



HAL
open science

Caractérisation de la réponse de deux modèles biologiques à des contraintes biotiques et/ou abiotiques via des approches métabolomiques: exemple chez l’Abeille (*Apis mellifera*) et le Peuplier (*Populus tremula x alba*)

Rajaa Aissaoui

► **To cite this version:**

Rajaa Aissaoui. Caractérisation de la réponse de deux modèles biologiques à des contraintes biotiques et/ou abiotiques via des approches métabolomiques: exemple chez l’Abeille (*Apis mellifera*) et le Peuplier (*Populus tremula x alba*). [Stage] France. Université Clermont Auvergne (UCA), FRA. 2017, 25 p + annexes. hal-02789477

HAL Id: hal-02789477

<https://hal.inrae.fr/hal-02789477>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



MASTER II Biologie et Environnement

SPECIALITÉ : Microbiologie : Génome, Écologie et Biotechnologies

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR:

Rajaa El Asbi

SUJET

Caractérisation de la réponse de deux modèles biologiques à des contraintes biotiques et/ou abiotiques *via* des approches métabolomiques : exemple chez l'Abeille (*Apis mellifera*) et le Peuplier (*Populus tremula x alba*)

Responsables de stage :

Monsieur Cyril Jousse, Ingénieur de Recherches, UCA, ICCF

Monsieur Frédéric Delbac, Professeur, UCA, LMGE

Monsieur Philippe Malagoli, Maître de Conférences, UCA, PIAF



Septembre 2017

Résumé

La métabolomique est un outil analytique permettant la caractérisation de la réponse métabolomique d'un organisme donné à un ou plusieurs facteurs de stress. Cette étude illustre deux applications de l'approche métabolomique employant un couplage des deux techniques LC-MS et RMN:

- i) La première a pour objectif l'identification de biomarqueurs caractéristiques de la réponse à l'apport de l'azote minéral avant le débourrement dans la sève xylémique chez le peuplier (*Populus tremula x alba*). Les analyses statistiques multivariées ont permis de retenir dans un premier temps 21 modèles et ont montré un effet « temps » qui n'était pas attendu.
- ii) La seconde s'intéresse aux abeilles et a pour objectif d'identifier les voies métaboliques impliquées dans la réponse du modèle biologique *Apis mellifera* à une infection par la microsporidie *N. ceranae* et/ou une intoxication par l'insecticide fipronil à deux doses différentes. L'étude de trois modalités statistiques intéressantes (CvsN, NvsFvsNF et NvsF+vsNF+) a permis l'identification de 24 voies métaboliques qui pourraient être affectés par l'un ou l'autre facteur de stress.

Mots-clés : métabolomique, *Populus tremula x alba*, azote, débourrement, *A. mellifera*, *N. ceranae*, fipronil

Summary

Metabolomics is an analytical tool to characterize the metabolomic response of a given organism to one or more stressors. This study illustrates two applications of the metabolomic approach using a coupling of the two LC-MS and NMR techniques:

- i) The first one concerns aims to identifying biomarkers linked to response to the N supply before bud burst in the poplar xylem sap (*Populus tremula x alba*). Multivariate statistical analyzes allowed to retain at first time 21 models and showed a “time” effect that was not expected.
- ii) The second focuses on bees and aims to identify the metabolic pathways involved in the response of the biological model *Apis mellifera* to infection with *N. ceranae* microsporidia and / or intoxication with two different dose of insecticide fipronil. The study of three interesting statistical modalities (CvsN, NvsFvsNF and NvsF + vsNF +) allowed the identification of 24 metabolic pathways that could be affected by one or the other stressor.

Keywords : Metabolomics, *Populus tremula x alba*, nitrogen, bud burst, *A. mellifera*, *N. ceranae*, fipronil

REMERCIEMENTS

Je remercie, tout d'abord, Monsieur Fabrice LEROUX, Directeur de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie plus particulièrement mes trois responsables de stage, Monsieur Cyril JOUSSE, Monsieur Frédéric DELBAC et Monsieur Philippe MALAGOLI pour leur soutien et conseils tout au long de mon stage. Je tiens à remercier également Madame Marie LAGREE pour ses conseils et disponibilité.

Enfin un grand merci à toutes les personnes que j'ai connu au laboratoire pour leur gentillesse et accueil chaleureux.

Abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BMRB	Biological Magnetic Resonance Data Bank
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
ESI	Electrospray ionization
GOGAT	Glutamate synthase
GS	Glutamine Synthétase
HATS	High Affinity Transport System
HMDB	Human Metabolome Database
ICCF	Institut de Chimie de Clermont-Ferrand
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LATS	Low Affinity Transport System
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
NiR	Nitrite Reductase
NR	Nitrate Reductase
PFEM	Plateforme d'Exploration du Métabolisme
PLS-DA	Plot Loading Scatter Discriminant Analysis
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
VSP	Vegetative Storage Protein
SLA	Specific Leaf Area (cm ² /g)
UMR	Unité Mixte de Recherche
VIP	Very Importance in Projection
UCA	Université de Clermont Auvergne

SOMMAIRE

I.	Introduction.....	1
II.	Présentation du laboratoire d'accueil : Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF).....	3
III.	Bibliographie.....	4
	A. La nutrition azotée chez les arbres.....	4
	1. Le peuplier : système modèle de l'étude des plantes ligneuses.....	4
	2. Classification et caractéristiques générales.....	4
	3. Absorption de l'azote minéral du sol chez l'arbre.....	5
	4. Assimilation de l'azote minéral chez l'arbre.....	6
	5. Cycle de l'azote chez les arbres en relation avec leur cycle de développement annuel.....	6
	6. Problématique.....	7
	B. Le déclin des colonies d'abeilles.....	8
	1. <i>Apis mellifera</i>	8
	2. <i>Nosema ceranae</i> et son impact sur <i>Apis mellifera</i>	8
	3. Voies de transmission de <i>Nosema ceranae</i>	9
	4. Cycle de vie de <i>Nosema ceranae</i>	9
	5. Mécanismes de défense de l'abeille contre <i>N.ceranae</i>	9
	6. L'insecticide fipronil et ses effets sur <i>A. mellifera</i>	10
	7. Moyens de détoxification des abeilles.....	10
	8. Problématique.....	11
IV.	Matériels et méthodes.....	11
	A. Echantillons biologiques.....	11
	1. Extraction de sèves xylémiques.....	11
	a. Espèce utilisée.....	11
	b. Dispositif expérimental.....	11
	c. Récoltes.....	12
	2. Rappel sur l'expérimentation réalisée sur l'abeille <i>A. mellifera</i>	12
	B. Echantillons analytiques.....	13
	1. Echantillons de sève de peuplier.....	13
	a. Préparation des échantillons pour l'analyse LC/MS.....	13
	b. Préparation des échantillons pour l'analyse RMN.....	13
	2. Rappel sur les échantillons d'intestins moyens d' <i>A. mellifera</i>	14
	C. Outils analytiques.....	14
	1. Metabolic Profiler.....	14
	2. Méthodes d'analyse.....	14
	a. LC/MS.....	14
	b. RMN.....	15
	D. Extraction de données.....	16
	1. Données LC/MS.....	16

	2. Données RMN.....	16
E.	Analyse statistique.....	16
	1. Analyse en Composantes principales (ACP).....	16
	2. Analyse PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis).....	17
F.	Identification et quantification des biomarqueurs.....	18
G.	Recherche dans les bases de données.....	18
V.	Résultats.....	18
A.	Sève de peuplier.....	18
	1. Analyses métabolomiques et extraction des données.....	18
	a. LC/MS.....	18
	b. RMN.....	19
	2. Analyse statistique.....	19
	a. Analyse ACP	19
	b. Analyse PLS-DA.....	19
	3. Recherche dans les Bases de données pour le projet abeilles.....	20
	a. Modalité CvsN	20
	❖ Exemple de la voie de la glycolyse/gluconéogenèse.....	21
	b. Modalité NvsFvsNF.....	21
	❖ Exemple de La voie de métabolisme du carbone.....	22
	c. Modalité NvsF+vsNF+.....	22
	❖ Exemple de la voie de biosynthèse des acides aminés.....	22
VI.	Discussion, conclusion générale, perspectives.....	22
	A. La sève de peuplier.....	22
	B. <i>A. mellifera</i>	24
	C. La métabolomique.....	25

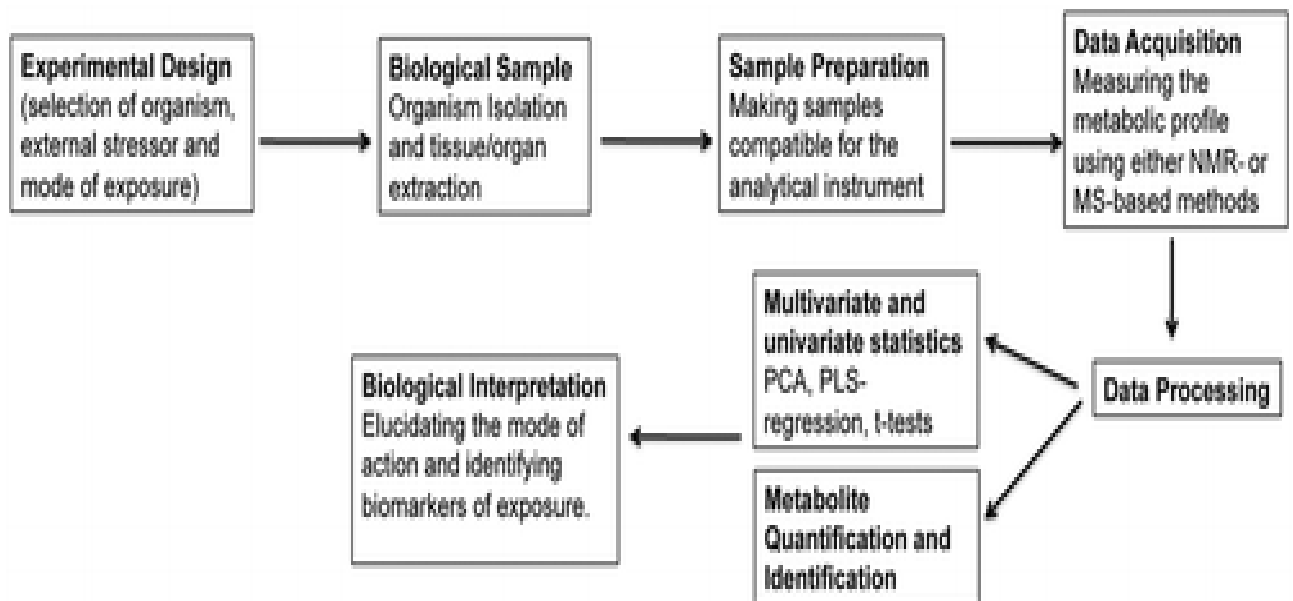


Figure 1: Déroulement typique d’une expérience métabolomique environnementale. NMR: Résonance Magnétique nucléaire; MS: Spectrométrie de masse; PCA: Analyse en Composante principale; PLS-regression: partial least-squares regression analysis. (Lankadurai et al., 2013)

I. Introduction

La métabolomique est une discipline de la science qui permet notamment d'étudier l'impact de différents facteurs de stress sur divers organismes qu'ils soient animaux ou végétaux. En effet, elle permet de dresser le profil des métabolites endogènes et exogènes de faible poids moléculaire dans différents compartiments biologiques (organe, tissu, cellule, ou un fluide biologique tel que l'urine ou encore le plasma) en réponse à une contrainte externe (Lankakadurai et al., 2013). Cette approche se déroule en différentes étapes (figure 1) :

- Exposition de l'organisme modèle au(x) facteur(s) de stress à étudier et préparation de l'échantillon analytique à partir de l'échantillon biologique sélectionné.
- Analyse des échantillons par des techniques appliquées à la métabolomique : La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et/ou la Spectrométrie de Masse (MS).
- Traitement des données générées et analyses statistiques. Deux méthodes d'analyses sont largement utilisées : L'ACP (Analyse en Composante Principale) et la PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis). Elles permettent de dresser une liste de métabolites discriminants, c'est-à-dire significativement différents entre l'état initial et l'état de stress appliqué.
- Identification et quantification des biomarqueurs retenus comme discriminants.
- Interprétation biologique des résultats en identifiant les différentes voies métaboliques dans lesquelles les métabolites identifiés sont impliqués et en les mettant en relation grâce à l'utilisation de réseaux métaboliques. Cette étape fait appel aux bases de données telles que KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ou HMDB (Human Metabolome Database) et permet donc de faire le lien entre le facteur de stress et l'organisme étudiés.

Mon stage a consisté en l'utilisation d'une approche métabolomique dans deux contextes scientifiques différents. Le premier s'intéresse aux plantes et plus particulièrement à leur nutrition azotée. Il a pour objectif d'évaluer le profil métabolique de la sève xylémique du peuplier (*Populus tremula x alba*) suite à une fluctuation nutritionnelle en azote avant le débourrement. Le second concerne le phénomène de déclin des abeilles observé depuis plusieurs années à grande échelle et vise à caractériser la réponse de l'abeille domestique *Apis mellifera* à des contraintes biotiques (infection par un parasite) et/ou abiotiques (intoxication par un insecticide).

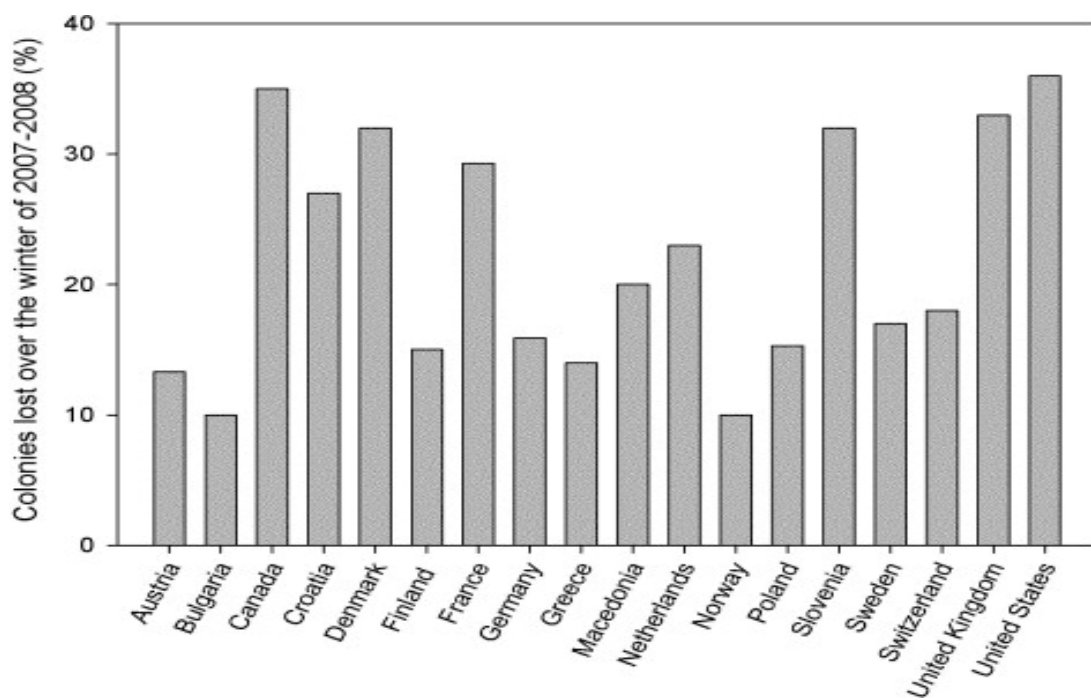


Figure 2: Pourcentage des pertes en colonies d'abeilles pendant l'hiver 2007/2008 dans plusieurs pays. (vanEngelsdorp et Meixner, 2010)

Pour assurer leur croissance, les plantes ont besoin d'éléments nutritifs qu'elles se procurent dans le sol, l'atmosphère et l'eau: i) des macroéléments (carbone, oxygène, potassium, azote,...) constituants 99% de la matière sèche de la plante ; ii) des oligoéléments en quantité beaucoup plus faible mais indispensable au métabolisme de la plante (manganèse, fer, cuivre,...). L'eau, la lumière (nécessaire à la production de la matière organique par la photosynthèse au niveau des parties aériennes), le carbone et l'azote sont les principaux facteurs limitants pour la croissance des plantes (Dickson, 1989). Dans plusieurs forêts tempérées et tropicales, l'azote est considéré comme l'élément limitant le plus important (Agren, 1985a). A l'exception des légumineuses capables de fixer l'azote atmosphérique, les arbres peuvent se procurer ce macroélément important par (i) absorption du sol et (ii) remobilisation des ressources internes en azote stockées (Millard, 2006 ; Millard et Grelet, 2010). L'absorption de l'azote est fonction, d'une part, de la quantité et de la nature des éléments azotés présents dans le sol (Shimel et Bennet, 2004) et, d'autre part, des capacités des mécanismes d'absorption racinaire et des régulations associées (Rennenberg, 2009). Il est important de noter que les changements climatiques qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique (réchauffement climatique, fonte importante de la glace et élévation du niveau moyen de la mer) pourraient influencer les différents systèmes biologiques dont les écosystèmes forestiers (IPCC, 2007). En effet, ces contraintes du climat pourraient avoir des conséquences sur l'acquisition de l'azote par les plantes ligneuses (Rennenberg, 2009) et donc avoir une répercussion sur le débourrement (reprise de la croissance du bourgeon) et, in fine, la pérennité de ces espèces. Par exemple, les travaux récents menés chez le Pêcher suggèrent qu'un apport d'azote pourrait faciliter une absorption racinaire précoce, cette dernière permettant de compenser un faible niveau de réserves azotées au moment de la reprise de végétation (Jordan et al., 2013). Chez le rosier, des études ont montré qu'une réduction de la fertilisation azotée était associée à une diminution du nombre de ramification produites entraînant une diminution de la qualité visuelle et donc du revenu de la culture (Huché-Thélier et al., 2011). Ces études mettent donc en évidence l'intérêt de mieux comprendre les modifications métaboliques suite à une fluctuation des ressources en azote minéral dans le sol et à identifier des biomarqueurs de la réponse à une contrainte nutritionnelle.

Durant ces dernières années, une diminution importante du nombre de colonies d'abeilles est constatée dans de nombreux pays et particulièrement en Europe et en Amérique du Nord (figure 2) (vanEngelsdorp et Meixner, 2010). Ces phénomènes de surmortalité des abeilles peuvent résulter de l'action de nombreux facteurs de stress (Booton et al., 2017) . En effet,

l'abeille est confrontée à 2 types de stress : i) des stress biotiques causés par des prédateurs (tel que le frelon asiatique), des parasites et/ou agents pathogènes (acariens, bactéries, virus, champignons tel que *Nosema ceranae*) (Morse et Flottum, 1997) ; ii) des stress abiotiques tels que les pesticides, le changement climatique ou la fragmentation des habitats (Rortais *et al.*, 2017). Ces différents stressseurs peuvent parfois agir simultanément et avoir même un effet synergique. Il a ainsi été démontré par exemple que les interactions entre plusieurs pesticides augmentent le taux de mortalité des abeilles de façon synergique (Goulson *et al.*, 2015). Il en est de même lorsque des abeilles sont co-exposées à des pesticides tel que le fipronil et infectées par certains pathogènes comme le parasite *Nosema ceranae* (Vidau *et al.*, 2011 ; Aufauvre *et al.*, 2012 ; Goulson *et al.*, 2015). Ces différentes études suscitent donc l'intérêt d'étudier chez l'abeille les métabolites biomarqueurs de stress impliqués dans le cadre d'une réponse à une contrainte d'infection et/ou d'intoxication.

II. Présentation du laboratoire d'accueil : Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF)

L'institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) a été formé en 2012 par la fusion de cinq laboratoires, dont quatre unités mixtes de recherche avec le CNRS et une équipe associée à l'École de Chimie de Clermont-Ferrand :

- Le laboratoire des Matériaux Inorganiques, LMI UMR 6002
- Le laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, LPMM UMR 6505
- Le laboratoire de Synthèse Et Etudes des Systèmes à Intérêt Biologique, SEESIB UMR 6504
- Le laboratoire de Thermodynamique et Interactions Moléculaires, LTIM UMR 6272
- Le laboratoire de Conception Et Synthèse de Molécules Antalgiques, CESMA

En janvier 2017, L'ICCF a été restructuré en six équipes de recherche : l'équipe Matériaux Pour la Santé (MPS), l'équipe Chimie Organique et Médicinale (COM), l'équipe Photochimie, l'équipe Thermodynamique et Interactions Moléculaires (TIM), l'équipe Matériaux Inorganiques (MI) et l'équipe Biocatalyse et Métabolisme (BIOMETA) au sein de laquelle j'ai effectué mon stage. J'ai intégré plus précisément la Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme (PFEM) qui est une structure fédérative entre INRA et UCA regroupant les compétences technologiques et scientifiques pour des analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques.

L'équipe de la PFEM est composée de 24 personnes dont les compétences incluent la biochimie, la biologie moléculaire, la chimie analytique, les statistiques et la bioinformatique.

La plate-forme a été créée en 2009 et a rejoint en 2013 le programme « Investissements d’Avenir », appelé Métabohub. Ce programme a pour objectif de développer des méthodes de pointe en métabolomique et en fluxomique afin de relever les défis technologiques rencontrés dans les domaines de la santé, de la recherche clinique et de la médecine, de la nutrition humaine et de l'alimentation, d'identifier des métabolites dans les liquides biologiques humains, les extraits de plantes, les microorganismes et les extraits de cellules animales grâce à la mise en œuvre et la maintenance de bases de données de spectres de référence pour les annotations du métabolome.

Les principaux services de la PFEM sont axés autour de 5 thématiques : la fluxomique, la métabolomique, la quantification, la protéomique et la transcriptomique. Ces projets de recherches (techniques ou scientifiques) se déroulent selon la thématique soit à l'ICCF soit sur le site de l'INRA.

III. Bibliographie

A. La nutrition azotée chez les arbres

1. Le peuplier : système modèle de l’étude des plantes ligneuses

Les rôles économique et écologique important que jouent les arbres forestiers et fruitiers ont suscité de l’intérêt chez la communauté scientifique pour les étudier et approfondir les connaissances biologiques dans le but de reconstituer les écosystèmes perturbés et améliorer la production fruitière. Le peuplier constitue un excellent modèle de recherche pour différentes raisons (une croissance rapide et un petit génome séquencé permettant son étude par différentes approches génétiques et moléculaires) (Bradshaw et al., 2000 ; Stettler et al., 1996).

2. Classification et caractéristiques générales

Le peuplier est une angiosperme dicotylédone appartenant au genre *Populus* de la famille des Salicacées (Bradshaw et al., 2000). Il comprend 22 à 85 espèces différentes classées dans 5 sections auxquelles se rajoutent une section constituée de peupliers hybrides (Stettler et al., 1996). Ces différentes espèces sont rencontrées surtout en hémisphère nord et dans les régions tempérées. Bien que le peuplier se caractérise par une croissance rapide, celle-ci dépend fortement de la disponibilité en azote qui est considéré comme l’un des principaux facteurs limitant pour la croissance des végétaux (Thitithanakul et al., 2012). Les arbres peuvent se

procurer ce macroélément important par absorption du sol :i) de composés minéraux tels que le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) issus de la minéralisation de la matière organique ou des fertilisations, et ii) de l'azote organique transféré aux racines des arbres *via* les mycorhizes (acides aminés et peptides). Par ailleurs, le peuplier, comme tous les arbres, se caractérise par un recyclage important de l'azote depuis les tissus de stockage (écorce, bois dans le tronc et les racines) vers les puits en croissance (bourgeons, feuilles). La coordination des flux issus de l'absorption et de la remobilisation permet de satisfaire la demande en azote dans les organes puits (figure 2) (Millard et al., 2006 ; Millard et Grelet 2006).

3. Absorption de l'azote minéral du sol chez l'arbre

A l'exception des légumineuses capables de fixer l'azote atmosphérique, les absorbent l'azote du sol principalement sous forme ammoniacale ou nitrique. La disponibilité en ces éléments dans le sol est fonction de plusieurs paramètres comme les précipitations, la température, le type du sol ou encore le pH. En fonction donc des plantes et de leur capacités d'adaptation au sol, celle-ci montrent une préférence soit pour l'ammonium, soit pour le nitrate (Masclaux-Daubresse et al., 2010). De manière générale, les plantes ont développé des systèmes de transport et de régulation vis-à-vis de l'azote issu du sol, adaptés à leur vitesse de croissance ainsi qu'à leur stade de développement (Imsande et Touraine, 1994). Ces systèmes sont directement liés aux concentrations d'azote disponible dans le sol (Morot-Gaudry et al., 2006). On distingue deux systèmes de transport chez les arbres qui coexistent et fonctionnent de manière coordonnée : le système de transport à forte affinité HATS (High Affinity Transport System) et le système à faible affinité LATS (Low Affinity Transport System).

Le système de transport à haute affinité HATS : Ce système est déployé par la plante pour de faibles concentrations externes d'azote allant de 0,2 à 0,5 μM . C'est le dispositif le plus utilisé car la concentration en azote dans le sol atteint rarement le 1 Mm (Doddema et Telkamp, 1979). Ce système suit une cinétique michaelienne et fait intervenir deux composantes (constitutive et inductible par le nitrate) qui affichent une affinité et une vitesse de transport différentes vis-à-vis du substrat azote (Morot-Gaudry et al., 2006).

Le système à faible affinité LATS : Ce système est actif pour l'absorption de concentrations plus forte en nitrate (au-delà de 200 à 500 μM). Il est inductible et non saturable (Morot-Gaudry et al., 2006).

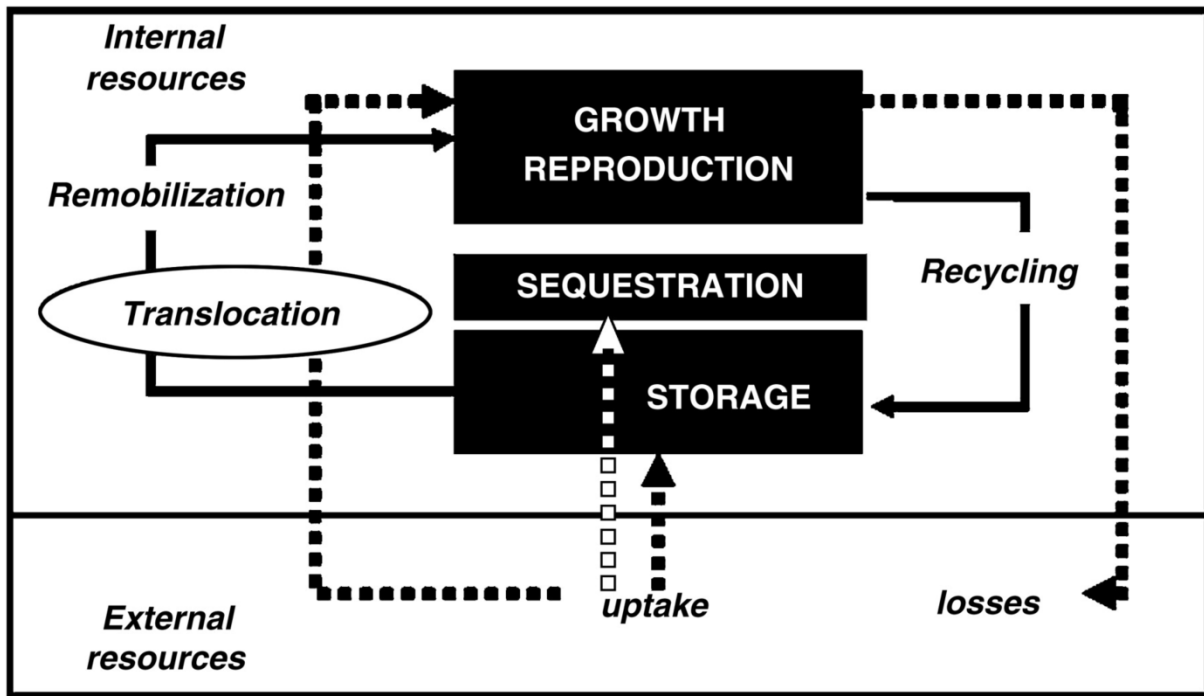


Figure 3 : Présentation schématique des ressources externes et recyclage interne de l'azote chez les arbres. Les lignes pointillées représentent l'échange d'azote entre des sources externes et des pools internes dans l'arbre. Ces échanges comprennent : 1) l'absorption impliquée (i) directement dans le stockage, (ii) la séquestration ou (iii) la croissance et la reproduction et 2) les pertes et le retour à la litière par la sénescence et l'abscission des feuilles et des racines. Les lignes pleines schématisent le recyclage interne des ressources azotées (suite à la sénescence des feuilles) et la remobilisation de celles-ci par translocation à partir des tissus de stockage vers d'autres tissus pour assurer la croissance et la reproduction de l'arbre. (Millard et Grelet, 2010)

4. Assimilation de l'azote minéral chez l'arbre

Pour assimiler l'azote absorbé du sol, les plantes et notamment les arbres doivent réduire le nitrate en ammonium qui sera ensuite assimilé sous forme d'acides aminés. La réduction du nitrate se fait au niveau du cytosol des cellules des racines et des pousses foliaires par la nitrate réductase (NR). La réduction en ammonium sera ensuite effectuée par la nitrite réductase (NiR) au niveau des plastes (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). En effet, l'ammonium est toxique pour les cellules végétales et doit être converti rapidement (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Mifflin et Lea, 1980). Cette conversion se fait principalement *via* le cycle (GS-GOGAT) faisant intervenir les deux enzymes clés : la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) qui aboutissent à l'incorporation de l'ammonium dans le cycle de formation des acides aminés (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

5. Cycle de l'azote chez les arbres en relation avec leur cycle de développement annuel

Le cycle de développement annuel des arbres se caractérise par deux grandes phases (figure 3) :

-La phase de croissance : Au printemps et en été, la croissance des arbres est maximale. En effet, l'absorption de l'azote inorganique par les racines est optimale durant cette période. Cet élément va être incorporé dans la voie de biosynthèse d'acides aminés et de protéines des arbres (Masclaux *et al.*, 2000), assurant ainsi leur reproduction et différents autres métabolismes (Millard et Grelet, 2010). Avec l'arrivée de l'automne, en réponse à des signaux environnementaux tel que le raccourcissement du temps de la photopériode et la diminution de la température, l'azote absorbé du sol est directement stocké afin de maintenir la croissance durant les périodes caractérisant par une carence en azote. De plus, la senescence des feuilles, suite à la dégradation de leurs protéines, entraîne la libération d'acides aminés qui seront transportés, selon les espèces, vers divers tissus de stockage (racines et écorce) (Masclaux *et al.*, 2000). En effet, Les feuilles constituent une bonne source d'azote pour la plante grâce à la Rubisco, enzyme jouant un rôle important dans la photosynthèse des plantes chlorophylliennes et qui peut constituer à elle seule jusqu'à 50% des protéines totales solubles des feuilles (Masclaux *et al.*, 2000). La mise en réserve de l'azote se fait sous forme de protéines de stockage VSPs (Vegetative Storage Proteins) et d'acides aminés (arginine) (Masclaux *et al.*, 2000 ; Millard et Grelet, 2010).

- la phase de dormance : Suite à la chute des feuilles à l'automne, et sous l'action du raccourcissement de la photopériode et de la chute de la température, les bourgeons vont entrer en dormance. A la sortie de l'hivers, les réserves en azote stockés sont transloquées et remobilisées afin de soutenir la croissance des jeunes tissus en développement au printemps (Masclaux et al., 2000). Pour les arbres stockant l'azote au niveau des racines et de l'écorce, la translocation de l'azote se fait *via* la sève xylémique qui va alimenter les jeunes tissus en demande. En effet, des approches par marquage de l'azote (^{15}N) stocké dans des jeunes arbres de peuplier ont démontré une augmentation considérable de cet élément dans le xylème durant la remobilisation des réserves en printemps. Cette hausse coïncide également avec le débourrement des jeunes pousses (Millard et al., 2006).

6. Problématique

Le débourrement des bourgeons est un évènement majeur dans le cycle de vie pluriannuel des arbres. Non seulement le profil de débourrement détermine le nombre d'axes et donc l'architecture de la plante mais aussi la surface foliaire et la qualité de cette surface (en terme de teneur en azote) pour assurer la photosynthèse au cours de période de végétation. Les travaux menés au PIAF durant la thèse de Suraphon Tithitanakul (Thitithanakul et al., 2012) et le stage de Master 2 de Sylvain Vrignon-Brenas (Vrignon-Brenas, 2012) ont montré que l'azote apporté sous forme minérale avant le débourrement (i) était effectivement absorbé par le peuplier, (ii) permettait une réhydratation précoce des tissus et (iii) entraînait une amélioration de la surface foliaire, de la surface spécifique (SLA ; cm. g^{-1}) et de la teneur en azote dans les jeunes feuilles après le débourrement. Ces résultats suggèrent que l'apport précoce d'azote dans l'environnement racinaire pouvait entraîner une stimulation de la remobilisation des réserves carbonées et azotées à partir des tissus traversés lors de la reprise de la transpiration foliaire. A ce jour, aucune étude n'a véritablement permis d'identifier la nature des processus et les acteurs impliqués expliquant la corrélation entre disponibilité azotée et amélioration de la qualité de la feuille après le débourrement. La question que nous nous posons est : est-ce que la modification de la composition métabolique de la sève xylémique suite à un apport précoce d'azote minéral (avant le débourrement) et son transport à travers les tissus de réserves suite à la réhydratation des tissus rendent-ils compte de l'amélioration de la qualité des jeunes feuilles ? Dans ce cadre-là, ma mission a consisté à mettre au point les conditions expérimentales pour des analyses LC/MS et RMN 1D et 2D du proton d'échantillons de sève de peuplier ayant subi ou non une fertilisation azotée (1 ou 4 mM), le but étant de dresser le profil métabolomique de cette sève après attribution et

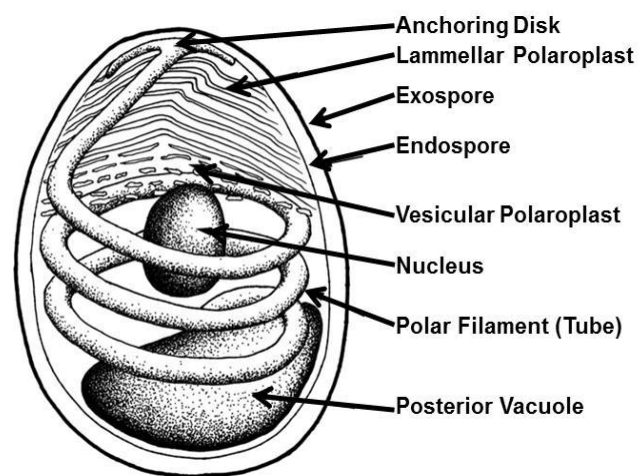


Figure 4 : Schéma d'une spore de microsporidie. (Keeling et Fast, 2002)

identification des biomarqueurs discriminants ce qui permettra de voir l'effet de l'azote sur cette plante ligneuse.

A. Le déclin des colonies d'abeilles

1. *Apis mellifera*

Possédant une grande capacité d'adaptation, l'abeille européenne *Apis mellifera* a pu se répandre quasiment partout dans le monde (vanEngelsdorp et Meixner, 2010) où elle joue un rôle majeur dans la pollinisation et donc dans le maintien de la biodiversité des plantes et dans les ressources alimentaires de l'Homme. En effet, les abeilles contribuent à la pollinisation de 80% des espèces de plantes à fleurs et l'apport des insectes pollinisateurs a été évalué à 9,5 % de la production alimentaire mondiale (Gallai *et al.*, 2009). De ce fait, l'effondrement des colonies pourrait avoir des conséquences importantes au niveau économique ainsi qu'écologique avec la réduction de la biodiversité.

2. *Nosema ceranae* et son impact sur *Apis mellifera*

La microsporidie *N. ceranae* est un parasite intracellulaire obligatoire qui se développe dans l'intestin des abeilles adultes. Initialement identifié chez l'abeille asiatique *Apis cerana*, cet eucaryote unicellulaire est passé chez *Apis mellifera* et est désormais retrouvé partout dans le monde (vanEngelsdorp et Meixner, 2010). L'infection par *N. ceranae* a des effets importants sur les abeilles parmi lesquels : i) une réduction de la survie des abeilles infectées (Dussaubat *et al.*, 2012) ; ii) une dégénérescence des cellules épithéliales (Dussaubat 2013 ; Dussaubat *et al.*, 2012) ; (iii) des changements comportementaux liés au stress énergétique causé par le parasite. Ces modifications se traduisent notamment par une surconsommation des carbohydrates, une altération de la trophallaxie (échange de nourriture entre les abeilles), ou encore une diminution des capacités d'orientation et de vol (Dussaubat, 2013).

N. ceranae existe sous deux formes: la forme végétative qui se multiplie au sein de la cellule hôte et la spore, forme de résistance, qui correspond à la forme infectieuse libérée de la cellule infectée à la fin du cycle.

La spore est enveloppée par une paroi constituée de deux couches appelées exospore et endospore. Elle délimite une membrane plasmique interne qui renferme le sporoplasme contenant les différentes structures internes de la spore (figure 4) (Keeling et Fast, 2002 ; Chen *et al.*, 2009) :

- Le tube polaire impliqué dans l'injection du contenu de la spore dans la cellule hôte (Dussaubat, 2013 ; Chen *et al.*, 2009).
- Le polaroplaste composé de structures lamellaires situées dans la partie antérieure de la spore (Chen *et al.*, 2009).
- Une vacuole à l'extrémité postérieure, ainsi que deux noyaux occupant la partie centrale de la spore (Chen *et al.*, 2009).

3. Voies de transmission de *Nosema ceranae*

La contamination des abeilles se fait soit par: i) voie orale-orale via la trophallaxie où les abeilles peuvent s'échanger entre elles de la nourriture contaminée. ii) voie féco-orale lors de l'activité de nettoyage de la ruche des fèces contenant des spores (Dussaubat, 2013).

4. Cycle de vie de *Nosema ceranae*

Le cycle de vie de *N. ceranae* dure moins de trois jours et se déroule en plusieurs étapes (Solter, 2010):

-L'étape d'invasion appelée germination. Après ingestion par les abeilles, les spores de *N. ceranae* font subir un mécanisme d'extrusion du tube polaire qui va permettre l'injection du sporoplasme dans le cytoplasme des cellules intestinales (Solter, 2010).

-La mérogonie, phase de prolifération, au cours de laquelle les parasites se divisent pour produire des mérontes (Solter, 2010 ; Higes *et al.*, 2010). A ce stade, les stades parasitaires sont entourés d'un grand nombre de mitochondries, ce qui leur permet de capturer les molécules d'ATP produites par la cellule hôte (Higes *et al.*, 2010).

-La sporogonie, étape de différenciation conduisant à la formation des spores. En effet, les mérontes se transforment en sporontes puis en sporoblastes qui donnent à leur tour des spores. Ces dernières pourront infecter les cellules voisines, après extrusion de leur tube polaire ou être libérées dans l'ampoule rectale.

5. Mécanismes de défense de l'abeille contre *N.ceranae*

Pour lutter contre les organismes pathogènes, les abeilles sont dotées de certains mécanismes de défense de nature mécanique, physiologique et immunitaire. En effet, la cuticule et la matrice péritrophique qui recouvre l'épithélium intestinal constituent des barrières

mécaniques qui contribuent à la résistance aux agents pathogènes en empêchant leur pénétration dans l'organisme. Cependant, il arrive souvent que le parasite puisse franchir cette barrière entraînant ainsi une réponse physiologique de l'abeille infectée visant à limiter sa diffusion. Les abeilles sont capables d'induire des réponses immunitaires individuelles faisant intervenir quatre voies moléculaires qui sont interconnectées entre elles : la voie Toll, Jak/STAT, Jnk et Imd. Faisant partie des organismes sociaux, les abeilles se caractérisent aussi par des réponses immunitaires au niveau social, on parle (d'immunité sociale.) Les abeilles sont par exemple capables de détecter et d'éliminer le couvain infecté afin de limiter la diffusion de certains parasites (Evans et Spivak, 2009).

6. L'insecticide fipronil et ses effets sur *A. mellifera*

Les abeilles sont exposées à de nombreux en se nourrissant de pollen, de nectar ou de miel contaminés (Mullin *et al.*, 2010). Le fipronil est un insecticide neurotoxique appartenant à la famille des phénylpyrazoles Utilisé dans le traitement de différentes cultures, le fipronil est également employé pour lutter contre certains ectoparasites (puces, tiques) des animaux de compagnie. Le fipronil a la capacité de se fixer sur les récepteurs GABA (Acide γ -Aminobutyrique), le GABA étant un neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Cette association va conduire au blocage des canaux à chlorures, entraînant une hyperpolarisation de la membrane des cellules nerveuses avec pour répercussions des tremblements et des convulsions pouvant aller jusqu'à entraîner la mort de l'organisme. Une étude a montré que le fipronil administré à des doses sublétales (doses n'entraînant pas la mort mais capables éventuellement d'avoir des effets sur l'organisme) par voie orale ou topique entraîne diverses perturbations physiologiques et comportementales chez les abeilles (Aliouane *et al.*, 2009). En effet, ce pesticide agit sur leur perception sensorielle, en diminuant la réactivité aux nutriments (sucrose), perturbe leur apprentissage olfactif et leurs capacités de mémoire, et agit également sur leur activité locomotrice et leur déplacement.

7. Moyens de détoxification des abeilles

Le processus de détoxification des abeilles se fait grâce à des enzymes spécifiques, et se déroule principalement dans deux compartiments biologiques : l'intestin moyen et le corps gras. La détoxification des xénobiotiques fait intervenir par exemple les cytochromes P450 et les carboxylestérases. En effet, certaines enzymes des familles CYP6 et CYP9 ont la capacité

de métaboliser les xénobiotiques pouvant se retrouver dans le miel ou le pollen (Mao et al., 2012).

8. Problématique

L'origine multifactorielle incriminée dans le phénomène de déclin des abeilles suscite l'intérêt d'étudier différents facteurs de stress ainsi que leurs effets lorsqu'ils sont combinés. Le but de notre étude est d'utiliser une approche métabolomique afin d'étudier l'impact de deux facteurs de stress sur le modèle *Apis mellifera* en dressant le profil métabolomique de l'intestin suite à une infection par la microsporidie *N. ceranae* et/ou une intoxication par l'insecticide fipronil à deux doses différentes (0.5 et 1 µg/L). Pour ce projet, la partie expérimentale a déjà été réalisée en utilisant les deux techniques analytiques: la LC/MS et la RMN 1D du proton. Mon travail porte donc sur l'analyse des données acquises par ces deux techniques afin de comprendre quels sont les métabolites jouant un rôle dans la réponse de l'abeille soumise aux stress appliqués par rapport à un organisme sain, comment varie leur quantité et dans quelles voies métaboliques sont-ils impliqués.

IV. Matériels et méthodes

Dans cette partie, l'ensemble des différentes étapes de la métabolomique sera présenté.

Il est à noter que pour la partie concernant *A.mellifera*, les étapes allant de l'acquisition du matériel biologique jusqu'à l'identification des biomarqueurs a été réalisé en amont de mon stage de M2.

A. Echantillons biologiques

1. Extraction de sèves xylémiques

a. Espèce utilisée

Les arbres utilisés sont des scions (arbre âgé d'un an) de peupliers hybrides *Populus tremula x alba* clone INRA 717-1B4. Leur préparation et leurs conditions de culture sont décrites en annexe 1.

b. Dispositif expérimental

L'objectif de cette expérimentation est de mettre en évidence une modification de la composition métabolique de la sève xylémique suite à un apport d'azote dans la solution nutritive avant le débourrement chez l'arbre.

36 plantes ont été utilisées, dont 6 plants pour les mesures de date de débourrement. Trois lots de plantes ont été identifiés en fonction de l'apport et de la dose d'azote minéral apporté sous forme de KNO_3 : (i) pas d'apport, (ii) apport de 1 mM KNO_3 , (iii) apport de 4 mM KNO_3 . L'apport de KNO_3 a été réalisé avant le débourrement. Pour chaque niveau d'apport d'azote minéral, les arbres ont été récoltés :

(i) à t0 (1^{er} mars 2016) afin de caractériser l'état initial et avant l'apport de l'azote minéral (6 arbres). A la même date, le KNO_3 a été ajouté à deux doses différentes,

(ii) à t+2j (3 mars 2016) : récolte 2 jours après l'apport de KNO_3 (12 plantes)

(iii) à t+6j (7 mars 2016) : récolte 6 jours après l'apport de KNO_3 (12 plantes)

Cette cinétique a été choisie pour suivre les changements qui pourraient s'opérer aussi bien au niveau de la composition de la sève que dans les tissus de réserve. Dans ce rapport, nous nous focaliserons sur la composition de la sève xylémique. L'annexe 2 résume l'échantillonnage réalisé.

c. Récoltes

Lors de la récolte, pour chaque arbre, le protocole suivant a été utilisé :

- 1 - Une section de scion est repérée sur la plante : 30 cm sous les deux-tiers de la hauteur totale du scion,
- 2 - Extraction de la sève xylémique par application d'une dépression, mesure du volume de la sève et stockage provisoire dans la glace avant d'être transférée à -80°C . La composition de la sève xylémique sera réalisée par LC/MS. C'est l'étude de la composition de cet échantillon qui constituera le cœur de l'analyse et des résultats de ce rapport.

2. Rappel sur l'expérimentation réalisée sur l'abeille *A.mellifera*

Les abeilles utilisées dans cette étude proviennent du rucher de l'équipe Interactions Hôtes-Parasites du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement.

Afin de tester plusieurs modalités expérimentales, ces abeilles ont subi différentes conditions d'expérimentation :

- Abeilles saines : Contrôle (C)
- Abeilles infectées par *N. ceranae* (1.25×10^5 spores par abeille, N)
- Abeilles intoxiquées au fipronil à la dose $0.5\mu\text{g/L}$ (F)
- Abeilles intoxiquées au fipronil à la dose $1\mu\text{g/L}$ (F+)
- Abeilles infectées par *N. ceranae* et intoxiquées au fipronil $0.5\mu\text{g/L}$ (NF)
- Abeilles infectées par *N. ceranae* et intoxiquées au fipronil $1\mu\text{g/L}$ (NF+)

Les intestins moyens de ces différents groupes d'abeilles ont été collectés à trois temps différents : 6, 12 et 13 jours après l'application du stress.

B. Echantillons analytiques

1. Echantillons de sève de peuplier

a. Préparation des échantillons pour l'analyse LC/MS

Après décongélation des trente échantillons récoltés, 200 µl de prise d'essai ont été prélevés et transférés dans un tube de type Eppendorf pour être ensuite évaporés à sec. Deux pools de 900 µl ont également été constitués en prélevant 30 µl de chaque échantillon. Le premier pool servira à visualiser l'évolution des performances de l'appareil LC/MS au cours des analyses, 800 µl de ce mélange ont donc été répartis dans 4 microtubes différents et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif réfrigéré. Les 100 µl restants ont été rajoutés au deuxième pool de façon à avoir un volume final de 1 ml qui servira à une identification ultérieure des métabolites marqueurs potentiels du stress étudié. Ce dernier a été conservé à -80°C. Les 34 tubes Eppendorf issus des échantillons et du premier pool respectivement ont été repris chacun dans un volume de 50 µl d'une solution constituée d'eau et d'acétonitrile (50/50 v/v). Les mélanges ont été ensuite « vortexés » puis transféré dans des tubes avec insert pour procéder à l'analyse par LC-MS en mode positif et négatif.

b. Préparation des échantillons pour les analyses en RMN

Après décongélation des trente échantillons récoltés, une prise d'essai de 200 µl est réalisée puis transférée dans un microtube de type Eppendorf pour être ensuite évaporée à sec à l'évaporateur rotatif réfrigéré. Les résidus secs obtenus sont repris dans 600 µl d'eau deutérée (D₂O) contenant 10% de tampon phosphate (concentration dans le tube : 300 mM, pH 7.12) dont la composition est décrite en annexe 3. Les échantillons de sève sont ensuite vortexés puis le surnageant est transféré dans des tubes RMN de 5 mm de diamètre. Il est à noter qu'un pool de 3 ml a été constitué également en prélevant un volume de 100 µl de chaque échantillon. Ce mélange a été évaporé de la même façon que les échantillons et conservé à -80°C. Il servira ultérieurement à identifier les marqueurs potentiels grâce à des analyses complémentaires réalisées par RMN 2D au sein de la Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme.

2. Rappel sur les échantillons d'intestins moyens d'*A. mellifera*

Les intestins moyens ont été récupérés de façon à avoir un pool de 5 intestins pour chaque échantillon analytique, Ils ont ensuite subi une extraction biphasique permettant d'obtenir deux phases : une phase organique et une phase aqueuse. Cette dernière a servi à la réalisation de notre étude. La suite du protocole expérimental pour les analyses LC/MS et de RMN 1D est détaillée dans le rapport de Dany GOMIS (GOMIS, 2015).

C. Outils analytiques

1. Metabolic Profiler

Il s'agit d'une plate-forme dédiée à l'analyse du métabolisme et de mélanges complexes. Ce couplage LC-MS/RMN est constitué :

- d'une chaîne de chromatographie liquide de type Fast LC 1200 Series (Agilent) couplée à un spectromètre de masse ESI-TOF de type micrOTOF (Bruker)
- d'un spectromètre de RMN 500MHz AVANCE III équipé d'une sonde Prodigy TCI 5 mm et d'un passeur réfrigéré de type SampleJet (Bruker)
- d'un robot préparateur d'échantillons SamplePro tubes (Sias)

Le Metabolic profileur est piloté par différents logiciels d'acquisition : HyStar version 3.2 pour la chromatographie liquide, otofControl version 3.2 pour la spectrométrie de masse et TopSpin version 3.2 pour la résonance magnétique nucléaire.

2. Méthodes d'analyse

Les paramètres des méthodes d'analyses décrites ci-dessous concernent la sève de peuplier, ceux adoptés pour les abeilles sont similaires.

a. LC/MS

Les échantillons ont été randomisé avant l'analyse en utilisant le carré latin de Williams. Les pools représentatifs de l'ensemble des échantillons sont utilisés pour modéliser la décroissance d'intensité des ions liée à l'encrassement de la source du spectromètre de masse. Le mélange de standard de cinq molécules dont la masse est connue (colchicine, créatinine, aminoanthracène, tryptophane et phénylalanine) permet de vérifier la stabilité du système LC-MS.

❖ Paramètres de chromatographie liquide

- Colonne Acquity HSST3 150x2.1mm 1.8um (Waters)
- Volume d'échantillon injecté : 6ul
- Température du four réglée à 30°C
- Débit de la phase mobile de 0.2 ml/min
 - Gradient d'élution : détaillé dans le tableau 2
 - Phase A : eau + 0.1 % acide formique
 - Phase B : acétonitrile + 0.1 % acide formique

❖ Paramètres de masse

- Source ESI (Electrospray Ionization) en mode positif et négatif
- Tension du capillaire : 4500V
- Gaz de nébulisation (diazote: N₂) : 40.6 psi
- Gaz de séchage (N₂) : 9.1 L/min
- Temperature de désolvatation : 200°C
- Fenêtre de détection (fullscan) : de 50 à 1000 m/z

b. RMN

Expérience proton à une dimension avec présaturation du signal de l'eau : noesygppr1d

❖ Paramètres RMN

T: 300K (température pour l'expérience RMN)
TD: 64K
NS: 256 (nombre de scan)
D1: 4 sec
D8: 10 ms
SW: 20 ppm
AQ: 3.2 sec
SI: 128K

D. Extraction de données

Les paramètres d'extraction décrites ci-dessous concernent la sève de peuplier. L'extraction des données pour la partie des abeilles a été faite précédemment et de façon similaire.

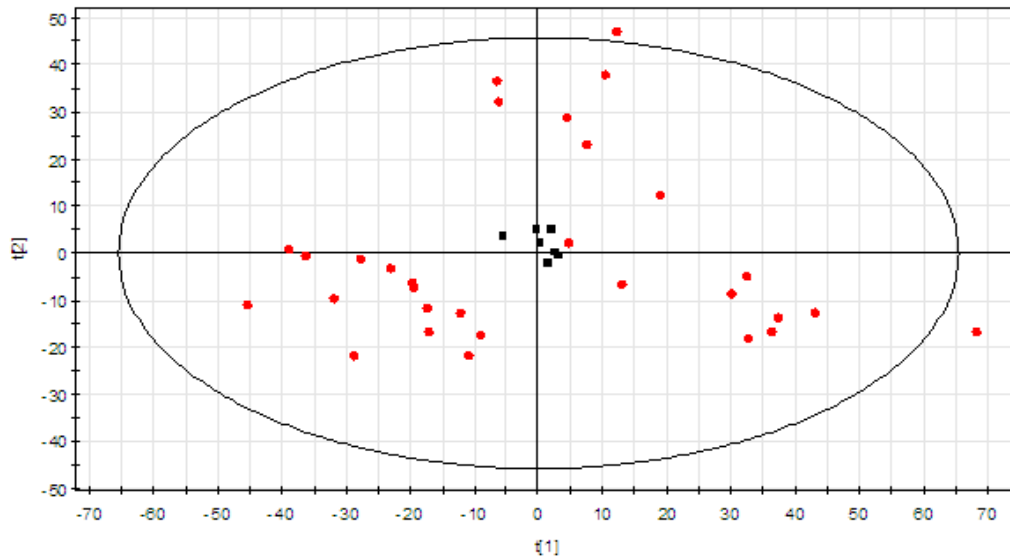


Figure 5 : Carte des individus (Score Scatter Plot) ; obtenue par l'analyse ACP pour la LC/MS en mode positif de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT2vsT6 en regardant les trois concentrations C0+ C1+C4. En rouge : les échantillons. En noir : les pools.

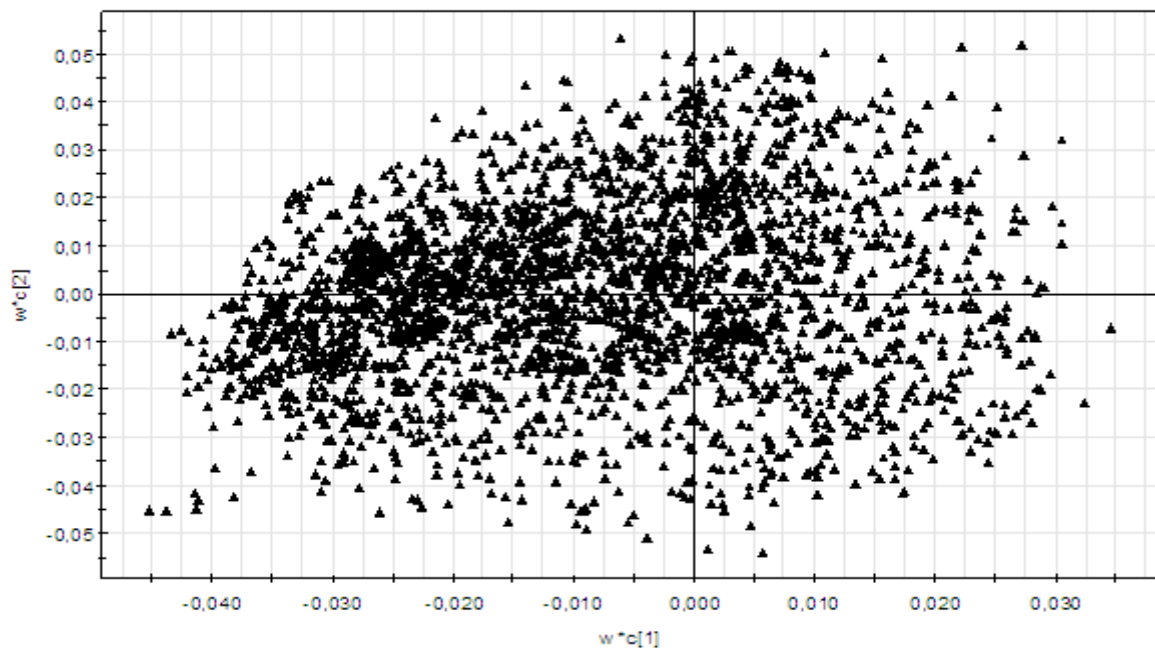


Figure 6 : Carte de corrélation; obtenue par l'analyse ACP pour la LC/MS en mode positif de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT2vsT6 en regardant les trois concentrations C0+ C1+C4. Les triangles noirs représentent les ions composants les différents échantillons.

1. Données de LC/MS

Les spectres obtenus par l'analyse LC-MS en mode positive et négative ont été traités avec le l'outil Galaxy en utilisant la méthode d'extraction « CentWave » et les paramètres suivants :

- Largeur de pics comprise entre 10 et 30 secondes
- Minimum de différence en m/z : 0,05 pour la MS positive et -0,001 pour la MS négative
- Bandwidth : 15
- Mzwidth : 0,05 (paramètre spécifique de l'appareil utilisé)

Les ions sont extraits de chaque échantillon de façon individuelle pour être ensuite alignés sur l'ensemble des échantillons analysés. Une étape d'annotation des ions est réalisée par la suite indiquant les formes ioniques ($M+H^+$ ou $M-H^-$), les adduits ($M+Na^+$ ou $M-Cl^-$) ou les fragments et isotopes (^{13}C) observés. Les données obtenues sont filtrées par les blancs et corrigées en terme du temps de rétention, avant d'être normalisées et filtrées ensuite par le coefficient de variation avec l'aide des pools. Après toutes ces étapes, une matrice comportant les différents ions ainsi que leurs intensités dans les différents échantillons est obtenue .

2. Données RMN

Après correction de la ligne de base à l'aide du logiciel Topspin des spectres obtenus par l'analyse RMN, ces derniers ont été également traités grâce à l'outil Galaxy permettant la visualisation et l'analyse des spectres. Cet outil fait appel au « Bucketting » qui vise à découper les spectres en tranches, définies dans ce cas à une largeur de 0.01 ppm, entre 0,8 et 10 ppm, en excluant la zone de l'eau située entre 4,7 et 4,88 ppm. Après normalisation des différents signaux obtenus par rapport à l'intensité totale, un fichier de « buckets » est généré. Ce dernier contient les intensités calculées pour chaque échantillon et dans chaque bucket. Cette matrice va servir à réaliser les analyses statistiques à l'aide du logiciel SIMCA-P+.

E. Analyse statistique

1. Analyse en composantes principales (ACP)

L'ACP est une méthode d'analyse de données multivariées sans *a priori*, c'est-à-dire que l'identité des échantillons n'est pas prédéfinie. Cette méthode permet d'avoir une vision sur la variabilité globale des échantillons dans un modèle statistique donné. Cette variabilité étant due à un ensemble de variables non corrélées appelées composantes principales (Lankakadurai et al., 2013). Les figures 5 et 6 représentent respectivement, à titre

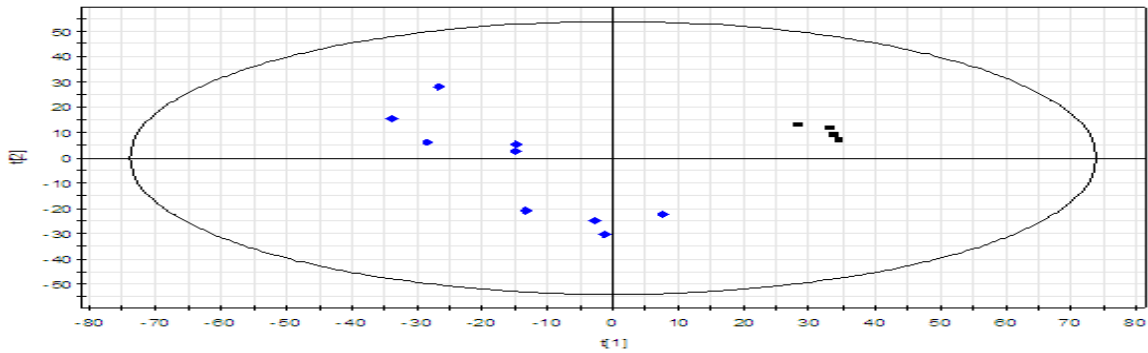


Figure 7 : Carte des individus (Score Scatter Plot) ; obtenue par l'analyse PLS-DA pour la LC/MS en mode positif de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT6 en regardant les deux concentrations C1+ C4. En noir : les échantillons appartenant à la classe T0. En bleu : les échantillons appartenant à la classe T6.

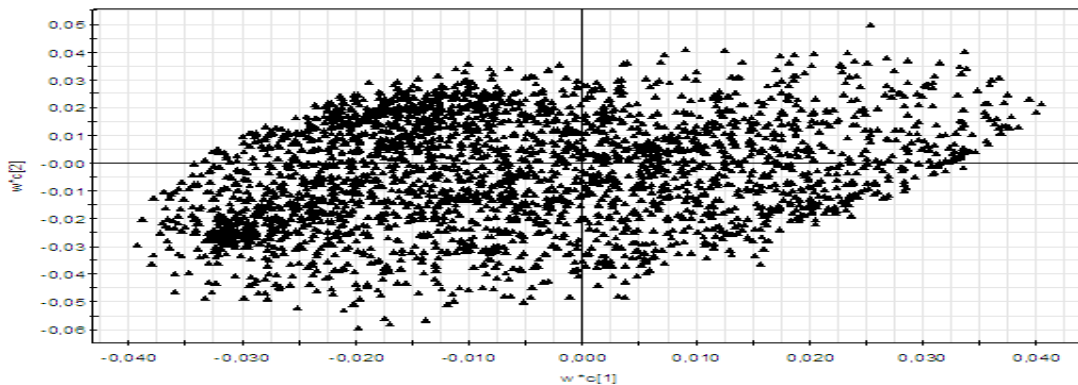


Figure 8 : Carte de corrélation; obtenue par l'analyse PLS-DA pour la LC/MS en mode positif de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT6 en regardant les deux concentrations C1+ C4. Les triangles noirs représentent les ions composants les différents échantillons.

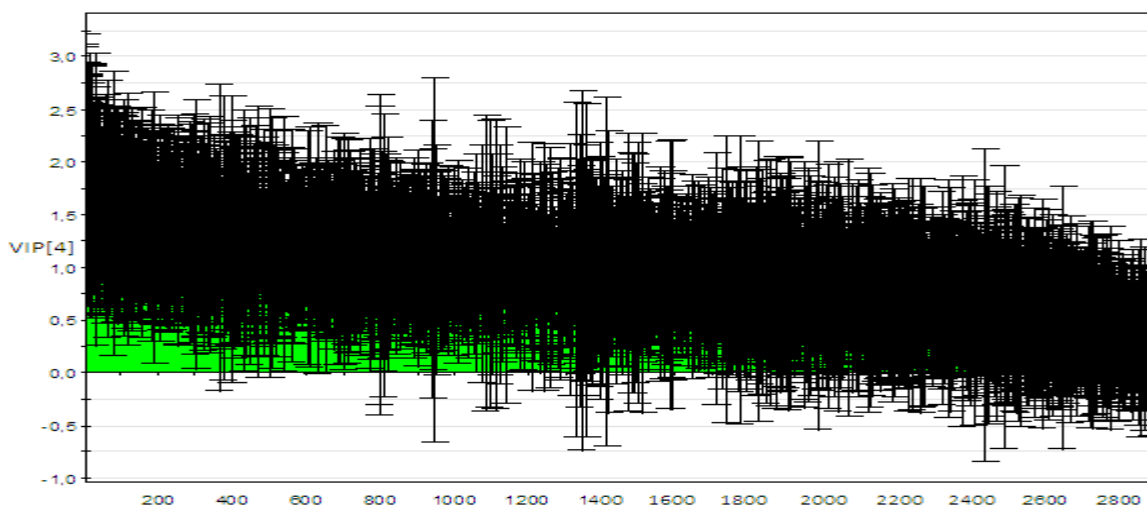


Figure 9 : Carte des VIP (VIP Plot) obtenue pour l'analyse LC/MS en mode positif de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT6 en regardant les deux concentrations C1+ C4. En vert les ions VIP et en gris les autres ions du modèle.

d'illustration, une carte de représentation des individus (Score Scatter Plot) et une carte de corrélation obtenues par ACP lors de l'analyse LC/MS en mode positif de la sève de peuplier. La première carte renseigne sur la dispersion des échantillons tandis que la seconde montre la distribution des ions composant chacun des échantillons.

2. Analyse PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis)

La PLS-DA est une méthode d'analyse statistique avec *a priori* ; c'est-à-dire que les échantillons sont regroupés dans différentes classes qui sont définies chacune à partir d'échantillons identiques : échantillons ayant subits les mêmes conditions expérimentales.

Deux paramètres générés par ces méthodes statistiques permettent d'évaluer dans un premier temps la robustesse des modèles statistiques :

- R² : capacité d'explication du modèle
- Q² : capacité de prédiction du modèle, ce paramètre est primordial dans le sens où un modèle est considéré comme prédictif si la valeur de sa capacité de prédiction est égale ou supérieure à 0,4). Les modèles sont validés ensuite par deux tests statistiques :
- Test de permutation : des permutations d'échantillons sont réalisées entre les différentes classes du modèle. Ce dernier est considéré comme fiable si les valeurs de Q² des modèles aléatoires générés sont inférieures à celles du modèle initial étudié ce qui indique que la variabilité observée entre les différentes classes n'est pas due au hasard.
- Diagramme « Observed » vs « Predicted » : Ce test permet de bien visualiser la discrimination entre les classes du modèle statistique étudié ainsi que la cohérence entre les différents échantillons constituant chacune de ses classes.

Les figures 7 et 8 sont des exemples respectifs d'une carte des individus et d'une carte de corrélation obtenues par analyse PLS-DA lors de l'analyse LC/MS en mode positif de la sève de peuplier.

Une fois un modèle statistique validé, une sélection de VIP (Variables Importants) correspondants aux ions ou aux buckets discriminants est réalisée. Ce sont ces éléments expliquant la variabilité entre les classes du modèle qui seront identifiés et quantifiés dans la suite de l'approche métabolomique. La figure 9 est une illustration de la carte des VIP (VIP Plot) obtenue par PLS-DA lors de l'analyse LC/MS en mode positif de la sève de peuplier.

Mon travail sur le projet de sève de peuplier s'est arrêté à cette étape.

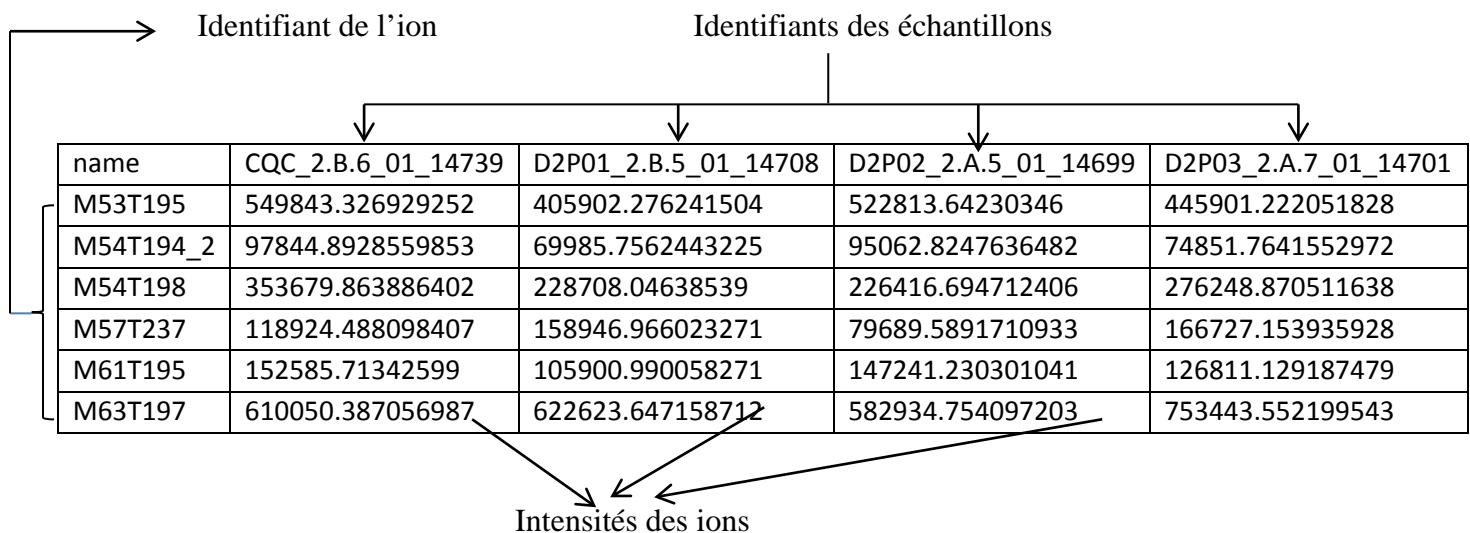


Figure 10 : Une partie de la matrice de données générée après extraction des données par LC/MS en mode positif des échantillons de sève de peuplier.

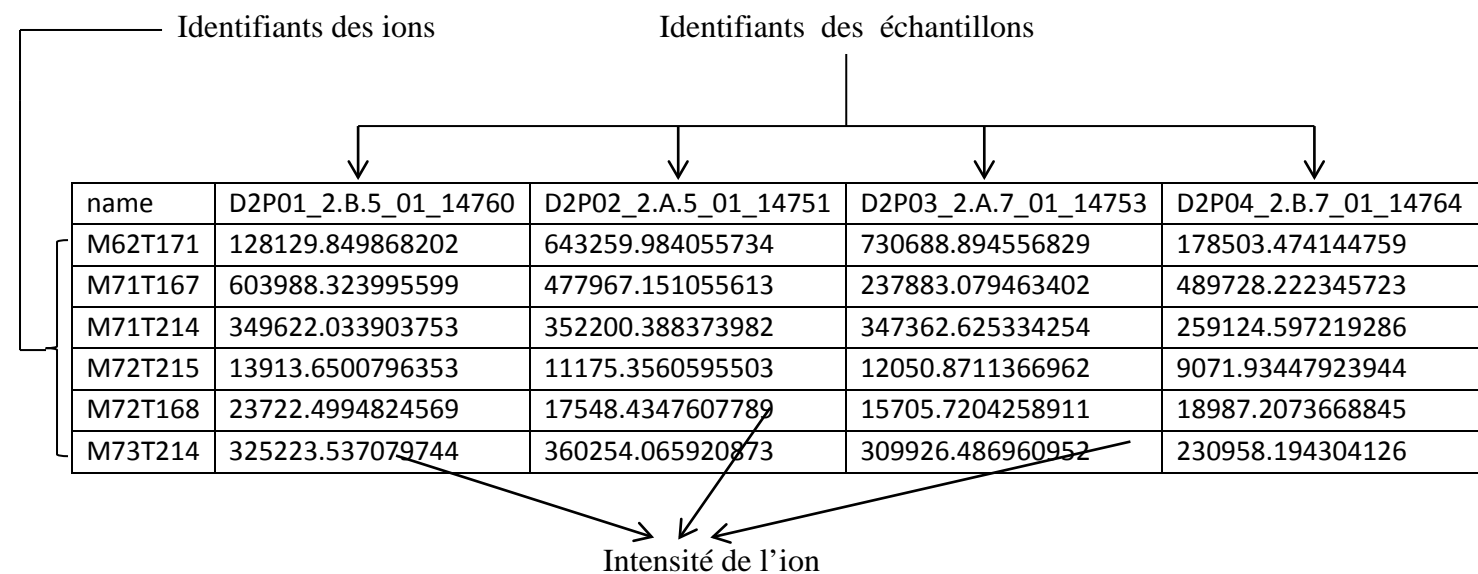


Figure 11 : Une partie de la matrice de données obtenue après extraction des données LC/MS en mode négatif des échantillons de sève de peuplier.

F. Identification et quantification des biomarqueurs

Elle consiste en l'interrogation de bases de données spécifiques telles que MassBank ou BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank), afin d'identifier les molécules correspondants aux ions et buckets discriminants mis en évidence par les analyses statistiques. Une étude basée sur les ratios d'intensités est réalisée ensuite pour les différentes molécules afin d'évaluer la variation de leur quantité en fonction du modèle étudié.

G. Recherche dans les bases de données

A la suite des identifications des biomarqueurs discriminants, que ce soit de manière certaine ou putative, j'ai entrepris une recherche dans la base de données KEGG. L'objectif était de vérifier si la molécule identifiée, est bien présente chez l'organisme étudié *A. mellifera* et si celui-ci possède bien les enzymes permettant de la métaboliser. Des voies métaboliques impliquant ces biomarqueurs peuvent ainsi être identifiées permettant parfois la mise en évidence de liens directs entre les molécules identifiées. Cette recherche a également été menée sur *N. ceranae* et sur l'insecte *Drosophila melanogaster*. L'intérêt d'inclure ces deux espèces dans la recherche est que, d'une part, *N. ceranae* est présent dans les intestins lors de l'extraction des métabolites, et que, d'autre part, *D. melanogaster* est un insecte modèle dont le génome est beaucoup mieux décrit que celui de l'abeille.

V. Résultats

A. Sève de peuplier

1. Analyses métabolomiques et extraction des données

a. LC/MS

L'analyse des sèves par LC/MS en mode positif et négatif a permis d'obtenir 30 spectres pour chaque mode d'ionisation (2 spectres par échantillon). L'extraction des données obtenues sous Galaxy a permis d'obtenir une matrice contenant les différents ions présents dans les trente échantillons testés en indiquant l'intensité de chaque ion dans chacun des échantillons. Au total, 2889 et 1671 ions ont été caractérisés respectivement en mode positif et négatif (figure 10 et 11).

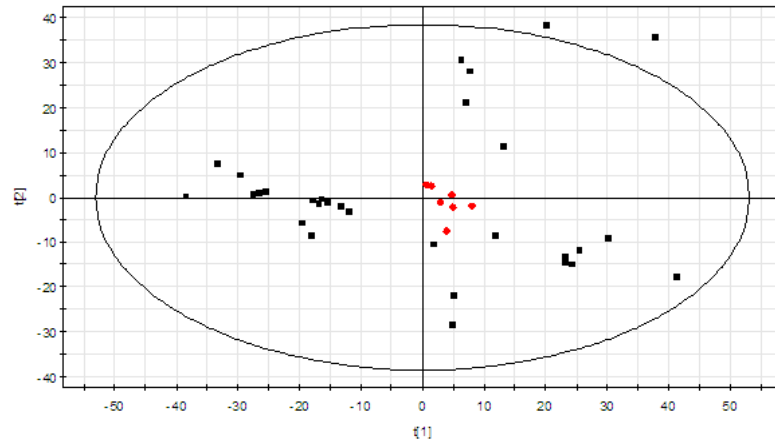


Figure 12 : Carte des individus (Score Scatter Plot) ; obtenue par l'analyse ACP pour la LC/MS en mode négatif de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT2vsT6 en regardant les trois concentrations C0+ C1+C4. En noir : les échantillons. En rouge : les pools.

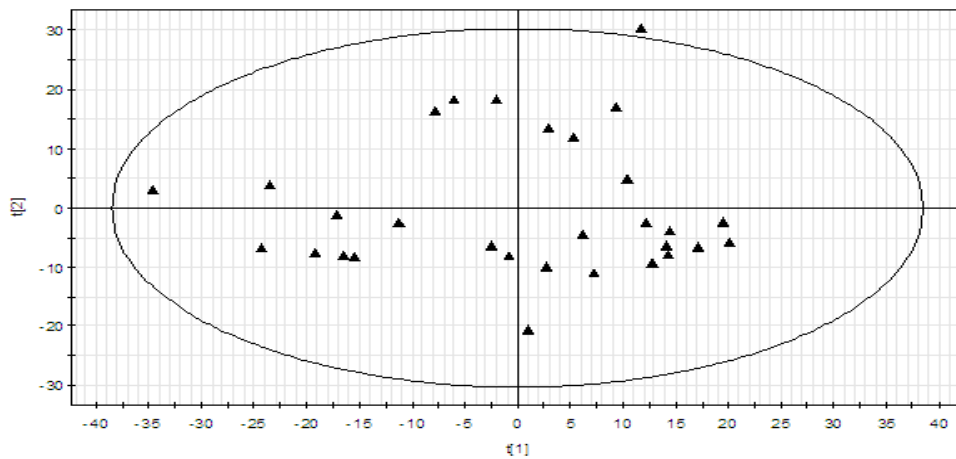


Figure 13 : Carte des individus (Score Scatter Plot) ; obtenue par l'analyse ACP pour l'analyse RMN de la sève de peuplier ; du modèle T0vsT2vsT6 en regardant les trois concentrations C0+ C1+C4. Les triangles noirs représentent les échantillons de sève.

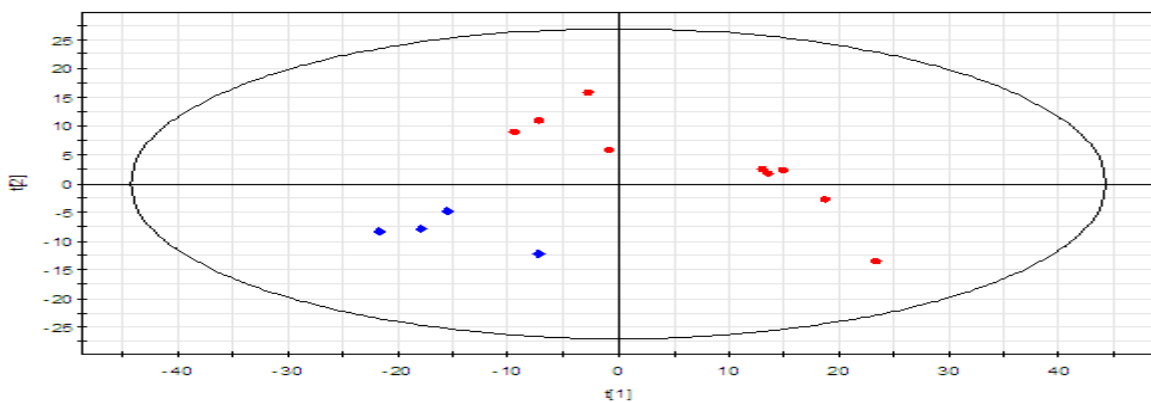


Figure 14 : Carte des individus (Score Scatter Plot) ; obtenue par l'analyse PLS-DA pour l'analyse RMN ; du modèle T0vsT6 en regardant les deux concentrations C1+ C4. En bleu les échantillons appartenant à la classe T0. En rouge : les échantillons appartenant à la classe T6.

b. RMN

L'analyse RMN des sèves a généré également un ensemble de 30 spectres dont le traitement sous Galaxy a permis d'obtenir une matrice contenant 901 buckets avec leur intensités dans chacun des trente échantillons analytiques.

2. Analyse statistique

Des analyses statistiques multivariées (ACP et PLS-DA) ont été réalisées par le logiciel SIMCA-P+ sur chacune des matrices générées lors de l'extraction. L'ensemble de 64 modèles statistiques ont été testés pour chaque type d'analyse (RMN et LC/MS en mode positif et négatif).

a. Analyse ACP

L'analyse ACP, prenant l'exemple du modèle T0vsT2vsT6 en regardant les trois concentrations C0+ C1+C4 a permis d'obtenir la carte de représentation des individus (Score Scatter Plot) représentée dans la figure 5 pour la LC/MS en mode positif. T0, T2 et T6 sont respectivement les classes contenant les sèves de peuplier récoltées à t0, à t+2j et t+3j. C0, C1 et C4 correspondent respectivement aux concentrations d'azote minéral 0, 1 et 4 mM apportés aux plantes. Cette carte montre la dispersion globale des échantillons ainsi qu'un bon regroupement des pools au centre de la carte. En effet, les pools étant représentatifs de tous les échantillons, ils doivent être regroupés au milieu et proches les uns des autres. La position des différents échantillons ainsi que des pools est dû à la dispersion des ions présents dans chacun d'entre eux comme le montre la carte de corrélation (Loading Scatter Plot) présentée sur la figure 6. Ce même résultat est obtenu pour ce même modèle pour la LC/MS en mode négatif (figure 12) et pour la RMN (figure 13).

b. Analyse PLS-DA

Pour le modèle T0vsT6 par exemple, L'analyse PLS-DA des deux concentrations C1+C4 pour la LC/MS en mode positif a permis d'obtenir une carte d'individus montrant une nette discrimination entre ces deux classes vis-à-vis des deux concentrations testées (figure 7). Cette discrimination a été également mise en évidence pour les analyses LC/MS en mode négatif et pour la RMN (figure 14). Le tableau 1 représente les paramètres statistiques des modèles qui ont été retenus pour la suite de l'étude parmi les 64 testés. En effet, l'analyse

Tableau 1 : Valeurs de R2 (capacité d'explication du modèle), Q2 (capacité de prédiction du modèle) et CP (nombre de composantes principales) des modèles statistiques retenus par analyse LC/MS en mode positif et négatif et par RMN des échantillons de sève de peuplier. C0 = plantes n'ayant pas reçu d'azote minéral ; C1= plantes ayant reçu 1mM d'azote minéral ; C4 = plantes ayant reçu 4mM d'azote minéral ; T0 = plantes récoltés à T initial ; T2 = plantes récoltées 2 jours après l'apport en azote minéral ; T6 = plantes récoltées 6 jours après l'apport en azote minéral.

Modèle	Technique	MS+			MS-			RMN		
		R2	Q2	C.P	R2	Q2	C.P	R2	Q2	C.P
C0vsC1	T2+T6	0,539	0.109	1	0,535	0,124	1	0,993	0,746	4
T0vsT2	C0	0,999	0,872	3	1	0,969	3	0,999	0,913	3
T0vsT2	C4	0,996	0,828	2	0,988	0,634	2	0,984	0,617	2
T0vsT2	C1+C4	0,998	0,841	3	0,997	0,769	3	0,995	0,804	3
T0vsT2	C0+C1+C4	0,898	0,674	2	0,994	0,824	4	0,591	0,304	1
T0vsT2vsT6	C0+C1+C4	0,899	0,597	4	0,911	0,556	5	0,989	0,726	7
T0vsT2vsT6	C0	0,349	0,131	1	0,385	0,24	1			0
T0vsT2vsT6	C1				0,367	0,0493	1	0,992	0,704	4
T0vsT2vsT6	C4	0,988	0,619	4			0			0
T0vsT2vsT6	C0+C1	0,965	0,597	5			0	0,992	0,777	6
T0vsT2vsT6	C1+C4	0,988	0,693	6			0	0,992	0,733	6
T0vsT2vsT6	C0+C4	0,934	0,402	4	0,295	0,154	1			0
T0vsT6	C0	0,988	0,712	1	0,33	0,645	1	0,884	0,43	1
T0vsT6	C1	0,998	0,887	3	0,988	0,602	2	0,999	0,934	3
T0vsT6	C4	0,905	0,596	1	0,774	0,271	1			0
T0vsT6	C1+C4	0,952	0,733	2	0,994	0,846	4	0,992	0,772	3
T0vsT6	C0+C1+C4	0,929	0,753	2	0,993	0,84	4	0,998	0,801	4
T2vsT6	C1	0,752	0,0585	1			0	0,997	0,886	3
T2vsT6	C4	0,999	0,733	3			0			0
T2vsT6	C1+C4	0,791	0,522	1	0,664	0,129	1	0,994	0,897	4
T2vsT6	C0+C1+C4	0,639	0,399	1	0,995	0,756	5	0,988	0,786	4

statistique de ces modèles montre une nette séparation entre les classes les constituants. Ces modèles sont :

C0vsC1 à T2+T6

T0vsT2, C0 ; C4 ; C1+C4 ; C0+C1+C4

T0vsT2vsT6, C0 ; C1 ; C4 ; C0+C1 ; C1+C4 ; C0+C4 ; C0+C1+C4

T0vsT6, C0 ; C1 ; C4 ; C1+C4 ; C0+C1+C4

T2vsT6, C1 ; C4 ; C1+C4 ; C0+C1+C4

Mon travail sur la sève de peuplier s'est arrêté là pour prendre la suite sur le deuxième projet concernant les abeilles.

3. Recherche dans les Bases de données pour le projet abeilles

Après identification des biomarqueurs discriminants dans les différents modèles analysés statistiquement (annexe 4), travail réalisé antérieurement à mon stage), mon travail a consisté à rechercher dans la base de données KEGG les différentes voies métaboliques impliquant chacun de ces métabolites qu'ils soient identifiés de manière certaine ou putative. Cette recherche s'est focalisée sur 1 modalité simple et 2 modalités complexes incluant en tout 104 métabolites.

-C vs N : modalité simple permettant de voir le profil métabolique dressé suite à l'infection par *N.ceranae* (C : Contrôle, N : infection par *N. ceranae*).

- N vs F vs NF et N vs F+ vs NF+: modalités complexes (infection par *N. ceranae* (N), intoxication au fipronil à 0.5µg/L (F), intoxication au fipronil à 1µg/L (F+) et stress combiné (NF ou NF+)).

a. Modalité CvsN :

L'analyse KEGG pour cette modalité a été réalisée à partir de 65 métabolites identifiés lors des différentes analyses. Ceci nous a permis d'identifier 40 voies métaboliques. Suite au grand nombre de voies métaboliques identifiées en prenant en considération tous les métabolites identifiés et sans forcément l'établissement de liens évidents entre eux, nous avons décidé de poursuivre notre travail en ne s'intéressant qu'aux voies métaboliques impliquant les métabolites identifiés de manière certaine. Les métabolites putatifs ont été conservés uniquement pour voir s'ils permettent de faire un lien éventuel entre les différents métabolites. De plus, une intégration dans la recherche sur KEGG des deux espèces *N. ceranae* et *D. melanogaster* a été entreprise pour ces biomarqueurs discriminants. Suite à ceci,

Tableau 2 : Liste des Métabolites certains identifiés chez *Apis mellifera* dans la modalité CvsN et les différentes voies métaboliques dans lesquelles ils sont impliqués chez (i) *Apis mellifera* (ii) *Drosopila melanogaster* (iii) *Nosema ceranae*.

Métabolites certains identifiés dans CvsN	Voies métaboliques identifiées chez <i>Apis mellifera</i>	Voies métaboliques identifiées chez <i>Drosopila melanogaster</i>	Voies métaboliques identifiées chez <i>Nosema ceranae</i>
β -L-Alanine	Métabolisme de la taurine et l'hypotaurine ; système de relais de soufre; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; métabolisme du sélénium ; métabolisme du carbone ; biosynthèse des acides aminés; transporteurs ABC ; métabolisme de la cystéine et de la méthionine	Métabolisme de la taurine et l'hypotaurine ; système de relais de soufre; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; métabolisme du sélénium; métabolisme du carbone ; biosynthèse des acides aminés; transporteurs ABC ; métabolisme de la cystéine et de la méthionine	Biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; métabolisme du sélénium; métabolisme du carbone ; biosynthèse des acides aminés; métabolisme de la cystéine et de la méthionine
α -D-Tréhalose	Métabolisme de l'amidon et du saccharose; transporteurs ABC	Métabolisme de l'amidon et du saccharose ; transporteurs ABC	Métabolisme de l'amidon et du saccharose ; biosynthèse des métabolites secondaires
β -D-Glucose	Glycolyse / Gluconéogenèse; voie des pentoses phosphates	Glycolyse / Gluconéogenèse; voie des pentoses phosphates	Glycolyse / Gluconéogenèse; voie des pentoses phosphates
N-w-acetylhistamine	Métabolisme de l'histidine	Métabolisme de l'histidine	
Histamine	Métabolisme de l'histidine ; Interaction neuroactive ligand-récepteur	Métabolisme de l'histidine ; Interaction neuroactive ligand-récepteur	Biosynthèse des métabolites secondaires
N-acétyl-L-phénylalanine	Métabolisme de la phénylalanine	Métabolisme de la phénylalanine	

le nombre de voies métaboliques a été réduit à 16 voies métaboliques pour la modalité CvsN identifiées par le biais des 6 biomarqueurs discriminants suivants (tableau 2):

La β -L-Alanine, l' α -D-Tréhalose, le β -D-Glucose, la N-w-acetylhistamine, l'histamine et la N-acétyl-L-phénylalanine.

La quantification par analyse de ratio N/C montre une diminution pour l'histamine et une augmentation pour la β -L-Alanine, l' α -D-Tréhalose, le β -D-Glucose et la N-acétyl-L-phénylalanine chez les abeilles infectées pour les 3 temps d'analyse (j0, j6 et j13). En ce qui concerne la N-w-acetylhistamine, sa quantité diminue chez ce groupe à j0 et j6 pour ensuite augmenter à j13.

❖ Exemple de la voie de la glycolyse/gluconéogenèse (annexe 5)

Cette voie a été mise en évidence par le β -D-Glucose identifié comme parmi les biomarqueurs discriminants pour la modalité CvsN. Dans cette voie, un lien direct entre le β -D-Glucose et le L-lactate, métabolite identifié putativement, est établi par une succession d'enzymes identifiées dans la base de données d'*A. mellifera*. Cette voie montre également l'interaction avec deux autres voies identifiées : la voie du métabolisme de l'amidon et du sucrose intervenant par le biais de l' α -D-Glucose 1-Phosphate et la voie des pentoses phosphates faisant intervenir l' α -D-Glucose 6-P et le glycéraldéhyde 3-P.

b. Modalité NvsFvsNF

Dans cette modalité, 6 biomarqueurs ont été identifiés de manière certaine :

La β -L-Alanine, le α -D-Tréhalose, le L-Aspartate, le formiate, l'histamine et la D-Proline.

La quantification a montré une diminution dans la quantité de la proline et le formiate et une augmentation dans celle de la β -L-Alanine, le L-Aspartate et l'histamine chez les abeilles doublement stressées par rapport aux abeilles infectées ou intoxiquées. Pour l' α -D-Tréhalose, le double de stress augmente la quantité de ce métabolite chez les abeilles par rapport à l'intoxication au fipronil et la diminue par rapport à l'infection par *N.ceranae*.

Ces métabolites identifiés, excepté le formiate, ont permis la mise en évidence de 21 voies métaboliques (tableau 3) dont les 13 suivantes sont en commun avec la modalité CvsN :

Les transporteurs ABC, le métabolisme de L'alanine, l'aspartate et du glutamate, la biosynthèse des aminoacyl-ARN, la biosynthèse des acides aminés, le métabolisme du carbone, le métabolisme de la cystéine et de la méthionine, le métabolisme de l'histidine, l'interaction neuroactive du ligand-récepteur, le métabolisme du sélénium, le métabolisme de

Tableau 3 : Liste des Métabolites certains identifiés chez *Apis mellifera* dans la modalité NvsFvsNF et les différentes voies métaboliques dans lesquelles ils sont impliqués chez (i) *Apis mellifera* (ii) *Drosopila melanogaster* (iii) *Nosema ceranae*.

Métabolites certains identifiés dans NvsFvsNF	Voies métaboliques identifiées chez <i>Apis mellifera</i>	Voies métaboliques identifiées chez <i>Drosopila melanogaster</i>	Voies métaboliques identifiées chez <i>Nosema ceranae</i>
β -L-Alanine	Métabolisme de la taurine et l'hypotaurine ; système de relais de soufre; métabolisme de l'alanine, l'aspartate et du glutamate; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; métabolisme du sélénium ; métabolisme du carbone ; biosynthèse des acides aminés; transporteurs ABC ; métabolisme de la cystéine et de la méthionine	Métabolisme de la taurine et l'hypotaurine ; système de relais de soufre; métabolisme de l'alanine, l'aspartate et du glutamate; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; métabolisme du sélénium; métabolisme du carbone ; biosynthèse des acides aminés; transporteurs ABC ; métabolisme de la cystéine et de la méthionine	biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; Selenocompound metabolism ; métabolisme du carbone ; biosynthèse des acides aminés; métabolisme de la cystéine et de la méthionine
α -D-Tréhalose	Métabolisme de l'amidon et du saccharose; transporteurs ABC	Métabolisme de l'amidon et du saccharose ; transporteurs ABC	Métabolisme de l'amidon et du saccharose ; biosynthèse des métabolites secondaires
Histamine	Métabolisme de l'histidine ; Interaction neuroactive ligand-récepteur	Métabolisme de l'histidine ; Interaction neuroactive ligand-récepteur	Biosynthèse des métabolites secondaires
L-Aspartate	métabolisme de l'alanine, l'aspartate et du glutamate; métabolisme de la glycine, la serine et de la thréonine ; biosynthèse de la lysine ; métabolisme de l'histidine ; métabolisme de l'acide 2-Oxocarboxylique ; Biosynthèse des acides aminés ; interaction neuroactive ligand-récepteur; métabolisme de la bêta-Alanine ; métabolisme du nicotinate et du nicotinamide ; biosynthèse du pantothenate et du coenzyme-A ; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; biosynthèse de l'arginine ; métabolisme du carbone ; transporteurs ABC ; métabolisme de la Cystéine et de la méthionine	métabolisme de l'alanine, l'aspartate et du glutamate; métabolisme de la glycine, la serine et de la thréonine ; biosynthèse de la lysine ; métabolisme de l'histidine ; métabolisme de l'acide 2-Oxocarboxylique ; Biosynthèse des acides aminés ; interaction neuroactive ligand-récepteur; beta-Alanine metabolism ; métabolisme du nicotinate et du nicotinamide ; biosynthèse du pantothenate et du coenzyme-A ; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; biosynthèse de l'arginine métabolisme du carbone ; transporteurs ABC ; métabolisme de la Cystéine et de la méthionine	Biosynthèse des acides aminés ; métabolisme du nicotinate et du nicotinamide ; biosynthèse des aminoacyl-ARNt ; métabolisme du carbone ; métabolisme de la Cystéine et de la méthionine ; biosynthèse des antibiotiques ; métabolisme du ciano-amino acide
La D-Proline	Métabolisme de l'arginine et de la proline	Métabolisme de l'arginine et de la proline	Métabolisme général
Formiate			

l'amidon et du sucrose, le système de relais de soufre et le métabolisme de la taurine et de l'hypotaurine.

La voie de métabolisme du carbone et la voie de biosynthèse des acides aminés montrent un lien direct entre les 2 biomarqueurs : la β -L-Alanine et le L-Aspartate impliqués tous les 2 dans ces 2 voies métaboliques.

❖ Exemple de La voie de métabolisme du carbone

Un lien direct est mis en évidence dans cette voie entre la β -L-Alanine et le L-Aspartate impliquant uniquement des enzymes appartenant à *A. mellifera*. Le glutamate et le méthylaspartate identifiés ici putativement n'interviennent pas dans cette liaison.

c. Modalité NvsF+vsNF+

Dans cette modalité complexe, 3 biomarqueurs seulement ont été identifiés :

La β -L-Alanine, le L-Aspartate et le formiate.

La quantification des 3 biomarqueurs identifiés dans cette modalité est la même que pour la modalité NvsFvsNF.

La β -L-Alanine, le L-Aspartate ont permis la mise en évidence de 19 voies métaboliques qui sont toutes en commun avec la modalité NvsFvsNF.

❖ Exemple de la voie de biosynthèse des acides aminés (figure 15)

Cette voie fait intervenir les 2 métabolites certains : la β -L-Alanine et le L-Aspartate qui sont liés directement par des enzymes appartenant à *A. mellifera*. Cette liaison ne fait pas appel à la lysine et au glutamate identifiés putativement.

VI. Discussion, conclusion générale, perspectives

A. La sève de peuplier

L'objectif scientifique de ce projet était d'identifier les biomarqueurs caractéristiques de la réponse à l'apport de l'azote minéral avant le débourrement dans la sève xylémique chez le peuplier. Des hypothèses liées à la modification de la remobilisation de réserves azotées et ou signalitiques (hormones) avaient été avancées pour expliquer une meilleure reprise de croissance chez des jeunes feuilles lors du débourrement. Mon rôle, dans ce projet, a été de participer à l'analyse technique puis statistique des échantillons biologiques afin de

BIOSYNTHESIS OF AMINO ACIDS

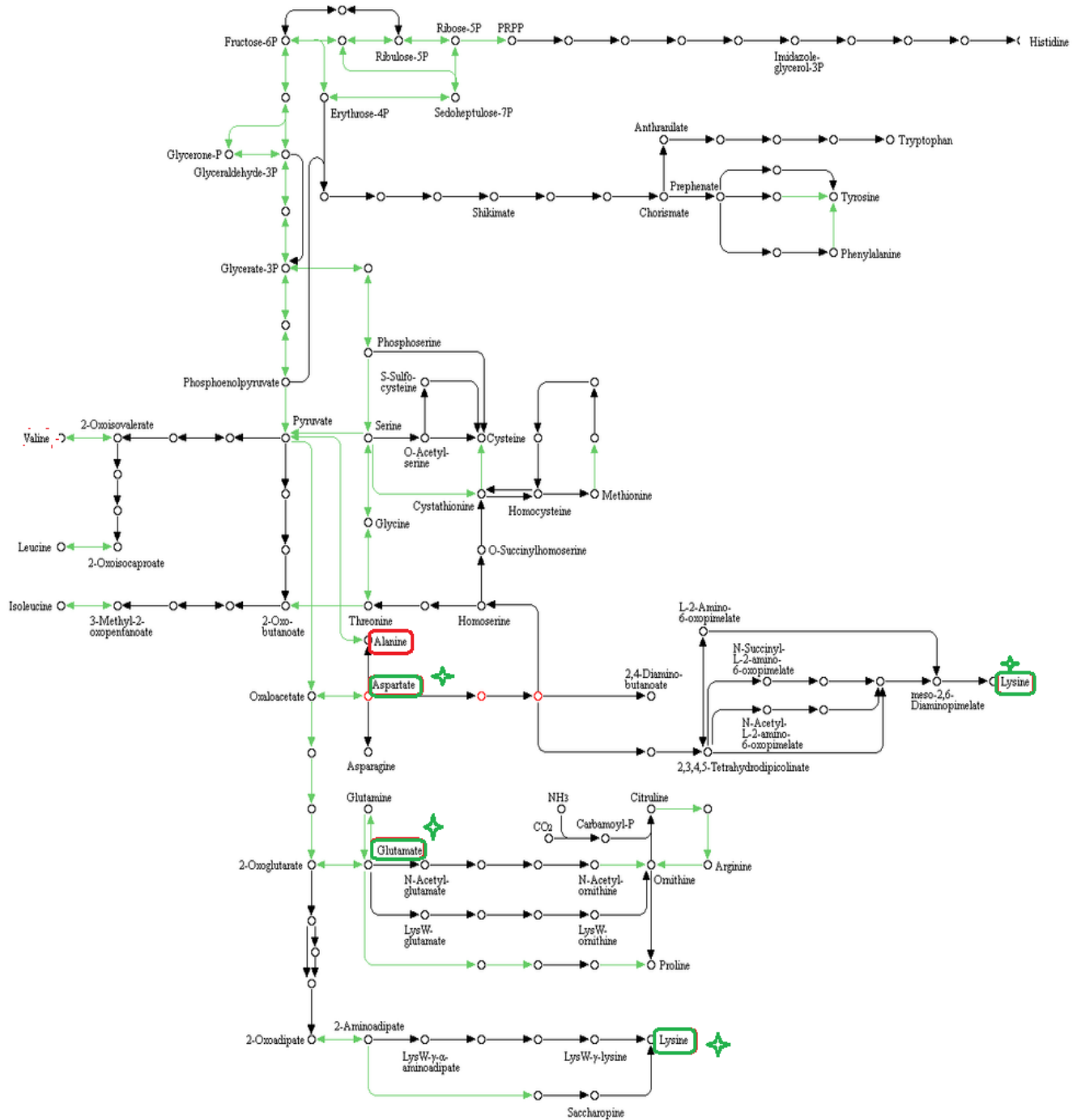


Figure 15: Représentation schématique de la voie de la biosynthèse des acides aminés identifiée dans la modalité NvsFvsNF chez *Apis mellifera*. Cette voie implique la β-L-Alanine et le L-Aspartate identifiés d'une manière certaine (métabolites encadré en rouge) et La lysine et le glutamate identifiés putativement (métabolites encadré en vert).

discriminer des biomarqueurs. Cette identification n'a pas pu être réalisée en raison d'écueils techniques à résoudre et d'une fouille statistique significative.

D'un point de vue technique, une grande partie de mon travail a consisté en l'optimisation des paramètres d'extraction de données sous Galaxy pour l'analyse LC/MS en mode positif. En effet, suite à un problème analytique dû à la colonne utilisée lors de cette analyse, le temps de rétention fluctuait de manière importante. Quatorze modalités d'extraction ont été donc testées en faisant varier les paramètres qui jouent sur le temps de rétention afin de résoudre au mieux cette problématique. Les paramètres qui semblaient permettre d'obtenir de meilleurs résultats ont été retenus, ce sont ceux notés dans la partie matériels et méthodes. Cette étape a été chronophage au regard de la durée du stage et de l'objectif qui m'était fixé. L'utilisation d'un outil d'aide à la décision permettant l'optimisation des paramètres serait d'une grande utilité d'un point de vue performance et gain du temps. L'optimisation de chacune des étapes de la métabolomique est importante. En effet, celles-ci étant étroitement liées, leur amélioration permet d'éviter l'accumulation des biais analytiques et donc l'obtention de meilleurs résultats.

D'un point de vue statistique, 64 modèles ont été testés pour chaque type d'analyse (RMN et LC/MS en mode positif et négatif), seulement 21 ont été retenus et peuvent potentiellement nous informer par la suite sur l'effet de la concentration en azote minéral apportée au peuplier sur sa capacité du débourement. Les modèles retenus sont :

-C0vsC1 à T2+T6

-T0vsT2, C0 ; C4 ; C1+C4 ; C0+C1+C4

-T0vsT2vsT6, C0 ; C1 ; C4 ; C0+C1 ; C1+C4 ; C0+C4 ; C0+C1+C4

-T0vsT6, C0 ; C1 ; C4 ; C1+C4 ; C0+C1+C4

-T2vsT6, C1 ; C4 ; C1+C4 ; C0+C1+C4

Mais avant de tirer des résultats concrets et de se lancer dans les étapes de l'identification des biomarqueurs et dans les interprétations biologiques, il est important de réaliser des tests de confirmation de ces modèles afin de vérifier leur robustesse tel le test de permutation et la réalisation du diagramme « Observed » vs « Predicted ». Il est à noter que malgré le grand nombre de modèles statistiques testés sur la sève de peuplier, on est resté limité dans l'étude exhaustive de l'ensemble des modalités contenu du faible nombre d'échantillons et son déséquilibre entre les différentes modalités. Il serait intéressant donc de refaire la manipulation en augmentant le nombre d'échantillons par modalité. On pourrait par exemple ne faire la récolte de la sève qu'à T0 et T6 en prenant plus de plantes par modalité.

Malgré ces difficultés, il ressort quelques tendances qui doivent être confirmées : Les analyses statistiques ont montré un effet « temps » qui n'était pas attendu, mais le manque de données et

l'absence de paramètres permettant d'expliquer cet effet ne nous a pas permis d'approfondir l'étude concernant ce facteur.

En s'appuyant sur les premiers résultats de cette étude, il semblerait opportun d'approfondir l'effet de la concentration en azote sur la composition de la sève xylémique. Ainsi, ceci peut se faire en analysant plus finement les trois concentrations C0, C1 et C4 au sixième jour par exemple en augmentant le nombre d'échantillons. Sinon, on pourrait chercher à voir l'effet « temps » uniquement en focalisant sur les deux concentrations C0 et C4 durant T1, T2 et T6 avec toujours plus d'échantillons. La deuxième proposition pourrait être intéressante à envisager au regard de l'effet temps fort observé lors des analyses statistiques, à condition d'avoir plus de données qui pourrait nous aider à expliquer ce modèle.

B. A.mellifera

L'objectif scientifique de ce projet était de caractériser la réponse métabolomique de l'abeille domestique *A. mellifera* suite à une infection par la microsporidie *N. ceranae* et/ou une intoxication par l'insecticide fipronil. Plusieurs modèles statistiques avaient été analysés préalablement à mon travail (annexe 4). Dans le cadre de mon stage, j'ai poursuivi l'étude de 3 modalités qui semblaient être les plus intéressantes :

-C vs N : modalité simple permettant d'étudier le profil métabolique dressé suite à l'infection par *N. ceranae*.

-N vs F vs NF et N vs F+ vs NF+ : modalités complexes, permettant de comparer les profils métaboliques en fonction d'un ou de 2 stress combinés (*N. ceranae* et/ou fipronil à 2 doses différentes).

A partir des tableaux Excel générés pour chaque type d'analyse (LC/MS en modes positif et négatif et RMN), j'ai pris en main les différentes données acquises. La recherche dans chaque tableau des biomarqueurs « certains » et « putatifs » et cela pour chaque modalité étudiée est une étape qui a demandé beaucoup d'attention et de temps. L'utilisation d'un seul tableau regroupant tous les métabolites certains d'un côté et ceux putatifs de l'autre, en récapitulant les différentes données issues des 3 types d'analyses pour chacun des métabolites pourrait faciliter grandement la tâche. Pour les trois modalités que j'ai étudiées, 9 biomarqueurs discriminants et 95 biomarqueurs putatifs ont été identifiés. Les métabolites certains ont permis la mise en évidence de 24 voies métaboliques qui pourraient être affectés par l'un ou l'autre facteur de stress. Malgré l'ensemble des essais, la mise en évidence de liens directs

entre les biomarqueurs discriminants n'a pu se faire que dans seulement 2 des 24 voies. Ce lien a fait intervenir uniquement des enzymes d'*A.mellifera* et sans intervention de métabolites incertains. Les 2 voies concernées, identifiées dans les deux modalités complexes N vs F vs NF et N vs F+ vs NF+, sont (i) la voie du métabolisme du carbone et (ii) la voie de biosynthèse des acides aminés impliquant tous les 2 la L-Alanine et le L-Aspartate.

Cette problématique est due au fait que peu d'informations sont disponibles sur l'identité des biomarqueurs. Il serait donc important d'approfondir la recherche sur l'identité des métabolites incertains. Des analyses RMN bidimensionnelles et LC-MS/MS permettant l'identification exacte des biomarqueurs peuvent par exemple être envisagées. Par contre ces techniques ont certaines limites, elles sont souvent onéreuses et chronophages.

A l'issue de mon travail, il serait judicieux de voir dans quels processus biologiques les différentes voies identifiées sont impliquées. Ceci permettra de mieux comprendre les effets de l'infection par *N. ceranae* et/ou de l'intoxication par le fipronil chez *A. mellifera*.

C. La métabolomique

La métabolomique est une approche intéressante pour l'étude de la réponse d'un organisme donné à un ou plusieurs stress grâce à la complémentarité des techniques qu'elle emploie : i) la RMN caractérisée par sa non-sélectivité et par sa préparation facile des échantillons. ii) la MS permettent la détection de métabolites de très faible concentration. Cette approche est facile à mettre en œuvre, cependant, ses étapes sont étroitement liées d'où l'intérêt de l'utilisation d'outils techniques et statistiques performants afin d'éviter l'accumulation des biais analytiques et permettre l'obtention de meilleurs résultats.

REFERENCES

- Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem.* Vol. 28(1):113-122.
- Agren G.I. 1985a. Limits to plant production. *J. Theor. Biol.* 113, 89-92.
- Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F and Blot N. 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep.* 2:326.
- Booton RD, Iwasa Y, Marshall JAR, Childs DZ. 2017. *J Theor Biol.* 7;420:213-219.
- Bradshaw H.D, Jr., Reinhart Ceulemans, John Davis, and Reinhard Stettler 2000. Emerging Model Systems in Plant Biology: Poplar (*Populus*) as a Model Forest Tree. *J Plant Growth Regul.* 19:306-313.
- Chen Y.P, Evans J.D., Murphy C., Guttell R., Zuker M., Gundensen D.R and Pettis J.S. 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56(2), pp. 142–147.
- Dickson RE. 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. *Annals of Forest Science* 46, 631s-647s.
- Doddema H. et Telkamp G.P. 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. II: Kinetics. *Physiol. Plant.* 45:332-338.
- Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, et al. 2012. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(5):e37017.
- Dussaubat-Arriagadat C.M. 2013. Effets de *Nosema ceranae* (Microsporidia) sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* L. : changements physiologiques et comportementaux. Thèse de doctorat. Biologie animale. Université d'Avignon. Disponible en ligne sur <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00866903/document> [consulté le 11/07/2016].
- Evans J.D. and Spivak M. 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees *Journal of Invertebrate pathology* 103:62-S72.
- Gomis.D. 2015. Traitement et analyses de données en métabolomique. Université de Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand.

- Goulson D., Nicholls E, Botías C, Rotheray E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347(6229):1255-957.
- Ismande J. and Touraine B. 1994. N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. *Plant Physiol.* 105:3-7.
- Keeling Patrick J., Fast Naomi M. 2002 Microsporidia : Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol*, 56:93-116.
- Lankadurai B.P., E.G., Nagato and Myrna J. Simpson 2013. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environ. Rev.* 21:180-205.
- Masclaux D.S, Vedele F.D, Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141–1157.
- Masclaud C. Quilleri I. Gallais A. and Hirel B. 2000. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Ann. appl. Biol.* 138:69-81.
- Millard P. and Grelet G.A. 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology* 30:1083-1095.
- Millard P., Wendler R., Grassi G., Grelet G.A. and Tagliavini M. 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiology* 26: 527–536.
- Mifflin B J, Lea P J. 1980. Ammonium assimilation. In *The biochemistry of plants. Amino acids and derivatives*. Academic Press. pp. 169-202.
- Morot-Gaudry., Orsel M., Diaz C., Vedele F.D. and Masclaux C.D. 2006. Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes : intérêt pour le colza. *Laboratoire de nutrition azotée des plantes, INRA, Versailles. OCL Vol 13:392-402.*
- Morse R.A. and Flottum K. 1997. *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA.
- Rennenberg H., Dannenmann M., Gessler A., Kreuzwieser J., Simon J., and Papen H. 2009. Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biol (Stuttg)*. 11 Suppl 1:4-23.
- Rortais A., Arnold G., Dorne J.L, More S.J, Sperandio G., Streissl F., Szentes a C., and Verdonck F. 2017. Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles,

data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Sciences of The Total Environment*. Vol. 587-588.

- Rortais A., Gérard Arnold, Jean-Lou Dorne, Simon J. More, Giorgio Sperandio, Franz Streissl, Csaba Szentes a, Frank Verdonck 2017. Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority.
- Schimel J.P. And Bennet J. 2004. Nitrogen mineralization: challenges: of a changing paradigm. *Ecology*, 85(3), 2004, pp. 591–602.
- Solter L. F. 2010. *Nosema Microsporidia: Friend Foe and Intriguing Creatures*. Illinois Natural History Survey, Institute of Natural Resources Sustainability, University of Illinois.
- Thitithanakul S., Petel G., Chalot M. and Beaujard F. 2012. Supplying nitrate before bud break induces pronounced changes in nitrogen nutrition and growth of young poplars. *Functional Plant Biology*. 39:795-803.
- vanEngelsdorp D. and Meixner M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl. 1S80-95.
- Vrignon-Brenas S. 2012. Effet de l'apport d'azote minéral avant le débourrement sur la qualité de la jeune pousse foliaire chez le scion de peuplier (*Populus tremula x alba*) : estimation des flux d'azote issus de la remobilisation et de l'absorption par un marquage ¹⁵N en conditions contrôlées, MSc MSc, Université de Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand.

Annexe 1 :Préparation des arbres et conditions de culture

Les arbres utilisés sont des scions (arbre âgé d'un an) de peupliers hybrides *Populus tremula x alba* clone INRA 717-1B4. Les scions ont été obtenus par enracinement de boutures issues micro-pieds-mères et faites l'année précédente sous serre. La croissance des plantes a été assurée dans des conditions équivalentes à celles de l'expérimentation. Les plantes ont été initialement cultivées toute une saison de végétation sous serre, dans le système de culture en solution recyclée et dans des pots cylindriques et en PVC de 10L qui ont été remplis de perlite (substrat chimiquement neutre, sans capacité d'échange cationique et à bonne capacité de rétention en eau). En fin de période de végétation et à partir du 15 octobre 2015, les jeunes arbres ont été transférés à l'extérieur de la serre avec une isolation faite au niveau des pots avec de la pouzzolane afin de limiter les échanges thermiques entre l'atmosphère et le système racinaire pendant l'hiver et donc, en partie, pour limiter les effets du gel. Le stockage hivernal en extérieur a alors permis de lever naturellement la dormance des bourgeons. Après cette période de stockage les arbres ont été replacés sous serre, (7 Février 2012) pour engager les expérimentations. Elles ont été faites en système de culture en solution nutritive recyclée car ce système permet de maîtriser l'environnement ionique des racines.

L'hiver 2015-2016 a été particulièrement doux jusqu'en début février puis les températures ont chuté brutalement avec une phase de fort gel (mini-16°C). Pour limiter de possibles conséquences du gel, les plantes ont été rentrées sous serre et stockées hors gel en serre froide pendant 6 jours. Ensuite en conservant des températures froides (5°C nuit, 10°C jour), les plantes ont été placées sur les dispositifs de culture en solution recyclée et alimentées avec une solution nutritive sans azote (6 arrosages par jour de 45 min, chacun). Cela afin d'homogénéiser les environnements ioniques racinaires au niveau de chaque plante. Après cette phase finissant l'acclimatation des plantes, la température de la serre a été augmentée pour démarrer les essais en nutrition minérale (10°C nuit et 15°C jour). Les fréquences d'arrosage (6 par jour de 45 min) ont été conservées pendant toute la durée des expériences. Les mesures de hauteurs et de diamètre (à la base et à mi-hauteur du tronc) ont permis de sélectionner des individus homogènes en terme de croissance afin de limiter la variabilité biologique liée à cette variable (moyenne \pm se ; n=36) : hauteur = 135.11 ± 5.75 cm, diamètre à la base de l'arbre = 11.6 ± 0.36 mm, diamètre à mi-hauteur : 7.32 ± 0.21 mm.

Annexe 2 : Liste des 30 échantillons de peuplier avec la quantité d'azote apportée sous forme KNO_3 , le temps de récolte, et le volume de sève récupéré de chaque plante.

N en Mm	Temps de récolte	Identifiant de la plante	Volume en ml
0	T0	D2P04	0,8
0	T0	D2P08	0,8
0	T2	D2P01	4,5
0	T+2	D2P02	2,75
0	T+2	D2P03	2,5
0	T+2	D2P07	2
0	T+2	D2P09	1
0	T+2	D2P11	2,5
0	T+6	D2P06	1,5
0	T+6	D2P10	2
0	T+6	D2P12	2
1	T0	D3P07	4,5
1	T0	D3P12	0,5
1	T+2	D3P05	4
1	T+2	D3P08	1
1	T+6	D3P01	2
1	T+6	D3P02	6
1	T+6	D3P04	2
1	T+6	D3P06	2
1	T+6	D3P09	3,5
1	T+6	D3P11	2
4	T0	D4P02	4
4	T0	D4P06	6
4	T+2	D4P03	6
4	T+2	D4P05	1,5
4	T+2	D4P07	6
4	T+2	D4P09	6,5
4	T+6	D4P01	6
4	T+6	D4P08	6
4	T+6	D4P11	1

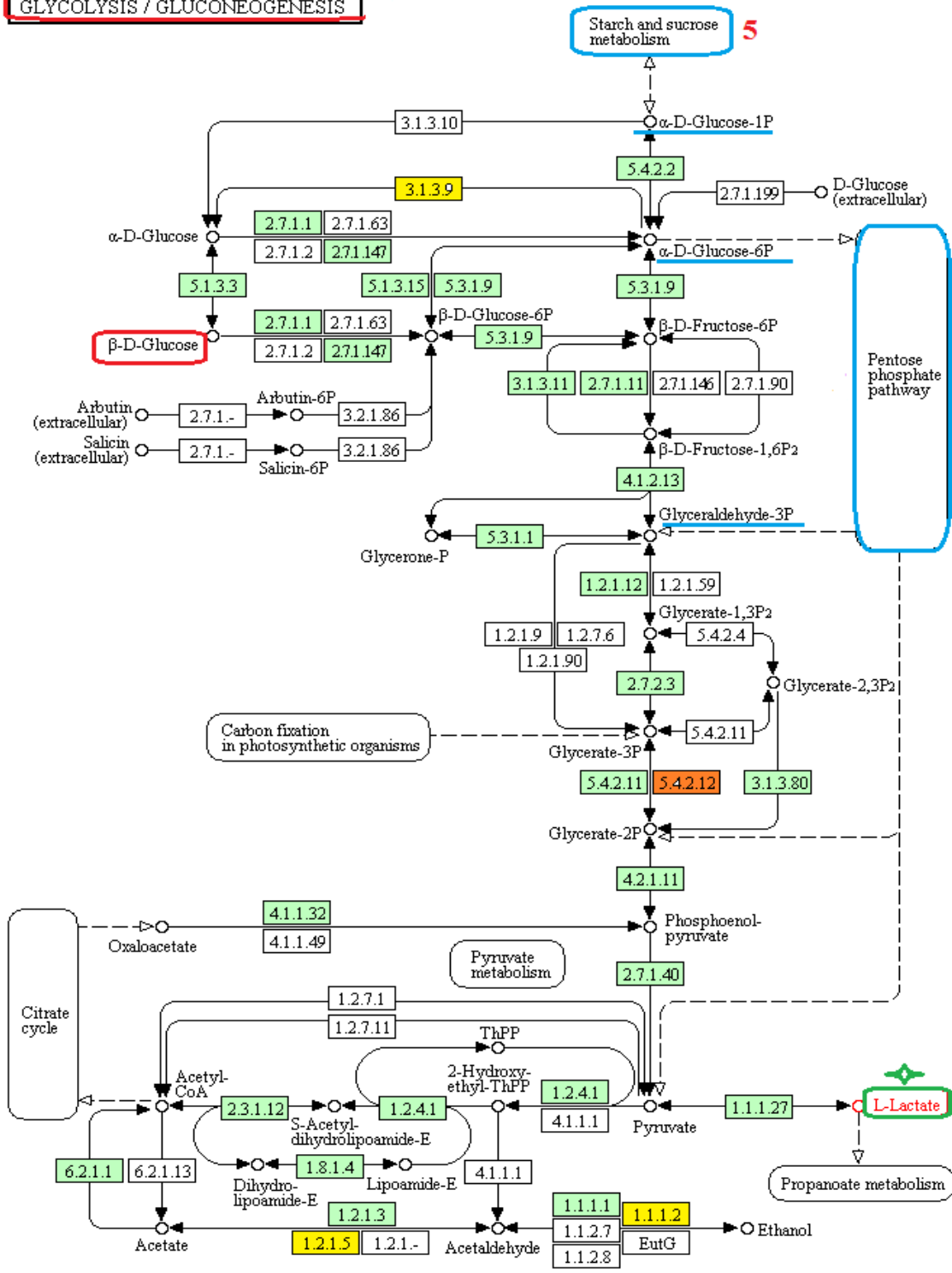
Annexe 3 : Composition du tampon phosphate (Concentration : 300 mM, pH:7.12)

Produit chimique	Quantité
D2O	50 ml
K ₂ HPO ₄	1.588 g
KH ₂ PO ₄	0.8005 g
TSP	40 mg
NaN ₃	20 mg

Annexe 4 : Valeurs de Q2 (capacité de prédiction) des différents modèles statistiques étudiés et leurs possibles combinaisons en fonction du jour de collecte et du type d'analyse utilisé; les modèles prioritaires (en rouge), les modèles non prioritaires (en jaune), les modèles non analysés (case -) et la valeur 0 signifie que le modèle proposé est rejeté par le logiciel. C = abeilles saines « contrôles » (C) ; N = abeilles infectées ; F = abeilles intoxiquées faiblement ; F+ = abeilles intoxiquées fortement ; NF = abeilles infectées et intoxiquées faiblement ; NF+ = abeilles infectées et intoxiquées fortement. (GOMIS 2015)

Test date Model\Analytics	J6			J12			J13		
	MS+	MS-	RMN	MS+	MS-	RMN	MS+	MS-	RMN
C/F/F+	0.0583	0	0.155	0.446	0	0.116	0.488	0.196	0.515
C/F	0	0	0.397	0.562	0.13	0.317	0.613	0.571	0.675
C/F+	0.372	0.261	0.282	0.777	0.391	0.6	0.883	0.544	0.784
F/F+	0	0	0.174	0.295	0	0	0.642	0.6	0.75
C/N	0.831	0.434	0.814	0.752	0.771	0.902	0.922	0.774	0.967
N/NF/NF+	0	0.0839	0	0.561	0	0.294	-	-	-
N/NF	0.126	0.212	0	0.565	0.622	0.0976	0.676	0.46	0.775
N/NF+	0.32	0.193	0	0.853	0.499	0.874	-	-	-
NF/NF+	0	0	0	0.718	0.203	0.686	-	-	-
N/F/NF	0.31	0.385	0.172	0.503	0.184	0.254	0.791	0.461	0.729
N/F	0.825	0.485	0.836	0.827	0.734	0.831	0.893	0.637	0.769
F/NF	0.79	0.442	0.301	0.782	0.55	0.736	0.907	0.635	0.878
N/F+/NF+	0.188	0.0552	0.17	0.763	0.5	0.77			
N/F+	0.805	0.415	0.643	0.879	0.668	0.832			
F+/NF+	0.73	0	0.768	0.742	0.571	0.841			
F/F+/NF/NF+	0.141	0.0711	0.166	0.422	0.128	0.357			

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



Annexe 5: Représentation schématique de la voie de la Glycolyse / Gluconéogenèse identifiée dans la modalité CvsN chez *A. mellifera*. Cette voie implique le biomarqueur β-D-Glucose identifié d’une manière certaine (métabolite encadré en rouge) et le L-lactate identifié putativement (métabolite encadré en vert). En vert : les enzymes appartenant à *A. mellifera*, en jaune : les enzymes appartenant à *D. melanogaster* et en orange les enzymes de *N. ceranae*. Cette voie montre une interaction avec deux autres voies identifiées (encadrées en bleu) : la voie du métabolisme de l’amidon et du sucrose intervenant par le biais du α-D-Glucose 1-Phosphate et la voie des pentoses phosphates faisant intervenir l’α-D-Glucose 6-P et le glycéraldéhyde 3-P.