de recherche Didier MERDINOGLU pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je souhaite remercier, par la suite, le professeur émérite Jean-François MULLER, initiateur de ce projet, et le docteur Grégory Hamm qui, par ses travaux de thèse, m'a permis de poursuivre cette thématique passionnante.

Je tiens à remercier très sincèrement l'ingénieur de recherche Anne POUTARAUD pour son implication dans ce projet et son accueil à l'INRA de Colmar, toujours chaleureux. Tu m'auras permis de mieux appréhender l'aspect biologie de ce sujet, qui m'était inconnu lorsque j'ai entamé ce projet.

Merci aux permanents du laboratoire, Frédéric AUBRIET, Olivier DELHOMME et Jean-Jacques GAUMET, pour leur bonne humeur communicative et les discussions scientifiques que j'ai eu l'occasion de partager avec eux. Ma reconnaissance va également aux ingénieurs de recherche Gabriel KRIER et Lionel VERNEX-LOSET pour leur disponibilité et leur soutien technique.

Merci à Sébastien BELLOW et Gwendal LATOUCHE du laboratoire Ecologie Systématique Evolution, pour votre investissement dans notre collaboration. Cette expérience enrichissante m'aura permis d'en apprendre plus sur un domaine que je connaissais très peu.

Merci à l'ancienne génération de doctorants, qui m'ont conforté dans ma décision : franchir le pas pour l'aventure que constitue une thèse. Nico, David, Didier et Junien, merci pour ces bons moments particulièrement fun. Bien sûr, je n'oublie pas mes contemporains ! Estelle, ma voisine de

bureau toujours très vivante, Sébastien, musicien quasi pro, Jean, mon prof de musique et ancien coloc, et Alain, le dernier représentant de notre lignée. Et je n'omet pas de citer les stagiaires qui ont aussi contribué à la vie du laboratoire. Alex, compagnon de fin d'étude, même si nous n'avons pas pu faire notre thèse dans le même labo, nous avons passé de sacrés bons moments ensemble !

Une pensée me vient également pour Kerstin, l'encadrement de ton stage restera une expérience très enrichissante. Et merci à Thierry, pour ton aide sur la LC-MS en cette fin de thèse mais aussi pour ces discussions très divertissantes qui m'auront permis de souffler pendant la rédaction !

Enfin, merci aux doctorants de l'ISEA, Lucas et Frédéric, ainsi que toutes leurs troupes. Ces repas au RU resteront de chouettes souvenirs, sans oublier ces fameux « lake laps » qui nous ont donné l'occasion de parler voire de philosopher !

Et pour terminer, merci à ma famille, mon père, ma mère et ma sœur pour leur soutien inconditionnel.

Et merci à toi.

# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I Contexte général de l'étude</b>	<b>I-7</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>I-9</b>
<b>2. Origines et enjeux de la viticulture</b>	<b>I-10</b>
<b>3. Les maladies de la vigne</b>	<b>I-11</b>
3.1. Les maladies cryptogamiques	I-11
3.2. Le mildiou de la vigne	I-14
3.2.1 Symptômes de la maladie	I-14
3.2.2 Processus de contamination du mildiou	I-15
3.2.3 Composition métabolique du mildiou	I-17
<b>4. Les moyens de lutte contre le mildiou</b>	<b>I-17</b>
4.1. Traitements chimiques	I-17
4.1.1 Les fongicides de contact	I-18
4.1.2 Les fongicides systémiques	I-19
4.2. Défense naturelle de la vigne	I-19
4.2.1 Voie métabolique	I-20
4.2.1.1 Métabolisme primaire	I-20
4.2.1.2 Métabolisme secondaire	I-21
4.2.2 Voie protéique	I-30
4.3. Les gènes de résistance de la vigne	I-31
<b>5. Conclusion</b>	<b>I-33</b>
<b>6. Littérature</b>	<b>I-35</b>
<b>Chapitre II La spectrométrie de masse appliquée à l'analyse de feuilles de vigne</b>	<b>II-39</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>II-41</b>
<b>2. La spectrométrie de masse</b>	<b>II-41</b>
2.1. Principes généraux	II-41
2.2. Les sources d'ionisation	II-42
2.2.1 La désorption/ionisation laser	II-42
2.2.1.1 L'interaction laser-matière	II-42
2.2.1.2 Désorption/ionisation laser assistée par matrice	II-44
2.2.2 L'électronébulisation	II-49

2.3.	La spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS)	II-51
2.3.1	Introduction	II-51
2.3.2	Principe général de l'analyseur à temps de vol	II-52
2.3.3	Instrumentation	II-53
2.4.	La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS)	II-55
2.4.1	Introduction	II-55
2.4.2	Origine et principe de la FTICRMS	II-55
2.4.3	Instrumentation	II-57
2.4.4	Déroulement d'une analyse FTICRMS	II-58
2.4.5	Modes de fragmentation	II-63
2.5.	Le couplage LC-IonTrap MS	II-64
2.5.1	La chromatographie liquide haute performance (HPLC)	II-64
2.5.2	Le piège à ions	II-65
2.5.2.1	Introduction	II-65
2.5.2.2	Fonctionnement en mode de fragmentation MS <sup>n</sup>	II-66
2.5.2.3	La trappe linéaire	II-67
2.5.3	La source HESI	II-69
<b>3.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>II-70</b>
<b>4.</b>	<b>Littérature</b>	<b>II-71</b>

**Chapitre III Etude métabolique par spectrométrie de masse d'extraits de feuilles de vigne infectées par le mildiou** **III-73**

<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>III-77</b>
<b>2.</b>	<b>Contexte de l'étude</b>	<b>III-77</b>
<b>3.</b>	<b>Paramètres expérimentaux</b>	<b>III-79</b>
3.1.	Matériel chimique	III-79
3.2.	Matériel végétal : la population 41528	III-79
3.2.1	Généalogie de la population 41528	III-79
3.2.2	Echantillonnage : inoculation et préparation des extraits méthanoliques	III-80
3.3.	Paramètres d'analyse ESI-FTICRMS et ESI-FTICRMS <sup>2</sup>	III-81
3.4.	Etude des modes d'ionisation	III-82
3.5.	Acquisition et calibration des spectres de masse	III-83
<b>4.</b>	<b>Résultats et discussion des analyses obtenues sur la population 41528</b>	<b>III-83</b>
4.1.	Etude de l'influence de la composition du solvant sur l'ionisation	III-83
4.2.	Identification des métabolites détectés par ESI-FTICRMS et MS <sup>2</sup>	III-84

4.2.1	Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques	III-86
4.2.2	Les sucres	III-86
4.2.3	Les flavonoïdes	III-89
4.2.4	Les acyle-lipides	III-90
4.2.5	Autres composés	III-95
<b>5.</b>	<b>Analyse de spores germées lyophilisées</b>	<b>III-97</b>
<b>6.</b>	<b>Etude statistique</b>	<b>III-98</b>
6.1.	Traitements des données	III-99
6.2.	Sélection des ions marqueurs	III-100
6.3.	Analyse en composantes principales de la population 41528	III-101
6.3.1	ACP des 19 variables	III-101
6.3.2	ACP des 96 individus	III-102
6.4.	Histogramme par métabolites en fonction de l'OIV	III-103
6.5.	ACP par variables	III-105
<b>7.</b>	<b>Conclusion de l'étude ESI-FTICRMS</b>	<b>III-107</b>
<b>8.</b>	<b>Analyse d'un extrait de feuille de vigne de l'étude par LC-ITMS</b>	<b>III-107</b>
8.1.	Profil métabolique ESI-FTICRMS d'un extrait inoculé de la population 41528	III-108
8.2.	Profiling LC-MS/MS d'un extrait inoculé de la population 41528	III-109
8.2.1	Paramètres d'analyse	III-109
8.2.2	Résultats	III-110
8.2.3	Conclusion sur le profiling LC-ITMS	III-112
<b>9.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>III-113</b>
<b>10.</b>	<b>Littérature</b>	<b>III-115</b>
<b>Chapitre IV Imagerie par spectrométrie de masse</b>		<b>IV-119</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>IV-123</b>
<b>2.</b>	<b>Imagerie par spectrométrie de masse</b>	<b>IV-123</b>
2.1.	Principe et applications de l'imagerie par spectrométrie de masse	IV-123
2.2.	Logiciels	IV-127
<b>3.</b>	<b>Imagerie par spectrométrie de masse en mode positif LDI-TOFMS</b>	<b>IV-127</b>
3.1.	Optimisation des paramètres d'analyse	IV-128
3.1.1	Paramètres du spectromètre de masse	IV-128
3.1.2	Paramètres laser	IV-128
3.2.	Analyse de feuilles de vigne infectées par <i>Plasmopara viticola</i>	IV-129
3.3.	Imagerie sur feuilles de vignes	IV-132

3.4.	Conclusion sur l'imagerie LDI-TOFMS en mode positif _____	IV-134
<b>4.</b>	<b>Evaluation de la répétabilité du signal par étalonnage interne _____</b>	<b>IV-134</b>
<b>5.</b>	<b>Evaluation de la répétabilité du signal des stilbènes par LC-ITMS _____</b>	<b>IV-135</b>
5.1.	Développement de la méthode LC-ITMS _____	IV-136
5.2.	Sélection des transitions MS/MS pour les dosages _____	IV-137
5.3.	Quantification des stilbènes par la méthode des ajouts dosés _____	IV-138
5.3.1	Résultats des dosage des échantillons _____	IV-138
5.3.2	Corrélation imagerie-dosages LC-MS _____	IV-143
5.4.	Conclusion sur l'évaluation de la répétabilité du signal en imagerie _____	IV-145
<b>6.</b>	<b>Imagerie en mode négatif _____</b>	<b>IV-145</b>
6.1.	Empreinte spectrale LDI-TOFMS en mode négatif _____	IV-145
6.2.	Cartes MSI sur feuilles de vigne en mode négatif _____	IV-146
<b>7.</b>	<b>Imagerie par spectrométrie de masse avec matrice _____</b>	<b>IV-148</b>
7.1.	Présentation du spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF _____	IV-148
7.2.	Analyse MALDI-TOFMS de composés standards _____	IV-149
7.2.1	Analyse de flavonoïdes _____	IV-149
7.2.2	Analyse de stilbènes _____	IV-153
7.3.	Analyse MALDI-TOFMS d'extraits méthanoliques de feuilles de vigne _____	IV-155
7.4.	MALDI-MSI sur le Reflex IV 337 nm _____	IV-157
<b>8.</b>	<b>Etude de feuilles de vigne en profondeur _____</b>	<b>IV-160</b>
8.1.	Généralités sur le laser excimer _____	IV-160
8.2.	Analyses LDI-TOFMS après ablation laser _____	IV-160
<b>9.</b>	<b>Conclusion _____</b>	<b>IV-163</b>
<b>10.</b>	<b>Littérature _____</b>	<b>IV-165</b>

**Chapitre V Intégration de l'imagerie par spectrométrie de masse dans une étude corrélative multi technique sur la synthèse des stilbènes dans les feuilles de vigne \_ IV-169**

<b>1.</b>	<b>Introduction et contexte _____</b>	<b>IV-171</b>
<b>2.</b>	<b>Présentation de l'imagerie photonique _____</b>	<b>IV-172</b>
2.1.	Microscopie de fluorescence _____	IV-173
2.2.	Microscopie confocale _____	IV-173
<b>3.</b>	<b>Développement expérimental _____</b>	<b>IV-175</b>
3.1.	Ordre d'analyse des échantillons _____	IV-175

3.2.	Conditionnement des échantillons : rinçage et lyophilisation _____	IV-175
3.2.1	Milieu pour l'analyse en microscopie optique _____	IV-176
3.2.2	Optimisation de la lyophilisation _____	IV-179
3.2.2.1	Protocole _____	IV-179
3.2.2.2	Synthèse _____	IV-181
3.3.	Mesure de la profondeur des impacts laser par microscopie confocale _____	IV-182
<b>4.</b>	<b>Résultats _____</b>	<b>IV-186</b>
4.1.	Feuilles irradiées aux UV-C _____	IV-186
4.1.1	Objectif et protocole _____	IV-187
4.1.2	Superposition des données d'imagerie et dosages HPLC _____	IV-188
4.1.2.1	Corrélation des techniques d'imagerie _____	IV-188
4.1.2.2	Dosages HPLC _____	IV-193
4.1.2.3	Conclusion _____	IV-194
4.2.	Feuilles inoculées par <i>Plasmopara viticola</i> _____	IV-195
4.2.1	Objectif et protocole _____	IV-195
4.2.2	Superposition des données d'imagerie et dosages HPLC _____	IV-196
4.2.2.1	Dosages HPLC _____	IV-196
4.2.2.2	Corrélation des techniques d'imagerie _____	IV-197
4.2.2.3	Bilan _____	IV-202
<b>5.</b>	<b>Conclusion _____</b>	<b>IV-203</b>
<b>6.</b>	<b>Littérature _____</b>	<b>IV-206</b>
	<b>Conclusion générale _____</b>	<b>207</b>
	<b>Annexes _____</b>	<b>215</b>



## Liste des abréviations

<b>2,5 DHB</b>	acide 2,5-dihydroxybenzoïque
<b>9-AA</b>	9-aminoacridine
<b>ACP</b>	analyse en composantes principales
<b>ACN</b>	acétonitrile
<b>AP</b>	affinité protonique
<b>a.u.</b>	unité arbitraire
<b>CHCA</b>	acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
<b>CMI</b>	<i>Confocale Microscopy Imaging</i>
<b>CS</b>	Cabernet Sauvignon
<b>CID</b>	<i>Collision Induced Dissociation</i>
<b>Da</b>	dalton
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector</i>
<b>DAN</b>	diaminonaphtalène
<b>DESI</b>	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
<b>DPI</b>	<i>Days Post Infection</i>
<b>ET</b>	éthylène
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i>
<b>eV</b>	électronvolt
<b>FM</b>	<i>Fluorescence Microscopy</i>
<b>FTICRMS</b>	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>
<b>FWHM</b>	<i>Full Width at Half Maximum</i>
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
<b>HCA</b>	acide hydroxycinnamique
<b>HESI</b>	<i>Heated Electrospray Ionization Source</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HR</b>	réaction d'hypersensibilité
<b>I</b>	inoculé
<b>ITMS</b>	<i>Ion Trap Mass Spectrometry</i>
<b>JA</b>	acide jasmonique
<b>LAESI</b>	<i>Laser Ablation Electrospray Ionization</i>
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
<b>LDI</b>	<i>Laser Desorption/Ionization</i>

<b>MALDI</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<b>MM</b>	masse molaire
<b>MO</b>	Muscat Ottonel
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>MSI</b>	<i>Mass Spectrometry Imaging</i>
<b>MS/MS</b>	spectrométrie de masse en tandem
<b>m/z</b>	rapport masse sur charge
<b>Nd-YAG</b>	crystal de grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme
<b>NI</b>	non inoculé
<b>OIV</b>	organisme international de la vigne et du vin
<b>PG</b>	polygalacturonase
<b>ppm</b>	partie par million
<b>PR</b>	<i>Pathogenesis-Related</i>
<b>P/S</b>	rapport poids sec sur volume du solvant
<b>RF</b>	radio fréquence
<b>ROS</b>	dérivés réactifs de l'oxygène
<b>RPV</b>	<i>Resistance to Plasmopara viticola</i>
<b>SA</b>	acide salicylique
<b>SIMS</b>	<i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
<b>SORI</b>	<i>Sustained Off-Resonance Irradiation</i>
<b>SQDG</b>	sulfoquinovosyl diacylglycérol
<b>SRM</b>	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
<b>STS</b>	stilbène synthase
<b>S/N</b>	rapport signal sur bruit
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique
<b>THAP</b>	trihydroxyacétophénone
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Current</i>
<b>TOFMS</b>	<i>Time of Flight Mass Spectrometry</i>
<b>t<sub>R</sub></b>	temps de rétention
<b>UPLC</b>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
<b>UV-C</b>	Ultraviolet C

# Introduction générale

---



La vigne, plante du genre *Vitis*, est cultivée pour la récolte de son fruit, le raisin. Celui-ci peut être consommé tel quel, en tant que « raisin de table », ou transformé en jus de fruit. Néanmoins, c'est principalement pour la fabrication du vin que la vigne est cultivée. La viticulture française, réputée à travers le monde, constitue une composante majeure de l'agriculture. Ainsi, la production de vin a été estimée à 42,3 millions d'hectolitres en France pour l'année 2013. Cela représente près de 15 % de la production mondiale. Toujours en 2013, la France a exporté plus de 1 800 milliers d'hectolitres dans le monde, principalement au Royaume-Uni, en Chine et aux Etats-Unis<sup>1</sup>. C'est le deuxième secteur d'exportation français. De ce fait, l'activité viticole génère des retombées économiques majeures pour les principaux pays producteurs. Mais au-delà de ces considérations financières, la viticulture constitue également un héritage culturel puisant sa source dans l'antiquité. A travers les âges, cette tradition vise à élaborer un produit à haute valeur ajoutée tout en se modernisant et s'adaptant aux demandes actuelles.

Cependant, comme toute plante, la vigne doit faire face à divers agresseurs qui perturbent sa croissance ainsi que la maturation de ses fruits. Parmi ces attaques, les plus notables sont sans doute les maladies cryptogamiques. L'oïdium, la pourriture noire ou encore le mildiou, qui constitue le cœur du travail de recherche consigné ici, peuvent causer de sérieuses pertes dans les vignobles. Afin de maintenir le rendement des vignes et donc la production du vin, des traitements phytosanitaires sont épandus de façon préventive dans les vignobles. S'ils protègent effectivement les cultures, ces traitements intensifs présentent toutefois différents inconvénients. Ils sont d'une part, coûteux, et d'autre part, en s'accumulant, contaminent les sols en participant à la détérioration progressive de la qualité de l'environnement, et même à long terme, dénaturent la typicité des terroirs.

Toutefois, tous les cépages n'adoptent pas le même comportement face au mildiou (*Plasmopara viticola*). Les variétés européennes présentent une sensibilité élevée au mildiou contrairement à certaines variétés américaines et asiatiques qui offrent une résistance partielle voire totale face à cet agresseur. En revanche, les qualités organoleptiques de ces dernières sont plus limitées que celles des variétés européennes. Par conséquent, la sélection par croisement de nouvelles variétés peut constituer une piste alternative à ces traitements phytosanitaires abondants. Pour piloter efficacement ces programmes de sélection, notamment conduits au sein des laboratoires de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), ces travaux étant d'ailleurs le fruit d'une collaboration avec l'INRA de Colmar, il est nécessaire de faire appel à

---

<sup>1</sup> Agreste Synthèses - Viticulture, Ministère de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire et de la Forêt, n° 2013/227, décembre 2013.

différents outils pour mieux appréhender les mécanismes de défense de la vigne mis en jeu lors de l'infection par *Plasmopara viticola*. La génétique est l'un de ces outils. Le génome de la vigne a, ainsi, été entièrement séquencé en 2007. Cette avancée majeure est un point de départ capital pour une meilleure caractérisation de la fonction des gènes, notamment de ceux impliqués dans les phénomènes de résistance. Il est bien connu également que les plantes synthétisent souvent des substances particulières dont le rôle est de lutter contre les agressions environnementales, qu'elles soient biotiques ou abiotiques. Ces molécules appartiennent pour un grand nombre à la famille des métabolites secondaires. Ainsi, comprendre l'interaction hôte-pathogène du point de vue du métabolisme secondaire est une voie sérieuse qu'il convient d'explorer. Tenter d'appréhender ce qui différencie une variété sensible d'une variété résistante à l'échelle moléculaire pourrait permettre de répondre à la problématique causée par le mildiou. C'est dans ce contexte que le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB) a accepté de financer ces travaux de recherche.

La spectrométrie de masse, technique de chimie analytique puissante, a été sélectionnée pour tenter d'apporter des réponses aux problèmes que nous venons d'évoquer. Nous verrons que la richesse instrumentale de cette technique autorise l'étude de la relation « vigne-mildiou » sous différents angles.

Ce mémoire se déclinera en cinq chapitres organisés de la façon suivante :

Le **Chapitre I** précisera le contexte général de l'étude en évoquant les principales maladies auxquelles la vigne est confrontée. La résistance des plantes aux agressions sera abordée sous plusieurs aspects. Les mécanismes mis en jeu chez les plantes supérieures tels la synthèse de métabolites secondaires ou de protéines dites de défenses (« pathogenesis-related protein ») seront détaillés. Enfin, les gènes responsables de la résistance au mildiou seront évoqués afin d'introduire l'intérêt du croisement variétal.

Le **Chapitre II** présentera les aspects instrumentaux des différents spectromètres de masse utilisés au cours de cette étude. Le fonctionnement des sources d'ionisation mises en jeu, l'électronébulisation (ESI) et la source à désorption/ionisation laser (MALDI), sera d'abord décrit. Puis, viendront les principes de fonctionnement de la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions par transformée de Fourier (FTICRMS) et de la spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS). Enfin, le couplage entre la chromatographie liquide et le piège à ions (LC-ITMS) sera abordé pour clore cette section.

Le **Chapitre III** sera consacré à l'étude métabolique réalisée sur des extraits de feuilles de vigne, avec pour objectif d'identifier un ou plusieurs éventuel(s) bio-marqueur(s) de résistance. Les feuilles étudiées proviennent d'individus appartenant à une population générée à partir de croisements entre des variétés sensibles (*Vitis vinifera*) et une espèce résistante (*Muscadinia rotundifolia*). Le brassage génétique permet, en outre, d'accéder à toute l'échelle de résistance face au mildiou. Ce chapitre présentera donc l'analyse différentielle d'échantillons témoins et infectés par *Plasmopara viticola* provenant de différents géotypes par infusion directe ESI-FTICRMS. L'identification de plusieurs métabolites permise par les expériences de spectrométrie de masse en tandem sera détaillée. Pour synthétiser les données associées à ces profils métaboliques, une étude statistique sera ensuite réalisée. Enfin, ces résultats obtenus par infusion seront complétés par le couplage LC-MS dans le but d'accéder à d'autres classes de composés.

Le **Chapitre IV** sera, quant à lui, dédié à l'imagerie par spectrométrie de masse par LDI-TOF, qui s'appuie notamment sur des travaux antérieurs du laboratoire<sup>2</sup>. Ces analyses *in situ* permettent d'observer la réponse de la feuille au niveau des sites d'infection sur une surface donnée. La robustesse de cette technique sera évaluée en croisant les signaux obtenus en imagerie avec les teneurs en stilbènes déterminées par dosages LC-MS. La fin de ce chapitre décrira l'exploration d'autres modes d'ionisation comme le MALDI et des tests de préparation d'échantillons réalisés avec un laser excimer, toujours dans l'optique d'identifier et de localiser à l'échelle d'une feuille des métabolites de résistance et de défense.

Enfin, le **Chapitre V** montrera une application originale de l'imagerie par spectrométrie de masse associée à deux autres techniques instrumentales, l'imagerie par microscopie confocale (ou selon le cas, la microscopie optique à fluorescence) et la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD). Ceci dans le but de localiser les stilbènes plus précisément au sein des feuilles avec une corrélation quantitative. Seront notamment décrits les développements méthodologiques concernant la préparation et le conditionnement des échantillons, indispensables pour gérer les contraintes géographiques et temporelles engendrées par cette collaboration entre trois laboratoires.

---

<sup>2</sup> Hamm, G. Recherche par spectrométrie de masse de métabolites intervenant dans la résistance de la vigne aux agressions biotiques et abiotiques ; Thèse de Doctorat. (2010).



# **Chapitre I**      Contexte général de l'étude

---

# Index

<b>1. Introduction</b>	<b>I-9</b>
<b>2. Origines et enjeux de la viticulture</b>	<b>I-10</b>
<b>3. Les maladies de la vigne</b>	<b>I-11</b>
3.1. Les maladies cryptogamiques	I-11
3.2. Le mildiou de la vigne	I-14
3.2.1 Symptômes de la maladie	I-14
3.2.2 Processus de contamination du mildiou	I-15
3.2.3 Composition métabolique du mildiou	I-17
<b>4. Les moyens de lutte contre le mildiou</b>	<b>I-17</b>
4.1. Traitements chimiques	I-17
4.1.1 Les fongicides de contact	I-18
4.1.2 Les fongicides systémiques	I-19
4.2. Défense naturelle de la vigne	I-19
4.2.1 Voie métabolique	I-20
4.2.1.1 Métabolisme primaire	I-20
4.2.1.2 Métabolisme secondaire	I-21
4.2.2 Voie protéique	I-30
4.3. Les gènes de résistance de la vigne	I-31
<b>5. Conclusion</b>	<b>I-33</b>
<b>6. Littérature</b>	<b>I-35</b>

## 1. Introduction

« Chaque goutte de vin est de la pluie reconquise sur le sol par le métabolisme de la vigne », Hugh Johnson<sup>1</sup>.

La vigne est une plante grimpante ligneuse appartenant au genre *Vitis*. Elle est cultivée pour son fruit, le raisin, qui peut être consommé en tant que fruit, jus, ou transformé en vin. *Vitis vinifera*, la vigne la plus répandue en Europe, est d'origine eurasiatique. La remarquable faculté d'adaptation au sol et au climat de *V. vinifera* en a fait l'espèce de choix pour la conquête de terroirs très différents à travers l'Europe, générant ainsi une extraordinaire hétérogénéité de cépages ou cultivars. On dénombre en effet une centaine de provenant de cette espèce. D'autres espèces sont toutefois cultivées telles que *Vitis riparia* et *Vitis rupestris*.

Historiquement développée sur le pourtour méditerranéen, la viticulture s'est maintenant étendue dans bien d'autres parties du monde. Désormais, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les Etats-Unis, l'Argentine, le Chili et l'Afrique du Sud font partie des grands producteurs mondiaux de vin.

En 2012, le vin, représentant le 2<sup>ème</sup> secteur d'exportation français, a rapporté 7,6 milliards d'euros. La filière du vin génère, en outre, 558 000 emplois directs ou indirects en France (source : fédération des exportateurs de vins & spiritueux 2012).

Comme toute culture, la vigne est touchée par différentes maladies, qu'elles soient de nature cryptogamique, bactérienne ou encore virale. Or, la culture de *Vitis vinifera* met en jeu des aspects culturels et économiques évidents. Dès lors, la lutte contre ses maladies devient un enjeu majeur. Si l'utilisation de produits phytosanitaires est largement répandue et plutôt efficace, elle n'est pas exempte d'aspects négatifs. Celui concernant la dégradation des sols avec l'accumulation d'éléments chimiques est d'autant plus crucial que la protection de l'environnement est devenue de plus en plus présente dans les consciences collectives. Trois traitements sont au minimum nécessaires chaque année, ils représentent 15 % du volume total de pesticides employés sur toutes les cultures en France<sup>2</sup>. Leur coût financier est donc conséquent. Au-delà de cet aspect, la santé des viticulteurs et des populations vivant à proximité des vignobles est également préoccupante. Enfin, ces traitements perdent en efficacité avec le développement de souches de pathogène plus résistantes. Toutes ces raisons conduisent à la même conclusion : il convient de trouver des solutions alternatives viables à ces traitements.

## 2. Origines et enjeux de la viticulture

Les origines de la viticulture remontent à l'antiquité. Il y a deux millénaires, lors de l'expansion maritime grecque, les pratiques viticoles se répandirent dans les pays où elles connaîtront leur apogée : la France et l'Italie. L'acte le plus lourd de conséquences historiques a été accompli par les Romains. Ils ont en effet introduit leurs variétés de vignes sur le territoire de la Gaule. Lorsque leur empire s'effondra au V<sup>e</sup> siècle, ils avaient ainsi jeté les bases de presque tous les grands vignobles européens actuels. Partant de Provence, ils remontèrent la vallée du Rhône et traversèrent toute la Gaule jusqu'à Bordeaux. Plus qu'une marchandise et un bien de consommation, les Romains remarquèrent que le vignoble stabilisait et civilisait la population locale. Dès le II<sup>e</sup> siècle, leurs vignes prospéraient en Bourgogne, au III<sup>e</sup> siècle dans la vallée de la Loire, au IV<sup>e</sup> à Paris, en Champagne et sur la Moselle et le Rhin. La viticulture en Alsace fait exception puisque ses origines remontent seulement au Haut Moyen Age<sup>3</sup>.

Suite à la chute de l'empire romain, les arts de la vigne et du vin ne ressurgirent qu'au Moyen Age. Les monastères, en plein essor, défrichent les collines et érigent des murs autour des champs. L'église se lie également au vin, la métaphore « le sang du Christ » témoignant de la pertinence de ce lien. Durant des siècles, elle posséda nombre des meilleurs vignobles d'Europe. L'art du vin, ses outils ainsi que sa technique se stabilisèrent.

La plupart des vins aujourd'hui connus remontent à la moitié du XVII<sup>e</sup> siècle. Cependant leur évolution aurait été impossible sans l'invention de la bouteille de verre. Depuis les romains le vin passait toute sa vie dans des amphores en terre cuite, en fût de bois par la suite. L'amélioration de la conservation du vin fut rendue possible grâce au progrès de l'art du verre du début du XVII<sup>e</sup> siècle. Au même moment, le bouchon de liège fut inventé. A partir de là, le vin put se bonifier dans des récipients de petite contenance et, partant, connaître une expansion commerciale sans limite, à la fois quantitative et qualitative (vins de grande garde).

Au XIX<sup>e</sup> siècle, le commerce du vin était en plein essor. Dans certains pays européens, l'économie reposait pour beaucoup sur le vin. Ainsi, en 1880, 80% de la population active italienne dépendait du vin directement ou indirectement. L'Italie et l'Espagne créèrent alors les premiers vins modernes d'exportation. La Californie connut également sa première ruée vers le vin. Cependant cet essor fut frappé de plein fouet par le phylloxéra (*Viteus vitifoliae*). Cet insecte de l'ordre des homoptères apparenté au puceron détruisit presque toutes les vignes d'Europe à la fin du XIX<sup>e</sup>. A la suite de cette tragédie économique, toutes les vignes d'Europe furent greffées sur des souches américaines résistantes au phylloxera. Cependant, quelques-unes des meilleures régions viticoles

du monde (notamment le Chili et certaines parties de l'Australie), encore épargnées à ce jour par ce ravageur peuvent continuer à planter *Vitis vinifera* sans porte-greffe.

Le phylloxera n'est pas le seul fléau de la vigne. Comme toutes les plantes cultivées, elle est extrêmement vulnérable aux agressions. Les maladies causant le plus de ravages sont les maladies cryptogamiques comme l'oïdium et le mildiou, et les insectes qui s'attaquent au feuillage et aux pousses comme les larves de cochylis et d'eudémis (également appelés vers de la grappe). Dès lors, il est devenu indispensable de mettre en place une stratégie de préservation des vignobles dans les principaux pays producteurs. Plus qu'un produit de consommation c'est tout un patrimoine culturel qui est à préserver ; l'enjeu est majeur.

### 3. Les maladies de la vigne

Outre les insectes ravageurs, *Vitis vinifera* est sensible à un nombre important de maladies. On recense les maladies virales comme les mosaïques, le court-noué (transmise par un hôte de la famille des nématodes)<sup>4</sup> ou encore l'enroulement viral (transmise par la cochenille mais aussi par la vigne malade elle-même)<sup>5</sup>. On compte également les maladies bactériennes comme la galle du collet ou à phytoplasmes comme la flavescence dorée, transmise par un insecte vecteur, la cicadelle<sup>5</sup>. Enfin, les maladies fongiques impactent régulièrement et sévèrement les plants de vigne. L'objet du travail présenté ici portant sur le mildiou, seules les maladies cryptogamiques de la vigne seront abordées dans cette section.

#### 3.1. Les maladies cryptogamiques

Les maladies cryptogamiques ou fongiques sont causées à une plante par un champignon ou un organisme filamenteux de la classe des oomycètes. Parmi ces maladies, certaines d'entre-elles sont plus courantes telles que le mildiou, l'oïdium, la pourriture noble (ou grise) ou encore le black rot.

- L'oïdium

L'oïdium (« powdery mildew » en anglais) est causé par le champignon *Erysiphe necator*. Originaire du continent américain, il est apparu en France à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Non traité, l'oïdium peut fortement diminuer le rendement des vignes. Comme toutes les maladies cryptogamiques, il devient particulièrement problématique lorsque le climat est humide ou le feuillage de la plante particulièrement dense.

Ce champignon attaque les parties vertes de la vigne et en particulier les feuilles à la surface desquelles il provoque l'apparition de taches blanc-grisâtres, poudreuses. Après avoir infecté les feuilles, et en l'absence de traitement, l'oïdium s'attaque aux inflorescences. Sur les inflorescences, l'oïdium se reconnaît facilement à la couche poudreuse blanche qu'il laisse (**Figure I-1**). L'oïdium s'attaque à toutes les parties vertes de la vigne, mais jamais au raisin après véraison complète et jamais aux bois après aoûtement (période à laquelle les rameaux deviennent bruns). Sur les rameaux, l'oïdium laisse des taches brunes/noires que l'on retrouve à la taille en hiver.



Figure I-1 : symptômes causés par l'oïdium sur les grappes de raisin et les feuilles (J-C Gutner).

- La pourriture noble

Cette « maladie » est due au champignon *Botrytis cinerea*. Elle se développe sur les baies de raisin dans des conditions d'humidité et d'ensoleillement favorables, permettant la production de vins de raisins surmûris (**Figure I-2**). Le champignon se nourrit de l'eau du raisin ce qui a pour effet de concentrer le sucre à l'intérieur des baies. À l'automne, la peau des baies surmûries « botrytisées » devient violacée. Dans des conditions de développement non maîtrisées, elle est appelée « pourriture grise » et elle endommage les récoltes.

*Botrytis cinerea* est présent dès la floraison de la vigne sur les baies. Pour la fabrication de vins liquoreux, son développement doit être maîtrisé de juin à août, afin de ne pas mettre en péril prématurément la maturation du raisin. Les travaux en vert (principalement l'ébourgeonnage et l'effeuillage) permettent de contrôler son développement trop précoce, qui n'est souhaité que quand les baies ont atteint une maturité suffisante. Certains vignobles n'hésitent pas à bannir ainsi les traitements anti-*botrytis*.



Figure I-2 : pourriture noble sur une grappe de raisin de sémillon dans le Sauternais (J. Yesberg).

Pour produire des raisins botrytisés l'humidité matinale des mois d'octobre et de novembre est indispensable, favorisant le développement de ce champignon, elle doit être suivie d'un temps sec pour faciliter l'évaporation de l'eau. La présence d'une rivière proche du vignoble permet également le développement de la pourriture noble ; dans le Sauternais, c'est le Ciron qui joue ce rôle.

On doit à ce champignon les vins blancs liquoreux tels que le sauternes du Bordelais, les « Vendanges Tardives » d'Alsace (essentiellement Gewurztraminer ou Pinot Gris) ou encore le coteaux-du-layon de la vallée de la Loire.

- Le black-rot de la vigne

Le black-rot (ou pourriture noire) est une maladie spécifique de la vigne et est causé par le champignon *Guignardia bidwellii*. Cette maladie originaire de l'Amérique du Nord se développe sur les feuilles, les pétioles, pédoncules, vrilles et les inflorescences en phase de croissance. Mais ce ne sont pas les attaques sur feuilles et rameaux qui sont les plus préjudiciables pour la vigne. Le black rot est surtout une maladie des grappes (**Figure I-3**) qui occasionne des pertes de récolte. Ces pertes dépendent de l'importance de l'inoculum, des conditions météorologiques et de la sensibilité du cépage cultivé.



Figure I-3 : grappe atteinte par le black rot en fin de saison (D. Molitor).

### 3.2. Le mildiou de la vigne

Le mildiou est une maladie cryptogamique commune à plusieurs plantes telles que la pomme de terre, la tomate et bien évidemment la vigne. Dans le cas de la vigne, l'agent pathogène est le *Plasmopara viticola*, en anglais : « downy mildew ». Le mot mildiou, issu de la francisation phonétique de l'anglais « mildew », est réservé à ce dernier, l'oïdium désignant le « powdery mildew ». Cette maladie est originaire d'Amérique du Nord. Contrairement aux espèces de ce continent, *Vitis vinifera* a longtemps évolué hors de tout contact avec ce pathogène. En effet, *P. viticola* a été signalée pour la première fois dans le Bordelais en 1878<sup>6</sup>. *Vitis vinifera* est donc particulièrement sensible à cette maladie. Cette dernière est causée par l'attaque d'un organisme filamenteux microscopique classé parmi les oomycètes. Le mildiou est qualifié de parasite obligatoire ou biotrophe c'est à dire qu'il s'alimente aux dépens d'un autre organisme vivant, au contraire d'un parasite nécrotrophe dont au moins la première étape d'infection nécessite une source nutritive composée de tissus nécrosés.

#### 3.2.1 Symptômes de la maladie

Le pathogène se développe principalement sur les jeunes feuilles, bien que tous les organes aériens soient susceptibles d'être infectés. Deux symptômes peuvent être observés, des taches jaunâtres sur la face supérieure de la feuille dites « taches d'huiles », ainsi qu'un feutrage blanchâtre sur la face inférieure : le mycélium (**Figure I-4**). Cet ensemble de symptômes engendre une nécrose de la feuille provoquant son dessèchement. Ceci a pour conséquence de diminuer la photosynthèse et de provoquer à long terme l'affaiblissement des vignes.



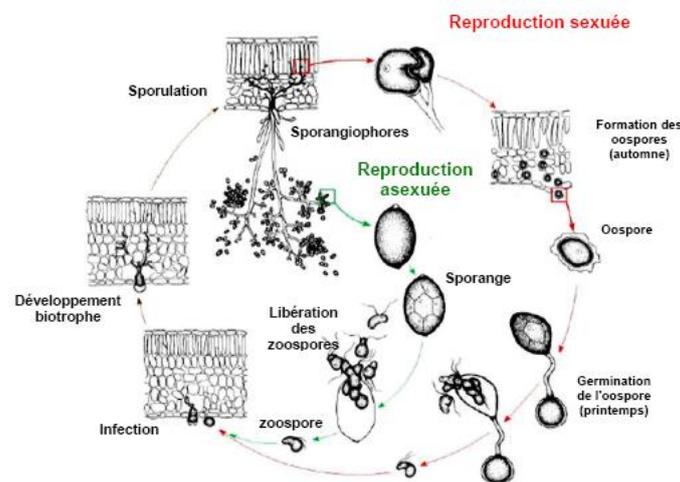
**Figure I-4 : photographie d'une face inférieure de feuille infectée par le mildiou, le duvet blanc caractéristique du mycélium est observable.**

Le mycélium peut également se développer sur les rameaux causant une diminution de la multiplication cellulaire ayant pour conséquence la formation de rameaux de petites tailles. L'aoûtement est également défectueux, la phase de lignification des rameaux ne se fait pas correctement ce qui peut rendre la taille hivernale des vignes difficile.

Enfin, le pathogène peut agir sur les inflorescences (boutons floraux) et sur les grappes. Si l'attaque se produit avant la floraison de la vigne, on observe alors une coulure dite pathologique se traduisant par le dessèchement des inflorescences et donc une perte de récolte assurée. Si l'attaque a lieu vers le stade « nouaison », on constate alors la formation de rot gris correspondant à l'apparition d'un feutrage blanchâtre sur les jeunes baies. Finalement, si l'attaque est plus tardive, on parle alors de rot brun (dessèchement des baies). Bien souvent, les attaques sur grappes ne se produisent plus après le stade « véraison ».

### 3.2.2 Processus de contamination du mildiou

L'agent responsable du mildiou, *Plasmopara viticola* se développe uniquement sur les tissus verts de la vigne, en particulier dans le parenchyme des feuilles (**Figure I-5** et **Figure I-6**).



**Figure I-5** : cycle de développement du mildiou, représentation des cycles de reproduction asexuée (flèches vertes) et sexuée (flèches rouges) de l'oomycète<sup>7</sup>.

En fonction des conditions climatiques, deux types de reproduction sont décrites. La reproduction sexuée a lieu au moment de la sénescence des feuilles<sup>8</sup>, lors de la fécondation de l'oogone par l'anthéridie par le biais d'un tube copulateur (**Figure I-5**). La maturation de ces œufs intervient au printemps. Lorsque la température dépasse 10 °C et que l'atmosphère est saturée en humidité, les oospores germent et produisent des sporanges capables de libérer des spores appelés zoospores (**Figure I-5**). Les zoospores sont biflagellées et hydrophiles très sensibles à la dessiccation. L'infection par *P. viticola* débute donc généralement au printemps, lorsque les zoospores parviennent à entrer en contact avec les feuilles de vigne lors de pluies violentes qui les éclaboussent. Quatre à cinq zoospores agglomérées autour d'un stomate ouvert s'enkystent (**Figure I-5 et I-6**) et émettent alors un tube germinatif ou siphon infestant qui pénètre la feuille

et conduit à la formation d'une vésicule sous-stomatique dans la cavité sous-stomatique (**Figure I-6**). Le cytoplasme des zoospores est transmis à cette vésicule qui rapidement va émettre un haustorium primaire vers une cellule hôte. La croissance de l'haustorium représente la phase initiale de croissance du mycélium (**Figure I-6**). Puis, la croissance se poursuit en intercellulaire dans le tissu de l'hôte.

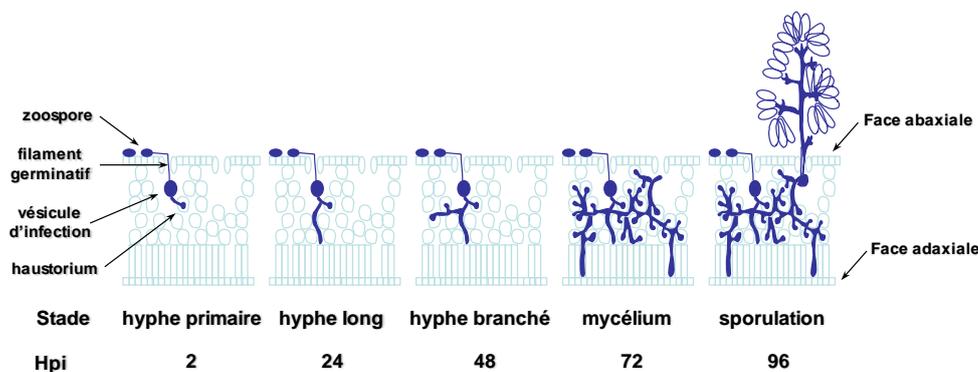


Figure I-6 : les différentes étapes de l'infection de *Plasmopara viticola* dans les tissus de la feuille (S. Wiedemann-Merdinoglu).

Des haustoria secondaires, rapidement formés, absorbent le contenu en eau et en nutriments des cellules voisines. Les hyphes ont une forme irrégulière qui varie selon les tissus colonisés. Les hyphes peuvent prendre une forme cylindrique dans les tissus lâches et une forme de filaments noduleux dans les tissus compacts. Les tissus lacuneux sont rapidement colonisés tandis que les vaisseaux et, plus généralement, toutes les parties ligneuses constituent des barrières plus ou moins infranchissables, selon l'âge des feuilles. La période d'incubation est définie comme le temps qui s'écoule entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes<sup>9</sup>. La durée de l'incubation varie selon la température, les conditions d'humidité et la nature des organes atteints. La durée de l'incubation, également appelée période de latence, oscille entre 4 et 10 jours selon les symptômes. Par temps humide, le premier symptôme est généralement la sporulation (**Figure I-4**) qui a lieu sur la face intérieure (ou abaxiale) des feuilles à partir de 4 à 5 jours après le début de l'infection. L'incubation s'achève par une chlorose, c'est-à-dire d'un palissement ou jaunissement des feuilles au niveau du site d'infection du fait de la perte de pigments chlorophylliens dans le mésophylle qui peut apparaître à partir du 8<sup>ème</sup> jour après le début de l'infection. L'infection secondaire se produit par temps humide lorsque les gouttes de pluies et, dans une moindre mesure, le vent entraîne les sporanges (**Figure I-5**). Les sporanges sont portés par les sporangiophores qui forment les hyphes aériens. Il se forme alors un feutre ou duvet mycélien blanc cotonneux sur la face inférieure des feuilles.

### 3.2.3 Composition métabolique du mildiou

Les données concernant la composition métabolique du mildiou sont peu nombreuses dans la littérature. Néanmoins, comme pour les autres organismes de sa classe, les cellules du mildiou sont composées en majorité de polysaccharides, de protéines (principalement de glycoprotéines), de lipides et de matériel inorganique à base de phosphate. Ses parois cellulaires sont quant à elle principalement composées de cellulose et de  $\beta$ -glucans<sup>10</sup>. Plus spécifiquement, Mérida *et al.* ont pu identifier trois types de parois cellulaires chez les oomycètes<sup>11</sup>. Le type I est dépourvu de N-acétylglucosamine (GlcNAc), mais contient de l'acide glucuronique et du mannose ; le type II contient jusqu'à 5 % des résidus GlcNAc, témoignant de la réticulation entre la cellulose et les 1,3- $\beta$ -glucanes; et enfin le type III, est caractérisée par la plus haute teneur en GlcNAc (supérieur à 5 %) et l'apparition d'hydrates de carbone inhabituels, constitués de résidus de 1,6-GlcNAc liés. Ces trois types de parois cellulaires sont également distingués par leur teneur en cellulose et la structure fine de leurs 1,3- $\beta$ -glucanes. Cette particularité différencie les oomycète des champignons. Toutefois, aucun marqueur moléculaire de *Plasmopara viticola* n'a été à ce jour identifié.

## 4. Les moyens de lutte contre le mildiou

Les stratégies employées pour combattre les maladies de la vigne sont principalement associées aux traitements chimiques. Les fongicides sont utilisés à but préventif mais aussi curatif mais certaines espèces de vigne sont dotées naturellement de défenses efficaces vis-à-vis du mildiou. Certaines espèces américaines et asiatiques présentent même une résistance partielle voire totale au mildiou<sup>12,13</sup>. C'est le cas de *Muscadinia rotundifolia* qui présente une résistance totale à *P. viticola*<sup>14</sup> mais de mauvaises qualités viticoles. Dès lors, l'identification des facteurs de résistance de ces variétés et leur introgression dans des variétés sensibles produisant du vin de qualité pourrait constituer une alternative aux traitements chimiques.

### 4.1. Traitements chimiques

Les traitements chimiques sont efficaces mais présentent toutefois plusieurs inconvénients. Outre leur coût non négligeable, l'accumulation de produits chimiques dans les sols pourrait dénaturer les terroirs et altérer ainsi la typicité des vins<sup>15</sup>. A plus long terme, des souches résistantes de pathogènes pourraient se développer et rendre inefficace ces traitements<sup>16</sup>.

Les traitements fongicides sont classés en deux grandes familles : les fongicides de contact et les fongicides systémiques.

#### 4.1.1 Les fongicides de contact

Ces produits ont un large spectre d'action puisque leur mécanisme d'action se base sur les réactions enzymatiques impliquées dans la production d'énergie du végétal ou du pathogène. Par définition, ils ne sont pas absorbés par la plante. On trouve principalement des produits à base de métaux et de soufre.

Le cuivre est souvent employé comme fongicide de contact. Le cuivre est peu toxique pour les organismes supérieurs comme les mammifères ( $DL_{50} = 300-500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  chez le rat, fiche technique n°294, INERIS 2013) mais l'est extrêmement pour les organismes inférieurs de type bactéries ou champignons. Il est souvent associé à un groupement thiol (R-SH). Dans ce cas, le métal constitue la partie active pour les enzymes impliqués dans les phénomènes d'oxydoréduction assurant notamment le transport de l'énergie du végétal. La toxicité des métaux n'est pas spécifique aux champignons mais touche tous les êtres vivants. Cependant, les champignons sont particulièrement sensibles à ces traitements puisqu'ils possèdent une capacité d'assimilation des métaux importante.

La bouillie bordelaise est régulièrement épandue lors des traitements phytosanitaires de la vigne. Elle est composée de sulfate de cuivre neutralisé par la chaux. Son effet est produit par le biais des ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  du mélange. En effet, c'est sous forme libre que le cuivre II est le plus toxique pour le pathogène<sup>17</sup>. Ces ions affectent des enzymes dans les spores des champignons parasites, empêchant leur germination.

Le soufre est également utilisé notamment sous forme de thiocarbamates et dithiocarbamates qui agissent en libérant des isocyanates ou du thirame. Ces molécules actives bloquent les groupements S-H des enzymes. Elles perturbent le métabolisme du pathogène à trois niveaux :

- a. inhibition de l'oxydation du glucose,
- b. inhibition de la synthèse d'acide nucléique,
- c. inhibition de la dégradation des acides gras.

Les dithiocarbamates sont dépourvus de toute phytotoxicité et également peu toxiques pour les mammifères ( $DL_{50} = 5,2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  chez le rat pour le zibène<sup>18</sup>).

#### 4.1.2 Les fongicides systémiques

Ces fongicides agissent directement sur les réactions de biosynthèse et sont donc plus spécifiques que les fongicides de contact. Pour des résultats équivalents, la dose requise est également moins importante. Cependant, à cause de leur mode d'action, l'apparition de souches de champignons plus résistantes est à craindre.

On trouve principalement les carbamates et les inhibiteurs systémiques de synthèse des stérols. Les carbamates, une fois absorbés, bloquent la division cellulaire et la mitose en perturbant la formation et le fonctionnement du fuseau chromatique. Ces composés spécifiques sont en revanche inefficaces contre le mildiou mais sont employés contre l'oïdium. Les inhibiteurs systémiques provoquent l'inhibition des enzymes impliquées dans la synthèse des stérols. Ceci entraîne une perturbation de la formation des membranes cellulaires des champignons.

#### 4.2. Défense naturelle de la vigne

Lorsque les plantes sont attaquées par des pathogènes, elles se défendent à l'aide de mécanismes actifs et passifs. Les mécanismes de défense passifs impliquent des composés constitutifs. La défense active requière la synthèse de protéines dédiées. Cette synthèse est régulée par un réseau complexe de voies de signalisation qui impliquent principalement trois molécules : l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET). Il en résulte la synthèse de protéines de défense, « les pathogenesis-related (PR) proteins ». Les voies de transduction de signal induites par les éliciteurs conduisent (i) à la production de phytoalexines, composés au fort potentiel antibiotique, (ii) au renforcement des parois cellulaires et à leur lignification et (iii) à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Parmi les protéines induites lors de la défense de la plante, les peroxydases participent à de nombreux processus physiologiques<sup>19</sup>. Chez la vigne, les peroxydases appartiennent au groupe de classe III<sup>20</sup>. Parmi ces processus, on cite la synthèse de phytoalexines et leur participation dans la métabolisation des ROS conduisant à des réponses hypersensibles (HR). Les HR sont une forme de mort programmée des cellules hôtes situées à proximité des sites d'infection, ce qui limite le développement du pathogène. Ces réactions sont efficaces contre les attaques de pathogènes à tendance biotrophe<sup>21</sup>. Ce mécanisme de résistance a été mis en évidence dans l'interaction *Plasmopara viticola* - *Vitis vinifera*<sup>22,23</sup>.

Cette thèse concerne principalement les métabolites synthétisés suite à l'infection du mildiou, cependant, les autres mécanismes de défense des plantes seront également abordés, de manière non exhaustive.

#### 4.2.1 Voie métabolique

Au sein des plantes sont distingués les métabolismes primaire et secondaire. Les métabolites primaires sont directement impliqués dans la croissance, le développement, la reproduction et l'assimilation des nutriments. Les acides aminés, les lipides ou encore les sucres appartiennent en conséquence au métabolisme primaire. Les métabolites secondaires, par exclusion, n'appartiennent pas au métabolisme primaire et résultent de réactions chimiques ultérieures. La distinction entre ces deux familles n'est cependant pas toujours aisée. Par exemple, la lignine possède des fonctions indispensables pour la croissance de la plante et peut donc se classer parmi les métabolites primaires.

##### 4.2.1.1 Métabolisme primaire

Lorsque l'on évoque les défenses métaboliques des plantes, ce sont les métabolites secondaires qui sont majoritairement décrits. Pourtant certains métabolites primaires interviennent dans les mécanismes de défense des plantes. L'objet de cette section est de décrire les plus notables d'entre eux.

#### a. Les sucres

Les plantes produisent du glucose lors de la photosynthèse. Ce composé peut ensuite être diffusé dans l'ensemble de la plante pour nourrir les cellules, être stocké sous forme de réserve ou servir de molécule de départ pour la synthèse d'autres molécules organiques végétales. Si les sucres ne sont pas connus pour agir directement dans les mécanismes de défense de la plante, ils peuvent toutefois y être impliqués. Par exemple, l'accumulation de saccharose permet d'exprimer les gènes de défense chez les plantes<sup>24</sup>. Plus spécifiquement, Gamm *et al.* ont observé une altération majeure du métabolisme des carbohydrates (notamment une accumulation d'amidon) lors des différents stades de développement du mildiou sur des feuilles de vigne<sup>25</sup>. Ceci démontre que les sucres sont impliqués indirectement lorsque la plante est attaquée.

La callose, un polysaccharide qu'on retrouve au niveau des parois cellulaires, jouerait également un rôle important chez les variétés résistantes à *Plasmopara viticola*. Ce composé est formé de résidus de molécules de glucose liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,3, d'où son appellation de  $\beta$ -glucane. En effet, Toffolatti *et al.* ont observé une accumulation (par dépôt) de callose au sein des cellules du mésophile spongieux chez des hybrides résistants après l'infection de stomates par *P. viticola*. Ce phénomène n'a pas été observé chez les variétés sensibles<sup>20</sup>.

## b. Les lipides

Les lipides sont des composés très diversifiés comprenant notamment les cires, les stérols les mono- di- et triglycérides ou encore les phospholipides.

Parmi ces composés, les polyphosphoinositides, notamment les lipides phosphorylés et les phosphates d'inositol sont reconnus pour intervenir dans les voies de signalisation de la plante<sup>26</sup>. Les phospholipides et plus spécifiquement les acides phosphatidiques jouent le rôle de second messenger dans la signalisation de défense. Leur concentration augmente rapidement suite à des stress de natures diverses (pathogènes, blessures, stress oxydatifs et osmotiques)<sup>27,28</sup>.

## c. Les acides aminés

En plus des 20 acides aminés impliqués dans la biosynthèse des protéines, les plantes produisent également d'autres acides aminés impliqués dans les voies de signalisation. Par exemple, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est un acide aminé à 4 carbones présent pratiquement chez toutes les plantes. Outre son rôle dans la croissance de la plante, ce composé présente une toxicité directe envers les insectes herbivores en inhibant leurs neurotransmissions<sup>29</sup>.

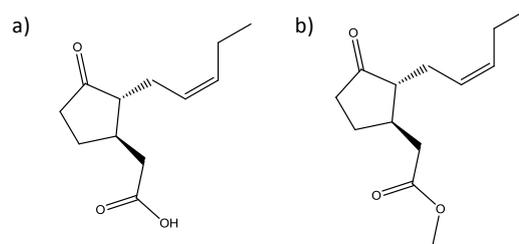
### 4.2.1.2 Métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires, plutôt spécifiques aux plantes, se divisent en trois grandes familles ; les polyphénols, les terpènes et les composés azotés. La présence de ces derniers au sein du genre *Vitis* n'est pas décrite dans la littérature, par conséquent ils ne seront pas traités dans ce chapitre. Pour qu'il y ait synthèse de métabolite secondaire, la reconnaissance du pathogène est un prérequis indispensable. Cette reconnaissance est généralement permise par les éliciteurs<sup>30</sup>, des composés généralement de faible poids moléculaire.

#### i Reconnaissance et signalisation

D'une grande diversité, les éliciteurs sont synthétisés ou libérés par des précurseurs polymériques. La vigne, comme les autres plantes est capable de reconnaître des agresseurs potentiels grâce à ces composés. Ces réactions chimiques, en plus de propager l'information dans toute la plante, provoquent la synthèse de différentes familles de molécules de défense. Elles ont des fonctions biologiques complémentaires qui contribuent à la protection des tissus et des organes et à l'élimination des pathogènes. Les produits finaux de défense se distinguent en deux catégories principales. La première est associée aux composés issus du métabolisme secondaire mais aussi aux composés structuraux avec la synthèse renforcée de lignines. Les protéines de

défense PR entrent dans la deuxième catégorie. Après la reconnaissance, c'est la signalisation qui entre en jeu dans ce processus de défense. Les jasmonates tout d'abord, dont l'acide jasmonique (JA) ou son ester, le jasmonate de méthyle (**Figure I-7**), font partie de ces molécules messagères qui déclenchent les réactions de synthèse des métabolites secondaires<sup>31</sup>. Il a d'ailleurs été montré qu'une augmentation en concentration de ces molécules au sein de cellules de plantes stimulait la synthèse de molécules secondaires<sup>32</sup>.



**Figure I-7 : structures moléculaires (a) acide jasmonique et (b) jasmonate de méthyle, les deux jasmonates les plus actifs.**

L'acide jasmonique fait partie de la famille des oxilipines. Il est synthétisé à partir de l'acide linoléique dont la dégradation permet également de libérer des composés volatils. JA permet la transduction des signaux éliciteurs pour la production de métabolites secondaires dont les phytoalexines. Cette molécule active également des gènes codant des protéines PR comme les chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases et inhibiteurs de protéases, notamment chez la vigne<sup>33</sup>. Enfin, l'acide jasmonique est réputé pour déclencher une réponse induite locale. L'éthylène, considéré comme une phytohormone, est induit par des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Il régule et induit la stimulation ou l'inhibition des métabolites secondaires en interagissant avec l'acide jasmonique<sup>34</sup>. Enfin, il existe également la voie de signalisation par l'acide salicylique (SA). Suite à une attaque, ce composé transmet l'information dans toute la plante. Cet éliciteur est reconnu pour intervenir sur les mécanismes de synthèse de protéine PR, notamment dans la lutte contre les attaques de champignons biotrophes<sup>21</sup>.

## ii Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont par définition des molécules présentant au moins un groupement phénolique. L'intérêt pour ces composés a considérablement augmenté ces dernières années. Leurs propriétés antioxydantes auraient de nombreuses vertus pour la santé chez l'être humain<sup>35-37</sup>. Ils préviendraient les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, les cancers, l'ostéoporose ou encore le diabète sucré<sup>38</sup>.

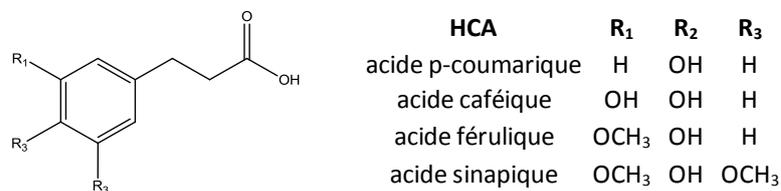
La plupart des polyphénols sont issus de la biosynthèse des phénylpropanoïdes (composés en C6-C3). Ces composés peuvent être de faible poids moléculaire, par exemple les unités simples de flavonoïdes, ou de poids moléculaire élevé (exemple : la lignine). Il existe une variété très importante de polyphénols, seuls ceux susceptibles d'avoir un rôle défensif chez la vigne seront décrits, toutefois non exhaustivement. Ces polyphénols se classent en plusieurs sous-familles, ces dernières sont associées à la structure des squelettes carbonés.

a. Les acides hydroxy benzoïques

L'acide ellagique, par exemple, est considéré comme un polyphénol. En se combinant avec le glucose des plantes, cette molécule constitue les ellagitanins, des composés présents chez la muscadine<sup>39</sup>.

b. Les acides hydroxycinnamiques (HCA)

Ces acides présentent une structure carbonée en C6-C3. Ils sont dérivés de l'acide cinnamique et appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes. Ces composés sont largement présents chez les végétaux, la **Figure I-8** présente les principaux HCA.



**Figure I-8 : les principaux acides hydroxycinnamiques.**

Parmi les acides hydroxycinnamiques, on peut également y inclure les dérivés d'acides hydroxycinnamiques tels que l'acide chlorogénique (**Figure I-9**). C'est un ester de l'acide caféique et de l'acide quinique. Son nom ne provient pas de la présence d'un atome de chlore au sein de sa structure mais du sens étymologique des mots *khloros* et *genos* qui signifient « vert » et « génération, naissance » respectivement en grec. Ce composé devient en effet vert lorsqu'il s'oxyde.

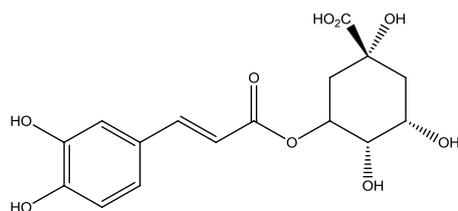


Figure I-9 : structure de l'acide chlorogénique.

Les acides hydroxycinnamiques, notamment l'acide p-coumarique, présentent une action antimicrobienne chez le riz<sup>40</sup>. Ils jouent également un rôle clef dans la défense des graminées contre les insectes, les champignons et les bactéries<sup>41</sup>. S'il existe une interaction avec *Plasmopara viticola*, elle n'a toutefois pas encore été découverte.

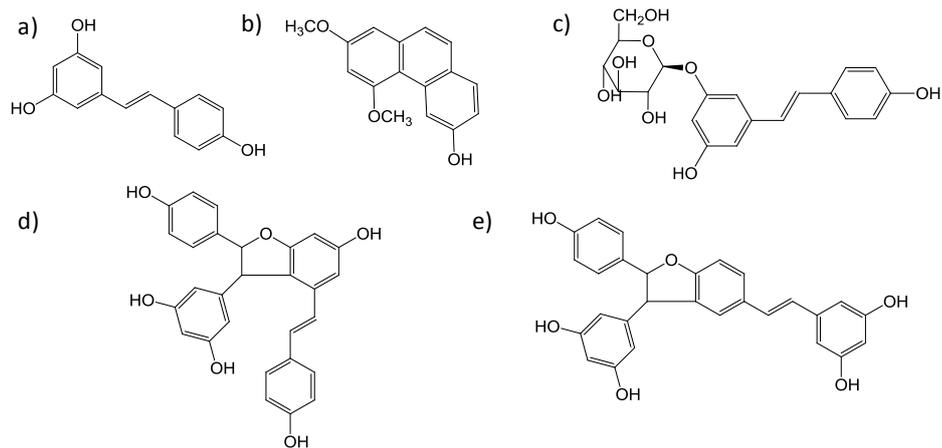
### c. Les stilbènes

C'est en 1977 que Langcake et Pryce mirent en relation pour la première fois les stilbènes avec la résistance de la vigne<sup>42</sup>. Ces composés sont classés parmi les phytoalexines. Ce terme a été introduit la première fois en 1940 par Müller et Börger<sup>43</sup>. Les phytoalexines, souvent de faible poids moléculaire, ont un fort potentiel antibiotique et on les retrouve pour cette raison accumulés près des sites d'infection. A la base, ce terme définit les composés chimiques synthétisés uniquement lorsque les cellules vivantes se nécrosent suite à l'invasion de la plante hôte par un autre organisme. Ces phytoalexines sont synthétisées en réponse à des stress abiotiques (rayonnement UV<sup>44</sup>, lésions, sécheresses, produits chimiques<sup>45</sup>) ou biotiques<sup>46-48</sup>. La synthèse de stilbènes est considérée comme la réponse la plus importante contre les maladies fongiques de la vigne. Leur structure de base comporte deux noyaux benzéniques reliés par de deux carbones  $sp^2$ , soit un squelette carboné de type C6-C2-C6. En raison de la présence d'une double liaison entre les deux noyaux phénoliques, deux formes, *cis* et *trans*, des stilbènes existent dans la nature<sup>49</sup>. La forme *trans* est plus abondante que la forme *cis*, car plus stable d'un point de vue stérique<sup>50</sup>.

Une étude récente a permis de localiser les stilbènes au sein de feuilles de vigne infectées par *P. viticola*. Leur concentration la plus importante se situe au niveau des stomates et de leur paroi cellulaire. Cependant, ces composés sont également localisés au niveau des cellules vacuolaires de l'épiderme chez les génotypes sensibles, et au niveau du parenchyme spongieux (à proximité du site d'infection) chez des génotypes partiellement résistants<sup>51</sup>.

Les stilbènes se rencontrent dans de nombreux végétaux sous forme libre, glycosylés, ou plus spécifiquement sous forme d'oligomères chez *Vitis vinifera* (Figure I-10). Le plus connu d'entre

eux est sans nul doute le resvératrol. De nombreuses études lui sont consacrées pour ses possibles propriétés thérapeutiques notamment pour les maladies cardiovasculaires<sup>52</sup>. Sa biodisponibilité (fraction d'une dose atteignant la circulation sanguine sous forme inchangée) est faible puisqu'il est rapidement métabolisé dans le foie et les intestins en formes conjuguées : glucuronate et sulfonate. Dans le cas de la consommation de vin, il a été montré que la quercétine (présente dans cette boisson) interférait avec la sulfatation et la glucuronidation du resvératrol dans le foie, permettant ainsi d'augmenter sa biodisponibilité<sup>53</sup>.



**Figure I-10 : structures des principaux stilbènes rencontrés chez la vigne, (a) *trans*-resvératrol, (b) *trans*-ptérostilbène, (c) *trans*-picéide, (d) *trans*- $\epsilon$ -viniférine et (e) *trans*- $\delta$ -viniférine.**

Chez *Vitis vinifera*, le méthyl jasmonate et l'acide jasmonique, jouant le rôle d'éliciteurs, induisent une cascade de réactions permettant de synthétiser le resvératrol, ses dérivés et des viniférines<sup>54</sup>.

Les stilbènes dérivent de la voie des phénylpropanoïdes qui implique l'enzyme phénylalanine ammonia lyase (PAL) des molécules dérivées de la voie des shikimates. Ce schéma de biosynthèse est décrit **Figure I-11**.

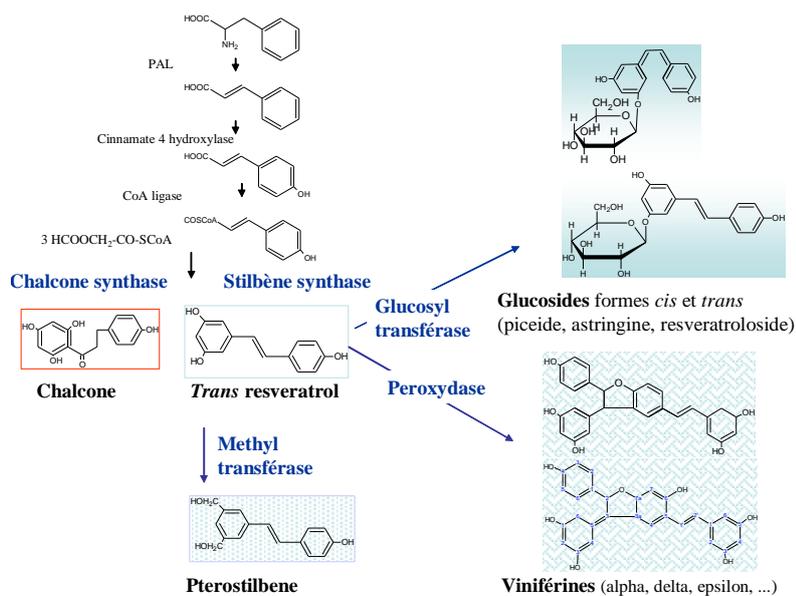


Figure I-11 : voie de biosynthèse du resvératrol et de ses principaux dérivés.

La condensation du p-coumaroyl CoA avec 3 molécules de malonyl CoA permet d'obtenir deux types de produits selon l'enzyme intervenant, la stilbène synthase (STS) ou la chalcone synthase. Le resvératrol est formé par l'action de la STS alors que la chalcone synthase est à l'origine de la biosynthèse des flavonoïdes. Ces deux familles de composés sont donc en compétition dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sachant que l'expression des gènes des STS est souvent induite par des stress biotiques et/ou abiotiques. Pour synthétiser le ptérostilbène, deux des trois groupements hydroxyles du resvératrol sont méthylés grâce à la méthyl transférase. La glucosyltransférase a pour effet la substitution d'un groupement hydroxyle par un sucre, un glucose, pour donner lieu à une molécule de resvératrol-3-O-glucoside ou piceïde, ce qui le protège de l'oxydation enzymatique. Les dimères du resvératrol comme la *trans*- $\delta$ -viniférine (ou *trans*-resvératrol dehydrodimer) sont des molécules produites grâce à une dimérisation oxydative du resvératrol par les peroxydases des plantes. Mais il existe également des trimères et tétramères de resvératrol au sein de l'espèce *Vitis vinifera*. Au sein des dimères présents chez la feuille de vigne se trouvent également l'ampélopsine D, le pallidol et la quadrangularine A. Les isomères de miyabénole C et l'alpha-viniférine représentent les trimères, l'ampélopsine H, l'hopéaphénole et la vaticanole C, les tétramères présents chez les feuilles de *V. vinifera*<sup>55</sup>.

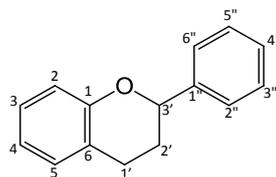
Ces stilbènes ne présentent cependant pas tous la même toxicité envers les zoospores de *Plasmopara viticola*. Les deux stilbènes reconnus comme étant les plus actifs contre ce pathogène sont les  $\delta$ - et  $\epsilon$ -viniférines<sup>56</sup> et le ptérostilbène<sup>57</sup>, tandis que les moins toxiques sont les piceïdes. Les différentes variétés de vigne ne sont pas égales face à la menace de *P. viticola*. Ainsi, Pezet et

*al.* ont montré que les variétés sensibles (précisément le Chasselas, le Gamay et le Pinot Noir) synthétisent du resvératrol en grande quantité très tôt après l'infection mais celui-ci est glycosylé très rapidement en picéide. Au contraire, les variétés résistantes (IRAC 2091 [Bronner X Gamaret] et Solaris) synthétisent également du resvératrol en grande quantité mais dans ce cas celui-ci est rapidement dimérisé en viniférines, toxiques pour le mildiou<sup>58</sup>. Chang *et al.* sont arrivés à la même conclusion avec la variété sensible Pinot Noir et la variété résistante *V. rupestris*<sup>59</sup>.

De ce point de vue, il semblerait que le resvératrol ne soit qu'un produit intermédiaire dans les mécanismes de défense de la vigne. En effet, lorsque la vigne est attaquée par le mildiou, le resvératrol est synthétisé en grande quantité quel que ce soit le cultivar, sensible ou résistant. Ce composé n'étant pas toxique en lui-même pour les zoospores, notamment à cause de son caractère hydrophile<sup>48</sup>, c'est son devenir dans la suite de la cascade de réaction des stilbènes qui serait déterminant dans la résistance de la vigne. Toutefois, son effet antimicrobien ne doit pas être sous-estimé, comme observé sur *Bothrytis*<sup>46</sup>.

#### d. Les flavonoïdes

Il existe un nombre très important de flavonoïdes dans le règne végétal, plus de 8 150 flavonoïdes ayant été identifiés<sup>60</sup>. On les trouve sous forme monomérique, dimérique, polymérique, mais le plus souvent substitués par une ou plusieurs unités de type carbohydrate. Ces composés ont un squelette carboné en C6-C3-C6, correspondant à la structure d'un composé de base appelé 2-phényl-benzopyrane (**Figure I-12**). L'intérêt pour ces molécules est important<sup>61</sup>, notamment pour leur action antioxydante, une propriété très recherchée dans l'alimentation. Plusieurs sous-familles sont décrites, on y distingue entre autre les flavonols, les flavanols, et les anthocyanidines.



**Figure I-12 : squelette moléculaire de base des flavonoïdes. La numérotation des carbones vise à expliquer la dénomination de la structure C6-C3-C6.**

Les précurseurs de la voie de biosynthèse des flavonoïdes sont le malonyl-CoA et le coumaryl-CoA, issus respectivement du métabolisme des sucres et de la voie des phénylpropanoïdes. La première étape enzymatique est catalysée par la chalcone synthase (CHS), qui aboutit à la chalcone. Pour la majorité des plantes, la chalcone ne s'accumule pas. Elle est métabolisée, via de multiples étapes

enzymatiques, en différentes classes de flavonoïdes : les flavanones, les dihydroflavonols et finalement les anthocyanes. D'autres classes de flavonoïdes telles que les isoflavones, les flavones, les pro-anthocyanidines et les flavonols sont issues de voies latérales de biosynthèse dont les précurseurs sont les intermédiaires de formation des anthocyanes<sup>62</sup>.

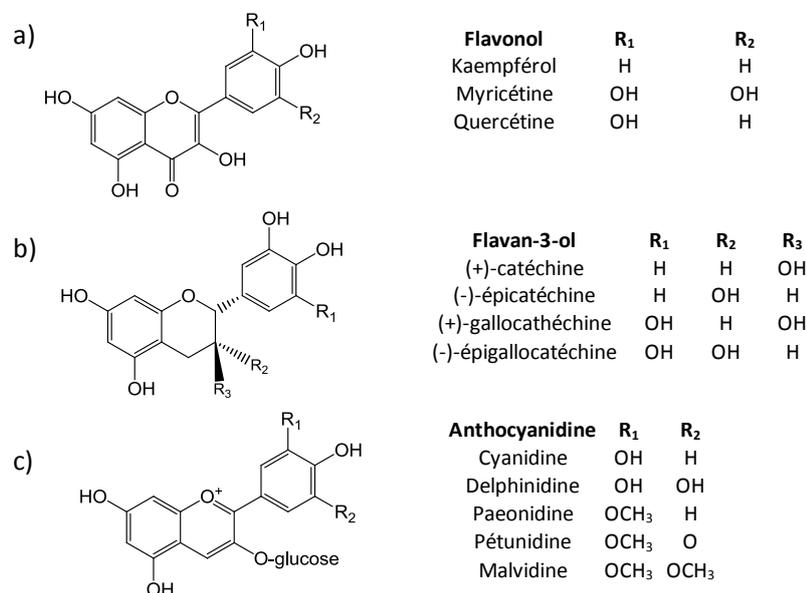


Figure I-13 : structure générale des principaux flavonoïdes, (a) flavonols, (b) flavanols et (c) anthocyanidines.

Les flavonols sont présents chez de nombreux végétaux. Chez la vigne, on retrouve principalement le kaempférol, la quercétine et la myricétine. Ces molécules sont le plus souvent substituées par des sucres<sup>63</sup>. Pour les monoglycosides, l'association avec le sucre se fait le plus souvent sur le carbone 3 (noté 2' sur la **Figure I-12**) par condensation avec la fonction hydroxyle. Dans certains cas, les flavonols montrent une activité antifongique. Il a été montré par exemple, que les flavonols constitutif des feuilles seraient capables de ralentir l'infection causée par le mildiou<sup>64</sup>. Ali *et al.* ont étudié deux variétés de vignes, Regent et Trincadeira, respectivement résistant et sensible à *Plasmopara viticola*. Ces deux variétés ont montré des réponses différentes quant à la biosynthèse de métabolites secondaires suite à l'infection. Le taux de quercétine-3-O-glucoside pour la variété résistante Regent était beaucoup plus élevé<sup>65</sup>, conférant un possible rôle de cette molécule dans la défense de la vigne au mildiou.

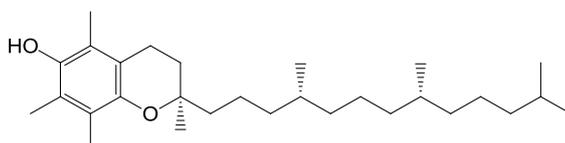
La catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine sont classés parmi les flavan-3-ols. La catéchine possède différents stéréoisomères provenant de 2 carbones asymétriques (**Figure I-13**). Les tanins condensés également nommés proanthocyanidines sont issus de la polymérisation d'unités flavanes correspondant à un squelette de quinze carbones organisés en C6-C3-C6 comme décrits précédemment. On parle d'oligomères lorsque 3 à 10 sous-unités

flavanols sont reliées entre elles par des liaisons C1'-C4 et/ou C1'-C2 (**Figure I-12**). Au-delà de 10 unités flavanols, ce sont des polymères. Les procyanidines peuvent être linéaires (liaisons interflavanes C1'-C2) ou branchées (liaisons à la fois C1'-C2 et C1'-C4). Ils se retrouvent principalement dans les baies de raisin, plus spécifiquement au sein des pellicules et pépins<sup>66</sup>. En conséquence, ces composés sont présents en quantité importante dans le vin.

Les anthocyanidines sont responsables de la pigmentation naturelle de la plante. Elles donnent notamment la coloration rouge aux fruits et aux feuilles en automne (lorsque la photosynthèse s'arrête et que la concentration en chlorophylle diminue). Ces molécules sont constituées d'un aglycone anthocyanidol et d'un glucose en position 2' (**Figure I-12**). L'aglycone est chargé positivement et la charge portée peut être délocalisée par effet mésomère sur la majeure partie du squelette flavonoïde. Les cinq anthocyanidines rencontrées dans le genre *Vitis* sont la malvidine, la paeonidine, la delphinidine, la pétunidine et la cyanidine. La coloration conférée aux végétaux dépend de plusieurs facteurs, notamment du pH et de la nature des substitutions de l'aglycone ; ce dernier jouant le rôle de chromophore. Outre la pigmentation, ces composés sont accumulés au sein de différents organes des plantes afin de les protéger contre la prédation<sup>67</sup>.

### iii Les terpénoïdes

Les terpènes produits par les plantes, font partie des hydrocarbures. Les terpénoïdes sont formés à partir des terpènes par greffe d'une fonction spécifique (alcool, aldéhyde, cétone). On en dénombre plus de 22 000. Le terpène le plus simple, l'isoprène, est un gaz volatile émis en quantité importante par les feuilles lors de la photosynthèse. Ce gaz permet de protéger les membranes cellulaires d'éventuels dommages causés par les stress oxydants<sup>68</sup> ou des hautes températures<sup>69</sup>. Les terpènes sont classés suivant le nombre d'unités d'isoprène qu'ils possèdent. Par exemple, les monoterpénoïdes et les triterpénoïdes présentent respectivement deux unités et six unités d'isoprène.



**Figure I-14 : structure moléculaire de l' $\alpha$ -tocophérol. Ce terpénoïde est surexprimé chez la feuille de vigne lorsque cette dernière est soumise à des irradiations UV-B<sup>70</sup>.**

Les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes (3 unités d'isoprènes) sont les principaux composants des huiles essentielles. Ces huiles jouent le rôle de toxines contre les insectes, mais servent également de protection contre les attaques fongiques et bactériennes<sup>71</sup>. Plus

spécifiquement, Mariana Gil *et al.* ont démontré que les niveaux en mono-, sesqui-, di- (**Figure I-14**) et tri-terpène, augmentaient lorsque la feuille de vigne est soumise à des irradiations UV-B<sup>70</sup>.

#### 4.2.2 Voie protéique

La défense des plantes face aux attaques biotiques ne met pas uniquement en jeu les métabolites. D'autres mécanismes impliquant des protéines entrent également en jeu. Les plus rencontrés dans la littérature seront décrits dans cette section.

Le premier aspect à prendre en compte est le mode d'infection des microorganismes dont font partie les oomycètes. En effet, les organismes tels les oomycètes, qui vivent en étroite association avec les plantes, voire qui les parasitent, engendrent une interaction hôte-pathogène complexe. Les protéines effectrices (ou effecteurs) sont au centre de ces interactions. Elles sont définies comme étant les protéines déployées par les organismes symbiotiques pour prendre le contrôle de la cellule ainsi que sa fonction, permettant la symbiose entre les deux organismes<sup>72</sup>. Dans le cas des oomycètes, l'haustorium serait le site émetteur de ces effecteurs vers la cellule hôte. Suite à cette émission d'effecteurs, la plante réagirait en synthétisant les éliciteurs comme l'acide jasmonique ou l'acide salicylique qui constituent chacun une interférence pour les effecteurs des symbiotes. S'en suit la cascade de réactions visant à synthétiser les métabolites secondaires mais également des protéines PR. Elles ont été définies en 1980 par Antoniw *et al.* comme des protéines codées par la plante hôte et uniquement induite en situation pathologique<sup>73,74</sup>. La synthèse de ces protéines PR est induite par l'acide salicylique près du site d'infection mais également dans l'ensemble de la plante<sup>75</sup>. En outre, les protéines PR sont particulièrement présentes au sein des feuilles<sup>76</sup>. Dix-sept familles de protéines PR ont été mises en évidence selon leur structure chimique et leur activité biologique et enzymatique.

Chez *Vitis vinifera*, la synthèse de différentes familles de protéines PR est induite dans les différents organes de la vigne lorsque ces derniers sont exposés à des stress ou arrivent à des stades spécifiques de développement<sup>77</sup>. Chez la vigne, les protéines impliquées et synthétisées suite à des stress sont majoritairement associées à la famille des PR-3, dite des chitinases et glutanases<sup>78</sup>. Les chitinases dégradent la chitine qui constitue l'élément essentiel de la paroi cellulaire des champignons<sup>79</sup>. *Uncinula necator*, l'agent pathogène de l'oïdium cause une hausse de l'activité des protéines chitinases et  $\beta$ -1,3-glucanase au sein des feuilles et des baies de raisin chez un certain nombre de variétés de vignes sensibles<sup>80</sup>. Il a été montré que l'augmentation de l'activité hydrolytique est directement liée à la gravité de l'infection de l'oïdium. De plus, aucune induction systémique n'a été observée pour les tissus non infectés.

En plus des protéines PR, les protéines des parois cellulaires de la plante entrent également en action lors d'une attaque fongique. Elles sont appelées PIPG, protéines inhibitrices de polygalacturonases. Les polygalacturonases (PG) sont des enzymes fongiques qui dégradent les composés saccharidiques des parois des plantes parmi lesquels se trouvent d'importants facteurs du pouvoir pathogène fongique. L'activité des PIPG présente une action de défense directe en lysant ces PG mais aussi indirecte en contribuant à la mise en place de réactions de défense. En effet, les PIPG modulent la coupure des PG afin de produire un maximum de fragments disposant d'un potentiel éliciteur. Ainsi, grâce aux PIPG, la plante convertit un signal de dégradation pariétale en un signal menant à l'activation de ses gènes de défense<sup>81,82</sup>.

Des enzymes ont des rôles connus dans la littérature. Les peroxydases, par exemple, renforcent les parois cellulaires en rendant les constituants de ces dernières insolubles par oxydation<sup>83</sup>. Reuveni, en outre, a démontré qu'avec l'âge, les feuilles deviennent plus résistantes à *P. viticola* grâce notamment à l'augmentation de l'activité des peroxydases et des  $\beta$ -1,3-glucanase<sup>74</sup>. Les protéases également, semblables aux caspases chez les animaux, jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes HR qui déclenchent les programmes de mort cellulaire. Gindro *et al.* ont montré que lorsque ces protéases sont inhibées, le taux d'infection augmentait chez des génotypes résistants avec notamment une baisse de la biosynthèse de stilbènes toxiques pour le mildiou<sup>84</sup>.

#### 4.3. Les gènes de résistance de la vigne

Les différentes variétés de vigne peuvent exprimer une résistance nulle, partielle ou totale au mildiou. Une résistance totale est caractérisée par l'absence de sporulation même si de légères taches nécrotiques peuvent être présentes. Une feuille possédant une résistance partielle présente des zones de nécrose relativement bien localisées, voire de légères zones de sporulation au milieu des tâches de nécrose. Une sporulation très développée s'observera sur une feuille sensible. Une échelle visuelle de référence a été mise au point pour prendre en compte l'interaction entre la vigne et *Plasmopara viticola*. Elle est appelée OIV-452 (Organisme International de la Vigne et du Vin) et s'échelonne de 1 pour une variété très sensible à 9 pour une variété très résistante. Les deux paramètres pris en compte sont la sporulation (sa densité) et la présence de nécrose (taille, couleur, surface). La **Figure I-15** décrit la relation entre les symptômes des feuilles de vigne suite à l'infection et le nombre OIV.

Notation	Degré de résistance	Fructifications	Point de tapisserie	Taches nécrotiques	
1	très faible	abondantes, généralisées	généralisées	absentes	
3	faible	abondantes	nombreux	absentes	
5	moyen	variables	irréguliers	absentes	
7	élevé	rares	rares	réduites	
9	très élevé	absentes	absents	variables	

Figure I-15 : échelle de notation OIV 452 (D. Merdinoglu)<sup>14</sup>.

La résistance de la vigne est associée à la présence de gènes de résistance appelés Rpv, « Resistance to *Plasmopara viticola* ». Le développement du mildiou chez des vignes possédant les gènes Rpv1 et Rpv2 est décrit dans la littérature (Figure I-16). Le gène Rpv1 permet une réaction compatible, il s'exprime aux stades plus avancés de l'infection. Par conséquent, il ne bloque pas l'infection. La sporulation a bien lieu à la surface de la feuille mais il permet tout de même de limiter son développement. En revanche, le gène Rpv2 bloque dès le début de l'infection (à 2 heures post-infection) vraisemblablement du fait d'échanges entre l'haustorium et les cellules de la plante. Le pathogène ne pouvant se développer, la réaction est alors incompatible. L'espèce américaine *Muscadinia rotundifolia* possède les gènes Rpv1 et Rpv2 ; ceux-ci lui confèrent une résistance totale au mildiou<sup>14</sup>.

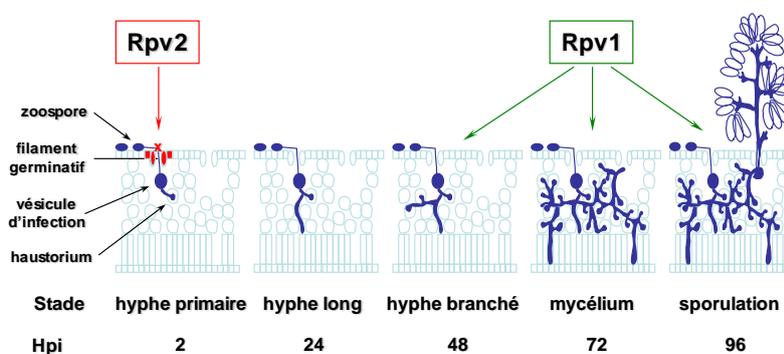


Figure I-16 : modes d'action des deux gènes de résistances Rpv1 et Rpv2 suivant les stades de l'infection de *Plasmopara viticola* (D. Merdinoglu).

Toutefois, d'autres gènes présentant des modes d'action différents ont été mis en évidence. Rpv3, par exemple, est responsable de la résistance au mildiou chez le cultivar Bianca<sup>20</sup>. Il provoque une réaction d'hypersensibilité (HR) chez la feuille de vigne<sup>85</sup>. Cette réaction active la voie de l'acide salicylique, un éliciteur qui induit la synthèse des protéines PR. Chez l'espèce *Vitis amurensis*, originaire de l'est de l'Asie, on retrouve les gènes de résistances Rpv8<sup>86</sup>, Rpv10<sup>87</sup> et Rpv12<sup>88</sup>, conférant une résistance à *P. viticola*. Toutefois, certaines souches de *P. viticola* parviennent

parfois à contourner ces défenses. Peressoti *et al.* ont observé une souche de mildiou tchèque parvenant à infecter une vigne possédant le gène de résistance Rpv3<sup>89</sup>. Pour l'élaboration du vin, la vigne requiert 30 ans de culture, voire plus. Dès lors, il est essentiel que ces résistances conférées par ces gènes soient stables sur de longues périodes. C'est pourquoi les programmes de sélection, notamment réalisés dans les INRA, doivent être conçus avec beaucoup de soin. Et c'est tout l'intérêt du pyramidage des gènes : combiner l'action de différents mécanismes de défense, relatifs à plusieurs gènes Rpv. Il est donc capital de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'activité de chaque gène. En ce sens, les approches métabolomiques peuvent permettre de déterminer quelles cascades de réactions sont engendrées par ces gènes<sup>90</sup>.

Dans les travaux qui seront présentés dans ce mémoire, des plantes provenant de deux populations issues de croisements entre *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia* seront étudiées. D'une part, la population 41524 qui présente des hybrides possédant le gène Rpv1 et d'autre part, la population 41528 qui, quant à elle, présente des hybrides avec les gènes de résistance Rpv1 et/ou Rpv2.

En 2007, le génome de la vigne a été entièrement séquencé<sup>91</sup>, c'est une première pour une plante à fruits. Cette avancée majeure est le point de départ d'une caractérisation détaillée de la fonction des gènes de *Vitis vinifera*. A terme, cela devrait permettre un meilleur pilotage des programmes d'amélioration génétique des cépages, avec une sélection plus précise et ciblée de certains critères comme la résistance aux maladies ou la régularité du rendement ou encore les qualités organoleptiques du raisin.

## 5. Conclusion

Ce chapitre a mis en évidence la nécessité de préserver l'héritage de l'activité vinicole qui perdure depuis l'antiquité. Aujourd'hui modernisée et étendue à travers le monde, la viticulture est menacée par plusieurs maladies. Les solutions proposées actuellement sont efficaces mais il est nécessaire de leur trouver des alternatives pour le long terme. En effet, l'utilisation répétée de produits phytosanitaires est à la fois coûteuse et polluante. Elle pourrait conduire à une perte de la typicité des terroirs avec l'accumulation de produits chimiques dans les sols.

Cependant, certaines espèces de vignes, notamment issues du continent nord-américain, présentent une résistance totale au mildiou. Ce phénomène de résistance est complexe et met en œuvre différents mécanismes. La plus reconnue dans le règne végétal est associée à la synthèse de métabolites secondaires. Ces biosynthèses sont élicitées par des molécules spécifiques,

notamment l'acide jasmonique. Parmi les phytoalexines, les stilbènes, dont les viniférines, présentent l'activité antifongique la plus puissante. Néanmoins, les interactions complexes entre la plante et le pathogène impliquent également d'autres voies, notamment protéiques. En effet, différentes classes de protéines sont engagées lors de l'interaction entre le pathogène et la plante.

Dès lors, il est nécessaire d'évaluer d'un point de vue moléculaire la résistance ou la sensibilité de ces différentes variétés de vigne à *Plasmopara viticola*. Le chapitre suivant décrira ainsi les techniques en spectrométrie de masse employées pour cette caractérisation. La première sera employée pour l'analyse d'échantillons liquides. Des profils métaboliques d'extraits de feuilles de vigne présentant différents niveaux de résistance au mildiou vont être réalisés par spectrométrie de masse à très haute résolution. La suite sera consacrée à l'étude *in situ* par imagerie par spectrométrie de masse de feuilles de vigne infectées.

## 6. Littérature

1. Johnson, H. *L'Atlas Mondiale du Vin (Deuxième édition)*. (Patrick Matthews, 1980).
2. Butault, J.-P., Delame, N., Jacquet, F. & Zardet, G. *L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réductions*. Notes et études socio-économiques n°35 octobre 2011 (Centre d'études et de prospective).
3. Dion, R. *Histoire de la vigne et du vin en France : des origines au XIXe siècle*. (édition du CNRS, 2010).
4. Demangeat, G. Court-noué de la vigne : survie *Xiphinema index* et rétention du GFLV en l'absence de plante hôte. *Vign. Champen.* (2005).
5. Walter, B. *Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne*. (FERET, 2000).
6. Viennot-Bourgin, G. *Les champignons parasites des plantes cultivées*. (Masson, 1949).
7. Agrios, G. *Plant pathology*. (2005).
8. Gessler, C., Pertot, I. & Perazzolli, M. *Plasmopara viticola* : a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr. Vol 50 No 1 2011* **50**, (2011).
9. Aegerter, B. J., Nuñez, J. J. & Davis, R. M. Environmental Factors Affecting Rose Downy Mildew and Development of a Forecasting Model for a Nursery Production System. *Plant Dis.* **87**, 732–738 (2003).
10. Chalupová, J. *et al.* MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *J. Mass Spectrom.* **47**, 978–986 (2012).
11. Mélida, H., Sandoval-Sierra, J. V., Diéguez-Urbeondo, J. & Bulone, V. Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. *Eukaryot. Cell* **12**, 194–203 (2013).
12. Staudt, G. & Kassemeyer, H. H. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* **34**, 225–228 (1995).
13. Langcake, P. & Lovell, P. A. Light and electron microscopical studies of the infection of *Vitis* spp. by *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen. *Vitis* **19**, 321–337 (1980).
14. Merdinoglu, D. *et al.* Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Hort. ISHS* **603**, 451–456 (2003).
15. Darriet, P. *et al.* Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma od Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis* **40**, 93–99 (2001).
16. Becker, R. & Miller, S. A. Managing downy mildew in organic and conventional vine crops. *Ohio State Univ. Ext. Fact Sheets* 1–4 (2009).
17. Somers, E. Solubilization of Copper and the Mode of Action of Bordeaux Mixture. *Nature* **206**, 216–217 (1965).
18. Engst, R. & Schnaak, W. in *Residue Rev.* (Gunther, F. A.) 45–67 (Springer New York, 1974).
19. Almagro, L. *et al.* Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* **60**, 377–390 (2009).
20. Toffolatti, S. L., Venturini, G., Maffi, D. & Vercesi, A. Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. *BMC Plant Biol.* **12**, 124 (2012).
21. Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205–227 (2005).
22. Kortekamp, A. & Zyprian, E. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J. Plant Physiol.* **160**, 1393–1400 (2003).
23. Kortekamp, A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* **44**, 58–67 (2006).
24. Gómez-Ariza, J. *et al.* Sucrose-Mediated Priming of Plant Defense Responses and Broad-Spectrum Disease Resistance by Overexpression of the Maize Pathogenesis-Related PRms Protein in Rice Plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**, 832–842 (2007).
25. Gamm, M. *et al.* Changes in Carbohydrate Metabolism in *Plasmopara viticola* -Infected Grapevine Leaves. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**, 1061–1073 (2011).

26. Munnik, T. & Vermeer, J. E. M. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **33**, 655–669 (2010).
27. Munnik, T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* **6**, 227–233 (2001).
28. Laxalt, A. M. & Munnik, T. Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 332–338 (2002).
29. Huang, T., Jander, G. & de Vos, M. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry* **72**, 1531–1537 (2011).
30. Hahn, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 387–412 (1996).
31. Kim, H.-J., Chen, F., Wang, X. & Rajapakse, N. C. Effect of Methyl Jasmonate on Secondary Metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2327–2332 (2006).
32. Wang, H. *et al.* Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. *Ind. Crops Prod.* **31**, 214–218 (2010).
33. Belhadj, A. *et al.* Methyl Jasmonate Induces Defense Responses in Grapevine and Triggers Protection against *Erysiphe necator*. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9119–9125 (2006).
34. Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**, 283–333 (2005).
35. Scalbert, A., Johnson, I. T. & Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 215S–217S (2005).
36. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278 (2009).
37. Andujar, I. *et al.* Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, (2012).
38. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Révész, C. & Jiménez, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287–306 (2005).
39. Sandhu, A. K. & Gu, L. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4681–4692 (2010).
40. Cho, J. Y., Moon, J. H., Seong, K. Y. & Park, K. H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2273–2276 (1998).
41. Niemeyer, H. M. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* **27**, 3349–3358 (1988).
42. Langcake, P. & Pryce, R. J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**, 151–152 (1977).
43. Müller, K. & Börger, H. Experimentelle untersuchungen über die Phytophthora-resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Land-u. Forstw.* **23**, 189–231 (1940).
44. Adrian, M. & Jeandet, P. Stilbene Content of Mature *Vitis vinifera* Berries in Response to UV-C Elicitation. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6103–6105 (2000).
45. Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R. & Joubert, J. M. Induction of Phytoalexin (Resveratrol) Synthesis in Grapevine Leaves Treated with Aluminum Chloride (AlCl<sub>3</sub>). *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1979–1981 (1996).
46. Jeandet, P. *et al.* Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2731–2741 (2002).
47. Langcake, P. Disease resistance of *vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol,  $\alpha$ -viniferin,  $\beta$ -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 213–226 (1981).
48. Dercks W., C. L. L. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 189–202 (1989).
49. Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M. & Terracciano, A. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2955–2964 (2007).

50. Chong, J., Poutaraud, A. & Huguene, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **177**, 143–155 (2009).
51. Bellow, S., Latouche, G., Brown, S. C., Poutaraud, A. & Cerovic, Z. G. In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* (2012).
52. Petrovski, G., Gurusamy, N. & Das, D. K. Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1215**, 22–33 (2011).
53. De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F. & Pacifici, G. M. Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **30**, 1047–1054 (2000).
54. Santamaria, A. R., Mulinacci, N., Valletta, A., Innocenti, M. & Pasqua, G. Effects of Elicitors on the Production of Resveratrol and Viniferins in Cell Cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 9094–9101 (2011).
55. Pawlus, A. Stilbenoid Chemistry from Wine and the Genus *Vitis*, a Review. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **46**, 57–111 (2012).
56. Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Martínez, M.-C. & Kassemeyer, H.-H. Quantification of Stilbenes in *Vitis* Genotypes with Different Levels of Resistance to *Plasmopara viticola* Infection. *Am. J. Enol. Vitic. ajev.2012.11127* (2012).
57. Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Richter, H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**, 145–148 (2004).
58. Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Spring, J.-L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65**, 297–303 (2005).
59. Chang, X., Heene, E., Qiao, F. & Nick, P. The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in *Vitis* Cell. *PLoS ONE* **6**, e26405 (2011).
60. Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T. & Cardinali, A. in *Phytochem. Adv. Res.* 23–67 (Research Signpost, 2006).
61. Beking, K. & Vieira, A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **62**, 17–19 (2011).
62. Schijlen, E. G. W. M., Ric de Vos, C. H., van Tunen, A. J. & Bovy, A. G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**, 2631–2648 (2004).
63. Harbone, J. B. & Baxter, H. *The Handbook of Natural Flavonoids (2 volume)*. (John Wiley & Sons, 1999).
64. Latouche, G., Bellow, S., Poutaraud, A., Meyer, S. & Cerovic, Z. G. Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*. *Planta* **237**, 351–361 (2013).
65. Ali, K. *et al.* Alterations in grapevine leaf metabolism upon inoculation with *Plasmopara viticola* in different time-points. *Plant Sci.* **191–192**, 100–107 (2012).
66. Lacampagne, S. Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin : étude de l'impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux ; Thèse de Doctorat. (2010).
67. Xie, D.-Y. & Dixon, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* **66**, 2127–2144 (2005).
68. Loreto, F. *et al.* Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. *Plant Physiol.* **126**, 993–1000 (2001).
69. Sharkey, T. D. & Singsaas, E. L. Why plants emit isoprene. *Nature* **374**, 769–769 (1995).
70. Gil, M., Pontin, M., Berli, F., Bottini, R. & Piccoli, P. Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry* **77**, 89–98 (2012).
71. Freeman, B. C. & Beattie, G. A. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Health Instr.* (2008).
72. Torto-Alalibo, T. *et al.* Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9**, S3 (2009).

73. Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S. & Loon, L. C. V. Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV. *J. Gen. Virol.* **47**, 79–87 (1980).
74. Reuveni, M. Relationships between Leaf Age, Peroxidase and  $\beta$ -1,3-Glucanase Activity, and Resistance to Downy Mildew in Grapevines. *J. Phytopathol.* **146**, 525–530 (1998).
75. Gozzo, F. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4487–4503 (2003).
76. Edreva, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **31**, 105–124 (2005).
77. Derckel, J.-P., Legendre, L., Audran, J.-C., Haye, B. & Lambert, B. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Sci.* **119**, 31–37 (1996).
78. Colas, S. *et al.* Expression and In Situ Localization of Two Major PR Proteins of Grapevine Berries during Development and after UV-C Exposition. *PLoS ONE* **7**, e43681 (2012).
79. Van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 135–162 (2006).
80. Jacobs, Dry & Robinson. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol.* **48**, 325–336 (1999).
81. Benhamou, N. & Picard, K. La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection* **80**, 137–168 (2000).
82. Howell, J. T. & Davis, M. R. Plant defense mechanisms against fungal pathogens: polygalacturonase inhibitor proteins. *Can. J. Plant Pathol.* **27**, 5–15 (2005).
83. Lepoivre. *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte.* (De Boeck Supérieur, 2003).
84. Gindro, K. *et al.* Protease inhibitors decrease the resistance of Vitaceae to *Plasmopara viticola*. *Plant Physiol. Biochem.* **60**, 74–80 (2012).
85. Casagrande, K., Falginella, L., Castellarin, S. D., Testolin, R. & Gaspero, G. D. Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta* **234**, 1097–1109 (2011).
86. Blasi, P. *et al.* Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* **123**, 43–53 (2011).
87. Schwander, F. *et al.* Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **124**, 163–176 (2012).
88. Venuti, S. *et al.* Historical Introgression of the Downy Mildew Resistance Gene Rpv12 from the Asian Species *Vitis amurensis* into Grapevine Varieties. *PLoS ONE* **8**, e61228 (2013).
89. Peressotti, E. *et al.* Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol.* **10**, 147 (2010).
90. Fukushima, A., Kusano, M., Redestig, H., Arita, M. & Saito, K. Integrated omics approaches in plant systems biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 532–538 (2009).
91. Jaillon, O. *et al.* The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463–467 (2007).

**Chapitre II** La spectrométrie de masse  
appliquée à l'analyse de feuilles de  
vigne

---

# Index

<b>1. Introduction</b>	<b>II-41</b>
<b>2. La spectrométrie de masse</b>	<b>II-41</b>
2.1. Principes généraux	II-41
2.2. Les sources d'ionisation	II-42
2.2.1 La désorption/ionisation laser	II-42
2.2.1.1 L'interaction laser-matière	II-42
2.2.1.2 Désorption/ionisation laser assistée par matrice	II-44
2.2.2 L'électronébulisation	II-49
2.3. La spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS)	II-51
2.3.1 Introduction	II-51
2.3.2 Principe général de l'analyseur à temps de vol	II-52
2.3.3 Instrumentation	II-53
2.4. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS)	II-55
2.4.1 Introduction	II-55
2.4.2 Origine et principe de la FTICRMS	II-55
2.4.3 Instrumentation	II-57
2.4.4 Déroulement d'une analyse FTICRMS	II-58
2.4.5 Modes de fragmentation	II-63
2.5. Le couplage LC-IonTrap MS	II-64
2.5.1 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)	II-64
2.5.2 Le piège à ions	II-65
2.5.2.1 Introduction	II-65
2.5.2.2 Fonctionnement en mode de fragmentation MS <sup>n</sup>	II-66
2.5.2.3 La trappe linéaire	II-67
2.5.3 La source HESI	II-69
<b>3. Conclusion</b>	<b>II-70</b>
<b>4. Littérature</b>	<b>II-71</b>

## 1. Introduction

Le premier chapitre a soulevé une problématique préoccupante concernant la préservation du vignoble face au mildiou. Toutes les variétés ne présentant pas la même résistance face à l'infection de *Plasmopara viticola*, il convient d'évaluer les raisons pour lesquelles certains géotypes parviennent à se défendre d'eux-mêmes face au mildiou. Les évaluations sensorielles (par exemple l'index OIV) ne fournissant qu'une donnée globale de la sensibilité, il est nécessaire d'aborder le problème sous un point de vue détaillé, notamment à l'échelle moléculaire. La spectrométrie de masse présentant d'excellentes capacités à identifier des molécules apparaît comme un outil de choix. Elle est devenue un outil incontournable pour des études métabolomiques<sup>1</sup>. Cet outil d'analyse sera employé pour explorer les phénomènes de défense ou de résistance de la vigne de manière ciblée (recherche de molécules choisies) ou non-ciblée (identification de molécules). En particulier, seront analysées des feuilles de vigne sélectionnées et cultivées à l'INRA de Colmar. Pour permettre l'analyse moléculaire de ce type d'échantillon par spectrométrie de masse, différents appareils ont été utilisés.

Ce chapitre sera dédié à la présentation des principes généraux de fonctionnement et des caractéristiques de ces différents instruments. Ainsi, seront décrites dans un premier temps les différentes sources d'ionisation auxquelles nous avons recouru, la désorption/ionisation laser et l'électronébulisation (ESI). Puis les instrumentations associées à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS) et à la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS) seront détaillées. Enfin, le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse, en l'occurrence avec une trappe ionique (LC-ITMS), sera abordé.

*Note : pour plus de convivialité, les acronymes présents dans ce manuscrit seront ceux employés en anglais.*

## 2. La spectrométrie de masse

### 2.1. Principes généraux

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse fine qui permet de détecter et d'identifier des composés par la mesure de leur masse. C'est pour cette raison que cette technique est également qualifiée de « balance moléculaire ». Après passage en phase gaz, la mesure en masse des composés préalablement ionisés se fait en fonction de leur rapport masse/charge,

couramment abrégé par « rapport  $m/z$  ». Généralement, une expérience en spectrométrie de masse nécessite trois étapes distinctes. La première est associée à la génération d'ions positifs ou négatifs en phase gazeuse à partir des composés issus d'un échantillon solide, liquide ou gazeux. La suivante concerne la séparation de ces ions en fonction de leur rapport  $m/z$  au sein de l'analyseur. Enfin, la dernière est assurée par le détecteur qui convertit le signal des ions en signal électrique. En général, plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. Dans le cadre d'une analyse structurale plus poussée, une étape supplémentaire dite de fragmentation est ajoutée au sein de l'analyseur.

## 2.2. Les sources d'ionisation

Toute expérience en spectrométrie de masse requiert la formation d'ions en phase gaz. De nombreuses sources sont disponibles mais elles ne sont pas toutes adaptées aux mêmes applications et aux mêmes spectromètres de masse. Il est donc crucial de bien choisir sa source d'ionisation en prenant en compte la nature de l'échantillon (organique ou inorganique), son état (liquide, solide ou gazeux) et la polarité des analytes. Seules les techniques utilisées pour nos études seront décrites dans ce présent chapitre, en l'occurrence l'électronébulisation (ESI) et la désorption/ionisation laser avec ou sans matrice (MALDI).

### 2.2.1 La désorption/ionisation laser

#### 2.2.1.1 L'interaction laser-matière

L'interaction d'un faisceau laser avec un échantillon solide non métallique engendre une suite de processus complexes. L'ablation et/ou la désorption sont à l'origine de la formation d'un nuage gazeux provenant de la matière éjectée de l'échantillon. Celle-ci est plus ou moins ionisée en fonction de la composition de l'échantillon et des conditions expérimentales. La répartition des espèces au sein de ce dernier dépend en effet étroitement des caractéristiques optiques (coefficient de réflexion  $R$ , coefficient d'absorption  $\alpha$ , ...) et thermiques (diffusivité thermique  $K$ , ...) de l'échantillon irradié et des caractéristiques du faisceau laser (longueur d'onde  $\lambda$ , durée d'impulsion  $\tau$  et la fluence  $F$ ).

La fluence laser, notée  $F$ , correspond à l'énergie par unité de surface générée par le faisceau laser. Elle se calcule grâce à la formule :

$$F = \frac{E}{S}$$

La fluence laser s'exprime généralement en  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou en  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$  avec  $E$ , l'énergie du faisceau laser exprimée en  $\text{J}$ , et  $S$ , la surface irradiée, en  $\text{cm}^2$  ou en  $\text{m}^2$ .

Pour définir l'énergie laser  $E$  déposée à la surface  $S$  de l'échantillon, on utilise également l'irradiance laser. Elle correspond à l'énergie laser déposée par unité de temps et de surface :

$$I = \frac{E}{\tau \times S}$$

L'irradiance laser s'exprime en  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  avec  $E$ , l'énergie du faisceau laser en  $\text{J}$  ;  $\tau$ , la durée de l'impulsion laser en  $\text{s}$  ( $1 \text{ W} = 1 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et  $S$ , la surface irradiée en  $\text{cm}^2$ .

Haglund a proposé une description qualitative des processus physicochimiques relatifs à l'interaction d'un faisceau laser avec un échantillon non métallique<sup>2</sup>. Il postule que le phénomène d'interaction laser-matière se décompose en quatre phases :

- (i) absorption de l'énergie laser par un processus simple ou multi-photonique (les propriétés d'absorption de l'échantillon étudié en phase solide sont par conséquent d'importance majeure) ;
- (ii) conversion de l'énergie incidente par des processus radiatifs et non-radiatifs de relaxation ;
- (iii) éjection d'espèces (atomes, molécules, neutres, ions, électrons, espèces excitées) de la surface irradiée ;
- (iv) la formation et l'expansion d'une plume plus ou moins dense de neutres et d'ions dont les mécanismes de formation peuvent être variés.

Ainsi, les molécules organiques amenées en phase gazeuse sont susceptibles de perdre un électron via des processus de photoionisation ou au contraire d'en capter, générant respectivement des espèces radicalaires positives ou négatives. De plus, si l'énergie absorbée est suffisante, la rupture d'une liaison dans le cas d'un proton labile peut être envisagée permettant ainsi à une espèce ayant un caractère basique de capter un proton et d'observer des ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Dans la mesure où l'énergie fournie par les photons du faisceau laser est suffisante, il est possible qu'un excès d'énergie interne au sein des ions moléculaires radicalaires ou protonés conduise à la fragmentation. On parle alors de photo-fragments. Ces mêmes espèces peuvent

également résulter de processus d'ionisation dissociative dans la mesure où des espèces neutres excitées sont susceptibles de conduire à des processus de dissociation hétérolytique de liaison.

Deux régimes d'interaction laser-matière doivent être considérés : la désorption (LD) et l'ablation laser (LA). Généralement, la LD conduit à l'émission d'ions, d'atomes et de molécules sans perturbation substantielle de la surface autour du point d'impact (sans dommages visibles). En revanche, la LA implique une perturbation à grande échelle de la topologie de la surface. Ainsi, Haglung différencie ces deux processus en considérant la désorption laser comme un processus à l'échelle microscopique et l'ablation comme un phénomène mésoscopique.

Selon l'énergie déposée sur l'échantillon, on se place dans des conditions :

- d'ablation à forte fluence ( $F > 2\,500\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ )
- de désorption à faible fluence ( $50 < F < 2\,500\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ )

Typiquement, il y a deux seuils d'énergie importants en désorption/ionisation laser : le seuil d'ionisation et le seuil de formation d'un micro-plasma. Ces deux seuils représentent respectivement le minimum et le maximum d'énergie nécessaire à l'obtention d'informations exploitables pour une analyse en spectrométrie de masse. Pour une fluence laser comprise entre 50 et  $2\,500\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ , le régime de désorption/ionisation prédomine.

Un faisceau laser est également caractérisé par sa distribution spatiale d'énergie. Il a été montré que l'existence de plusieurs points chauds dans le faisceau conduit à une augmentation du rendement de production d'ions. Ceci explique les meilleures performances des lasers  $\text{N}_2$  (337 nm) par rapport aux lasers Nd-YAG (355 nm), les lasers azote présentant naturellement des faisceaux peu homogènes. Les lasers de type Smartbeam (Nd-YAG 355 nm) développés par Bruker émettent un faisceau volontairement déstructuré de manière à générer de nombreux points chauds, contribuant à augmenter le nombre d'ions produits<sup>3</sup>. Il est aussi important de contrôler la stabilité du laser dans le temps afin d'éviter toute dérive de l'énergie, soit au cours d'une série d'analyses (en imagerie par exemple), soit entre différentes campagnes d'analyses. Le choix du laser ainsi que l'optimisation de ses paramètres seront discutés dans le **Chapitre IV** consacré à l'imagerie par spectrométrie de masse sur feuilles de vigne.

#### 2.2.1.2 Désorption/ionisation laser assistée par matrice

Cette technique a été développée par plusieurs groupes, notamment Karas et Hillenkamp<sup>4</sup> mais aussi Tanaka<sup>5</sup> dans les années 80. A la différence de la LDI, le processus MALDI (Matrix

Assisted Laser Desorption/Ionisation) implique l'utilisation d'une matrice. Généralement les matrices sont de petites molécules organiques, plus précisément des acides dans le cas d'études en mode positif. Après son mélange avec l'analyte, la matrice absorbe l'énergie apportée par le laser pour ensuite la retransmettre en partie aux molécules à analyser sous forme d'hydrogènes labiles. C'est pour cette raison que le MALDI est considéré comme une technique d'ionisation douce contrairement à la LDI. Toutefois, pour obtenir « un effet MALDI », la matrice doit être présente en large excès par rapport à l'analyte, de 100 à 10 000 plus concentrée. Ce phénomène ne mène à un processus d'ionisation que lorsque la gamme de fluence est comprise typiquement entre 30 et 600 J·m<sup>-2</sup>,<sup>6</sup>.

Le processus d'ionisation par MALDI reste de nos jours empirique. Toutefois, cette étude<sup>7</sup> réalisée par Knochenmuss a apporté des éléments de compréhension des processus mis en jeu qui se résument comme suivant (**Figure II-1**) :

- (i) le laser transmet une énergie photonique qui est absorbée par la matrice ;
  
- (ii) l'énergie apportée par les photons induit un processus de désorption correspondant à un changement de phase, c'est-à-dire le passage d'une phase condensée vers une phase gazeuse, entraînant une co-éjection de l'analyte intacte et de fragments de matrice.

Les molécules sont alors ionisées en phase gazeuse selon deux processus :

- ionisation primaire : correspondant à la formation de molécules de matrices excitées par absorption photonique ;
- ionisation secondaire donnant lieu principalement à un transfert de protons en phase gazeuse.

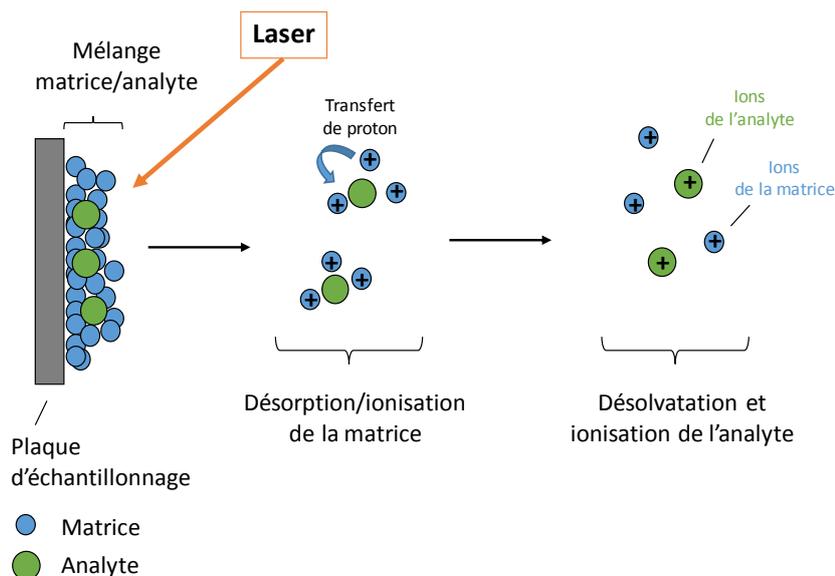


Figure II-1 : processus de la désorption/ionisation laser avec matrice (MALDI) et réactions ion-molécules mises en jeu lors de la phase d'expansion de la plume.

Ce transfert de proton est induit par les collisions entre la matière matrice photoexcitée et l'analyte, ou par les réactions de type acido-basique reposant sur le principe d'affinité protonique (AP) entre les molécules de matrice et l'analyte. Afin de favoriser thermodynamiquement la protonation des composés d'intérêt, il faut que la matrice ait une AP inférieure à celle de l'analyte en question. A l'issue de ce transfert de protons, des ions principalement monochargés du type  $[M+H]^+$  sont formés. Les protons des groupes acides carboxyliques ou phénoliques provenant de la matrice, du solvant ou de l'échantillon lui-même, ainsi que les protons non labiles de la matrice semblent être impliqués<sup>8</sup>. Typiquement, en mode positif, la matrice sera plutôt une molécule acide et en mode négatif, une molécule basique. Enfin, il est rare d'observer la formation d'ions multichargés en MALDI. Toutefois, d'autres mécanismes de productions d'ions sont décrits dans la littérature, tels que, des processus de reneutralisation et des mécanismes impliquant des agrégats<sup>9</sup>, ou encore des processus de transfert d'énergie induits par dismutation<sup>10</sup>. Ces différents mécanismes sont susceptibles de coexister lors une expérience MALDI.

Bien qu'il existe des protocoles prédéfinis pour une analyse MALDI-MS, l'optimisation de l'étape d'échantillonnage doit être réalisée, dans la mesure du possible, pour chaque produit à analyser. Les paramètres essentiels à optimiser sont le choix de la matrice, le milieu de solvation ainsi que le type de dépôt MALDI.

## iv Choix de la matrice

Le choix de la matrice est l'un des paramètres essentiels pour le bon déroulement d'une expérience en MALDI. En effet, il n'existe pas de matrice universellement efficace pour tout type de composé. Par conséquent, celle-ci doit répondre à certains critères afin d'être parfaitement adaptée aux types de molécules analysées. Même s'il n'est possible de satisfaire tous ces critères, la matrice doit idéalement :

- ✓ présenter un pic d'absorption dans le domaine d'émission du laser (le plus souvent à azote,  $\lambda=337$  nm ou Nd-YAG triplé,  $\lambda=355$  nm) ;
- ✓ être compatible avec le milieu de solvatation de l'analyte, afin de promouvoir une co-cristallisation homogène du dépôt et un meilleur transfert d'énergie ;
- ✓ éviter la formation d'agrégats entre molécules d'analyte en les entourant (prévenir la dégradation de l'ion moléculaire analyte lors de l'interaction laser-matière) ;
- ✓ absorber majoritairement l'énergie transmise par le laser par rapport à l'analyte, favorisant l'ionisation de l'échantillon par transfert de protons ;
- ✓ permettre l'ionisation de l'ensemble des analytes présents indépendamment de leurs tailles ;
- ✓ s'ioniser sur une même gamme de masse différente de celle de l'analyte pour éviter l'interférence entre les signaux de la matrice et de l'analyte.
- ✓ minimiser la formation d'adduits et/ou fragments de faible masse par le choix, soit de matrices conventionnelles de faible masse moléculaire, soit de nouvelles matrices organiques<sup>11</sup> et inorganiques<sup>12</sup>.

Les matrices les plus utilisées en MALDI (**Figure II-2**) notamment en mode positif, sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB)<sup>13</sup>, l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)<sup>14</sup> ou encore l'acide sinapinique (SA)<sup>15</sup> pour les composés de haut poids moléculaire tels les protéines. La 9-aminoacridine (9AA) est souvent citée dans la littérature pour les analyses en mode négatif<sup>16</sup>. Elle a été notamment utilisée pour l'imagerie MALDI sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*<sup>17,18</sup>. Le MALDI étant empirique, des références à d'autres matrices présentant des propriétés différentes peuvent être trouvées couramment dans la littérature<sup>19</sup>. Par exemple, la trihydroxyacétophénone (THAP) peut être utilisée en tant que matrice donneuse d'électrons. Dans ce cas on observera également des espèces radicalaires  $M^{\bullet}$ . Il existe également des matrices dites accepteurs d'électron telles que le 1,5 diamidonaphtalène (DAN). Cette dernière est, toutefois, employée le plus souvent dans le cadre d'analyses ISD (*In Source Decay*), notamment pour l'identification de protéines<sup>20</sup>. Enfin, il est possible d'ajouter de l'acide, souvent de l'acide trifluoroacétique (TFA),

en faible quantité (de 0,1 à 1 %). Celui-ci a pour effet d'améliorer le processus d'ionisation notamment si des sels sont présents dans le milieu d'analyse.

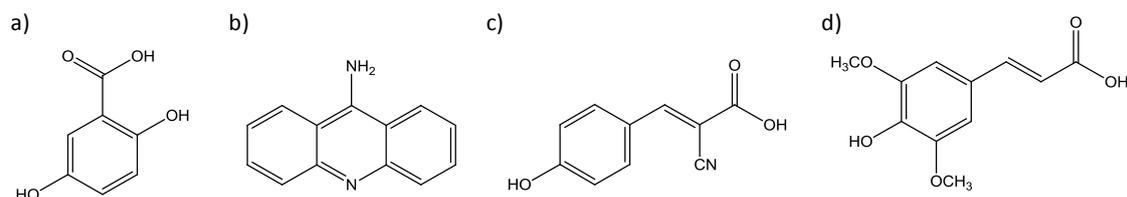


Figure II-2 : structures moléculaires de quelques matrices usuelles : (a) acide 2,5 dihydroxybenzoïque ; (b) 9-aminoacridine ; (c) acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique et (d) acide sinapique.

#### v Mode de dépôt de la matrice

Après le choix de la matrice, il faut considérer le mode de dépôt. Ce paramètre influence grandement sur la qualité de l'empreinte spectrale<sup>21,22</sup>, il est à adapter en fonction de l'analyte à étudier.

Il existe trois modes de dépôt de matrice : le dépôt en goutte séchée, le dépôt en couche mince et le dépôt en sandwich.

Pour un dépôt en goutte séchée, la matrice et l'analyte sont mélangés soit dans un tube (de type Eppendorf®), soit directement sur la plaque d'analyse. Ce type de dépôt est simple et rapide à réaliser mais le temps de conservation du dépôt est faible.

Le dépôt en couche mince se réalise en deux étapes. Dans un premier temps, l'échantillon ou la matrice est déposé(e) sur le porte-échantillon. Après séchage, on dépose par-dessus soit la matrice, soit l'échantillon (suivant la première couche déposée). Ce mode de dépôt est utilisé lorsque la matrice et l'échantillon ne sont pas miscibles dans les mêmes solvants. L'ordre de dépôt peut néanmoins avoir une influence sur le spectre de l'analyte. Il présente en outre une meilleure conservation et permet des analyses plus sensibles mais le nombre de tirs laser en un même endroit est plus limité.

Enfin, la méthode sandwich consiste à insérer l'analyte entre deux couches de matrices. Cette méthode est notamment adaptée aux faibles concentrations d'analytes. Habituellement, la première couche de matrice est préparée dans l'acétone. Elle permet, en outre, avec l'application d'une deuxième couche de matrice, d'obtenir une distribution plus régulière entre les cristaux de la matrice et l'analyte. Les effets combinés d'une redissolution et d'une recristallisation permettent une meilleure incorporation de l'analyte au sein de la matrice<sup>23</sup>. Ce mode de dépôt est également bien adapté pour les acides cinnamiques (CHCA, SA).

### 2.2.2 L'électronébulisation

L'électronébulisation est un phénomène connu depuis 1917<sup>24</sup>. Mais ce n'est qu'en 1984 que John B. Fenn a mis au point la source à électronébulisation proprement dite. Ses travaux ont permis un développement rapide de cette technique notamment pour l'analyse de biomolécules de haut poids moléculaire<sup>25</sup>.

Elle repose sur la nébulisation d'un échantillon liquide à pression atmosphérique et à température ambiante. La **Figure II-3** présente le schéma de principe de l'électrospray.

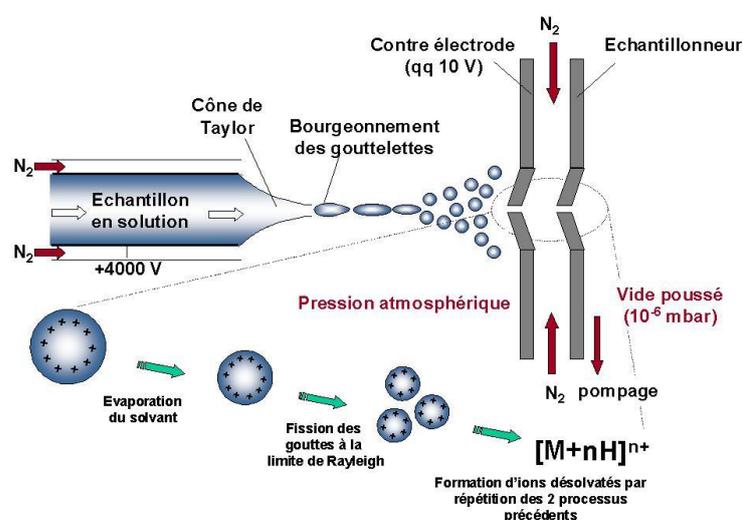


Figure II-3 : schéma de principe de la source électrospray (ESI)<sup>26</sup>.

L'échantillon est introduit dans la source par l'intermédiaire d'un dispositif pousse-seringue. Les débits d'introduction sont faibles, typiquement inférieur à  $10\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . On distingue trois étapes dans le processus d'ionisation par électronébulisation : la formation des gouttelettes électriquement chargées, l'explosion de ces gouttelettes en de plus petites, puis la formation des ions en phase gaz.

La formation des gouttelettes est obtenue par l'application d'un potentiel élevé aux électrodes du capillaire d'infusion. L'accélération des gouttelettes chargées vers l'entrée du spectromètre de masse est assurée par une différence de potentiel appliquée entre le cône d'extraction de la contre-électrode et le cône de l'électrode échantillonneuse (quelques dizaines de volts). Lorsque la solution quitte le capillaire, elle est polarisée par le champ électrique généré par la différence de potentiel entre le capillaire d'introduction et la contre-électrode (entrée du spectromètre de masse). Le diamètre du flux d'écoulement diminue et conduit à la formation d'un cône dit « cône de Taylor ». Lorsque le champ électrostatique est suffisamment intense, le cône s'étire et conduit

à la formation de gouttelettes chargées à leur surface positivement ou négativement selon la polarité des ions à analyser. Afin d'assister ce processus, un flux d'azote est appliqué parallèlement à l'axe du capillaire d'infusion. Les gouttelettes chargées traversent alors simultanément un gradient de potentiel et un gradient de pression dans la direction du spectromètre de masse. Le diamètre des gouttes peut être supérieur à l'échelle du micromètre. Celui-ci dépend du champ électrique, du débit de la solution, de la nature du solvant et de la température qui est appliquée dans la source d'ionisation électrospray<sup>27</sup>. Au cours de la progression de l'aérosol, l'évaporation du solvant provoque la diminution de la taille des gouttelettes. Lorsque le rapport charge/surface de la gouttelette devient trop élevé (limite de Raleigh), les répulsions électrostatiques deviennent supérieures aux forces de cohésion de la gouttelette. Elle éclate en gouttelettes plus petites. Par évaporation du solvant et explosions « coulombiennes » successives, le diamètre des gouttelettes diminue fortement. Deux modèles sont admis pour le phénomène de production d'ions désolvatés en phase gazeuse. Selon le modèle d'Iribarne<sup>28</sup>, lorsque la taille des gouttelettes est trop faible, la densité de charge à leur surface devient telle que le champ électrique local, très intense, conduit à la désorption des ions par effet de champ. Pour des composés de plus haut poids moléculaire (peptides et protéines), le modèle décrit par Dole est plus adapté<sup>29</sup>. Ce modèle, dit de charge résiduelle, suggère que les gouttelettes subissent des cycles successifs d'évaporation et de scission. Les gouttelettes résultantes contiennent alors en moyenne un ion. Les ions formés en phase gaz après l'évaporation du solvant restant, transmettent alors leur charge à l'analyte.

Une des caractéristiques remarquable de la technique d'électronébulisation consiste en la production d'ions multichargés de type  $[M+nH]^{n+}$  en mode d'ionisation positif ou  $[M-nH]^{n-}$  en mode d'ionisation négatif pour bon nombre de molécules. La présence d'adduits, différents selon la polarité, est également courante. On retrouve des adduits sodique et potassique en mode positif et des adduits chlorure, formiate et acétate en mode négatif.

Plusieurs paramètres doivent être bien réglés pour le bon déroulement d'une ionisation par électrospray. La différence de potentiel appliquée pour l'accélération des ions vers le spectromètre de masse constitue un paramètre important dans la stabilité des composés. Trop faible, la transmission des ions vers l'analyseur n'est pas bien assurée ; trop forte, elle peut provoquer une fragmentation des ions dite dissociation « in source » par collision des molécules avec les gaz de l'atmosphère de la source. Néanmoins on peut utiliser ce processus d'activation par collision pour obtenir des informations structurales sans avoir recours à la spectrométrie de masse en tandem. L'ionisation dépend également fortement de paramètres physico-chimiques

tels que le pH de la solution, la nature du solvant, le nombre de sites de protonation sur la molécule, de même que de la différence d'affinité protonique entre le soluté et le solvant. Les solvants doivent être volatiles : ceux qui fournissent les meilleurs rendements d'ionisation sont typiquement les solvants purs comme le méthanol ou l'acétonitrile ou encore des mélanges acétonitrile/eau ou méthanol/eau<sup>30</sup>. L'ajout d'un solvant dissociant tel que l'eau peut en effet favoriser l'ionisation. Il est également possible d'ajouter des sels en faible concentration tel que l'acétate d'ammonium pour augmenter le rapport signal sur bruit<sup>31</sup>. En revanche, lorsque la phase mobile contient des sels peu volatils ou du TFA par exemple, le rendement d'ionisation diminue fortement, on parle de suppression ionique. Enfin, la concentration du soluté est un autre paramètre important ; idéalement, elle doit être comprise entre  $10^{-5}$  et de  $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> afin d'éviter la pollution de la source.

L'ionisation par électronébulisation a été utilisée pour les analyses d'extraits de feuilles de vigne par FTICRMS mais également en couplage LC-MS. Pour le couplage, cette source est particulièrement adaptée puisque l'ionisation du liquide se fait en continue. En outre, cette source implique un processus d'ionisation doux et est adaptée, entre autres, aux composés phénoliques<sup>32</sup>, susceptibles de se trouver au sein des extraits de feuilles de vigne.

### 2.3. La spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS)

#### 2.3.1 Introduction

C'est en 1918 que Dempster introduit l'usage d'une différence de potentiel pour accélérer et ainsi discriminer en fonction de leur énergie cinétique les ions<sup>33</sup>. Sur ce principe, les premiers spectromètres de masse à temps de vol appelés velocitytrons ont été proposés à la fin des années 1940<sup>34,35</sup>. Ils ont connu, depuis la fin des années 1980, un essor considérable lié à des améliorations électroniques notables et à l'émergence de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). La spectrométrie de masse à temps de vol est actuellement l'une des techniques les plus utilisées en analyse de composés bio-organiques. Les développements actuels sont relatifs à la mise en place de systèmes hybrides pour faciliter les analyses structurales (notamment par rapport à la PSD « Post-Source Decay ») par une analyse de masse en tandem (MS/MS, instruments TOF/TOF) ou le couplage à des sources continues (Q-TOF).

Un spectromètre de masse MALDI-ToF Reflex IV commercialisé par la société Bruker Daltonics a été utilisé pour l'imagerie de feuilles de vigne par spectrométrie de masse (MSI). Cette application particulière sera détaillée dans le **Chapitre IV**.

### 2.3.2 Principe général de l'analyseur à temps de vol

Dans un vide poussé, les ions de masse  $m$  (exprimée en gramme) et de charge  $ze$  (Coulomb) accélérés par une différence de potentiel  $V$  (volt), acquièrent une énergie cinétique  $E_c$  (joules) :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

Leur vitesse est égale à :

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}}$$

Le temps nécessaire au parcours d'une distance  $L$  (en mètre) est donné par :

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}} = K\sqrt{\frac{m}{z}} \text{ avec } K = L\sqrt{\frac{1}{2eV}}$$

Donc, pour une distance  $L$  donnée, les ions de masses différentes seront séparés en fonction de leurs temps de parcours. La détection des ions peut être réalisée en mode linéaire ou en mode réflectron. Dans la configuration linéaire, les ions après un parcours de 1,8 m (pour notre instrument) frappent un détecteur à galettes micro-canaux (MCP). Un signal est alors produit, amplifié puis digitalisé. Bien adapté à l'analyse de composés de haut poids moléculaire, ce mode conduit à une très bonne sensibilité mais à une résolution en masse limitée. Afin d'augmenter cette dernière, une méthode alternative est employée, il s'agit du mode réflectron. Dans ce cas, les ions pénètrent dans un amortisseur électrostatique où ils perdent progressivement leur énergie cinétique avant d'être accélérés de nouveau dans le second tube à temps de vol puis détectés par un second jeu de galettes micro-canaux (**Figure II-4**). Ce dispositif assure la refocalisation en énergie cinétique des ions de même rapport  $m/z$ . La dispersion en énergie cinétique est en fait le principal responsable de la diminution de la résolution en masse définie par :

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

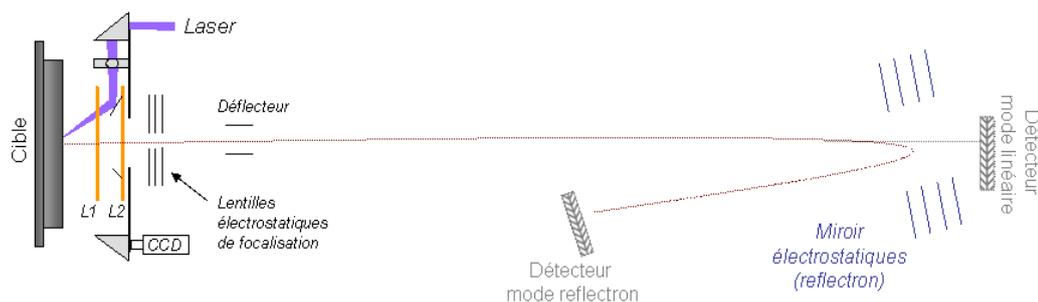


Figure II-4 : schéma de principe du spectromètre de masse à temps de vol Reflex IV, Bruker Daltonics.

L'extraction retardée (Delayed Extraction DE ou Pulse Ion Extraction PIE dans le cas de notre appareil) est un autre dispositif permettant d'accroître la résolution<sup>36</sup>. Cette technique permet de compenser le retard initial des ions de même rapport  $m/z$  produit par désorption/ionisation laser, afin que tous ces ions de même  $m/z$  arrivent en même temps sur le détecteur. Pour ce faire, un délai est introduit entre l'ionisation et l'extraction des ions.

Lors de l'impact laser, des ions formés de même  $m/z$  ont des vitesses initiales variables. Pendant un temps très court de quelques nanosecondes, ces ions évoluent vers la première lentille L1 qui est au même potentiel que la cible (**Figure II-4**). Au bout d'un temps  $\tau$  le potentiel de cette lentille L1 est diminué et les ions sont alors accélérés. L'ion le plus lent sera alors soumis à un champ électrique plus intense que les ions plus rapides et rattrapera ainsi son retard qu'il aurait eu sans l'extraction retardée. Des distributions plus étroites de temps d'arrivée des ions de même  $m/z$  au détecteur sont ainsi obtenues, ce qui se traduit par une meilleure résolution que celle obtenue sans extraction retardée. Selon la masse des ions à analyser, différentes valeurs de délais d'extraction peuvent être appliquées. Deux paramètres sont à optimiser : le délai  $\tau$  et la tension d'extraction intermédiaire de la lentille L1.

L'arrivée d'instruments équipés d'un réflectron et de l'extraction retardée permettant d'obtenir une meilleure résolution spectrale, a contribué à relancer fortement le développement et l'utilisation des instruments de type TOF.

### 2.3.3 Instrumentation

Pour des expériences MALDI, la nature de l'échantillon (solide ou liquide) conditionne son échantillonnage. Dans le cas d'échantillons liquides, l'échantillon est déposé avec la matrice en mélange intime pour cristalliser sous forme de dépôt. Par exemple, pour un solide (coupe de tissus de végétaux ou d'animaux), l'échantillon est fixé à l'aide d'un adhésif en aluminium sur le porte-échantillon.

Les ions sont générés par ablation laser. Deux lasers sont disponibles sur cet appareil, un laser azote de longueur d'onde  $\lambda = 337$  nm et un laser Nd-YAG quadruplé en fréquence de longueur d'onde  $\lambda = 266$  nm. Lors de cette étude, les analyses LDI ont été menées en majorité avec le laser à 266 nm.

Le laboratoire est également doté d'un instrument MALDI-TOF Ultraflex III (Brucker Daltonics) équipé d'un laser « Smartbeam » Nd-YAG triplé en fréquence de longueur d'onde  $\lambda = 355$  nm. Les avantages des lasers Nd-YAG par rapport aux lasers N<sub>2</sub> se situent notamment au niveau de la cadence de tir, 1 000 Hz contre 50 Hz mais aussi de la durée de vie, 10<sup>9</sup> tirs contre 2.10<sup>7</sup> à 6.10<sup>7</sup> tirs<sup>3</sup>.

Ce spectromètre de type TOF-TOF donne, en outre, la possibilité d'effectuer des études structurales, par le biais d'une cellule « LIFT ». Ce mode de fragmentation d'ions métastables est basé sur l'augmentation de l'énergie cinétique entre l'ion précurseur et le plus petit ion fragment jusqu'à un niveau de différence d'énergie n'excédant pas 30 %. Dans ce cas, tous les ions fragments peuvent être détectés simultanément avec l'ion précurseur. L'ion précurseur d'intérêt et ses fragments associés sont alors sélectionnés dans la zone PCIS (precursor ion selector, **Figure II-5**) utilisée comme filtre de masse. Les ions arrivent alors dans la cellule LIFT placée juste derrière la zone PCIS, dans laquelle ils se séparent suite à une phase d'accélération. Une seconde unité de déviation (PLMS : post lift metastable suppressor) située entre le LIFT et le réflecteur permet d'éliminer les ions parents dont le signal très intense nuirait au rapport S/N des fragments. Le LIFT permet ainsi de réaliser un spectre MS/MS en une seule fenêtre d'acquisition contrairement au PSD (Post-Source Decay) où plusieurs fenêtres sont nécessaires pour reconstruire le spectre final en diminuant progressivement la tension du réflecteur.

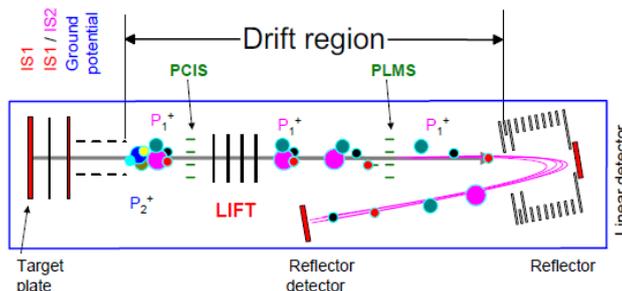


Figure II-5 : schéma de principe de l'Ultraflex III<sup>37</sup>.

Cette appareil a été utilisé pour l'analyse de standards ou d'extraits en MALDI mais n'a pas pu être utilisé pour l'imagerie. Cet aspect sera abordé dans le **Chapitre IV**. Pour les deux spectromètres à temps de vol, la détection des ions est réalisée en mode réflectron.

## 2.4. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS)

### 2.4.1 Introduction

La spectrométrie de masse par résonance cyclotronique à transformée de Fourier (FTICRMS) assure la mesure précise de la fréquence de giration des ions dans un champ magnétique intense produit par un aimant solénoïde supraconducteur. Elle combine l'analyse simultanée en mode haute résolution FWHM (*full width at half maximum*) de 100 000 à plus d'un million et haute précision (justesse) sur la mesure du rapport  $m/z$ . Cette précision en masse permet d'obtenir des différences entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques, exprimées en partie par million (ppm), typiquement inférieures à 1 ppm. L'association de cette technique à une grande variété de techniques d'ionisation en fait un outil puissant et sans égal dans le domaine de la spectrométrie de masse<sup>38-40</sup>.

Lors de ces travaux de thèse, cette technique a été utilisée pour l'étude des profils métaboliques des extraits de feuilles de vigne en infusion directe. Ceci fera l'objet du **Chapitre III**.

### 2.4.2 Origine et principe de la FTICRMS

C'est en 1929, aux Etats-Unis, que Lawrence (prix Nobel en 1939) découvre le principe du cyclotron<sup>41</sup>. En 1949, l'équipe de Hipple détermine la fréquence de résonance cyclotronique du proton à l'aide d'un instrument appelé Omégatron<sup>42</sup>. Ces deux travaux sont à la base de la technique de spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions (ICRMS). C'est en 1974 que Comisarow et Marshall<sup>43</sup> associent le traitement par transformée de Fourier rapide (FFT) à l'analyse des ions par ICRMS. Le premier instrument doté d'un aimant supraconducteur est commercialisé en 1983. Jusqu'alors des électroaimants de 1 à 1,6 Teslas étaient employés. Actuellement, la force du champ magnétique des appareils commerciaux est comprise entre 7 et 15 T. Un instrument doté d'un aimant de 21 T est actuellement en cours de développement au laboratoire des hauts champs magnétiques à Tallahassee en Floride sous la direction d'Alan Marshall.

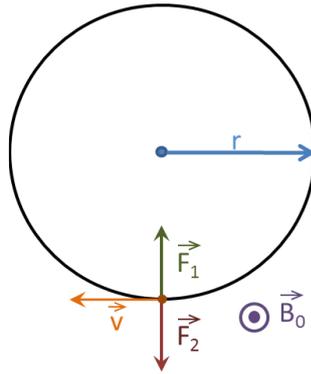


Figure II-6 : principe du mouvement cyclotronique.  $\vec{F}_1$  représente la force de Lorentz et  $\vec{F}_2$  la force centrifuge.

L'étude du mouvement cyclotronique est à l'origine de la mesure du rapport  $m/z$  d'un ion par la technique FTICRMS. Un ion de masse  $m$  et de charge  $q$  possédant une vitesse  $v$ , adopte une trajectoire circulaire uniforme de rayon  $r$  lorsqu'il est plongé dans un champ magnétique  $B_0$ . Ceci résulte de l'action de la force de Lorentz  $\vec{F}_1$  et de la force centrifuge  $\vec{F}_2$ . Ces deux forces de sens opposé agissent simultanément. Elles conduisent à l'établissement d'un mouvement stable si leur module est égal (Figure II-6).

Expression de la force de Lorentz :

$$\vec{F}_1 = q \times \vec{v} \wedge \vec{B}_0 = qvB_0\vec{k}$$

Expression de la force centrifuge :

$$\vec{F}_2 = -\frac{mv^2}{r}\vec{k}$$

$$|\vec{F}_1| = |\vec{F}_2|$$

$$qvB_0 = \frac{mv^2}{r}$$

$$\frac{qB_0}{m} = \frac{v}{r} = \omega_c$$

Avec  $q = ze$

$$\omega_c = \frac{eB_0}{m/z}$$

$$v_c = \frac{\omega_c}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \times \frac{eB_0}{m/z}$$

$\nu_c$  est appelée fréquence cyclotronique, elle est exprimée en Hertz. La fréquence cyclotronique dépend du champ magnétique  $B_0$  appliqué. Elle est inversement proportionnelle au rapport  $m/z$  et indépendante de la vitesse initiale des ions présents dans la cellule d'analyse. La mesure de la fréquence cyclotronique d'un ion plongé dans un champ magnétique permet ainsi d'obtenir son rapport masse sur charge. La précision de la mesure du rapport  $m/z$  va dépendre de la qualité de la mesure de la fréquence cyclotronique. Il est alors nécessaire que le champ magnétique soit intense ( $> 4,7$  Teslas) mais aussi très homogène, d'où l'utilisation d'aimants solénoïdes supraconducteurs.

### 2.4.3 Instrumentation

Bien que les premiers spectromètres de masse de type FTICR utilisaient des sources internes d'ionisation, ceux actuellement commercialisés bénéficient de sources externes. Ceci limite notamment les contraintes de pompage, principalement lors de l'introduction de l'échantillon. Dans ce cas, la pression au sein de la cellule de mesure FTICR est bien plus basse que celle des dispositifs à source interne ( $\sim 10^{-10}$  mbar). Cela permet un temps de vie plus long des ions lors de l'acquisition de leur signal et des conditions plus favorables pour atteindre des résolutions FWHM proches de 1 000 000.

Les études décrites dans la suite de ce manuscrit ont été conduites à l'aide d'un spectromètre de masse FTICR doté d'un champ magnétique de 9,4 Teslas. Ce spectromètre de masse de modèle « Explorer QFT-9 » a été conçu par la société Ion Spec (IonSpec, Varian Corporation, Palo Alto, Ca, USA). Il est équipé de deux modules constitués chacun d'une cellule FTICR cylindrique et d'un système de transfert et de stockage d'ions et d'une source d'ionisation externe. Le premier module installé sur ce spectromètre de masse correspond à une source d'ionisation externe par électro-nébulisation de type « Z-Spray<sup>TM</sup> » développée par Micromass/Waters. La deuxième source d'ionisation appelée « ProMALDI » (IonSpec, California, Lake Forest, USA) est une source MALDI équipée d'un laser Nd-YAG Orion (New wave research, Fremont, USA), triplé en fréquence, délivrant une énergie maximale de 8 mJ/impulsion à la longueur d'onde de 355 nm. La **Figure II-7** présente le spectromètre de masse FTICR, avec l'aimant supraconducteur au centre et les deux modules d'ionisation : à droite celui pour l'électrospray et à gauche le module « ProMALDI ».

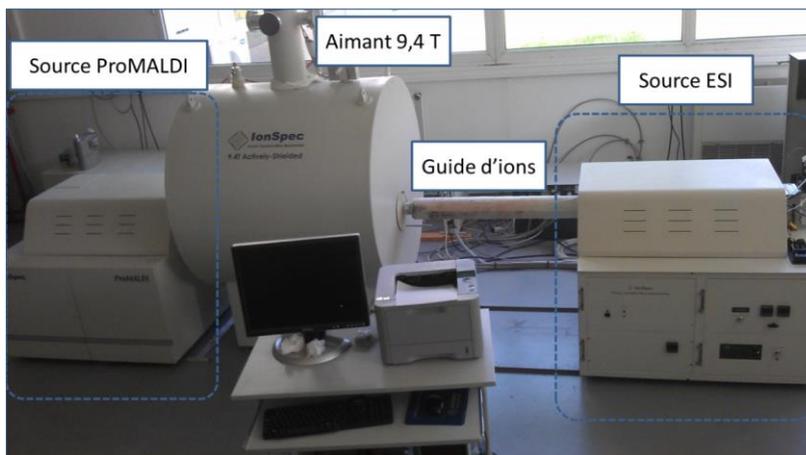


Figure II-7 : photographie du spectromètre de masse FTICR Explorer QFT-9 (Varian). A droite, le module ESI est en position de retrait, et à gauche, le module ProMALDI est en position engagée dans la cellule<sup>44</sup>.

#### 2.4.4 Déroulement d'une analyse FTICRMS

Une description de l'instrument utilisé avec sa source d'ionisation externe à électronébulisation est présentée en **Figure II-8**. Trois étapes successives sont nécessaires pour l'obtention d'un spectre de masse : 1) la production des ions dans la source, soit par électronébulisation soit par désorption/ionisation laser suivie de leur stockage dans un hexapôle ; 2) le transfert des ions de la source vers la cellule FTICR ; 3) leur détection et analyse.

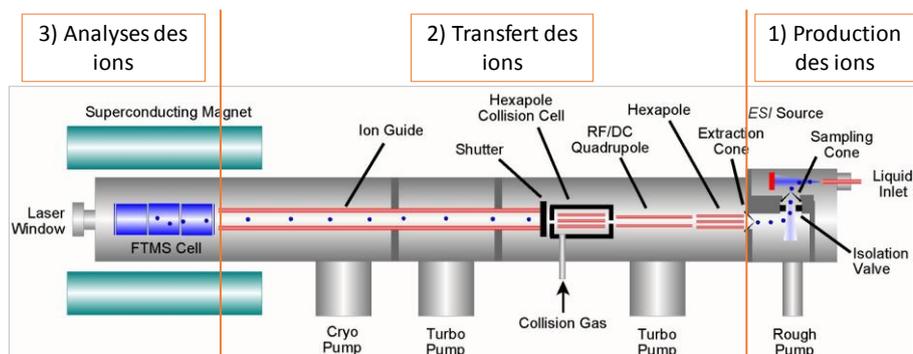


Figure II-8 : schéma du spectromètre en mode ESI-FTICRMS détaillant les différents éléments instrumentaux qui le composent.

L'enchaînement de ces différents événements est piloté par le logiciel Oméga. Une interface graphique permet de suivre et de modifier les paramètres instrumentaux de façon chronologique (**Figure II-9**). On distingue 5 étapes successives qui s'organisent suivant un axe temporel (notées de A à E).

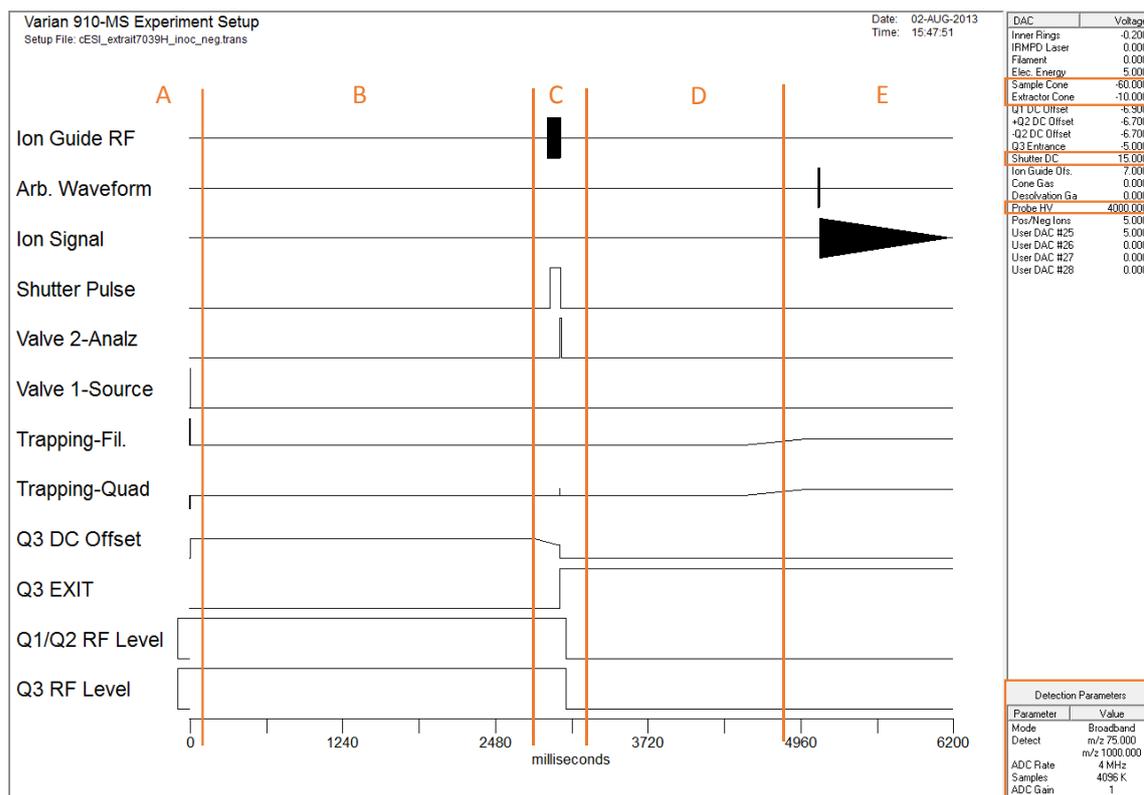


Figure II-9 : schéma synoptique d'analyse FTICRMS en utilisant le module d'électronébulisation.

Au début de chaque séquence d'analyse, les potentiels des différentes plaques de piégeage de la cellule d'analyse sont portés à une tension de signe opposé à celui de la charge des ions à analyser. Ceci a pour effet d'éliminer tous les ions résiduels associés à une expérience précédente ; c'est l'étape **A**.

➤ Production des ions

C'est l'étape **B**, durant laquelle les ions générés à partir de l'analyte dans la source Electrospray sont transférés par l'intermédiaire des multipôles Q1 et Q2 puis ensuite stockés dans l'hexapôle Q3 dit de stockage en vue d'être injectés plus tard dans la cellule d'analyse. Cet hexapôle fonctionne uniquement en mode radiofréquence (RF-only). Tous les ions possédant un domaine de stabilité compatible avec les paramètres instrumentaux appliqués ou associés à cet hexapôle (amplitude et fréquence de la RF, distance entre les barreaux) adoptent une trajectoire stable. Ils sont maintenus à l'intérieur de l'hexapôle par l'application de potentiels continus identiques et adéquats (fonction de la polarité des ions piégés) sur les plaques d'entrée et de sortie. Il faut, en outre, prendre soin d'ajuster le temps d'accumulation des espèces dans l'hexapôle de manière à générer des ions en quantité suffisante sans pour autant saturer la cellule. Ceci peut effectivement nuire à la résolution et à la précision sur la mesure en masse ou induire également des

fragmentations « in source » pouvant biaiser l'identification des analytes (réduction de l'intensité des ions moléculaires). Il convient aussi à ce niveau d'homogénéiser les tensions de l'hexapôle de stockage et du guide d'ion pour favoriser la stabilité et la conduction de la gamme de masse souhaitée vers la cellule ICR.

➤ Transfert des ions

Les ions piégés dans l'hexapôle de stockage sont acheminés vers la cellule d'analyse à l'aide d'un guide d'ion (étape C). De type hexapolaire, il fonctionne de manière identique à l'hexapôle de stockage. L'ajustement de l'amplitude et de la fréquence de la radiofréquence permet de sélectionner la gamme de rapport  $m/z$  pour laquelle le transfert des ions se fait de façon optimale. Le transfert des ions débute par l'abaissement du potentiel continu à la sortie de l'hexapôle de stockage (Q3 EXIT) et l'ouverture de la séparation physique (SHUTTER DC) entre la partie source ( $\sim 10^{-4}$  Torr) et la partie très basse pression de l'instrument ( $\sim 10^{-10}$  Torr) associée à la cellule FTICR. Sous l'effet de la différence de potentiel entre les deux extrémités de l'hexapôle de stockage, les ions sont accélérés dans l'optique de transfert électrostatique. Le potentiel de la plaque de piégeage de la cellule FTICR du côté "guide d'ion" est mis à la terre pendant une durée variable pour permettre l'introduction des ions dans la cellule. Un pulse d'azote peut être alors introduit à ce niveau pour thermaliser les ions au sein de la cellule FTICR.

➤ La détection des ions au sein de la cellule (Etape E)

Le mouvement cyclotronique des ions, induit par l'interaction de ces derniers avec le champ magnétique, prend place au sein de la cellule FTICR (piège de Penning, **Figure II-10**). La pression dans cette partie de l'instrument est de l'ordre de  $10^{-10}$  Torr. A ces pressions, le libre parcours moyen d'un ion est important (plusieurs centaines de mètres) ce qui accroît leur durée de vie. Un piège de Penning peut adopter plusieurs géométries (cubique, parallélépipédique, cylindrique). Dans notre cas, la cellule ICR est de forme cylindrique (**Figure II-10**). Il est systématiquement constitué par trois jeux (au moins) de deux plaques appariées. Ces trois paires de plaques permettent la succession des trois étapes nécessaires à la production d'un spectre de masse FTICR : le piégeage, l'excitation et la détection des ions.

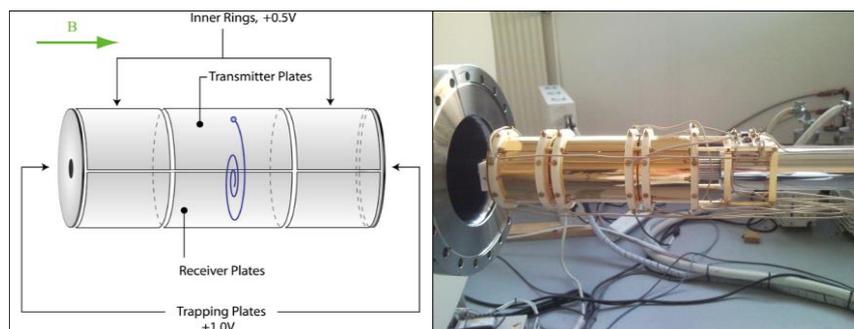


Figure II-10 : schéma et photographie de la cellule ICR de forme cylindrique du spectromètre de masse Explorer QFT-9.

- Le piégeage :

Le champ magnétique  $B_0$  assure le confinement des ions dans le plan perpendiculaire au champ magnétique. Pour les piéger dans la dernière direction, un puits de potentiel est créé par application d'un potentiel sur une première paire de plaques dites de piégeage.

Le signe du potentiel appliqué sur les plaques de piégeage est adapté à la polarité des ions analysés. Il doit être le plus faible possible pour limiter les oscillations de piégeage afin de limiter la perturbation du mouvement cyclotronique. A cette fin, l'instrument employé dans cette étude assure la création de deux puits de potentiel emboîtés. Le premier permet un piégeage efficace des ions à des potentiels de l'ordre  $\pm 30$  V. Après thermalisation des ions, ce potentiel est abaissé typiquement à  $\pm 1,5$  V. Les espèces ioniques sont alors piégées par un second jeu de plaques de piégeage portées à un potentiel de  $\pm 0,20$  V.

L'emploi d'une source externe d'ions et l'utilisation d'une ligne de transfert impose que le puits de potentiel s'ouvre pour laisser entrer les ions au cœur de la cellule FTICR. Cette étape est critique. Elle peut conduire à des discriminations au sein de la population d'ions.

- L'excitation :

Après leur introduction au sein de la cellule, les ions se trouvent sur une orbite basse. Leur rayon de giration est de l'ordre de quelques dixièmes de millimètres. Leur mouvement, de type brownien, n'est pas cohérent. L'application sur la seconde paire (plaques d'excitation) d'une radiofréquence (début de l'étape E) permet, par un phénomène de résonance, un transfert d'énergie aux différentes populations d'ions présentes dans la cellule. Le rayon de la trajectoire augmente jusqu'à être porté au voisinage des plaques de détection. Cette étape a également pour effet d'augmenter la cohérence des ions possédant un même rapport  $m/z$ . Le rayon de l'orbite ne dépend que de la tension d'excitation et de la durée d'excitation. Il faut alors contrôler deux paramètres importants pour l'acquisition du spectre de masse : l'intensité d'excitation et la durée

d'irradiation (quelques ms). En général, un temps d'acquisition long conduit à une meilleure résolution. Dans notre cas, le temps d'acquisition a été porté à 525 ms soit 2048 K points enregistrés. Avec ces paramètres, la résolution moyenne est de l'ordre de 200 000 ( $\Delta m/m$ ) avec une précision de mesure en masse de l'ordre du ppm.

- La détection et l'obtention d'un spectre de masse :

Les ions proches du troisième jeu de plaques induisent par leur mouvement circulaire un courant alternatif (**Figure II-11**) détecté par une électronique adaptée. La superposition des signaux associés à des ions de rapport  $m/z$  différents permet d'obtenir un signal composite appelé interférogramme (transient en anglais) où les sinusoïdes amorties de l'ensemble des ions présents dans la cellule se superposent et se combinent.

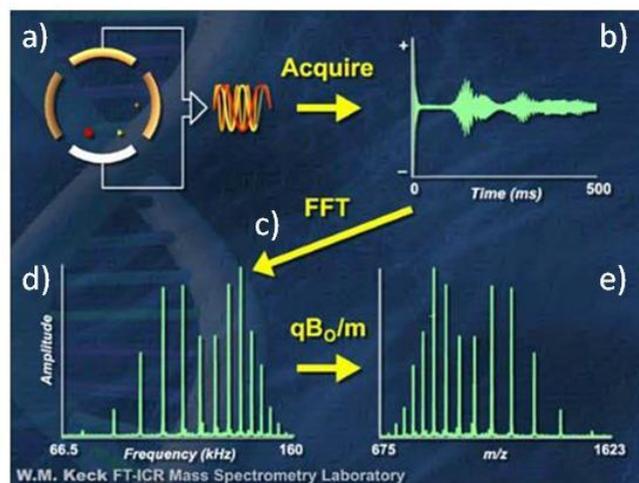


Figure II-11 : les différentes étapes d'acquisition d'un spectre de masse :

a) induction d'un courant - b) interférogramme - c) transformée de Fourier - d) spectre en fréquence - e) spectre de masse.

Pour extraire de ce signal complexe toutes les fréquences fondamentales qui le composent, une opération de transformée de Fourier est utilisée (FFT, Fast Fourier Transform). On obtient alors un spectre en fréquence (représentation de l'intensité du signal mesuré aux différentes fréquences). Avant le traitement par FFT, le signal détecté subit une opération d'apodisation par la fonction Blackman-Harris et un remplissage de zéro pour augmenter le nombre de points. Ces opérations améliorent la qualité du spectre obtenu. Par ailleurs, l'accumulation de plusieurs interférogrammes pour constituer un spectre de masse augmente le rapport S/N proportionnellement à la racine carrée du nombre de transient considéré.

#### 2.4.5 Modes de fragmentation

Une expérience de spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS ou MS<sup>n</sup> débute par la sélection de l'ion parent. Dans notre cas, elle est effectuée à l'aide d'une expérience SWIFT (Stored-Waveform Inverse Fourier Transform). Une radiofréquence est appliquée sur les plaques d'excitation afin que le rayon du mouvement cyclotronique des ions soit porté au-delà des limites physiques de la cellule FTICR. Il s'agit d'un signal composite associant les fréquences séculaires de tous les ions dans une gamme de rapports  $m/z$  donnée à l'exception de celui de l'ion parent.

Le spectromètre FTICR de notre laboratoire permet de réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem selon trois modes de fragmentation : l'IRMPD (InfraRed MultiPhoton Dissociation), l'ECD (Electron Capture Dissociation) et le SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation / Collision Induced Dissociation). Lors de nos travaux, les expériences de fragmentation ont été intégralement réalisées à l'aide du mode SORI-CID.

Une expérience SORI-CID combine l'introduction d'un gaz de collision (ici de l'azote) et l'application d'une radiofréquence afin d'augmenter l'énergie cinétique de l'ion parent. Cette radiofréquence est appliquée à une fréquence très proche de la fréquence de l'ion parent (off-resonance)<sup>45</sup>. Par défaut, la fréquence l'offset est de 1,5 % par rapport à la fréquence de l'ion. Dans ces conditions, son énergie cinétique et donc le rayon de sa trajectoire croît et décroît de façon séquentielle pendant la période de temps associée à l'application de cette RF. Par collision, une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne ce qui a pour effet d'induire la fragmentation. Pour un ion protoné la relation suivante s'appliquera :



L'amplitude base à pic de la RF et la durée de l'irradiation sont des paramètres critiques dans l'obtention du spectre de fragmentation tout comme la quantité de gaz de collision introduite. Dans cette étude, plusieurs paramètres SORI-CID ont été utilisés. Pour l'étude comparative de la fragmentation de différents ions, présentée dans le **Chapitre III**, chaque ion est excité par la radiofréquence pendant une durée de 150 ms et une bouffée de gaz de collision, stockée à 80 mbar, est envoyée par un système de vanne de fuite pendant 10 ms, les deux évènements étant conjoints. Pour les autres expériences de fragmentation présentées dans cette étude, les paramètres sont choisis individuellement pour obtenir le meilleur rendement de fragmentation possible.

La détermination de l'énergie au centre de masse par cycle ( $E_{COM}$ ) permet d'évaluer la stabilité relative des ions parents étudiés à l'aide de la formule suivante :

$$E_{COM} = \frac{q^2 \cdot V_{b-p}^2}{4 \cdot m \cdot \Delta\omega^2} \cdot \frac{M}{M + m}$$

où,  $q$  et  $m$  sont la charge et la masse de l'ion,  $V_{b-p}$  et  $\Delta\omega$  l'amplitude base à pic de la radiofréquence et le décalage en fréquence par rapport à la fréquence cyclotronique de l'ion (*offset*).  $M$  est la masse du gaz de collision, ici du  $N_2$ .

Par exemple, pour la fragmentation de l'ion  $m/z$  815 en SORI-CID avec une amplitude base à pic définie à 12 V et un offset de 2 633 Hz, l'énergie calculée au centre de masse sera égale à **0,59 eV**.

## 2.5. Le couplage LC-IonTrap MS

Le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse est devenu courant dans le domaine de la chimie analytique. C'est l'une des techniques les plus adaptées pour l'analyse d'extraits de plantes de par sa robustesse et la possibilité d'analyse sur une large gamme de masse et de polarité moléculaire. C'est grâce à la chromatographie que la résolution des composés isomères (voire isobare pour la spectrométrie de masse basse résolution) peuvent être mis en évidence au sein des mélanges, la spectrométrie de masse (à l'exception des spectromètres à mobilité ionique) étant incapable d'en faire la distinction. De plus, le nombre de métabolites détectables est également plus important par rapport à l'infusion directe avec la réduction de l'effet de suppression ionique engendré par la matrice.

Cependant, le développement d'une méthode chromatographique peut s'avérer long. De plus, les analyses avec gradient d'élution durent bien plus longtemps qu'une analyse en infusion directe. Les deux techniques présentent des avantages et des inconvénients mais peuvent fournir des jeux de données complémentaires pour un même échantillon. Ce point sera discuté lors du **Chapitre III**.

### 2.5.1 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les expériences chromatographiques ont été menées sur une chaîne de type HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex, France) pilotée par le logiciel Chromeleon™ 6.80. Cette chaîne se compose d'une pompe LPG-3400M quaternaire munie d'un dégazeur en ligne et d'un injecteur automatique. La colonne utilisée est une Symmetry Shield (Waters) phase inverse C18 (4,6 x 50 mm) de 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre interne. Le volume de la boucle d'injection est de 20  $\mu\text{L}$  et le débit de phase mobile est de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Dans le cas du dosage des stilbènes, une élution isochratique a été employée. Pour le screening des extraits de feuilles de vigne, un gradient d'élution a été développé et sera détaillé dans la partie correspondante. En effet, les molécules potentiellement

présentes possèdent des polarités très différentes et requièrent donc la mise en place d'un gradient d'élution.

L'HPLC est une méthode puissante de séparation mais elle nécessite l'utilisation de standards pour l'identification de composés. Les détecteurs UV ou DAD ne permettent pas d'obtenir des informations structurales. Dès lors, la spectrométrie de masse utilisée en tant que détecteur s'avère être un atout de poids, d'autant plus si l'analyseur permet la réalisation d'expériences de fragmentations.

### 2.5.2 Le piège à ions

Lors de ces travaux, le couplage chromatographie haute performance avec un analyseur basse résolution, le piège à ions ou trappe ionique, a été employé (LC-ITMS). Le principe général de cet analyseur est brièvement décrit dans les paragraphes suivants.

#### 2.5.2.1 Introduction

C'est en 1953 que Paul W. et Steinwedel H. ont décrit l'analyseur de type trappe ionique pour la première fois. Mais c'est véritablement à la fin des années 80 que son potentiel apparaît à travers le développement de la source à électrospray et les avancées technologiques concernant la détection, le stockage et l'éjection sélectifs des ions.

La trappe ionique ou piège ionique est constituée de deux électrodes de forme quasi hyperbolique dites électrodes chapeaux et d'une électrode annulaire soumises à différents potentiels en fonction de l'étape d'analyse (**Figure II-12**). Les ions entrent et sortent de la trappe par des orifices situés dans les électrodes chapeaux. Une analyse par trappe ionique implique plusieurs étapes distinctes. On distingue notamment le piégeage et l'éjection des ions. Pour une analyse en MS/MS, deux étapes s'ajoutent aux deux précédentes citées, l'isolement et la fragmentation de l'ion.

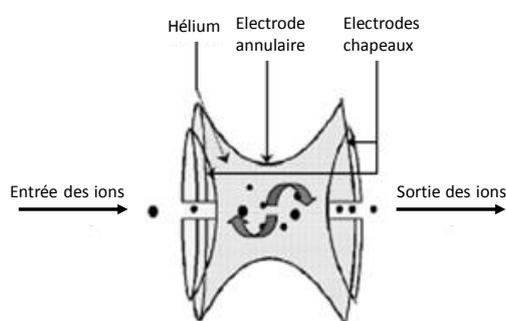


Figure II-12 : schéma du piège à ions.

Contrairement à d'autres types d'analyseurs, les ions restent confinés à l'intérieur de la trappe. Les ions sont injectés et extraits du piège à ions par les orifices situés sur les électrodes chapeaux. L'application sur les deux types d'électrodes d'une combinaison de potentiels alternatifs (radiofréquence) et continus conduit à créer un champ quadripolaire au sein du piège. Afin d'améliorer la qualité du piégeage, de l'hélium est introduit dans la trappe à une pression constante (environ  $10^{-6}$  bar). Ceci permet de thermaliser et de contraindre les ions à rester proches du centre du piège. Les ions piégés décrivent des trajectoires correspondantes au champ quadripolaire, appelées courbes de Lissajous, liées aux variations de polarité alternative de l'électrode annulaire.

L'éjection a lieu après le piégeage des ions dans la trappe et peut se faire de deux façons. **Une éjection simple** se fait par balayage croissant de la radiofréquence appliquée à l'électrode annulaire, afin de déstabiliser la trajectoire des ions en fonction de leur rapport  $m/z$  croissant. La moitié des ions sont donc éjectés vers l'électrode d'entrée et ne seront donc pas détectés, tandis que l'autre moitié sera dirigée vers l'électrode de sortie en direction du détecteur. Cependant, les faibles valeurs de tensions applicables limitent cette technique qui ne permet pas d'éjecter des ions de hautes masses ( $m/z > 650$ ). **L'éjection résonante** est utilisée pour obtenir une gamme d'ions plus importante. L'éjection des ions est réalisée dans ce cas en appliquant une tension alternative aux électrodes chapeaux de sortie, ainsi qu'une radiofréquence à l'électrode annulaire. Puisque chaque ion de rapport  $m/z$  possède une fréquence qui lui est propre, en appliquant aux électrodes chapeaux un potentiel à une fréquence correspondante à la fréquence de résonance d'un ion, celui-ci voit son énergie cinétique augmenter. De ce fait, une éjection successive de chaque ion de rapport  $m/z$  peut être obtenue en augmentant de manière progressive les tensions appliquées sur les électrodes chapeaux et sur l'électrode annulaire.

#### 2.5.2.2 Fonctionnement en mode de fragmentation $MS^n$

De la même manière qu'une analyse MS, les ions sont d'abord piégés dans la trappe. Un ion, appelé ion précurseur, est alors isolé puis fragmenté en un ou plusieurs ions appelés ions produits. **L'isolement** consiste à isoler l'ion précurseur dans la trappe ionique. Pour cela, tous les ions de rapports  $m/z$  plus faibles que l'ion précurseur sont éjectés par balayage croissant de l'amplitude de la radiofréquence appliquée à l'électrode annulaire. Les ions de rapports  $m/z$  supérieurs à l'ion précurseur sont quant à eux éjectés par éjection résonante. **La fragmentation** en mode CID (Collision Induced Dissociation) a lieu après isolement de l'ion précurseur dans la trappe. Une faible tension alternative est appliquée aux électrodes chapeaux à la fréquence de résonance de cet ion qui va alors augmenter son énergie cinétique et se fragmenter par collision

avec les molécules de gaz tampon, dans ce cas l'hélium. Les ions produits sont transférés dans la cellule basse pression. Ils sont alors éjectés et analysés de la même manière que pour une analyse en mode MS.

Lorsque les ions précurseurs sont fragmentés pour donner une première génération d'ions produits, on parle de MS/MS mais on préférera noter MS<sup>2</sup> pour la trappe car cet analyseur a la particularité de permettre la génération d'ions produits de seconde génération à partir de la sélection d'un ion produit précurseur. On parle alors de MS<sup>3</sup> (l'appareil permettant d'aller ici jusqu'à MS<sup>10</sup>). Cette technique est l'une des plus efficaces pour des études structurales, en donnant la possibilité de retrouver la filiation des ions.

#### 2.5.2.3 La trappe linéaire

Les toutes premières expérimentations sur ce qui deviendra plus tard la trappe linéaire furent réalisées par Church en 1969<sup>46</sup>. Il parvint à stocker des ions H<sup>+</sup> et He<sup>+</sup> dans deux quadripôles refermés sur eux-mêmes en forme d'hippodrome. En 1989, Prestage *et al.* décrivent un piège quadripolaire linéaire pour l'étude du comportement d'ions piégés<sup>47</sup>. Suite à ces premiers travaux, les trappes linéaires ont trouvé rapidement de nouvelles applications dans de nombreux domaines de la spectrométrie de masse<sup>48</sup>. Par rapport aux trappes 3D, les trappes linéaires ont une meilleure efficacité d'injection et une capacité de stockage plus importante. Elles peuvent, de plus, se combiner avec d'autres analyseurs pour donner naissance à des configurations hybrides ; dans ce cas, elles sont utilisées pour la sélection d'ion lors d'expériences de spectrométrie de masse en tandem.

Les études en LC-MS ont été menées sur un spectromètre de masse LTQ Velos Pro (Thermo Fisher Scientifique, MA, Etats Unis). L'architecture de cet appareil est bâtie autour de deux trappes linéaires. L'analyseur est constitué, en outre, d'une source électrospray, d'une série de lentilles et de multipôles qui assurent la transmission des ions, puis de deux cellules à haute et basse pression pour le piégeage et l'analyse des ions (**Figure II-13**).

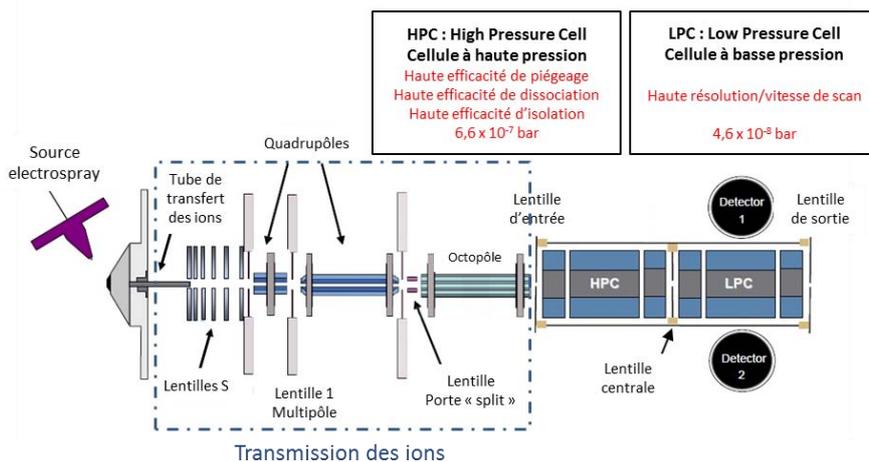


Figure II-13 : schéma de principe du spectromètre de masse Velos Pro.

Dans le cas d'une trappe linéaire, les ions sont confinés radialement par une radio fréquence (RF) bidimensionnelle, et axialement par des potentiels d'arrêt appliqués aux électrodes. Le Velos Pro utilise 6 tensions continues de piégeage axial, une pour chaque section des barreaux des deux pièges linéaires.

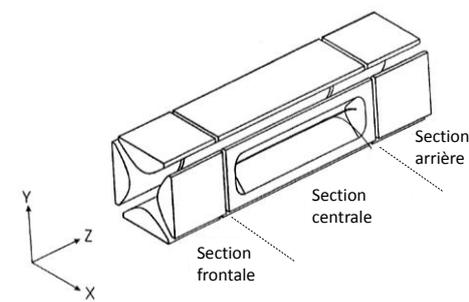


Figure II-14 : représentation schématique d'une trappe linéaire.

Le Velos Pro est équipé de deux trappes successives. Dans la première, dite à haute pression, a lieu le piégeage, l'isolement et la fragmentation des ions. Les tensions d'isolement de l'ion, de l'excitation résonante alternative et de l'éjection résonante alternative sont appliquées aux barreaux de sortie pour expulser les ions vers les détecteurs. Lorsque la fréquence de courant alternatif appliquée aux barreaux est égale à la fréquence du mouvement de l'ion piégé (dépendante de sa masse), l'ion acquiert de l'énergie cinétique. Si l'amplitude de la tension appliquée est suffisamment grande, l'ion est éjecté de l'analyseur vers les détecteurs selon la direction X (Figure II-14).

La tension appliquée pour l'isolement d'un ion lors d'expériences SIM (Selected Ion Monitoring), SRM (Selected Reaction Monitoring), CRM (Consecutive Reaction Monitoring) ou MS<sup>n</sup> est une

forme d'onde d'éjection résonante multifréquence. La tension d'isolement des ions, combinée à la tension RF principale, éjecte tous les ions à l'exception de ceux de rapports  $m/z$  sélectionnés.

Au cours d'expériences de fragmentation par CID (Collision Induced Dissociation) en SRM, CRM, ou  $MS^n$ , une tension alternative d'excitation résonante est appliquée sur les barreaux de sortie pour favoriser la fragmentation des ions précurseurs. Ceci améliore le mouvement des ions en augmentant leur énergie cinétique. Après plusieurs collisions énergétiques avec l'hélium (gaz de collision présent au sein de l'analyseur), les ions augmentent suffisamment leur énergie interne pour se dissocier en ions produits. Ces derniers sont ensuite analysés.

Pour permettre la détection des ions, la tension alternative d'éjection résonante éjecte les ions à partir de l'analyseur de masse tout en améliorant la résolution en masse et la sensibilité. Cette de résonance est appliquée en même temps que la rampe de la RF principale. Les ions entrent ainsi en résonance avec la tension alternative d'éjection résonante. Lorsqu'un ion approche de la résonance, sa trajectoire s'éloigne du centre de l'analyseur et il est ensuite éjecté. L'étape de détection a lieu dans la deuxième trappe, dite à basse pression. Deux multiplicateurs d'électrons sont disposés selon l'axe des X (**Figure II-13** et **Figure II-14**) de chaque côté de la trappe. Chacun d'entre eux possède sa dynode de conversion dédiée.

### 2.5.3 La source HESI

La source qui équipe le Velos Pro est une source électrospray chauffée, dite HESI (Heated Electrospray Ionization Source). Outre les paramètres classiques de débit de seringue et de température (capillaire de transfert et vaporisation), plusieurs réglages de gaz sont disponibles. Les flux de  $N_2$  peuvent être diffusés selon trois directions différentes. Le « sheath gas » est le flux principal, il est coaxial au capillaire et permet de nébuliser la solution. Le flux du gaz auxiliaire agit à travers la buse, il permet de focaliser la pulvérisation. Son utilisation est essentielle pour assister le « sheath gas » lors de débits de source importants (supérieur à 100  $\mu$ L). Enfin, le « sweep gas » ou gaz de balayage, est un flux qui arrive par derrière le cône. Il permet de diminuer la formation d'agrégats avec le solvant et également la production d'adduits. Il est utile pour l'analyse de matrices complexes.

### 3. Conclusion

Ce chapitre a eu pour objet de décrire le principe des techniques utilisées lors de ces travaux. Ces techniques variées, la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier électrospray (ESI-FTICRMS), la spectrométrie de masse à temps de vol associée à la désorption/ionisation laser (LDI-FTICRMS) et le couplage chromatographie liquide trappe ionique (LC-ITMS), seront appliquées toutes trois à des études spécifiques. Ceci a nécessité pour chaque cas d'optimiser et surtout d'adapter ces techniques au type d'échantillon à analyser. Ces points seront décrits dans les chapitres correspondants.

Ainsi, la spectrométrie très haute résolution couplée à l'électrospray sera utilisée lors de l'étude métabolique menée sur des échantillons liquides (**Chapitre III**). La spectrométrie de masse à temps vol couplée à la désorption/ionisation laser sera, quant à elle, employée pour l'analyse *in situ* de feuilles de vigne en imagerie, ce qui constituera l'objet des **Chapitre IV** et **Chapitre V**. Pour ce dernier volet, l'imagerie MS sera associée à l'imagerie photonique dans le cadre d'une association originale de plusieurs approches. Le couplage LC-MS sera mis à profit pour compléter les deux axes principaux : d'une part, apporter un supplément d'information par rapport à l'infusion directe ESI-FTICRMS et, d'autre part, vérifier la répétabilité du signal en imagerie par le biais d'analyses quantitatives.

## 4. Littérature

1. Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 51–78 (2007).
2. Haglund, R. F. in *Microsc. Mesoscopic Asp. Laser-Induc. Desorption Ablation* **30**, 1–16 (Academic Press, 1996).
3. Holle, A., Haase, A., Kayser, M. & Höhdorf, J. Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *J. Mass Spectrom.* **41**, 705–716 (2006).
4. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption/ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
5. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151–153 (1988).
6. Dreisewerd, K. The Desorption Process in MALDI. *Chem. Rev.* **103**, 395–426 (2003).
7. Knochenmuss, R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.* **37**, 867–877 (2002).
8. Wong, C., So, M. & Chan, T.-W. Origins of the proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Eur. J. Mass Spectrom.* **4**, 223 (1998).
9. Karas, M. & Krüger, R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem. Rev.* **103**, 427–440 (2003).
10. Chang, W. C. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal. Chim. Acta* **582**, 1–9 (2007).
11. Ayorinde, Hambright, Porter & Keith. Use of meso- tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **13**, 2474–2479 (1999).
12. Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M. & Niwa, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *J. Mass Spectrom.* **35**, 417–422 (2000).
13. Strupat, K., Karas, M. & Hillenkamp, F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **111**, 89–102 (1991).
14. Beavis, R. C., Chaudhary, T. & Chait, B. T.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **27**, 156–158 (1992).
15. Beavis, R. C. & Chait, B. T. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **3**, 432–435 (1989).
16. Vermillion-Salsbury, R. L. & Hercules, D. M. 9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1575–1581 (2002).
17. Shroff, R., Vergara, F., Muck, A., Svatoš, A. & Gershenzon, J. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6196–6201 (2008).
18. Sarsby, J., Towers, M. W., Stain, C., Cramer, R. & Koroleva, O. A. Mass spectrometry imaging of glucosinolates in *Arabidopsis* flowers and siliques. *Phytochemistry* **77**, 110–118 (2012).
19. Thomas, A., Charbonneau, J. L., Fournaise, E. & Chaurand, P. Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition. *Anal. Chem.* (2012).
20. Reiber, D. C., Grover, T. A. & Brown, R. S. Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching. *Anal. Chem.* **70**, 673–683 (1998).
21. Cohen, S. L. & Chait, B. T. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem.* **68**, 31–37 (1996).
22. Kussmann, M. *et al.* Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *J. Mass Spectrom.* **32**, 593–601 (1997).

23. Kemptner, J. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **23**, 877–884 (2009).
24. Zeleny, J. Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Phys. Rev.* **10**, 1–6 (1917).
25. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
26. Tang, L. & Kebarle, P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.* **65**, 3654–3668 (1993).
27. Smith, D. P. H. The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **IA-22**, 527–535 (1986).
28. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287–2294 (1976).
29. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
30. Kostianen, R. & Kauppila, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 685–699 (2009).
31. Chaimbault, P. Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse. (2000).
32. Pérez-Magariño S, R. I. Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A* **847**, 75–81 (1999).
33. Dempster, A. J. A new Method of Positive Ray Analysis. *Phys. Rev.* **11**, 316–325 (1918).
34. Stephens, W. E. Proceedings of the American Physical Society. *Phys. Rev.* **69**, 674–674 (1946).
35. Goudsmit, S. A. A Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Phys. Rev.* **74**, 622–623 (1948).
36. Vestal, M. L., Juhasz, P. & Martin, S. A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1044–1050 (1995).
37. Bruker, D. Ultraflex III : User Manual. (2006).
38. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L. & Jackson, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 1–35 (1998).
39. Marshall, A. G. & Hendrickson, C. L. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: Principles and experimental configurations. *Int. J. Mass Spectrom.* **215**, 59–75 (2002).
40. Xian, F., Hendrickson, C. L. & Marshall, A. G. High resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 708–719 (2012).
41. Lawrence, E. O. The evolution of cyclotron. *Nobel Lect.* (1951).
42. Thomas, H. A., Driscoll, R. L. & Hipple, J. A. Measurement of the Proton Moment in Absolute Units. *Phys. Rev.* **75**, 902 (1949).
43. Comisarow, M. B. & Marshall, A. G. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **25**, 282–283 (1974).
44. Sibille, E. Criblage d'inhibiteurs réversibles et irréversibles des phosphatases CDC25 par spectrométrie de masse - Application à des extraits d'origine végétale ; Thèse de Doctorat. (2013).
45. Herrmann, K. A., Somogyi, Á., Wysocki, V. H., Drahos, L. & Vékey, K. Combination of Sustained Off-Resonance Irradiation and On-Resonance Excitation in FT-ICR. *Anal. Chem.* **77**, 7626–7638 (2005).
46. Church, D. A. Storage-Ring Ion Trap Derived from the Linear Quadrupole Radio-Frequency Mass Filter. *J. Appl. Phys.* **40**, 3127–3134 (1969).
47. Prestage, J. D., Dick, G. J. & Maleki, L. New ion trap for frequency standard applications. *J. Appl. Phys.* **66**, 1013–1017 (1989).
48. Douglas, D. J., Frank, A. J. & Mao, D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 1–29 (2005).

**Chapitre III** Etude métabolique par  
spectrométrie de masse d'extraits de  
feuilles de vigne infectées par le mildiou

---

# Index

<b>1. Introduction</b>	<b>III-77</b>
<b>2. Contexte de l'étude</b>	<b>III-77</b>
<b>3. Paramètres expérimentaux</b>	<b>III-79</b>
3.1. Matériel chimique	III-79
3.2. Matériel végétal : la population 41528	III-79
3.2.1 Généalogie de la population 41528	III-79
3.2.2 Echantillonnage : inoculation et préparation des extraits méthanoliques	III-80
3.3. Paramètres d'analyse ESI-FTICRMS et ESI-FTICRMS <sup>2</sup>	III-81
3.4. Acquisition et calibration des spectres de masse	III-83
<b>4. Résultats et discussion des analyses obtenues sur la population 41528</b>	<b>III-83</b>
4.1. Etude des modes d'ionisation	III-82
4.2. Etude de l'influence de la composition du solvant sur l'ionisation	III-83
4.3. Identification des métabolites détectés par ESI-FTICRMS et MS <sup>2</sup>	III-84
4.3.1 Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques	III-86
4.3.2 Les sucres	III-86
4.3.3 Les flavonoïdes	III-89
4.3.4 Les acyle-lipides	III-90
4.3.5 Autres composés	III-95
<b>5. Analyse de spores germées lyophilisées</b>	<b>III-97</b>
<b>6. Etude statistique</b>	<b>III-98</b>
6.1. Traitements des données	III-99
6.2. Sélection des ions marqueurs	III-100
6.3. Analyse en composantes principales de la population 41528	III-101
6.3.1 ACP des 19 variables	III-101
6.3.2 ACP des 96 individus	III-102
6.4. Histogramme par métabolites en fonction de l'OIV	III-103
6.5. ACP par variables	III-105
<b>7. Conclusion de l'étude ESI-FTICRMS</b>	<b>III-107</b>
<b>8. Analyse d'un extrait de feuille de vigne de l'étude par LC-ITMS</b>	<b>III-107</b>
8.1. Profil métabolique ESI-FTICRMS d'un extrait inoculé de la population 41528	III-108
8.2. Profiling LC-MS/MS d'un extrait inoculé de la population 41528	III-109
8.2.1 Paramètres d'analyse	III-109
8.2.2 Résultats	III-110

8.2.3	Conclusion sur le profiling LC-ITMS	III-112
<b>9.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>III-113</b>
<b>10.</b>	<b>Littérature</b>	<b>III-115</b>



## 1. Introduction

Ce chapitre décrit l'étude métabolique menée sur une population d'hybrides phénotypés en vue d'étudier la résistance de la vigne face à l'infection du mildiou. L'objectif de ces travaux est notamment d'évaluer l'apport de l'injection directe (infusion de l'échantillon) par ESI-FTICRMS et MS<sup>2</sup> pour l'étude de la relation hôte-pathogène entre la vigne et le mildiou.

L'étude complète s'est déroulée sur un temps relativement long car il a fallu avant les analyses en spectrométrie de masse, générer la population d'hybrides puis les échantillons (récolter les témoins et inoculer la vigne avec le mildiou) à l'INRA de Colmar. Les premiers échantillons ont été analysés au laboratoire par G. Hamm en 2007<sup>1</sup>. Il s'agissait alors des échantillons témoins (non infectés) issus de cette population, constituant des résultats préliminaires. L'analyse des échantillons infectés par *Plasmopara viticola* en ESI-FTICRMS et MS<sup>2</sup> et les conclusions qui ont été tirées de l'analyse différentielle font l'objet du travail de recherche présenté ici. Plusieurs aspects ont été développés pour conduire à l'aboutissement des conclusions à cette étude. La majeure partie des travaux présentés dans ce chapitre a été publiée dans *Analytica Chimica Acta* en 2013<sup>2</sup>. Pour approfondir l'évaluation de l'analyse en infusion par ESI-FTICRMS, la fin de ce chapitre ouvre sur une expérience LC-ESI-MS/MS menée sur un échantillon de l'étude afin de positionner les analyses par infusion en ESI-FTICRMS dans un schéma de type « approche métabolomique ».

## 2. Contexte de l'étude

Le profilage métabolique est une approche puissante qui permet de mettre en évidence les composés synthétisés en réaction à des stimuli environnementaux biotiques (ex : maladies) ou abiotiques (sécheresse, lumière UV intense,...). En comparant leur composition métabolique via des outils statistiques convenablement choisis, il est possible de regrouper des échantillons selon leur similarité, de hiérarchiser cette similarité ou encore de mettre en évidence les paramètres discriminants. La résonance magnétique nucléaire (NMR) ainsi que la spectrométrie de masse (MS) sont souvent impliquées dans ces études pour l'identification de métabolites d'intérêt (exemple : biomarqueurs)<sup>3</sup>. La RMN permet d'accéder à des informations structurales avec une bonne reproductibilité et des données quantitatives. Cependant, ses limites de détection demeurent élevées. En revanche, la MS offre une large gamme dynamique d'analyse et permet la détection de composés à l'état de trace. Lors d'une analyse pour un même échantillon, davantage de métabolites seront détectés en spectrométrie de masse qu'en RMN<sup>4</sup>. De plus, en l'absence de composés standards disponibles, la MS permet d'obtenir des informations structurales par le biais

d'expérience de spectrométrie de masse en tandem. Afin d'interpréter des échantillons très complexes (contenant des isomères par exemple), la MS est souvent couplée avec les méthodes séparatives telles que la chromatographie en phase gaz (GC) ou la chromatographie liquide (LC) au sens large (incluant l'Ultra Performance Liquid Chromatography ou UPLC,)<sup>5,6</sup>. La LC couplée à la MS est plus appropriée que la GC-MS pour l'analyse de composés non volatils, thermolabiles et/ou polaires. La LC-MS a été notamment employée pour classer certains phénotypes mutants d'*Arabidopsis thaliana*<sup>7</sup>. La LC peut contribuer à diminuer également les phénomènes de suppression ionique causés par les éventuelles coélutions de plusieurs composés. Elle permet de résoudre les interférences entre composés isobares lors de l'utilisation d'analyseurs basse résolution. La LC est surtout très appréciable pour la séparation des isomères avant leur détection<sup>8</sup>. Les études métabolomiques peuvent faire appel à la plupart des analyseurs de masse classiques tels que les trappes ioniques<sup>9,10</sup>, les triples quadripôles<sup>11</sup>, les spectromètres à temps de vol (TOF)<sup>12,13</sup>, les hybrides de type Q-TOF<sup>14,15</sup> et enfin les analyseurs orbitrap<sup>16,17</sup> plus récemment apparus dans le paysage de la spectrométrie de masse. La littérature fourmille d'exemples d'applications impliquant ces configurations instrumentales. Par exemple, des études menées sur de l'urine<sup>18,19</sup> ou des échantillons de plasma<sup>12,20</sup>, ont mis en évidence la synthèse de métabolites en réponse à des xénobiotiques<sup>11</sup>, des métaux lourds toxiques<sup>9</sup> et même des biomarqueurs discriminatoires de souches, du sexe et de variations diurnes chez le rat<sup>13</sup>. La métabolomique reposant sur une analyse par spectrométrie de masse est employée notamment pour classer<sup>21</sup> et vérifier l'origine géographique de plantes<sup>22,23</sup>, mais également pour évaluer leurs réactions aux stress<sup>24</sup>. Cette approche est également mise en œuvre pour mettre en évidence des métabolites fongiques<sup>25</sup> et étudier les relations hôte-pathogènes<sup>26</sup>.

En couplage, l'étape chromatographique peut être longue surtout lorsque un gradient est nécessaire pour séparer des métabolites présentant des polarités très différentes. Même si l'UPLC qui est plus résolutive et plus rapide que l'HPLC classique, une empreinte métabolique prend tout de même une dizaine<sup>6,27</sup> à une trentaine de minutes<sup>28</sup> selon la complexité de l'application, sans compter le temps de rééquilibrage nécessaire avant chaque nouvelle injection. Ce temps de rééquilibrage n'est que rarement indiqué dans la littérature mais par exemple, Wang *et al.* précisent un temps de rééquilibrage de 10 min (c'est souvent un minimum à respecter) pour un total de 20,5 minutes d'analyse en UPLC<sup>29</sup>.

Si on comprend bien l'utilité d'une séparation chromatographique à terme pour avoir une meilleure vision du phénomène étudié, il est intéressant de se demander si une simple infusion des échantillons d'une étude n'est déjà pas suffisamment informative pour dégager de nouvelles

pistes de réflexion ou pour définir de nouvelles orientations de travail. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions par transformée de Fourier (FTICRMS), dite à très haute résolution, couplée à une source d'ionisation électrospray (ESI) est un outil rapide et puissant permettant l'interprétation d'empreintes spectrales d'échantillons très complexes<sup>30-32</sup>. L'électrospray est une source d'ionisation douce, présentant une bonne sensibilité pour l'analyse de composés naturels<sup>33</sup>. Enfin, la grande précision des mesures en masse de la FTICR permet d'accéder aux formules moléculaires des ions et sa très haute résolution permet la distinction de composés isobares.

### 3. Paramètres expérimentaux

Cette partie décrit les conditions expérimentales appliquées dans l'étude, notamment ce qui concerne la méthode d'échantillonnage ainsi que les paramètres instrumentaux d'analyse.

#### 3.1. Matériel chimique

Les composés naturels sont bien souvent coûteux et surtout pas systématiquement disponibles commercialement. Toutefois, la majorité des composés standards nécessaires à l'étude (flavonoïdes et sucres) ont pu être acquis auprès de la société Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'ensemble des produits chimiques utilisés pour cette étude est décrit de façon exhaustive dans la publication<sup>2</sup> associée à ces travaux annexée en fin de manuscrit.

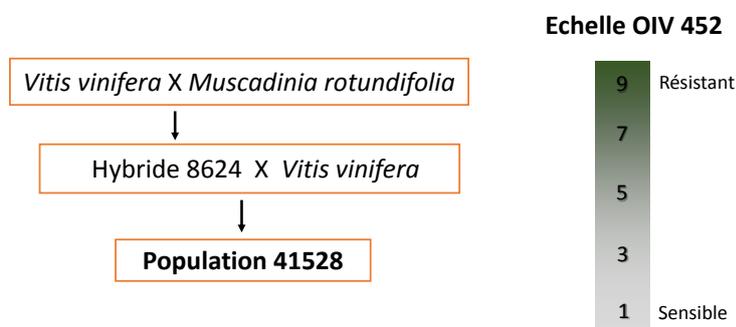
#### 3.2. Matériel végétal : la population 41528

Les profils métaboliques ont été réalisés à partir d'extraits méthanoliques provenant de feuilles issues d'une population d'hybrides phénotypés pour étudier la résistance au mildiou, créée à l'INRA de Colmar et codifiée par le n°41528. Cette population a été obtenue après différentes étapes de croisement avec pour but de combiner les qualités de plusieurs espèces de vignes. Ces croisements sont effectués à partir de variétés européennes sensibles au pathogène et une variété américaine résistante au mildiou. Ainsi, on peut espérer additionner les qualités organoleptiques des vignes européennes à celle de résistance au mildiou des vignes américaines.

##### 3.2.1 Généalogie de la population 41528

La population étudiée lors de ces travaux a été obtenue par sélection variétale. Le but est de transférer les gènes de résistance présents chez la muscadine à *Vitis vinifera* qui possède des qualités organoleptiques. La première étape est celle du croisement entre un génotype très résistant de *Muscadinia rotundifolia* (OIV 9) avec un génotype sensible de *Vitis vinifera* (OIV 3). Le

but est de transmettre le gène de résistance Rpv2 au génotype sensible. L'hybride 8624 qui en découle est rétrocroisé avec *Vitis vinifera*, produisant ainsi la population finale nommée population 41528. Cette étape de rétrocroisement permet d'augmenter la part du patrimoine génétique issu de *Vitis* chez les individus de la population finale. Toutes ces étapes de croisement ont été effectuées par pollinisation. Le schéma de **Figure III-1** résume ces différentes étapes, chacune d'entre elle a nécessité une année. Cette population est composée de 102 hybrides présentant différents degrés de résistance en raison du brassage génétique. Une échelle visuelle est utilisée pour prendre en compte l'interaction entre la vigne et *Plasmopara viticola*. Elle est nommée OIV-452 (Organisme International de la Vigne et du Vin) et s'étalonne de 1 pour une variété très sensible à 9 pour une très résistante (**Figure III-1**).



**Figure III-1** : schéma représentant les différentes étapes de croisement entre *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia* conduisant à la population 41528. Représentation à droite de l'échelle OIV-452.

### 3.2.2 Echantillonnage : inoculation et préparation des extraits méthanoliques

Pour chacun des 102 hybrides, deux feuilles sont prélevées : une feuille de niveau 5 et une autre de niveau 6 (le niveau 1 correspond à la première feuille éclose donc la plus ancienne). Après prélèvement, elles sont rincées à l'eau ultrapure pour éliminer les résidus. Les feuilles de niveau 6 sont infectées par *P. viticola* par pulvérisation d'une solution d'inoculum. La concentration en sporanges de la solution d'inoculum est ajustée à  $2 \cdot 10^4$  sporanges·mL<sup>-1</sup>. Les feuilles de niveau 5 sont pendant ce temps placées dans l'eau ultrapure et constitueront le groupe des feuilles témoins. Après l'inoculation, les feuilles sont disposées sur du papier humide sur leur face adaxiale (face supérieure) dans des bacs. Ces bacs sont refermés à l'aide de papier cellophane afin de conserver une atmosphère humide saturante nécessaire pour le bon développement du pathogène. Les bacs contenant les feuilles infectées sont ensuite stockés dans des chambres de cultures thermostatées à 23 °C pour une période initiale de 24 heures dans le noir. Pour les jours suivant, les feuilles sont soumises à une lumière artificielle (environ 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 18 h/jour, puis les 6 h restantes se passent dans l'obscurité.

Pour la réalisation des extraits, un disque foliaire de 2 centimètres de diamètre est prélevé 5 jours après l'infection sur chaque feuille. C'est un procédé d'extraction solide-liquide dérivé de celui de Pezet<sup>34</sup> et adapté aux feuilles de vigne. Le disque foliaire est placé dans 0,5 mL de méthanol et mis à l'étuve pour être chauffé à 60 °C et mis sous agitation pendant 45 min. Le disque foliaire est ensuite retiré de l'extrait, puis séché par chauffage à 100 °C pendant 24 h afin de procéder à sa pesée. L'extrait est quant à lui centrifugé à 12 000 tour·min<sup>-1</sup>.

Pour l'étude ESI-FTICRMS, la population a été réduite à 48 individus. En effet, l'étude s'étant étendue sur plusieurs années, le problème de la conservation des échantillons s'est posé. Certains d'entre eux étaient totalement évaporés. En conséquence, seul les couples d'hybrides complets (le témoin et son inoculé) ont été conservés. Finalement, 96 échantillons ont été retenus, présentant tous les degrés de résistance (du nombre OIV 1 à 9).

Avant les analyses en spectrométrie de masse, ces extraits ont été dilués 5 fois afin de prévenir la pollution de la source ESI.

### 3.3. Paramètres d'analyse ESI-FTICRMS et ESI-FTICRMS<sup>2</sup>

Les analyses ESI-FICRMS et MS<sup>2</sup> ont été conduites sur un spectromètre de masse Explorer HiRes (Varian, Palo Alto, CA, Etats-Unis) doté d'un aimant supraconducteur de 9,4 T et d'une source d'ionisation électrospray (ESI) Micromass Z-spray. Les paramètres de sources et de l'analyseur ont été optimisés afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible sur une gamme de masse s'étalant de 100 à 1 000 Da tout en essayant d'éviter les phénomènes de fragmentation *in-source*. En effet, au-delà de 1 000 Da, aucun signal significatif ne fut enregistré.

Les paramètres de source utilisés pour les analyses des extraits méthanoliques purs sont présentés dans le **Tableau III-1**.

Tableau III-1 : paramètres de la source électrospray en mode négatif et positif pour les analyses d'extraits méthanoliques.

Paramètre	Valeurs mode négatif	Valeurs mode positif
température de source	85 °C	85 °C
température de la sonde	100 °C	100 °C
potentiel de la source	3800 V	4000 V
tension du cône d'échantillonnage	- 45 V	60 V
tension du cône d'extraction	- 10 V	10 V
Débit de seringue	2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Les ions sont accumulés pendant 3 s dans le guide d'ion (hexapôle). Les spectres de fragmentation sont obtenus par SORI-CID par collision avec du diazote introduit après isolement de l'ion précurseur. La quantité de gaz introduite dans la cellule ainsi que l'amplitude de la fréquence de l'excitation du SORI sont ajustées en fonction de l'ion à fragmenter.

Pour chaque échantillon, trois répliques des spectres de masse sont enregistrés. Entre chaque acquisition, la source ESI est rincée pendant 1 min avec dans un premier temps un mélange composé d'acétonitrile/eau (50/50, v/v) puis avec du méthanol pur.

#### 3.4. Etude des modes d'ionisation

Par la suite, les modes d'ionisations positif et négatif ont été testés sur quelques échantillons. Quelques ions intenses issus des empreintes spectrales en mode positif ont pu toutefois être attribués. L'ion  $m/z$  872 a été identifié comme étant la phéophytine A (confirmé par SORI-CID) de formule moléculaire  $\text{C}_{55}\text{H}_{75}\text{N}_4\text{O}_5^+$ . Cette molécule est en fait la chlorophylle A ayant perdu son cation  $\text{Mg}^{2+}$ . Un signal très intense, souvent présent sur les empreintes spectrales en mode positif, l'ion  $m/z$  607, n'a quant à lui pas été identifié bien qu'une formule brute lui soit attribué :  $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{O}_{91}^+$ . D'autres espèces apparaissent pour l'échantillon inoculé. Un disaccharide est également détecté en mode positif sous deux formes : adduits sodique et potassique, respectivement  $m/z$  365 et 381. Dans ce mode, l'ionisation de composés dépend justement en partie de la présence de ces cations dans le milieu. Par exemple, le disaccharide n'a pas été détecté sous sa forme protonée  $[\text{M}+\text{H}]^+$  au rapport  $m/z$  343.

Si le mode positif permet d'observer quelques métabolites, le mode d'ionisation négatif permet d'accéder à davantage d'espèces, plus diversifiées en termes de famille de métabolites. Par exemple, ce mode d'ionisation assure une meilleure sensibilité de détection pour les composés phénoliques<sup>30</sup>. Ces derniers sont susceptibles d'être nombreux dans les extraits, ils sont en effet

souvent associés aux protections des plantes<sup>35</sup>. Pour toutes ces raisons décrites, seul le mode d'ionisation négatif sera conservé pour l'analyse de la population 41528.

### 3.5. Acquisition et calibration des spectres de masse

Les spectres de masse sont acquis avec le logiciel Omega en mode manuel (v 9.1.18, Varian, CA). Pour le mode négatif, la calibration interne a été initialement effectuée avec 4 ions associés à des flavonoïdes. Ces ions très intenses apparaissent aux rapports  $m/z$  447,  $m/z$  477,  $m/z$  463 et  $m/z$  493. Ils correspondent à la quercétine et à la myricétine avec, soit un rhamnose, soit un glucuronide substitué. Ces hypothèses de structures ont été au préalable vérifiées via des études de spectrométrie de masse en tandem menées sur standards de ces composés. Cette liste a progressivement été étendue avec l'identification de nouveaux pics, confirmées systématiquement par SORI-CID. La calibration est considérée comme acceptable lorsque l'erreur en masse est comprise entre 0 et 1,5 ppm.

## 4. Résultats et discussion des analyses obtenues sur la population 41528

Dans le but d'étudier la relation hôte-pathogène entre la vigne et le mildiou, un panel de 96 hybrides a été sélectionné, représentant toute l'échelle de résistance de la population 41528. En tout, ce sont 192 échantillons qui ont été analysés en ESI-FTICRMS.

### 4.1. Etude de l'influence de la composition du solvant sur l'ionisation

Au préalable, plusieurs compositions de solvant ont été testées afin de déterminer quelle phase d'infusion permettait d'obtenir la meilleure ionisation. En effet, cette composition peut avoir une influence non négligeable sur le rendement d'ionisation de composés en solution<sup>36</sup>. L'ajout d'une faible proportion d'eau (solvant dissociant) dans le mélange peut favoriser l'ionisation. Il est également possible d'ajouter des acides ou/et des bases volatiles en faible concentration tel que l'acétate d'ammonium pour augmenter le signal des métabolites d'intérêt.

Des tests ont été réalisés sur l'échantillon 7050H (OIV 9) afin de déterminer la meilleure composition de solvant possible pour l'ionisation en mode négatif. Le **Tableau III-2** résume cette expérience. Les résultats sont donnés en termes de courant ionique total pour globaliser l'information sur la variation de l'ionisation des métabolites.

**Tableau III-2 : intensité des courants ioniques totaux (TIC) en fonction de la composition du solvant et de la présence d'acétate d'ammonium. Chaque essai a été répété 3 fois et moyenné, le TIC est le résultat de la moyenne de 3 essais menés sur l'échantillon 7050H.**

Composition solvant (v/v)	Acétate d'ammonium	TIC
Méthanol 100%	non	519
Méthanol/Eau (95/5)	non	540
Acétonitrile/Eau (95/5)	non	422
Méthanol/Eau (95/5)	oui	494

On remarque que l'ajout d'un faible pourcentage d'eau augmente très légèrement l'ionisation. En revanche le remplacement du méthanol par l'acétonitrile diminue d'environ une vingtaine de pourcent l'ionisation globale de l'échantillon. Enfin, l'ajout d'acétate d'ammonium n'a pas montré une influence significative. L'allure des spectres a également été comparée, les distributions ont été trouvées dans tous les cas similaires. Afin de rester au plus simple, nous avons conservé le méthanol pur comme solvant d'infusion.

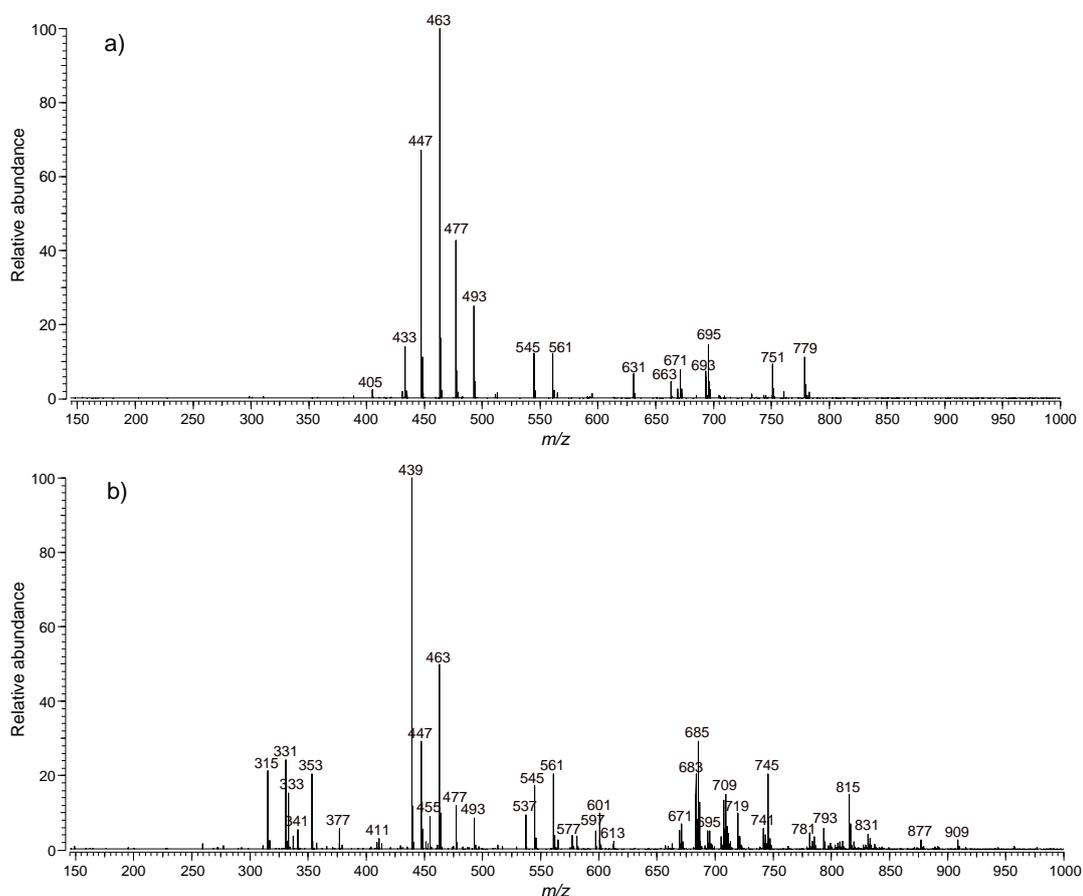
#### 4.2. Identification des métabolites détectés par ESI-FTICRMS et MS<sup>2</sup>

*Note : dans cette partie, les ions apparaîtront le plus souvent avec leur masse nominale et non leur masse exacte afin de ne pas surcharger le texte. Lorsque nécessaire (calculs de différences de masse en ppm par exemple), la masse exacte sera indiquée.*

L'identification de métabolites n'est pas une étape obligatoire pour différencier des échantillons entre eux. Par exemple, Plumb *et al.* ont classé des échantillons d'urine de souris ou de plasma en fonction de la souche ou de leur phénotype, mais également du sexe ou encore, des variations diurnes<sup>37,38</sup> et ceci sans pour autant identifier de marqueurs relatifs à ces paramètres. Cependant, l'identification de marqueurs permet de conclure des études métaboliques de façon plus précise et aboutie. Il est par exemple possible d'apporter des interprétations biologiques, en reliant le rôle des métabolites.

Les spectres de masse ont été acquis sur une gamme de masse s'étendant de 150 à 1 000 Da. En moyenne, chaque spectre donne lieu à environ 200 signaux (ou rapports  $m/z$ ). Aucun ion n'a été détecté au-delà de 1 000 Da. La haute précision en masse de la FTICRMS permet une attribution de formules moléculaires avec moins d'un ppm d'erreur. Les ions précurseurs ont été fragmentés par SORI-CID afin de confirmer leur attribution moléculaire en l'absence d'étalons disponibles dans le commerce. La **Figure III-2** présente une comparaison de deux empreintes spectrales issues

d'un même génotype (7087H). A noter que de légères différences s'observaient suivant les génotypes au niveau de l'abondance relative des ions caractéristiques.



**Figure III-2 : comparaison des empreintes des extraits méthanoliques du génotype 7087H (OIV 9) obtenues par ESI-FTICRMS en mode négatif, (a) échantillon témoin et (b) échantillon inoculé.**

Plusieurs éléments se dégagent à l'observation de ces deux profils métaboliques. Tout d'abord, la même distribution des ions  $m/z$  447, 463, 477 et 493 se retrouve au sein des deux empreintes spectrales. En revanche, c'est l'ion  $m/z$  439 qui constitue le pic de base du spectre de l'échantillon inoculé. Le comportement de cet ion s'est retrouvé sur la majorité des empreintes de la population inoculée. Une autre distribution est remarquable, celle des ions en haute masse (au-dessus de 650 Da) du spectre (b) de la **Figure III-2**. Ces ions possèdent un défaut de masse élevé et une distribution isotopique du  $^{13}\text{C}$  qui font penser à des composés avec un nombre d'atomes de carbone important.

Ces informations constituent les premières tendances à retenir. En revanche à cause de la grande variabilité de ces profils métaboliques d'un génotype à l'autre, il n'a pas été possible de tirer de conclusion aboutie à leur seule observation.

Les identifications de ces pics sont détaillées par famille de molécule dans les points suivant.

#### 4.2.1 Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques

Les ions  $m/z$  295, 311 et 353 sont attribués à des dérivés d'acides hydroxycinnamiques (HCA) déprotonés. Ces hypothèses sont confirmées par MS<sup>2</sup>. La fragmentation de l'ion  $m/z$  295 donne deux ions  $m/z$  163 et  $m/z$  149 caractéristiques des acides déprotonés p-coumarique et tartrique respectivement. La structure de l'ion  $m/z$  295 est attribuée à l'acide coutarique. Les principaux ions fragments de l'ion  $m/z$  311 sont l'ion  $m/z$  179 (acide caféique) et l'ion  $m/z$  149 (acide tartrique) menant à l'identification de l'acide caftarique. L'ion  $m/z$  353 est assigné à l'acide chlorogénique, sa fragmentation donne lieu aux ions produits  $m/z$  191 et 179 correspondant respectivement aux acides quinique et caféique. L'acide chlorogénique est l'ion le plus intense de cette classe de molécule. Ce composé est, en outre, principalement détecté dans les extraits de feuilles infectées. Le **Tableau III-3** rassemble l'ensemble des ions détectés en MS et MS<sup>2</sup>.

**Tableau III-3 : liste des espèces associées aux dérivés des acides hydroxycinnamiques observées en ESI-FTICRMS et MS<sup>2</sup>.**

Ion détecté	Masse exacte	Formule moléculaire	Identification	Présence
[M-H] <sup>-</sup>	149,00916	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	acide tartrique	MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	163,04007	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	acide coumarique	MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	179,03498	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	acide caféique	MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	191,01973	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	acide quinique	MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	295,04594	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	acide coutarique	MS
[M-H] <sup>-</sup>	311,04086	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	acide caftarique	MS
[M-H] <sup>-</sup>	353,08781	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	acide chlorogénique	MS
[M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	409,01776	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>13</sub> P <sup>-</sup>	acide caftarique	MS

#### 4.2.2 Les sucres

Le cycle de photosynthèse permet la conversion du dioxyde de carbone en sucres qui sont logiquement détectés dans les extraits de feuille. Le saccharose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1→2)- $\beta$ -D-fructofuranoside) est l'un des disaccharides le plus abondamment synthétisés au sein du cytosol à partir duquel il se propage dans le reste de la plante. Ce composé clef est détecté dans les extraits de feuille de vigne au rapport  $m/z$  341, correspondant à l'ion déprotoné [M-H]<sup>-</sup>. Cet ion est également détecté aux rapports  $m/z$  377 et 439. Ces deux ions sont attribués respectivement à un adduit chloré [M+Cl]<sup>-</sup> (confirmé par la distribution isotopique caractéristique) et un adduit phosphate [M+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (la présence d'adduit phosphate est peu conventionnelle et nous reviendrons sur la vérification de cette hypothèse dans le prochain paragraphe). La fragmentation

de ces trois ions a conduit à la perte d'une unité glucose soit une perte de 162 u. Un mono- et trisaccharide ont été également observés, cependant dans des proportions moins importantes. Ils sont détectés à  $m/z$  277 et 601 également sous forme d'adduits.

Dans des extraits d'herbe chinoise Tanshen, Li *et al.* avaient attribué par FTICRMS les ions  $m/z$  277, 439 et 601 à des mono- di- et tri-saccharides sous la forme d'adduit sulfate<sup>39</sup>. Cependant, les masses exactes de ces sucres avec le groupe  $\text{HSO}_4^-$  ne sont pas compatibles avec nos mesures. Cette différence de masse, supérieure à 15 ppm, est beaucoup trop élevée pour ce type d'analyseur. Nos résultats concordent davantage avec des adduits phosphates. Ces derniers ne sont cependant pas décrits dans la littérature. Dans le but de confirmer cette hypothèse, des solutions méthanoliques de glucose, saccharose et raffinose acidifiées avec une faible quantité d'acide phosphorique ont été infusés en ESI-FTICRMS. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le **Tableau III-4**.

**Tableau III-4 : étude en ESI-FTICRMS d'étalons en milieu acide phosphorique et sulfurique. Le glucose a été préparé à une concentration de  $10^{-4}$  M avec 1 % d'acide phosphorique ; le saccharose et le raffinose ont été préparés à une concentration de  $10^{-5}$  M avec 1% d'acide phosphorique. Les ions détectés pour chaque espèce sont reportés dans ce tableau. Pour la calibration des spectres des sucres, la myricétine, le kaempférol, le kaempférol-O-glucoside et l'hypéricine ont servi d'étalons internes.**

Composé	Ion détecté	Formule moléculaire	Rapport S/N	$m/z$ mesuré	$m/z$ théorique	Erreur (ppm)	Différence adduits $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ / $\text{HSO}_4^-$ (ppm)
Glucose	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6^-$	/	/	/	/	
	$[\text{M}+\text{H}_2\text{PO}_4]^-$	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_{10}\text{P}^-$	2180	277,0329	277,0330	0,4	-34,4
Saccharose	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^-$	204	341,1089	341,1091	0,6	
	$[\text{M}+\text{H}_2\text{PO}_4]^-$	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{15}\text{P}^-$	3117	439,0850	439,0853	0,7	-21,7
Raffinose	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_{16}^-$	139	503,1618	503,1621	0,6	
	$[\text{M}+\text{H}_2\text{PO}_4]^-$	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_{20}\text{P}^-$	3096	601,1379	601,1383	0,7	-15,8
Quercétine	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7^-$	131	N/A*	301,0354	N/A*	
	$[\text{M}+\text{H}_2\text{PO}_4]^-$	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_{11}\text{P}^-$	23	399,0124	399,0123	0,4	-23,8
Kaempférol-O-glycoside	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}^-$	583	N/A*	447,0933	N/A*	
	$[\text{M}+\text{H}_2\text{PO}_4]^-$	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{15}\text{P}^-$	511	545,0710	545,0702	0,7	-17,5

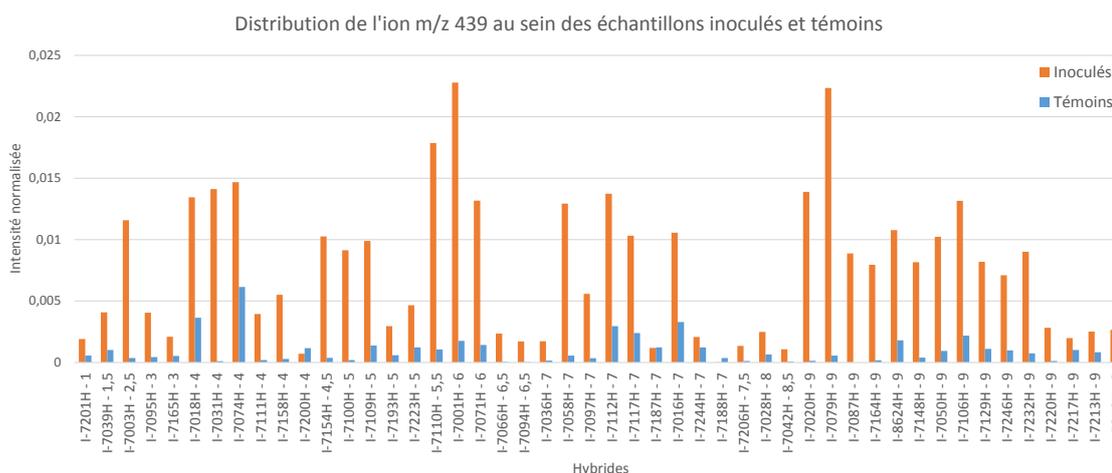
\* Non applicable car utilisé en tant qu'étalon interne

En présence d'acide phosphorique, les sucres sont principalement observés sous forme d'adduit phosphate avec moins d'un ppm d'erreur en masse. Par exemple, le saccharose avec l'adduit phosphate présente une masse exacte de 439,0853 u. Cette espèce est détectée à  $m/z$  439,0850, ce qui équivaut à une erreur de 0,7 ppm. La même expérience a été reproduite avec de l'acide

sulfurique, elle a conduit à la détection du sucre sous forme d'adduit sulfate à  $m/z$  439,0765, menant à une erreur de 0,5 ppm avec la masse exacte théorique (439,0763). Ainsi, il n'y a pas de confusion possible en FTICRMS entre un adduit phosphate et un adduit sulfate (la différence est supérieure à 15 ppm pour les molécules les plus lourdes, voir **Tableau III-4**). Enfin, lorsque les acides phosphorique et sulfurique ont été conjointement ajoutés, seules les espèces sous formes d'adduits phosphates ont été détectées. En outre, les standards utilisés pour la calibration interne sont détectés sous forme déprotonée mais également sous forme d'adduits phosphates (ou sulfate suivant l'expérience). Ainsi la quercétine est détectée à  $m/z$  301 et 399 respectivement pour les formes déprotonées et  $[M+H_2PO_4]^-$ . Il en va de même pour la kaempférol-O-glucoside à  $m/z$  447 et 545.

La présence de phosphate dans les échantillons de feuilles n'est pas surprenante puisque ce dernier est un nutriment essentiel pour la vigne<sup>40</sup>. Enfin, ces adduits phosphates ne peuvent être confondus avec les phosphates esters correspondant. En effet, un phosphate ester est formé par la condensation entre un groupe phosphate et une molécule conduisant à une perte d'eau. Par exemple, le glucose-6-phosphate ester (voie de la glycolyse) serait détecté à  $m/z$  259,0224 ( $C_6H_{12}O_9P$ ) alors que le glucose sous forme d'adduit phosphate est détecté à  $m/z$  277,0330. Il en va de même pour les autres sucres (di- et trisaccharides), les flavonoïdes et leurs dérivés glycosylés.

Même si les sucres sont détectés dans la plupart des échantillons, le saccharose apparaît particulièrement plus intense dans les feuilles de vignes infectées comme illustré en **Figure III-2 (b)** et **Figure III-3**, et la plupart du temps, cet ion correspond même au pic de base des spectres enregistrés pour les feuilles infectées.



**Figure III-3 : répartition des intensités normalisées de l'ion  $m/z$  439 pour chaque hybride étudié. Les barres bleues sont associées aux témoins et celles des inoculés apparaissent en orange.**

Cette tendance est semblable pour le monosaccharide et le trisaccharide mais dans des proportions moins importantes.

#### 4.2.3 Les flavonoïdes

Comme précédemment indiqué, le mode d'ionisation négative permet une meilleure détection des composés phénoliques. En effet, de nombreux signaux sont associés à ces types de composés. Ainsi, les ions  $m/z$  447 et 463 sont respectivement associés aux molécules de quercétine-O-rhamnoside et myricétine-O-rhamnoside. Ces deux molécules sont également détectées sous forme d'adduits phosphates avec ions  $m/z$  545 et 561 respectivement. La possible formation de ces adduits avec des flavonoïdes, glycosylés ou non, a été vérifiée, tout comme pour les sucres (**Tableau III-4**). Les standards de quercétine et de kaempférol-O-glucoside utilisés pour la calibration interne ont montré qu'une partie de l'ionisation de ces molécules s'effectuait sous forme d'adduit phosphate, en plus de l'ion déprotoné. La quercétine ainsi que la myricétine ont également été observées sous forme de dérivés glucuronides, respectivement  $m/z$  447 et 493. Ces hypothèses ont été vérifiées par SORI-CID. Des pertes de 146 u pour un rhamnose et de 176 pour un glucuronide ont été observées, menant à la détection de ces flavonoïdes sous leur forme respective d'aglycone déprotoné. Ces fragments ainsi que la mesure de leur masse sont en accord avec la littérature<sup>41</sup>. Ici encore, ces deux molécules  $[M-H]^-$   $m/z$  447 et 493 possèdent leur équivalent sous forme d'adduits phosphate, respectivement  $m/z$  575 et 591. La **Figure III-2** confirme une présence des flavonoïdes relativement importante au sein des extraits. Ils sont principalement détectés sous forme de dérivés glycosylés.

Le **Tableau III-5** : décrit l'ensemble des flavonoïdes observés ainsi que leurs fragments détectés au sein des extraits de feuille de vigne.

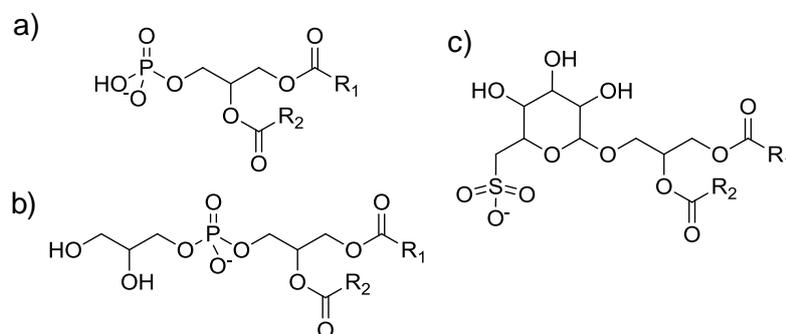
**Tableau III-5 : liste des espèces associées aux flavonoïdes observées en ESI-FTICRMS et MS<sup>2</sup>.**

Ion détecté	Masse exacte	Formule moléculaire	Identification	Présence
[M-H] <sup>-</sup>	301,03538	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	quercétine	MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	317,03029	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	myricétine	MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	447,09306	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	quercétine-O-rhamnoside	MS et MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	463,08820	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	myricétine-O-rhamnoside	MS et MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	477,06746	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	quercétine-O-glucuronide	MS et MS <sup>2</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	493,06238	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	myricétine-O-glucuronide	MS et MS <sup>2</sup>
[M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	545,07255	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub> P <sup>-</sup>	quercétine-O-rhamnoside	MS
[M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	561,06509	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>16</sub> P <sup>-</sup>	myricétine-O-rhamnoside	MS
[M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	575,04436	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>17</sub> P <sup>-</sup>	quercétine-O-glucuronide	MS
[M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	591,03927	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>18</sub> P <sup>-</sup>	myricétine-O-glucuronide	MS

Ces flavonoïdes (*m/z* 447, 463, 477 et 493) sont détectés dans tous les extraits. Ils sont observés avec une intensité relative plus importante dans les échantillons témoins (pic de base) mais paraissent moins abondants, notamment par rapport aux disaccharides, au sein des empreintes spectrales des feuilles infectées.

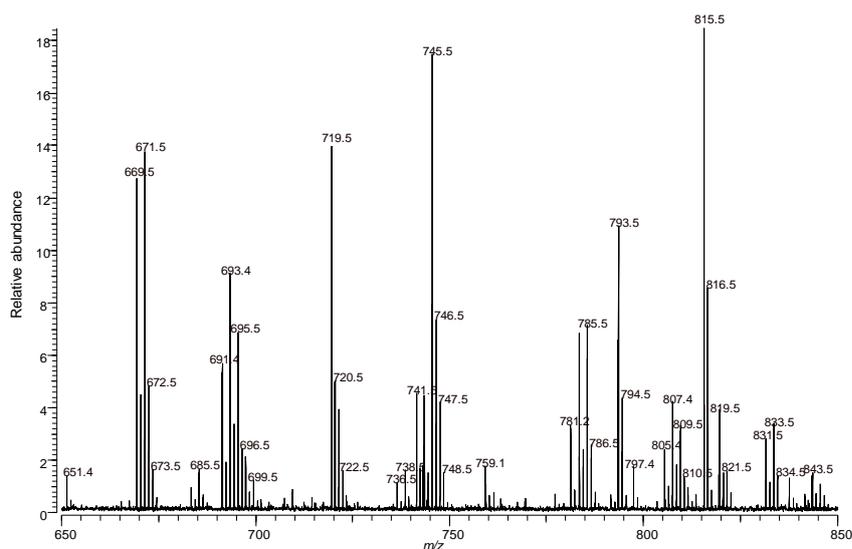
#### 4.2.4 Les acyle-lipides

De nombreux ions sont observés en haute masse, au-dessus de 600 Da. Leur formule moléculaire résultant de l'exactitude de la FTICRMS et l'étude de leur fragmentation conduit à l'identification de lipides acylés comprenant trois sous familles dont la structure de base est présentée en **Figure III-4**.



**Figure III-4 : structures moléculaires des trois sous-familles d'acyle-lipides. (a) acides phosphatidiques, (b) phosphatidylglycérols et (c) sulfoquinovosyl diacylglycérols. R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> correspondent à des acides gras en C16 ou C18 plus ou moins insaturés.**

Ces trois types de composés possèdent un groupe fonctionnel phosphate ou sulfate en plus d'un ou deux glycérols auxquels sont substitués deux acides gras. Dans nos extraits, ces acides gras sont majoritairement composés de chaînes à 16 ou 18 carbones. Chez les végétaux, ces chaînes carbonées sont classiquement linéaires et à nombre pair car la biosynthèse des acides gras, catalysée par l'acide gras synthase (en anglais « fatty acid synthase », FAS), procède par ajout de groupes à deux atomes de carbone à l'acétyl-CoA<sup>42</sup>. Le nombre d'insaturations est également très variable mais certains sont plus répandus que d'autres. On trouve des acides gras saturés comme par exemple l'acide palmitique C16:0 (16 carbones et 0 insaturation) ou insaturés comme l'acide linoléique C18:2 (18 carbones et 2 insaturations). Les positions des doubles liaisons ne sont pas spécifiées ici car les expériences MS menées ici ne permettent pas cette détermination. Au sein du genre *Vitis*, on retrouve majoritairement les acides gras en C16:0, C18:2 et C18:3, l'acide gras en C18:1 étant présent en de plus faibles proportions<sup>43</sup>. Par la présence de ces acides gras, ces 3 familles d'acyl-lipides conduisent à la détection de nombreux ions car de nombreuses combinaisons d'acide gras sont possibles (**Figure III-5**).



**Figure III-5 : détail de l'empreinte spectrale ESI-FTICRMS des acyle-lipides observée entre 650 Da et 850 Da pour l'échantillon 7095H (OIV 3) inoculé.**

Ces massifs typiques sont majoritairement plus intenses au sein des échantillons inoculés. La distribution isotopique ainsi que le défaut de masse de ces ions renforcent l'hypothèse de molécules aux nombres élevés d'atomes de carbone et d'hydrogène, comme le présentent les lipides.

Les ions  $m/z$  671 et 695 sont les principaux représentants de la série des acides phosphatidiques, le spectre MS/MS de l'ion  $m/z$  671 est présenté en **Figure III-6**. La structure proposée est

hypothétique car cette molécule possède en effet plusieurs isomères avec notamment, de nombreuses combinaisons possibles d'acides gras (insaturation et position sur le glycérol).

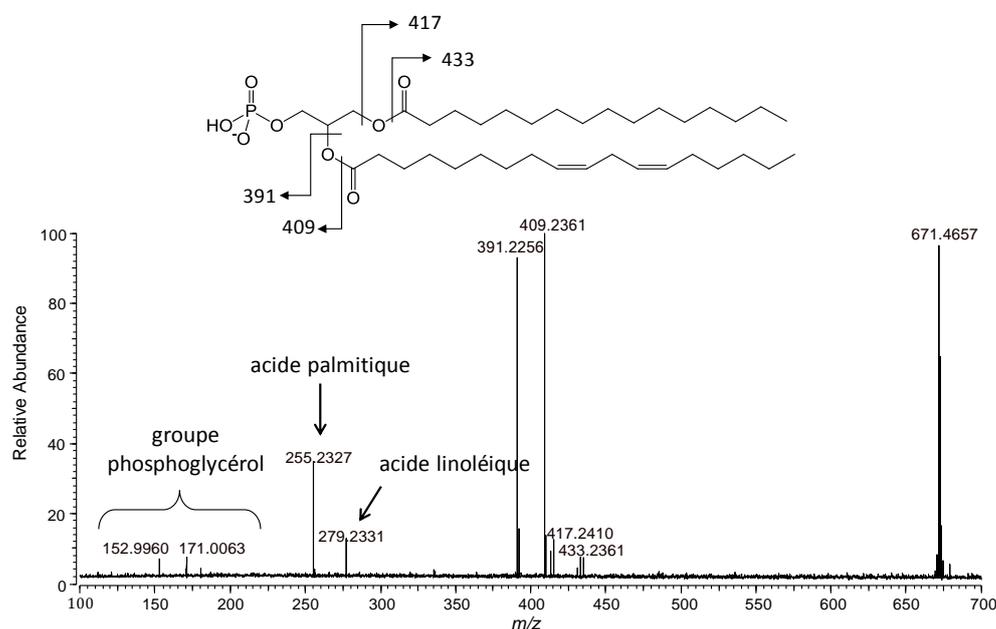
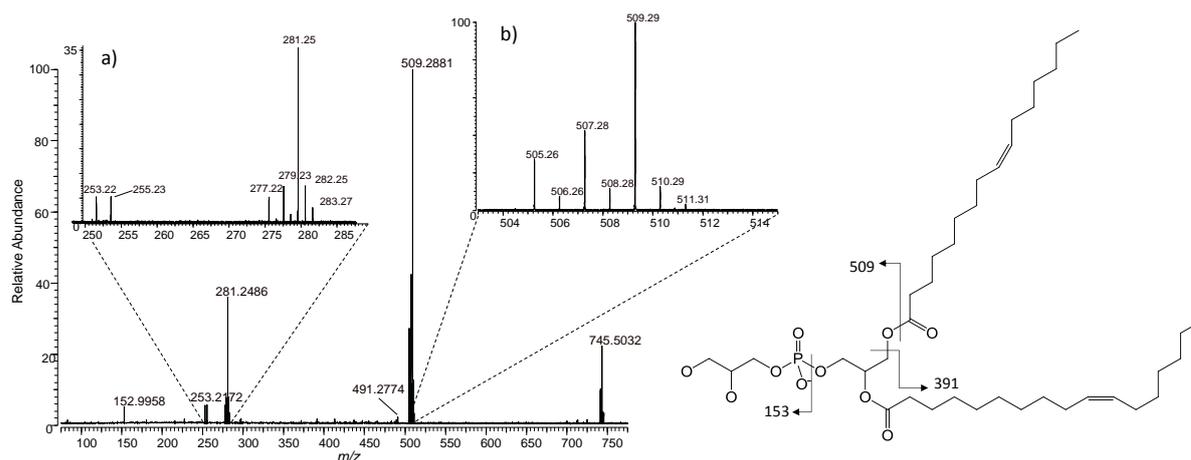


Figure III-6 : spectre ESI-FTICRMS<sup>2</sup> et structure moléculaire proposée pour l'ion  $m/z$  671. Un pulse de N<sub>2</sub> a été ajouté pendant 10 ms pour assurer les collisions et l'amplitude de la radiofréquence SORI a été réglée à 10 V.

Le mécanisme de fragmentation met en évidence la perte d'acides gras C16 et C18. Pour chaque acide gras, deux ruptures sont possibles : la première liée à la perte du groupe acyle (dans le cas de l'acide linoléique, - C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O) et la deuxième associée à une perte de l'acide gras (dans le cas de l'acide linoléique, - C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>). Ces ruptures s'observent pour les deux acides gras, celles liées à l'acide linoléique donnent lieu à des ions produits plus intenses. Ces deux acides gras sont également détectés seuls, à  $m/z$  279 (acide palmitique) et  $m/z$  255 (acide linoléique). Les fragments aux rapports  $m/z$  153 et 171 sont caractéristiques de groupement phosphoglycérol, une perte d'H<sub>2</sub>O les différencient. Ces molécules sont connues pour jouer un rôle dans la croissance mais également dans les mécanismes de défense de la plante<sup>44</sup>.

Les composés observés à  $m/z$  719 et 745 sont assignés à des phosphatidylglycérols. Ces espèces sont associées aux chloroplastes des plantes<sup>45</sup>. De façon similaire, ces composés possèdent de nombreux homologues avec la possibilité de combinaisons variées d'acides gras. La **Figure III-7** représente le spectre de fragmentation de l'ion  $m/z$  745. La structure de la molécule de phosphatidylglycérol est présentée à titre d'hypothèse avec un acide palmitoléique (C16:1) et un acide oléique (C18:1).



**Figure III-7 : spectre ESI-FTICRMS<sup>2</sup> et structure moléculaire proposée pour l'ion  $m/z$  745. La durée du pulse de  $N_2$  était de 20 ms et l'amplitude de la radiofréquence SORI a été réglée à 10 V. (a) détail de 250 à 285 Da montrant les fragments d'acide gras ; (b) détail de 503 à 514 Da montrant les principaux fragments autour de la masse  $m/z$  509.**

Le fragment le plus intense à la masse  $m/z$  509 est associé à la perte du groupement acyle de l'acide C16:1. L'ion  $m/z$  491, bien moins intense, provient de la perte totale de l'acide C16:1. Le groupe phosphoglycérol plus une perte d'une molécule  $H_2O$  est détecté à la masse  $m/z$  153. Les deux cartouches de la **Figure III-7** illustrent la difficulté pour interpréter ces spectres de fragmentation. La cartouche a) indique la présence d'acides en C16:1 ( $m/z$  253) et C16:0 ( $m/z$  255) et une diversité d'acides en C18 encore plus importante. En effet, les ions  $m/z$  277, 279, 281 et 283 associés respectivement aux acides C18:3, C18:2, C18:1 et C18:0, sont détectés. Ceci est confirmé par le nombre de fragments autour de la masse  $m/z$  509 (**Fig. III-7 (b)**). Par exemple, l'ion précurseur  $m/z$  745 qui mènerait à la détection du fragment  $m/z$  507 devrait être composé d'un acide en C16:0 et d'un acide C18:2. Cependant, pour l'ion  $m/z$  745 qui conduit à l'ion produit majoritaire  $m/z$  509, la combinaison d'acides gras doit inclure les acides C16:1 et C18:1 comme illustré sur la **Figure III-7**. Un autre phénomène doit être gardé à l'esprit, à savoir la difficulté d'isoler certains ions avant leur fragmentation. Au moment de la fragmentation l'ion  $m/z$  745, ses homologues  $m/z$  741 et 743 (avec une ou deux insaturations en plus) étaient également présents dans la cellule du spectromètre. Ces composés possédant d'autres combinaisons d'acides gras ont donc pu contribuer à générer ces différents fragments.

La dernière famille d'importance au sein des acyle-lipides, apparentée aux sulfoquinovosyl diacylglycérols, est composée majoritairement des ions  $m/z$  793, 815 et 837. La formule brute attribuée pour l'ion  $m/z$  815,4982 est  $C_{43}H_{75}O_{12}S^-$  et son massif isotopique est en accord avec cette composition chimique. Son spectre de fragmentation SORI-CID est présenté en **Figure III-8**. Ici également, la structure proposée est hypothétique puisque de nombreux isomères sont possibles.

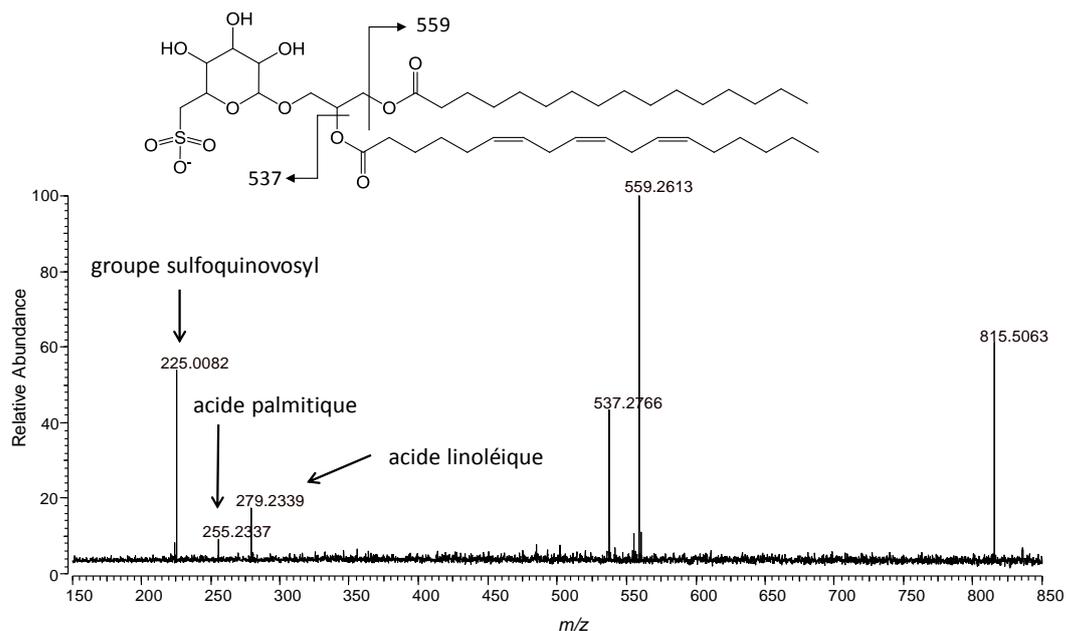


Figure III-8 : spectre ESI-FTICRMS<sup>2</sup> et structure moléculaire potentielle de l'ion  $m/z$  815. Un pulse de N<sub>2</sub> a été ajouté pendant 20 ms pour les collisions et l'amplitude de la radiofréquence SORI a été réglée à 12 V.

La fragmentation de l'ion  $m/z$  815 révèle la présence d'acide palmitique (C16:0) et d'un autre acide gras en C18. La perte de l'acide palmitique conduit à la détection de l'ion  $m/z$  559. De même, la perte de l'acide linoléique conduit à la détection de l'ion  $m/z$  537. En revanche on ne détecte pas cet acide gras seul. On détecte à la place l'acide linoléique à la masse  $m/z$  279. Ce fragment serait donc issu d'un isomère de l'ion précurseur  $m/z$  815, présentant cette fois-ci une combinaison d'acides gras en C18:2 et C16:1. Dans le cas de la **Figure III-8**, la structure proposée conduit effectivement à la détection des deux ions produits  $m/z$  559 et 537 mais pas à celle des deux acides gras simultanément attendus au vu de cette structure. Enfin, le groupe sulfoquinovosyl est détecté à la masse  $m/z$  225 (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub>S). Les SQDG sont des composants caractéristiques des thylakoïdes, les structures des membranes cellulaires qui portent les pigments photosynthétiques des plantes<sup>46</sup>.

Des méthyl-phospholipides ( $m/z$  685 et 709) sont également détectés mais dans des proportions moindre. Ils n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude puisque la formation de méthyl-phosphoesters est souvent observée lorsque le méthanol est utilisé comme solvant d'extraction<sup>47</sup>. Ce sont donc plutôt des « espèces artéfacts » que de réels métabolites.

Comme illustré en **Figure III-2**, les acyle-lipides, présents en hautes masses, sont plutôt caractéristiques des empreintes métaboliques des échantillons inoculés par *P. viticola*.

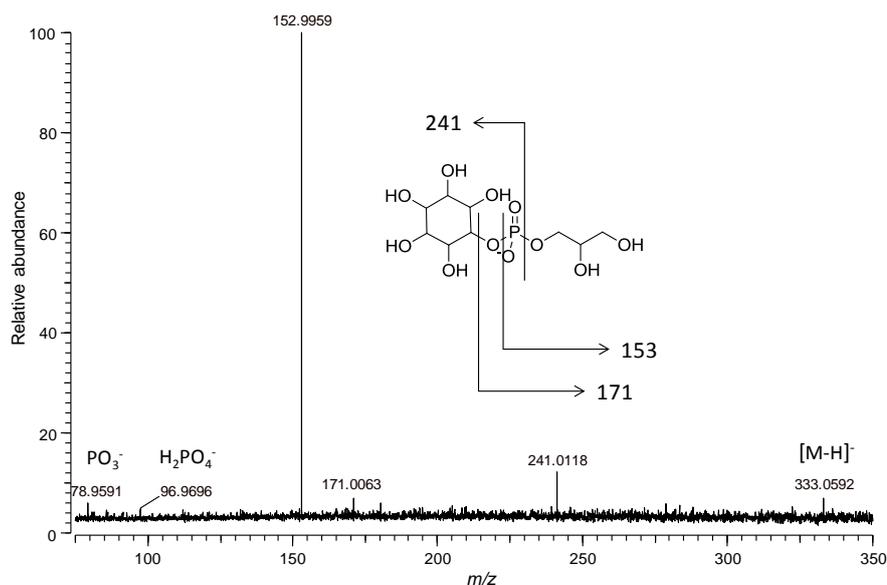
#### 4.2.5 Autres composés

D'autres ions isolés, ou seuls représentants de familles moléculaires, ont attiré notre attention et ont fait l'objet d'investigations supplémentaires. Ils sont décrits dans cette section.

L'ion  $m/z$  331 peut être attribué à un monogalloyl-glucose déprotoné. Sa fragmentation a effectivement conduit à une perte de 162 u, permettant la détection de l'acide gallique déprotoné ( $m/z$  169). Le signal correspondant au trigalloyl glucose ou à l'un de ses isomères est également détecté mais avec des intensités très faibles.

Jusqu'à présent, deux ions  $m/z$  513 et 631 demeurent non identifiés mais les formules moléculaires données par la FTICRMS indiquent un nombre très élevé d'atomes d'oxygène (défaut de masse très faible). On peut ainsi émettre l'hypothèse de molécules fortement glycosylées. La formule proposée pour l'ion  $m/z$  631 ( $C_{27}H_{19}O_{18}^-$ ) est compatible avec les ellagitannins décrits pour d'autres plantes<sup>31,48</sup>. Cette molécule n'a pas encore été décrite au sein des feuilles de vigne mais la présence d'ellagitannins en grande proportion a été démontrée chez les espèces résistantes telles que *Muscadinia rotundifolia*<sup>49</sup>. Or la muscadine est précisément l'un des parents des hybrides étudiés, ceci conforte cette hypothèse. De plus, la fragmentation de l'ion  $m/z$  631 mène à la détection de l'ion produit  $m/z$  445,0412 ( $C_{20}H_{13}O_{12}^-$ ) compatible avec la perte d'un groupe galloyl et d'une molécule d'eau, et également celle de l'ion  $m/z$  300,9990 correspondant à l'acide ellagique déprotoné.

Parmi les autres pics détectés, l'ion  $m/z$  333 a particulièrement attiré notre attention puisque ce dernier est principalement détecté au sein des échantillons inoculés. Sa masse exacte,  $m/z$  333,0592 peut être associée à la formule chimique  $C_9H_{18}O_{11}P^-$  conduisant à l'hypothèse du glycérophosphoinositol sous forme  $[M-H]^-$ . Cette attribution a été confirmée par SORI-CID et le spectre de fragmentation associé est présenté en **Figure III-9**.



**Figure III-9** : spectre ESI-FTICRMS<sup>2</sup> de l'ion  $m/z$  333 et structure du glycérophosphoinositol. Un pulse de N<sub>2</sub> a été ajouté pendant 20 ms pour les collisions et l'amplitude de la radiofréquence SORI a été réglée à 15 V.

Le fragment principal ( $m/z$  153) correspond à la perte du groupe inositol (-180 u). Les ions  $m/z$  78,9591 et 96,9696 sont associées respectivement aux molécules PO<sub>3</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Ils témoignent de la présence du groupe phosphate. Enfin, l'ion  $m/z$  241 est caractéristique du groupe phosphoinositol. Le glycérophosphoinositol est connu notamment pour être impliqué dans les mécanismes de voies de signalisation de défense des plantes<sup>50</sup>. En outre, ce composé est surtout détecté au sein des échantillons infectés. Le **Tableau III-6** rassemble toutes les molécules qui ont été identifiées par SORI-CID lors de cette étude.

**Tableau III-6 : ensemble des métabolites identifiés par SORI-CID en ESI-FTICRMS. Les composés qui apparaissent en orange sont associés aux acides hydroxycinnamiques, en bleu, aux saccharides ; en vert, aux flavonoïdes et en jaune aux acyle-lipides.**

[M-H]	Identification	[M-H]	Identification
163,04007	acide coumarique	561,08272	myricétine-O-rhamnoside *
179,03498	acide caféique	575,04436	quercétine-O-glucuronide *
179,05611	monosaccharide	591,03927	myricétine-O-glucuronide *
300,99899	acide ellagique	601,13865	trisaccharide *
311,04086	acide caftarique	631,05769	ellagitannin
331,06707	galloylglucose	669,45008	acide phosphatidique 1
333,05922	glycérophosphoinositol	671,46573	acide phosphatidique 2
341,10894	disaccharide	685,48138	méthylphospholipide 1
353,08781	acide chlorogénique	693,45008	acide phosphatidique 3
377,08562	disaccharide + adduit Cl <sup>-</sup>	695,46573	acide phosphatidique 4
409,01776	acide caftarique + adduit phosphate	709,48138	méthylphospholipide 2
439,08584	disaccharide + adduit phosphate	719,48686	phosphatidylglycérol 1
447,09306	quercétine-O-rhamnoside	745,50251	phosphatidylglycérol 2
463,08820	myricétine-O-rhamnoside	793,51412	sulfoquinosyl diacylglycérol 1
477,06746	quercétine-O-glucuronide	815,49847	sulfoquinosyl diacylglycérol 2
493,06238	myricétine-O-glucuronide	837,48282	sulfoquinosyl diacylglycérol 3
545,07018	quercétine-O-rhamnoside *		

\* : adduit phosphate

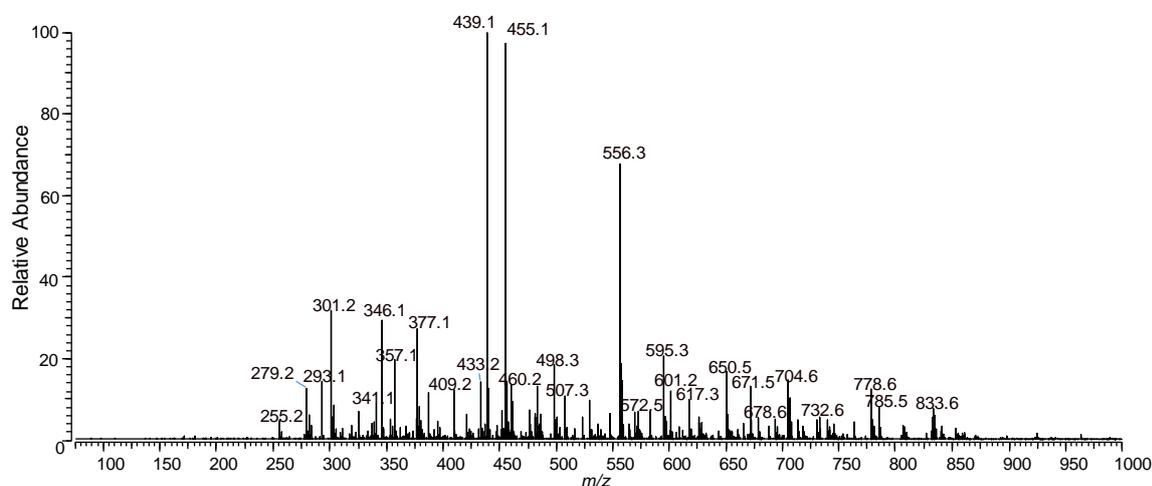
Ces composés sont détectés au sein des spectres MS des échantillons témoins et inoculés. Pour chacun d'entre eux, comme précisé dans les paragraphes précédents, les expériences en SORI-CID ont permis de confirmer les hypothèses d'identification structurale. Connaissant leur masse exacte après calibration, les spectres de fragmentation ont été confrontés aux données disponibles dans la littérature. Certaines propositions demeurent néanmoins des hypothèses, d'autant que certains composés présentent plusieurs isomères.

## 5. Analyse de spores germées lyophilisées

Toutefois, une interrogation demeure lors de l'analyse des feuilles inoculées. Les métabolites observés proviennent-ils exclusivement des feuilles, du mildiou lui-même ou des deux organismes ?

Afin de tenter de répondre à cette question, des analyses de spores germées lyophilisées (préparées par Jean-François CHICH, INRA de Colmar) ont été entreprises. Les résultats pourraient, en outre, permettre de choisir un ou plusieurs ions spécifiques du mildiou en vue d'un suivi de marqueur.

Ces spores germées lyophilisées ont été remis dans 1 mL de méthanol. Les paramètres d'analyse de la source ESI et du spectromètre de masse FTICR ont été conservés. La **Figure III-10** présente l'empreinte spectrale de ces spores obtenue en mode négatif.



**Figure III-10 : empreinte spectrale ESI-FTICRMS en mode négatif obtenue pour les spores germées lyophilisées.**

Dans une gamme de 250 à 850 Da, cette empreinte est riche et par conséquent très complexe. Certains ions semblent être communs à ceux détectés au sein des extraits de feuilles de vigne. C'est le cas des ions  $m/z$  341, 439 et 601. Leur masse exacte est associée respectivement à un disaccharide déprotoné, un disaccharide avec un adduit chlorure et un trisaccharide avec un adduit phosphate. La fragmentation de ces ions a conduit aux mêmes spectres de fragmentations que ceux obtenus avec les extraits de feuilles. Ceci n'est pas étonnant puisque le pathogène requiert les sucres de la plante pour son développement. La présence d'acide gras,  $m/z$  255 (C16:0), 279 (C18:2) est remarquable. Cependant, les ions caractéristiques de l'empreinte spectrale des spores germées ne sont pas observables dans les profils des extraits inoculés. Les ions détectés au sein de ces extraits proviennent majoritairement des feuilles. Des analyses complémentaires pourraient permettre d'identifier un nombre plus important de métabolites mais elles nécessiteront davantage de ce matériel difficile à cultiver *in-vitro*.

## 6. Etude statistique

Pour cette étude, 576 spectres de masse ont été acquis : 96 spectres d'échantillons inoculés et 96 spectres d'échantillons témoins, à chaque fois enregistrés en trois répliques. Une telle quantité de signaux rend toute étude comparative impossible par de simples observations. Il est donc nécessaire d'utiliser un outil statistique afin de dégager des conclusions sur ces travaux.

Les analyses en métabolomique sont souvent associées à des études statistiques multivariées. L'analyse en composantes principales (ACP) fait partie de ces méthodes statistiques. Cet outil transforme des variables liées entre elles (dites corrélées) en de nouvelles variables décorréelées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales ». L'ACP projette suivant deux axes (ou trois dans le cas de 3 variables décorréelées) les tendances qui représentent le mieux le comportement des échantillons entre eux. Elle met ainsi en évidence les ressemblances ou dissemblances sur l'ensemble d'une population.

L'analyse en composantes principales a été réalisée sur une matrice hybrides/rapports  $m/z$  (respectivement observations et variables). Cette partie décrit le traitement des données, la sélection des ions marqueurs et les résultats obtenus en analyse en composantes principales.

### 6.1. Traitements des données

Les amplitudes relatives des ions sélectionnés pour l'étude statistique (décrits à partir du point suivant) ont été extraites de chacun des 576 spectres de masse à partir du logiciel Omega.

Une première normalisation des données est appliquée sur les intensités relatives reposant sur l'utilisation du courant ionique total. En effet, chaque spectre de masse possède un courant ionique total propre qui correspond à la somme de toutes les amplitudes relatives de chaque ion. Ainsi, en divisant l'intensité du signal de l'ion par le TIC du spectre dont il est issu, c'est sa contribution relative dans chaque spectre qui est prise en compte.

Une deuxième normalisation met en jeu le rapport de matière sèche par rapport au volume de solvant de chaque échantillon (noté  $P/S$ ). En effet, certains échantillons ont subi une évaporation partielle de solvant durant leur conservation. Dans ces cas, il a été nécessaire de réajuster le volume avec du méthanol. Cette correction permet ainsi de tenir compte de ces effets de dilution.

Enfin, afin de moyenner les données massiques de chaque échantillon, les spectres ont été acquis systématiquement en trois répliques.

Finalement l'**Équation 1** résume le traitement appliqué à chaque ion.

**Équation 1 : formule de normalisation appliquée pour un ion issu de 3 spectres de masse (3 répliques) d'un échantillon.**

$$\text{Intensité moyenne normalisée} = \left( \frac{I_1}{TIC_1} + \frac{I_2}{TIC_2} + \frac{I_3}{TIC_3} \right) \frac{1}{3} \times \frac{S}{P}$$

## 6.2. Sélection des ions marqueurs

Dans le but de mener une analyse statistique sur l'ensemble des échantillons, il a fallu dégager une liste d'ions marqueurs pour constituer les variables de l'ACP. Le **Tableau III-7** liste l'ensemble des 19 rapports  $m/z$  sélectionnés.

**Tableau III-7 : liste des 19 ions marqueurs sélectionnés pour l'étude statistique de la population 41528.**

Composés	$m/z$ mesuré	$m/z$ théorique	Erreur (ppm)	Formule moléculaire	Ions marqueurs
monosaccharide*	277,0329	277,0330	0,4	$C_6H_{14}O_{10}P^-$	277
acide coutarique	295,0460	295,0459	0,2	$C_{13}H_{11}O_8^-$	295
glycérophosphoinositol	333,0592	333,0592	0,1	$C_9H_{18}O_{11}P^-$	333
acide chlorogénique	353,0877	353,0878	0,3	$C_{16}H_{17}O_9^-$	353
acide caftarique*	409,0176	409,0178	0,4	$C_{13}H_{14}O_{13}P^-$	409
disaccharide*	439,0857	439,0858	0,3	$C_{12}H_{24}O_{15}P^-$	439
quercétine-O-rhamnoside	447,0931	447,0933	0,4	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447
myricétine-O-rhamnoside	463,0883	463,0882	0,2	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$	463
quercétine-O-glucuronide	477,0673	477,0675	0,3	$C_{21}H_{17}O_{13}^-$	477
myricétine-O-glucuronide	493,0623	493,0624	0,2	$C_{21}H_{17}O_{14}^-$	493
non identifié 1	513,1230	513,1226	0,8	$C_{15}H_{30}O_{17}P^-$	513
trisaccharide*	601,1388	601,1387	0,2	$C_{18}H_{34}O_{20}P^-$	601
ellagitannin 1	631,0574	631,0577	0,5	$C_{27}H_{19}O_{18}^-$	631
acide phosphatidique 1	671,4653	671,4657	0,6	$C_{37}H_{68}O_8P^-$	671
acide phosphatidique 2	693,4493	693,4501	1,1	$C_{39}H_{66}O_8P^-$	693
phosphatidylglycérol 1	719,4863	719,4869	0,8	$C_{38}H_{72}O_{10}P^-$	719
phosphatidylglycérol 2	745,5029	745,5025	0,5	$C_{40}H_{74}O_{10}P^-$	745
sulfoquinovosyl diacylglycérol 1	793,5145	793,5141	0,5	$C_{41}H_{77}O_{12}S^-$	793
sulfoquinovosyl diacylglycérol 2	815,4982	815,4985	0,3	$C_{43}H_{75}O_{12}S^-$	815

\* : adduit phosphate

Toutes les familles de molécules identifiées sont représentées au sein cette liste : les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, les sucres, les flavonoïdes, les acyle-lipides en plus d'un ellagitannin et d'un composé encore non attribué. Ces ions ont été choisis suivant leur abondance relative. Toutefois, ils présentaient des comportements différents suivant les spectres de masse. Par exemple, les flavonoïdes ainsi que l'ion  $m/z$  513 sont plus intenses au sein des échantillons inoculés alors que le phénomène inverse s'observe pour l'acide chlorogénique et les sucres. Dans le cas des adduits chlorure et phosphate, les intensités normalisées aux ions détectés sous forme

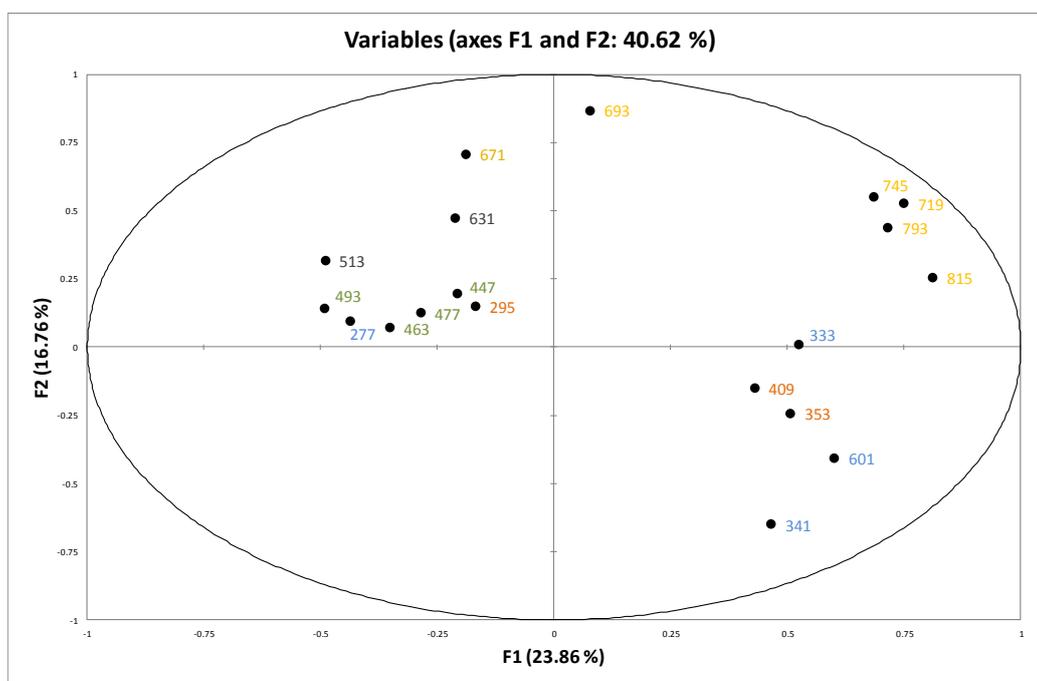
d'adduit sont additionnées avec celles des ions déprotonés. Il serait en effet redondant d'inclure plus d'une fois la contribution d'une même espèce au sein du jeu de variable.

### 6.3. Analyse en composantes principales de la population 41528

Cette ACP dite globale de l'étude comporte une matrice à 19 variables et 96 individus. Ces 19 variables sont associées à la liste des 19 ions marqueurs présentée précédemment. Les 96 individus correspondent aux individus de la population 41528, 48 témoins et 48 inoculés. Les graphiques des variables et individus sont détaillés dans les paragraphes suivants.

#### 6.3.1 ACP des 19 variables

Le graphique de la **Figure III-11** est associé à l'analyse en composantes principales des 19 variables. Il permet notamment d'évaluer la pertinence des marqueurs sélectionnés.



**Figure III-11 : analyse en composantes principales (ACP) des 19 variables. Les acides hydroxycinnamiques apparaissent en orange, les saccharides en bleu, les flavonoïdes en verts, les acyle-lipides en jaune et enfin les espèces non identifiées en gris.**

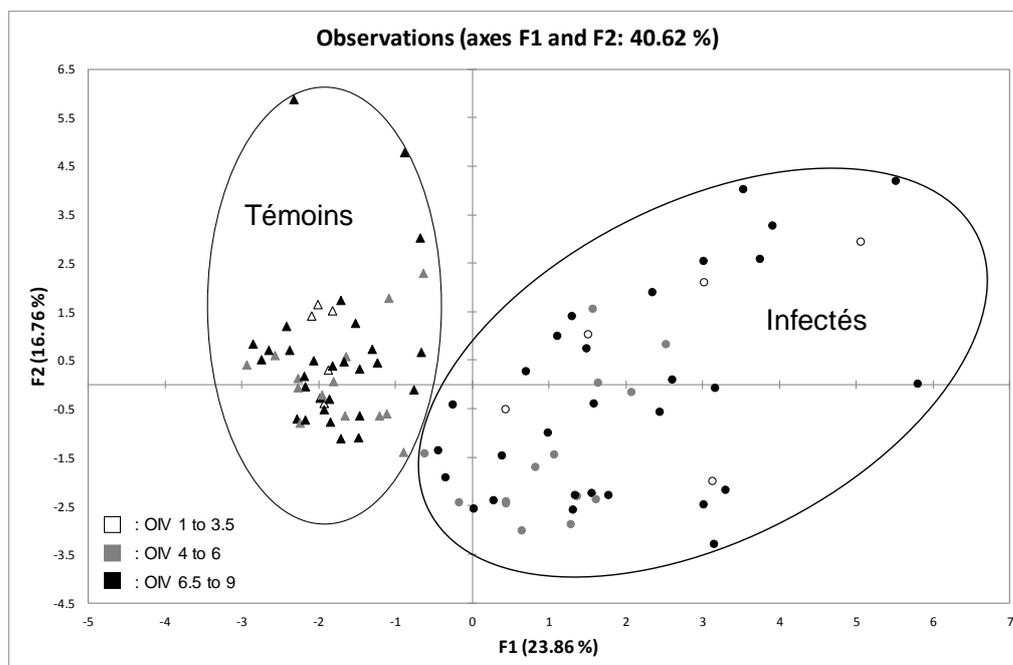
Cette ACP des variables possède un degré de variabilité représentée de 40,62 %. Plusieurs observations viennent à l'esprit lors de la visualisation de ce graphique. Les flavonoïdes tout d'abord, sont peu corrélés au reste des molécules étudiées. Ils n'expliquent pas ou très peu les composantes F1 & F2. Parmi les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, seuls les ions  $m/z$  353 (acide chlorogénique) et  $m/z$  409 (acide caftarique) montre des comportements significatifs ; ils sont fortement projetés sur l'axe F1. Ce dernier est d'ailleurs supporté en majeure partie par le

glycérophosphoinositol ( $m/z$  333), les phosphatidylglycérols ( $m/z$  719 et 745) et les sulfoquinovosyl diacylglycérols ( $m/z$  793 et 815). Les acides phosphatidiques ( $m/z$  671 et 693) sont quant à eux fortement projetés sur l'axe F2.

Ces ACP permettent de dégager une première tendance. Les molécules qui discriminent le plus les échantillons témoins des inoculés sont associées aux saccharides et aux acyle-lipides. Les flavonoïdes n'apportent quant à eux pas beaucoup de dispersion. Ils ont néanmoins été conservés pour l'ACP des individus puisque ce sont les principaux représentants des signaux relevés des empreintes spectrales des échantillons témoins.

### 6.3.2 ACP des 96 individus

Pour tirer l'ensemble des informations d'une ACP, il convient d'observer également l'analyse en composantes principales des individus (**Figure III-12**).



**Figure III-12** : ACP des 96 individus (48 paires d'hybrides) selon les composantes F1 et F2. Les échantillons témoins sont représentés en triangle et les infectés en cercle. Les symboles non remplis correspondent aux hybrides sensibles au mildiou ( $1 \leq$  index OIV  $\leq 3,5$ ), la couleur grise aux hybrides moyennement résistants ( $4 \leq$  index OIV  $\leq 6,5$ ) et enfin la noir aux hybrides très résistants ( $7 \leq$  index OIV  $\leq 9$ ).

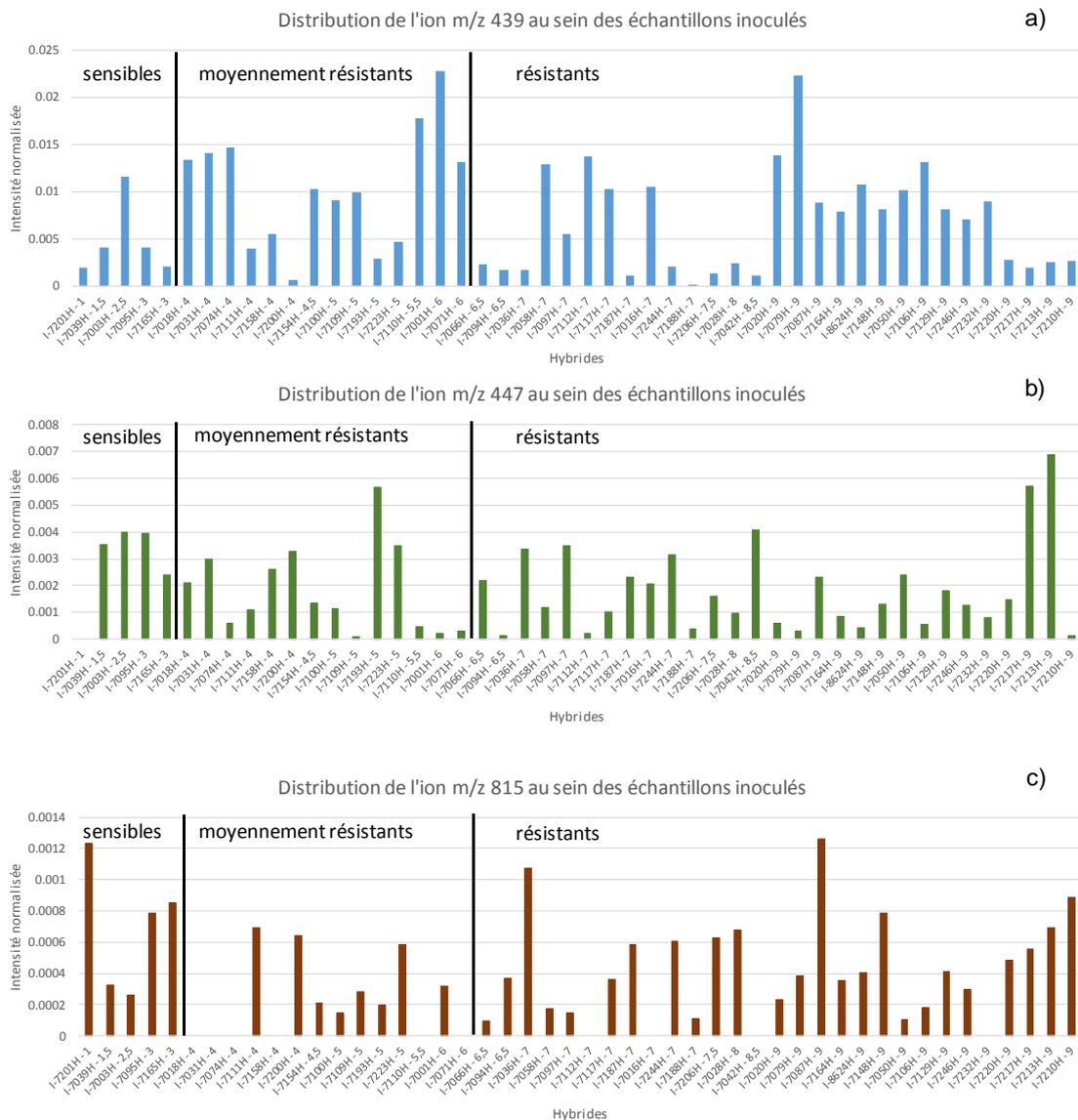
Ce graphique met en évidence un regroupement en deux sous-populations. Les échantillons inoculés (à droite) sont clairement différenciés des échantillons témoins (à gauche). Ainsi, l'axe F1 semble être associé à l'infection puisque la ségrégation des échantillons est opérée suivant ce dernier. Il représente d'ailleurs la variance la plus importante avec 23,86 %. Ces résultats confirment les tendances décrites précédemment notamment avec les ACP par variables.

L'importance de certains métabolites dans ce classement est en bon accord avec certaines études montrant notamment que l'accumulation de saccharose pourrait éliciter les défenses chez la plante<sup>50</sup>. Il a été de même décrit que des concentrations importantes en saccharose promeuvent la biosynthèse des phénylpropanoïdes qui induisent à leur tour la synthèse de métabolites de défense telles que les stilbènes chez le lupin<sup>51</sup> et, in vitro, dans les cellules de vigne en culture<sup>52</sup>. Les phospholipides quant à eux sont connus pour intervenir dans les voies de signalisation des mécanismes de défense de la plante<sup>53</sup>.

Cependant, aucun classement n'apparaît en fonction du nombre OIV des hybrides. Les échantillons inoculés sensibles (ronds blancs) montrent des comportements similaires à ceux des échantillons inoculés très résistants (ronds noirs). Ainsi, les génotypes sensibles ne peuvent pas être clairement distingués des ceux résistants. Ces observations conduisent à penser que le rôle de ces 19 métabolites dans l'infection par le mildiou semble être davantage associé à des mécanismes de défenses plutôt qu'à un phénomène de résistance proprement dit.

#### 6.4. Histogramme par métabolites en fonction de l'OIV

Afin d'analyser plus finement la distribution de quelques métabolites remarquables au sein de la population, des graphiques ont été générés pour chacun des 19 métabolites. La **Figure III-13** présente trois histogrammes, avec un représentant des sucres, des flavonoïdes et des acyl-lipides.



**Figure III-13 : distribution des intensités normalisées de trois ions au sein des échantillons inoculés, (a)  $m/z$  439 (disaccharide + adduit phosphate), (b)  $m/z$  447 (quercétine-O-rhamnoside) et (c)  $m/z$  815 (sulfoquinovosyl diacylglycéril). Sur chaque histogramme sont délimitées trois zones : celle des hybrides sensibles, celle des hybrides moyennement résistants et celle des hybrides résistants.**

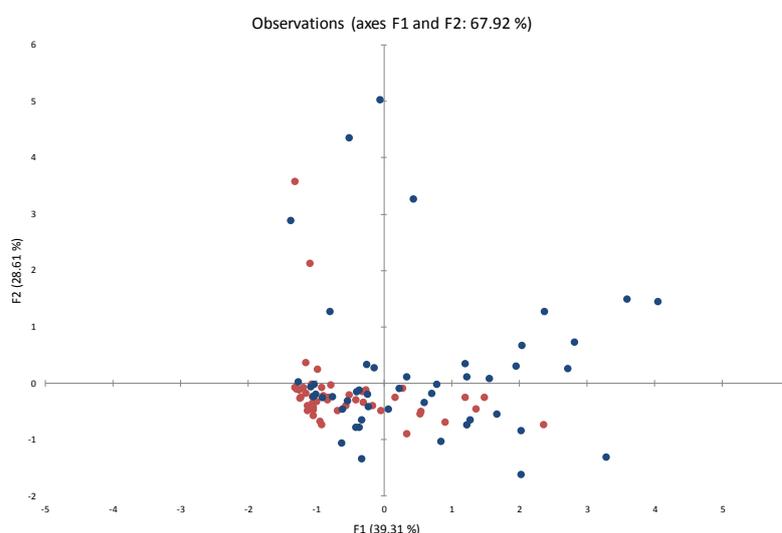
Aucun comportement spécifique ne se dégage à l'observation de ces trois histogrammes. Le niveau de résistance des hybrides n'influe pas sur les intensités relatives de ces ions. Les intensités des ions sont distribuées de manière aléatoire. Du point de vue des intensités maximales, c'est logiquement l'ion  $m/z$  439 qui présente les intensités relatives les plus intenses. La présence du sulfoquinovosyl ( $m/z$  815) est plus disparate au sein des échantillons inoculés mais l'intensité maximale est plus importante que celle du flavonoïde sélectionné ( $m/z$  447). Ceci confirme l'absence de groupements au sein de l'ACP des individus en fonction du nombre OIV. Des

comportements similaires sont observés pour l'ensemble des 19 ions marqueurs, quelle que soit la famille métabolique à laquelle appartient l'ion.

### 6.5. ACP par variables

Ces ACP par variables ont été réalisées dans le but d'observer avec plus de précision le rôle de chaque famille de molécules dans la ségrégation des individus. Les trois familles les plus remarquables ont été testées : les flavonoïdes, les sucres et les acyle-lipides.

La **Figure III-14** présente l'ACP des 192 individus avec les flavonoïdes. Dans ce cas, les rapports  $m/z$  sélectionnés en tant que variables sont les ions  $m/z$  447, 463, 477, 493. Les intensités normalisées des ions avec un adduit phosphate ont été additionnées avec celles des ions déprotonés associés.



**Figure III-14** : ACP des 96 individus avec quatre variables associées aux flavonoïdes ( $m/z$  447, 463, 477 et 493). Les échantillons témoins sont représentés en bleu et les inoculés apparaissent en rouge.

Cette ACP avec les flavonoïdes présente un degré de variabilité représentée qui s'élève à 67,92 %. Cependant la variabilité des seuls flavonoïdes ne permet pas de séparer les échantillons témoins des échantillons inoculés et encore moins de voir apparaître la raison d'une résistance (pas de regroupement selon l'échelle OIV). De nombreux échantillons témoins et inoculés restent regroupés ensemble près du centre du graphique.

La **Figure III-15** présente l'ACP des 96 individus avec les sucres. Les rapports  $m/z$  sélectionnés comme variables sont les ions  $m/z$  277, 341 et 601, correspondant respectivement aux mono- di- et trisaccharides. Ici également, les contributions du disaccharide sous ses 3 formes détectées (déprotonée, adduit chlore et adduit phosphate) ont été additionnées.

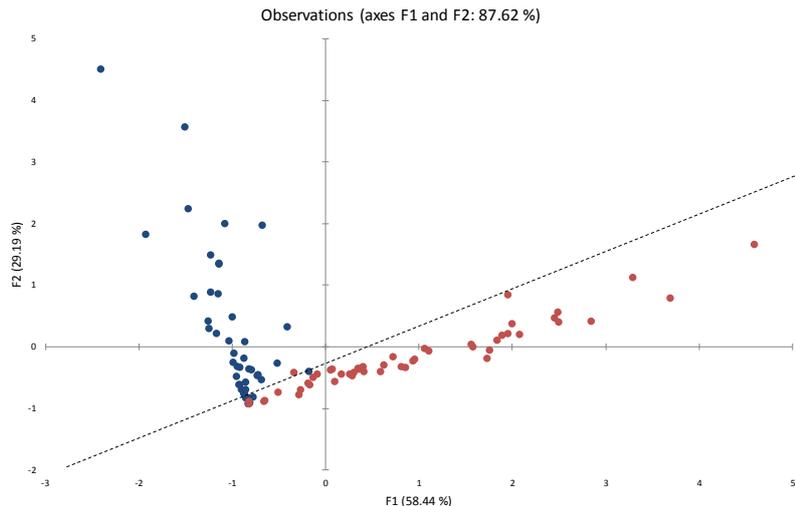


Figure III-15 : ACP des 96 individus avec comme variables les sucres ( $m/z$  277, 341 et 601). Les échantillons témoins sont représentés en bleu et les inoculés apparaissent en rouge.

L'ACP avec les saccharides seuls permet de constater des regroupements entre les échantillons témoins et inoculés. Le degré de variabilité est également plus important ici, il est égal à 87,62 %. Ceci confirme l'observation émise notamment à l'encontre du disaccharide au sein des empreintes spectrales. Cet ion (sous ses différentes formes détectées) paraissait être davantage exprimé dans les échantillons inoculés.

Enfin, l'ACP effectué sur les acyle-lipides est présentée en **Figure III-16**. Elle inclut les 3 sous-familles de lipides : les acides phosphatidiques ( $m/z$  671 et 693), les phosphatidylglycérols ( $m/z$  719 et 745) et les SQDG ( $m/z$  793 et 815).

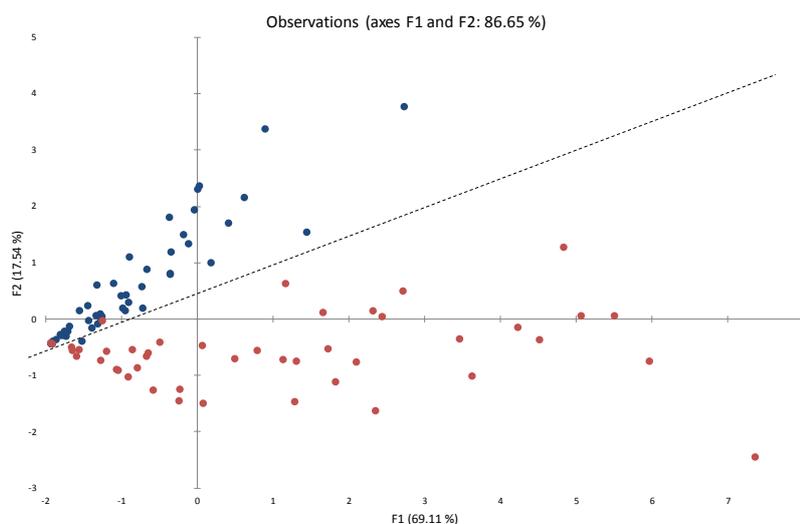


Figure III-16 : ACP des 96 individus avec comme variables les lipides ( $m/z$  671, 693, 719, 745, 793 et 815). Les échantillons témoins sont représentés en bleu et les inoculés apparaissent en rouge.

Tout comme pour les sucres, les lipides conduisent à une ségrégation entre les échantillons témoins et inoculés (à deux échantillons près). Ici également, ce n'est pas surprenant puisque ces espèces ont été détectées de façon intense dans la plupart des échantillons inoculés. La séparation observée entre les deux sous-populations s'opère suivant un axe similaire à celui des sucres (**Figure III-15**). Le degré de variabilité est égal à 86,65 %.

Ces trois ACP par variables confirment le fait que les sucres et les acyle-lipides sont responsables de la ségrégation observée sur l'ensemble de la population 41528.

## 7. Conclusion de l'étude ESI-FTICRMS

Lors de l'analyse de la population 41528, une quarantaine de métabolites a pu être identifiée par infusion directe électrospray en mode négatif. Différentes familles de métabolites ont été mises en évidence : les dérivés d'acides hydroxycinnamique, les saccharides, les flavonoïdes et enfin les acyle-lipides en haute masse. Ces attributions ont été confirmées dans la plupart des cas par MS/MS. L'analyse en composantes principales a permis d'observer une ségrégation entre les individus témoins et les individus infectés par le mildiou. Une analyse fine des données MS tend à confirmer que les ions marqueurs sont plutôt impliqués dans la défense que dans la résistance. En effet, ces marqueurs apparaissent aussi bien au sein des géotypes sensibles qu'au sein de ceux résistants.

Cependant, certains métabolites ne sont pas accessibles en infusion directe, notamment à cause du phénomène de compétition à l'ionisation. Les stilbènes par exemple, ne sont pas observés alors qu'ils sont synthétisés suite à l'infection de *Plasmopara viticola*. L'une des possibilités pour accéder à davantage de métabolites est d'ajouter une étape de séparation avant l'analyse en masse. L'utilisation du couplage LC-MS pour le profilage d'un extrait méthanolique constitue dès lors l'objet du point suivant. Cependant le développement d'une méthode chromatographique demande du temps, et surtout, les temps d'analyses sont bien plus longs. En infusion directe, l'analyse d'un échantillon dure 2 min (temps de rinçage compris) contre une heure en couplage, sans compter le temps de rééquilibrage.

## 8. Analyse d'un extrait de feuille de vigne de l'étude par LC-ITMS

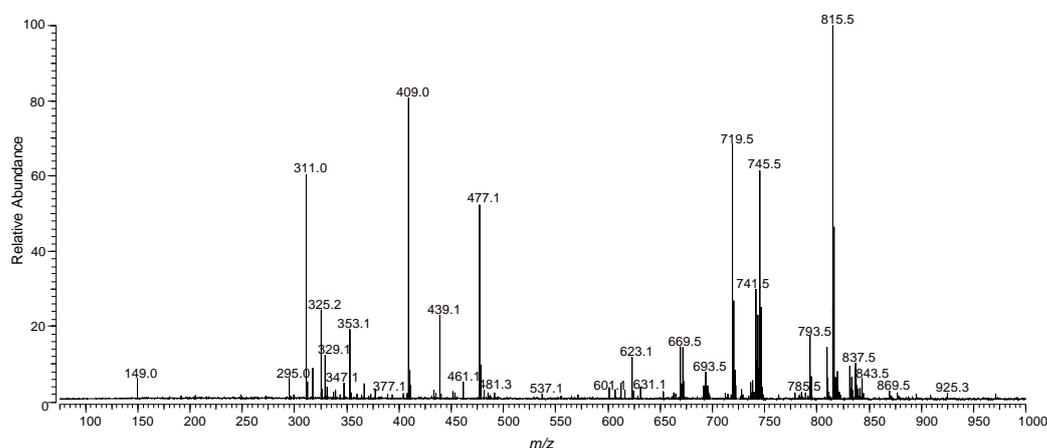
Si elle demande plus de temps qu'une simple infusion, l'analyse non ciblée par LC-ITMS (« profiling » ou encore « screening ») doit permettre d'accéder à un nombre plus important de métabolites par rapport à l'infusion directe. Outre l'avantage de pouvoir séparer les isomères, la

chromatographie peut fortement diminuer les phénomènes de compétition à l'ionisation (suppression ionique), un point crucial lors de l'analyse de matrices complexes.

Cette partie comportera uniquement l'analyse d'un seul échantillon. Les raisons en sont multiples, au premier rang desquelles on peut citer le manque d'échantillons. En effet, à l'arrivée du spectromètre au laboratoire, beaucoup de couples d'échantillon « témoin-infecté » n'étaient plus disponibles pour une étude complète. La plupart des témoins restant ont été utilisés comme « matrice blanche » pour le dosage des stilbènes qui sera utilisé à l'appui d'expériences en imagerie et présenté ultérieurement dans ce manuscrit (**Chapitre IV**). L'objectif de l'analyse qui est présentée ici est de fournir un ordre de grandeur du nombre de métabolites détectés et identifiés par rapport à l'infusion en ESI-FTICRMS.

### 8.1. Profil métabolique ESI-FTICRMS d'un extrait inoculé de la population 41528

Un extrait de feuille de vigne infectée, sensible (OIV 3), issu du jeu d'échantillons de la population 41528 a été sélectionné pour cette étude. Avant l'analyse en couplage, il est intéressant d'infuser cet échantillon en ESI-FTICRMS afin d'avoir une empreinte spectrale de référence. Pour rester cohérent avec l'ensemble de l'étude de la population 41528, ces analyses ne seront effectuées uniquement en mode négatif. Le spectre de masse de cet échantillon obtenu en infusion direct est présenté en **Figure III-17**.



**Figure III-17** : spectre de masse obtenu en infusion directe par ESI-FTICRMS en mode négatif d'un extrait de feuille de vigne inoculé (OIV 3).

Ce spectre en infusion directe montre une présence importante des acyle-lipides ( $m/z$  669, 719, 745, 793, 815 et 837). Deux acides hydroxycinnamiques ( $m/z$  311 et 409) sont détectés intensément, l'ion présentant le rapport  $m/z$  le plus faible est associé à l'acide tartrique. Le

représentant le plus intense des flavonoïdes est l'ion  $m/z$  477, associé à la quercétine-O-glucuronide. Enfin, le disaccharide avec son adduit phosphate est détecté ( $m/z$  439).

## 8.2. Profiling LC-MS/MS d'un extrait inoculé de la population 41528

Cet échantillon a été ensuite analysé par couplage LC-ITMS par une méthode reposant sur un gradient linéaire de 60 minutes. Les paramètres de séparation et de sources sont décrits ci-après.

### 8.2.1 Paramètres d'analyse

La séparation est faite sur une colonne Waters Symmetry Shield, phase inverse C18, de diamètre interne de 3,5 mm et de dimensions 4,6 mm x 50 mm. Cette phase stationnaire implique des interactions de type hydrophobes. Si on peut s'attendre à ce que les sucres par exemple ne soient pas retenus sur ce support, la chromatographie de partage à polarité de phases inversée est classiquement utilisée pour balayer le contenu d'échantillon présentant à la fois des analytes polaires et apolaires. Les premiers sont retenus grâce une forte proportion d'eau dans la phase mobile et les seconds pourront être élués en présence d'une forte proportion de phase organique (acétonitrile la plupart du temps). Le gradient d'éluion permettra d'augmenter la force éluante au cours du temps et sa pente sera relativement douce pour un maximum de résolution.

#### Paramètres de séparation :

Un gradient linéaire a été programmé avec les voies A (H<sub>2</sub>O) et B (ACN). Le four de la colonne est maintenu à 40 °C, le débit est fixé à 500  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$ .

Gradient : 0 min : 5 % B ; 55 min 100 % B ; 60 min 100 % B

#### Paramètres de source :

Température de source : 400 °C

Sheath Gas (a.u.) : 60

Auxiliary Gas (a.u.) : 20

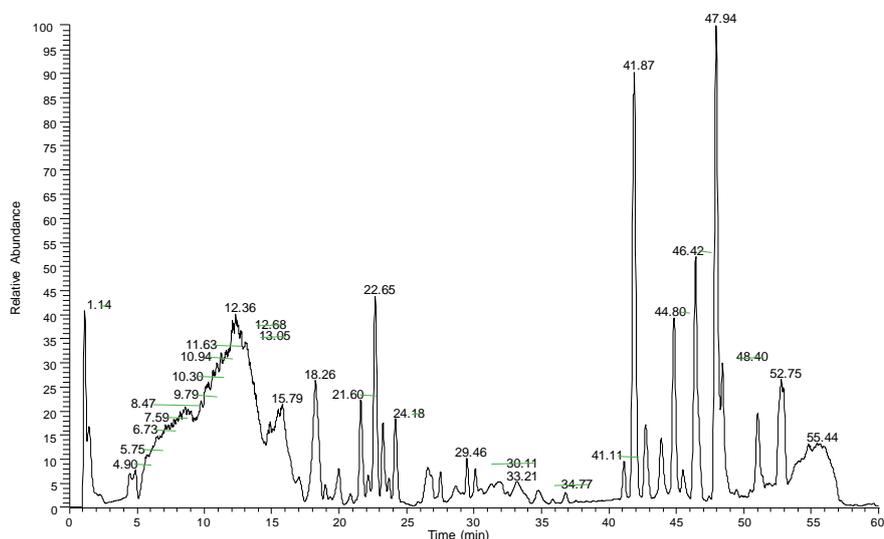
Sweep gaz flow (a.u.) : 5

Tension de spray : - 4,5 kV

Température du capillaire : 380 °C

## 8.2.2 Résultats

Le piège ionique est configuré pour analyser deux événements. Le premier est le balayage  $m/z$  en « full MS » et le deuxième concerne la fragmentation des 10 ions les plus intenses lorsqu'un seuil d'intensité est dépassé. Le chromatogramme obtenu est présenté en **Figure III-18**.



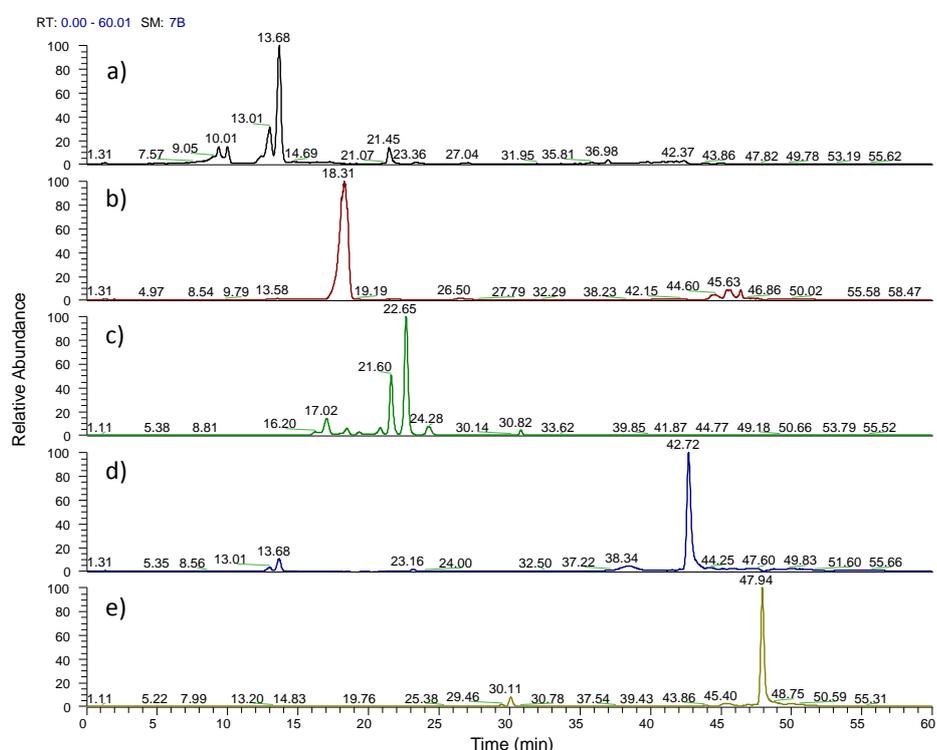
**Figure III-18** : chromatogramme LC-ITMS d'un échantillon inoculé obtenu avec une colonne C18 en phase inverse. Le four de la colonne est maintenu à 40 °C, le débit fixé à 500  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$ . Un gradient linéaire est opéré avec les voies A ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et B (ACN) pendant 60 min : 0 min : 5 % B ; 55 min 100 % B ; 60 min 100 % B. Le TIC (Total Ion Current) représenté est associé au full scan de cette analyse.

Environ 130 signaux correspondant à 90 rapports  $m/z$  ont été extraits de ce chromatogramme contre environ 40 rapports  $m/z$  en infusion ESI-FTICRMS. Quatorze métabolites ont été détectés en commun avec ces deux techniques. L'**Annexe I** présente la liste des ions détectés avec leurs temps de rétention, leurs fragments (lorsque l'intensité du signal l'a permis) ainsi que leurs identifications potentielles correspondantes. Cependant, le travail d'attribution restant est conséquent. Si les données de fragmentation (parfois abondantes) ne sont pas référencées dans la littérature, l'attribution n'est pas aisée. Qui plus est, avec la perte de la haute résolution de la FTICRMS, les données sur les compositions élémentaires des ions et des fragments ne sont plus accessibles.

Comme on peut s'y attendre, le pic chromatographique correspondant au temps mort contient entre-autre les sucres, des composés très polaires. L'ion le plus intense de cette région du chromatogramme est associé à l'acide tartrique,  $m/z$  149. Ce composé est également présent dans le spectre d'infusion directe (**Figure III-17**). Le deuxième pic est un massif très large s'étendant de 4,90 à 14,40 min. Il comporte un continuum de composés qui sont élués au fur et à mesure de l'augmentation du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile. La présence d'un seul

flavonoïde, l'ion  $m/z$  477, correspondant à la quercétine-O-glucuronide, est cohérente avec l'empreinte spectrale ESI-FTICRMS. L'acide chlorogénique, l'ion de rapport  $m/z$  353 est élué à 9,45 minutes.

Cette expérience a permis, en outre, de détecter une toute nouvelle famille de métabolites non accessible jusqu'à présent en infusion : les stilbènes. Ces composés n'étaient pas détectés en ESI-FTICRMS à cause d'un phénomène de compétition à l'ionisation<sup>1</sup>. Or, comme décrit lors au **Chapitre I**, ces composés de défense sont synthétisés de façon abondante lorsque la feuille est infectée par *Plasmopara viticola*. La **Figure III-19** présente les chromatogrammes des stilbènes détectés pour cet échantillon.



**Figure III-19** : chromatogrammes des différents stilbènes détectés en full scan au sein de l'échantillon inoculé : (a) picéides (ion extrait  $m/z$  389), (b) picéatannol (ion extrait  $m/z$  243), (c) viniférines (ion extrait  $m/z$  453), (d) resvératrol (ion extrait  $m/z$  227) et (e) ptérostilbène (ion extrait  $m/z$  255). Conditions chromatographiques identiques à la Figure III-18.

Plusieurs stilbènes sont détectés par couplage LC-MS au sein de cet échantillon. Leur identification a été confirmée d'une part avec les temps de rétention et d'autre part avec la fragmentation de leur standard associé. Le *trans*-picéide, le plus polaire avec sa substitution glycosidique, présente logiquement le temps de rétention le plus faible : 13,68 min. La présence d'un pic au temps de rétention 13,01 min (**Figure III-19 (a)**) atteste de la présence de son isomère, le *cis*-picéide. Après les picéides, c'est le picéatannol qui est élué avec un temps de 18,31 min (**Figure III-19 (b)**). Ce

composé est décrit dans la littérature comme étant surtout présent au sein des raisins<sup>54</sup> mais il n'est pas impossible que ce stilbène soit également présent dans les feuilles. Les viniférines donnent lieu à 4 pics chromatographiques. Les deux premiers à 17,02 et 18,07 min sont respectivement associés à la *cis*- et *trans*- $\epsilon$ -viniférine. Les deux pics suivants à 21,60 et 22,65 min sont quant à eux respectivement associés à la *trans*- et à *cis*- $\delta$ -viniférine (**Figure III-19 (c)**). L'ordre d'éluion des différents isomères de viniférines a été démontré par Pezet *et al.* sur une colonne C18<sup>34</sup>. Le resvératrol, stilbène phare de la vigne, repéré sur le chromatogramme d'ion extrait à  $m/z$  227, est élué à 42,72 min (**Figure III-19 (d)**). Enfin, avec ces deux groupements méthyle supplémentaires, le ptérostilbène est le plus apolaire de ces stilbènes, son temps de rétention est à 47,94 min (**Figure III-19 (e)**). En termes d'intensité de signal des spectres de masse, c'est le ptérostilbène qui est le plus intense ( $6,45 \cdot 10^5$  a.u.), le picéide étant le moins intense ( $2,95 \cdot 10^4$  a.u.).

Les acyle-lipides, fortement abondants sur l'empreinte spectrale ESI-FTICRMS, sont détectés après 40 min. L'ion  $m/z$  815 en particulier, associé à un sulfoquinovosyl diacylglycérol déjà observé en ESI-FTICRMS, présente un pic chromatographique à 53,67 min.

### 8.2.3 Conclusion sur le profiling LC-ITMS

Ce type d'expérience LC-MS/MS permet d'obtenir un nombre de signaux plus élevé qu'en simple infusion avec cependant, une méthode d'analyse plus longue (60 min sans prendre en compte le temps de rééquilibrage de la colonne). La quantité de données nécessite un temps de traitement également plus important. Mais cette expérience a permis de mettre en évidence les stilbènes de la vigne jusqu'ici non détectés. Cette analyse préliminaire de couplage chromatographique avec le piège à ions permet de montrer l'accroissement de l'information qui en résulterait pour l'étude menée.

Toutefois, de nombreux rapports  $m/z$  demeurent sans attribution. A titre d'hypothèse, on peut penser que certains d'entre eux proviennent du mildiou lui-même. Pour le vérifier, il faudrait confronter les analyses d'un extrait de feuille de vigne témoin avec celle d'un échantillon de spores germées lyophilisées. L'échantillon de spores germées n'était hélas plus disponible lorsque ces analyses LC-MS ont été conduites. Le nombre de métabolites détectés et identifiés pourrait encore s'accroître avec un appareillage de type Orbitrap, mais le laboratoire n'en est pas équipé pour l'instant. L'apport de la haute résolution de ce type de spectromètre pourrait faciliter considérablement les attributions de composés.

## 9. Conclusion

De ces expériences, le but était d'utiliser la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier dans une approche type métabolomique, même si seul le mode négatif a été exploré. Dans cette optique, des extraits méthanoliques de feuilles de vigne ont été analysés. Ces derniers sont issus d'une population phénotypée d'hybrides pour résister au mildiou, présentant des degrés de résistance divers au pathogène a été étudiée. Le brassage génétique a généré une variabilité importante des degrés de résistance au sein de la population 41528.

Une quarantaine de métabolites ont été identifiés par ESI-FTICRMS. Les assignations de structures moléculaires ont été confirmées par des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Quatre grandes familles se sont dégagées lors de ces identifications : les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, les saccharides, les flavonoïdes et les acyle-lipides. Les résultats obtenus ont montré que ces analyses en routine rapides étaient suffisamment informatives pour différencier des échantillons entre eux. L'analyse en composantes principales des 19 ions marqueurs a ainsi permis d'observer une ségrégation entre les échantillons inoculés et les échantillons témoins. Ces marqueurs sont vraisemblablement impliqués dans les mécanismes de défense ou de voie de signalisation mais n'expliquent pas la résistance des feuilles à *Plasmopara viticola*. Les feuilles de vignes témoins ont montré des taux relatifs élevés de flavonoïdes glycosylés. En revanche, les saccharides (principalement le disaccharide) ainsi que les lipides ont vu leur abondance relative fortement augmenter au sein des échantillons inoculés. Ce phénomène peut être attribué à la présence du pathogène qui dégrade une partie du matériel cellulaire. Les sulfoquinovosyl diacylglycérols, molécules peu décrites dans la littérature, apparaissent clairement comme des métabolites favorisant la défense de la plante. Ce point méritera cependant des investigations supplémentaires.

Enfin pour terminer cette étude, un échantillon infecté de la population 41528 a été analysé en couplage LC-MS. Un nombre de données important a pu être enregistré lors de ce gradient linéaire de 60 minutes. La présence de plusieurs ions observés en infusion ESI-FTICRMS a pu être confirmée par LC-ITMS, et en particulier grâce aux expériences MS/MS. En outre, les stilbènes, jusqu'à présent non accessibles à cause d'un phénomène de compétition à l'ionisation, ont pu être observés. Ainsi, le resvératrol, le picéatannol, le ptérostilbène, les picéides ainsi que les viniférines ont été détectés, parfois sous différentes formes isomériques. Bien que le temps d'analyse soit long, cette expérience s'est révélée particulièrement informative puisqu'elle a permis de détecter un nombre de métabolites bien plus important qu'en infusion directe, même

s'ils n'ont pas pu être tous identifiés. Enfin, cette méthode chromatographique a servi de point de départ pour le développement d'une méthode de dosage de stilbène, explicitée dans le chapitre suivant, consacré à l'imagerie par spectrométrie de masse.

## 10. Littérature

1. Hamm, G. Recherche par spectrométrie de masse de métabolites intervenant dans la résistance de la vigne aux agressions biotiques et abiotiques ; Thèse de Doctorat. (2010).
2. Becker, L. *et al.* Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray – Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **795**, 44–51 (2013).
3. Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Systems biology: Metabonomics. *Nature* **455**, 1056–1056 (2008).
4. Schripsema, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochem. Anal.* **21**, 14–21 (2010).
5. Heo, S. *et al.* Metabolite fingerprinting of bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) by UPLC-qTOF-MS. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 567–570 (2011).
6. Grata, E. *et al.* UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Chromatogr. B* **871**, 261–270 (2008).
7. Messerli, G. *et al.* Rapid classification of phenotypic mutants of *Arabidopsis* via metabolite fingerprinting. *Plant Physiol.* **143**, 1484–92 (2007).
8. Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J. & Wilson, I. D. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal. Chim. Acta* **711**, 7–16 (2012).
9. Lafaye, A. *et al.* Metabolite profiling in rat urine by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. Application to the study of heavy metal toxicity. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2541–2549 (2003).
10. Tolstikov, V. V. & Fiehn, O. Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **301**, 298–307 (2002).
11. Idborg-Björkman, H., Edlund, P.-O., Kvalheim, O. M., Schuppe-Koistinen, I. & Jacobsson, S. P. Screening of Biomarkers in Rat Urine Using LC/Electrospray Ionization-MS and Two-Way Data Analysis. *Anal. Chem.* **75**, 4784–4792 (2003).
12. Wang, W. *et al.* Quantification of Proteins and Metabolites by Mass Spectrometry without Isotopic Labeling or Spiked Standards. *Anal. Chem.* **75**, 4818–4826 (2003).
13. Plumb, R. S. *et al.* Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences. *Analyst* **128**, 819–823 (2003).
14. Godzien, J. *et al.* Metabolomic Approach with LC-QTOF to Study the Effect of a Nutraceutical Treatment on Urine of Diabetic Rats. *J. Proteome Res.* **10**, 837–844 (2011).
15. Ciborowski, M., Teul, J., Martin-Ventura, J. L., Egado, J. & Barbas, C. Metabolomics with LC-QTOF-MS Permits the Prediction of Disease Stage in Aortic Abdominal Aneurysm Based on Plasma Metabolic Fingerprint. *PLoS ONE* **7**, e31982 (2012).
16. Regal, P. *et al.* Metabolomic approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry to screen for the illegal use of estradiol and progesterone in cattle. *Anal. Chim. Acta* **700**, 16–25 (2011).
17. Dunn, W. B. *et al.* Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *J. Chromatogr. B* **871**, 288–298 (2008).
18. Lenz, E. M., Bright, J., Knight, R., Wilson, I. D. & Major, H. A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using <sup>1</sup>H NMR and HPLC-TOF/MS: time dependant changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. *Analyst* **129**, 535–541 (2004).
19. Williams, R. E., Major, H., Lock, E. A., Lenz, E. M. & Wilson, I. D. d-Serine-induced nephrotoxicity: a HPLC–TOF/MS-based metabonomics approach. *Toxicology* **207**, 179–190 (2005).
20. Dunn, W. B. *et al.* Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **6**, 1060–1083 (2011).

21. Rhourri-Frih, B. *et al.* Classification of natural resins by liquid chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry using chemometric analysis. *J. Chromatogr. A* **1256**, 177–190 (2012).
22. Kim, E. J. *et al.* Metabolite Profiling of *Angelica gigas* from Different Geographical Origins Using <sup>1</sup>H NMR and UPLC-MS Analyses. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 8806–8815 (2011).
23. Gougeon, R. D. *et al.* The chemodiversity of wines can reveal a metabo-geography expression of cooperage oak wood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009).
24. Obata, T. & Fernie, A. R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 3225–3243 (2012).
25. Nielsen, K. F. & Smedsgaard, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *J. Chromatogr. A* **1002**, 111–136 (2003).
26. Parker, D. *et al.* Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant J.* **59**, 723–737 (2009).
27. Boccard, J. *et al.* Standard machine learning algorithms applied to UPLC-TOF/MS metabolic fingerprinting for the discovery of wound biomarkers in *Arabidopsis thaliana*. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **104**, 20–27 (2010).
28. Wang, Y. *et al.* UPLC–Q-TOF-MS/MS fingerprinting of Traditional Chinese Formula SiJunZiTang. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **80**, 24–33 (2013).
29. Wang, C. *et al.* Metabolic profiling of urine in young obese men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). *J. Chromatogr. B* **879**, 2871–2876 (2011).
30. Rodrigues, C. M. *et al.* Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 1907–1914 (2007).
31. Gougeon, R. D. *et al.* Expressing Forest Origins in the Chemical Composition of Cooperage Oak Woods and Corresponding Wines by Using FTICR-MS. *Chem. - Eur. J.* **15**, 600–611 (2009).
32. Lucio, M. *et al.* Insulin Sensitivity Is Reflected by Characteristic Metabolic Fingerprints - A Fourier Transform Mass Spectrometric Non-Targeted Metabolomics Approach. *PLoS One* **5**, e13317 (2010).
33. Pérez-Magariño S, R. I. Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A* **847**, 75–81 (1999).
34. Pezet, R. *et al.*  $\delta$ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5488–5492 (2003).
35. Daayf, F. *et al.* in *Recent Adv. Polyphenol Res.* 191–208 (Wiley-Blackwell, 2012).
36. Kostianen, R. & Kauppila, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 685–699 (2009).
37. Major, H. J., Williams, R., Wilson, A. J. & Wilson, I. D. A metabonomic analysis of plasma from Zucker rat strains using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3295–3302 (2006).
38. Plumb, R. S. *et al.* The detection of phenotypic differences in the metabolic plasma profile of three strains of Zucker rats at 20 weeks of age using ultra-performance liquid chromatography/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2800–2806 (2006).
39. Li, H., Song, F., Zheng, Z., Liu, Z. & Liu, S. Characterization of saccharides and phenolic acids in the Chinese herb Tanshen by ESI-FT-ICR-MS and HPLC. *J. Mass Spectrom.* **43**, 1545–1552 (2008).
40. Jackson, R. S. *Wine Science : Principles and Applications (third edition)*. (2008).
41. Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E. & Quetin-Leclercq, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 707–715 (2001).
42. Hamilton, R. J. *Trans Fatty Acids : structure, occurrence, nomenclature, biosynthesis and properties*. (John Wiley & Sons, 2008).

43. Koussa, T., Dubos, B. & Cherrad, M. Les teneurs en acides gras, en eau et en acide abscissique des feuilles de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon) infectées par *Eutypa lata*. *Vitis* **41**, 143–146 (2002).
44. Testerink, C. & Munnik, T. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* **10**, 368–375 (2005).
45. Hsu, F. F., Turk, J., Williams, T. D. & Welti, R. Electrospray ionization multiple stage quadrupole ion-trap and tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylglycerol from *Arabidopsis* leaves. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 783–790 (2007).
46. Welti, R., Wang, X. & Williams, T. D. Electrospray ionization tandem mass spectrometry scan modes for plant chloroplast lipids. *Anal. Biochem.* **314**, 149–152 (2003).
47. Roughan, P., Slack, C. & Holland, R. Generation of phospholipid artefacts during extraction of developing soybean seeds with methanolic solvents. *Lipids* **13**, 497–503 (1978).
48. Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., Cabral, M. & de Freitas, V. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. *Food Chem.* **125**, 1398–1405 (2011).
49. Sandhu, A. K. & Gu, L. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4681–4692 (2010).
50. Gómez-Ariza, J. *et al.* Sucrose-Mediated Priming of Plant Defense Responses and Broad-Spectrum Disease Resistance by Overexpression of the Maize Pathogenesis-Related PRms Protein in Rice Plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**, 832–842 (2007).
51. Morkunas, I., Marczak, Ł., Stachowiak, J. & Stobiecki, M. Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 363–373 (2005).
52. Ferri, M., Righetti, L. & Tassoni, A. Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. *J. Plant Physiol.* **168**, 189–195 (2011).
53. Laxalt, A. M. & Munnik, T. Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 332–338 (2002).
54. Bavaresco, L. *et al.* The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis* **41**, 133–136 (2002).



# **Chapitre IV**    Imagerie par spectrométrie de masse

---

# Index

<b>1. Introduction</b>	<b>IV-123</b>
<b>2. Imagerie par spectrométrie de masse</b>	<b>IV-123</b>
2.1. Principe et applications de l'imagerie par spectrométrie de masse	IV-123
2.2. Logiciels	IV-127
<b>3. Imagerie par spectrométrie de masse en mode positif LDI-TOFMS</b>	<b>IV-127</b>
3.1. Optimisation des paramètres d'analyse	IV-128
3.1.1 Paramètres du spectromètre de masse	IV-128
3.1.2 Paramètres laser	IV-128
3.2. Analyse de feuilles de vigne infectées par <i>Plasmopara viticola</i>	IV-129
3.3. Imagerie sur feuilles de vignes	IV-132
3.4. Conclusion sur l'imagerie LDI-TOFMS en mode positif	IV-134
<b>4. Evaluation de la répétabilité du signal par étalonnage interne</b>	<b>IV-134</b>
<b>5. Evaluation de la répétabilité du signal des stilbènes par LC-ITMS</b>	<b>IV-135</b>
5.1. Développement de la méthode LC-ITMS	IV-136
5.2. Sélection des transitions MS/MS pour les dosages	IV-137
5.3. Quantification des stilbènes par la méthode des ajouts dosés	IV-138
5.3.1 Résultats de dosages des échantillons	IV-138
5.3.2 Corrélation imagerie-dosages LC-MS	IV-143
5.4. Conclusion sur l'évaluation de la répétabilité du signal en imagerie	IV-145
<b>6. Imagerie en mode négatif</b>	<b>IV-145</b>
6.1. Empreinte spectrale LDI-TOFMS en mode négatif	IV-145
6.2. Cartes MSI sur feuilles de vigne en mode négatif	IV-146
<b>7. Imagerie par spectrométrie de masse avec matrice</b>	<b>IV-148</b>
7.1. Présentation du spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF	IV-148
7.2. Analyse MALDI-TOFMS de composés standards	IV-149
7.2.1 Analyse de flavonoïdes	IV-149
7.2.2 Analyse de stilbènes	IV-153
7.3. Analyse MALDI-TOFMS d'extraits méthanoliques de feuilles de vigne	IV-155
7.4. MALDI-MSI sur le Reflex IV 337 nm	IV-157
<b>8. Etude de feuilles de vigne en profondeur</b>	<b>IV-160</b>
8.1. Généralités sur le laser excimer	IV-160
8.2. Analyses LDI-TOFMS après ablation laser	IV-160

<b>9. Conclusion</b>	<b>IV-163</b>
<b>10. Littérature</b>	<b>IV-165</b>



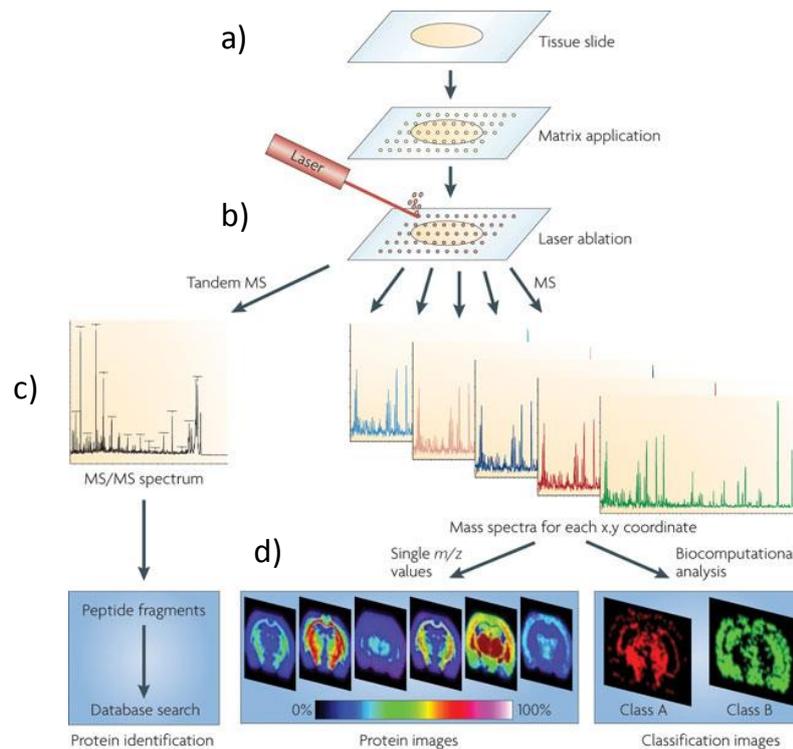
## 1. Introduction

Contrairement aux analyses du chapitre précédent, elles sont ici réalisées directement sur la feuille de vigne. Ce chapitre traite ainsi de l'analyse *in situ* de molécules impliquées dans l'infection des feuilles de vigne par *Plasmopara viticola*. Ces travaux s'appuient sur l'utilisation d'un outil original : l'imagerie par désorption/ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse (LDI-TOFMS). Les résultats acquis par cette technique permettent de disposer de données inédites et précises chez la vigne sur la synthèse de molécules en lien direct avec l'agression du pathogène. Ce chapitre décrira tout d'abord le développement instrumental nécessaire au maintien de conditions d'analyse stables et répétables dans le temps. La répétabilité du signal obtenu en imagerie sera évaluée avec le développement d'une méthode de dosage en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ceci conduira à l'aboutissement de l'imagerie LDI-TOFMS, détaillé dans le dernier volet de ce manuscrit. Enfin, ce chapitre se terminera par l'exploration d'autres modes d'ionisation pour l'imagerie comme le MALDI et par des tests de préparation d'échantillon réalisés avec un laser excimer.

## 2. Imagerie par spectrométrie de masse

### 2.1. Principe et applications de l'imagerie par spectrométrie de masse

L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI, Mass Spectrometry Imaging) permet d'établir des représentations de la répartition d'une molécule sur des surfaces plus ou moins complexes (cartographie). A travers les cartes d'ions d'intérêt qui en résultent, elle donne ainsi accès aux lieux d'accumulation de ces composés. Le principe de cette technique est présenté **Figure IV-1.**



**Figure IV-1 : principe de l'imagerie par spectrométrie de masse publiée dans *Nature Reviews Cancer*<sup>1</sup>. (a) une section fine de tissu biologique (animal ou végétal) est préparée avec ou sans matrice ; (b) interaction laser-matière entre le laser et l'échantillon : le laser tire sur chaque pixel qui compose la grille bidimensionnelle à analyser ; (c) dans le cas de protéines, après leur digestion trypsique, identification par PSD/CID ; (d) visualisation des cartes moléculaires pour les ions ciblés.**

La technique a été mise au point par Caprioli en 1997 sur un instrument de type MALDI-TOFMS. Son étude avait pour objectif l'analyse de sections de tissus dans le but de localiser des peptides et des protéines au sein de tissus humains et de rat<sup>2</sup>. Le spectromètre à temps de vol était à cette époque le seul analyseur adapté à l'imagerie. La combinaison d'une vitesse d'acquisition élevée, d'une très bonne sensibilité et d'une large gamme de détection en ont fait et en fait encore un outil de choix pour la MSI. S'il reste le principal instrument dédié à l'imagerie par spectrométrie de masse, la littérature décrit des expériences MSI effectuées avec d'autres types analyseurs tels que le piège ionique linéaire<sup>3</sup>, l'orbitrap<sup>4-6</sup>, la FTICRMS<sup>7-9</sup> ou encore l'analyseur hybride de type Q-TOF<sup>10,11</sup>. Si la FTICR permet une résolution et une précision en masse très élevées, son temps d'acquisition élevé conduit à des expériences MSI longues.

Les sources d'ionisations les plus couramment utilisées pour l'imagerie en spectrométrie de masse sont le MALDI<sup>12,13</sup>, la désorption/ionisation par électrospray (DESI)<sup>14,15</sup>, et l'ionisation secondaire par bombardement d'ions primaires (SIMS)<sup>16,17</sup>. Ces sources d'ionisation utilisent respectivement un faisceau laser, un spray de solvant ou un faisceau d'ions comme sonde pour agir avec le tissu à analyser. En MALDI, les meilleures résolutions spatiales atteignent 10  $\mu\text{m}$ <sup>18</sup> voire 5  $\mu\text{m}$ <sup>19</sup>. Ce

paramètre est notamment limitée par la focalisation du laser ou encore la taille des cristaux de la matrice. Avec une source de type SIMS, les résolutions sont inférieures à 100 nm<sup>20,21</sup>. Cependant, ce type de source génère une fragmentation abondante de composés organiques, limitant ainsi la taille des molécules biologiques analysables. Néanmoins, de nouvelles avancées ont permis d'utiliser cette technique avec l'utilisation de nouvelles sources d'agrégats (Bi<sup>1+</sup>, Bi<sup>3+</sup> et C<sub>60</sub><sup>+</sup>)<sup>22</sup>, notamment pour l'analyse de coupes histologiques de cerveau rat<sup>23</sup>. La résolution en DESI est couramment autour de 200 µm mais une étude récente d'imagerie en nano-DESI a permis d'atteindre 12 µm de résolution spatiale pour des applications relatives à des diagnostics cliniques ou encore à la biochimie<sup>24</sup>. L'ionisation par électronébulisation et désorption laser (LAESI) est un cas particulier puisque cette source utilise un laser pour désorber les molécules et un courant de spray pour ioniser ces dernières. Tout comme en SIMS, cette technique permet de sonder des échantillons en profondeur. Nemes *et al.* ont mené plusieurs études couvrant les domaines de la biologie végétale et des analyses cliniques en imagerie avec la source LAESI<sup>25,26</sup>. En LAESI, il est même possible de réaliser des cartes en 3 dimensions. Dans le cas de l'étude de feuilles de *Spathiphyllum lynise*, chaque ablation retire entre 30 et 40 µm d'épaisseur du tissu, permettant d'effectuer des images successives dans la profondeur. Les répartitions en 3 dimensions des métabolites de la plante s'obtiennent par la superposition des différentes images<sup>27</sup>.

L'avènement de l'imagerie MALDI par spectrométrie de masse, initié par Caprioli à la fin des années 90, a ouvert un large champ d'applications biologiques. L'histologie moléculaire par spectrométrie de masse appliquée à l'imagerie s'est imposée rapidement comme une nouvelle technologie prometteuse pour l'investigation de biomarqueurs<sup>28,29</sup>, pour le profilage de métabolites associés à des médicaments<sup>30,31</sup>, pour l'analyse de lipides<sup>32-34</sup> ou encore pour la protéomique<sup>35-37</sup>. Avec l'instrumentation actuelle, il est même possible d'étudier des sections d'organes entiers (coupe de cerveau par exemple)<sup>38,39</sup>. Son évolution constante, notamment grâce à la variété de sources d'ionisation disponibles, permet, en outre, d'étendre ses champs d'application au-delà de l'analyse de tissus humains ou d'animaux. La littérature fait notamment état d'analyses de films bactériens<sup>40,41</sup>, de verre antique<sup>42</sup>, de quartz<sup>43</sup>, de circuits imprimés<sup>44</sup> ou même d'empreintes digitales<sup>45,46</sup>.

Les débuts de l'imagerie par spectrométrie de masse ont surtout porté sur des études de tissu animal. Dans ces applications, les molécules ciblées sont le plus souvent des peptides et des protéines. Ce n'est que très récemment que le nombre de publications en imagerie appliquée aux métabolites de végétaux s'est mis à augmenter de façon importante<sup>47</sup>. Avant 2010, seuls quelques exemples apparaissaient dans la littérature. En 2005, Mullen *et al.* ont suivi la répartition de

fongicides et d'herbicides sur des plants de soja<sup>48</sup>. En 2006, Robinson *et al.* se sont intéressés aux carbohydrates hydrosolubles dans les tiges de blé. La même année, Burrell *et al.* ont également travaillé sur le blé montrant les différences de répartition du sucrose et du glucose-6-phosphate au sein des grains<sup>49</sup>. En 2008, Shroff *et al.* ont suivi la répartition de glucosinolates sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, en mode de détection négatif avec la matrice 9-aminoacridine<sup>50</sup>. A partir de 2010, le nombre de publications en MSI dans le domaine des végétaux a considérablement augmenté. On peut citer par exemple, l'étude de Goto-Inoue *et al.* sur la répartition de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) chez l'aubergine<sup>51</sup>. Jun *et al.* ont utilisé des particules colloïdales d'argent en tant que matrice pour la localisation par imagerie d'alcanes et d'aldéhydes chez *Arabidopsis thaliana*<sup>52</sup>. Zaima *et al.* se sont intéressés à la répartition de lipides présents chez une variété de riz asiatique résistante à la sécheresse<sup>53</sup>. Les travaux précédents de notre laboratoire ont, eux aussi, d'ailleurs conduit à une publication en imagerie sur la localisation de stilbènes sur feuilles de vigne suite à l'infection par *P. viticola* ou irradiation UV<sup>54</sup>. Plus récemment, la littérature fait état d'études en MSI sur les glucosinolates au sein des fleurs et des siliques d'*Arabidopsis*<sup>55</sup> ou encore de MSI indirecte sur des empreintes de matériel végétal (« imprint ») sur une surface en Teflon<sup>56</sup>. Tout dernièrement, en 2013, Li *et al.* sont parvenus à suivre la localisation d'une longue chaîne d'acide gras (VLCFAs) directement sur la cuticule des feuilles et des pétales de millepertuis par DESI<sup>57</sup>. Pour y parvenir sans utiliser de chloroforme ou réaliser « d'imprints », qui délocaliseraient ces chaînes grasses, ils ont vaporisé un solvant ternaire (composé de chloroforme, d'acétonitrile et d'eau) sur leur matériel végétal, permettant d'avoir une meilleure sensibilité pour cette classe de composés.

L'ensemble des résultats publiés prouvent que cette technologie est désormais capable de localiser précisément des métabolites d'intérêt. Dans certains cas, la résolution est même suffisante pour visualiser leurs emplacements au niveau cellulaire<sup>58</sup>. Historiquement, l'imagerie par spectrométrie de masse reste limitée au domaine semi-quantitatif. Cependant, une nouvelle approche de quantification pour la MSI a récemment été développée par Hamm *et al.*<sup>59</sup>, basée sur la détermination d'un coefficient d'extinction. Ce dernier évalue la diminution du signal d'une molécule au sein de sa matrice biologique en comparaison de l'intensité de son étalon. Il est ensuite appliqué en tant que facteur de normalisation.

Le caractère versatile de l'imagerie explique la poursuite active de son développement actuel. Certains défis techniques restent d'ailleurs à relever comme l'amélioration de la sensibilité, de la résolution spatiale, de la résolution en masse, de la réduction du temps d'acquisition d'une expérience MSI et encore de la quantification.

## 2.2. Logiciels

Les logiciels informatiques jouent un rôle non négligeable dans la convivialité d'acquisition et la rapidité du traitement des données.

Au début des travaux en imagerie par spectrométrie de masse, une première suite logicielle a été utilisée. Elle est composée de logiciels libres de droit<sup>60</sup>. Le premier, *Create Target* (version 2.04) crée la trame virtuelle avec l'observation de l'échantillon par une caméra CCD. C'est lors de cette étape que l'on renseigne le pas du tir laser et les dimensions de la surface à analyser, ces deux paramètres conditionnant la résolution spatiale de la future image. Cette trame virtuelle est ensuite chargée par le logiciel qui contrôle le spectromètre de masse, *FlexControl* (version 3.3, Bruker Daltonics). Un 3<sup>ème</sup> logiciel, *AnalyzeThis!* (version 1.21) génère un fichier image global qui contient toutes les données spectrales de chaque pixel. Enfin, le logiciel *BioMap* (version 3.08, Novartis) sert à visualiser les représentations des ions d'intérêts. L'inconvénient de cette suite logicielle concerne la difficulté pour superposer l'image en masse avec le cliché optique du même échantillon. Les logiciels *Create Target* et *Analyze This!* ont été développés par Stefan Clerens<sup>61</sup> pour l'imagerie par spectrométrie de masse sur des appareils Bruker de type Reflex IV et Ultraflex II.

Avec l'acquisition du spectromètre de masse à temps de vol Ultraflex III (Bruker), le laboratoire a acheté un logiciel développé par Bruker, *FlexImaging* (version 2.1), dédié à l'imagerie. Ce dernier permet de n'utiliser plus qu'un seul logiciel pour toutes les étapes citées précédemment. Il donne, en outre, la possibilité de superposer directement et surtout précisément les images en masse avec le cliché optique relatif. Toutes les expériences en MSI effectuées après le mois de mai 2012 ont été réalisées avec ce logiciel.

## 3. Imagerie par spectrométrie de masse en mode positif LDI-TOFMS

La désorption/ionisation laser (LDI) sans utilisation de matrice a été privilégiée pour le début de ces travaux en imagerie pour plusieurs raisons. D'une part, la première partie de ce travail vise à approfondir les recherches du laboratoire en MSI sur les feuilles de vignes<sup>62</sup> et d'autre part, la LDI présente plusieurs avantages. Elle permet de s'affranchir des pics caractéristiques des matrices en basse masse, une zone où sont susceptibles d'être présents les composés d'intérêts, de limiter les contaminations et la préparation de l'échantillon est réduite à sa plus simple expression.

### 3.1. Optimisation des paramètres d'analyse

#### 3.1.1 Paramètres du spectromètre de masse

Les paramètres instrumentaux ont été optimisés dans le but d'obtenir un maximum d'information avec la meilleure sensibilité lors d'analyses *in situ* de feuilles de vigne.

Les paramètres du spectromètre de masse (tensions des lentilles IS/1, IS/2, du réflectron, gain du détecteur) ont été optimisés pour une gamme de masse s'échelonnant de 100 à 1100 Da. Ils sont présentés en **Tableau IV-1**. C'est dans cette zone que sont susceptibles de se trouver les métabolites d'intérêts, le plus souvent des composés moléculaires de faible masse.

**Tableau IV-1 : principaux paramètres du spectromètre de masse en mode positif.**

Paramètre	Valeurs
Ion Source 1	20,00 kV
Ion Source 2	16,40 kV
Lens	9,90 kV
Reflector	23,00 kV
Pulsed ion extraction	200 ns
Detector gain	1711 V

#### 3.1.2 Paramètres laser

La focalisation et la taille du spot laser sont des paramètres cruciaux lors d'expériences en MSI. Le diamètre du spot laser peut être modifié grâce à un iris. En effet, sur ce dernier il est possible d'y adapter un diaphragme (pinhole). Les deux lentilles, successivement convergente puis divergente, focalisent le faisceau laser sur la cible. Pour l'analyse de feuilles de vigne, le réglage de ces lentilles doit être modifié puisque les feuilles génèrent une surépaisseur (environ 50 µm pour une feuille lyophilisée) par rapport à un dépôt MALDI classique. Plusieurs positions ont été testées, repérées au moyen d'une règle graduée au millimètre fixée sur le banc optique. Celle permettant d'obtenir le meilleur signal pour l'analyse de feuilles de vigne a été retenue. Le pinhole, quant à lui, permet de ne sélectionner que la partie centrale et homogène du faisceau laser de profil gaussien. Plusieurs pinholes de différents diamètres d'ouverture (350 µm à 1000 µm) ont été testés. Les pinholes les plus petits, permettant d'atteindre une taille de spot laser de 10 µm ne permettent pas d'obtenir une sensibilité suffisante. Le pinhole de 650 µm de diamètre d'ouverture offre un bon compromis entre bonne sensibilité et taille du spot, de 40 à 45 µm. La taille des impacts a été évaluée à l'aide d'une zone de la plaque MALDI recouverte d'encre bleue.

Après plusieurs tirs lasers sur cette zone, les surfaces désorbées ont été mesurées afin de déterminer le diamètre moyen de ces impacts laser.

L'énergie laser nécessaire pour l'analyse de feuilles de vigne, supérieure à une analyse classique de dépôts MALDI, a également été adaptée. Si l'énergie est trop faible, le spectre ne présentera que du bruit de fond. En revanche, si l'énergie est trop forte, le spectre sera saturé en basse masse (pics enregistrés à chaque masse jusqu'à 300 Da) et les résultats seront inexploitable. Avant chaque série d'analyses en imagerie, il est nécessaire de contrôler l'énergie laser. Ce contrôle s'effectue par l'intermédiaire de la mesure d'un faisceau dévié. Typiquement, l'énergie mesurée doit être comprise entre 28 et 32  $\mu\text{J}$ . Un atténuateur en silice situé en amont du parcours optique, contrôlé par le logiciel pilote du spectromètre de masse, permet d'affiner le réglage de l'énergie laser. La valeur de l'atténuateur est réglée à 60 %, plus ou moins 5 % suivant la réponse de l'échantillon.

Il est toutefois possible de calculer l'énergie réellement déposée sur la cible en déterminant le coefficient d'absorption de tous les éléments optiques présents sur le parcours du laser<sup>63</sup>. Le filtre UV (qui sélectionne la bonne longueur d'onde en sortie du laser), l'atténuateur, les deux lentilles de focalisation, la lame séparatrice (servant à dévier le faisceau de contrôle de l'énergie), les prismes de déviation et enfin le hublot de la source absorbent tous une partie de l'énergie laser. Les mesures d'énergie sont faites avec une cellule Gentec-EO ED 200 reliée à un boîtier DUO (Gentec-EO). A 266nm, la transmittance totale  $T$  a été évaluée à 0,070 en considérant une transmission totale de l'atténuateur (position 100 %) pour l'ensemble du trajet optique jusqu'à la cible. Lorsque l'atténuateur est positionné à 60 %, son absorbance a été mesurée à 0,695. En prenant en compte cette contribution, la transmittance totale  $T$  devient égale à 0,025. En sortie, l'énergie laser a été mesurée à 1,19 mJ. Ainsi, avec l'atténuateur positionné à 60 %, l'énergie déposée sur la cible sera d'environ 30  $\mu\text{J}$ , soit une fluence d'environ  $1,89 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ , en considérant un spot laser de diamètre égale à 45  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Analyse de feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola*

La **Figure IV-2** présente une empreinte spectrale typique d'une analyse d'une feuille de Cabernet Sauvignon, 5 jours après son infection par le mildiou.

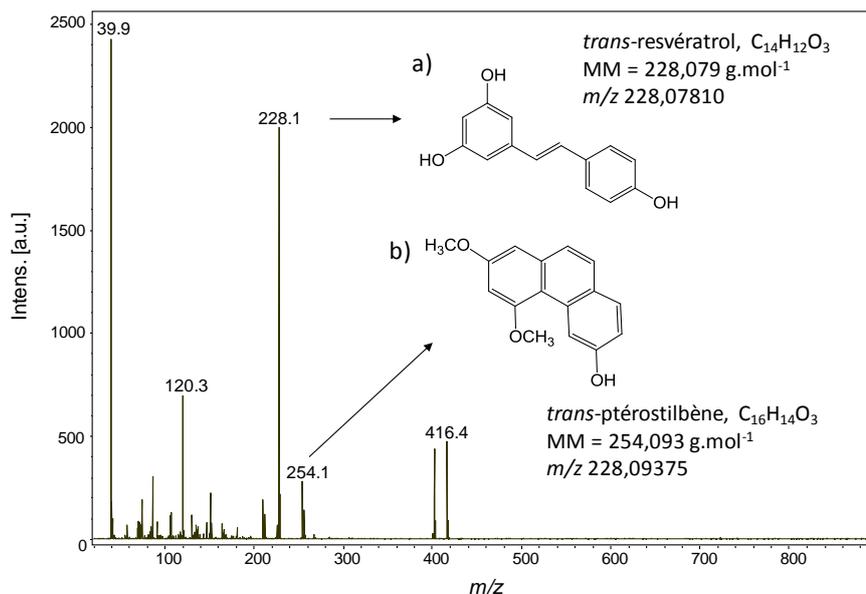
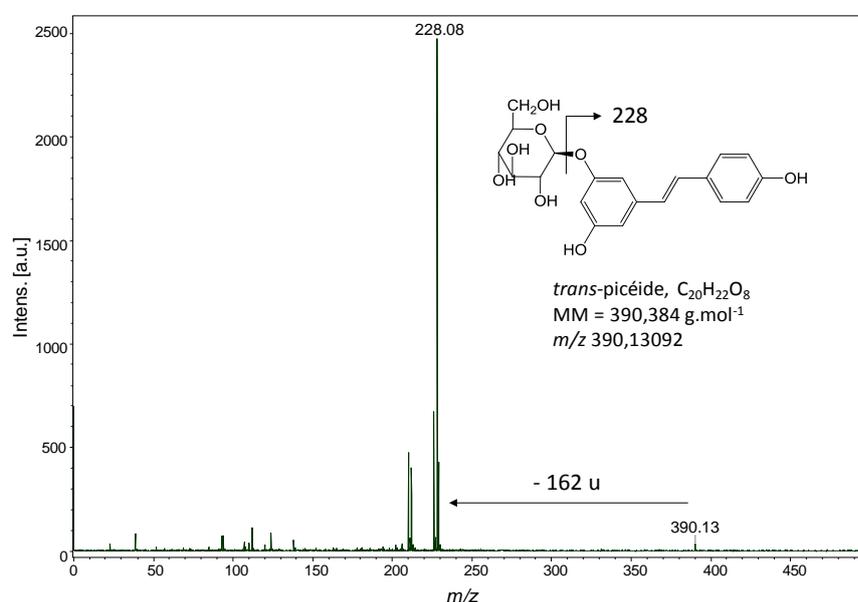


Figure IV-2 : empreinte spectrale LDI-TOFMS obtenue lors de l'analyse d'une feuille de vigne de Cabernet Sauvignon à 5 jours post infection (5 dpi) et structures moléculaires associées aux ions  $m/z$  228 et 254, (a) *trans*-resvératrol et (b) *trans*-ptérostilbène.

Deux signaux retiennent particulièrement l'attention sur cette empreinte spectrale : les ions de rapport  $m/z$  228 et 254, respectivement associés au *trans*-resvératrol et au *trans*-ptérostilbène. Comme cela a été décrit dans la **Chapitre I**, une feuille de vigne infectée par *Plasmopara viticola* synthétise différents composés en réponse à cette agression comme les stilbènes. Bien que non détectés lors des analyses par ESI-FTICRMS, le profiling réalisé en LC-ITMS a confirmé la présence de plusieurs stilbènes au sein des échantillons inoculés. L'imagerie LDI-TOFMS en donnant accès à une autre classe de composés, est donc complémentaire avec l'ESI-FTICRMS.

Dans nos conditions d'analyses en désorption/ionisation laser à 266 nm, seuls le resvératrol et le ptérostilbène sont détectés (**Figure IV-2**). Ces molécules s'ionisent sous forme d'un ion radicalaire  $M^{\bullet+}$ . Leur ionisation utilise un processus biphotonique au sein de la plume d'ablation<sup>62,64</sup>. Dans le cas du resvératrol, l'ion radicalaire  $m/z$  228 est effectivement détecté. Le cas du ptérostilbène est légèrement différent. Ce composé de formule brute C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> (256,296 g.mol<sup>-1</sup>) est détecté sous forme d'un ion radicalaire à  $m/z$  254 correspondant à l'ion  $[M-2H]^{\bullet+}$ . Ce composé perd rapidement deux atomes d'hydrogène par un phénomène de cyclisation photochimique déjà observé pour le *trans*-3,3',5,5'-tetraméthoxystilbène<sup>65</sup>. Tout d'abord, l'irradiation UV à 266 nm entraîne l'isomérisation de la forme *trans* à la forme *cis* du ptérostilbène. Puis, l'élimination de deux atomes d'hydrogène et la cyclisation du *cis*-ptérostilbène résultant donne lieu à la formation d'un phénanthrène tri-substitué.

Bien entendu, la spectrométrie de masse ne permettra pas de différencier ici les isomères *cis* et *trans* d'une même molécule. Par ailleurs, bien que leur présence ait été confirmée par le profilage LC-MS (**Chapitre III**, point 7), les viniférines et picéides n'apparaissent pas sur les spectres alors qu'ils possèdent le groupe stilbène capable de s'ioniser par LDI. L'analyse d'étalons de ( $\delta$ )-viniférine et de *trans*-picéide a été entreprise en LDI-TOFMS afin de lever l'incertitude les concernant. Ils ont été préparés en solution méthanolique et simplement déposés sur le porte-cible. La *trans*- $\delta$ -viniférine est issue d'une fraction d'extrait de feuille collectée et dosée à  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>. Malgré quelques essais de différents réglages du spectromètre, l'ionisation par LDI de la  $\delta$ -viniférine s'est révélée infructueuse. L'analyse d'une solution de picéide de concentration  $2 \cdot 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> conduit en revanche à la détection de deux signaux (**Figure IV-3**).



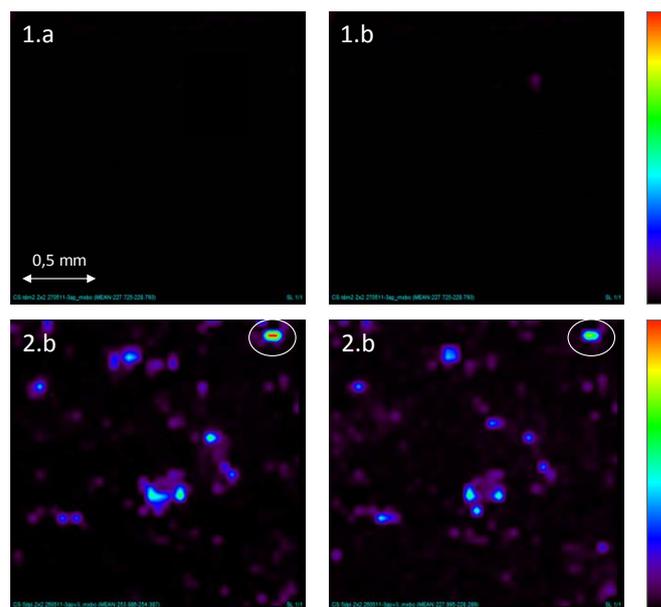
**Figure IV-3 :** spectre LDI-TOF d'une solution méthanolique de picéide préparée à une concentration de  $2 \cdot 10^{-5}$  M. Accumulation de spectres de masse LDI-TOFMS correspondant à 100 tirs laser. La position de la fragmentation est précisée sur la structure moléculaire.

Deux ions associés au picéide sont détectés. L'ion moléculaire radicalaire M<sup>•+</sup> à m/z 390 et l'ion m/z 228 correspondant à l'aglycone (resvératrol) issu d'une fragmentation *in source*. Cette perte enregistrée de 162 u correspond donc à la perte du groupement sucre accompagné d'un transfert d'atome hydrogène (**Figure IV-3**). La désorption/ionisation laser est une méthode d'ionisation suffisamment énergétique pour permettre la rupture de liaisons fragiles comme peuvent l'être les liaisons glycosidiques. En conséquence, la détection du picéide peut se confondre avec celle de resvératrol. Ceci signifie que l'ion m/z 228 détecté sur une feuille de vigne en LDI-TOF peut provenir d'une détection globale de 4 stilbènes différents : *cis*- et *trans*-picéide et *cis*- et *trans*-resvératrol. En revanche, l'ion m/z 254 ne peut provenir que du *trans*- ou du *cis*-ptérostilbène.

La majorité du signal provient sans nul doute de l'isomère *trans* car il est bien plus répandu que la forme *cis*. En effet, ce dernier est moins stable d'un point de vue stérique<sup>66</sup>.

### 3.3. Imagerie sur feuilles de vignes

Les expériences en imagerie ont été conduites sur deux feuilles de Cabernet Sauvignon dont une a été infectée. Cette dernière a été analysée cinq jours après son infection. Un morceau de feuille d'environ 1 cm<sup>2</sup> est fixé sur la plaque d'analyse à l'aide d'un ruban adhésif en aluminium. La zone à analyser est un carré de 2 x 2 mm avec un pas de 50 µm entre chaque tir laser. L'ensemble correspond à 1600 pixels. Le diamètre du spot laser mesure environ 45 µm de diamètre. Avec un pas de 25 µm, un phénomène de recouvrement aurait lieu, pouvant conduire à des baisses progressives de signal pour des pixels adjacents. Un pas de 50 µm permet l'analyse de la totalité de la trame sélectionnée sans risque de recouvrement. Les images de la répartition des deux stilbènes suivis provenant d'une feuille témoin et d'une feuille inoculée de Cabernet Sauvignon sont présentées en **Figure IV-4**.

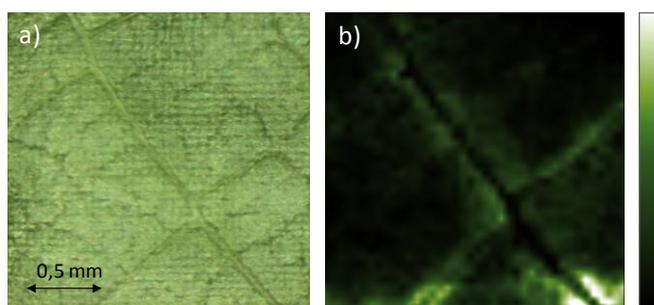


**Figure IV-4** : cartes MSI de feuilles témoin et inoculée de Cabernet Sauvignon (*BioMap*). Les images 1.a et 1.b correspondent aux distributions respectives des ions  $m/z$  254 et 228 d'une feuille témoin. Les images 2.a et 2.b correspondent aux distributions respectives des ions  $m/z$  254 (intensité maximale 2500 a.u.) et 228 (intensité maximale 1000 a.u.) d'une feuille à 5 dpi. L'intensité maximale correspond à la couleur rouge et l'intensité minimale à la couleur noire. Les cercles blancs témoignent d'un site probable d'infection. Pour les 2 feuilles, la zone analysée de 4 mm<sup>2</sup> avec un pas de 50 µm contient 1600 pixels.

Les stilbènes ne sont pas détectés sur la feuille témoin : aucun signal n'est enregistré pour les ions  $m/z$  228 et 254 (images 1.a et 1.b, **Figure IV-5**). En revanche, sur la feuille infectée, un signal intense est enregistré pour ces deux mêmes composés. En outre, le resvératrol et le pterostilbène

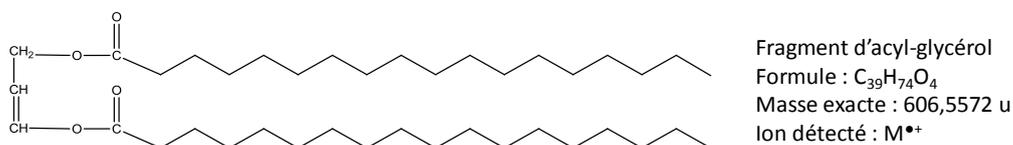
apparaissent colocalisés (images 2.a et 2.b, **Figure IV-5**). Certaines zones (cercles blancs) sont même particulièrement intenses. Elles pourraient correspondre à des sites d'infection, donc aux stomates, la voie d'entrée du pathogène au sein de la feuille. Enfin, on remarque que le signal du ptérostilbène est 2,5 fois plus important que celui du resvératrol.

Si nous avons beaucoup discuté des signaux des stilbènes jusqu'à présent, il est possible de noter quelques autres distributions supplémentaires en MSI. C'est le cas des ions associés aux couches protectrices de la feuille (cires), majoritairement les ions  $m/z$  578 et 606 (**Figure IV-5**).



**Figure IV-5** : imagerie MS d'une feuille de Cabernet Sauvignon témoin, (a) cliché pris à la binoculaire et (b) représentation de l'ion  $m/z$  606.

L'intensité relative à l'ion  $m/z$  606 est la plus élevée autour des nervures. Dans les zones du limbe, le signal est quasiment nul. Ceci permet d'obtenir des images qui représentent fidèlement la topographie de la feuille (nervures, limbe). Ces ions sont apparentés à des acyl-glycérol<sup>62</sup> (**Figure IV-6**). Ils font partie des ions les plus intenses sur les spectres de masse en LDI-TOFMS. Tout comme les stilbènes, ils s'ionisent sous forme d'ions radicalaires. D'autres groupes de cires sont détectés, souvent moins intensément : un centré autour de 400 Da (ions  $m/z$  402 et 416, **Figure IV-2**) et un autre autour de 1 000 Da.



**Figure IV-6** : structure moléculaire proposée pour l'acyle-glycérol détecté à la masse  $m/z$  606.

S'ils ne sont pas reliés directement à l'étude de l'interaction « hôte-pathogène », ces ions n'en demeurent pas moins utiles en tant qu'indicateur de la qualité de l'image. En effet, s'ils ne sont pas détectés avec une intensité suffisante, sur les échantillons témoins comme inoculés, l'image ne sera pas exploitable car leur absence traduit un dérèglement probable du spectromètre de masse.

### 3.4. Conclusion sur l'imagerie LDI-TOFMS en mode positif

Les conditions actuelles LDI-TOFMS permettent d'observer les signaux de deux stilbènes en imagerie : le *trans*-resvératrol et le *trans*-ptérostilbène. Il est possible de différencier rapidement un échantillon témoin (absence de signal relatif aux stilbènes) d'un échantillon infecté par le mildiou (signaux relatifs aux stilbènes intenses et localisés). A l'intérieur d'un échantillon infecté, il est possible de repérer les zones d'accumulation des deux stilbènes. En revanche, une interrogation demeure sur la répétabilité du signal d'une expérience MSI à l'autre. La robustesse de cette technique n'est pas facile à évaluer et des questions demeurent lorsqu'il faut comparer un ensemble d'image entre elles. Autrement dit, lorsque des différences d'intensité sont enregistrées entre deux images d'échantillons différents, dans quelle mesure celles-ci sont imputables aux différences de quantité des composés suivis ?

## 4. Evaluation de la répétabilité du signal par étalonnage interne

L'imagerie par spectrométrie de masse fournit des informations qualitatives et semi-quantitatives. En outre, la corrélation entre l'intensité d'un ion et sa concentration effective locale n'est pas accessible. L'une des approches pour avancer dans les niveaux de quantification consiste à utiliser un étalon interne, afin de normaliser les intensités provenant de différents échantillons.

Nous avons entrepris cette approche en utilisant comme étalon interne une molécule naturelle extraite du Millepertuis, une naphthodianthrone, l'hypéricine ( $C_{30}H_{16}O_8$ ). Plusieurs raisons ont motivé le choix de ce composé. Premièrement, cette molécule n'est pas présente chez *Vitis vinifera*. Ensuite, aucun composé n'est détecté à la masse  $m/z$  505 (forme protonée de l'hypéricine) ou à la masse  $m/z$  503 (forme déprotonée de l'hypéricine) lors de l'étude des feuilles de vigne. Enfin, cette molécule est détectée avec une très bonne sensibilité en LDI-TOFMS en mode négatif<sup>67</sup>.

Un essai a été réalisé sur une feuille de vigne témoin. Un dépôt par mouillage de 10  $\mu$ L d'une solution méthanolique d'hypéricine à une concentration de  $10^{-4}$  M a été effectué sur l'échantillon. Plusieurs volumes ont été testés. Un volume de 10  $\mu$ L permet de recouvrir de façon homogène sans « détremper » la surface de la feuille (environ 30  $mm^2$ ).

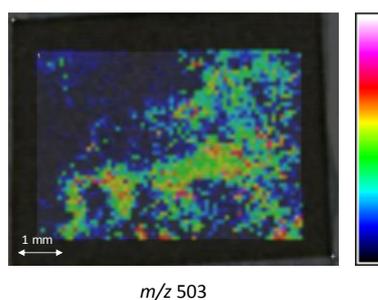


Figure IV-7 : carte MSI de l'ion  $m/z$  503 (ion  $[M-H]^-$  de l'hypericine), expérience LDI-MSI en mode négatif, 3025 pixels, résolution spatiale de 75  $\mu\text{m}$ .

La **Figure IV-7** expose une répartition très hétérogène de l'ion associé à la molécule déprotonée de l'hypericine. Certaines zones sont peu intenses tandis que d'autres montrent un signal très élevé. Cette expérience prouve qu'il n'est pas aisé d'utiliser un étalon interne puisque sa répartition n'est pas régulière, notamment à cause de la topographie irrégulière de la surface de la feuille qui ne favorise pas un séchage homogène. D'autres essais menés, notamment par vaporisation, avec un automate (Linomat 5, Camag, Suisse), n'ont pas conduit à des dépôts plus homogènes.

Plutôt que de persévérer dans cette voie, l'étalonnage indirect a été privilégié pour répondre à cette problématique de répétabilité. Cette approche a été réalisée en comparant l'intensité globale obtenue sur par MSI sur une feuille et les données quantitatives obtenues par LC-MS/MS d'extraits méthanoliques de la même feuille.

## 5. Evaluation de la répétabilité du signal des stilbènes par LC-ITMS

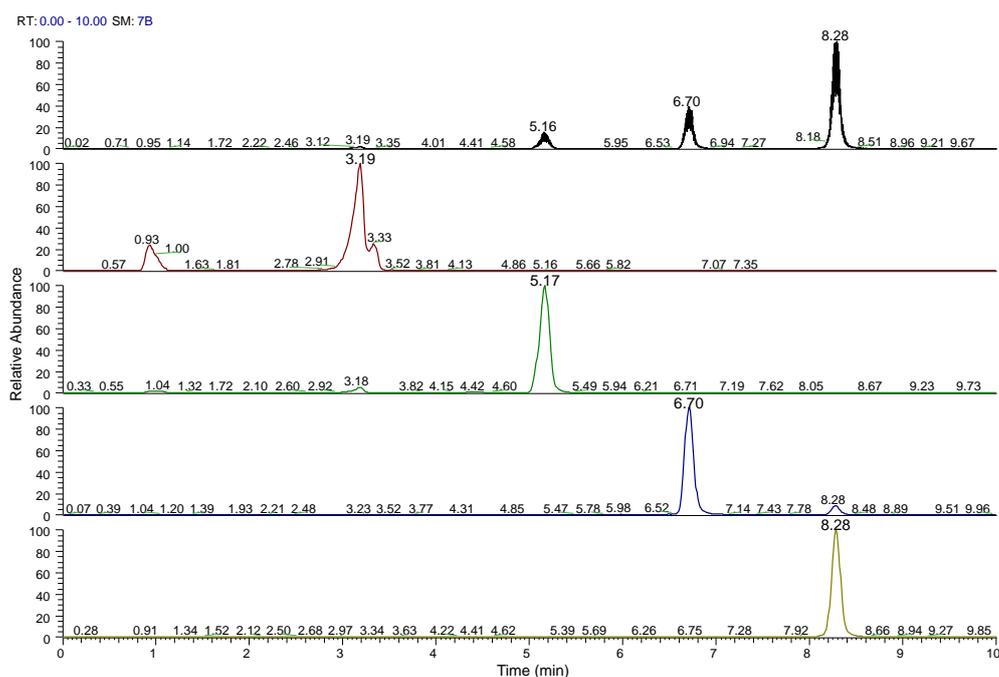
Pour procéder à l'évaluation de la répétabilité de la MSI par LDI-TOFMS, plusieurs échantillons issus d'une même feuille (6 répétitions) vont être analysés. Une feuille irradiée aux UV-C a été sélectionnée pour cette étude car les stilbènes devraient à priori être répartis sur une majeure partie de la surface suite à ce stress<sup>62</sup>. De plus, la quantité de stilbènes synthétisés suite à une irradiation aux UV-C est plus importante que celle liée à un stress biotique, ce qui permet ainsi de s'affranchir d'éventuelles limites de détection en LDI-TOFMS. Pour chacun des 6 échantillons, une zone adjacente sera prélevée puis extraite avec du méthanol. Ce qui constituera finalement, 6 paires d'échantillons : 6 échantillons à analyser en MSI et leurs 6 extraits associés pour les dosages LC-MS des stilbènes. Avant d'effectuer la comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques d'analyse, il a été nécessaire de mettre au point la méthode d'analyse des stilbènes d'intérêt par LC-MS.

## 5.1. Développement de la méthode LC-ITMS

La méthode chromatographique pour le dosage des stilbènes observables en MSI a été développée à partir du gradient d'élution utilisé pour le profiling de l'extrait méthanolique, présenté au **Chapitre III**. Ce développement a été réalisé avec les étalons de resvératrol, ptérostilbène et picéide. A ces 3 stilbènes a été ajouté le pinostilbène (absent au sein du genre *Vitis*) en tant qu'étalon interne ( $C_{15}H_{14}O_3$ ).

La phase mobile consiste en un mélange d'eau déionisée et d'acétonitrile dont la composition en acétonitrile passe linéairement de 20 à 90 % en 10 min à un débit de  $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le volume d'injection est de  $20 \mu\text{L}$ . La température de la colonne est maintenue à  $30^\circ\text{C}$ . Un rééquilibrage de 10 min est programmé pour revenir aux conditions initiales entre chaque injection. Les autres paramètres instrumentaux sont détaillés dans l'**Annexe II**.

La **Figure IV-8** présente un chromatogramme de l'analyse d'une solution des 4 stilbènes à  $10^{-6}$  M.



**Figure IV-8 : chromatogramme d'une solution de 4 stilbènes chacun à une concentration de  $10^{-6}$  M avec les conditions finales LC. De haut en bas : courants ioniques totaux extraits du *trans*-picéide, du *trans*-resvératrol, du *trans*-pinostilbène et du *trans*-ptérostilbène.**

Les 4 stilbènes étalons sont élués logiquement du plus polaire au moins polaire à savoir le *trans*-picéide ( $t_R = 3,2$  min, resvératrol glycosylé), le *trans*-resvératrol ( $t_R = 5,2$  min), le *trans*-pinostilbène ( $t_R = 6,7$  min, resvératrol mono méthoxylé) et le *trans*-ptérostilbène ( $t_R = 8,3$  min, resvératrol substitué avec deux groupes méthoxyles).

Les limites de quantification (LOQ) ont été établies sur une base d'un rapport signal sur bruit  $S/N = 10$  et correspondent à l'injection d'une solution à  $10^{-9}$  M pour le resvératrol et le picéide, et à  $10^{-10}$  M pour le ptérostilbène.

## 5.2. Sélection des transitions MS/MS pour les dosages

Le dosage ciblé de composés par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) s'effectue en suivant uniquement certains courants ioniques. Le mode SRM (Selective Reaction Monitoring) augmente la spécificité de détection en permettant le suivi successif des courants ioniques caractéristiques de la fragmentation des seuls composés sélectionnés. Le suivi spécifique d'un ion produit par fragmentation d'un ion précurseur présélectionné est appelé transition (noté : ion précurseur > ion produit). Ce mode d'analyse permet de s'affranchir de nombreux composés issus du milieu complexe que représente l'échantillon lui-même (matrice) et qui ne correspondront donc pas aux critères de sélection imposés au spectromètre. Dans les cas d'isomères, le recours à la chromatographie facilite également les interprétations. Sans que ce soit une règle générale, les isomères présentent souvent une fragmentation identique, donc des transitions identiques. Dans ce cas, chaque isomère doit être caractérisé par un temps de rétention différent.

Les transitions à suivre ont été déterminées à partir des quatre étalons analysés séparément en infusion directe. L'énergie de collision est adaptée pour optimiser le signal de la transition la plus intense. Les expériences ont été réalisées en mode d'ionisation négatif car les stilbènes se déprotonent plus facilement qu'ils ne se protonent (présence de groupes phénols). Le signal est donc plus intense en mode d'ionisation négatif<sup>68</sup>. Par ailleurs, il est plus facile de maximiser l'intensité d'une transition en mode négatif qu'en mode positif car ce mode génère moins de fragments, le signal à suivre n'est donc pas dilué sur plusieurs fragments.

Pour ces expériences, les 4 stilbènes ont été préparés individuellement à une concentration de  $10^{-4}$  M dans du méthanol. Les énergies de collision permettant des voies de fragmentation exploitables pour le dosage avec l'appareillage utilisé s'échelonnent de 15 à 35 eV. Le **Tableau IV-2** présente les résultats de ces fragmentations. Les interprétations de ces schémas de fragmentations sont décrites en **Annexe II**.

**Tableau IV-2 : données des fragmentations pour le resvératrol, le ptérostilbène, le pinostilbène et le picéide.**  
L'intensité relative de chaque fragment est précisée entre parenthèses.

Molécules	Rapport $m/z$	Fragments	Energie CID (eV)
<i>trans</i> -resvératrol	228	185 <sub>(100)</sub> ; 183 <sub>(38)</sub> ; 159 <sub>(32)</sub> ; 157 <sub>(29)</sub> ; 143 <sub>(11)</sub> ; 141 <sub>(3)</sub>	32
<i>trans</i> -ptérostilbène	257	240 <sub>(100)</sub> ; 239 <sub>(5)</sub>	30
<i>trans</i> -pinostilbène	241	226 <sub>(81)</sub> ; 225 <sub>(100)</sub>	31
<i>trans</i> -picéide	389	227 <sub>(100)</sub>	25

Dans le cas de l'utilisation de la SRM, la connaissance des principaux fragments issus des molécules ciblées est essentielle pour le suivi de transitions. Le choix se portera sur la transition la plus représentative possible de la structure en évitant de sélectionner les fragments peu spécifiques, lorsque cela est possible, comme par exemple la perte d'une molécule d'eau. En dépit d'une plus grande sélectivité dans la détection, il peut arriver, même en SRM, dans le cas de l'analyse d'une matrice complexe, de rencontrer des perturbations au niveau des transitions sélectionnées amenant à choisir une autre transition.

Le fragment le plus intense provenant de la fragmentation de chaque stilbène a été sélectionné. Pour le *trans*-picéide, c'est la transition **389>227** qui a été suivie ; pour le *trans*-pinostilbène, la transition **240>225** ; pour le *trans*-ptérostilbène, la transition **255>240**. En revanche, pour le *trans*-resvératrol ce n'est pas la transition la plus intense qui a été considérée. Dans le milieu matriciel cette dernière ne conduisait pas à des résultats satisfaisants. En conséquence, c'est la transition **227>159** qui a été sélectionnée.

### 5.3. Quantification des stilbènes par la méthode des ajouts dosés

Cette méthode a été privilégiée d'une part pour s'affranchir de l'effet matrice, et d'autre part car les échantillons étaient disponibles en volumes limités. Elle a été validée au préalable à l'aide d'extraits méthanoliques de feuilles de vigne différents de ceux qui seront analysés pour la corrélation du signal en imagerie LDI-TOFMS.

#### 5.3.1 Résultats des dosage des échantillons

Le même protocole de préparation des échantillons (détaillé en **Annexe II**) et de dosage précédemment décrit ont été suivis pour les 6 extraits de l'expérience. Un 7<sup>ème</sup> extrait a été analysé, en qualité de contrôle (généralisé à partir d'une feuille témoin du même génotype), afin de comparer les teneurs des stilbènes avec et sans traitement UV. La **Figure IV-9** détaille les chromatogrammes associés aux trois stilbènes pour l'échantillon #2.

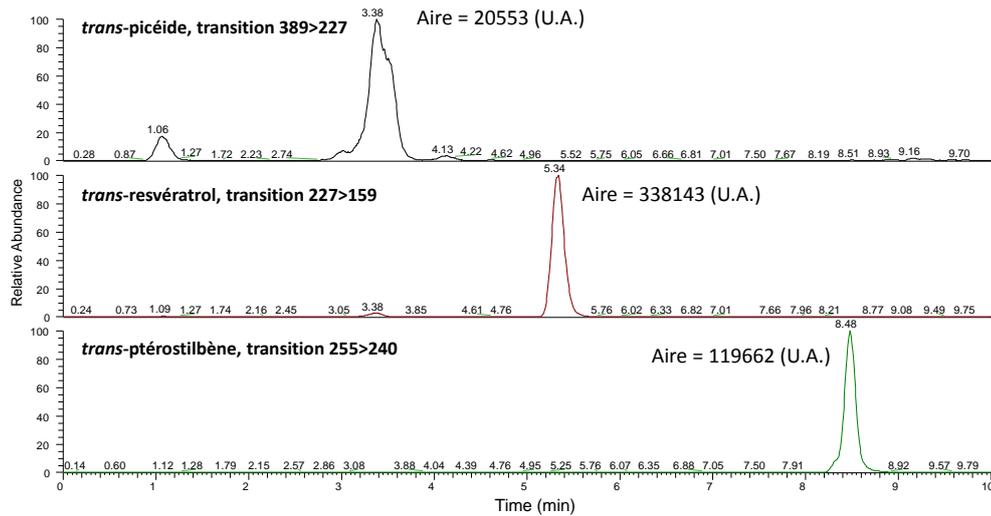


Figure IV-9 : analyse LC-MS de l'échantillon #2. De haut en bas sont présentés les chromatogrammes associés au *trans*-picéide, *trans*-resvératrol et *trans*-ptérostilbène obtenus en mode SRM. Les aires des pics chromatographiques sont indiquées en unité arbitraire (a.u.). Ces chromatogrammes sont relatifs au dosage de l'échantillon #2, après deux ajouts de la solution étalon de stilbènes.

Les aires des trois stilbènes ne sont pas comparables, la concentration de ces mêmes composés n'étant pas la même dans la solution des ajouts dosés. De plus, le coefficient de réponse de ces trois composés n'est probablement pas le même.

La **Figure IV-10** illustre un exemple des courbes de dosage la méthode des ajouts dosés pour l'échantillon #1 pour les trois stilbènes. Le *cis*-picéide n'a pas été dosé puisque seul le *trans*-picéide était dans la solution étalon. Ceci n'est pas préjudiciable puisque les aires du *cis*-picéide pour ce génotype sont négligeables devant les aires du *trans*-picéide (de l'ordre de 5 %).

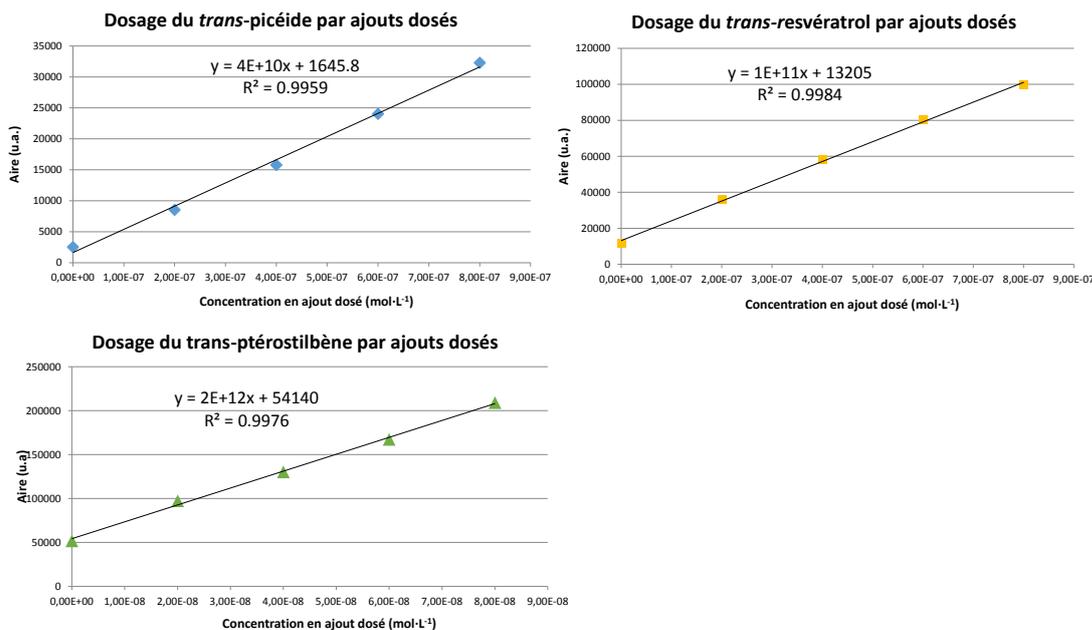
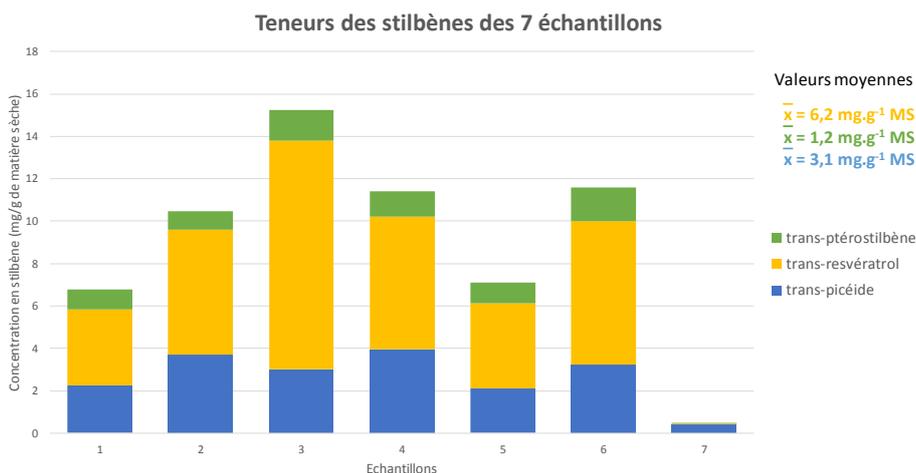


Figure IV-10 : droites d'étalonnage pour la méthode des ajouts dosés des trois stilbènes pour l'échantillon #1. Les équations ainsi que les coefficients de chaque droite de régression linéaire sont indiqués.

Des coefficients de détermination satisfaisants ont été obtenus pour les 3 stilbènes avec la méthode des ajouts dosés. Dans les trois cas, un coefficient de détermination supérieur à 0,99 est obtenu, ce qui tout à fait est acceptable pour un étalonnage effectué dans une matrice complexe.

Ces résultats ont été obtenus sans utiliser d'étalon interne. L'utilisation du pinostilbène n'a pas conduit à des résultats satisfaisants. Les coefficients de détermination étaient systématiquement plus faibles avec la normalisation interne. Le pinostilbène connaît vraisemblablement une perturbation dans la matrice. L'utilisation d'étalons deutérés reste la solution idéale mais il n'est pas aisé de se procurer ceux du resvératrol ou d'autres stilbènes, leur coût est élevé par rapport à ce qu'ils apporteraient au dosage.

La **Figure IV-11** présente l'ensemble des concentrations en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière de matière sèche déterminées pour les 7 échantillons après la prise en compte des facteurs de dilution respectifs des échantillons. Les 6 extraits irradiés sont relatifs à leurs homologues analysés en MSI.



**Figure IV-11 : concentrations en stilbènes des 7 échantillons obtenues par la méthode des ajouts dosés. Les échantillons numéro 1 à 6 sont associés à la feuille irradiée et le numéro 7 à la feuille témoin.**

Les concentrations en stilbène des 6 échantillons irradiés présentent la même tendance. Le resvératrol est celui qui est synthétisé le plus abondamment, il représente en moyenne près de 60 % de la teneur totale en stilbène. Les échantillons #2, #4 et #6 sont quasiment similaires. L'échantillon #3 présente un taux plus important en resvératrol. Ceci peut paraître surprenant puisque ces six échantillons proviennent de la même feuille. En ce qui concerne les concentrations en stilbènes de l'échantillon contrôle, les concentrations en resvératrol et ptérostilbène de représentent moins de 0,5 % des concentrations moyennes correspondantes des échantillons irradiés. Le taux endogène du picéide est relativement plus élevé puisqu'il représente près de 14 % de la valeur moyenne des échantillons irradiés. De telles teneurs sont trop faibles pour conduire à la détection d'un signal en imagerie LDI-TOFMS.

Le **Tableau IV-3** détaille les données associées à cette étude de répétabilité réalisée sur 7 mesures dont un échantillon témoin. Ces données concernent les rapports de matière sèche sur le volume de solvant des échantillons ( $P/S$ ), les concentrations en  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  et  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche et enfin les erreurs sur les mesures. Ces dernières ont été déterminées par le calcul de la déviation standard<sup>69</sup>. Ces calculs sont détaillés en **Annexe II**.

Tableau IV-3 : résultats des dosages des 7 échantillons analysés en LC-MS/MS. L'erreur sur la mesure de la concentration a été déterminée suite aux calculs des déviations standards. Les concentrations initialement calculées en mol·L<sup>-1</sup> ont été converties en g·mL<sup>-1</sup> pour faciliter les comparaisons entre les échantillons. Le rapport P/S représente le rapport de matière sèche divisé par le volume de solvant de l'extrait. Les moyennes et les écart-types associés aux 3 stilbènes ont été calculés pour les échantillons irradiés.

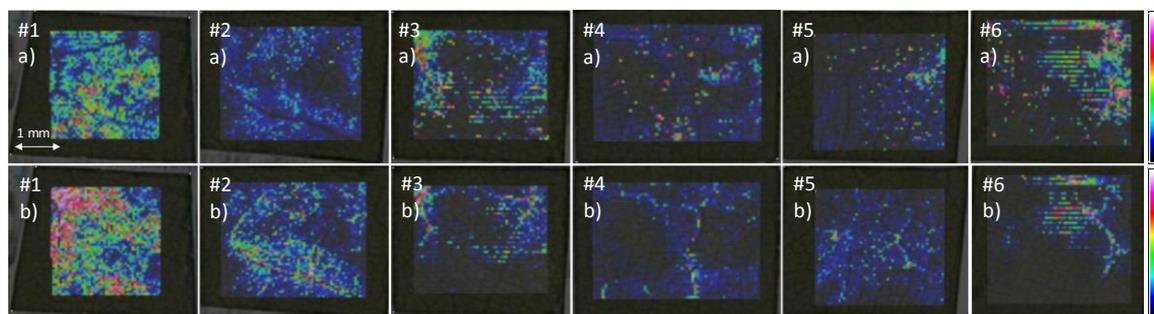
Echantillon	P/S (mg·mL <sup>-1</sup> )	Molécule	Concentration (g·mL <sup>-1</sup> )	Concentration (mg·g <sup>-1</sup> de matière sèche)	Erreur sur la mesure
#1	7,63	Resvératrol	27,43	3,59	11,9%
		Picéide	17,15	2,25	44,3%
		Ptérostilbène	7,22	0,95	7,8%
#2	7,80	Resvératrol	45,91	5,88	14,9%
		Picéide	29,03	3,72	31,1%
		Ptérostilbène	6,80	0,87	13,5%
#3	7,66	Resvératrol	82,72	10,80	8,7%
		Picéide	23,07	3,01	15,5%
		Ptérostilbène	11,03	1,44	3,0%
#4	8,64	Resvératrol	54,17	6,27	10,8%
		Picéide	34,08	3,94	27,4%
		Ptérostilbène	10,34	1,20	6,8%
#5	6,13	Resvératrol	24,61	4,02	21,1%
		Picéide	12,99	2,12	84,3%
		Ptérostilbène	6,01	0,98	10,0%
#6	8,12	Resvératrol	55,03	6,78	13,0%
		Picéide	26,26	3,23	40,3%
		Ptérostilbène	12,92	1,59	13,0%
<b>Resvératrol</b>			<b>48,31</b>		<b>21,29</b>
	<b>Picéide</b>	<b>Moyennes (g·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>23,76</b>	<b>Ecart-types</b>	<b>7,76</b>
	<b>Ptérostilbène</b>		<b>9,05</b>		<b>2,76</b>
Témoïn	5,83	Resvératrol	0,077	0,013	13,1%
		Picéide	2,47	0,42	11,2%
		Ptérostilbène	0,033	0,006	38,7%

Les erreurs sur la mesure pour le resvératrol et le ptérostilbène sont dans la majorité des cas inférieurs à 15 %. Pour le *trans*-picéide, ces erreurs sont en revanche plus importantes, elles sont dans la majorité des cas supérieures à 30 %. Ces calculs d'erreur permettent de relativiser les différences de teneurs constatées entre les 6 échantillons.

### 5.3.2 Corrélation imagerie-dosages LC-MS

Dans un premier temps, les répartitions du resvératrol et du ptérostilbène des 6 échantillons irradiés ont été confrontées afin de dégager visuellement de premières tendances.

La **Figure IV-12** expose les 6 cartes MSI obtenues lors de ces expériences.



**Figure IV-12** : cartes MSI des 6 échantillons irradiés, numérotés de 1 à 6. Les images notées (a) et (b) représentent respectivement les répartitions des ions  $m/z$  228 et 254.

La répartition des deux stilbènes suivis est assez homogène sur toute la surface de l'échantillon #1. Cependant, cette tendance ne s'observe pas pour les autres échantillons. En effet, sur les 5 autres cartes, la synthèse de ces composés est certes intense mais leur localisation est plus hétérogène. Certaines zones, pourtant exposées, présentent même des intensités très faibles voire nulles. Ceci montre que même après une irradiation réalisée sur toute la feuille, la zone de biosynthèse des stilbènes est presque systématiquement répartie de façon inhomogène. Pour notre feuille, la « norme comportementale » semble être plus proche de ce qui est observé pour les échantillons # 2 à 6.

Pour comparer les concentrations en stilbènes obtenues par dosage LC-MS et la répartition des deux stilbènes obtenues par MSI, l'intensité moyenne obtenue pour chaque ions suivis (resvératrol,  $m/z$  228, et ptérostilbène,  $m/z$  254) sur chaque carte MSI a été déterminée. Ces intensités moyennes «  $i$  » ont été divisées par la concentration «  $c$  » de l'échantillon irradié correspondant. Le ratio de proportionnalité intensité/concentration (noté «  $i/c$  ») pourrait permettre de comparer les échantillons entre eux. Le **Tableau IV-4** rassemble les résultats des six couples d'échantillons irradiés.

**Tableau IV-4 : corrélation entre les concentrations déterminées en LC-ITMS et les intensités moyennes relevées en imagerie par spectrométrie de masse des 6 échantillons irradiés aux UV-C. Les intensités des cartes MSI sont exprimées en unité arbitraire (a.u.), l'unité utilisée par le logiciel *FlexImaging*. Les valeurs associées à l'échantillon #1, jugées très élevées par rapport aux autres, sont notées en rouge.**

Echantillon	Intensité moyenne (a.u.)		Ratio intensité/concentration ( <i>i/c</i> )	
	<i>m/z</i> 228	<i>m/z</i> 254	resvératrol + picéide	ptérostilbène
1	21,45	29,58	3,67	31,29
2	5,78	10,98	0,60	12,60
3	9,18	4,63	0,66	3,21
4	3,93	2,81	0,38	2,35
5	3,82	2,32	0,62	2,37
6	8,93	3,70	0,89	2,33
Moyenne *	<b>6,33</b>	<b>4,89</b>	<b>0,63</b>	<b>4,57</b>
Ecart-type *	<b>2,61</b>	<b>3,52</b>	<b>0,18</b>	<b>4,50</b>

\* pour ces calculs, l'échantillon #1 a été exclu, considéré comme point aberrant.

L'échantillon #1 présente des intensités moyennes très élevées par rapport aux cinq autres. Alors que les concentrations obtenues par dosage dans la zone adjacente sont faibles. Il est fort probable que les mesures pour cet échantillon ne soient pas représentatives de la feuille, la zone cartographiée ayant un comportement différent de la moyenne. Mis à part l'échantillon #1, les intensités moyennes des 2 ions considérés restent dans le même ordre de grandeur (inférieure à 10 a.u.). Pour la corrélation du signal de l'ion *m/z* 228, le rapport *i/c* a été calculé en prenant en compte la concentration du resvératrol additionnée à celle du *trans*-picéide puisque ce dernier conduit aussi à la détection de l'ion *m/z* 228 en LDI (en supposant qu'ils aient le même coefficient de réponse). Le ratio *i/c* pour le ptérostilbène est plus important que pour le resvératrol, le rendement d'ionisation de ce composé est donc supérieur à celui du resvératrol : ceci confirme l'observation émise lors du **point 3.3**.

Pour un échantillon biologique, l'écart-type (valeurs en gras, **Tableau IV-4**) est relativement faible pour le resvératrol, la déviation standard est d'environ 30 %. Pour le ptérostilbène, la déviation standard est plus importante puisque de 98 %. Néanmoins, dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence une correspondance acceptable entre les concentrations déterminées en dosages LC-MS/MS et les intensités moyennes des ions enregistrés en imagerie LDI-TOFMS. Ils montrent une répétabilité correcte des signaux d'une image à l'autre.

Toutefois, ils mettent également en évidence une variation des teneurs en stilbène d'une zone à l'autre de la feuille. Deux prélèvements proches peuvent ainsi présenter des concentrations relativement différentes (au maximum d'un facteur 3 dans le cas du resvératrol), contrairement au postulat émis au début de cette étude.

En ce qui concerne la répétabilité du signal, ces résultats laissent imaginer au pire un facteur 2 entre les intensités observées d'une image à l'autre pour les 2 stilbènes suivis. En revanche, la localisation de ces derniers est apparue plus hétérogène que ce qui avait été observé jusqu'alors pour des feuilles irradiées. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, l'explication de cette différence de résultats peut provenir de la variété du cépage ou de la génétique de la plante analysée. Les cartes MSI et les dosages montrent que la variabilité inter image est vraisemblablement davantage imputable à l'échantillon qu'à la technique MSI.

#### 5.4. Conclusion sur l'évaluation de la répétabilité du signal en imagerie

Les dosages LC-ITMS ont permis d'une part de déterminer les teneurs en stilbènes pour plusieurs échantillons irradiés, et d'autre part de contrôler la répétabilité du signal en imagerie. Hormis un échantillon, les intensités pour des échantillons provenant d'une même feuille sont dans le même ordre de grandeur et demeurent comparables. Ce résultat pourra conforter les observations qui seront faites lors de comparaison de cartes réalisées en LDI-TOFMS.

## 6. Imagerie en mode négatif

Avant de refermer la discussion sur l'imagerie en mode LDI, il convient d'explorer les profils métaboliques qui ont pu être observés en mode de détection négatif. Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre III**, lors des analyses d'extraits méthanolique de feuilles, le mode de détection négatif est assez bien adapté pour l'étude de nombreux métabolites.

#### 6.1. Empreinte spectrale LDI-TOFMS en mode négatif

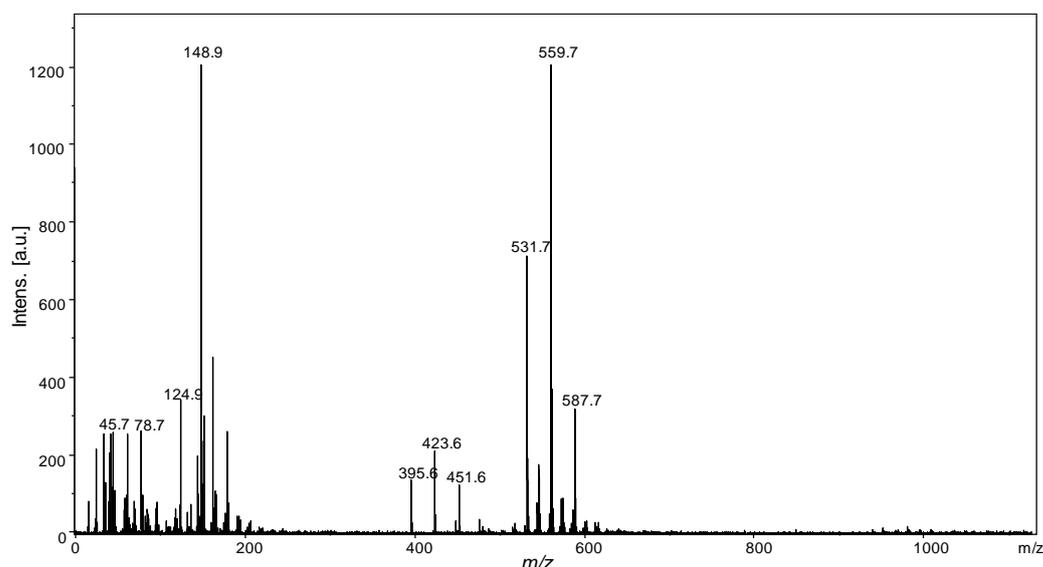
Les tensions du spectromètre de masse ont dû être légèrement modifiées afin d'obtenir le meilleur signal possible. Ces paramètres sont présentés en **Tableau IV-5**.

**Tableau IV-5 : paramètres du spectromètre de masse à temps de vol Reflex IV en mode négatif.**

Paramètre	Valeurs
Ion Source 1	20,00 kV
Ion Source 2	16,20 kV
Lens	9,80 kV
Reflector	23,00 kV
Pulsed ion extraction	200 ns
Detector gain	1728 V

Les paramètres associés au laser 266 nm (focalisation, énergie laser et taille du spot laser) n'ont pas été modifiés. Seule l'énergie du laser a été augmentée pour atteindre un rendement d'ionisation suffisant.

La **Figure IV-13** présente une empreinte spectrale d'une feuille de vigne de Cabernet Sauvignon analysée en mode de détection négatif.



**Figure IV-13** : empreinte spectrale LDI-TOF en mode négatif d'une feuille de vigne de Cabernet Sauvignon.

Certains pics sont remarquables au-delà de 500 Da, c'est notamment le cas des ions  $m/z$  531, 559 et 587. En outre, ces trois ions sont séparés de 28 u entre eux. Ceux-ci pourraient être associés à des molécules ou fragment de molécule présentant des chaînes grasses. Le même comportement se retrouve avec le groupe d'ions  $m/z$  395, 423 et 451. Le défaut de masse est particulièrement élevé pour ces ions, mais ce critère doit être pris avec précaution puisque ce spectre n'a pu être calibré que par étalonnage externe. Malgré quelques investigations, peu d'informations ont pu être trouvées dans la littérature à leur sujet. La perte de 136 u entre les deux séries d'ions peut néanmoins faire penser à des lipides de type phosphatidyl glycérols<sup>70</sup>.

## 6.2. Cartes MSI sur feuilles de vigne en mode négatif

Deux autres ions, très peu intenses sur le spectre de la **Figure IV-13**, ont retenus notre attention. Il s'agit des ions  $m/z$  301 et 317 dont la cartographie peut présenter un intérêt dans le cadre des études de mécanisme de défense chez la vigne.

Un premier essai a été conduit sur une feuille de vigne prélevée en plein champ. Les paramètres sont identiques à ceux décrits au point précédent.

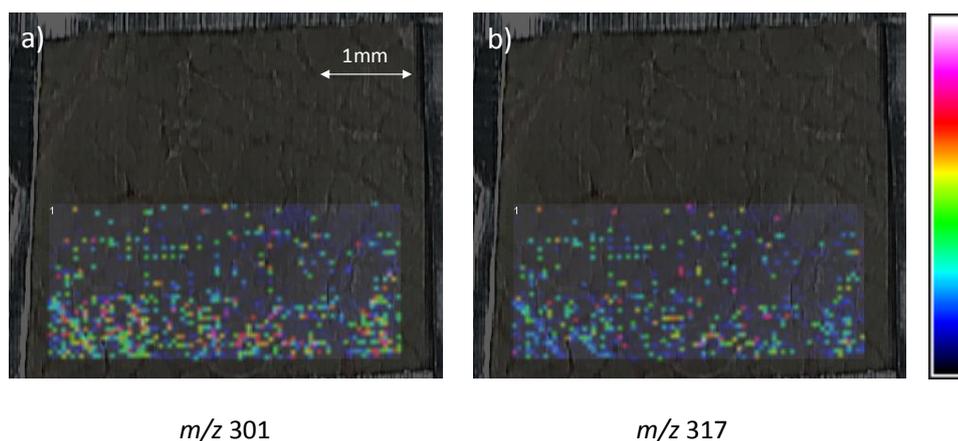


Figure IV-14 : expérience MSI conduite sur une feuille prélevée en plein champ en mode négatif. Représentations des ions (a)  $m/z$  301, ion  $[M-H]^-$  de la quercétine et (b)  $m/z$  317, ion  $[M-H]^-$  de la myricétine.

Les répartitions des ions  $m/z$  301 et 317 présentées en **Figure IV-14** correspondent respectivement à la quercétine et à la myricétine. Il a été montré dans le chapitre précédent que ces flavonoïdes étaient détectés en ESI-FTICRMS exclusivement sous forme de composés substitués par des sucres ; en l'occurrence avec un glucuronide ou avec un rhamnoside. Ainsi, ces ions détectés en LDI-TOFMS sont uniquement associés à l'aglycone correspondant sous forme déprotonée  $[M-H]^-$ . Lors du processus d'ionisation, ces flavonoïdes substitués perdent leur partie sucre comme observé pour le picéide en mode positif. En outre, la répartition de ces deux composés est remarquable. Certains pixels sont très intenses alors que d'autres sont totalement dépourvus de ce ou ces ions. De plus, les deux flavonoïdes semblent colocalisés bien que la quercétine apparaisse de façon plus intense. Un tel comportement n'a pas été retrouvé lors de l'analyse d'une feuille de serre. On ne détecte pas de flavonoïdes sur ce type de feuilles. Les études des extraits méthanoliques par ESI-FTICRMS ont pourtant montré qu'ils étaient présents dans les feuilles cultivées en serre mais sans doute en quantité trop faible pour être détectés avec une bonne sensibilité en imagerie MS. En effet, la serre bloque les rayonnements UV or ces derniers induisent la synthèse de flavonoïdes. En extérieur, ces composés servent de protection anti-UV pour les cellules de l'épiderme de la feuille<sup>71</sup>.

Pour évaluer l'influence de la longueur d'onde sur l'observation de la répartition de métabolites en mode d'ionisation négatif, les deux lasers disponibles sur le Reflex IV ont été évalués. Sur un même échantillon, deux zones ont été analysées : la première à 266 nm, et la seconde à 337 nm. Les paramètres du spectromètre de masse sont restés inchangés et les énergies laser ont été optimisées dans les deux cas pour obtenir le meilleur rapport signal/bruit. L'échantillon provient d'une feuille d'un hybride (7063H, OIV 9) cultivé en plein champ. Les résultats de cette expérience sont décrits en **Figure IV-15**.

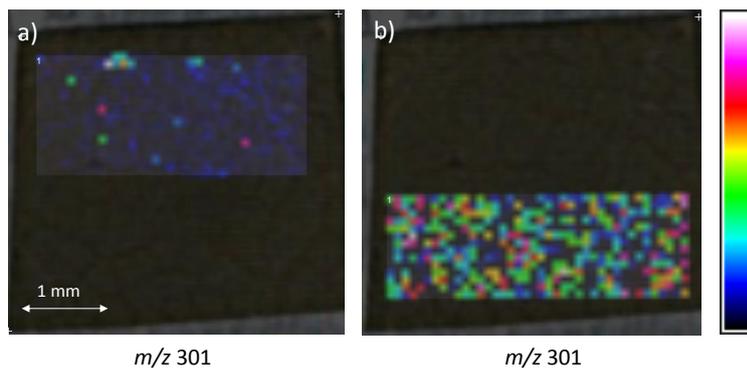


Figure IV-15 : comparatif de l'efficacité d'ionisation pour le mode de détection négatif. (a) répartition de la quercétine, l'ion  $m/z$  301 avec le laser 266 nm et (b) avec le laser 337 nm sur un même échantillon. La résolution spatiale est la même pour les deux images.

A l'observation de ces deux cartes, une nette différence d'intensité apparaît pour la répartition de la quercétine. La sensibilité de détection des flavonoïdes semble bien supérieure à 337 nm par phénomène de protonation. Cette différence peut-être également liée au diamètre du spot laser, plus large dans le cas du laser azote, qui augmenterait la quantité désorbée à l'impact.

## 7. Imagerie par spectrométrie de masse avec matrice

Nous venons de voir que notre méthode d'imagerie MS par LDI de feuilles de vigne permettait d'observer avec une sensibilité élevée deux stilbènes, le resvératrol et le ptérostilbène. Il existe cependant de nombreux autres métabolites non détectés par cette technique et qui ont pu être identifiés lors de l'analyse d'extraits par ESI-FTICRMS (**Chapitre III**). De même, suite à un stress subit par une plante, des phénomènes d'oligomérisation par oxydation du resvératrol ont été décrits, conduisant notamment à la production de viniférines particulièrement actives en présence d'un pathogène. Par conséquent, pour limiter la perte d'information relative à l'interaction laser-feuille, le mode d'ionisation MALDI a été évalué dans le but d'accéder à la répartition de ces autres métabolites d'intérêt. Cette partie décrit les essais réalisés pour déterminer les meilleurs paramètres expérimentaux pour l'imagerie MALDI. Ils ont été menés sur les deux spectromètres à temps de vol disponibles au laboratoire : le Reflex IV et l'Ultraflex III.

### 7.1. Présentation du spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF

En avril 2012, le laboratoire s'est doté d'un nouveau spectromètre de masse à temps de vol MALDI-TOF/TOF, de modèle Ultraflex III (Bruker Daltonic). Les caractéristiques de cet appareil en font un spectromètre adapté pour l'imagerie par spectrométrie de masse. Notamment grâce à la fréquence de tir laser, qui peut monter jusqu'à 200 Hz (contre 9 Hz avec les lasers du Reflex IV).

Les moteurs qui permettent le déplacement de la cible sont également plus véloces. Ces deux caractéristiques permettent d'analyser des zones en imagerie comprenant un nombre supérieur à 10 000 pixels avec une résolution spatiale élevée. Enfin, la possibilité de réaliser des expériences en fragmentation est également un atout pour l'imagerie.

Cependant, en dépit de ses avantages, l'Ultraflex n'a pas permis d'obtenir de résultats en imagerie sur des feuilles de vigne. En effet, dans les conditions d'analyses LDI, quelle que soit l'énergie laser ou le nombre de tirs laser cumulés, le spectre de masse ne comporte que du bruit de fond. Toutes les largeurs de spots ont été testées, sans résultat. Le laser, appelé « Smartbeam » est vraisemblablement en cause. Ce laser de type Nd-YAG émettant une impulsion laser à 355 nm est dit à profil structuré. Contrairement aux lasers Nd-YAG classiques où l'énergie est déposée sur l'échantillon suivant un profil gaussien, le Smartbeam répartit l'énergie laser sur toute la surface de manière inhomogène et modifie cette distribution d'énergie entre chaque tir. La quantité d'énergie localement déposée est donc plus faible, trop faible dans notre cas, pour qu'il y ait une interaction avec les couches celluliques de la feuille, bien plus rigides que ne le serait par exemple, un tissu animal.

Les essais de dépôt d'une couche absorbante telle qu'une matrice n'ont également pas conduit à des résultats satisfaisants, seule la matrice est ionisée. Plusieurs matrices (9-AA, DHB, CHCA, nitrate d'argent et graphite) avec plusieurs concentrations (de 1 M à  $10^{-2}$  M) et plusieurs modes de dépôts (goutte séchée, vaporisation, trempage de l'échantillon) ont été testés en vain.

En conséquence, seuls les essais de matrice sur les étalons et les extraits ont pu être réalisés sur l'Ultraflex III. Les expériences d'imageries MALDI ont été conduites sur le Reflex IV.

## 7.2. Analyse MALDI-TOFMS de composés standards

Certains métabolites présents au sein des extraits de feuilles de vigne (voir **Chapitre III**) et détectés lors des études ESI-FTICRMS sont commerciaux et étaient disponibles au laboratoire. Des essais d'ionisation ont été réalisés sur ces étalons afin de déterminer les matrices les plus efficaces en mode positif et négatif. Deux familles de métabolites ont été étudiées : les flavonoïdes et les stilbènes.

### 7.2.1 Analyse de flavonoïdes

Deux flavonoïdes de type flavonol ont été analysés en MALDI-TOFMS : la quercétine et l'astragaline (kaempférol-3-O-glucoside). Dans ce dernier cas, un processus d'ionisation doux est indispensable pour ioniser la molécule sans fragmentation, la liaison O-glycosidique étant

particulièrement fragile<sup>72</sup>. Ces étalons ont été préparés dans du méthanol à une concentration de  $10^{-5}$  M. Les analyses ont été conduites sur l'Ultraflex III équipé du laser Smartbeam à 355 nm.

Cinq matrices ont été testées pour l'analyse de ces deux composés : la 9-aminoacridine (9-AA), le 1,5-diaminonaphtalène (DAN), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et la trihydroxyacétophénone (THAP). Un rapport de concentration classique de 10 000 a été défini entre l'analyte et les matrices, en conséquence ces dernières ont été préparées à  $10^{-1}$  M. Pour le mode de détection positif, l'ajout d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % a également été évalué systématiquement. Des dépôts de 1  $\mu$ L des différents mélanges intimes (matrice et standards) sont effectués en goutte séchée sur la plaque MALDI. Dans chaque expérience, le type d'ion détecté (ion sous forme radicalaire, protoné ou déprotoné) a été reporté ainsi que son rapport signal/bruit associé. Les conditions LDI, sans matrice ont également été évaluées pour avoir un point de comparaison avec cette technique d'ionisation qui est notre référence depuis le début du chapitre. Le **Tableau IV-6** résume les différents résultats relatifs aux essais réalisés avec la quercétine.

**Tableau IV-6 : récapitulatif des rapports signal/bruit et des intensités absolues obtenus pour la détection de la quercétine (solution méthanolique à  $10^{-5}$  M) en LDI- et MALDI-TOFMS dans les différentes conditions testées. Cinq matrices ont été testées : 9-AA, DAN, DHB, CHCA et THAP, toute préparée à  $10^{-1}$  M (« / » non détecté).**

Mode	Matrice	Solvant	Pic majoritaire	Intensité (a.u.)	S/N
Négatif		LDI	/	/	/
	<b>9-AA</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	<b>301</b>	<b>1541</b>	<b>347</b>
	<b>DAN</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>302* / 301</b>	<b>3261 / 2923</b>	<b>711 / 637</b>
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	301	2848	204
	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	301	1013	148.8
Positif		LDI	/	/	/
	DAN	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DAN+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	303	11421	285.9
	<b>DHB+TFA</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>303</b>	<b>25992</b>	<b>464.7</b>
	<b>CHCA</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>303</b>	<b>54004</b>	<b>549</b>
	CHCA+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	303	53697	362
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	303	7480	243.4
	THAP+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	303	14719	285.8
	9-AA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	/	/	/
9-AA+TFA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	/	/	/	

\* : ion radicalaire

L'ionisation LDI à 355 nm de ce composé est inefficace que ce soit en mode négatif ou en mode positif. En MALDI, le DAN permet d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit (886) pour la détection de la quercétine. Cette matrice permet l'ionisation de cette molécule sous forme déprotonée ( $m/z$  301) mais aussi sous forme radicalaire  $M^{\bullet-}$  ( $m/z$  302), démontrant le fait que cette matrice est donneuse d'électron. L'ionisation la quercétine avec La 9-AA est satisfaisante même si le rapport S/N est deux fois important qu'avec la matrice précédente. En mode positif, la DHB avec l'ajout de TFA à 0,1 % et la CHCA donnent les meilleurs résultats avec respectivement des rapports S/N de 464 et 617. A noter que les intensités absolues sont bien plus élevées en mode positif. Ainsi pour ce composé, il est possible de travailler en mode négatif mais également positif.

Les mêmes tests ont été conduits sur astragaline, le **Tableau IV-7** synthétise les résultats associés.

Tableau IV-7 : récapitulatif des rapports signal/bruit et des intensités absolues obtenus pour la détection du kaempférol-O-glycoside (solution méthanolique à  $10^{-5}$  M) en LDI- et MALDI-TOFMS dans les différentes conditions testées. Cinq matrices ont été testées : 9-AA, DAN, DHB, CHCA et THAP, toute préparée à  $10^{-1}$  M (« / » non détecté).

Mode	Matrice	Solvant	Pic majoritaire	Intensité (a.u.)	S/N
		LDI	447 / 285	3344 / 6051	105.6 / 131.8
Négatif	9-AA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	447	629	25.3
	<b>DAN</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>448* / 447</b>	<b>1403 / 1491</b>	<b>124.3 / 131.1</b>
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
		LDI	/	/	/
Positif	DAN	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DAN+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	<b>DHB</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>287 / 449</b>	<b>4066 / 1723</b>	<b>183.4 / 60.1</b>
	<b>DHB+TFA</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>287 / 449</b>	<b>7055 / 1504</b>	<b>295.2 / 47.9</b>
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	287	4416	220.1
	CHCA+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	287	307	55.7
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	287 / 449	348 / 747	70.4 / 79
	THAP+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	287 / 449	1033 / 1038	72.1 / 57
	9-AA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	/	/	/
9-AA+TFA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	/	/	/	

\* : ion radicalaire

La LDI permet cette fois l'ionisation de ce composé et deux ions déprotonés peuvent être observés pour ce composé;  $m/z$  447 et 285 qui peuvent être respectivement associés à l'ion moléculaire et à son aglycone déprotonés. Les meilleurs rapports S/N sont toutefois obtenus avec le DAN avec une détection de l'astragaline sous forme d'ion radicalaire ( $m/z$  448) et d'ion moléculaire déprotoné ( $m/z$  447). En mode positif, la THAP permet la détection de l'ion  $m/z$  447 avec le meilleur rapport S/N.

L'ionisation de l'astragaline n'est pas aisée même en condition MALDI. L'hétéroside est détecté sous forme de fragment correspondant à l'aglycone. L'intensité absolue de ce dernier est toujours bien supérieure à celle de l'hétéroside (mise à part pour le cas de la THAP avec TFA en mode positif). Ceci met en évidence le fait que ces conditions d'ionisation MALDI sont moins douces que l'électrospray. La 9-AA permet néanmoins la détection de l'hétéroside avec un bon rapport S/N. Contrairement aux autres matrices, cette dernière présente l'avantage de ne générer que très peu d'ions, l'ion majoritaire en mode négatif étant relatif à la 9-AA déprotonée. Ceci facilite

grandement les interprétations des spectres issus d'analyse MALDI-TOFMS en n'ayant quasiment pas de signaux interférents avec les pics d'intérêts.

Pour l'analyse de flavonoïdes, le 1,5-diaminonaphtalène semble être bien adaptée au mode de détection négatif. En mode positif, l'obtention de l'ion moléculaire est plus difficile à obtenir mais possible avec la THAP et la DHB. Pour cette dernière, l'ajout de TFA augmente légèrement le rapport signal sur bruit.

### 7.2.2 Analyse de stilbènes

Ces essais ont été menés sur le *trans*-resvératrol, le *trans*-ptérostilbène et un dimère de resvératrol, la *trans*- $\delta$ -viniférine, toujours avec les cinq mêmes matrices.

Le ratio matrice/analyte a dû cependant être ramené à 1 000 pour conduire une détection des stilbènes. Les standards ont été préparés à  $10^{-4}$  M et les matrices toujours à  $10^{-1}$  M.

Le **Tableau IV-8** résume les différents rapports signal sur bruit enregistrés avec les différentes matrices. La CHCA n'a pas pu être prise en compte en mode positif puisqu'elle génère un pic interférent  $m/z$  228 avec le resvératrol.

**Tableau IV-8 : récapitulatif des rapports signal/bruit et des intensités absolues obtenus pour la détection du resvératrol (solution méthanolique à  $10^{-4}$  M) en en LDI- et MALDI-TOFMS dans les différentes conditions testées. Cinq matrices ont été testées : 9-AA, DAN, DHB, CHCA et THAP, toute préparée à  $10^{-1}$  M (« / » non détecté).**

Mode	Matrice	Solvant	Pic majoritaire	Intensité (a.u.)	S/N
Négatif		LDI	227	7373	306.7
	9-AA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	<b>227</b>	<b>594</b>	<b>68.2</b>
	DAN	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>227 / 228*</b>	<b>1499 / 662</b>	<b>348.9 / 153</b>
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
Positif		LDI	228*	2934	91.5
	DAN	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DAN+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	228* / 229	499 / 232	55.3 / 25.5
	DHB+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	228* / 229	6783 / 5366	328.8 / 258.7
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	CHCA+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	229	152	38.3
9-AA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	/	/	/	

\* : ion radicalaire

Le resvératrol peut s'ioniser sans l'aide de matrice avec le laser à 355 nm. Parmi les matrices testées en mode d'ionisation positif, seule la DHB conduit à la détection du resvératrol sous deux formes : l'ion moléculaire radicalaire et protoné. L'ajout d'acide trifluoroacétique améliore significativement le signal. Le rapport S/N ainsi que l'intensité absolue de l'ion protoné augmentent cependant plus vite (facteur 10) que ceux de l'ion radicalaire (facteur 6). Ce comportement est attendu puisque l'ajout d'acide augmente la quantité de protons dans le milieu. De façon similaire, en mode négatif, le DAN conduit à la détection de l'ion radicalaire  $M^{\bullet}$  et de l'ion déprotoné  $[M-H]^{-}$ .

Les résultats pour le ptérostilbène sont semblables. Un bon rapport S/N s'obtient en mode négatif sans matrice et il s'ionise également en mode positif avec la DHB. Le dernier stilbène testé fut la *trans*- $\delta$ -viniférine. Les résultats associés à ce composé sont détaillés dans le **Tableau IV-9**. Le 1,5-diaminonaphtalène n'a pas pu être utilisé en raison d'un pic apparaissant au rapport  $m/z$  453, le même que celui associé à l'ion moléculaire de la viniférine déprotonée.

**Tableau IV-9 : récapitulatif des rapports signal/bruit et des intensités absolues obtenus pour la détection de la *trans*- $\delta$ -viniférine (solution méthanolique à  $10^{-4}$  M) en LDI- et MALDI-TOFMS dans les différentes conditions testées. Quatre matrices ont été testées : 9-AA, DHB, CHCA et THAP, toute préparée à  $10^{-1}$  M (« / » non détecté).**

Mode	Matrice	Solvant	Pic majoritaire	Intensité (a.u.)	S/N
		LDI	/	/	/
Négatif	9-AA	MeOH/H <sub>2</sub> O 75/25	453	185	11.4
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
		LDI	/	/	/
Positif	DHB	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	454/455	946 / 721	182.5/139.1
	<b>DHB+TFA</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>454/455</b>	<b>2601 / 1825</b>	<b>329.8/231.1</b>
	CHCA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	454	1015	145.7
	<b>CHCA+TFA</b>	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	<b>454</b>	<b>12647</b>	<b>500.6</b>
	THAP	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	/	/	/
	THAP+TFA	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50	454 / 455	252 / 376	29.5 / 44.2

\* : ion radicalaire

Sans utilisation de matrice, la viniférine n'est pas détectée. Ceci n'est pas surprenant puisque cette molécule ou l'un de ses isomères n'ont jamais été détectés en imagerie par LDI. En mode négatif, seul la 9-AA conduit à la détection de l'ion déprotoné mais avec un rapport signal sur bruit très

faible. En mode positif, deux matrices se distinguent : la DHB et la CHCA. Pour ces dernières, l'ajout d'acide trifluoroacétique à 0,1 % améliore nettement le signal. A noter que l'ion majoritaire détecté avec la CHCA est l'ion radicalaire  $M^{\bullet}$ . La DHB conduit quant à elle à la détection de l'ion  $M^{\bullet}$  et de l'ion  $[M+H]^+$ .

Suite à ces essais, deux matrices seront conservées pour les analyses d'extraits : la DHB pour le mode positif et la 9-AA pour le mode négatif. Ces deux matrices se sont révélées être adaptées au type de composés recherchés (stilbènes et flavonoïdes).

### 7.3. Analyse MALDI-TOFMS d'extraits méthanoliques de feuilles de vigne

Dans la continuité de ces premiers tests avec matrice, des extraits de feuilles de vigne préalablement analysés en ESI-FTICRMS ont été analysés en MALDI-TOFMS. Au vu des expériences menées sur les standards, seules deux matrices ont été retenues pour l'analyse d'extraits méthanoliques : la 9-AA pour le mode négatif et la DHB pour le mode positif.

Ce sont directement les mêmes échantillons analysés en infusion directe (**Chapitre III**) qui ont été utilisés pour les mélanges intimes avec les matrices. En conservant la même concentration il est ainsi possible de comparer la sensibilité de l'analyse MALDI-TOFMS par rapport à l'ESI-FTICRMS. Les extraits sélectionnés sont des extraits inoculés. Les extraits n°2462 et n°2444 présentent respectivement un indice OIV 7 et 9. Ne connaissant pas les concentrations des métabolites au sein des extraits, les matrices ont été préparées à une concentration de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Après mélange intime de l'extrait et de la matrice,  $1 \mu\text{L}$  a été déposé sur la plaque d'analyse, le **Tableau IV-10** présente les principales espèces détectées pour les deux extraits.

**Tableau IV-10 : espèces détectées pour l'analyse des extraits méthanoliques n°2462 et n°2444 en MALDI-TOFMS avec les deux matrices suivantes : 9-AA et DHB préparées à  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .**

	Mode	Matrice	Pics de matrices majoritaires ( $m/z$ )	Espèces observées ( $m/z$ )
Extrait n°2462	Négatif	9-AA	193	301 ; 353 ; 447 ; 463 ; 793 ; 815
	Positif	DHB	137 ; 154 ; 155 ; 177 ; 193 ; 273	184 ; 226 ; 303 ; 319 ; 455 ; 593 ; 607
Extrait n°2444	Négatif	9-AA	193	227 ; 301 ; 317 ; 463 ; 493
		DHB	153 ; 289 ; 307	317 ; 341 ; 463 ; 493
	Positif	DHB	137 ; 154 ; 155 ; 177 ; 193	184 ; 226 ; 257 ; 303 ; 319 ; 463 ; 579 ; 607

Pour l'extrait n°2462, la 9-AA permet l'ionisation en mode négatif, comme attendu, de plusieurs flavonoïdes. Les ions  $m/z$  301, 317, 447 et 463 respectivement associés à la quercétine, la myricétine, la quercétine-O-rhamnoside et la myricétine-O-rhamnoside sont ainsi détectés.

L'acide chlorogénique ( $m/z$  353), ainsi que deux acyle-lipides ( $m/z$  793 et 815) sont également détectés, ce qui en fait une matrice plutôt polyvalente. En mode positif, la DHB permet de détecter des composés relatifs aux cires, détectés en LDI, mais cette fois-ci sous forme d'ions protonés ( $m/z$  593 et 607). Certains fragments associés à ces cires se détectent aussi sous forme d'ions radicalaires ( $m/z$  184 et 226). La quercétine et la myricétine se détectent uniquement sans leur sucre, donc sous forme de fragment. La DHB confirme, en outre, le résultat observé avec l'étude du standard de la viniférine. Elle conduit en effet à la détection de ce composé sous sa forme radicalaire ( $m/z$  454) et protonée ( $m/z$  455), même si dans le cas présent c'est l'espèce  $[M+H]^+$  qui est la plus intense.

Pour l'extrait n°2444, la DHB donne lieu en mode négatif à la détection du disaccharide ( $m/z$  341) largement détecté durant l'étude ESI-FTICRMS (voir **Chapitre III**) mais aussi des flavonoïdes ( $m/z$  317, 463 et 493). Toutefois la sensibilité sur ces derniers est meilleure avec la 9-aminoacridine. En outre, le resvératrol est détecté sous sa forme déprotoné ( $m/z$  227) avec la 9-AA. En mode positif, cette dernière n'a pas conduit à la détection de métabolites d'intérêts. En mode positif, la DHB permet tout comme avec l'extrait n°2462, de détecter les flavonoïdes (sous forme d'aglycones seulement), les cires mais aussi le ptérostilbène. L'ion  $m/z$  463 détecté en mode positif, peut être associé à titre d'hypothèse à la péonidine-O-glucoside. Cet anthocyane a notamment été détecté au sein des feuilles de *Vitis vinifera*<sup>73</sup>.

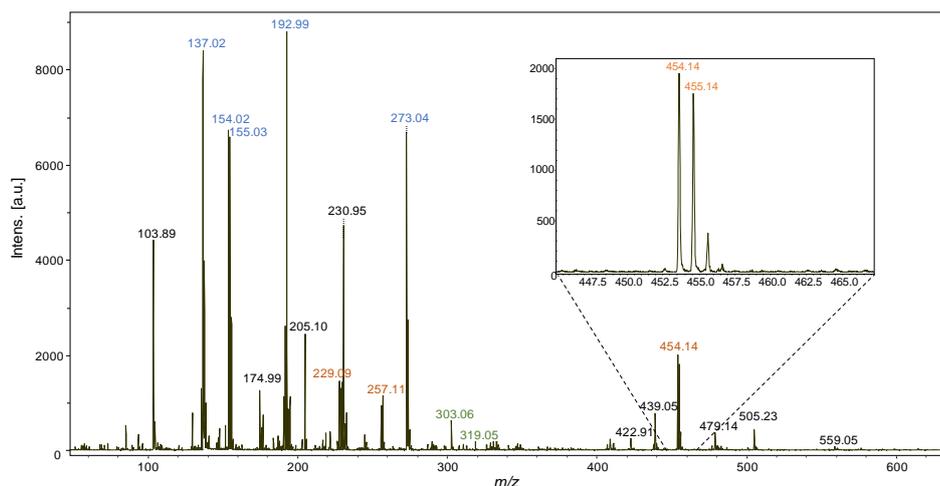
Ces travaux montrent qu'il est difficile de trouver une matrice permettant d'ioniser toutes les familles de composés. Toutefois, deux matrices se dégagent à la suite de cette étude. En mode négatif, la 9-AA est la plus polyvalente. Elle permet l'ionisation de flavonoïdes avec leur sucre mais également celle des acyle-lipides. Dans le mode positif, c'est la DHB qui donne les meilleurs résultats même si elle génère de nombreux pics potentiellement interférents. Elle permet notamment de détecter les viniférines, des composés auxquels on s'intéresse fortement dans le processus de sensibilité ou de résistance au mildiou et qui, jusqu'à présent, étaient inaccessibles en imagerie. Enfin, ces analyses d'extraits de la population 41528 ont confirmé les observations émises lors des analyses des standards.

Ces extraits ont également été analysés sur le Reflex IV avec le laser azote afin de déceler une éventuelle influence du laser. Les différences aux niveaux des longueurs des deux lasers (337 nm pour le laser azote et 355 nm laser Nd-YAG) et des profils énergétiques n'ont cependant pas conduit à des changements significatifs, que ce soit en termes d'espèces détectées ou en termes d'intensité du signal.

#### 7.4. MALDI-MSI sur le Reflex IV 337 nm

Suite au problème de sensibilité rencontré sur l'Ultraflex III, mentionné en introduction de cette partie, les expériences MALDI-MSI ont été conduites sur le Reflex IV équipé du laser 337 nm. Ce dernier permet d'obtenir du signal sur les feuilles en LDI avec ou sans matrice. Toutefois, sa vitesse d'acquisition reste faible (8 Hz). En conséquence les analyses en imagerie couvriront de petites zones. Le laser à 266 nm n'a pas été utilisé puisque la longueur d'onde d'absorption des matrices usuelles se situe aux alentours de 337 nm, la longueur d'onde générée par le laser azote.

Cette expérience d'imagerie MALDI en mode positif a été réalisée avec l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque. La matrice a été solubilisée à une concentration de 10 mg·mL<sup>-1</sup> dans un solvant acétonitrile/eau 50/50 (v/v) acidifié à 0,1 % avec de l'acide trifluoroacétique. Cinq microlitres de matrice ont été déposés sur la surface d'une feuille de vigne de 10,6 mm<sup>2</sup>. Cet échantillon a été préparé à partir d'une feuille fraîche de génotype Rpv1 22-8-78 préalablement irradiée aux UV-C. La **Figure IV-16** expose un spectre MALDI-TOFMS de cet échantillon.



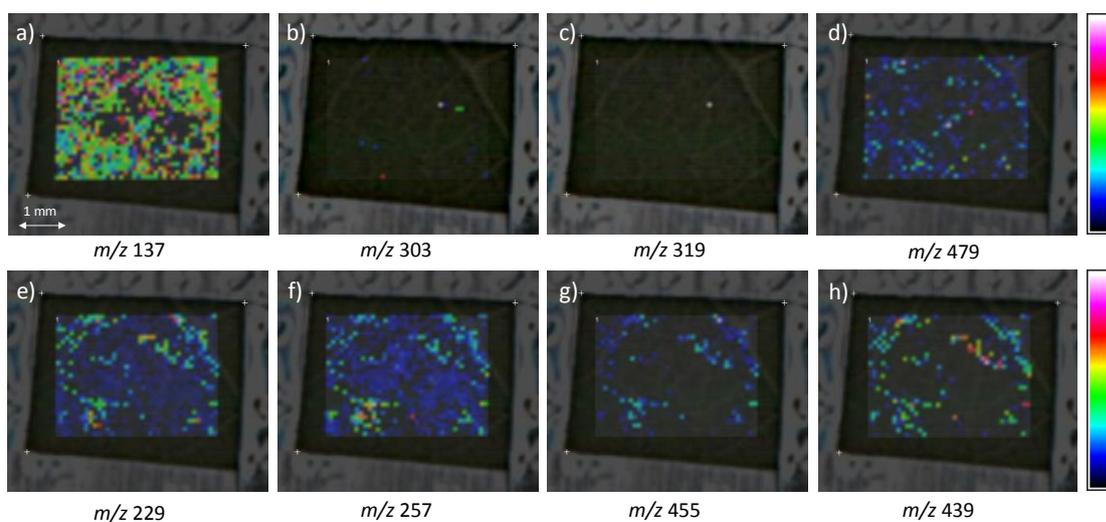
**Figure IV-16** : spectre MALDI-TOFMS après un dépôt de 5  $\mu$ L de DHB sur un échantillon irradié Rpv1 22-8-78.

La calibration est effectuée de 137 à 454 Da avec une erreur de 13 ppm. Apparaissent en bleu les ions associés à la matrice, en orange aux stilbènes et en vert aux flavonoïdes. Le cartouche, zoom de 445 à 467 Da, détaille les deux espèces détectées relatives aux viniférines.

Les ions issus de la DHB dominent cette empreinte spectrale. Outre la perturbation en basse masse, ces signaux permettent de calibrer le spectre. La cartouche montre les deux signaux détectés de la viniférine. La distribution isotopique de l'ion radicalaire  $m/z$  454 n'est pas celle attendue, l'ion  $m/z$  455 est presque aussi intense. Ce signal présente en réalité deux contributions : celle du <sup>13</sup>C de l'ion radicalaire  $m/z$  454 et celle de l'ion protoné  $m/z$  455. La résolution du spectromètre de masse à temps de vol n'est pas suffisante pour séparer ces deux

pics qui ne possèdent pas la même masse exacte (différence de 9,7 ppm). Deux flavonoïdes aglycones (pics de couleur verte, **Figure IV-16**) sont également présents sur ce spectre à une intensité inférieure à celle des stilbènes. En revanche, l'ion  $m/z$  479 pourrait correspondre à la quercétine-O-glucuronide. Ce flavonoïde a été largement détecté dans les extraits méthanoliques sous la forme de l'ion déprotoné  $m/z$  477 (voir **Chapitre III**). Les autres ions intenses, hors pics de matrice, n'ont pas pu être identifiés.

Suite à cette analyse, l'expérience MSI a été conduite sur le même échantillon sur une surface de 6,4 mm<sup>2</sup>. La **Figure IV-17** présente différentes cartes MSI associées à différents ions remarquables.



**Figure IV-17** : expérience MALDI-MSI à 337 nm en mode positif. Cinq microlitres de DHB ont été déposés sur une surface de 10,6 mm<sup>2</sup>. La trame analysée mesurait 6,4 mm<sup>2</sup> avec une résolution spatiale de 75 μm, soit 1094 pixels. Les cartes MSI correspondent à la répartition de l'ion (a)  $m/z$  137 ([DHB-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>), (b)  $m/z$  303 (quercétine protonée), (c)  $m/z$  319 (myricétine protonée), (d)  $m/z$  479, (e)  $m/z$  229 (resvératrol protoné), (f)  $m/z$  257 (ptérostilbène protoné) et (h)  $m/z$  455 (viniférine protonée) et  $m/z$  439.

La répartition de l'ion relatif de la matrice ( $m/z$  137) est relativement homogène, hormis sur la zone centrale (**Figure IV-17 (a)**). De même, alors que cette matrice cristallise le plus souvent sous forme d'aiguilles, la formation d'un dépôt de matrice s'est fait sous la forme uniquement d'une couche de matrice. Ceci montre que cette méthode de dépôt par goutte séchée est envisageable sur des feuilles, en veillant toutefois à contrôler la quantité déposée, celle-ci augmentant fortement le risque de délocalisation des analytes de la feuille. Il existe d'ailleurs des dispositifs dédiés pour les dépôts de matrice soit par vaporisation (par exemple, le dispositif ImagePrep, Bruker), soit par sublimation permettant de mieux contrôler ces dépôts de matrice<sup>74</sup>. Les flavonoïdes détectés sous forme aglycone sont peu présents sur ces échantillons. Ceci est vraisemblablement dû au fait que cette feuille provienne d'une serre et a, par conséquent,

synthétisé moins de flavonoïdes. La répartition de l'ion  $m/z$  479 (**Figure IV-17 (d)**), possiblement la quercétine-O-glucuronide déprotonée est remarquable : il est particulièrement localisé, mais différemment par rapport aux stilbènes. Les lieux de biosynthèse de ces deux familles de composés sont probablement différents.

Trois stilbènes sont observés en imagerie : le resvératrol, le ptérostilbène et la viniférine (isomères) sous forme d'ions moléculaires radicalaires et protonés, ces derniers étant les plus abondants ((**Figure IV-17 (e), (f) et (g)**). L'apport du mode MALDI est particulièrement intéressant ici parce qu'il permet d'observer que la localisation de ces trois stilbènes est similaire. Ceci indiquerait que le lieu de biosynthèse de ces stilbènes est commun. En revanche, le picéide n'a pas été détecté. Son rendement d'ionisation à partir de la feuille de vigne est vraisemblablement faible. On peut penser que ce composé se localise davantage dans les tissus de la feuille, étant ainsi inaccessible avec une analyse de surface comme la MALDI. Enfin, l'ion  $m/z$  439 a retenu notre attention, ce dernier présente une répartition similaire à celle des stilbènes bien que cette masse ne corresponde pas à un représentant de cette famille de phytoalexines ((**Figure IV-17 (h)**).

Cette expérience en imagerie MALDI montre une avancée par rapport à l'imagerie LDI-TOFMS. Dans le mode positif, la DHB permet de détecter les viniférines, ces composés qui étaient jusqu'à présent inaccessibles. Ce résultat est d'autant plus intéressant que ces stilbènes présentent la toxicité la plus importante envers les zoospores de *Plasmopara viticola*<sup>75</sup>.

Un essai a également été réalisé en mode négatif avec la matrice 9-aminoacridine. Cette matrice a en effet conduit à des résultats encourageants lors des analyses des standards et des extraits méthanoliques. Cependant aucun résultat concluant n'a été obtenu, seule la matrice générait des pics. Plusieurs concentrations de matrices ont été testées, sans amélioration. Les flavonoïdes glycosylés susceptibles d'être présent n'ont pas été détectés. Ceci est vraisemblablement dû au fait que la feuille analysée était une feuille de serre. Or, nous avons montré qu'une feuille extérieure présente des concentrations en ces composés bien plus importantes (**point 6.2**).

Ces résultats préliminaires sont prometteurs mais il est possible de les optimiser. Le mode de dépôt de la matrice peut être amélioré. Ces expériences peuvent être conduites sur des feuilles inoculées ainsi que sur des feuilles issues de pieds de vigne cultivés en plein champ. Ceci dans le but d'observer la localisation spécifique de stilbènes et de flavonoïdes.

L'imagerie LDI ou MALDI reste cependant une analyse de surface, dès lors, qu'en est-il de la répartition de ces métabolites dans la profondeur de la feuille ?

## 8. Etude de feuilles de vigne en profondeur

Pour tenter de retirer une ou plusieurs couches cellulaires, deux techniques peuvent être considérées. La première solution envisageable est la microdissection par microtome, il serait alors possible d'analyser la feuille couche par couche (de 2 à 25  $\mu\text{m}$ ) et donc de s'affranchir de l'épiderme. Dans ce cas, le protocole de préparation d'échantillon deviendrait plus lourd. La deuxième solution concerne l'utilisation d'un laser excimer pour ablater les couches superficielles. Le laboratoire a démontré une expertise certaine dans le domaine de l'interaction laser matière de haute énergie, en conséquence, cette solution a été privilégiée en premier lieu.

### 8.1. Généralités sur le laser excimer

Le laser à excimère ou laser à exciplexe (l'appellation dépend du gaz utilisé : pur ou en mélange) émet dans le domaine des ultraviolets. Il est notamment employé en chirurgie oculaire réfractive. Sous l'effet d'une décharge électrique importante (plusieurs dizaines de kilovolts), l'espèce excimère ou exciplexe se retrouve à l'état excité. Lorsque l'espèce redescend à son niveau d'énergie fondamental, elle émet un rayonnement laser de longueur d'onde spécifique à l'espèce utilisée.

Le laboratoire est équipé d'un laser à exciplexe COMPex<sup>TM</sup> 201 (Lambda Physik) utilisant un mélange d'argon et de fluor. En se désexcitant, l'espèce ArF\* émet à la longueur de 193 nm. L'énergie maximale délivrée en sortie par ce laser est supérieure à 200 mJ et la durée du pulse est de 20 ns. Le spot est de forme rectangulaire, un diaphragme est disposé sur le banc optique afin de réduire le spot à la taille de la surface de la feuille à traiter.

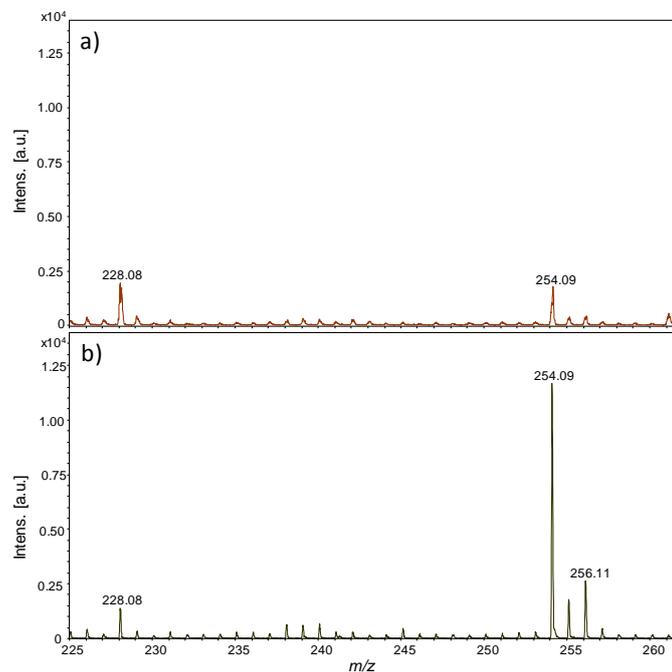
### 8.2. Analyses LDI-TOFMS après ablation laser

Plusieurs énergies laser de sortie ont été testées. Bien que le laser puisse tirer à une fréquence de 10 Hz, cette dernière a été réglée à 1 Hz afin de mieux contrôler le nombre de tir que l'échantillon reçoit.

Ces expériences préliminaires ont été réalisées tardivement, par conséquent, il n'a pas été possible d'évaluer la profondeur d'ablation générée par le laser excimer sur les feuilles de vigne. En conséquence, ces essais préliminaires ont été menés sur des feuilles irradiées Rpv1 22-8-78. Ces dernières ont été analysées au préalable sur le Reflex IV en imagerie LDI-TOFMS avec le laser à 266 nm dans le but de cibler le comportement des stilbènes. Ces expériences en imagerie préliminaires ont pour but « d'épuiser » les stilbènes présents en surface de la feuille.

Différentes énergies laser ont été testées sur les feuilles irradiées après leur analyse en MSI : 50, 75, 100, 125, 150 et 200 mJ. Au-delà de 150 mJ, l'aspect de la feuille change : elle brunit. En outre, le signal en LDI-TOFMS s'en retrouve affecté : pour conserver l'énergie du laser LDI à son énergie habituelle, une saturation du détecteur est enregistrée de 40 à 400 Da. Il est donc nécessaire d'augmenter fortement l'atténuation laser mais au détriment du signal. Pour des énergies inférieures à 100 mJ, il est difficile de quantifier les différences d'intensité des composés d'intérêts. En conséquence, l'énergie du laser excimer a été fixée à 100 mJ pour le reste des tests.

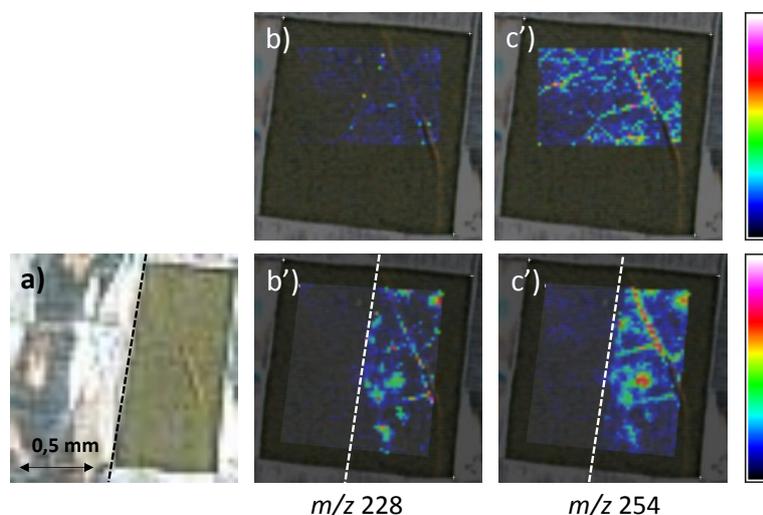
Les feuilles irradiées sélectionnées pour ces tests ont montré des intensités en resvératrol ( $m/z$  228) et ptérostilbène ( $m/z$  254) très importantes. Dans un premier temps, une image a été réalisée sur la globalité d'un échantillon. Puis, sur la surface « épuisée » en stilbènes, un spectre de 500 tirs laser cumulés à différents endroits de la zone analysée en MSI a été enregistré. L'échantillon a ensuite été soumis à 10 tirs à 100 mJ du laser excimer. Enfin, afin de comparer les intensités avant et après passage au laser excimer, un nouveau spectre de 500 tirs lasers cumulés a été enregistré sur le même carré de feuille. Les paramètres LDI-TOF et du laser 266 nm sont restés fixes. La **Figure IV-18** expose un agrandissement des deux empreintes spectrales dans la zone d'intérêt de cet échantillon.



**Figure IV-18 : comparaison du signal du resvératrol et du ptérostilbène avant et après ablation au laser excimer. Somme de 500 spectres de masse LDI-TOFMS (500 tirs laser), d'un échantillon irradié Rpv1 22-8-78 (a) avant traitement au laser excimer et (b) après traitement au laser excimer. Zoom entre 225 et 262 Da, le maximum des axes d'ordonnées a été fixé à  $1,4 \cdot 10^4$  a.u.**

Le rapport signal sur bruit est supérieur dans le cas du spectre après le traitement au laser excimer. Si dans les deux cas l'intensité absolue du resvératrol reste dans le même ordre de grandeur (environ 2100 a.u.), celle du ptérostilbène est plus importante d'un facteur 6 (**Figure IV-18 (b)**). Il semblerait donc qu'une ou plusieurs couches soient ablatées lors du passage au laser excimer puisque l'intensité du ptérostilbène est plus importante. Toutefois, la feuille n'étant pas un matériel homogène, il est difficile de conclure avec la seule comparaison de sommes de 500 spectres de masse.

Finalement, pour confirmer cette observation, une expérience en imagerie MS a été menée. Un autre échantillon irradié (également de génotype 22-8-78) présentant des taux importants de stilbènes a été dans un premier temps analysé en MSI. Un cache a ensuite été disposé sur la moitié de l'échantillon (**Figure IV-19 (a)**). Puis, ce dernier a été soumis à 10 tirs du laser excimer à une énergie de 100 mJ. Après traitement, la feuille a été analysée une seconde fois en MSI après avoir retiré le cache. La zone de la seconde analyse MSI a été étendue afin de constater une éventuelle influence du recouvrement des tirs lasers à 266 nm. La **Figure IV-19** présente les images associées à cette expérience.



**Figure IV-19 :** étude de l'influence de l'ablation laser sur le signal des stilbènes par imagerie MS. (a) image optique avec le dispositif de cache avant le passage au laser excimer. (b) et (c) sont les cartes MSI respectives de la répartition du resvératrol et du ptérostilbène issues de la 1<sup>ère</sup> analyse MSI. Pour la 2<sup>ème</sup> analyse MSI, la zone a été étendue, (b') et (c') sont associées respectivement à la répartition du resvératrol et du ptérostilbène après 10 tirs à 100 mJ au laser excimer.

La séparation entre la zone traitée et la zone non traitée au laser excimer se distingue aisément. L'analyse de la partie gauche non exposée au laser montre des intensités en stilbène bien plus faibles par rapport à celle de la partie droite, exposée au laser (**Figure IV-19 (b') et (c')**). C'est

d'autant plus flagrant pour le cas du ptérostilbène qui est plus intense. Ceci confirme l'observation émise à l'observation des deux spectres de masses (**Figure IV-18**) : les intensités relatives au ptérostilbène sont plus élevées que celles du resvératrol. La répartition de l'ion  $m/z$  254 est remarquable, il est localisé préférentiellement sur les nervures. Le comportement du resvératrol est également atypique. Après le traitement au laser excimer, le signal de l'ion  $m/z$  228 est relativement plus intense par rapport à la première expérience MSI. On peut supposer que dans ce cas, le resvératrol est moins concentré à la surface de la feuille mais davantage dans les tissus de la feuille. Enfin, il n'y a pas de diminution de signal sur la zone de recouvrement, commune aux deux imageries MS successives, confirmant le fait que du matériel végétal a bien été ablaté.

L'intégration de cette étape pour appréhender les stilbènes en profondeur lors de l'analyse MSI apporterait une dimension supplémentaire à la localisation des stilbènes. Ceci impliquerait de contrôler précisément l'épaisseur de la couche ablatée en fonction du nombre de tirs et de l'énergie laser. Ceci n'est pas aisé à déterminer puisque la surface d'une feuille n'est pas homogène. Les nervures et le limbe ne possèdent pas la même fermeté et ne seront en conséquence pas ablatés de la même manière. Mais la piste est ouverte.

## 9. Conclusion

Dans la continuité des travaux de thèse de G. Hamm, le développement de l'imagerie LDI sur feuille de vigne s'est poursuivi. Les molécules ciblées avec cette technique, notamment en mode positif, sont les stilbènes, les composés antifongiques synthétisés lorsque la feuille est soumise à des stress biotiques (*Plasmopara viticola*) ou abiotique (irradiations UV-C). Dans les conditions de désorption/ionisation laser, seuls les suivis du ptérostilbène et du resvératrol sont possibles, les autres stilbènes n'étant pas ionisés. En revanche, il a été montré que le signal du resvératrol pouvait également provenir de la fragmentation *in-source* des picéides. Dans le but de fiabiliser ces analyses, la répétabilité du signal a été évaluée. Pour permettre la quantification du resvératrol, du ptérostilbène et des picéides, le développement d'une méthode LC-ITMS a été entrepris. La méthode des ajouts dosés a permis d'observer une correspondance marquée entre les teneurs calculées en stilbènes et les signaux relevés en imagerie de ces mêmes composés.

Par la suite, l'analyse LDI-TOF en mode de détection négatif a été envisagée pour l'imagerie par spectrométrie de masse. Les mêmes protocoles de préparation des échantillons ont été conservés. Via le mode négatif, une nouvelle famille de molécules a pu être suivie en imagerie : les flavonoïdes, plus précisément la quercétine et la myricétine. En LDI, ces composés sont détectés uniquement sous forme d'aglycone alors qu'ils sont présents au sein des feuilles de vigne

uniquement sous forme glycosylée. Ceci est dû à un phénomène de fragmentation *in-source* qui brise la liaison éther entre le flavonoïde et son sucre. Enfin, l'analyse de feuilles de plein champ a montré des intensités bien plus importantes par rapport à des feuilles de serre témoignant du fait que les rayons UV induisent la synthèse de flavonoïdes. De plus, ces composés étaient répartis de façon très localisés et intense.

La suite logique du développement de l'imagerie est la prise en considération du MALDI. Plusieurs publications dans la littérature font état d'études MALDI-MSI appliquées aux végétaux mais non sur feuilles de vigne. Ceci nécessite un développement important puisqu'un nombre non négligeable de paramètres entrent en jeu. Le choix de la matrice en lui-même est crucial puisqu'il conditionne le type de molécule qui sera détecté. Ce développement instrumental a été mené sur le dernier spectromètre à temps de vol acquis par le laboratoire, l'Ultraflex III développé par Bruker. Pour débiter ces travaux, l'analyse de composés standards présents au sein de feuilles de vigne a été mise en œuvre en MALDI-TOFMS. Plusieurs matrices ont été testées. Puis, les mêmes tests ont été conduits sur des extraits de feuilles déjà analysés en ESI-FTICRMS. Ceci a permis de déterminer les matrices les plus adaptées pour les petits métabolites : l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque pour le mode positif et la 9-aminoacridine pour le mode négatif. Ce développement a ensuite connu des difficultés instrumentales puisque le laser Nd-YAG 355 nm qui équipe ce spectromètre de masse n'a donné aucun signal en LDI sur les feuilles. Même en conditions MALDI, seules les espèces relatives aux matrices étaient détectées, aucune interaction entre les matrices et la feuille ne s'est produite. Plusieurs tests ont été conduits afin d'y remédier, sans succès. Le développement de l'imagerie MALDI s'est donc poursuivi sur le Reflex IV équipé de son laser azote à 337 nm. Si le mode négatif n'a pas conduit à des résultats, le mode positif avec la DHB a permis la détection des viniférines, des stilbènes jusqu'à présent inaccessible en MSI. La méthode de dépôt peut cependant être améliorée pour conduire à une répartition plus homogène de la matrice.

Enfin, pour tenter d'étudier les feuilles de vigne à différentes profondeurs, l'utilisation d'un laser excimer a été envisagée. Elle a conduit à des résultats intéressants en LDI-TOFMS 266 nm. Bien que l'épaisseur de la couche ablatée par le laser ne soit pas encore maîtrisée, le traitement au laser excimer a permis la détection plus en profondeur des stilbènes. La microdissection pourrait également être envisagée mais elle rendrait le protocole d'échantillonnage plus lourd et le risque de délocalisation de métabolites plus grand.

Le dernier chapitre de ce manuscrit décrira une application de l'imagerie LDI-TOFMS en mode positif. Il présentera une association de trois techniques pour l'observation des stilbènes.

## 10. Littérature

1. Schwamborn, K. & Caprioli, R. M. Molecular imaging by mass spectrometry — looking beyond classical histology. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 639–646 (2010).
2. Caprioli, R. M., Farmer, T. B. & Gile, J. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **69**, 4751–4760 (1997).
3. Garrett, T. J. *et al.* Imaging of small molecules in tissue sections with a new intermediate-pressure MALDI linear ion trap mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* **260**, 166–176 (2007).
4. Strupat, K. *et al.* MALDI Produced Ions Inspected with a Linear Ion Trap-Orbitrap Hybrid Mass Analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1451–1463 (2009).
5. Manicke, N. E., Dill, A. L., Ifa, D. R. & Cooks, R. G. High resolution tissue imaging on an orbitrap mass spectrometer by desorption electro-spray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *J. Mass Spectrom.* **45**, 223–226 (2010).
6. Verhaert, P. D. E. M., Pinkse, M. W. H., Strupat, K. & Conaway, M. C. P. in *Mass Spectrom. Imaging* (eds. Rubakhin, S. S. & Sweedler, J. V.) 433–449 (Humana Press, 2010).
7. Cornett, D. S., Frappier, S. L. & Caprioli, R. M. MALDI-FTICR Imaging Mass Spectrometry of Drugs and Metabolites in Tissue. *Anal. Chem.* **80**, 5648–5653 (2008).
8. Taban, I. M. *et al.* Imaging of Peptides in the Rat Brain Using MALDI-FTICR Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 145–151 (2007).
9. Miki, A. *et al.* MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair. *J. Mass Spectrom.* **46**, 411–416 (2011).
10. Bunch, J., Clench, M. R. & Richards, D. S. Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 3051–3060 (2004).
11. Carado, A. *et al.* Biological tissue imaging with a hybrid cluster SIMS quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 1572–1575 (2008).
12. Chaurand, P., Stoeckli, M. & Caprioli, R. M. Direct Profiling of Proteins in Biological Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **71**, 5263–5270 (1999).
13. Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E. & Caprioli, R. M. Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* **7**, 493–496 (2001).
14. Manicke, N. E. *et al.* Imaging of Lipids in Atheroma by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 8702–8707 (2009).
15. Müller, T., Oradu, S., Ifa, D. R., Cooks, R. G. & Kräutler, B. Direct Plant Tissue Analysis and Imprint Imaging by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 5754–5761 (2011).
16. Colliver, T. L. *et al.* Atomic and Molecular Imaging at the Single-Cell Level with TOF-SIMS. *Anal. Chem.* **69**, 2225–2231 (1997).
17. Vickerman, J. C. Molecular imaging and depth profiling by mass spectrometry-SIMS, MALDI or DESI? *Analyst* **136**, 2199–2217 (2011).
18. Boggio, K. J. *et al.* Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact. *Expert Rev. Proteomics* **8**, 591–604 (2011).
19. Römpf, A. & Spengler, B. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem. Cell Biol.* **139**, 759–783 (2013).
20. Ostrowski, S. G., Van Bell, C. T., Winograd, N. & Ewing, A. G. Mass Spectrometric Imaging of Highly Curved Membranes During Tetrahymena Mating. *Science* **305**, 71–73 (2004).
21. Piehowski, P. D. *et al.* MS/MS Methodology To Improve Subcellular Mapping of Cholesterol Using TOF-SIMS. *Anal. Chem.* **80**, 8662–8667 (2008).

22. Dubey, M., Brison, J., Grainger, D. W. & Castner, D. G. Comparison of Bi(1), Bi(3) and C(60) primary ion sources for ToF-SIMS imaging of patterned protein samples. *Surf. Interface Anal. SIA* **43**, 261–264 (2011).
23. Bich, C. *et al.* Compatibility between TOF-SIMS lipid imaging and histological staining on a rat brain section. *Surf. Interface Anal.* **45**, 260–263 (2013).
24. Laskin, J., Heath, B. S., Roach, P. J., Cazares, L. & Semmes, O. J. Tissue imaging using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 141–148 (2012).
25. Nemes, P. & Vertes, A. Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure, in Vivo, and Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 8098–8106 (2007).
26. Nemes, P., Barton, A. A., Li, Y. & Vertes, A. Ambient Molecular Imaging and Depth Profiling of Live Tissue by Infrared Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 4575–4582 (2008).
27. Nemes, P., Barton, A. A. & Vertes, A. Three-Dimensional Imaging of Metabolites in Tissues under Ambient Conditions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 6668–6675 (2009).
28. Schuerenberg, M., Luebbert, C., Deininger, S.-O., Ketterlinus, R. & Suckau, D. MALDI tissue imaging: mass spectrometric localization of biomarkers in tissue slices. *Nat. Methods* **4**, (2007).
29. Wong, S. C. C. *et al.* Advanced proteomic technologies for cancer biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics* **6**, 123–134 (2009).
30. Sugiura, Y. & Setou, M. Imaging Mass Spectrometry for Visualization of Drug and Endogenous Metabolite Distribution: Toward In Situ Pharmacometabolomes. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **5**, 31–43 (2010).
31. Solon, E. G., Schweitzer, A., Stoeckli, M. & Prideaux, B. Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS Imaging in Pharmaceutical Discovery and Development. *AAPS J.* **12**, 11–26 (2010).
32. Tanaka, H. *et al.* Imaging Mass Spectrometry Reveals Unique Lipid Distribution in Primary Varicose Veins. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **40**, 657–663 (2010).
33. Brunelle, A. & Laprévotte, O. Lipid imaging with cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 31–35 (2009).
34. Amaya, K. R., Monroe, E. B., Sweedler, J. V. & Clayton, D. F. Lipid imaging in the zebra finch brain with secondary ion mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **260**, 121–127 (2007).
35. Chaurand, P., Schwartz, S. A. & Caprioli, R. M. Assessing Protein Patterns in Disease Using Imaging Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **3**, 245–252 (2004).
36. Van Remoortere, A. *et al.* MALDI Imaging and Profiling MS of Higher Mass Proteins from Tissue. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1922–1929 (2010).
37. McDonnell, L. A. *et al.* Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J. Proteomics* **73**, 1921–1944 (2010).
38. Khatib-Shahidi, S., Andersson, M., Herman, J. L., Gillespie, T. A. & Caprioli, R. M. Direct Molecular Analysis of Whole-Body Animal Tissue Sections by Imaging MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 6448–6456 (2006).
39. Stoeckli, M., Staab, D. & Schweitzer, A. Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. *Int. J. Mass Spectrom.* **260**, 195–202 (2007).
40. Watrous, J., Hendricks, N., Meehan, M. & Dorrestein, P. C. Capturing Bacterial Metabolic Exchange Using Thin Film Desorption Electrospray Ionization-Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 1598–1600 (2010).
41. Liu, W.-T. *et al.* Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16286–16290 (2010).
42. Rutten, F. J. M., Briggs, D., Henderson, J. & Roe, M. J. The application of Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) to the characterization of opaque ancient glasses. *Archaeometry* **51**, 966–986 (2009).

43. Lehmann, K., Berger, A., Götte, T., Ramseyer, K. & Wiedenbeck, M. Growth related zonations in authigenic and hydrothermal quartz characterized by SIMS-, EPMA-, SEM-CL- and SEM-CC-imaging. *Mineral. Mag.* **73**, 633–643 (2009).
44. Zoriy, M. V., Mayer, D. & Becker, J. S. Metal Imaging on Surface of Micro- and Nanoelectronic Devices by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Possibility to Measure at Nanometer Range. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 883–890 (2009).
45. Bailey, M. J. *et al.* Depth profiling of fingerprint and ink signals by SIMS and MeV SIMS. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **268**, 1929–1932 (2010).
46. Tang, H.-W., Lu, W., Che, C.-M. & Ng, K.-M. Gold Nanoparticles and Imaging Mass Spectrometry: Double Imaging of Latent Fingerprints. *Anal. Chem.* **82**, 1589–1593 (2010).
47. Kaspar, S., Peukert, M., Svatos, A., Matros, A. & Mock, H.-P. MALDI-imaging mass spectrometry – An emerging technique in plant biology. *Proteomics* **11**, 1840–1850 (2011).
48. Mullen, A. K., Clench, M. R., Crosland, S. & Sharples, K. R. Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2507–2516 (2005).
49. Burrell, M., Earnshaw, C. & Clench, M. Imaging Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. *J. Exp. Bot.* **58**, 757–763 (2007).
50. Shroff, R., Vergara, F., Muck, A., Svatoš, A. & Gershenzon, J. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6196–6201 (2008).
51. Goto-Inoue, N., Setou, M. & Zaima, N. Visualization of spatial distribution of gamma-aminobutyric acid in eggplant (*Solanum melongena*) by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* **26**, 821–825 (2010).
52. Jun, J. H. *et al.* High-Spatial and High-Mass Resolution Imaging of Surface Metabolites of *Arabidopsis thaliana* by Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry Using Colloidal Silver. *Anal. Chem.* **82**, 3255–3265 (2010).
53. Zaima, N., Goto-Inoue, N., Hayasaka, T. & Setou, M. Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **24**, 2723–2729 (2010).
54. Hamm G, C. V. Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 335–342 (2010).
55. Sarsby, J., Towers, M. W., Stain, C., Cramer, R. & Koroleva, O. A. Mass spectrometry imaging of glucosinolates in *Arabidopsis* flowers and siliques. *Phytochemistry* **77**, 110–118 (2012).
56. Thunig, J., Hansen, S. H. & Janfelt, C. Analysis of Secondary Plant Metabolites by Indirect Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 3256–3259 (2011).
57. Li, B., Hansen, S. H. & Janfelt, C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **348**, 15–22 (2013).
58. Lee, Y. J., Perdian, D. C., Song, Z., Yeung, E. S. & Nikolau, B. J. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *Plant J.* **70**, 81–95 (2012).
59. Hamm, G. *et al.* Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor. *J. Proteomics* **75**, 4952–4961 (2012).
60. msimaging. [www.maldi-msi.org](http://www.maldi-msi.org). (2011).
61. Clerens, S., Ceuppens, R. & Arckens, L. CreateTarget and Analyze This!: new software assisting imaging mass spectrometry on Bruker Reflex IV and Ultraflex II instruments. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3061–3066 (2006).

62. Hamm, G. Recherche par spectrométrie de masse de métabolites intervenant dans la résistance de la vigne aux agressions biotiques et abiotiques ; Thèse de Doctorat. (2010).
63. Gerbeau, M. *Modélisation de l'énergie et de l'irradiance dans un spectromètre de masse à source d'ionisation laser*. (Université Paul-Verlaine Metz, 2005).
64. Montero, C., Orea, J. M., Muñoz, M. S., Lobo, R. F. M. & Ureña, A. G. Non-volatile analysis in fruits by laser resonant ionization spectrometry: application to resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in grapes. *Appl. Phys. B* **71**, 601–605 (2000).
65. Momotake, A., Uda, M. & Arai, T. Photochemical cyclization reaction in cis-tetramethoxystilbene. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **158**, 7–12 (2003).
66. Chong, J., Poutaraud, A. & Huguene, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **177**, 143–155 (2009).
67. Hecka, A. Caractérisation par Spectrométrie de Masse d'extraits de Millepertuis potentiellement utilisables en Photodiagnostic et Photothérapie des cancers ; Thèse de Doctorat. (2009).
68. Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M. & Terracciano, A. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2955–2964 (2007).
69. Millier, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. (Prentice Hall, 2000).
70. Hsu, F.-F. & Turk, J. Characterization of Cardiolipin as the Sodiated Ions by Positive-Ion Electrospray Ionization with Multiple Stage Quadrupole Ion-Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1146–1157 (2006).
71. Kolb, C. A. *et al.* Effects of Natural Intensities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves. *Plant Physiol.* **127**, 863–875 (2001).
72. Davis, B. D. & Brodbelt, J. S. An investigation of the homolytic saccharide cleavage of deprotonated flavonol 3-O-glycosides in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **43**, 1045–1052 (2008).
73. Gutha, L. R., Casassa, L. F., Harbertson, J. F. & Naidu, R. A. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biol.* **10**, 187 (2010).
74. Thomas, A., Charbonneau, J. L., Fournaise, E. & Chaurand, P. Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition. *Anal. Chem.* (2012).
75. Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Richter, H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**, 145–148 (2004).

**Chapitre V**    Intégration de l'imagerie par  
spectrométrie de masse dans une étude  
corrélative multi technique sur la  
synthèse des stilbènes dans les feuilles  
de vigne

---

# Index

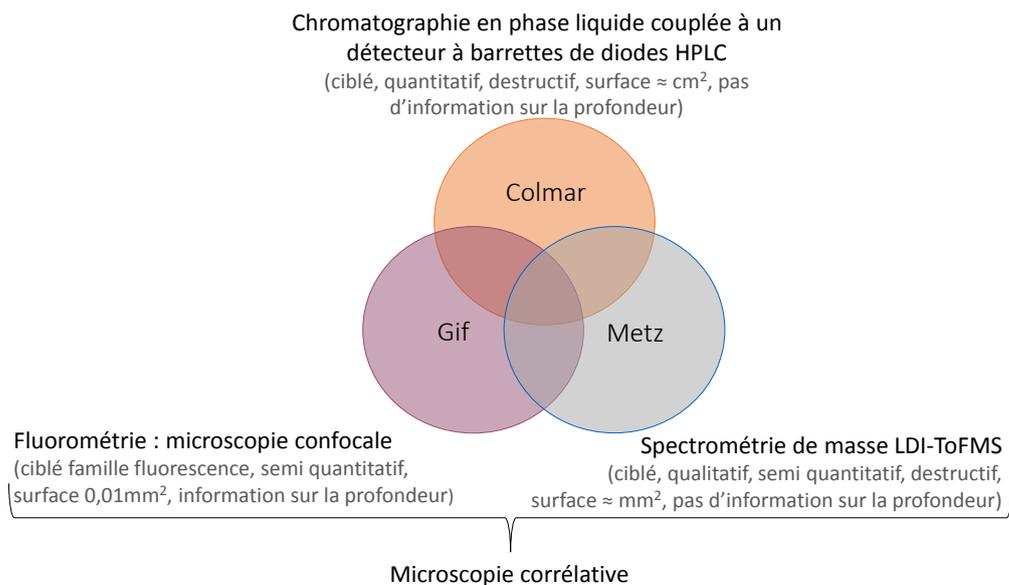
<b>1. Introduction et contexte</b>	<b>IV-171</b>
<b>2. Présentation de l'imagerie photonique</b>	<b>IV-172</b>
2.1. Microscopie de fluorescence	IV-173
2.2. Microscopie confocale	IV-173
<b>3. Développement expérimental</b>	<b>IV-175</b>
3.1. Ordre d'analyse des échantillons	IV-175
3.2. Conditionnement des échantillons : rinçage et lyophilisation	IV-175
3.2.1 Milieu pour l'analyse en microscopie optique	IV-176
3.2.2 Optimisation de la lyophilisation	IV-179
3.2.2.1 Protocole	IV-179
3.2.2.2 Synthèse	IV-181
3.3. Mesure de la profondeur des impacts laser par microscopie confocale	IV-182
<b>4. Résultats</b>	<b>IV-186</b>
4.1. Feuilles irradiées aux UV-C	IV-186
4.1.1 Objectif et protocole	IV-187
4.1.2 Superposition des données d'imagerie et dosages HPLC	IV-188
4.1.2.1 Corrélation des techniques d'imagerie	IV-188
4.1.2.2 Dosages HPLC	IV-193
4.1.2.3 Conclusion	IV-194
4.2. Feuilles inoculées par <i>Plasmopara viticola</i>	IV-195
4.2.1 Objectif et protocole	IV-195
4.2.2 Superposition des données d'imagerie et dosages HPLC	IV-196
4.2.2.1 Dosages HPLC	IV-196
4.2.2.2 Corrélation des techniques d'imagerie	IV-197
4.2.2.3 Bilan	IV-202
<b>5. Conclusion</b>	<b>IV-203</b>
<b>6. Littérature</b>	<b>IV-206</b>

## 1. Introduction et contexte

Ce chapitre présente une application particulière de l'imagerie par spectrométrie de masse par LDI-TOF en mode positif avec le laser 266 nm décrite lors du **Chapitre IV**. Le but de l'étude est d'obtenir une localisation des stilbènes plus précise qu'elle ne le serait avec une seule technique. Ainsi, cette étude combinant trois techniques complémentaires, est le fruit d'une collaboration étroite avec l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin de l'INRA Colmar (UMR 1131) et le Laboratoire Ecologie Systématique Evolution UMR 8079 (CNRS, UPS, AgroParisTech Université Paris-Sud 11).

L'association de plusieurs techniques a été effectuée afin d'obtenir des informations complémentaires sur la répartition des phytoalexines dans les feuilles de vigne. L'objectif consiste à préciser le plus finement le(s) lieu(x) de synthèse des stilbènes suite à l'infection des tissus des feuilles par le pathogène.

L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) permet d'avoir une localisation avec l'identification structurale de la synthèse des stilbènes sur la surface de la feuille des métabolites. Néanmoins la résolution spatiale reste relativement faible et l'information apportée reste plutôt cantonnée à la surface. La nature de l'interaction avec la feuille (phénomène de désorption en surface et/ou d'ablation en profondeur) n'est encore pas clairement définie. La microscopie confocale repose sur la fluorescence globale des stilbènes. Elle donne accès à la répartition en surface mais également en profondeur de ces molécules d'intérêt avec une bien meilleure résolution spatiale mais elle n'apporte pas d'information sur les molécules à l'origine de cette fluorescence (type de stilbène en présence).



**Figure V-1 : concept de l'approche corrélative multi technique présentant les atouts et limitations de chacune d'entre elle (A. Poutaraud).**

L'intérêt de la combinaison de ces techniques réside donc dans leur complémentarité. La microscopie confocale peut répondre à l'aspect analyse en trois dimensions (informations sur la localisation en profondeur des stilbènes. La spectrométrie de masse, moins résolutive, permet d'identifier les stilbènes à l'origine de la fluorescence observée. Enfin, les dosages HPLC permettent quant à eux d'estimer la quantité de chaque stilbène, mais en moyennant les résultats sur tout l'échantillon. La microscopie confocale et les dosages HPLC-UV ont été menés respectivement au Laboratoire Ecologie Systématique Evolution (ESE, Paris-Sud) et à l'INRA de Colmar (**Figure V-1**).

Après la présentation de l'imagerie photonique, le protocole de préparation et de conservation des échantillons, qui doit être adaptée pour toutes les techniques, sera détaillé. Les échantillons étudiés dans le cadre de cette approche provenaient de différents génotypes possédant les gènes de résistance Rpv1 et/ou Rpv2 ou aucun des deux. Le comportement des stilbènes sera étudié d'abord suite à leur induction par irradiations aux UV-C, puis par infection par le mildiou.

## 2. Présentation de l'imagerie photonique

Certains composés phénoliques contenus dans les feuilles de vigne présentent des capacités d'autofluorescence<sup>1</sup>. Cela dépend des conditions inhérentes à la feuille telles que le pH, la polarité ou encore le compartiment de la feuille où ils sont présents. C'est notamment le cas des stilbènes qui émettent une fluorescence bleue lorsqu'ils sont exposés à la lumière UV. Les

propriétés spectrales des stilbènes ont été décrites pour la première fois en 1968 par Hillis et Ishikura<sup>2</sup>. Le *trans*-resvératrol en solution méthanolique par exemple, présente un maximum d'excitation de fluorescence situé autour de 320 nm et un maximum d'émission de fluorescence situé à 380 nm<sup>1</sup>. Bien que de faibles variations existent en termes de rendement de fluorescence, les spectres des principaux stilbènes présent chez la vigne sont assez semblables, à l'exception du *cis*-picéide. Les spectres excitation et d'émission de ce dernier présentent un double pic à 380 nm<sup>3</sup>.

### 2.1. Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence ou épifluorescence est l'une des techniques de microscopie optique les plus employées dans la recherche biologique et biomédicale. Ceci s'explique, d'une part, par sa grande spécificité et sa relative facilité d'utilisation, et d'autre part, par sa résolution spatiale très élevée (centaine du nanomètre) qui permet d'observer les organelles. La microscopie de fluorescence (**Figure V-2**) est utilisée fréquemment dans les études intracellulaires impliquant mécanismes et dynamiques moléculaires de macromolécules et métabolites<sup>4,5</sup>.

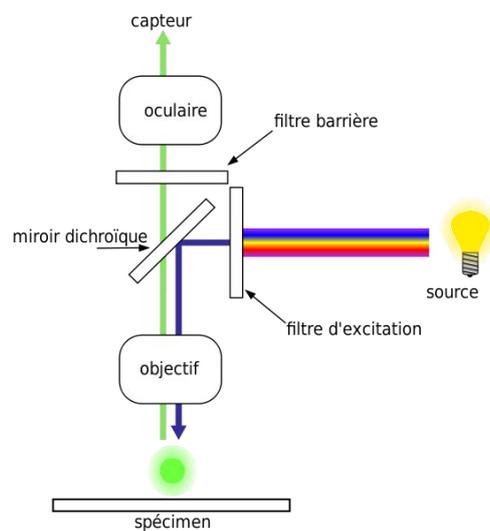


Figure V-2 : schéma du principe de la microscopie de fluorescence.

### 2.2. Microscopie confocale

Le principe de la microscopie confocale a été développé et breveté en 1957 par Martin Minsky. En microscopie confocale (CMI : « Confocal Microscopy Imaging ») le système d'excitation et de détection est réduit dans un même dispositif de taille réduite. Comme pour la microscopie de fluorescence, l'observation de signaux fluorescents repose sur quatre éléments clefs : une

source de lumière excitatrice, un fluorophore, des filtres pour séparer les photons d'émission des photons d'excitation et un détecteur qui enregistre l'émission de photon.

L'image dite confocale est obtenue par le déplacement du point de focalisation de la lumière excitatrice dans les trois dimensions de l'échantillon (**Figure V-3**). Cette technique d'imagerie représente une avancée technologique importante puisqu'elle permet d'obtenir des images de grande résolution. Ces images peuvent être qualifiées de « coupes optiques », d'une épaisseur d'environ  $0,4 \mu\text{m}$ , obtenues à différents niveaux dans l'épaisseur d'un échantillon. Basée sur l'élimination des signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal, cette technique donne ainsi accès à des informations situées à l'intérieur des cellules.

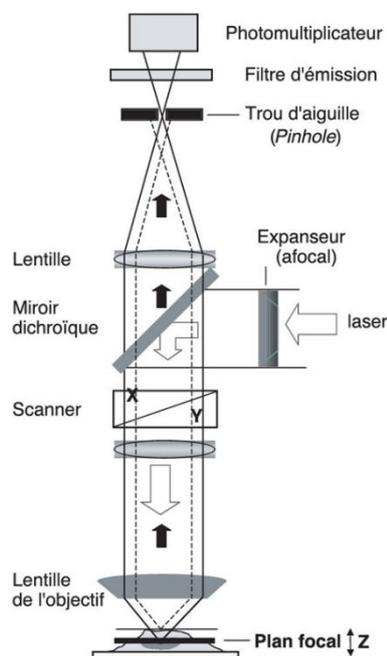


Figure V-3 : schéma d'un microscope confocal à balayage laser (d'après S. Brown).

Les résolutions latérale ( $x, y$ ) et dans la profondeur ( $z$ ) des images obtenues peuvent être très élevées ; elles dépendent directement de l'objectif utilisé. La microscopie confocale permet également d'obtenir des images hautement contrastées de bien meilleure résolution (résolution latérale allant jusqu'à  $0,2 \mu\text{m}$ ) que la microscopie de fluorescence plein champs, surtout sur les échantillons épais.

Comme l'ont montré Hutzler *et al.*, cette technique permet la visualisation *in vivo* de composés phénoliques au sein même de feuille grâce aux sections optiques permettant la reconstruction 3D<sup>6</sup>. Cela rend possible la localisation subcellulaire de ces composés, en plus de l'accès à des informations quantitatives avec l'intensité de fluorescence. Ces possibilités font de la microscopie

confocale un outil particulièrement adapté pour l'étude au niveau cellulaire des plantes<sup>7,8</sup>. Par ailleurs, plusieurs articles récents font état de l'utilisation de la microscopie confocale pour l'étude de relations plante-pathogène<sup>9,10</sup>.

### 3. Développement expérimental

Cette approche corrélative multidisciplinaire a nécessité un développement méthodologique conséquent. En effet, il a fallu coordonner les analyses entre les différents laboratoires en tenant compte des contraintes instrumentales différentes tout en veillant au conditionnement des échantillons. Les parties suivantes décrivent les différentes étapes de ce développement.

#### 3.1. Ordre d'analyse des échantillons

Faisant intervenir 3 laboratoires, ce travail a soulevé des questions de mises au point techniques mais également logistiques. Chaque échantillon issu de cultures à l'INRA de Colmar doit être en effet analysé au même stade d'évolution sur les mêmes zones par les deux techniques d'imagerie (MSI et microscopie de fluorescence) situées à Metz et Paris. Il est donc nécessaire d'établir une organisation séquentielle de l'analyse d'un échantillon vis-à-vis de ces 2 techniques et de marquage (repérage) de la zone à cartographier. Les dosages HPLC sont réalisés sur une zone de la feuille adjacente à celle cartographiée par MSI et fluorescence car une fois étudiée en MSI, l'échantillon n'est plus récupérable pour une extraction méthanolique.

Les expériences en microscopie confocale doivent être réalisées en amont car cette technique est non destructive contrairement à la MSI pour laquelle l'impact du laser à 266 nm désorbe de la matière (**Chapitre IV**).

Le dispositif de repérage a été discuté notamment pour différencier la face intérieure de l'échantillon (face abaxiale) à analyser de sa face extérieure (face adaxiale). En effet, après lyophilisation, il n'est plus aisé de distinguer les deux faces de la feuille. Ce dispositif permet, d'autre part, de repérer les zones qui doivent être cartographiées avec les deux techniques d'imagerie.

#### 3.2. Conditionnement des échantillons : rinçage et lyophilisation

La question de la conservation et du conditionnement de l'échantillon entre son étude en microscopie confocale et en imagerie MS implique quelques points à résoudre :

- La première difficulté est liée aux conditions d'analyse qui doivent être compatibles pour la CMI et la MSI. En microscopie confocale, l'uniformité du chemin optique doit être respectée par l'homogénéisation des indices de réfraction milieu/lamelle/agent mouillant. Il faudra ensuite pouvoir éliminer les traces d'agents mouillants qui pourraient perturber les mesures en MSI.
- La deuxième difficulté concerne la conservation des échantillons et leur transport. Il faut éviter une évolution possible de l'échantillon dans le temps entre l'étape de CMI et de MSI. Afin de bloquer cette possible dégradation, il a été décidé de conserver les échantillons par lyophilisation après analyses en microscopie confocal. Les extraits pour les dosages HPLC sont effectués au stade d'analyse de la CMI.

### 3.2.1 Milieu pour l'analyse en microscopie optique

Plusieurs milieux de montage ou agents mouillants sont envisagés pour la microscopie confocale :

- tween (esters de sorbitan) : non envisageable en MSI car ce mélange complexe s'ionise très facilement et peut générer de nombreux pics d'interférence ;
- l'eau pure : compatible avec la spectrométrie de masse, elle ne génère pas de pic de matrice supplémentaire et peut s'éliminer lors de la lyophilisation. En revanche, ce milieu ne permet pas d'acquérir une image optimale en microscopie confocale ;
- l'huile : compatible avec les deux techniques, cependant elle pose ensuite problème pour les rinçages à l'eau, nécessaires avant la lyophilisation ;
- le glycérol : très bon milieu pour la CMI mais peut générer des pollutions persistantes avec un encrassement au niveau des lentilles du spectromètre de masse.

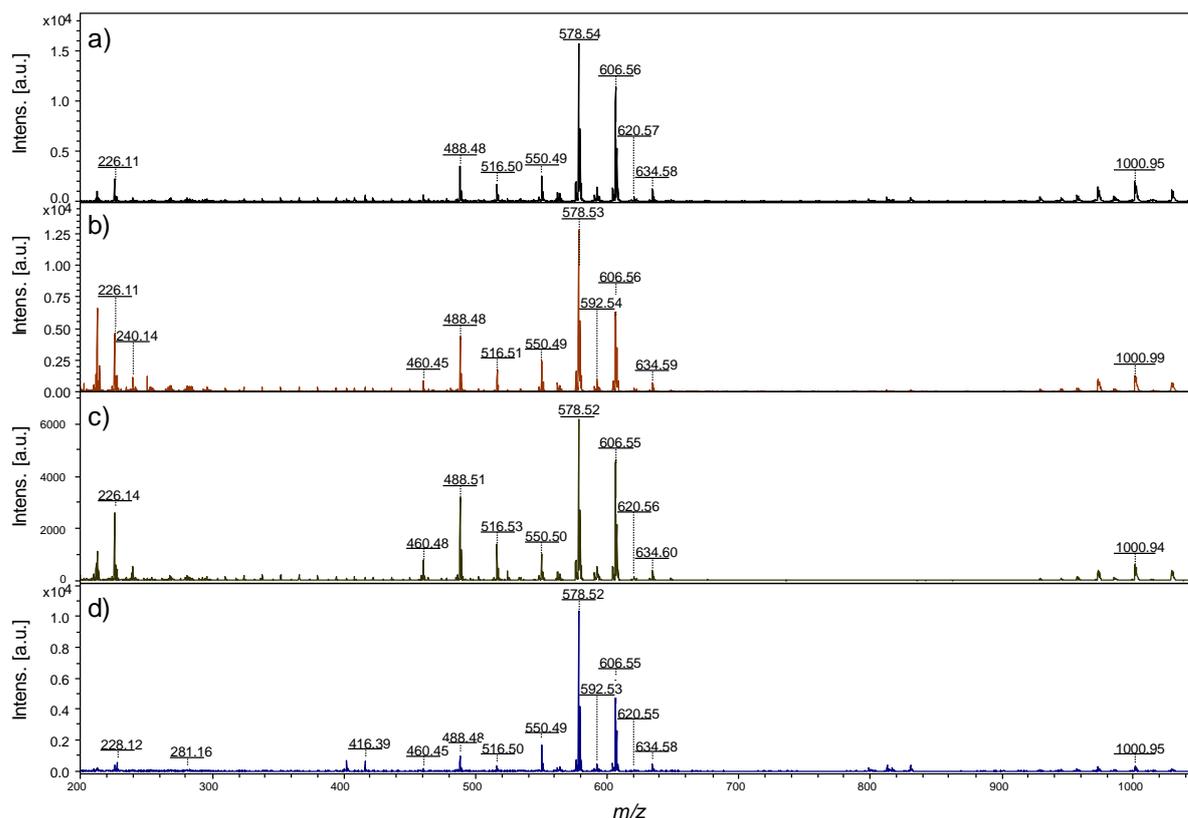
L'eau, le glycérol et l'huile, trois milieux compatibles pour la microscopie confocale ont été retenus pour une évaluation en HPLC et en LDI-TOFMS. Le but est de vérifier si l'utilisation de l'un ou l'autre milieu perturbe la détection des stilbènes sur les feuilles de vigne. Pour répondre à ce point, des échantillons ont été préparés pour les deux techniques sur des feuilles de Muscat Ottonel infectées par *P. viticola*.

Quatre modalités ont été appliquées :

- échantillon qui ne subit aucun traitement aux agents mouillant : échantillon dit « témoin » ;
- échantillon monté entre lame et lamelle avec de l'eau ultra pure ;

- échantillon monté entre lame et lamelle avec du glycérol pur ;
- échantillon monté entre lame et lamelle avec de l'huile (huile d'immersion, Merck, d'indice 1,046990100).

Dans tous les cas, après la simulation du montage lame/lamelle avec l'agent mouillant, les échantillons sont rincés à l'eau ultra pure. La **Figure V-4** présente les spectres de masse acquis avec ces échantillons lyophilisés deux jours après inoculation.



**Figure V-4 :** étude de l'influence des 4 milieux de montage pour la détection en LDI-TOFMS. Somme de 100 spectres de masse LDI-TOFMS (100 tirs laser), (a) du témoin (pas d'agent mouillant et donc pas de rinçage) ; (b) en milieu aqueux puis rincé à l'eau ; (c) en milieu huile puis rincé à l'eau ; (d) en milieu glycérol puis rincé à l'eau. L'erreur moyenne après calibration sur ces 4 spectres est d'environ 35 ppm.

Les ions  $m/z$  578, 606 et 1001 associés aux couches protectrices des feuilles (cires)<sup>11</sup> apparaissent pour les 4 milieux de montage. Ces composés préférentiellement présents en surface ne semblent pas être altérés par les agents mouillant et les rinçages. Le resvératrol ( $m/z$  228) est détecté sur tous les spectres de masse comme en témoigne la **Figure V-5**.

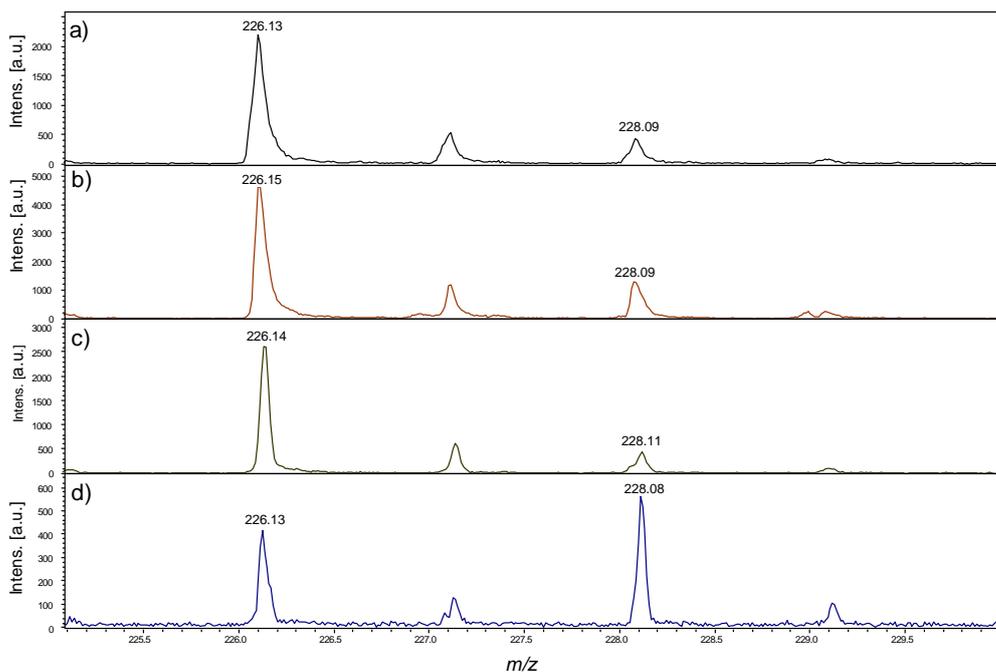


Figure V-5 : étude de l'influence des 4 milieux de montages pour la détection en LDI-TOFMS. Détail de 225 à 230 Da des 4 spectres de masse LDI-TOFMS (a), (b), (c) et (d) de la Figure V-4.

La présence de l'ion  $m/z$  226, apparenté à un fragment de cire, se remarque dans les 4 cas. Cette expérience prouve que ces milieux ne perturbent pas de façon évidente la détection du resvératrol.

Les dosages HPLC-UV (Figure V-6) confirment la présence de différents stilbènes au sein de ces échantillons de Muscat Ottonel.

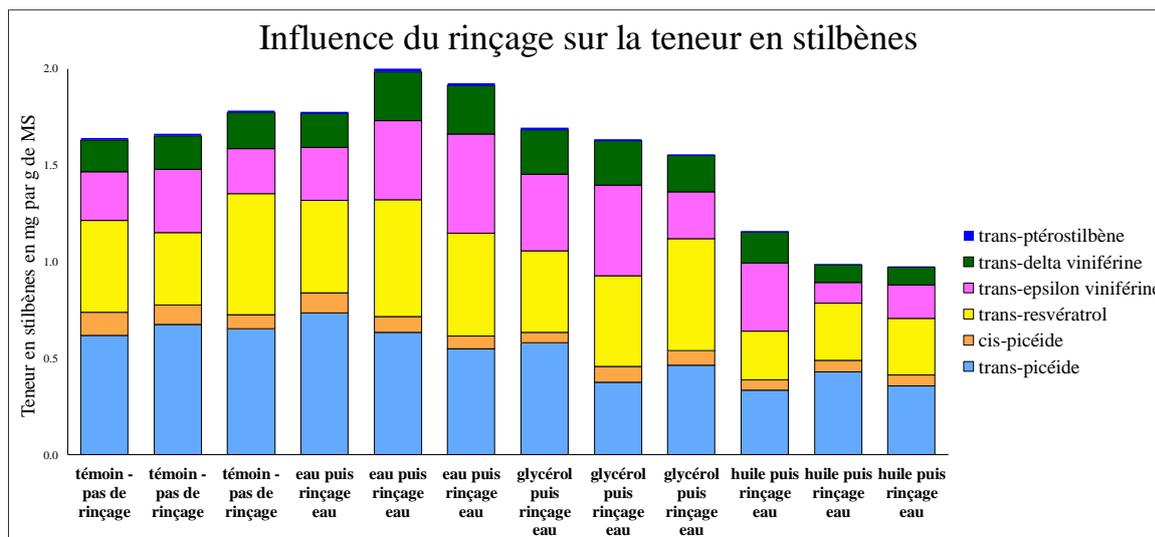


Figure V-6 : dosages HPLC-DAD pour l'étude de l'influence du rinçage sur la teneur en stilbènes, 3 répétitions sont réalisées pour chaque modalité (INRA de Colmar, A. Poutraud).

Le trans-ptérostilbène, le *trans*-resvératrol, la *trans*-delta viniférine, la *trans*-epsilon viniférine, le *cis*- et *trans*-picéide sont les principaux stilbènes dosés. D'après la **Figure V-6**, c'est uniquement dans le cas du montage avec huile qu'une nette diminution des teneurs en stilbène est enregistrée. Les quantifications associées au traitement avec le glycérol sont proches de celles de la feuille témoin. Enfin, les quantités de ptérostilbène sont très faibles, ceci conforte l'absence de détection de ce composé en spectrométrie de masse sur ces échantillons.

Le glycérol a donc été sélectionné comme agent mouillant en remplacement de l'huile puisqu'il est compatible avec les trois types d'analyses, pose moins de difficulté pour le rinçage, et enfin, n'altère pas le signal associé aux stilbènes.

### 3.2.2 Optimisation de la lyophilisation

Comme précisé plus tôt dans ce chapitre, il est indispensable de bloquer après les analyses en CMI les réactions de biosynthèses de la feuille afin que les deux techniques d'imagerie « photographient » l'échantillon à un même instant. Or ce n'est physiquement pas possible dès lors que ces deux techniques sont accessibles dans des laboratoires géographiquement éloignés. Avec une telle contrainte, la lyophilisation apparaît comme indispensable. Ce procédé, également appelé cryodessiccation, élimine l'eau présente au sein des échantillons et bloque ainsi la suite des réactions de l'échantillon. Ceci présente l'avantage, en outre, de faciliter les transports des échantillons puisque ces derniers sont conditionnés entre lames et lamelles.

Cependant, les premières lyophilisations ont posé des difficultés : de nombreux échantillons se sont craquelés pendant ce processus, rendant leur analyse en TOFMS impossible.

#### 3.2.2.1 Protocole

Pour cette expérience, les paramètres suivant ont été pris en considération :

- 3 géotypes sélectionnés, cultivés en serre : Muscat Ottonel (sensible), Rpv1 22.8.78 (moyennement résistant) et Rpv2 7001H (résistant) ; et deux modalités : inoculés et témoin ;
- l'intérieur du montage (**Figure V-7**), trois supports ont été testés :
  - lame recouverte de scotch ;
  - création d'une chambre pour l'échantillon à l'aide d'une surépaisseur de scotch ;
  - utilisation d'un filtre à la place du scotch (filtre millipore AP40 glassfiber prefilters).

La surface en contact avec l'échantillon est importante puisque dans le cas des lames en contact direct, l'échantillon se craquèle. Il faut trouver une surface plus souple mais qui ne fait pas adhérer l'échantillon auquel cas ce dernier serait difficile à extraire du montage.

- le type de fermeture des lames :
  - scotch ;
  - une pince ;
  - deux pinces.

Ce paramètre est également capital, la tension appliquée sur les deux lames doit être suffisante pour que les échantillons soient le plus plats possible sans toutefois qu'ils adhèrent au support.

- passage dans l'azote liquide ou sur un pack de glace avant la lyophilisation. Cette étape permet d'effectuer une transition pour les échantillons qui sont préparés à température ambiante du laboratoire (environ 20 °C) avant de les placer dans le lyophilisateur. En effet, les échantillons contiennent de l'eau et une chute brutale de la température pourrait les endommager (craquèlements). La glace refroidit donc progressivement les échantillons.

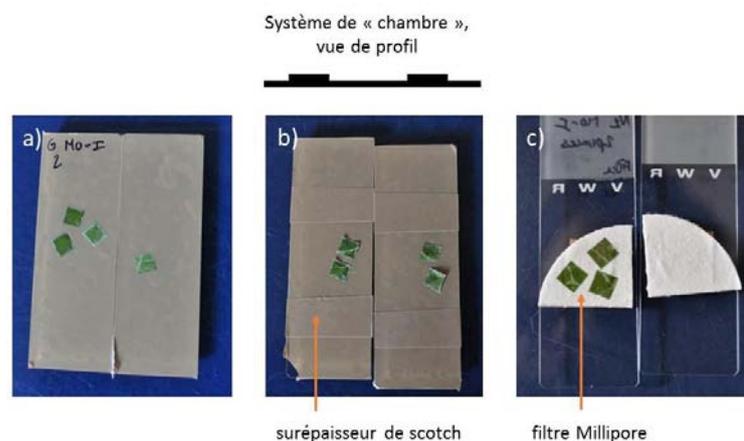
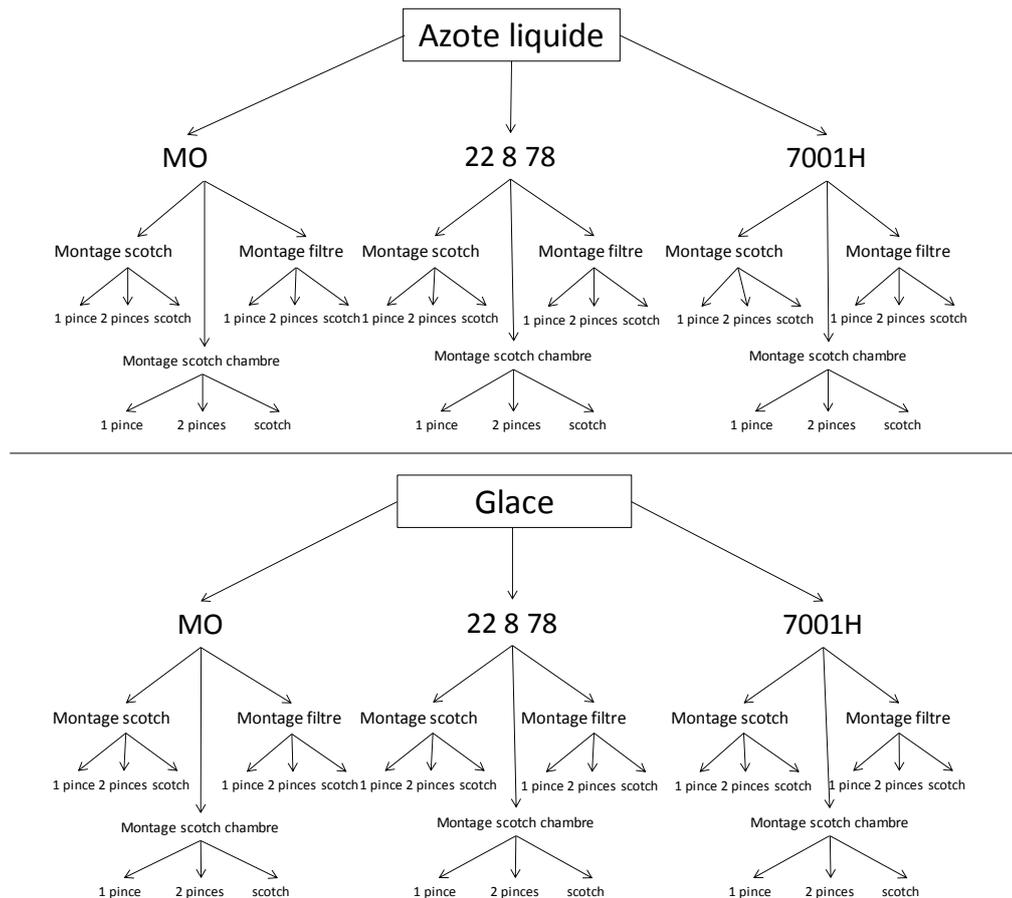


Figure V-7 : clichés des trois types de montage testés : (a) lames recouvertes de scotch, (b) système de chambre créée par une surépaisseur de scotch, (c) quart de filtres Millipore scotché aux lames.

Pour se placer dans les conditions du futur protocole de corrélation des 3 techniques, les feuilles sont plongées au préalable dans du glycérol pendant 4h (temps nécessaire pour une analyse en CMI) puis rincées à l'eau. La **Figure V-8** décrit le plan global de l'expérience.



**Figure V-8 : plan de l'expérience réalisée pour évaluer les différentes configurations de montage, « MO » signifie Muscat Ottonel.**

Les échantillons prélevés correspondent à la surface d'un carré de 6 mm x 6 mm. Quatre carrés de feuilles sont placés dans chaque lame, sauf pour les filtres pour lesquels il y en aura 3 seulement. En tout cela fait 54 individus dans ce plan, soit 188 échantillons à prélever et 108 lames. Enfin, une fois dans leur montage, les échantillons sont placés 48h dans le lyophilisateur.

### 3.2.2.2 Synthèse

Trois critères sont retenus pour l'évaluation de l'état des échantillons après la lyophilisation. Sont pris en compte l'état général de l'échantillon (présence ou non de craquelures), la planéité de l'échantillon (est-il parfaitement plat ou ondulé ?) et enfin la facilité d'extraction de l'échantillon hors du montage. Ces trois critères sont notés de 0 à 2 (0 pour mauvais ; 1 pour correct ; 2 pour excellent). Les détails relatifs à ces notations sont précisés en **Annexe III**. La somme de ces trois notes permet de donner une note globale à chaque modalité. La présence de plusieurs échantillons au sein d'un même montage permet d'avoir des répétitions et donc une note moyenne pour chaque dispositif de montage.

Observations à l'évaluation de toutes les lames :

- ✓ Le refroidissement des lames sur les blocs de glace avant la lyophilisation est moins brutale que la trempe directe des échantillons dans l'azote liquide. Aucune craquelure n'a été constatée avec la glace ;
- ✓ Les filtres Millipore donnent d'excellents résultats pour les trois critères suivis ;
- ✓ Le système de chambre (surépaisseur de scotch), donne également de bons résultats, l'échantillon est facilement extractible et en très bon état. Cependant, l'échantillon peut se déformer dans quelques rares cas ;
- ✓ La fermeture la plus efficace est assurée avec le scotch. Mais associé avec le système de chambre, l'échantillon gondole quelques fois. Le système à une pince constitue également un bon compromis entre planéité et fermeté, la tension appliquée sur les lames étant inférieure à celle avec deux pinces.

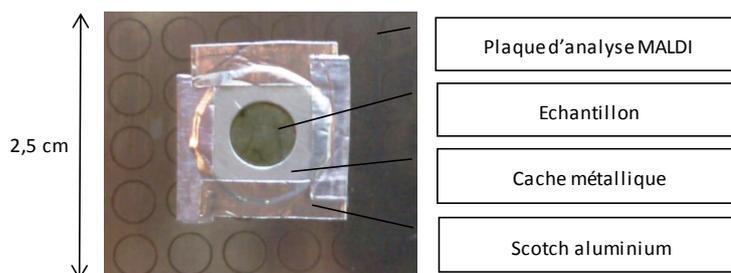
Le montage qui a donné les meilleurs résultats est celui constitué avec les filtres, un système de fermeture constitué de scotch ou d'une seule pince, les deux possibilités donnant les mêmes résultats.

### 3.3. Mesure de la profondeur des impacts laser par microscopie confocale

Contrairement à la microscopie confocale, l'imagerie par spectrométrie de masse n'apporte pas d'information sur la localisation en profondeur des stilbènes. Néanmoins, les impacts laser sont susceptibles d'ablater plus ou moins de matière lors de l'analyse en fonction de la nature de la surface de l'échantillon et de l'énergie du laser. La microscopie confocale également permet de mesurer le diamètre et la profondeur des impacts. Ces mesures permettront de connaître la profondeur à laquelle le laser interagit en MSI pour l'observation de la synthèse des stilbène. En d'autres termes, nous pourrions savoir si les stilbènes détectés proviennent plutôt de la surface de la feuille ou aussi de cellules de couches inférieures.

Pour cette expérience, les échantillons seront analysés dans l'ordre inverse de l'étude. Dans un premier temps, l'échantillon sera soumis à la MSI puis, dans un deuxième temps, la taille et la profondeur des impacts seront estimées en CMI. Dans ce cas de figure, la difficulté est de récupérer l'échantillon pour cette deuxième analyse. Habituellement, l'échantillon lyophilisé est fixé par un ruban adhésif en aluminium. En outre, les feuilles lyophilisées sont sèches et donc très cassantes. Afin de pouvoir récupérer les échantillons sans dommage, il a été nécessaire de revoir son protocole de fixation au support MALDI. Quelques essais se sont révélés infructueux comme

une redécoupe au scalpel, le repli du scotch aluminium, la fabrication de cadres en carton, etc. Une astuce de fixation a été finalement trouvée. L'échantillon est maintenu par un cache métallique (partie supérieure d'une capsule de sertissage en aluminium de Vial), lui-même scotché sur la plaque avec le même ruban adhésif. Il est à noter que ce système est conducteur ce qui devrait permettre de conserver une homogénéité des potentiels électriques à proximité de l'échantillon. La **Figure V-9** illustre ce système de fixation.



**Figure V-9** : système de fixation des échantillons sur la plaque d'analyse MALDI permettant leur extraction après analyse.

Les mesures intégreront également une comparaison des impacts laser entre une feuille fraîche (la plupart du temps, en dehors de cette étude, les analyses sont faites sur feuille fraîche) et une feuille lyophilisée. Les feuilles fraîches directement analysées dans le spectromètre de masse ne sont pas proprement dites lyophilisées même si sous l'effet d'un vide poussé, l'échantillon se déshydrate. Ce processus est différent de celui d'une lyophilisation classique.

Pour ces mesures d'impacts, trois échantillons ont été préparés et analysés en LDI-TOFMS :

- un échantillon frais donc déshydraté *in source*, cartographié sur une zone de 2 x 2 mm avec un pas de 50  $\mu\text{m}$ , **échantillon A** ;
- un échantillon lyophilisé cartographié sur une zone de 2 x 2 mm avec un pas de 50  $\mu\text{m}$ , **échantillon B** ;
- un échantillon lyophilisé avec des lignes d'impacts laser incrémentées de 5 tirs à chaque fois, séparées de deux lignes « vides » sans impacts, **échantillon C, (Figure V-10)**.

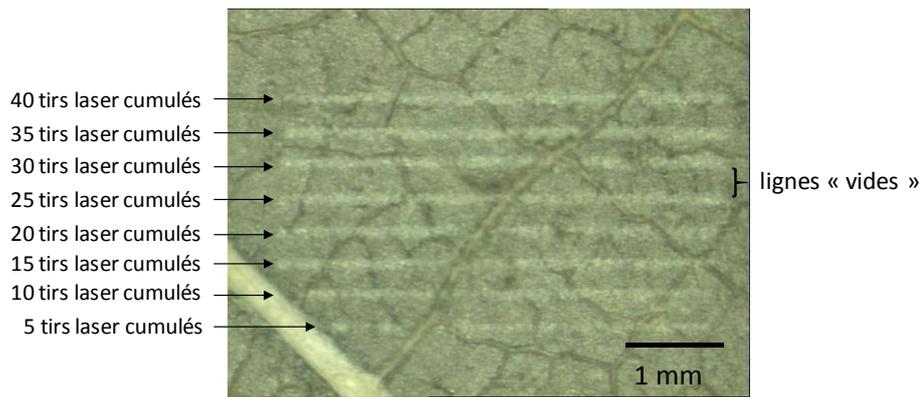


Figure V-10 : cliché optique pris à la binoculaire du protocole mise en œuvre pour l'évaluation de la profondeur des tirs laser sur feuilles de vigne pour l'échantillon C.

La microscopie de fluorescence (FM, « fluorescence microscopy ») permet de s'apercevoir que les impacts laser intensifient la fluorescence verte sous excitation bleue. Plus les lignes ont subi d'impacts laser, plus elles fluorescent comme l'illustre la **Figure V-11**.

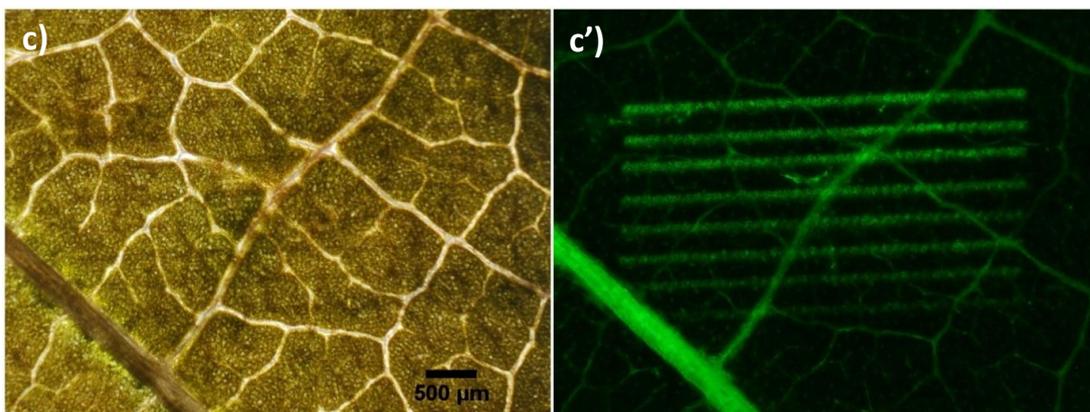


Figure V-11 : images en microscopie de fluorescence de l'échantillon lyophilisé C, (c) en transmission et (c') en fluorescence sous excitation bleue, (Laboratoire Ecologie Systématique Evolution, S. Bellow).

En réalisant cette mesure à l'aide d'un laser 488 nm, la microscopie confocale permet de différencier les régions qui ont subi des tirs laser des autres (**Figure V-12**). La fluorescence verte des parois des cellules de l'épiderme induite par les impacts laser est très clairement visible (**Figure V-13**).

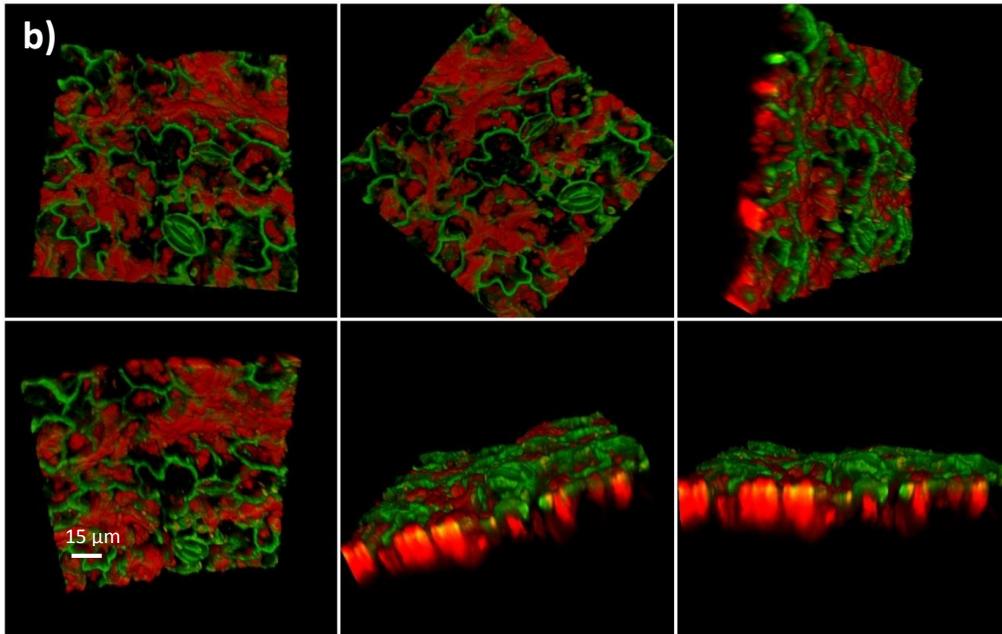


Figure V-12 : images 3D sous différents angles de microscopie confocale de la région cartographiée en MSI de l'échantillon B, obtenues à l'aide d'un laser 488 nm. Ces images 3D sont des superpositions du canal vert (501 – 597 nm) associé à la fluorescence des cellules de l'épiderme, et du canal rouge (629 – 683 nm) relatif à la fluorescence des chlorophylles. La région imagée représente  $133.6 \times 133.6 \times 38 \mu\text{m}^3$  (LESE, S. Bellow).

Cependant, le diamètre des impacts ne sont observables ni en microscopie classique ni en microscopie confocale. On ne note aucun impact en creux sur aucun des échantillons, qu'ils soient « frais déshydratés » dans la source ou lyophilisés (Figure V-11 et -12). Les impacts laser n'entament pas l'échantillon mais ils semblent augmenter l'intensité de la fluorescence verte (Figure V-11).

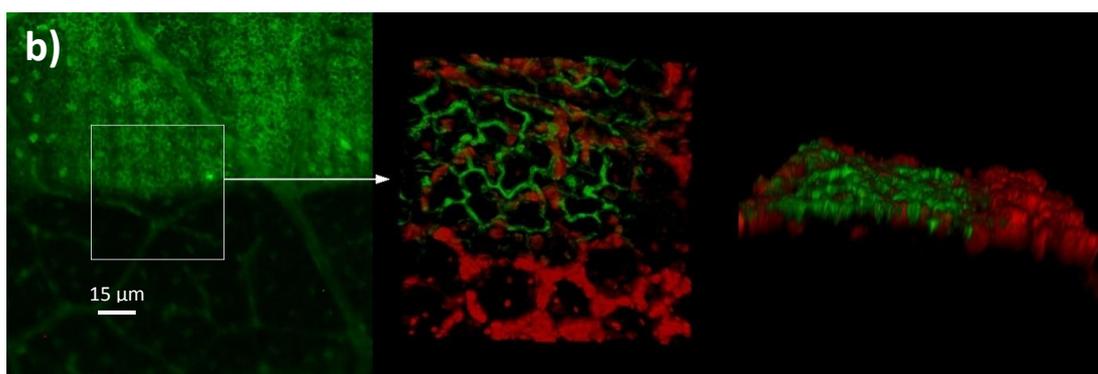


Figure V-13 : images en microscopie de fluorescence (gauche) et de microscopie confocale (centre et droite) acquises dans les mêmes conditions que celles présentées Figure V-11 et -12, respectivement. La région imagée en microscopie confocale représente  $133.6 \times 133.6 \times 31 \mu\text{m}^3$  (LESE, S. Bellow).

Ces différentes images permettent de conclure sur la nature de l'interaction du laser avec la feuille. Les conditions opératoires utilisées montrent que les images effectuées en MSI sont

produites en condition de désorption laser sans jamais atteindre le régime d'ablation. Ce sont donc uniquement les stilbènes d'extrême surface (de quelques micromètres au maximum) qui sont visualisés et qui donnent lieu à la détection des ions  $m/z$  228 et 254.

## 4. Résultats

Cette première partie détaille les expériences réalisées sur des échantillons irradiés aux UV-C. Elle a pour objectif d'évaluer la faisabilité de cette approche multi technique avec des échantillons qui synthétisent en concentration importante les stilbènes. L'étape finale consiste en l'analyse d'échantillons inoculés par *Plasmopara viticola*, dans le but d'obtenir une localisation précise des stilbènes synthétisés dans le cadre de la relation hôte-pathogène.

### 4.1. Feuilles irradiées aux UV-C

Comme nous l'avons déjà développé dans le **Chapitre IV**, les irradiations aux UV-C sollicitent la production de stilbènes chez *Vitis*. Les irradiations sont réalisées via une lampe à UV-C (tube UV-C, Osram, 30 W,  $90 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) à 254 nm, à une distance de 13 cm des feuilles, disposées sur leur face supérieure de façon à ce que la face abaxiale soit orientée en vis-à-vis avec la lampe. Les temps d'exposition dépendent de l'expérience. L'irradiation est effectuée sur les faces abaxiales des feuilles. En effet, Langedake et Pryce ont démontré que l'irradiation de cette face de la feuille conduisait à la biosynthèse de stilbènes<sup>12</sup>.

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'une irradiation UV-C donnait des résultats différents quant à la détection des stilbènes<sup>11</sup>. Après une inoculation, la présence des ions associés au resvératrol et au ptérostilbène est très localisée. Suite à une irradiation UV-C, la présence de ces stilbènes est intense mais aussi plus diffuse. Pour cette raison, le calage des expériences d'imageries MSI et CMI a débuté par l'étude d'échantillons irradiés aux UV-C afin d'avoir plus d'homogénéité en terme de biosynthèse des stilbènes et aucun problème de sensibilité de détection.

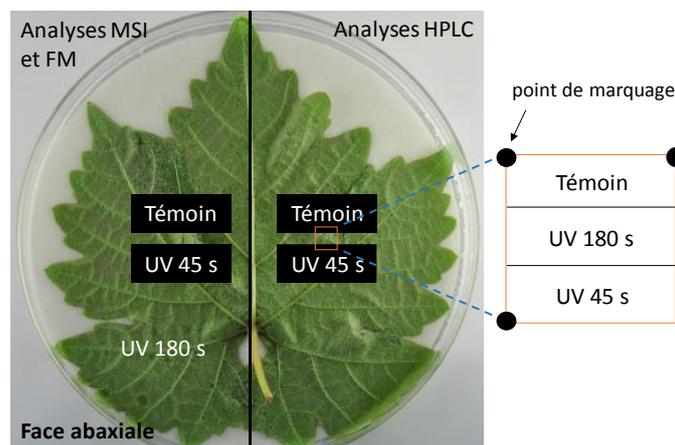
Les conditions expérimentales de la MSI appliquées ne permettent la détection des stilbènes qu'à la surface de la feuille. De ce fait, les échantillons n'ont pas été analysés en microscopie confocale mais uniquement en microscopie de fluorescence (FM). Ceci présente l'avantage de couvrir une zone plus importante et surtout cela ne nécessite pas de traitements informatiques lourds, occasionnant parfois des pertes de données lors du traitement informatique en CMI.

#### 4.1.1 Objectif et protocole

L'objectif de cette première expérience est de valider la superposition des informations fournies par les deux techniques d'imagerie avec des feuilles qui synthétisent des stilbènes en quantité importante sur de larges zones.

La moitié des échantillons présente 3 modalités : pas d'irradiation UV (zone témoin), 45 secondes sous irradiation UV (irradiation intermédiaire) et 180 secondes sous irradiation UV (zone fortement irradiée). L'autre moitié présente 2 modalités : pas d'irradiation UV et 180 secondes d'irradiations UV.

Comme défini en amont, les échantillons sont préalablement observés en FM avant d'être lyophilisés et nous être envoyés. Pour repérer la zone à analyser, 3 points de marquage sont déposés par un feutre fin aux 3 extrémités (**Figure V-14**).



**Figure V-14** : présentation du protocole d'irradiation d'une feuille de vigne. Pour les analyses en imagerie MS et en microscopie, les zones seront prélevées sur la partie gauche de la feuille et pour les analyses LC-MS, sur la partie droite. Trois points de marquage sont déposés avec un feutre noir afin de délimiter la zone commune à analyser en MSI et en microscopie. Dans ce cas de figure, l'échantillon présente 3 modalités.

Pour obtenir ces différents temps d'irradiation, quatre caches (espacés verticalement de 1 mm) sont disposés aux endroits choisis. La feuille est ensuite exposée pendant 2 min 15 s aux rayons UV. Suite à ce temps d'exposition, les deux caches de la zone intermédiaire inférieurs sont retirés. Enfin, la feuille est resoumise à 45 s de rayonnement UV.

Trois génotypes ont été sélectionnés pour cette expérience, 1223 (sensible), Rpv2 1162 (OIV 7) et Rpv2 1202 (OIV 9), soit trois feuilles. Ces mêmes génotypes seront repris pour la partie inoculation de cette expérience.

Trois jours après traitement, les échantillons sont prélevés sur les feuilles. Deux rectangles de 8 x 10 mm sont découpés. Le premier comporte trois zones correspondant aux trois modalités : 0, 45 et 180 secondes ; et le deuxième deux zones : 0 et 180 secondes. Pour les dosages des stilbènes par HPLC, les disques foliaires correspondants aux trois zones sont découpés. Après extraction méthanolique, ils sont séchés puis pesés afin de contrôler le rapport de matière sèche/volume de solvant.

Les paramètres d'imagerie pour cette expérience sont les mêmes que ceux décrits dans le **Chapitre IV**.

#### 4.1.2 Superposition des données d'imagerie et dosages HPLC

Comme mentionné dans le **Chapitre IV**, l'ion  $m/z$  228 détecté en LDI-TOFMS peut provenir soit du *trans*- ou *cis*-resvératrol, soit du *trans*- ou *cis*-picéide. En conséquence, pour simplifier le discours dans cette partie, l'ion  $m/z$  228 sera systématiquement associé au resvératrol. Les dosages compléteront les données.

##### 4.1.2.1 Corrélation des techniques d'imagerie

L'échantillon #1 Rpv2 1202 n'a pas pu être exploité car la zone étudiée était trop près du point de repérage à l'encre situé sur la face abaxiale. Ceci conduit à une saturation du détecteur qui n'est plus opérationnel pendant plusieurs dizaines de minutes voire quelques heures. Pour les échantillons suivants, les zones d'analyses en imagerie ont été réduites afin d'être suffisamment éloignées des points de marquage.

##### a. Echantillon #2, Rpv2 1202

Cet échantillon présente une configuration à 3 zones (témoin, zone à droite ; irradiation à 180 s, zone centrale ; irradiation à 45 s, zone à gauche). L'acquisition des 5228 pixels a duré environ 10h15. La **Figure V-15** présente les images observées en microscopie et en MSI pour cet échantillon.

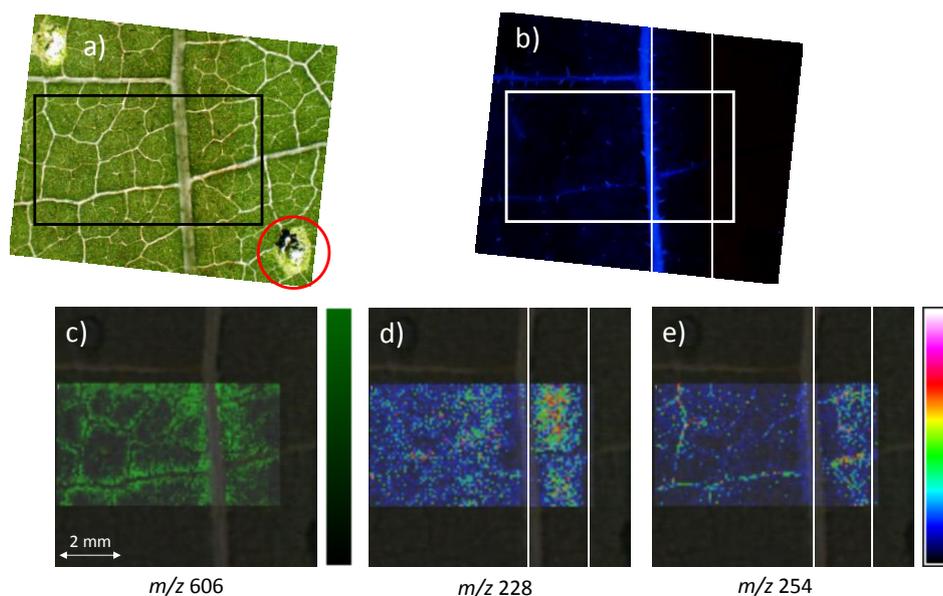


Figure V-15 : analyses de l'échantillon #2 Rpv2 1202. Clichés de microscopie, (a) en transmission et (b) en fluorescence. Répartition des ions (c)  $m/z$  606, (d)  $m/z$  228 et (e)  $m/z$  254. Les cadres servent à repérer les zones communes entre les deux techniques. Les deux barres verticales sur les images (d) et (e) délimitent les 3 zones : à gauche la zone irradiée pendant 45 s ; au centre, irradié 3 min ; et à droite, la zone témoin. Un décalage d'orientation a été remarqué entre les clichés FM et les images issues de la MSI, il a fallu opérer une légère rotation pour la corrélation des images. Paramètres MSI : énergie laser à  $30 \mu\text{J}$  (faisceau dévié), atténuateur à 60 %, pas de  $50 \mu\text{m}$  entre chaque tir laser et diamètre des impacts laser d'environ  $40 \mu\text{m}$ . Le cercle rouge indique un point de marquage.

Sur ces cartes MSI, les 3 zones se distinguent nettement avec la distribution du resvératrol ( $m/z$  228). Les pixels de la zone entre les deux barres blanches sont effectivement plus intenses (**Figure V-15 (d)**). C'est moins net pour le ptérostilbène ( $m/z$  254), mais tout de même visible. Ce dernier semble être plutôt localisé au niveau des petites nervures. En fluorescence, le dessin des nervures est également très reconnaissable. Les cires (ion  $m/z$  606, **Figure V-15 (c)**) témoignent d'un signal régulier durant toute l'expérience MSI. La taille des nervures a une influence au niveau du signal détecté. Au niveau des très grosses nervures, l'interaction du laser avec l'échantillon ne conduit pas à la détection d'ions. Dans le cas de la fluorescence, la concentration des métabolites mais également la rigidité et la viscosité du milieu influent sur le signal. Les stilbènes présentent donc une intensité de fluorescence plus importante au niveau des nervures.

#### b. Echantillon #3, 1223

Cet échantillon présente une configuration à 2 zones. L'acquisition des 4856 pixels correspondant a duré un peu plus de 9 heures et demi. La **Figure V-16** présente les images observées en microscopie et en MSI associées à cet échantillon.

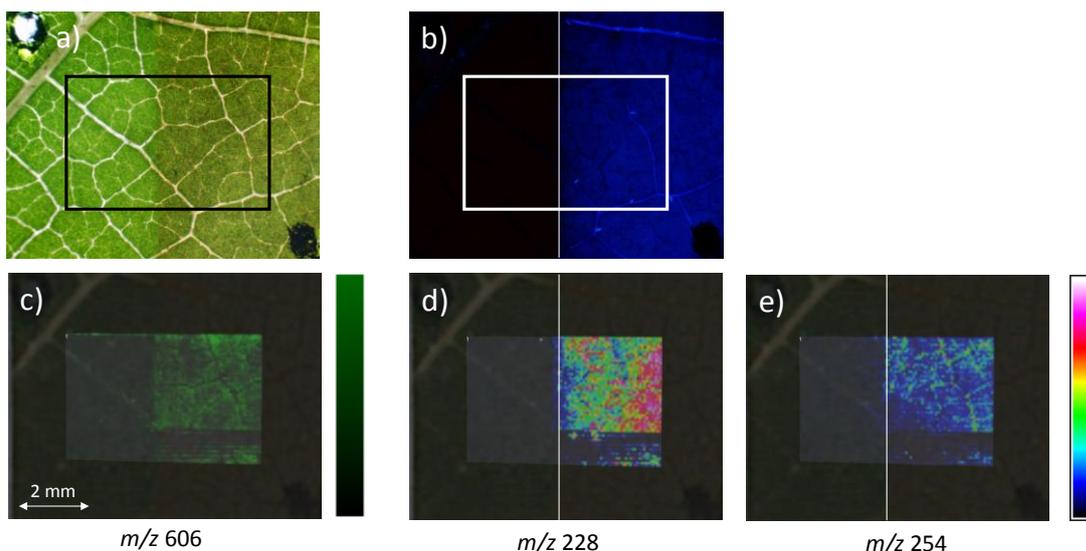


Figure V-16 : analyses de l'échantillon #3, 1223. Clichés de microscopie (a) en transmission, et (b) en fluorescence (b). Répartition des ions (c)  $m/z$  606, (d)  $m/z$  228 et (e)  $m/z$  254. Les cadres servent à repérer les zones communes entre les deux techniques. Les barres verticales sur les images (d) et (e) délimitent les deux zones, non traitée à gauche et irradiée pendant 3 min à droite.

La distinction est très nette entre la zone irradiée et la zone témoin, notamment avec le resvératrol. Le même phénomène observé pour l'échantillon précédent se remarque ici pour le ptérostilbène. Ce composé est moins intense et est surtout davantage localisé au niveau des nervures. Une baisse du signal survient pour quelques lignes avant la fin de la cartographie confirmée avec l'ion  $m/z$  606. Ceci est vraisemblablement dû au signal saturé du resvératrol qui a rendu le détecteur inopérant pendant plusieurs dizaines de lignes cartographiées.

#### c. Echantillon #4, 1223

Cet échantillon présente une configuration à 3 zones (témoin, zone à droite ; irradiation à 180 s, zone centrale ; irradiation à 45 s, zone à gauche). L'acquisition de 5880 pixels a duré 11h30. La **Figure V-17** présente les images observées en microscopie et en MSI associées à cet échantillon.

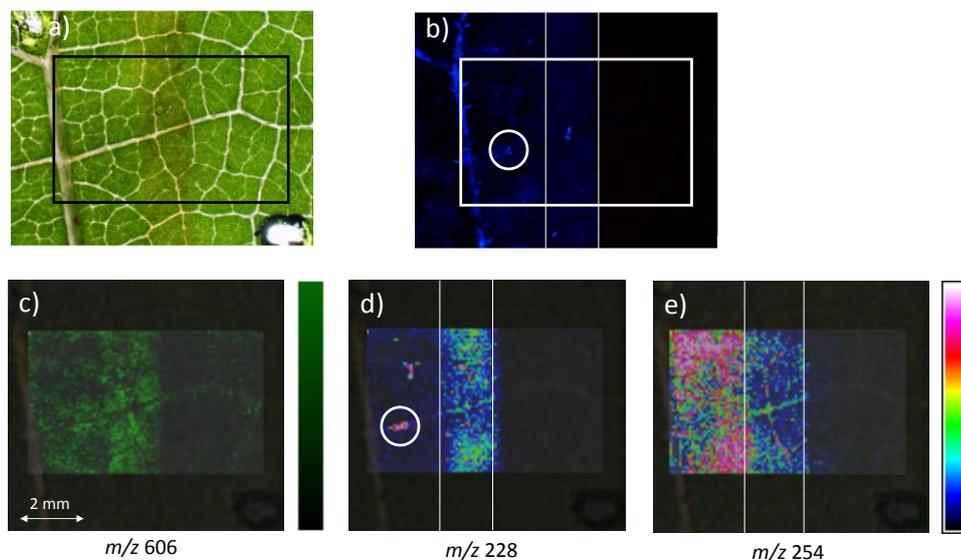


Figure V-17 : analyses de l'échantillon #4 1223, sensible. Clichés de microscopie (a) en transmission, et (b) en fluorescence (b). Répartition des ions (c)  $m/z$  606, (d)  $m/z$  228 et (e)  $m/z$  254. Les cadres servent à repérer les zones communes entre les deux techniques. Les deux barres verticales sur les images (d) et (e) délimitent les 3 zones : à gauche la zone irradiée pendant 45 s, au centre irradié 3 min et à droite la zone témoin. Le cercle blanc des images (b) et (d) cible une zone particulièrement intense en resvératrol, également repérée en fluorescence.

La répartition du resvératrol permet une distinction nette des trois zones. Certains pixels sont très intenses dans la zone à 45 s, cette zone semble être colocalisée avec la fluorescence (cercle blanc). Un phénomène étrange avec le ptérostilbène se remarque. S'il permet de faire la distinction entre les 3 zones, son intensité moyenne est bien plus élevée sein de la zone intermédiaire de 45 s que celle de la zone irradiée à 3 min. Ce comportement aussi inhabituel qu'inattendu a toutefois été confirmé par les dosages HPLC-DAD (**paragraphe 4.1.2.2**).

#### d. Echantillon #5, Rpv2 1162

Cet échantillon présente une configuration à 2 zones. L'analyse de 4904 pixels a duré environ 9h30. La **Figure V-18** présente les images observées en microscopie et en MSI associées à cet échantillon. Afin de balayer la quasi-totalité de l'échantillon, le pas a été réglé à 75  $\mu\text{m}$ .

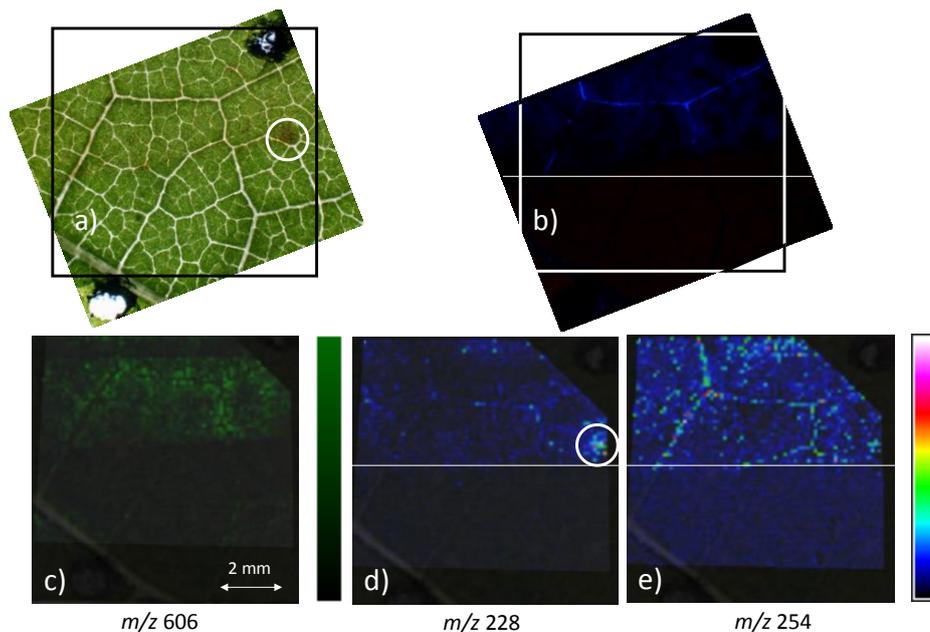


Figure V-18 : analyses de l'échantillon #5 Rpv2 1162. Clichés de microscopie (a) en transmission, et (b) en fluorescence (b). Répartition des ions (c)  $m/z$  606, (d)  $m/z$  228 et (e)  $m/z$  254. Les barres horizontales sur les images (b), (d) et (e) délimitent la zone supérieure (irradiée 3 min) de la zone inférieure (témoin). Le cercle blanc cible une zone intense en resvératrol, zone qui apparaît brunie sur le cliché (a) en transmission.

Pour cette expérience, il a fallu procéder à un réajustement des alignements. Tout comme le cliché en fluorescence, l'intensité maximale des stilbènes sur cet échantillon est assez faible. Une nouvelle fois, c'est le ptérostilbène qui colocalise le mieux avec la fluorescence avec une distribution préférentielle sur les petites nervures. L'ion  $m/z$  228 apparaît très intense pour quelques pixels. Ces derniers peuvent être associés à une zone particulièrement brunie par l'irradiation UV (cercle blanc), observable sur le cliché de microscopie en transmission.

#### e. Echantillon #6, Rpv2 1162

Cet échantillon présente une configuration à 3 zones (témoin, zone supérieure ; irradiation à 180 s, zone centrale ; irradiation à 45 s, zone inférieure). L'analyse de 5092 pixels a duré pratiquement dix heures. La **Figure V-19** présente les images observées en microscopie et en MSI associées à cet échantillon. Afin de balayer la quasi-totalité de l'échantillon, le pas a également été réglé ici à 75  $\mu\text{m}$ .

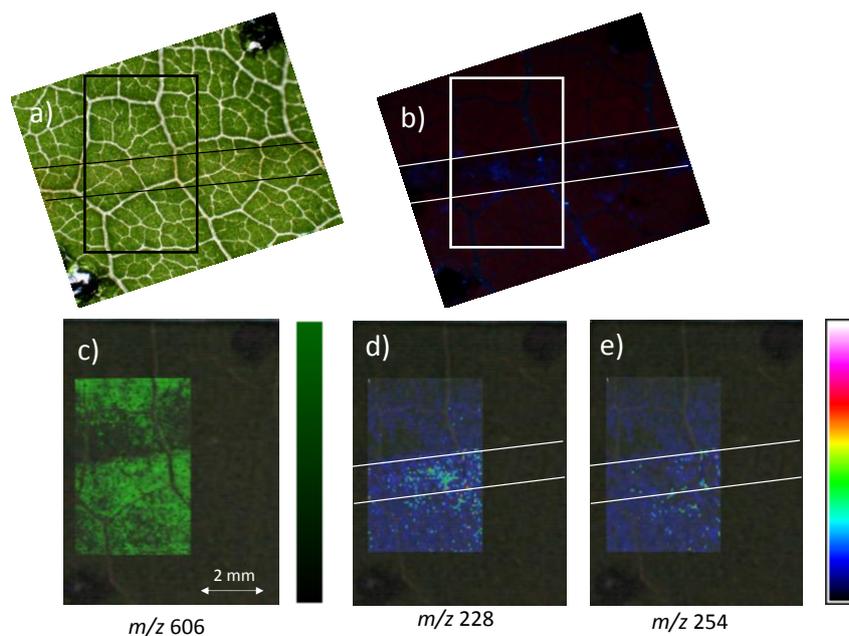
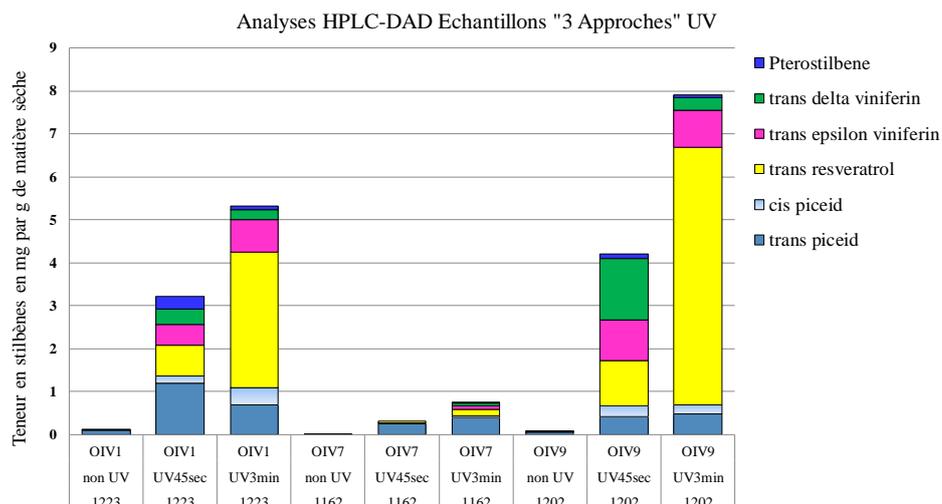


Figure V-19 : analyses de l'échantillon #6 Rpv2 1162. Clichés de microscopie (a) en transmission, et (b) en fluorescence (b). Répartition des ions (c)  $m/z$  606, (d)  $m/z$  228 et (e)  $m/z$  254. Les cadres servent à repérer les zones communes entre les deux techniques. Les barres sur les images (b), (d) et (e) délimitent les 3 zones : supérieure, la zone témoin ; au centre, la zone 3 min ; et inférieure, le zone irradiée 45 s.

L'échantillon #6 a dû aussi être recadré. Même constat que l'échantillon précédent, l'intensité des stilbènes pour ce génotype est plus faible avec les deux techniques. La délimitation des 3 zones est moins franche par rapport aux autres échantillons. La zone du milieu (entre les deux barres) est néanmoins plus intense en resvératrol, conformément au temps d'irradiation de 180 s.

#### 4.1.2.2 Dosages HPLC

Les extraits méthanoliques relatifs à ces échantillons ont été analysés en HPLC-DAD afin d'accéder à des valeurs de concentration pour les stilbènes. Chaque génotype n'a été analysé qu'une fois, les analyses correspondantes sont détaillées en **Figure V-20**.



**Figure V-20 : résultats des dosages HPLC-DAD des échantillons irradiés aux UV-C pour l'approche corrélative (INRA de Colmar, A. Poutaraud).**

Même si le dosage n'apporte qu'une information quantitative moyennée sur toute la surface du disque foliaire prélevé, ils confirment plusieurs observations émises lors des analyses en imagerie MS et de fluorescence. Premièrement, la feuille de génotype 1162 est celle qui a synthétisé le moins de stilbène suite à son irradiation UV. En effet, les signaux en fluorescence ainsi que les intensités relatives aux ions suivis étaient faibles pour ce génotype. L'autre fait remarquable qui a été observé en MSI était la très forte intensité du ptérostilbène pour le génotype sensible 1223 sur la zone intermédiaire irradiée à 45 secondes. Ce phénomène est confirmé par ces dosages. Enfin, pour la feuille de génotype 1202, tout comme l'intensité élevée de l'ion associé au resvératrol en MSI, les dosages montrent des teneurs pour ce composé très élevées. Ces dosages permettent, en outre, de dégager une tendance sur la provenance de l'ion  $m/z$  228. En l'occurrence, le signal de cet ion provient en majorité du *trans*-resvératrol. Les teneurs en picéides sont en effet inférieures à celles du resvératrol, sauf dans le cas de l'échantillon 1223 pour le temps d'irradiation de 45 secondes. Les concentrations en viniférines sont également notables, bien que non observables en MSI, ces composés contribuent au signal global de fluorescence des stilbènes.

#### 4.1.2.3 Conclusion

Cette étude témoigne d'une complémentarité mais aussi d'une corrélation entre les données obtenues avec ces trois techniques. Les deux techniques d'imagerie tout d'abord, la fluorescence et l'imagerie par spectrométrie de masse, ont montré des répartitions similaires pour les stilbènes conjointement suivis (resvératrol et ptérostilbène). Les dosages HPLC ont confirmé les observations semi-quantitatives émises à propos des différences d'intensité entre le

resvératrol et le ptérostilbène au sein d'une même carte. Il est évident, par exemple, que le génotype 1162 est celui qui a synthétisé le moins de stilbènes, comme observé par les trois techniques. Les dosages ont permis, enfin, de confirmer la présence d'autres stilbènes non observés en MSI : les viniférines et les picéides.

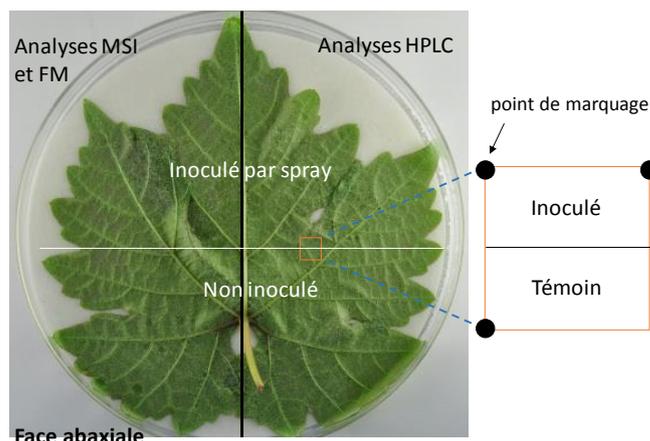
Concernant l'instrumentation, l'énergie du laser s'est montrée stable sur de longues durées d'analyse même s'il a fallu faire attention de ne pas atteindre la saturation du détecteur, faute de quoi, l'échantillon n'aurait été pas exploitable (extinction du signal pour l'échantillon #1, et quelques lignes absentes pour les échantillons 3 et 5). Les deux stilbènes ont présenté deux comportements distincts dans le cas de l'irradiation UV-C. Pour cette série d'échantillons, le ptérostilbène se concentrait davantage au niveau des petites nervures au contraire du resvératrol, présent largement dans le limbe. Enfin, le temps d'irradiation a montré avoir une influence, les signaux associés aux stilbènes étant plus élevés pour les zones irradiées à 180 s, sauf pour le ptérostilbène pour l'échantillon #4. Bien que confirmée par les dosages en HPLC, ce cas unique est difficile à interpréter d'un point de vue biologique.

#### 4.2. Feuilles inoculées par *Plasmopara viticola*

L'expérience ayant été validée sur des échantillons de feuilles de vigne irradiées aux rayons UV-C, la même expérience a été reconduite sur des échantillons inoculés par *Plasmopara viticola*. Le même protocole a été suivi, que ce soit pour la préparation des échantillons ou leur analyse. Tout comme pour la précédente expérience, l'observation des stilbènes se fera uniquement en microscopie de fluorescence et non en microscopie confocale.

##### 4.2.1 Objectif et protocole

Six génotypes présentant différents niveaux de résistance ont été sélectionnés pour cette expérience. Les échantillons sont inoculés par vaporisation d'une solution d'inoculum à  $3.10^5$  sporanges par millilitre. La solution d'inoculum est obtenue à partir de feuilles de Muscat Ottonel à 6 dpi. Un cache est déposé sur la partie de la feuille qui doit rester « témoin ». Pour repérer les zones à analyser, 3 points de marquage sont effectués par un feutre fin noir aux 3 extrémités de la future zone à cartographier (**Figure V-21**).



**Figure V-21 : présentation du protocole d'inoculation. Pour les analyses en MSI et en FM, les zones seront prélevées sur la partie gauche de la feuille et sur la partie droite pour les analyses LC-MS.**

A 3 jours post infection, deux rectangles de 8 x 10 mm sont découpés de chaque feuille pour les deux techniques d'imagerie. Les disques foliaires sont prélevés sur les mêmes feuilles pour effectuer les analyses par HPLC-DAD.

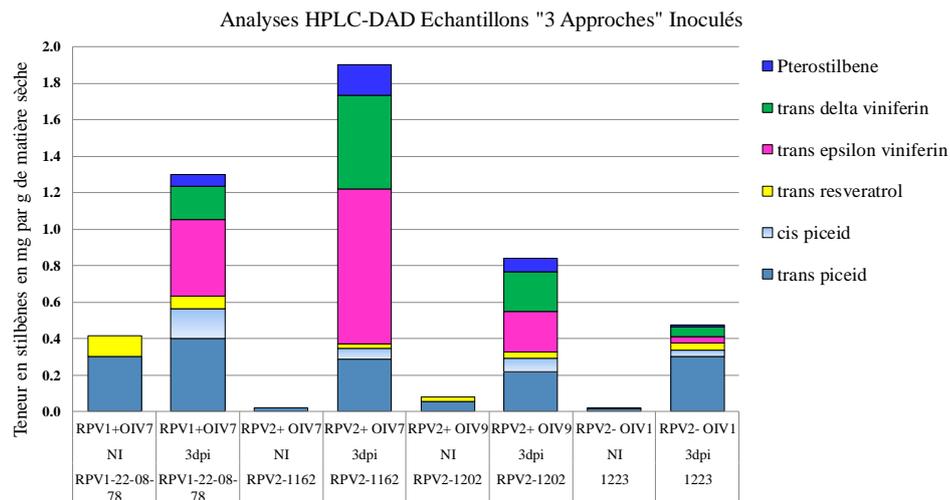
Les 6 échantillons inoculés analysés en MSI pour cette deuxième expérience sont encodés de la manière suivante :

- ✓ échantillon #1 : **Rpv1 22-8-78, OIV 7** ;
- ✓ échantillon #2 : **Rpv2 1162, OIV 7** ;
- ✓ échantillon #3 : **Rpv2 1202, OIV 9** ;
- ✓ échantillon #4 : **1223, OIV1**.

#### 4.2.2 Superposition des données d'imagerie et dosages HPLC

##### 4.2.2.1 Dosages HPLC

Comme pour l'étude précédente, les extraits méthanoliques associés aux échantillons infectés ont été analysés par HPLC. Les résultats de ces analyses sont présentés en premier lieu en **Figure V-22**.



**Figure V-22 : résultats des dosages HPLC-DAD des échantillons inoculés pour l'approche corrélative (INRA de Colmar, A. Poutaraud).**

Plusieurs observations peuvent être émises quant à l'étude de ce graphique. Tout d'abord, les taux en resvératrol sont en général assez faibles au sein des échantillons inoculés. Plus étonnant encore, le taux endogène de ce même composé est plus important au sein de l'échantillon Rpv1 non inoculé. Le taux endogène en *trans*-picéide de l'échantillon Rpv1 est également très élevé. Les concentrations associées aux stilbènes ciblés (resvératrol et ptérostilbène) sont bien plus faibles que pour la précédente expérience avec les échantillons UV, en moyenne d'un facteur 5. En revanche, contrairement aux irradiations UV, la proportion des viniférines par rapport au resvératrol est beaucoup plus importante. C'est particulièrement le cas pour les échantillons 22-8-78, 1162 et 1202. En valeur absolue, les concentrations en viniférines de ces échantillons sont dans le même ordre de grandeur que celles des échantillons irradiés.

#### 4.2.2.2 Corrélation des techniques d'imagerie

##### a. Echantillon #1, Rpv1 22-8-78

Cette feuille est issue d'un génotype Rpv1 22-8-78 de nombre OIV 7. Les cartes MSI issues d'une zone d'analyse de 8710 pixels sont présentées en **Figure V-23**.

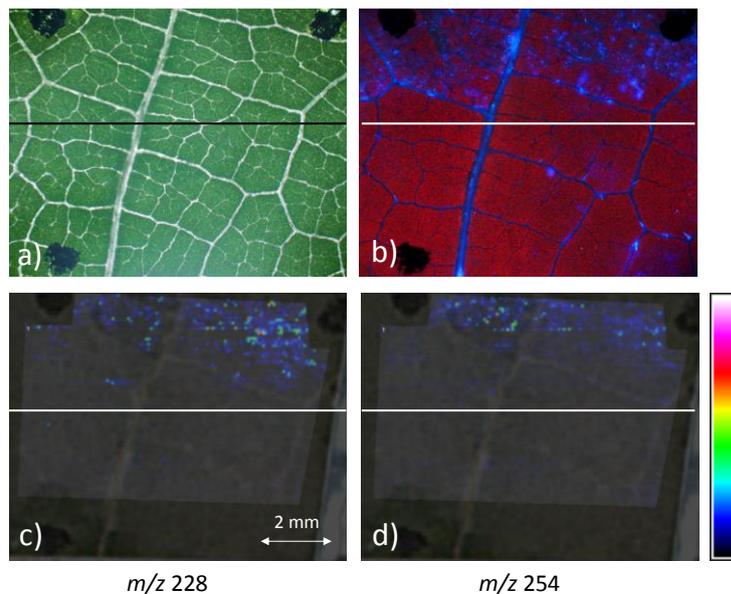


Figure V-23 : analyses de l'échantillon #1 Rpv1 22-8-78 inoculé. Clichés de microscopie (a) en transmission et (b) en fluorescence. Répartition des ions (c)  $m/z$  228 et (d)  $m/z$  254. Les traits horizontaux délimitent la zone infectée (supérieure) de la zone témoin (inférieure).

Le signal moyen en MSI est faible, particulièrement sur les parties gauches des images (**Figure V-23 (c) et (d)**). La corrélation avec le cliché en FM est toutefois respectée. La séparation zone inoculée/zone témoin est également cohérente entre les deux techniques d'imagerie. En MSI, le resvératrol et ptérostilbène sont colocalisés, leurs signaux se retrouvent en majorité sur les mêmes zones même si lorsque le resvératrol est très présent, le ptérostilbène l'est moins et vice-versa. Globalement, le resvératrol est toutefois détecté de façon plus intense. Enfin, le comportement du ptérostilbène évoqué dans l'expérience précédente menée sur les échantillons UV n'est pas retrouvé ici. Alors qu'il était plutôt localisé sur les nervures, il se concentre ici dans le limbe, tout comme le resvératrol. Ceci peut être imputé au mode d'induction des stilbènes. En effet, l'inoculation génère des sites d'infections vraisemblablement au niveau des stomates. Les lieux de biosynthèse sont donc bien localisés.

#### b. Echantillon #2, Rpv2 1162

Une zone de 8509 pixels a été analysée pour cet échantillon résistant à *P. viticola* (OIV 7). Les images qui lui sont associées sont présentées en **Figure V-24**.

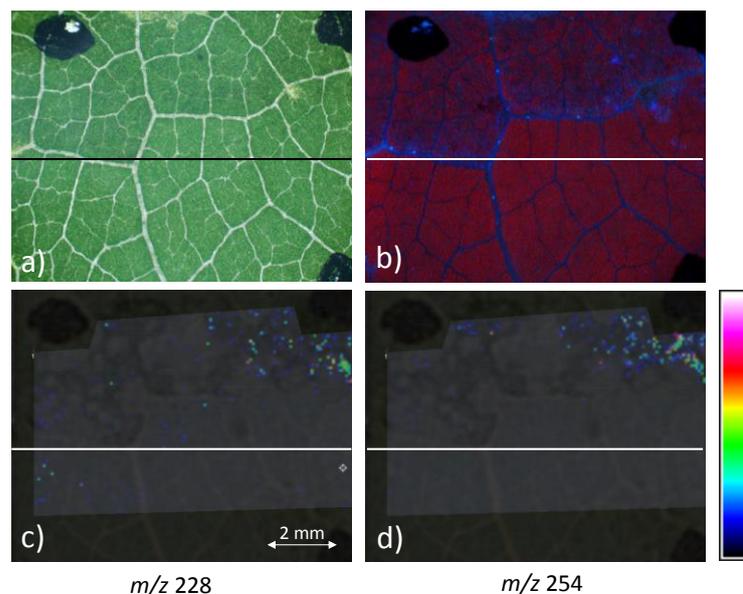


Figure V-24 : analyses de l'échantillon #2 Rpv2 1162. Clichés de microscopie (a) en transmission et (b) en fluorescence, répartitions des ions (c)  $m/z$  228 et (d)  $m/z$  254. Les traits horizontaux délimitent la zone infectée (supérieure) de la zone témoin (inférieure).

Pour ce cas, le signal global relatif au stilbène n'est pas très élevé. La fluorescence enregistrée en microscopie n'est elle-même pas très intense. La corrélation ne s'observe que sur la partie droite de l'échantillon (**Figure V-24 (b), (c) et (d)**). Cependant, la fluorescence des stilbènes reste visible et permet de faire la distinction entre la zone infectée et la zone témoin. Au vu des dosages HPLC, elle pourrait provenir des viniférines, particulièrement abondantes pour cet échantillon.

### c. Echantillon #3, Rpv2 1202

Ce génotype 1202 présente une résistance totale au mildiou (OIV 9). Seule fois dans toute l'étude, cet échantillon s'est retrouvé malheureusement craquelé à sa réception. La partie la plus importante en termes de surface a néanmoins été récupérée pour l'analyse en MSI, soit une zone de 5247 pixels. Les clichés associés à cet échantillon sont illustrés en **Figure V-25**.

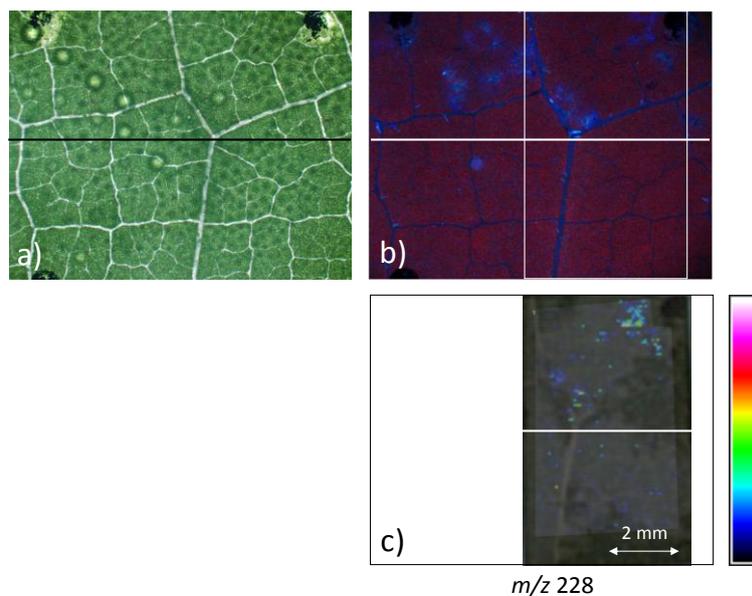


Figure V-25 : analyses de l'échantillon #3 1202. Clichés de microscopie (a) en transmission et (b) en fluorescence, (c) image de la répartition de l'ion  $m/z$  228. Les barres verticales de l'image (b) délimitent la zone analysée en MSI. Les traits horizontaux délimitent la zone infectée (supérieure) de la zone témoin (inférieure).

Seul le resvératrol est détecté en MSI. Sur la partie qui a pu être analysée en imagerie par spectrométrie de masse, on note une bonne corrélation entre le signal de fluorescence et celui du resvératrol en MSI même si l'intensité reste faible en moyenne sur toute la surface. Ce qui est en accord avec les dosages HPLC, la teneur en resvératrol est effectivement très faible.

Une analyse complémentaire a été menée sur la face adaxiale de ce même échantillon. En effet, les clichés en microscopie montraient également une fluorescence des stilbènes remarquable pour ce côté de la feuille. L'échantillon a donc été extrait de son montage puis refixé sur la plaque d'analyse. Les clichés de ces analyses sont exposés en **Figure V-26**.

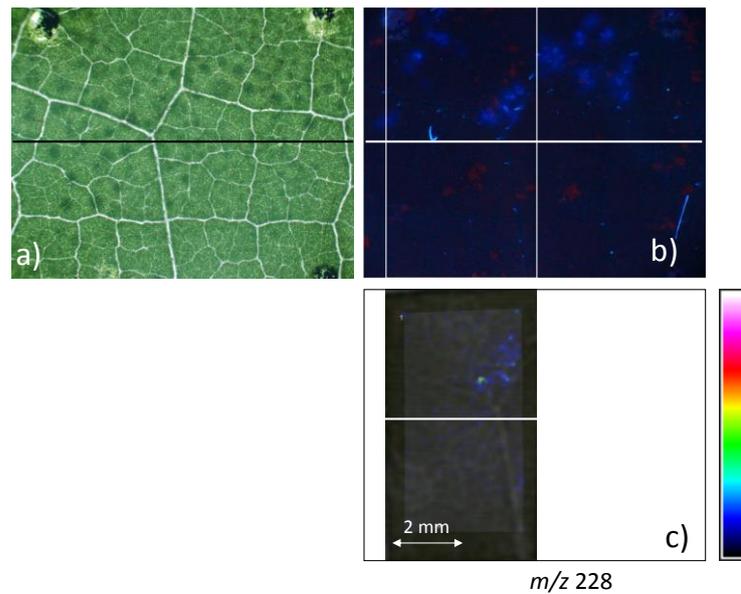


Figure V-26 : analyses de la face adaxiale de l'échantillon #3 1202 Clichés de microscopie (a) en transmission et (b) en fluorescence, (c) image de la répartition de l'ion  $m/z$  228. Les traits horizontaux délimitent la zone infectée (supérieure) de la zone témoin (inférieure).

Le signal concernant l'ion  $m/z$  228 est très faible, il est vraisemblablement très proche de la limite de détection du spectromètre. Cependant, on note une corrélation entre la répartition de l'ion  $m/z$  228 et le cliché en fluorescence. Ceci démontre que l'analyse de stilbène en MSI sur la face adaxiale est possible. Même dans le cadre d'une inoculation (qui présente des répartition en stilbènes très localisées), la LDI-TOFMS demeurent suffisamment sensible pour détecter les stilbènes sur la face adaxiale ; la face habituellement moins concentrée en stilbènes<sup>3,12</sup>.

d. Echantillon #4, 1223

Le dernier échantillon est issu d'un génotype sensible : 1223, de nombre OIV 1. La surface analysée est composée de 7000 pixels. Les différentes images relatives à cet échantillon sont présentées en **Figure V-27**.

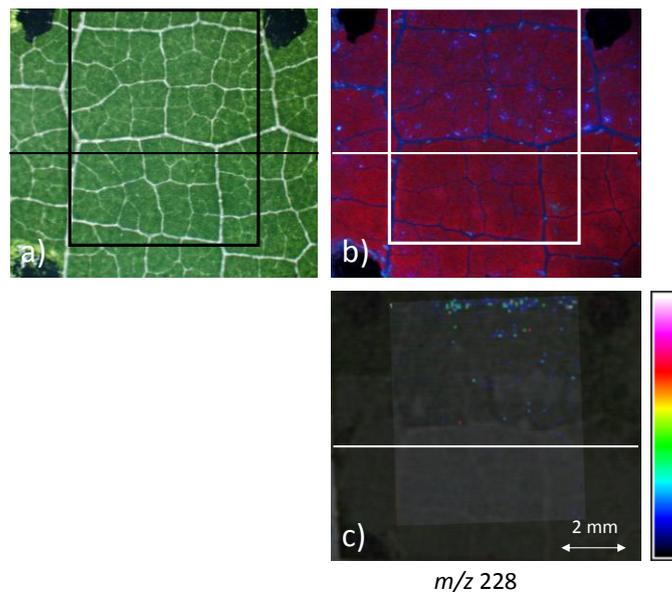


Figure V-27 : analyses de l'échantillon #4, 1223. Clichés de microscopie (a) en transmission et (b) en fluorescence, (c) image de la répartition de l'ion  $m/z$  228. Les cadres des images (a) et (b) délimitent la zone analysée en MSI. Les traits horizontaux délimitent la zone infectée (supérieure) de la zone témoin (inférieure).

Outre la fluorescence observée sur les nervures, elle apparaît également très localisée, ce qui diffère par rapport aux échantillons précédents. Etant donné que ce génotype ne possède aucun gène de résistance, on peut penser que les sites de développement du pathogène sont plus nombreux, d'où une présence très localisée des stilbènes. Ici également, le signal enregistré en imagerie MS ne provient que du resvératrol. La corrélation s'observe au niveau de la nervure supérieure et ponctuellement sur des sites de la zone infectée (**Figure V-27 (b) et (c)**). Le signal moyen pour cette cartographie est très faible, la fluorescence des stilbènes l'est également. Les dosages HPLC montrent que cet échantillon a synthétisé des stilbènes en de faibles proportions, la concentration en ptérostilbène étant particulièrement faible.

#### 4.2.2.3 Bilan

Les dosages HPLC corréleront moins bien avec les signaux enregistrés en MSI par rapport aux échantillons UV. C'est notamment le cas pour les échantillons #2 et #3 pour lesquels il n'y a pas eu de détection de ptérostilbène en imagerie MS. Pourtant, d'après les dosages, il devrait y en avoir plus que du resvératrol. Une explication peut être avancée pour justifier ce constat. Après une irradiation UV, les stilbènes sont synthétisés sur de larges zones contrairement à une inoculation où la présence de stilbènes est très localisée. Les dosages HPLC « moyennent » les taux de stilbènes, puisque les surfaces des disques prélevés sont bien supérieures (plus de 20 fois) par rapport aux zones analysées en MSI. De plus, même si un disque foliaire présente une

concentration élevée en stilbènes, la zone adjacente à ce prélèvement peut-être moins concentrée. Cet évènement est moins susceptible de se produire pour les feuilles irradiées (voir l'étude de la répétabilité du signal en imagerie par LC-MS, **Chapitre IV**). Enfin, les dosages ont révélé des teneurs en viniférines particulièrement importantes pour les échantillons résistants (Rpv1 22-8-78, Rpv2 1162 et Rpv2 1202). Ces concentrations sont dans le même ordre de grandeur que celles des échantillons irradiés.

En ce qui concerne les techniques d'imagerie, une corrélation entre la fluorescence observée en microscopie et la MSI a été mise en évidence. Toutefois, elle est moins évidente que pour l'expérience conduite sur les échantillons UV. Les dosages HPLC ont révélé des taux en ptérostilbène et resvératrol faibles, rendant leur détection plus difficile car proche de la limite de détection en LDI-TOFMS. Néanmoins, la sensibilité de cette technique s'est montrée suffisante pour détecter les stilbènes sur la face adaxiale qui présente habituellement des concentrations moins importantes de ces composés. De plus, une différence de comportement dans la répartition du ptérostilbène a également été décelée. Il se concentre ainsi principalement autour des petites nervures et non plus sur ces dernières comme c'était le cas pour les échantillons irradiés. En revanche, sur les grosses nervures, aucun signal n'est enregistré, comme observé lors de l'expérience UV. Enfin, la fluorescence observée pour l'échantillon sensible 1202 semble différente des autres, elle est moins diffuse et davantage localisée.

## 5. Conclusion

Les analyses en microscopie confocale ont été conduites en amont puisque l'imagerie par spectrométrie de masse est une technique destructive. En conséquence, le conditionnement des échantillons a demandé une adaptation pour la bonne conservation des échantillons lors de leur transport entre les différents laboratoires. Il fallait, en outre, bloquer leur cinétique afin que les échantillons soient analysés à un même instant d'évolution suite à un stress. C'est dans ce but qu'un protocole de lyophilisation a été mis en place et optimisé.

La première partie de cette approche corrélative concernait des feuilles exposées aux rayons UV-C. Sur un même échantillon, 2 ou 3 temps d'irradiation différents ont été étudiés. Pour ces échantillons, la corrélation entre la fluorescence et la MSI des stilbènes a bien été respectée. Pour certains géotypes, les 3 zones étaient clairement distinguables. Les dosages ont, en outre, confirmé les teneurs en stilbènes cohérentes aux analyses effectuées en imagerie. Toutefois, les deux stilbènes ont montré des comportements différents au niveau de leur répartition : le

ptérostilbène était principalement localisé sur les nervures de la feuille alors que le resvératrol était plutôt localisé dans le limbe.

Les résultats de cette étude ciblée sur les stilbènes ont été obtenus avec l'association originale de trois techniques analytiques complémentaires entre elles. La microscopie confocale, ou à défaut l'observation en microscopie de fluorescence, donnent accès à des localisations des stilbènes en profondeur (dans seul le cas de la CMI) avec des clichés hautement résolus. L'imagerie par spectrométrie de masse permet d'accéder à des informations structurales par le suivi des ions  $m/z$  228 et 254 fournissant des informations structurales sur la nature de la fluorescence observée. Les dosages HPLC quant à eux apportent un complément d'information quantitatif sur la répartition resvératrol/picéide (inclus l'isomérisation *cis-trans*) représenté par le seul ion  $m/z$  228 en MSI. Ils fournissent également des données qualitatives puisque l'ensemble des stilbènes, y compris ceux inaccessibles en MSI, sont dosés.

Dans le contexte de l'étude de la relation du pathogène avec la feuille de vigne, la deuxième partie a été logiquement consacrée à l'analyse de feuilles inoculées par le mildiou. Ici également, une corrélation a pu être mise en évidence entre la fluorescence et l'imagerie par spectrométrie de masse. Cependant, les signaux provenant des stilbènes étaient nettement plus faibles. Dans certains cas, on se rapprochait des limites de détection LDI-TOFMS. Les taux en stilbènes déterminés en HPLC étaient effectivement plus faibles par rapport à ceux des échantillons irradiés. Ce fut particulièrement le cas pour le resvératrol. De plus, pour certains échantillons, les valeurs de ces dosages n'étaient pas en accord avec les intensités relevées en MSI (cas du ptérostilbène pour les échantillons #2 et 3). La répartition du ptérostilbène était également différente de celle observée avec les échantillons irradiés. Ce dernier se concentrait davantage autour des nervures pour les échantillons inoculés. Enfin, la LDI-TOFMS s'est montrée suffisamment sensible pour détecter et conduire à une corrélation sur une face adaxiale de feuille infectée.

Finalement ces résultats démontrent la faisabilité et l'intérêt de cette approche corrélative, même si cette dernière est encore perfectible. Le repérage des zones avec le trait de marquage est efficace mais la zone autour du feutre doit être soigneusement évitée en MSI afin de prévenir toute saturation du détecteur. Un autre dispositif de marquage pourrait être développé pour éviter cet écueil. Cette expérience pourrait également être menée sur d'autres génotypes tels que le Cabernet Sauvignon, par exemple. Du point de vue purement instrumental, la limite actuelle en imagerie réside dans la résolution et la vitesse d'acquisition, toutes deux dépendantes du laser. Les lasers Nd-YAG actuels fonctionnent à plus haute fréquence tout en conservant des diamètres d'impacts inférieurs à 50  $\mu\text{m}$ . Ceci permettrait de considérablement améliorer la résolution des

images et la taille de la zone analysée. Le laser excimer pourrait également être utilisé, comme vu dans le chapitre précédent, dans le but d'analyser différents niveaux de profondeurs de la feuille conjointement en CMI et MSI. Enfin, cette étude multi disciplinaire pourrait maintenant être réalisée en MALDI pour la partie spectrométrie de masse. Ceci permettrait de suivre par exemple les viniférines qui, comme nous l'avons observé, sont très présentes chez certains génotypes lors de l'infection par *P. Viticola*.

## 6. Littérature

1. Bellow, S. Etude des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au mildiou : Thèse de Doctorat. (2012).
2. Hillis, W. E. & Ishikura, N. The chromatographic and spectral properties of stilbene derivatives. *J. Chromatogr. A* **32**, 323–336 (1968).
3. Poutaraud, A. *et al.* Fast and Local Assessment of Stilbene Content in Grapevine Leaf by in Vivo Fluorometry. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4913–4920 (2007).
4. Fricker, M. D. & Meyer, A. J. Confocal imaging of metabolism in vivo: pitfalls and possibilities. *J. Exp. Bot.* **52**, 631–640 (2001).
5. Wymer, C. L., Beven, A. F., Boudonck, K. & Lloyd, C. W. in *Confocal Microsc. Methods Protoc.* (Paddock, S. W.) 103–130 (Humana Press, 1999).
6. Hutzler, P. *et al.* Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* **49**, 953–965 (1998).
7. Genre, A. Confocal microscopy and plant cell biology: A perfect match. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* **142**, 348–354 (2008).
8. French, A. P., Mills, S., Swarup, R., Bennett, M. J. & Pridmore, T. P. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nat. Protoc.* **3**, 619–628 (2008).
9. Bellow, S., Latouche, G., Brown, S. C., Poutaraud, A. & Cerovic, Z. G. In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* (2012).
10. Hardham, A. R. Confocal microscopy in plant-pathogen interactions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **835**, 295–309 (2012).
11. Hamm, G. Recherche par spectrométrie de masse de métabolites intervenant dans la résistance de la vigne aux agressions biotiques et abiotiques ; Thèse de Doctorat. (2010).
12. Langcake, P. & Pryce, R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* **16**, 1193–1196 (1977).

## Conclusion générale

---



Parmi les maladies de la vigne, le mildiou, causé par l'agent pathogène *Plasmopara viticola*, demeure une préoccupation majeure dans les vignobles européens. Les traitements phytosanitaires demeurent encore pour l'instant efficaces, mais il reste impératif de trouver des réponses alternatives notamment pour la protection de l'environnement et la santé des viticulteurs et des populations vivant à proximité des vignobles.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit sont inscrits dans ce contexte, avec l'objectif d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes naturels de défense et de résistance de la vigne. Nous pourrions espérer compter sur ces défenses plutôt que sur l'assistance des produits phytosanitaires. Certaines variétés de vigne possèdent des gènes de résistance leur conférant une résistance partielle voire totale au pathogène. Cependant, cette stratégie de lutte plus « naturelle » conduit à rechercher ce qui différencie d'un point de vue moléculaire un cultivar résistant d'un autre sensible. Afin de répondre à cette interrogation, plusieurs approches analytiques par spectrométrie de masse ont été envisagées.

Dans un premier temps, une population issue de différentes étapes de croisement entre *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia* a été étudiée. La population 41528 a été créée dans le but de transmettre les gènes de résistance Rpv1 et Rpv2 de *Muscadinia rotundifolia* aux variétés sensibles de *Vitis vinifera*. A cause du brassage génétique, les hybrides ont présenté différents degrés de résistance. Pour chaque individu, deux feuilles ont été prélevées : la première, qui a été mise en contact avec le mildiou par inoculation, et la deuxième, qui a servi de témoin. L'analyse de l'extrait méthanolique de ces échantillons par la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS) associée à une source à électrospray (ESI) a permis d'établir les profils métaboliques des deux sous-populations. Quatre grandes familles de molécules ont été mises en évidence par le biais d'expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) : les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, les saccharides, les flavonoïdes et les acyle-lipides. Si les échantillons témoins ont montré des intensités relatives importantes en flavonoïdes, les saccharides et les lipides sont apparus surexprimés au sein des échantillons inoculés notamment à cause de la dégradation du matériel cellulaire entraînée par l'infection du pathogène.

Dans le but de synthétiser ces résultats, une analyse en composantes principales (ACP) a été entreprise avec 19 ions marqueurs. Chaque famille de molécules était représentée dans cette liste d'ions, ces derniers étant parmi les plus représentatifs des empreintes spectrales. Ces ACP ont permis d'observer une ségrégation entre les échantillons infectés et les échantillons témoins. Cependant, aucun classement n'a pu être établi selon le degré de résistance des hybrides à *Plasmopara viticola*. Si les marqueurs sélectionnés ont montré être impactés par l'infection, aucun

d'eux ne semble être clairement lié au phénomène de résistance proprement dit. Toutefois, des sulfoquinovosyl diacylglycérols ont été identifiés pour la première fois chez *Vitis* et bien qu'ils soient peu évoqués dans la littérature, des investigations supplémentaires mériteraient d'être menées à leur sujet. En effet, ils pourraient être associés à des mécanismes favorisant la défense de la plante, notamment au sein des chloroplastes comme c'est le cas pour d'autres plantes.

Enfin, pour inscrire ces travaux dans une approche de type métabolomique plus détaillée, le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse a été envisagé. Lors de l'analyse d'un échantillon infecté, cette expérience a permis d'acquérir de nombreux signaux, qui n'ont pas pu tous être identifiés, la précision en masse du spectromètre de type trappe linéaire ne le permettant pas. En plus des espèces identifiées par ESI-FTICRMS, cinq stilbènes ainsi que certains de leurs isomères ont été détectés. En limitant les effets de matrice par la séparation chromatographique, cette approche a permis d'acquérir une vue plus complète des métabolites présents dans un extrait de feuille de vigne. Il semble alors nécessaire de pouvoir combiner les analyses à haute résolution et précision en masse avec une étape de séparation chromatographique, par exemple avec un couplage LC-MS impliquant un analyseur orbitrap.

Lors de ces précédentes analyses métaboliques, l'étape nécessaire d'extraction du matériel végétal induit conjointement une perte d'information sur la distribution spatiale des métabolites. Par conséquent, l'analyse *in situ* de feuilles de vigne a été entreprise en imagerie par spectrométrie de masse (MSI) dans un deuxième temps. Cette technique repose sur l'interaction laser-échantillon. Les paramètres du laser ont été au préalable optimisés afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible aux stilbènes en condition de désorption/ionisation laser, sans utilisation de matrice. L'avantage de la LDI réside dans la préparation simple des échantillons qui limite les contaminations, délocalisations et interférences associées à l'ajout de substances exogènes telles que les matrices. Les molécules détectées dans ces conditions sont principalement associées à des acyle-glycérols et à des stilbènes, ces derniers étant uniquement détectés sur des feuilles irradiées ou infectées par *P. viticola*. Toutefois, en LDI à 266 nm, seuls deux signaux correspondant à des stilbènes sont détectables :  $m/z$  228 et  $m/z$  254. Si l'ion  $m/z$  254 peut être attribué au ptérostilbène, le signal LDI-MS de l'ion  $m/z$  228 peut provenir des isomères du resvératrol et du picéide. Le profilage LC-MS a d'ailleurs montré la présence de 5 cinq stilbènes lors de l'analyse d'une feuille infectée. Les conditions d'ionisation ne sont donc pas adaptées à la détection du resvératrol glycosylé (picéide) mais aussi des dimères de resvératrol (les viniférines). La MSI a mis en évidence une colocalisation des sites de biosynthèse du ptérostilbène et du resvératrol, vraisemblablement en réponse à l'agression du pathogène au niveau des stomates, la voie d'entrée du pathogène.

Différentes voies d'études ont été alors explorées pour compléter le panel des métabolites accessibles par imagerie MS.

Le mode négatif a été d'abord testé en MSI tout en conservant un protocole d'échantillonnage simple. Ceci a conduit à la détection et l'observation de flavonoïdes. Leur répartition est apparue très localisée et intense. Ils n'ont été, cependant, détectés que sous la forme de fragments associés aux aglycones correspondant, bien qu'ils soient principalement présents sous forme glycosylée au sein des feuilles de vigne. Ceci est vraisemblablement dû aux conditions dures de désorption/ionisation qui provoquent la rupture de la liaison glycosidique de l'hétéroside. Suivant le type d'échantillon étudié, une nette différence a été observée concernant la détection de ces composés. En effet, les intensités relatives aux flavonoïdes étaient très faibles pour des feuilles élevées en serre en comparaison des feuilles prélevées en plein champ et donc soumises aux rayonnements UV de leur environnement naturel.

Toujours dans le but de suivre la répartition d'autres composés, l'utilisation de matrice a été envisagée. Afin de déterminer les matrices les plus adaptées, des études préliminaires ont été conduites sur des étalons puis des extraits méthanoliques de feuilles de vigne préalablement analysés en ESI-FTICRMS. Les molécules ciblées étaient principalement les stilbènes et les flavonoïdes, les deux familles de composés les plus présents chez la vigne. Ces études ont permis de dégager deux matrices : l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque pour le mode positif et la 9-aminoacridine pour le mode négatif. Si les essais de MALDI-MSI n'ont pas conduit à des résultats en mode négatif avec la 9-AA, la DHB a permis de suivre en mode positif sur une feuille de vigne irradiée la répartition des viniférines, jusqu'alors non détectées en LDI-TOFMS. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque la toxicité des viniférines à l'égard du mildiou est bien plus importante que celle du resvératrol. Il est apparu, en outre, que le resvératrol, le ptérostilbène et les viniférines étaient localisés aux mêmes endroits. L'imagerie MALDI sur feuille de vigne doit être poursuivie, notamment en mode négatif avec la 9-AA, en améliorant le protocole de dépôt de la matrice (par vaporisation par exemple).

Enfin, des tests d'ablations ont été menés avec un laser excimer afin d'étudier les feuilles de vigne à d'autres niveaux de profondeur. Même si la profondeur d'ablation n'a pu être mesurée, ces essais ont permis de réaliser des cartographies successives de stilbènes en LDI-TOFMS sur une même feuille irradiée aux UV-C. Ce protocole de préparation des feuilles pourrait désormais être repris pour des expériences MALDI. Une autre solution reste à envisager pour la préparation des échantillons. Elle consisterait en l'utilisation de la microdissection, une technique qui permettrait d'avoir un contrôle précis des couches retirées. En contrepartie, le protocole de préparation deviendrait plus lourd.

Ces pistes exploratoires ont montré que la technique d'imagerie de végétaux par spectrométrie de masse possède un fort potentiel d'évolution. Suivant les conditions de préparation de l'échantillon mais aussi des paramètres laser, nous avons vu qu'un plus grand nombre de molécules pouvaient être imagées. De plus, l'accès à la haute résolution ainsi qu'à la MS/MS serait un atout non négligeable pour confirmer les répartitions de métabolites sur végétaux.

Pour conclure le volet imagerie MS, une association de trois techniques d'analyse des stilbènes a été mise en place dans le but d'acquérir une localisation précise, détaillée et quantifiée des stilbènes au sein des feuilles de vigne. La microscopie de fluorescence (localisation avec des clichés hautement résolus), l'imagerie par spectrométrie de masse (données structurales et de localisation) et l'HPLC (données quantitatives et qualitatives) ont apporté des informations complémentaires sur les stilbènes. Un protocole d'échantillonnage robuste a dû être mis en place au préalable. L'ordre d'analyse des échantillons et leur conditionnement par lyophilisation pour leur conservation ont nécessité plusieurs expériences de mise au point. Le premier volet de cette approche corrélative multi disciplinaire a été réalisé sur des échantillons irradiés aux UV-C afin de valider la faisabilité de cette approche, autant en termes de logistiques que de résultats. Une bonne corrélation est apparue entre les 3 techniques. Les localisations observées en microscopie de fluorescence étaient en accord avec celles constatées en MSI. Les dosages ont confirmés les proportions attendues en stilbènes pour ces échantillons. Le ptérostilbène est apparu principalement localisé sur les nervures de la feuille alors que le resvératrol était plutôt localisé dans le limbe. En revanche, sur les très grosses nervures aucun signal n'était enregistré en MSI contrairement à la microscopie de fluorescence où les signaux de fluorescence étaient intenses.

Une fois cette approche validée avec des feuilles irradiées, l'étude d'échantillons infectés par le mildiou a pu être envisagée. Une corrélation entre les deux techniques d'imagerie a été observée, toutefois, de façon moins évidente que précédemment. Pour certains échantillons, on se rapprochait des limites de détection LDI-TOFMS. La fluorescence des stilbènes était également nettement plus faible en comparaison des échantillons irradiés. Les valeurs des dosages ont confirmé des teneurs en moyenne 5 fois inférieures à celles enregistrées pour les feuilles irradiées. En perspective, cette expérience prometteuse pourrait être reconduite avec d'autres génotypes producteurs de plus grandes quantités de stilbènes. Puis, par la suite, avec d'autres préparations d'échantillons telles que l'utilisation de matrices pour la MSI, donnant ainsi accès à la localisation des viniférines. L'utilisation d'un laser haute cadence permettrait, en outre, d'augmenter le nombre d'acquisitions ou d'analyser des zones plus importantes en MSI dans un même laps de temps.

Pour aller plus loin dans l'étude de l'interaction hôte-pathogène, l'analyse de spores germées de mildiou pourra constituer une piste pertinente. L'analyse d'extraits méthanoliques de ces spores en spectrométrie de masse en tandem ESI-FTICMRS pourra apporter de précieuses informations. Ces expériences donneront accès aux fragments de composés potentiellement intéressants, tout en bénéficiant de la très haute précision en masse. Elles demanderont, toutefois, du temps pour être optimisées et donc un volume d'échantillon important. Ces analyses pourront être également complétées par des expériences LC-MS. En effet, le profiling réalisé à la fin du **Chapitre III** a laissé un nombre important de métabolites non identifiés, ces derniers pouvant provenir du mildiou lui-même. Ainsi, par comparaison entre le profil d'une feuille infectée et celui du mildiou, il sera possible de déterminer quels métabolites sont issus des spores. Ces analyses en FTICMRS et LC-MS pourront être effectuées à différents stades du développement du pathogène. Le métabolisme du mildiou est, en effet, encore mal connu et peut être susceptible d'évoluer rapidement.



## Annexes

---



## Annexe I

- Analyse LC-ITMS en mode négatif d'un extrait de feuille de vigne inoculé -

Tableau-1 : liste des ions détectés et isolés lors de l'analyse LC-ITMS en mode négatif d'un extrait de feuille de vigne inoculé. Colonne « métabolites potentiels » : les métabolites identifiés apparaissent en vert (notamment avec les fragments et les temps de rétention) et en orange les possibles métabolites.

<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	MS/MS	Métabolites potentiels
133	5,46	115 ; 87	
149	1,02 ; 12,3	131 ; 103 ; 87 ; 59	acide tartrique
153	9,08	138 ; 135	
157	26,58	158 ; 139	
163	1,31 ; 4,92	145 ; 131 ; 119 ; 103 ; 87 ; 59	acide coumarique
176	9,55	155 ; 135	
179	1,16 ; 15,05	161 ; 135	acide cafféique
185	33,73	167 ; 158(157) ; 141	acide carboxylique
191	28,42	173	
197	22,05	179 ; 182 ; 153	acide syringique
199	36,79	181	
205	5,48	187 ; 173 ; 143	
213	38,79 ; 39,79		
223	22,53	207	
227	42,70	185	resvératrol
233	34,22		
243	18,31	225 ; 181	picéatannol
253	43,83		
255	47,90	235	ptérostilbène
264	18,20	246 ; 218	
272	26,06	240 ; 208	
277	41,83	259 ; 233 ; 179	
281	48,40		
283	52,59		
293	5,32 ; 23,42 ; 34,05	236 ; 221 ; 131 ; 97	
295	16,08	163 ; 149	acide coutarique
297	34,93	279 ; 193	
301	41,13	283 ; 257	acide ellagique
311	15,97	179 ; 149	acide caftarique
315	5,81	297 ; 271 ; 237 ; 225 ; 207 ; 195	acide carboxylique
323	6,29 ; 25,8 ; 47,86	305 ; 279 ; 249 ; 233 ; 204 ; 179 ; 161 ; 143 ; 131 ; 119 ; 113 ; 101	
325	12,75	183 ; 193	ferruloyltartaric
341	34,88	179 ; 161 ; 135	cafféoyl-4-Glc
351	35,81	259	

353	9,57	191 ; 179 ; 135	acide chlorogénique
366	10,34	246 ; 204 ; 186 ; 142	
389	13,03 ; 13,66	227	picéïdes
439	1,25	421 ; 341 ; 179	dissaccharide+H2PO4-
453	17,02 ; 18,47 ; 21,58 ; 22,71	435 ; 411 ; 359 ; 347 ; 333	viniférines
477	15,84	301	quercétine-O-glururonide
489	21,58 ; 22,65	453	
527	28,89 ; 39,35	421 ; 405 ; 270 ; 255 ; 240	
547	56,01 ; 58,66	493 ; 313 ; 287 ; 259 ; 234	
549	29,86 ; 30,41	531 ; 513 ; 481 ; 277 ; 253 ; 241	
556	31,95	299 ; 255 ; 225	
559	29,86 ; 30,41	513 ; 277 ; 253	
591	46,45	559 ; 515	
595	28,20	415 ; 315 ; 279 ; 241 ; 223	
605	51,70	519	
607	43,86	575 ; 531 ; 487	
615	23,66	573 ; 521 ; 505 ; 453 ; 401 ; 213	
621	49,40	562 ; 535 ; 491	
631	10,84	613	ellagitannin
663	12,06	631	
667	35,14 ; 37,54	635	
675	26,84 ; 27,52	415 ; 397	
678	24,18	583 ; 571 ; 501 ; 465 ; 437	
683	34,32 ; 34,61 ; 50,78 ; 51,74	423 ; 405 ; 277	
707	23,90 ; 24,66 ; 26,02	613 ; 519	
711	26,86 ; 27,50	679 ; 415 ; 397	
712	50,98 ; 54,04	550 ; 532 ; 452 ; 227 ; 255	acyle-lipide
713	24,18 ; 51,00 ; 53,94	677	acyle-lipide
719	26,84 ; 27,52	673	
734	48,59	474 ; 277	acyle-lipide
743	46,93	507	acyle-lipide
748	51,00	715	acyle-lipide
779	12,06	751	
782	47,90	498 ; 301 ; 257	acyle-lipide
797	12,04	751 ; 725	
799	10,82	781 ; 631	
809	52,73 ; 52,97	779 ; 724 ; 513 ; 277	acyle-lipide
815	12,26 ; 54,77	751 ; 559 ; 537	acyle-lipide
819	52,95	773 ; 513 ; 277	acyle-lipide
829	13,16	811 ; 779 ; 751 ; 735 ; 709 ; 299	
834	46,38	577 ; 553 ; 415 ; 391 ; 297 ; 279 ; 255	acyle-lipide
837	48,09 ; 48,42 ; 52,75	559	acyle-lipide
840	46,42	739 ; 556 ; 455 ; 437 ; 301 ; 257	acyle-lipide
905	19,99	811 ; 717 ; 451 ; 359	
923	23,10	679 ; 453 ; 339 ; 293	

929	58,76	579 ; 564	acyle-lipide
935	48,19	675 ; 657 ; 397 ; 379 ; 277	acyle-lipide
951	40,34 ; 46,42 ; 52,73 ; 55,08	691 ; 673 ; 657 ; 415 ; 397 ; 379 ; 293	acyle-lipide
962	52,97 ; 55,04 ; 57,06	930 ; 898	acyle-lipide
966	12,26	945 ; 815 ; 797 ; 779 ; 751 ; 733	
971	48,04	935 ; 675 ; 657 ; 415 ; 397 ; 379 ; 277	acyle-lipide
981	48,19	935 ; 657	acyle-lipide

## Annexe II

### - Développement de la méthode LC-ITMS pour le dosage des stilbènes -

---

#### 1. Paramètres expérimentaux

##### 1.1. Conditions de séparation en chromatographie liquide

La séparation chromatographique est réalisée sur une chaîne HPLC Dionex Ultimate 3000, équipée d'une colonne Waters Symmetry Shield phase inverse C18 de diamètre interne de 3,5 mm et de dimensions 4,6 mm x 50 mm. La phase mobile est composée d'acétonitrile (ACN, solvant "A") et d'eau (solvant "B"). Un gradient linéaire d'une durée de 10 min de 20 à 90 % d'ACN dans l'eau est programmé pour chaque expérience avec le four de la colonne maintenu à 30 °C, le débit de pompe fixé à 500  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et un volume d'injection de 20  $\mu\text{L}$ . Entre chaque run, du solvant pur est injectée avec une phase mobile composée de 20 % d'ACN et de 80 % d'eau afin de rééquilibrer la colonne.

##### 1.2. Conditions ESI-MS

La chaîne HPLC est couplée à une trappe ionique linéaire de modèle Velos Pro (ThermoScientific) associée à une source d'ionisation à électrospray. Les conditions finales de la source sont les suivantes :

Température de source : 400 °C  
Sheath Gas (a.u.) : 60  
Auxiliary Gas (a.u.) : 20  
Sweep gaz flow (a.u.) : 5  
Potentiel : - 4,60 kV  
Température du capillaire : 380 °C

##### 1.3. Logiciels

Ce système de couplage est piloté par le logiciel *Xcalibur* (Thermo, version 2.2). Ce programme permet de créer des séquences entièrement automatisées. Le logiciel *Chromeleon* (Dionex) peut piloter indépendamment la chaîne HPLC, et le logiciel *LTQ Tune Plus* (Thermo version 2.7.0 1103 SP1) le spectromètre de masse. Les exploitations des chromatogrammes sont réalisées avec le module *Qual Browser* du logiciel *Xcalibur*. Enfin, les données et les régressions linéaires ont été traitées avec *Excel 2013* (Microsoft).

## 2. Matériel chimique et végétal

### 2.1. Matériel chimique

L'acétonitrile, le méthanol et l'eau, tous de grade HPLC, ont été achetés auprès de la société Sigma Chemicals (Saint Louis, MO). Les étalons de *trans*-resvératrol, *trans*-ptérostilbène, *trans*-pinostilbène et de *trans*-picéide ont été acquis chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ils ont été préparés systématiquement dans du méthanol. L'acétate d'ammonium a également été acheté chez Sigma-Aldrich.

### 2.2. Protocole d'extraction

Une feuille de génotype Rpv1 22-8-78 a été irradiée pendant 3 min aux UV-C. L'extraction solide-liquide est réalisée deux jours après ce traitement, selon la procédure décrite dans le **Chapitre III**. Six carrés d'environ 1,5 x 1,5 cm sont prélevés de cette feuille traitée. Un autre est prélevé d'une feuille témoin du même génotype. Les poids frais de ces 7 carrés de feuilles sont compris entre 12 et 25 mg. Après leur pesée, ils sont placés dans des Vial. En partant d'un pourcentage théorique d'humidité des feuilles de 80 %, le volume de solvant est ajusté de manière à ce que le rapport poids sec sur volume de solvant soit maintenu à 7,5 mg·mL<sup>-1</sup>. Ces vials contenant les carrés de feuilles immergés dans le solvant sont placés dans une étuve à 60 °C pendant 45 min sous légère agitation. Après cette opération, les carrés de feuilles sont retirés puis pesés une fois ramenés à sec afin de déterminer le rapport poids sec sur volume de solvant exact pour les 7 échantillons. Avant analyse HPLC, les extraits sont filtrés par centrifugation à l'aide de micro-filtres Amicon pendant 10 min à 12 000 tour·min<sup>-1</sup>. Le **Tableau-2** détaille les données concernant ces extraits méthanoliques.

Tableau-2 : données sur les 7 échantillons : 6 échantillons proviennent de la même feuille Rpv1 22-8-78 irradiée aux UV-C, le 7ème est prélevé d'une autre feuille Rpv1 22-8-78 témoin.

Feuille	Echantillon	Traitement	Poids frais (mg)	Volume de solvant ( $\mu\text{L}$ )	Poids sec (mg)	Rapport P/S ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
A	1	UV 3min	18,40	491	3,74	7,63
A	2	UV 3min	22,20	592	4,62	7,80
A	3	UV 3min	16,96	452	3,46	7,66
A	4	UV 3min	14,46	386	3,34	8,64
A	5	UV 3min	17,66	471	2,89	6,13
A	6	UV 3min	12,26	327	2,66	8,12
B	7	Témoin	19,77	527	3,07	5,83

### 3. Etude des standards par spectrométrie de masse en tandem

Cette partie détaille les expériences de spectrométrie de masse en tandem réalisées sur les 4 standards de stilbènes.

#### 3.1. Fragmentation CID du *trans*-picéide

La **Figure 1** présente le spectre de fragmentation du *trans*-picéide.

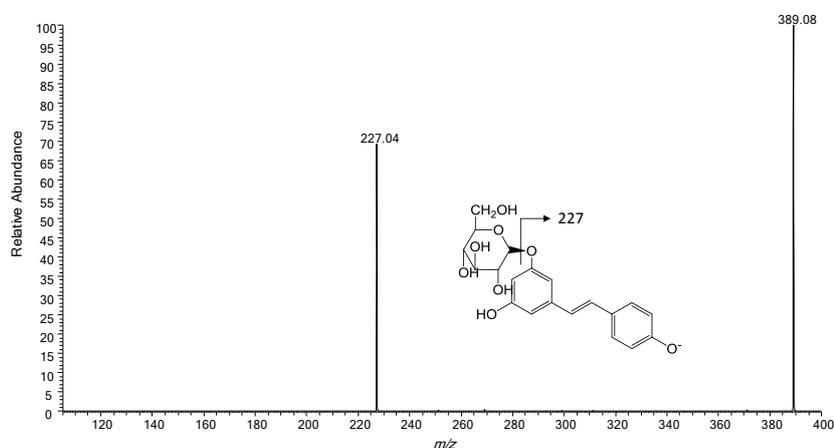
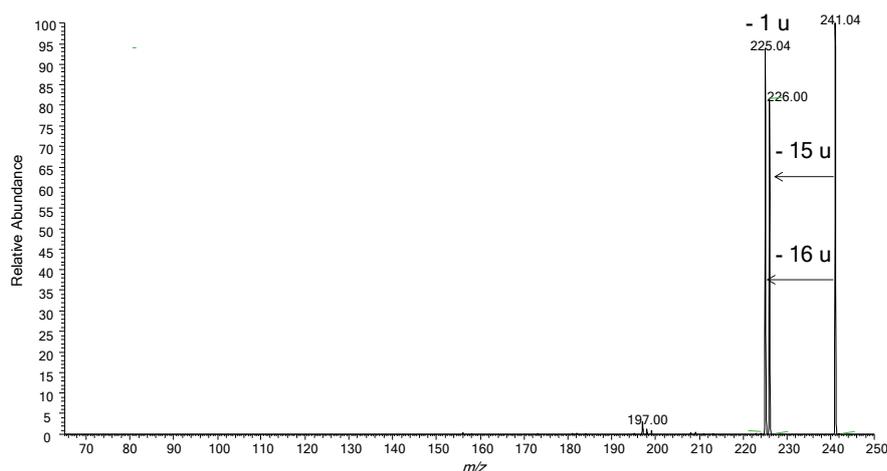


Figure 1 : spectre ESI-ITMS/MS du *trans*-picéide en mode négatif, l'énergie de collision a été fixée à 25 V.

La fragmentation de ce composé est simple. L'ion précurseur  $m/z$  389 se fragmente pour donner un ion produit unique au rapport  $m/z$  227. La rupture se fait comme attendu au niveau de la liaison éther entre l'aglycone et son sucre, la liaison la plus faible de la molécule. C'est pour cette même raison que ce composé nécessite une énergie d'activation relativement faible. La fragmentation du picéide conduit donc à la détection du resvératrol déprotonée.

### 3.2. Fragmentation du pinostilbène

Le spectre de fragmentation du pinostilbène conduit à la détection de deux fragments,  $m/z$  226 et 225, respectivement associés à une perte de 15 et 16 u (**Figure 2**). L'ion précurseur correspond à la molécule de pinostilbène déprotonée. Le premier fragment au rapport  $m/z$  226 suggère une perte du groupement méthyle radicalaire suite à un mécanisme de rupture homolytique. Le second pic à  $m/z$  225 pourrait être associé à une perte du groupe  $\text{CH}_4$ .



**Figure 2** : spectre ESI-ITMS/MS du *trans*-pinostilbène en mode négatif, l'énergie de collision a été fixée à 31 V.

Une autre possibilité pour la formation du pic  $m/z$  225 serait associée à la perte d'un hydrogène radicalaire de l'ion fragment  $m/z$  226. Cependant, ce type de perte n'est que très peu décrit dans la littérature. En revanche, ce mécanisme est détaillé dans l'étude de Mazotti *et al.* lors de la fragmentation du ptérostilbène<sup>16</sup>, un composé présentant une structure très proche de celle du pinostilbène. La **Figure 3** décrit les deux voies de fragmentation possibles pour le pinostilbène.

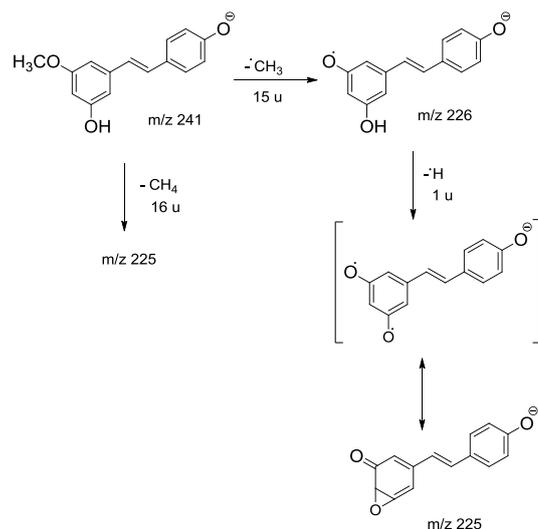


Figure 3 : schéma de fragmentation du pinostilbène présentant les deux voies possibles.

### 3.3. Fragmentation CID du ptérostilbène

La fragmentation du ptérostilbène conduit à un seul fragment comme illustré en **Figure 4**.

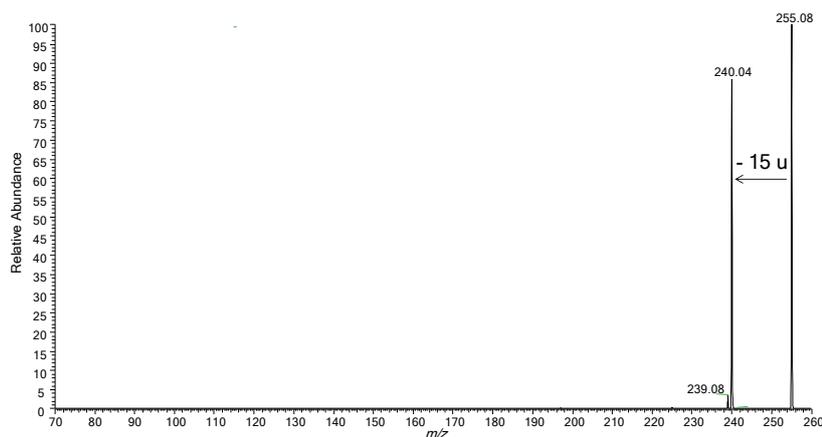


Figure 4 : spectre ESI-ITMS/MS du *trans*-ptérostilbène en mode négatif, l'énergie de collision a été définie à 30 V.

L'ion  $m/z$  240 est le résultat d'une perte de 15 u par rapport à l'ion précurseur, soit une perte d'un groupement méthyle radicalaire, en accord avec l'étude de Mazzotti *et al.*<sup>1</sup>. Ce schéma de fragmentation est similaire à celui observé pour le pinostilbène.

### 3.4. Fragmentation CID du resvératrol

La fragmentation du resvératrol est riche (**Figure 5**). Cette expérience de spectrométrie de masse en tandem met en jeu différents mécanismes de fragmentation. La déprotonation peut avoir lieu sur un groupement hydroxyle du phénol ou de la résorcine : la valeur de leur pKa est

très proches : respectivement 9,89 et 9,81. Ainsi, certains fragments peuvent être expliqués par la déprotonation au niveau du phénol (**Figure 6.A**) et d'autres au niveau de la résorcine (**Figure 6.B**). Ces deux cas seront donc détaillés séparément.

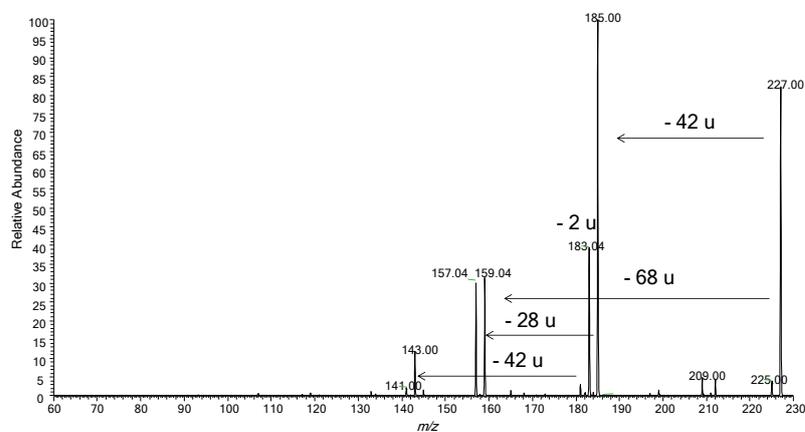
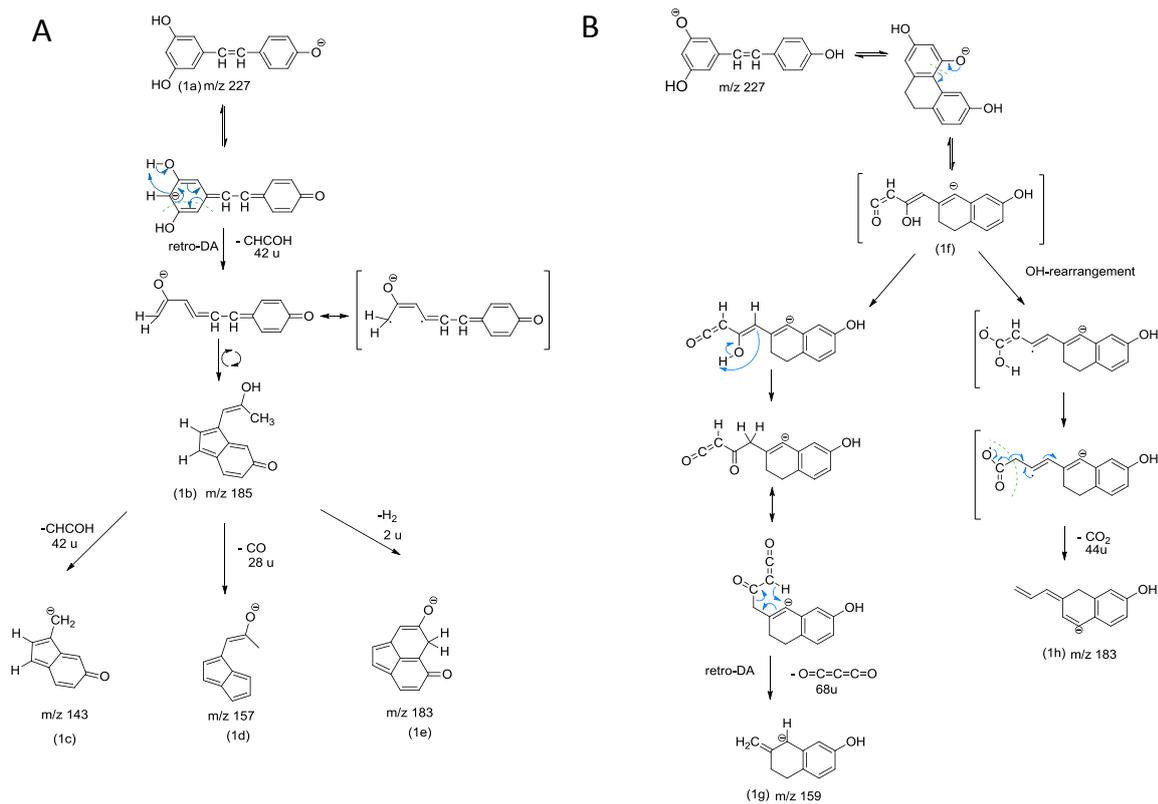


Figure 5 : spectre ESI-ITMS/MS du *trans*-resvératrol en mode négatif, l'énergie de collision a été fixée à 32 V.

Ces schémas de fragmentation sont basés sur ceux décrit par Stella *et al.*<sup>2</sup>. Dans leurs travaux, ils décrivent le mécanisme dissociation du resvératrol par CID. Les structures qu'ils proposent ont été confirmées à l'aide du marquage aux isotopes stables, en l'occurrence au deutérium.



**Figure 6 :** schéma de fragmentation du resvératrol avec (A) la déprotonation initiale ayant lieu sur le phénol et (B) la déprotonation initiale ayant lieu sur la résorcine, d'après Stella *et al.*<sup>2</sup>.

L'ion fragment  $m/z$  185 est associé à une perte de 42 u. Dans ce cas, une perte de CHCOH est supposée à partir de la structure résonante du resvératrol avec un réarrangement d'hydrogène suivi par une réaction de retro-Diels-Alder. Cette réaction conduit à un autre réarrangement (probablement via un intermédiaire di-radicalaire), duquel résulte l'ion fragment (1b),  $m/z$  185.

Le fragment suivant,  $m/z$  183, pourrait provenir d'une perte du groupement H<sub>2</sub> et une cyclisation de l'ion fragment  $m/z$  185 (structure (1e)). Une autre possibilité est envisageable pour la formation de ce fragment, en considérant cette fois-ci une déprotonation initiale au niveau de la résorcine, fragment (1h) (**Figure 6.B**). L'ion  $m/z$  157 correspondrait à une perte de 28 u du fragment (1b) et pourrait être expliqué par une perte de CO, donnant lieu à la formation de la structure (1d). Le dernier pic intense, l'ion fragment  $m/z$  143 correspond à une perte de 42 u de l'ion  $m/z$  185. De toute évidence, cette perte est associée au départ d'un groupe CHCOH pour conduire à l'ion (1c).

Les ions aux rapports  $m/z$  143, 157 et 183 proviennent de l'ion fragment (1b)  $m/z$  185 suite à différents réarrangements. La déprotonation de la résorcine peut conduire à une réaction de cyclisation suivie par une ouverture de cycle donnant lieu à la structure (1f). D'autre part, la formation du fragment  $m/z$  159 pourrait être expliquée par un décalage d'hydrogène suivi d'une

réaction de retro-Dies-Alder, ce qui conduit à une perte de  $C_3O_2$ , soit 68 u, donnant lieu à la détection de l'ion à la structure (1f), au lieu de la formation de l'ion (1b)  $m/z$  185). Un réarrangement radicalaire d'hydroxyle forme un bi-radical anion suivi d'un réarrangement avec un proton permettrait la perte du neutre  $CO_2$ , soit une perte de 42 u. Ceci mène à la formation du pic  $m/z$  183, structure (1h).

Ces études de fragmentation ont permis de sélectionner les transitions à suivre pour le mode SRM. Les fragments suivis sont respectivement les ions  $m/z$  227, 159, 225, et 240 pour le picéide, le resvératrol, le picéide et le ptérostilbène. Le suivi du fragment le plus intense du resvératrol (l'ion produit  $m/z$  185) n'a pas été possible à cause vraisemblablement d'une perturbation dans le milieu matricielle.

## 4. Méthode des ajouts dosés

### 4.1. Préparation des échantillons pour les ajouts dosés

Afin d'éviter la saturation du signal, les six échantillons irradiés sont dilués 1 000 fois et l'échantillon témoin, 20 fois dans du méthanol. Une solution étalon composée de *trans*-picéide et resvératrol à  $10^{-5}$  M et de ptérostilbène à  $10^{-6}$  M est utilisée pour les ajouts dosés. La concentration en resvératrol est plus élevée que celle du ptérostilbène pour compenser l'intensité plus faible de la transition 227>159, ceci afin de conserver une bonne sensibilité pour la quantification. Les échantillons irradiés sont analysés après l'échantillon témoin, toujours pour éviter les problèmes de contamination.

Pour chaque échantillon, 5 dosages sont effectués : le premier, l'extrait seul ; puis, respectivement, le deuxième avec 5  $\mu$ L ; le troisième avec 10  $\mu$ L ; le quatrième avec 15 ; et enfin, le quatrième avec 20  $\mu$ L de la solution étalon.

### 4.2. Détermination des concentrations

La méthode des ajouts dosés permet de déterminer la concentration de composés par l'ajout d'une solution d'étalons directement dans l'échantillon. La réponse de l'échantillon seul est mesurée au préalable. Puis, on ajoute une quantité connue des étalons à doser (en l'occurrence, le *trans*-picéide, le resvératrol et le ptérostilbène) pour ensuite en déterminer la réponse. Cette opération doit être répétée au minimum 3 à 4 fois en doublant la quantité ajoutée de manière itérative, comme pour la réalisation d'une courbe d'étalonnage normale. Un graphique est ensuite tracé avec le signal en ordonnée (aires des pics relevées) et les

concentrations de l'ajout en abscisse. Une régression linéaire donne une réponse du type (**Équation 2**) :

**Équation 2**

$$\text{Signal} = a \times C_{\text{ajout}} + b$$

Si le signal est égal à 0, cela signifie que la concentration de l'analyte est nulle. En outre :

$$C_{\text{ajout}} = C - C_0$$

Et lorsque le signal est nul :  $C_{\text{ajout}} = \frac{-b}{a}$

De plus si le signal est nul,  $C = 0$ , et en remplaçant  $C_{\text{ajout}}$  l'équation devient :  $C_0 = \frac{b}{a}$

#### 4.3. Calcul de la déviation standard sur les concentrations déterminées

Pour la méthode des ajouts dosés, le calcul de la déviation standard est l'une des possibilités envisageables<sup>3</sup>. Pour calculer l'intervalle de confiance, un seul dosage par échantillon est suffisant. L'**Équation 3** détaille la formule employée pour le calcul de l'erreur sur la détermination de la concentration des sept échantillons.

**Équation 3**

$$S_{x_E} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Avec :

$S_{x_E}$ , la déviation standard ;

$n$ , le nombre de point pris en compte pour la régression linéaire ;

$S_{y/x}$ , l'écart-type résiduel ;

$\bar{y}$ , la moyenne des valeurs des titres ;

$b$ , le coefficient directeur de la droite ;

$\sum_i (x_i - \bar{x})^2$ , somme des  $x_i$  moins la moyenne, au carré

## 5. Littérature

1. Mazzotti, F. *et al.* The assay of pterostilbene in spiked matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope dilution method. *J. Mass Spectrom.* **45**, 358–363 (2010).
2. Stella, L. *et al.* Collisionally induced fragmentation of [M–H]<sup>–</sup> species of resveratrol and piceatannol investigated by deuterium labelling and accurate mass measurements. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3867–3872 (2008).
3. Millier, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry.* (Prentice Hall, 2000).



## Annexe III

- Evaluation des différents types de montage pour la lyophilisation des échantillons -

Traitement pré-lyophilisation	Génotype	Type de montage	Type de fermeture	Etat échantillon	Planéité échantillon	Extraction échantillon	Total	Remarques	
Azote liquide	Muscat Ottonel	Scotch	2 pinces	0	2	0	2		
			1 pince	1	2	0	3		
			scotch	2	2	1	5		
		Scotch chambre	2 pinces	2	2	1	5		
			1 pince	2	1	2	5		
			scotch	1	0	2	3		
		Filtre millipore	2 pinces	0	2	0	2		
			1 pince	0	2	1	3		
			scotch	0	1	1	2		peluchage du filtre
	22 8 78	Scotch	2 pinces	1	2	0	3		
			1 pince	1	2	0	3		
			scotch	1	1	2	4		
		Scotch chambre	2 pinces	2	2	1	5		
			1 pince	2	2	2	6		
			scotch	2	0	2	4		bulles d'air importantes
		Filtre millipore	2 pinces	0	2	1	3		
			1 pince	0	2	1	3		
			scotch	2	2	2	6		peluchage du filtre
	7001H	Scotch	2 pinces	1	2	1	4		
			1 pince	0	2	0	2		
			scotch	2	0	2	4		
		Scotch chambre	2 pinces	2	2	0	4		
			1 pince	?	?	?	0		lame ouverte
			scotch	2	2	2	6		
Filtre millipore		2 pinces	2	2	0	4			
		1 pince	2	2	2	6			
		scotch	2	2	2	6	peluchage du filtre		

Traitement pré-lyophilisation	Génotype	Type de montage	Type de fermeture	Etat échantillon	Planéité échantillon	Extraction échantillon	Total		
Glace	Muscat Ottonel	Scotch	2 pinces	0	2	0	2		
			1 pince	1	2	1	4		
			scotch	2	2	1	5		
		Scotch chambre	2 pinces	2	1	2	5		
			1 pince	2	2	1	5		
			scotch	2	0	2	4		
		Filtre millipore	2 pinces	2	2	1	5		peluchage du filtre
			1 pince	2	2	2	6		peluchage du filtre
			scotch	2	2	1	5		peluchage du filtre
	22 8 78	Scotch	2 pinces	2	2	0	4		
			1 pince	2	2	0	4		
			scotch	1	2	0	3		
		Scotch chambre	2 pinces	2	2	0	4		
			1 pince	2	2	1	5		
			scotch	2	2	2	6		
		Filtre millipore	2 pinces	2	2	1	5		peluchage du filtre
			1 pince	2	1	2	5		peluchage du filtre
			scotch	2	2	2	6		
	7001H	Scotch	2 pinces	2	2	1	5		
			1 pince	2	2	2	6		
			scotch	2	2	2	6		
		Scotch chambre	2 pinces	2	1	2	5		
			1 pince	2	2	2	6		
			scotch	2	2	2	6		
		Filtre millipore	2 pinces	2	2	2	6		peluchage du filtre
			1 pince	2	2	2	6		
			scotch	2	2	2	6		peluchage du filtre

# Articles et communications scientifiques

## Articles

Becker, L.; Poutaraud, A.; Hamm, G.; Muller, J.-F.; Merdinoglu, D.; Carré, V.; Chaimbault, P.. Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray – Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **795**, 44–51 (2013).

Becker, L.; Carré, V.; Poutaraud, A.; Merdinoglu, D.; Chaimbault, P.. MALDI Mass Spectrometry Imaging for the Simultaneous Location of Resveratrol, Pterostilbene and Viniferins on Grapevine Leaves. *Molecules* **19**, 10587-10600 (2014).

## Communications orales

Becker, L.; Poutaraud, A.; Carré, V.; Chaimbault, P.; Identification et suivi *in situ* de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées par leur niveau de résistance au mildiou. **Avril 2012**. *XVII<sup>èmes</sup> Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse*

Becker, L.; Poutaraud, A.; Carré, V.; Chaimbault, P.; Identification et suivi *in situ* de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne face au mildiou. **Juillet 2012**. *Physique Atomique et Moléculaire Optique (PAMO 2012)*

Becker, L.; Poutaraud, A.; Carré, V.; Chaimbault, P.; Développements analytiques pour l'identification et le suivi de composés phénoliques dans la défense des feuilles de vigne caractérisées par leur niveau de résistance au mildiou. **Février 2013**. *11<sup>ème</sup> journée technique du CIVB*

Becker, L.; Poutaraud, A.; Carré, V.; Chaimbault, P.; Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using electrospray ionization – Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and imaging mass spectrometry. **Juillet 2013**. *In Vino Analytica Scientia Symposium 2013*

# Résumé

Le mildiou de la vigne, causé par le pathogène *Plasmopara viticola*, est une maladie cryptogamique pouvant causer de sérieux dégâts sur les récoltes. Pour éviter ces pertes, il est nécessaire de recourir à des produits phytosanitaires. Outre leur coût financier, les questions sur la santé des viticulteurs et des populations vivant à proximité des vignobles, ainsi que la protection de l'environnement ne peuvent être ignorées. Cependant, toutes les variétés de vigne ne présentent pas la même sensibilité au pathogène. En effet, bien qu'elles soient moins appréciées pour leurs qualités organoleptiques, les variétés américaines sont résistantes à cette maladie. Les combiner par croisement variétal avec des espèces européennes peut constituer une alternative viable aux traitements antifongiques. Cependant, pour piloter l'effacement ces problèmes de sélection variétal, il est nécessaire de mieux appréhender la relation « hôte-pathogène ». C'est dans ce but que l'analyse par spectrométrie de masse a été employée sous différents aspects.

Le premier volet de cette étude a concerné l'étude métabolique de feuilles de vigne témoins et infectées par le mildiou par spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier couplée à l'électrospray (ESI-FTICRMS). Ces feuilles provenaient d'une population d'hybrides issus de croisements variétaux entre *Muscadinia rotundifolia* (résistant) et *Vitis vinifera* (sensible). Plusieurs molécules, regroupées en quatre familles de composés ont pu être identifiées grâce à des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Une analyse en composantes principales (ACP) a permis d'observer une ségrégation entre les échantillons témoins et infectés sans toutefois classer les échantillons suivant leur degré de résistance. Cela démontre que les métabolites sélectionnés pour cette ACP sont impactés par l'infection, sans toutefois être directement liés au phénomène de résistance.

La suite de ces travaux a été consacrée à l'analyse *in situ* de feuilles de vigne en imagerie par spectrométrie de masse (MSI). L'instrumentation impliquée était la spectrométrie de masse à temps de vol couplée à une source de désorption/ionisation laser (LDI-TOFMS). Les répartitions de deux stilbènes, le ptérostilbène et le resvératrol, ont pu être observées sur les feuilles infectées. Ces deux composés sont apparus colocalisés, vraisemblablement au niveau des stomates de la feuille, la voie d'entrée du pathogène. Le mode négatif ainsi que l'utilisation d'une matrice ont permis d'observer en imagerie respectivement les flavonoïdes et les viniférines, ces dernières étant particulièrement toxiques pour le mildiou. Enfin, ces travaux se sont achevés avec la mise en place d'une approche multi disciplinaire, dans le but de préciser plus finement les lieux de biosynthèse des stilbènes suite à l'infection des tissus des feuilles par le pathogène. Ainsi, l'observation des stilbènes en imagerie par spectrométrie de masse (MSI) a été combinée à la microscopie de fluorescence et à des analyses quantitatives en chromatographie liquide haute performance (HPLC). Une corrélation sur la répartition des stilbènes a été mise en évidence entre les deux techniques d'imagerie. Les dosages HPLC ont confirmé ces résultats tout en apportant des informations sur la présence d'autres stilbènes au sein des échantillons.

# Abstract

Downy mildew, caused by the *Plasmopara viticola* pathogen, is a fungal disease which can induce serious harvest damages. To avoid these losses, it is necessary to use phytosanitary treatments. In addition to their financial cost, winegrower's health issues and the environment protection cannot be ignored. However, all grapevine varieties do not present the same sensitivity to the pathogen. Indeed, despite of poor organoleptic qualities, American varieties are resistant to this disease. Combining them with European species by varietal crossing may be a viable alternative to these treatments. However, to lead efficiently these cross breeding programs, it is necessary to know more about the relationship "host-pathogen". In this context, analysis by mass spectrometry has been used under different aspects.

The first part of this work concerned a metabolic study of controlled and infected (by downy mildew) grapevine leaves by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry associated with an electrospray source (ESI-FTICRMS). These leaves came from a population of hybrids stemming from crosses between *Muscadinia rotundifolia* (resistant) and *Vitis vinifera* (sensitive). Several molecules, grouped in four families of compounds, have been identified through fragmentation experiments. A principal component analysis (PCA) performed on the whole population with nineteen marker-ions allowed to observe a segregation between the control samples and the infected ones. However, no sample classification according to their degree of resistance was noticed. This result points out that selected metabolites seems to be affected by the infection without being directly related to the resistance phenomenon.

The second part of this work was devoted to *in situ* analysis of grapevine leaves by mass spectrometry imaging (MSI). The instrumentation involved here was the time of flight mass spectrometry coupled with laser desorption/ionization (LDI-TOFMS). Distributions of two stilbenes, pterostilbene and resveratrol have been observed on infected leaves. These two compounds appeared to be collocated, possibly near stomata, the place of the early infection. The negative ionization mode and the use of a matrix allowed to observe respectively flavonoids and viniferins (particularly toxic to *P. viticola*) by MSI. Finally, a multi-disciplinary approach was established to finish this study. The purpose was to specify more precisely the sites of stilbene biosynthesis following infection of leaf tissues by the pathogen. Thus, observation of stilbenes by MSI was combined with fluorescence microscopy and quantitative analyzes by high-performance liquid chromatography (HPLC). Correlation on the stilbene distributions was noticed with the two imaging techniques. HPLC dosages have confirmed these results while providing information on the presence of other stilbenes in samples.