

De la phytochimie vers l'écologie chimique pour une meilleure connaissance de la biodiversité

MG Dijoux-Franca, G Comte

Centre d'Etude des Substances Naturelles

Université Lyon I



Phytochimie ?

Etude de métabolites secondaires
± 20% de la flore mondiale étudiée

~ 40 000 composés naturels identifiés

Rôle de défense ou de signal

Composés importants pour la survie de l'espèce

Reflet des caractères génétiques → Adaptation à
l'environnement

Diversité structurale des métabolites secondaires

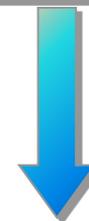
Métabolites azotés

Alcaloïdes	12 000
Amino-acides non constitutifs des protéines	700
Amines	100
Hétérosides cyanogénétiques	60
Glucosinolates	100
Alcamides	150

Métabolites non-azotés

Monoterpènes	2 500	} 15 500
Sesquiterpènes	5 000	
Diterpènes	2 500	
Triterpènes, saponines, stéroïdes	5 000	
Tétraterpènes	500	
Flavonoïdes (tannins compris)	4 500	} > 7 000
Autres phénylpropanoïdes (coumarines, lignanes)	2 000	
Polyacétates (quinones, anthraquinones)	750	
Polyacétylènes, acides gras, cires	1 000	
Carbohydrates	> 200	

Investigation de
~ 15 %
flore mondiale



≥ 37 000

Phytochimie - Modèles d'étude

Les substances naturelles issues du métabolisme secondaire

- SN issues du métabolisme secondaire à l'heure actuelle :
Environ 40000 molécules connues chez les végétaux
Peu d'inventaires chez les bactéries ou les champignons
- SN classées en trois familles principales : terpènes, phénols et alcaloïdes
- Grande diversité de fonctions biologiques
hormones, molécules signal, antibiotiques, ...
- Diversité se manifeste au sein des différentes familles, genres, espèces, individus mais aussi au sein des différentes parties d'un même organisme.
- **Diversité** également **affectée** par l'état **physiologique** et par **l'environnement** de l'organisme (biotique ou abiotique)

Evolution vers l'écologie chimique...

Étude des métabolites secondaires...



*Molécules
impliquées dans
les interactions
biotiques*

Caractérisation de
molécules à activité
biologique impliquées dans
divers processus
d'interactions biotiques

*Métabolomique des
interactions*

Étude de l'influence de
facteurs environnementaux
sur l'expression
métabolique d'un
partenaire dans un
écosystème

Chimiobiodiversité

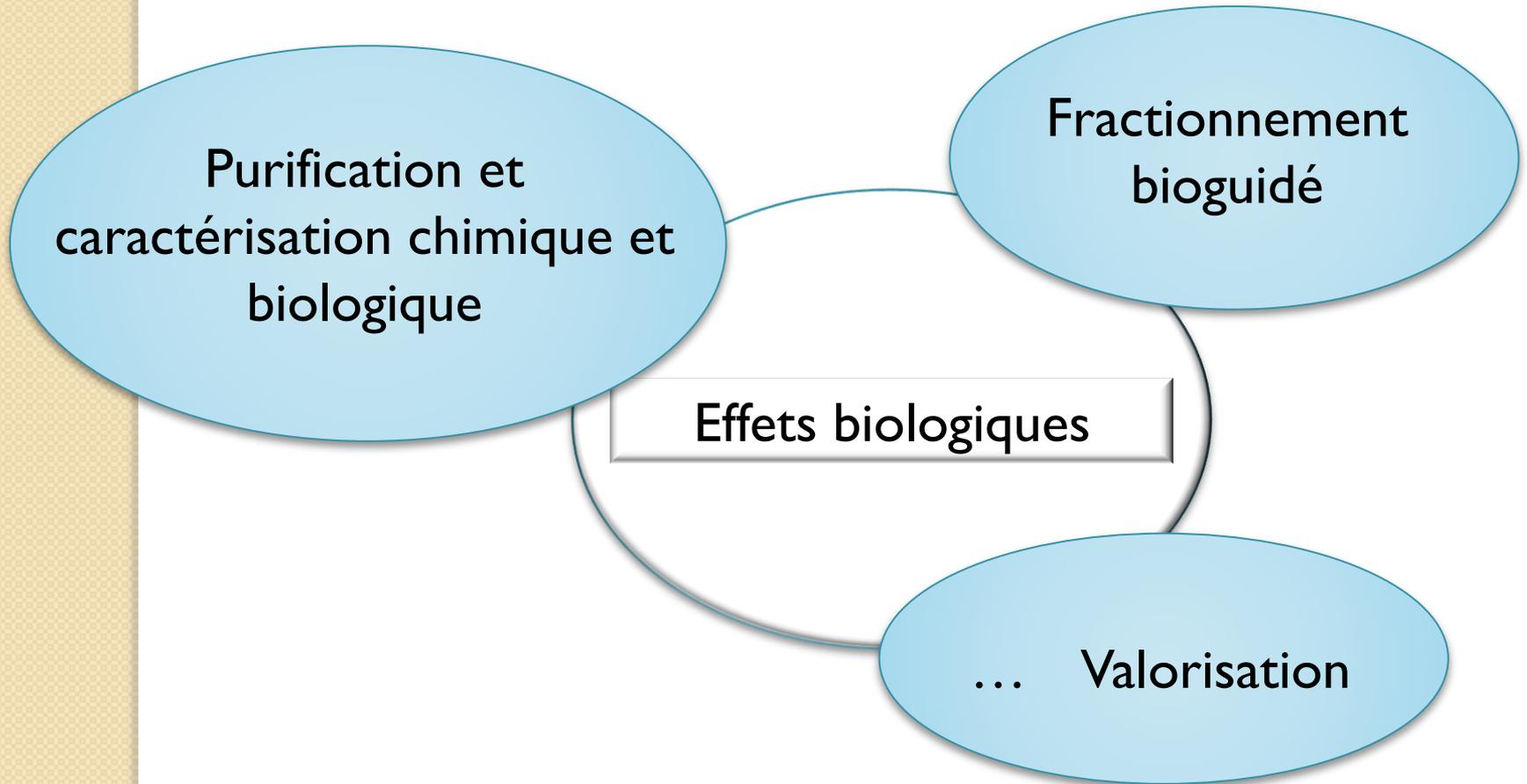
Chimiotaxonomie

Applications potentielles
(valorisations, conservations de
flores endémiques)

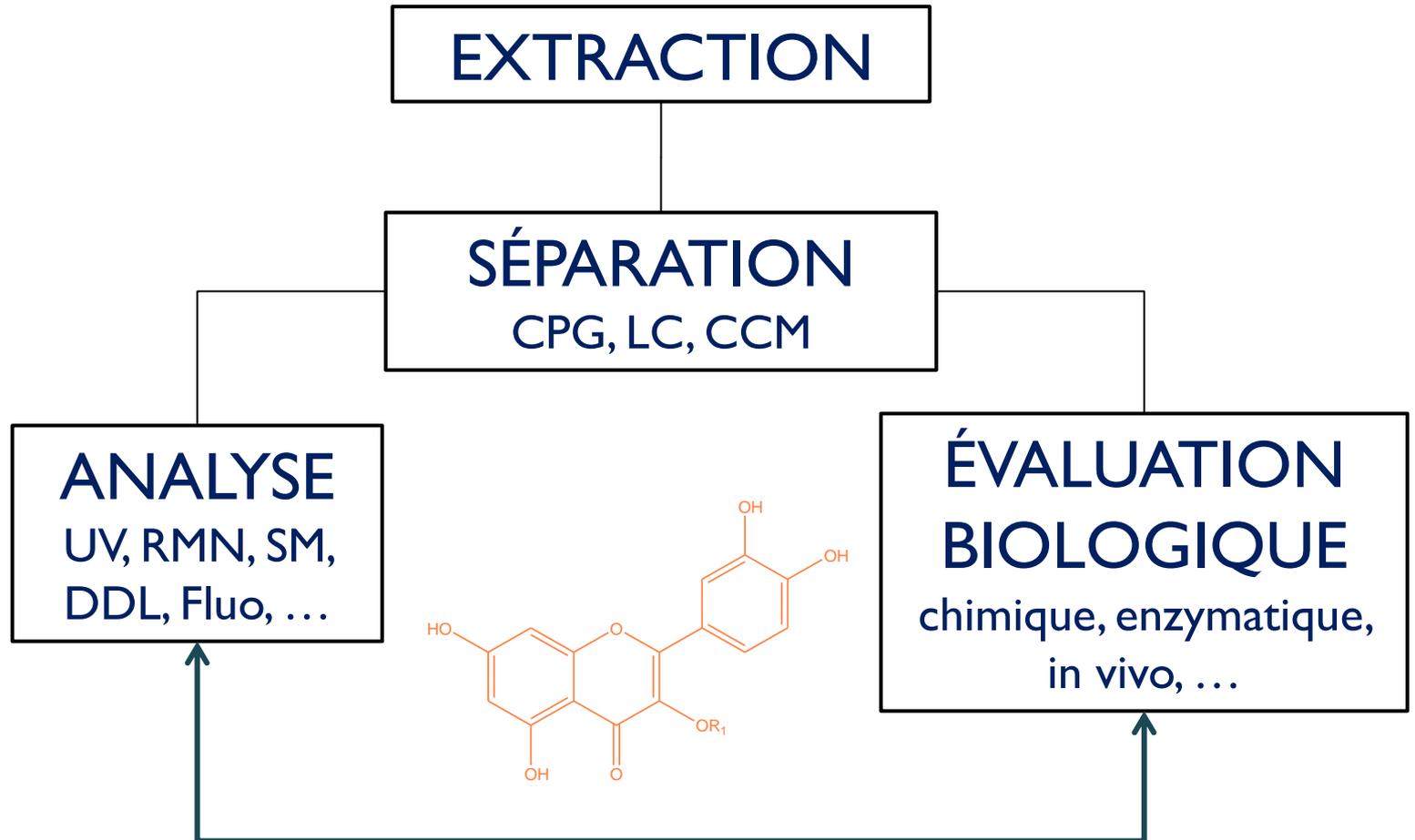
Inhibiteurs des pompes à efflux

Ecologie chimique

Approches



OUTILS ?

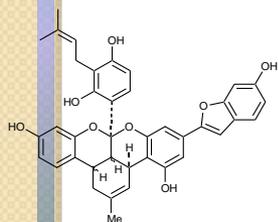


Etude, valorisation et protection de flores endémiques



Inhibiteurs de pompes à efflux

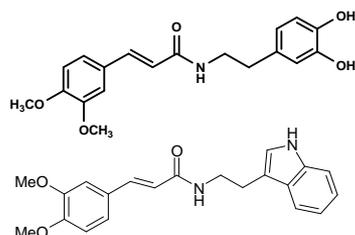
MDR anticancéreux



Morus mezogezia
(Moraceae, Cameroun)

Zéléfack et al. *Planta Med.*
2008, 74 (9), 1029

MDR bactérienne

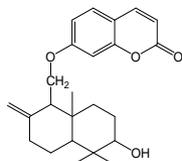
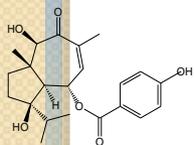


Mirabilis jalapa
(Nyctaginaceae)

Michalet et al. *Biorg. Med Chem Lett.* 2007, 17(6), 1755-8

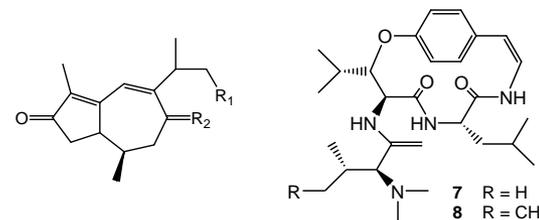
Ferula vesceritensis (Apiaceae, Algérie)

Oughlissi-Dehak et al. *Phytochemistry*, 2008, 69 (9), 1933-1938.



Chimiotaxonomie

Biodiversité végétale



Christiana africana
(Malvaceae, Cameroun)

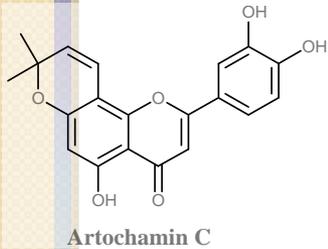
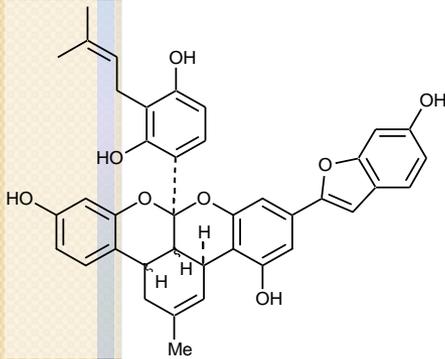
Michalet et al. *Helv Chim Acta*, 2008, 91, 1106-1117

Biodiversité marine

**Collaborations / Univ
Tananarive, GDRI**

Morus mezogezia
(Moraceae, Cameroun,
Écorces)

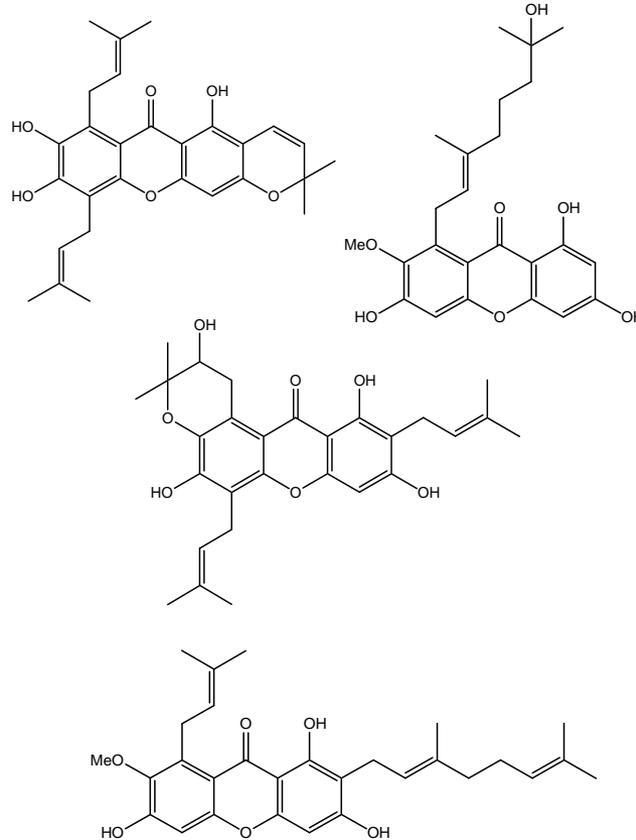
Trterpènes
Flavones



Modulateurs de la MDR
anticancéreux

Pentadesma butyracea
(Clusiaceae, Cameroun,
écorces)

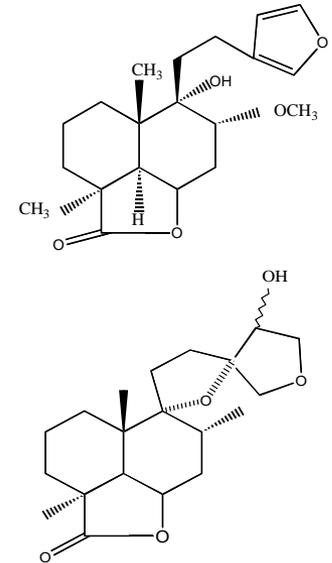
Xanthones prénylées



Antipaludisme, cytotoxicité

Marubium desertii
(Asteraceae, Algérie,
parties aériennes)

Diterpènes



Modulateurs de la MDR
bactérienne

Étude des composés excrétés par *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 et inhibition du protéasome

***Nocardia* sp.**

Ordre des Actinomycétales

Bactéries filamenteuses ramifiées ou pléiomorphes

Environnement

Saprophytes dont certaines espèces pathogènes pour l'Homme, l'animal ou les plantes

1990 : Implication dans la maladie de Parkinson ^[1] / **GUH-2**

Mise en cause des **inhibiteurs du protéasome**

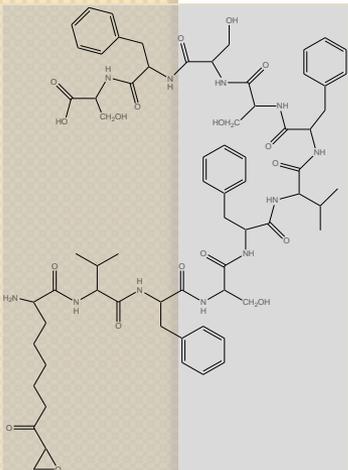
Séquençage du génome réalisé et annotation en cours

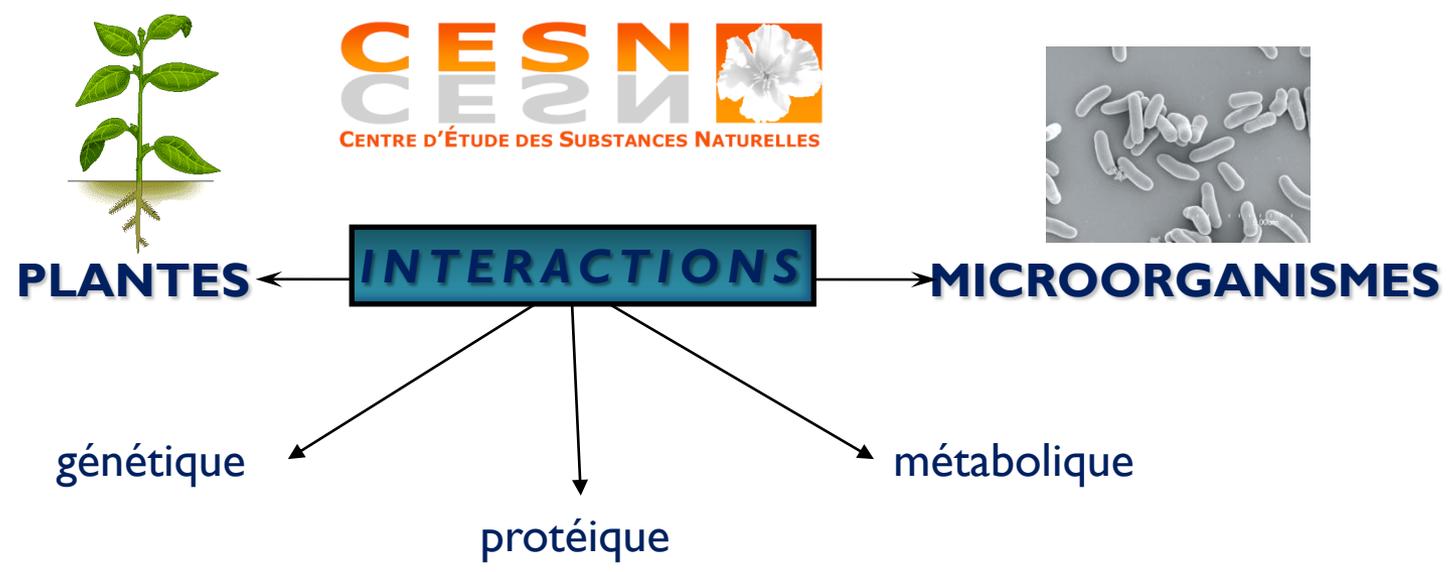
Opéron de 3 gènes

3 peptides synthases

protéine / Epoxycine

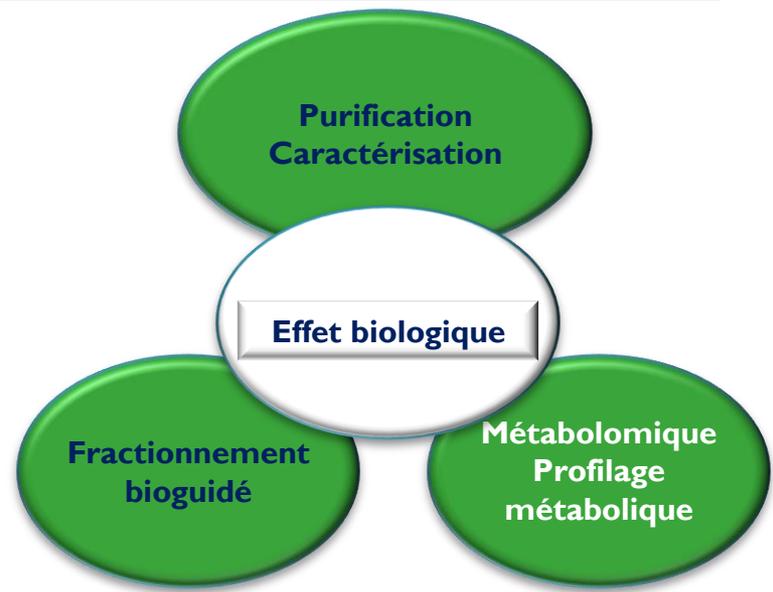
décapetide / Epoxymycine





Étude de l'implication des métabolites secondaires dans les interactions biotiques

- Caractérisation de molécules à activité biologique impliquées dans divers processus d'interactions biotiques
- Étude de l'influence de facteurs environnementaux sur l'expression métabolique d'un partenaire dans un écosystème
- Chimibiobiodiversité et applications potentielles



QU'EST-CE QUE LA MÉTABOLOMIQUE?

Combinaison de 4 bases simples

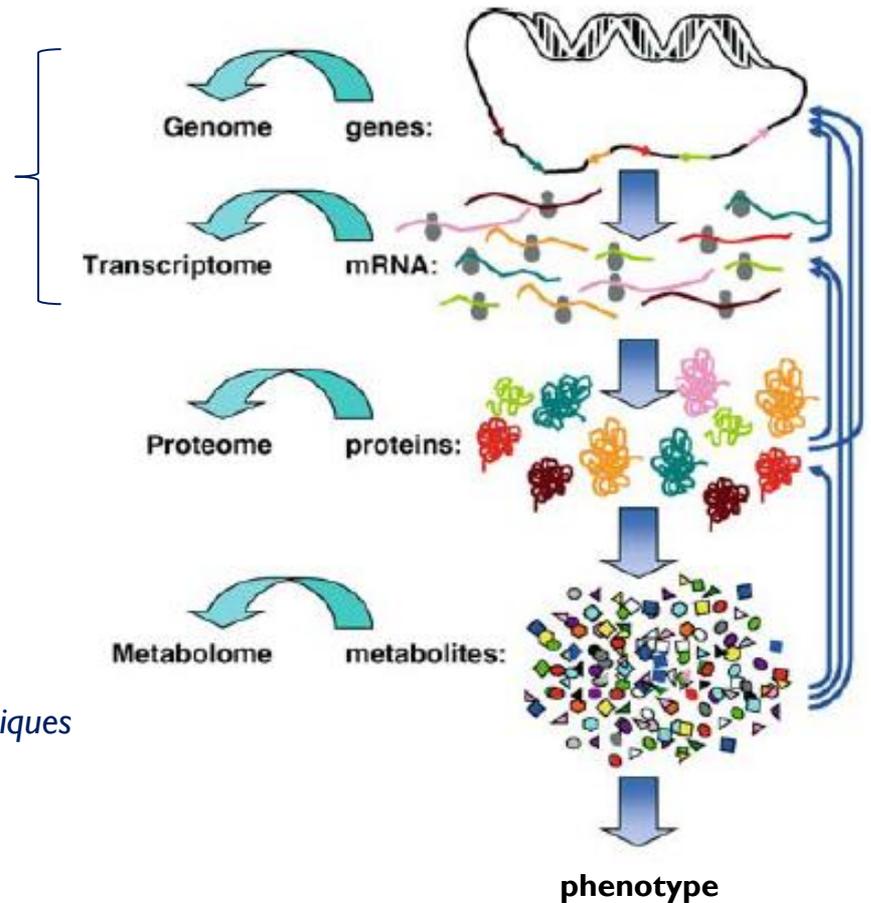
*Similarité physicochimique
Facilité d'extraction et d'analyse*

Combinaison des 20 acides aminés

*Facilité d'extraction
Analyse globale réalisable*

Grand nombre de métabolites (+ 200 000 dans le règne végétal)

*Grande diversité des propriétés physico chimiques
Pas de méthodes d'analyse globale*



Les métabolites sont donc le résultat de l'information génétique (expression des gènes) et définissent le phénotype chimique d'une plante, d'un tissu ou d'une cellule.

La métabolomique permet donc de suivre et d'évaluer la fonction d'un gène, mais de connaître également l'état de l'organisme dans des conditions et à un moment donné.

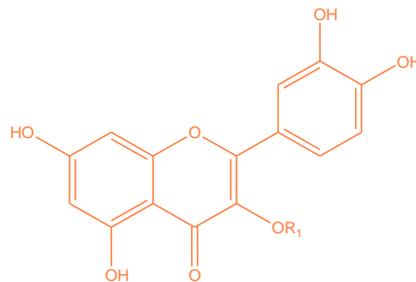
OUTILS ?



EXTRACTION

SÉPARATION
CPG, LC, CCM

ANALYSE
UV, RMN, SM,
DDL, Fluo, ...



**ÉVALUATION
BIOLOGIQUE**
chimique, enzymatique,
in vivo, ...

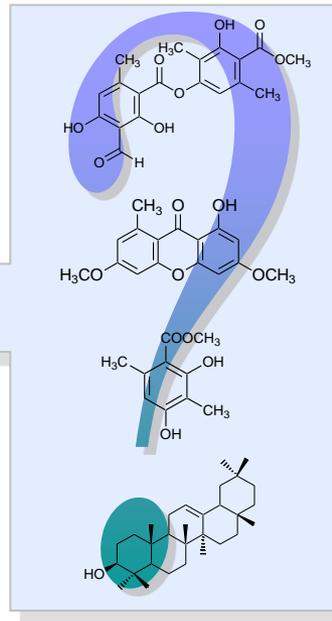
**TRAITEMENT
STATISTIQUE**

Étude de l'influence de facteurs environnementaux sur l'expression métabolique d'un partenaire dans un écosystème



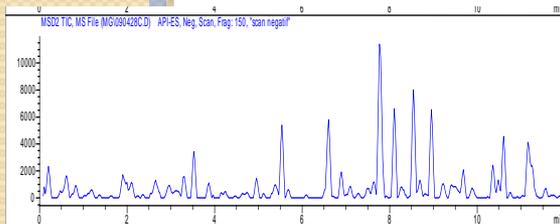
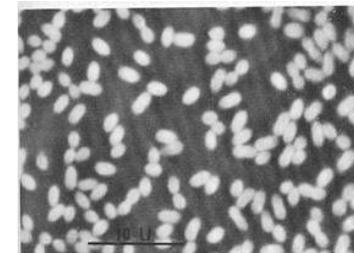
grande diversité des molécules organiques végétales disponibles

Diversité végétale



Diversité des bactéries du sol
Bactéries dénitrifiantes

Forte dépendance aux sources de carbone



Objectif :

Profilage de la diversité métabolique dans le sol / Diversité végétale

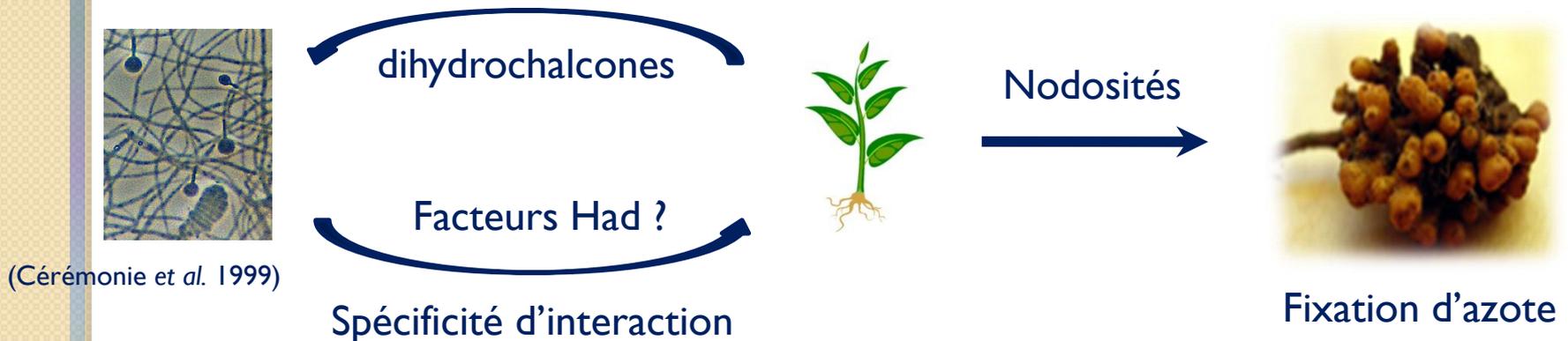
METABOLITES SECONDAIRES ET INTERACTIONS

Symbiose *Rhizobium/Fabaceae* :



Impact sur la plante → modulation de la voie des **phénylpropanoïdes** (Mandal *et al.* 2009)

Symbiose Actinorhizienne :



Impact sur la plante → modulation de la voie des **phénols** (Popovici *et al.* 2010, 2011)

METABOLITES SECONDAIRES ET INTERACTIONS

Symbiose associative (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)

Pas de formation de structures particulières

Métabolites I^R

Chimiotactisme
Signaux ?

Adhésion
Biofilms
Signaux ?



Effet Phytostimulateur



- *Azospirillum* +

Effet Phytoprotecteur



- *Pseudomonas* +

Impact sur la plante → modulation du métabolisme?

AZOSPIRILLUM ET METABOLISME : DEMARCHE

Matériel biologique:

Zea mays L.

PR37Y15 (hybride semi tardif)

DK315 (hybride semi précoce)

Azospirillum lipoferum CRT1 (isolée du maïs en France)

Azospirillum brasilense UAP-154 (isolée du maïs au Mexique)

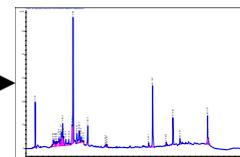
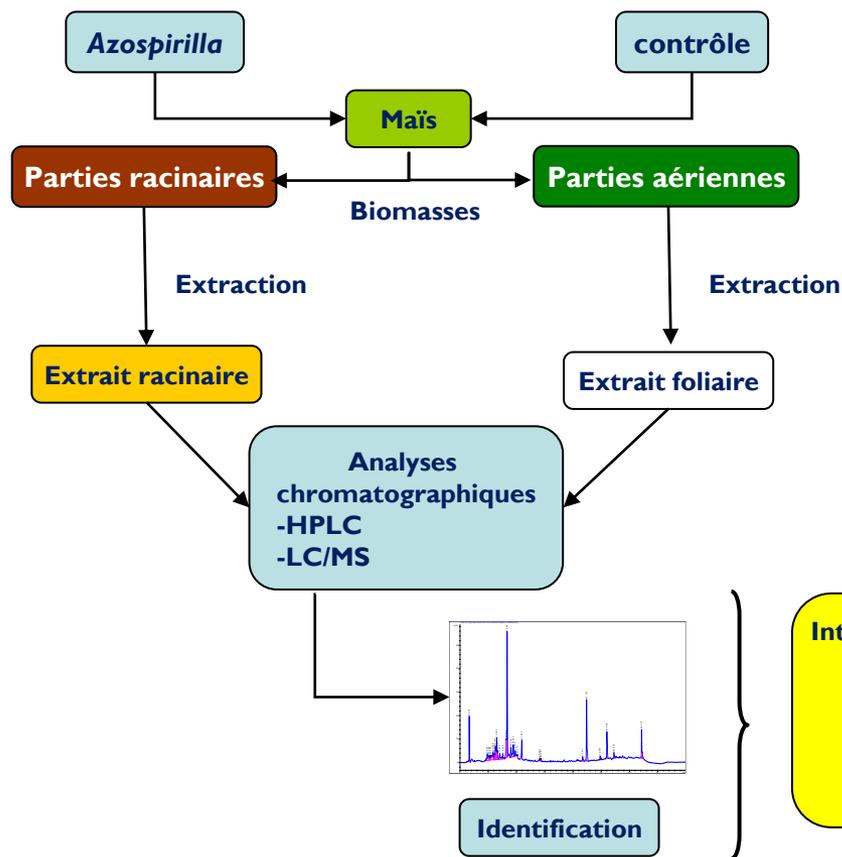
Azospirillum brasilense CFN-535 (isolée du maïs au Mexique)

Inoculation sur graine (10^7 CFU/mL)

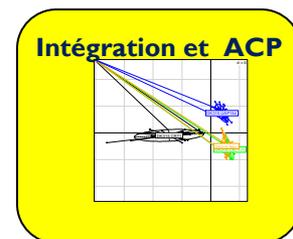
Sur sol non stérile (10 jours)



Cultures en conditions contrôlées

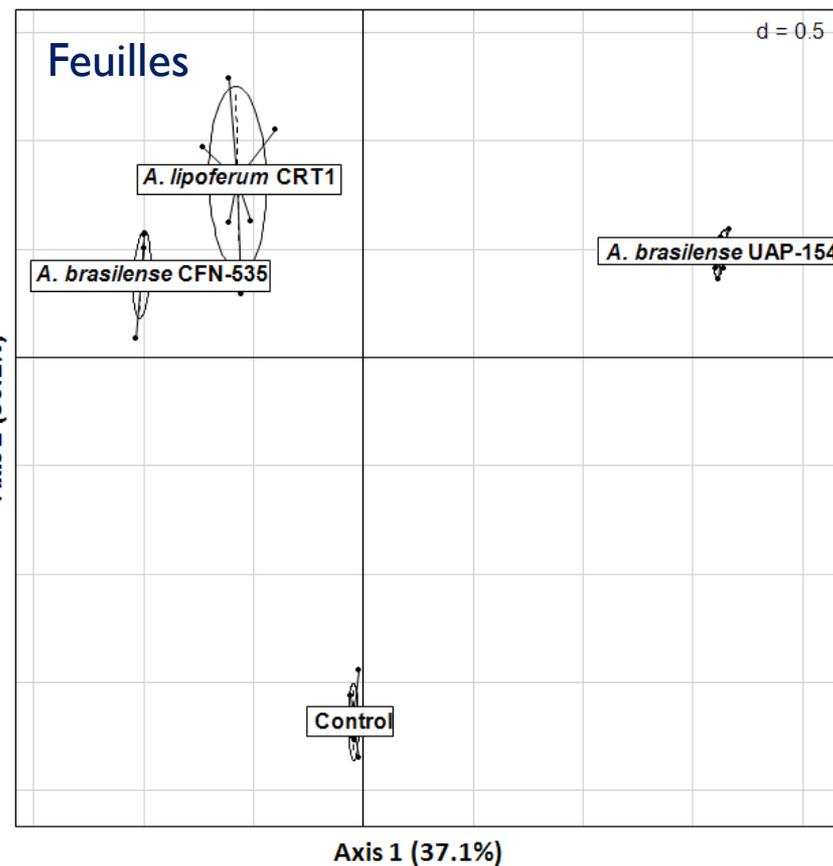
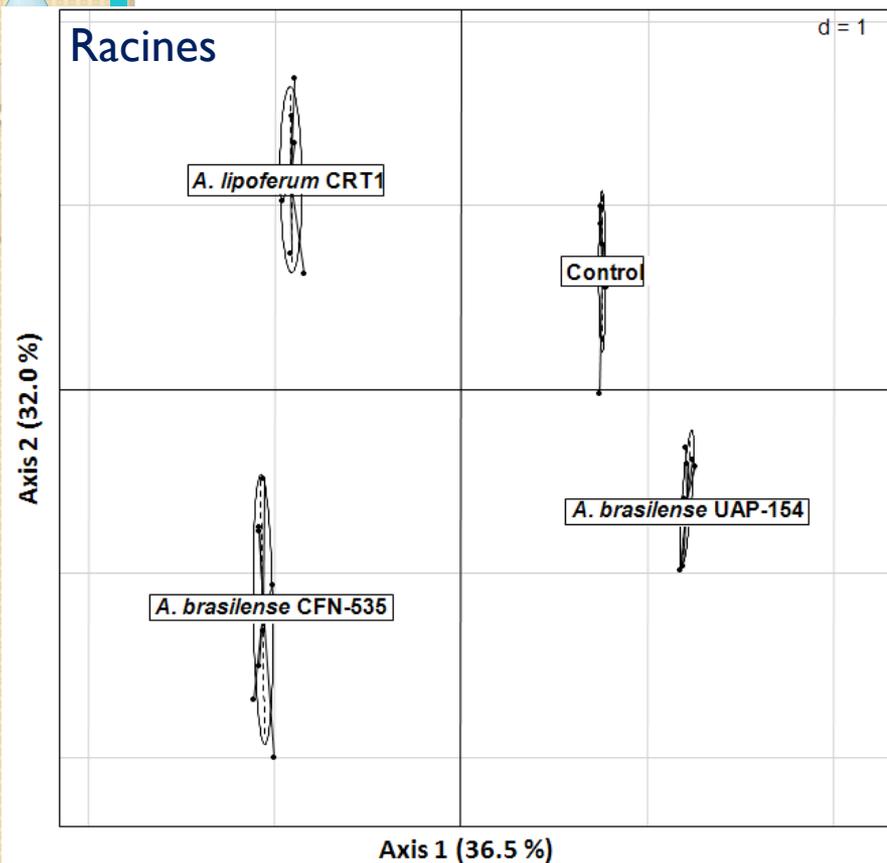


Identification



Intégration et ACP

AZOSPIRILLUM ET METABOLISME : PR37Y15



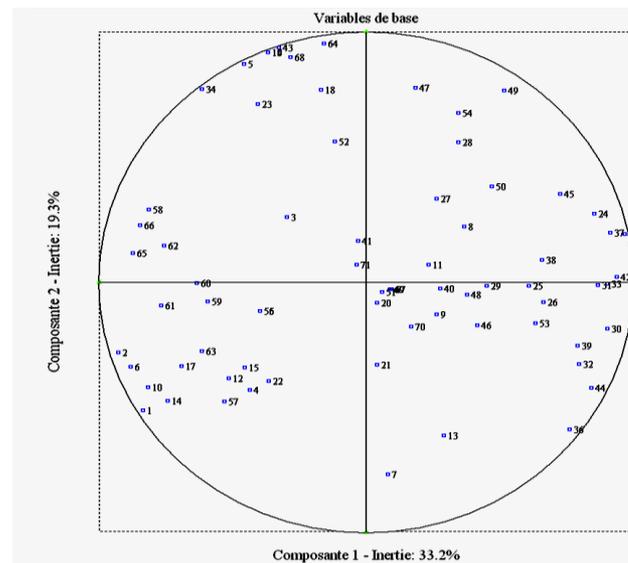
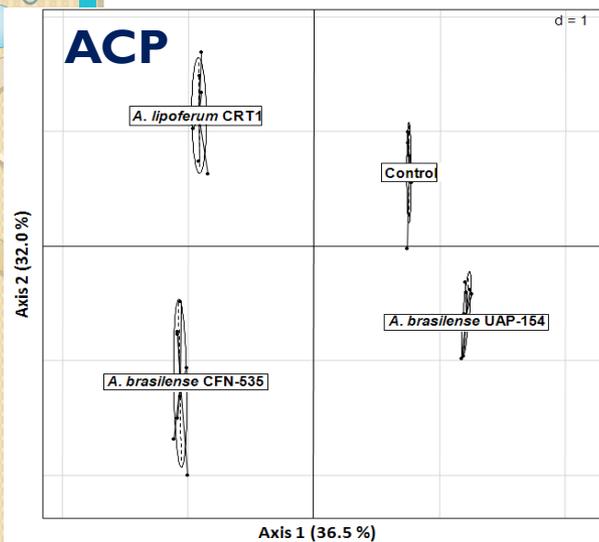
L'analyse des métabolites permet de séparer les traitements

Variations entre les plants témoins et les plants inoculés

Variation entre les inoculations

L'inoculation des souches a un impact différent sur le métabolisme de PR37Y15

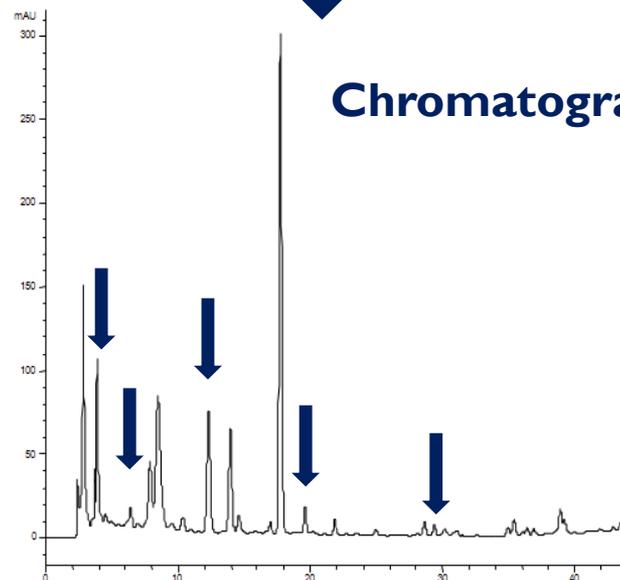
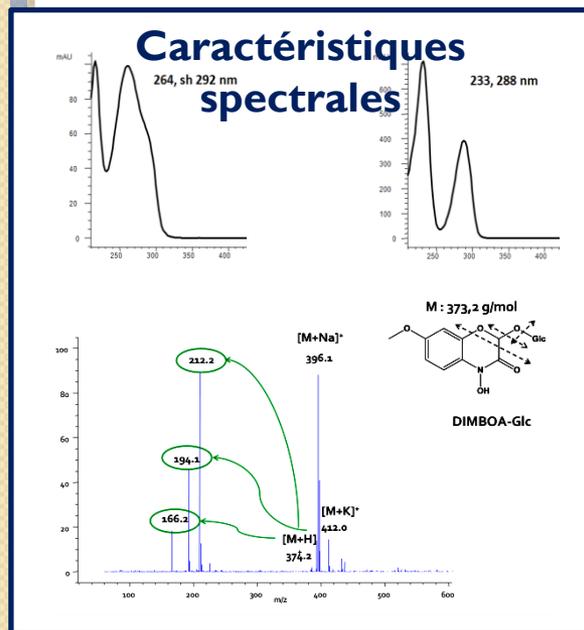
AZOSPIRILLUM ET METABOLISME : COMPOSES IMPLIQUES



**Cercle des
corrélations**

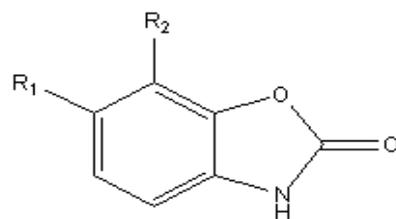
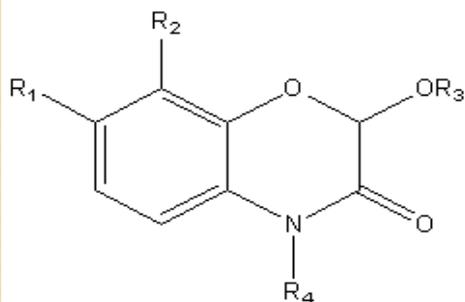


Chromatogrammes



AZOSPIRILLUM ET METABOLISME : COMPOSES IMPLIQUES

Métabolites impliqués : Benzoxazinoïdes



Hydroxamic acids:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1) DIBOA-Glc	H	H	Glc	OH
(2) DIMBOA	OCH ₃	H	H	OH
(3) DIMBOA-Glc	OCH ₃	H	Glc	OH
(4) DIM ₂ BOA	OCH ₃	OCH ₃	H	OH

Lactam type:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(5) HMBOA	OCH ₃	H	H	H
(6) HMBOA-Glc	OCH ₃	H	Glc	H

Methyl derivatives:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(7) HDMBOA-Glc	OCH ₃	H	Glc	OCH ₃

Benzoxazolinones:

	R ₁	R ₂
(8) MBOA	OCH ₃	H
(9) M ₂ BOA	OCH ₃	OCH ₃

APPROCHE DU SOURCING PAR METABOLOMIQUE

Problème : mieux maîtriser la ressource et limiter la variabilité de sa qualité

Objectif : définir des marqueurs de cette qualité

Moyens : appliquer une approche de type métabolomique

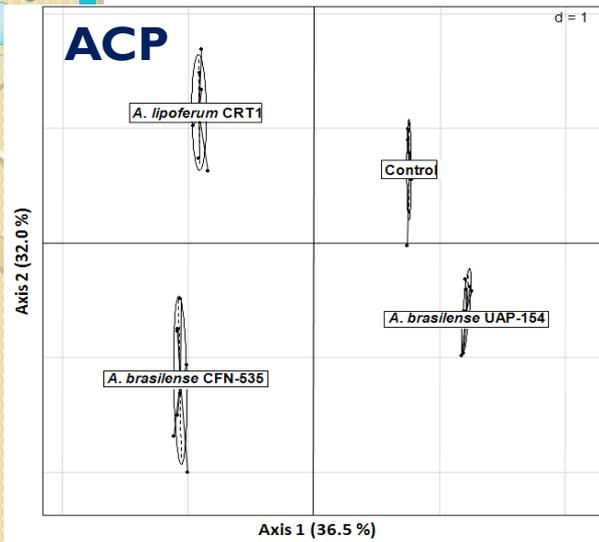
Attendu : démontrer les corrélations existantes entre les différents paramètres

- activité et contenu chimique
- contenu chimique et sourcing
- paramètres organoleptiques et contenu chimique

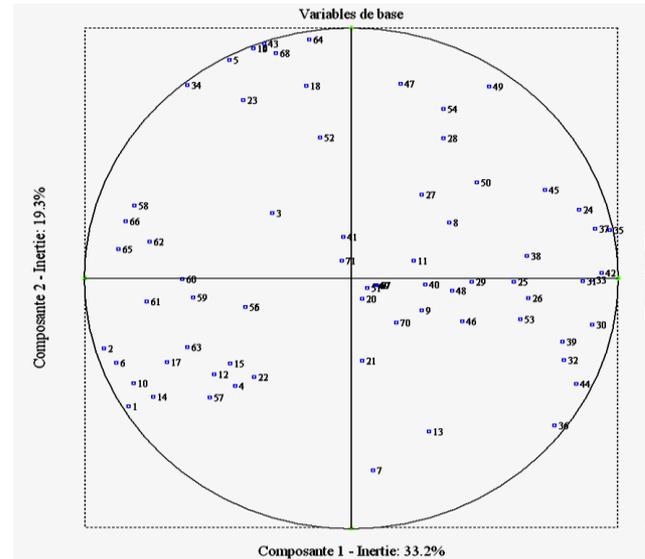
Exemples de paramètres à considérer

- lieu de production (pays, région, site, parcelle, ...)
- procédé de récolte (arrachage, coupe, mécanique, manuelle, ...)
- conditionnement et stockage pré et post expédition (oui/non et nature)
- mode d'expédition (unique ou multiple, route, bateau, aérien, ...)
- traitement à réception (oui/non/lequel)
- méthodologie d'extraction
- contenu chimique de l'extrait
- points de contrôle process
- activité biologique
- stabilité biologique
- stabilité chimique
- stabilité physique
- stabilité organoleptique (odeur et couleur)
-

APPROCHE DU SOURCING PAR METABOLOMIQUE



Ressource A



Cercle des correlations



Variables impliquées



Marqueurs de qualité Ressource A

APPROCHE DU SOURCING PAR METABOLOMIQUE

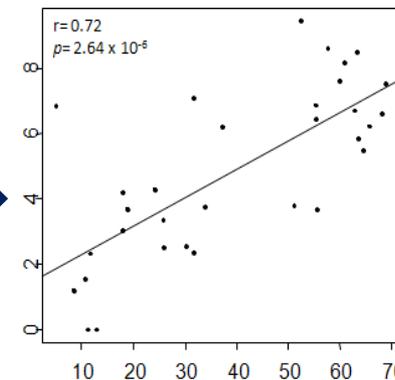
Marqueurs de qualité
Ressource A

Marqueurs de qualité
Ressource B

Marqueurs de qualité
Ressource C

Marqueurs de qualité
Ressource D

Marqueurs de qualité
Ressource E



Etude des corrélations
croisées

Détermination de marqueurs communs
aux différentes ressources

Ecologie chimique en milieu marin



- 250.000 espèces marines ont été décrites et les estimations de la biodiversité marine totale varient entre 5×10^5 et 10^8 espèces
- GDRI Récifs coralliens
- Effet anthropisation sur l'équilibre des écosystèmes marins



En conclusion....

- Intérêt des métabolites secondaires
- Implication des métabolites secondaires dans des préoccupations d'écologie.... Et d'écologie microbienne
- Evolution de la phytochimie vers l'écologie chimique
Dialogue moléculaire interspécifique
- Valorisation en écologie, agronomie et...
en santé

