

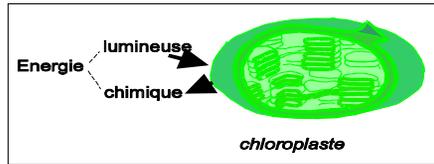


Nutrition azotée des plantes et techniques en « omique »

JF Morot-Gaudry

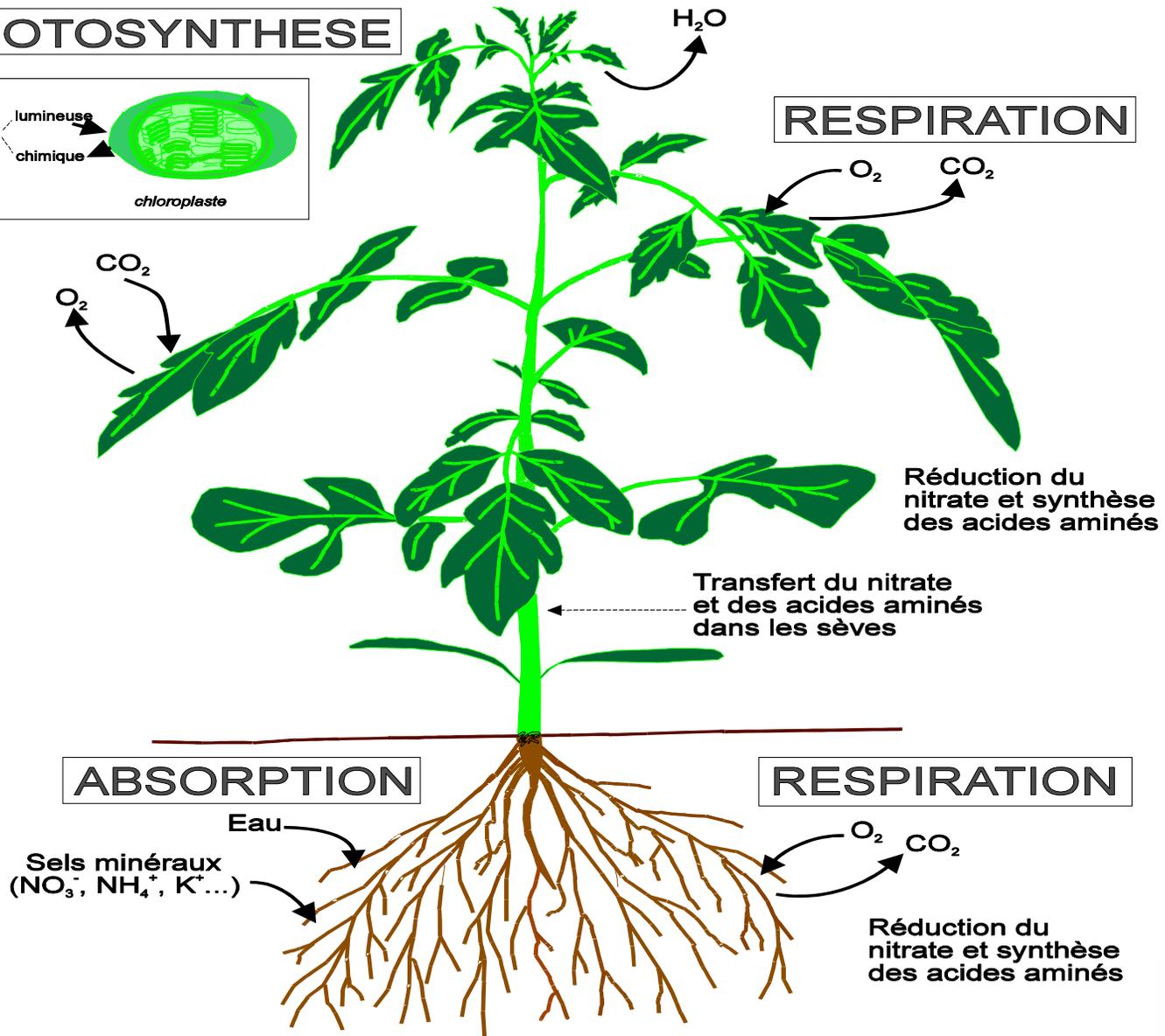
Laboratoire de nutrition azotée des plantes, Institut JP Bourgin, INRA-Versailles

PHOTOSYNTHESE



TRANSPIRATION

RESPIRATION



Nutrition minérale

Absorption de l'eau et des sels minéraux par les racines.

Un arbre de 20 m exploite par ses racines 250 m³ de terre.

Très souvent, sont associées aux racines des **mycorhizes (champignons filamenteux) qui améliorent les performances de fouilles des racines.**

Photosynthèse

Un chêne de 15 m de haut compte à peu près 250 000 feuilles, soit une surface de 160-180 m²

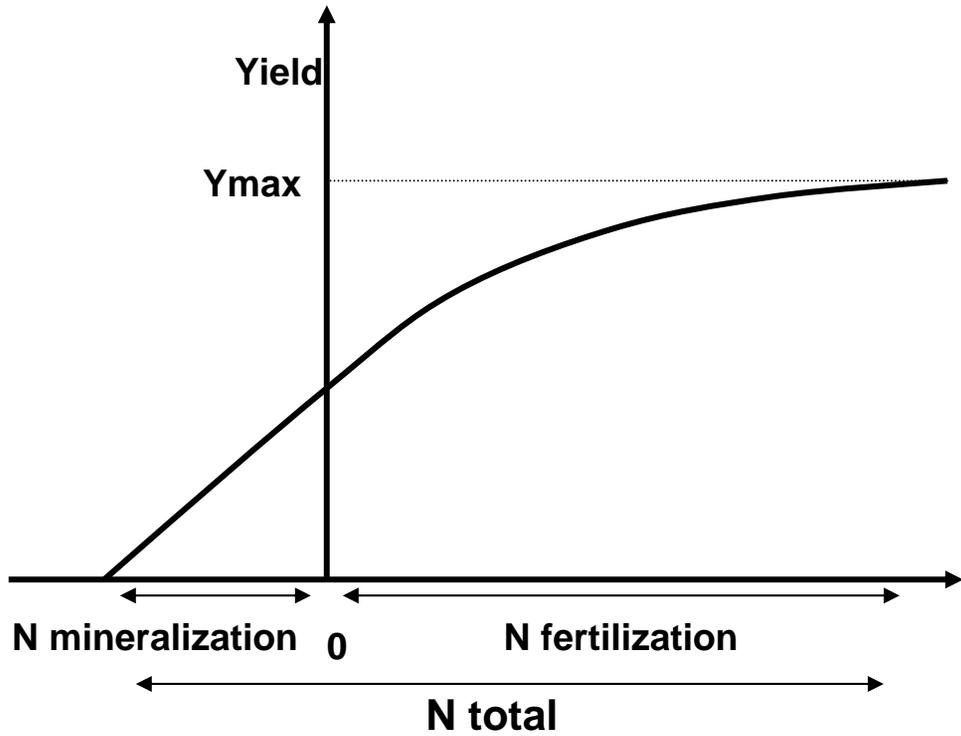
La fabrication d'1 kg de matière sèche demande à un arbre de piéger le CO₂ de 4000 m³ d'air.

La synthèse d'1 kg de matière sèche demande 500 l d'eau.



Effet de la nutrition azotée sur la croissance de plants de tabac. INRA-Versailles NAP- IJPB.

L'azote : Un élément limitant pour la croissance des plantes



Z. mays



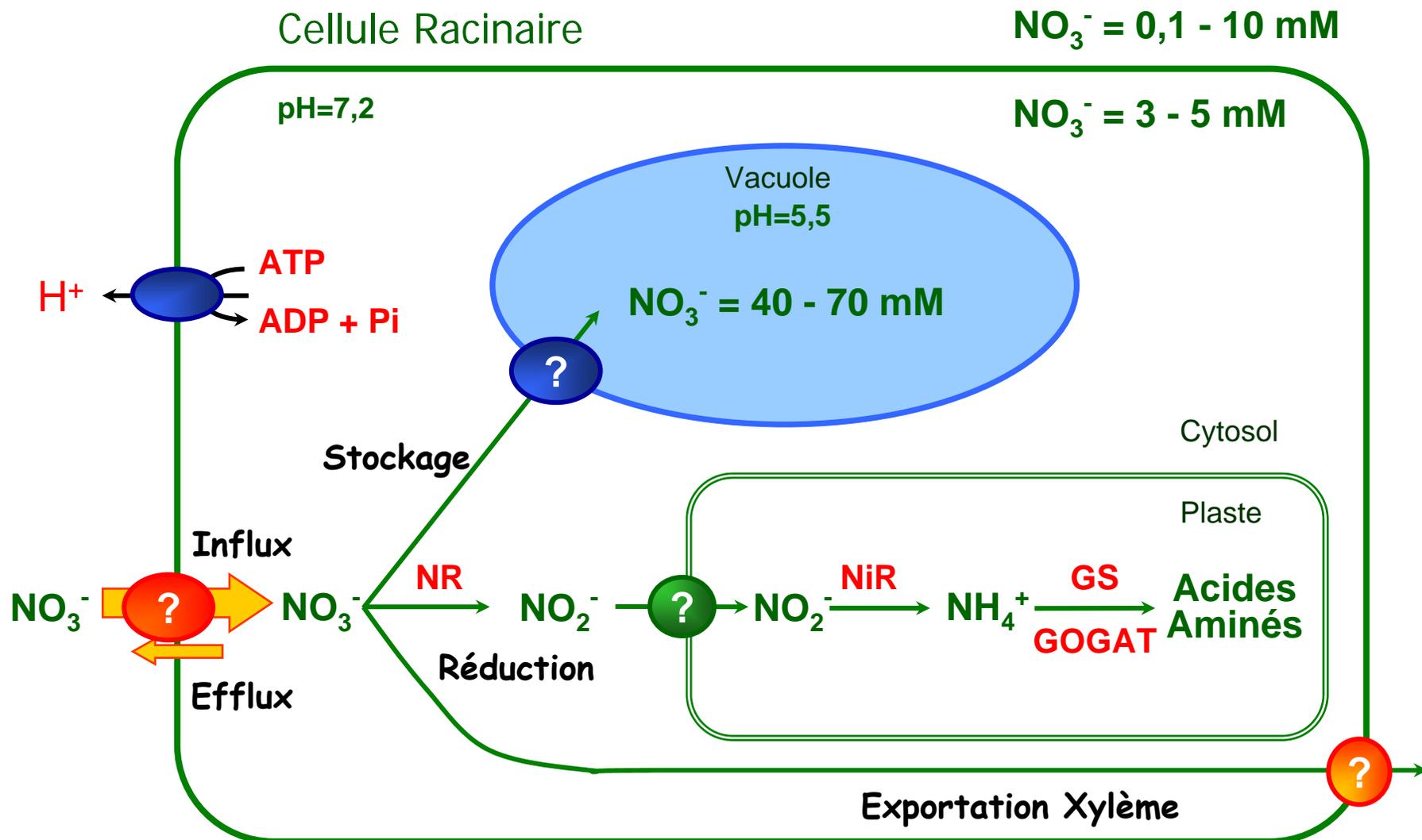
+ Azote

- Azote

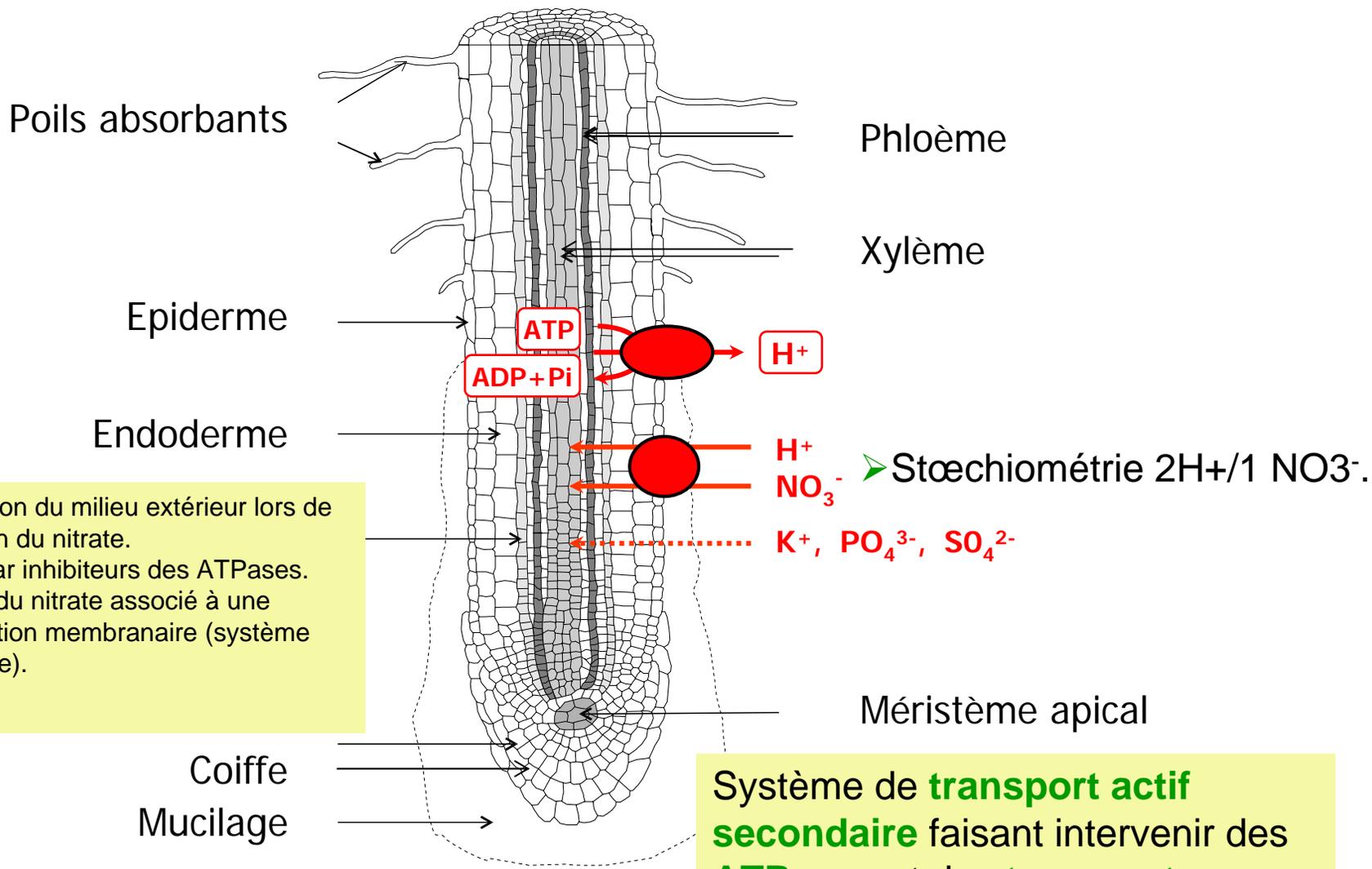


A. thaliana

Métabolisme Azoté



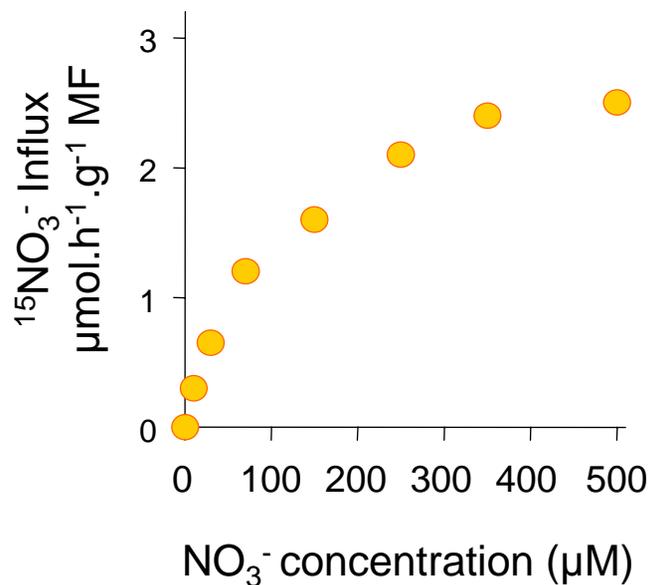
Absorption racinaire



Alcalinisation du milieu extérieur lors de l'absorption du nitrate.
 Blocage par inhibiteurs des ATPases.
 Transport du nitrate associé à une dépolariation membranaire (système électrogène).

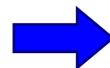
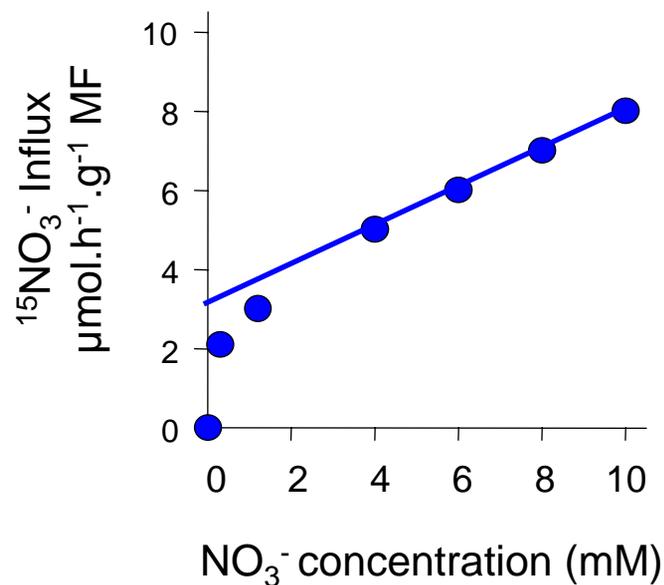
Système de **transport actif secondaire** faisant intervenir des **ATPases** et des **transporteurs**.

Deux systèmes de transport du nitrate



HATS

Km 10-100 μM ,
2 composantes:
cHATS: constitutive
iHATS: NO_3^- inductible
Gènes *NRT2*

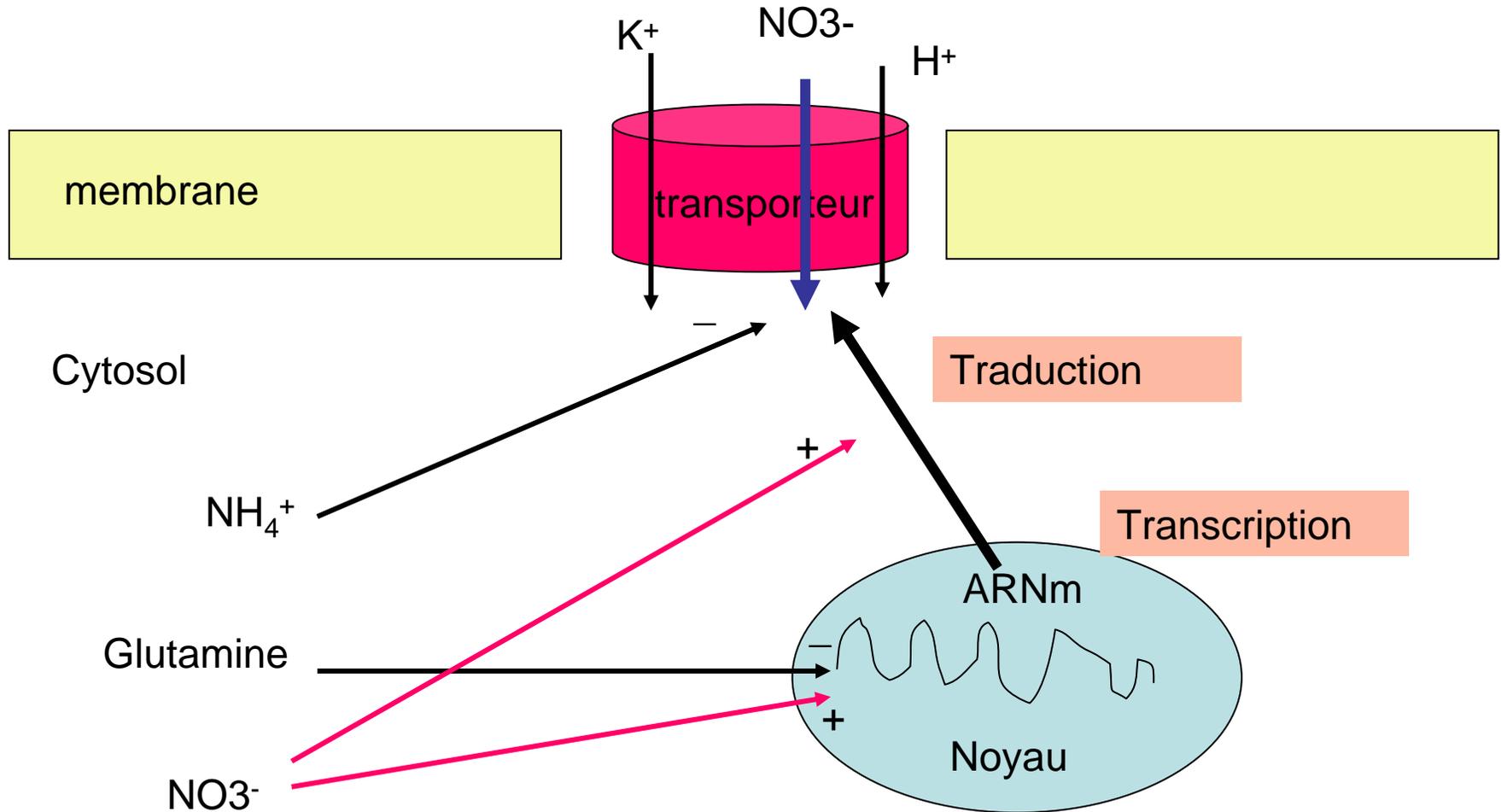


LATS

Non saturable
 NO_3^- constitutif
Gènes *NRT1*

In *A. Thaliana* 7 *NRT2* et 50 *NRT1*

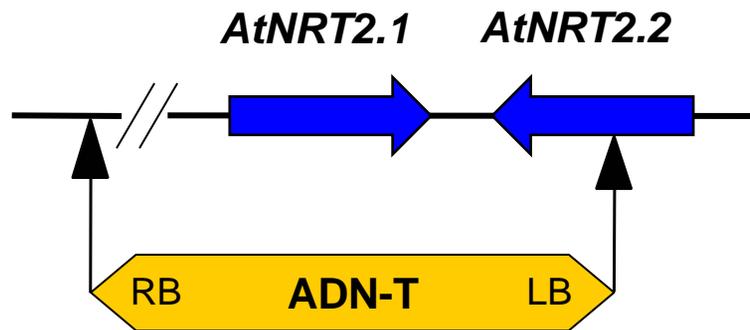
Régulation des transporteurs de nitrate par les métabolites



Mutant *atnrt2.1a* : phénotype HATS ?

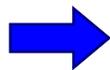
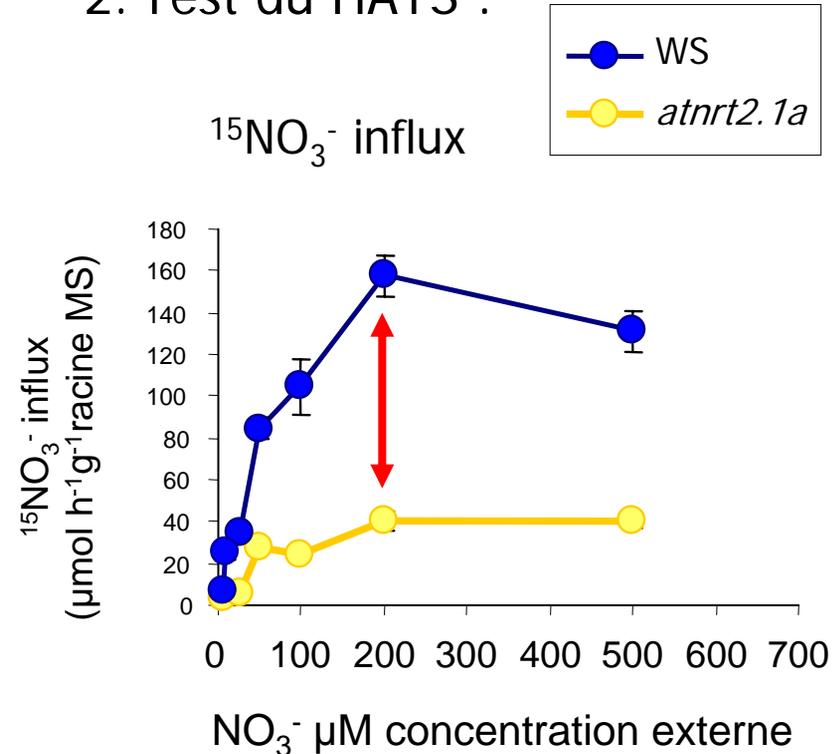
Filleur *et al.*, 2001

1. Recherche de mutant :



Délétion 25 Kb : double mutant

2. Test du HATS :



Le mutant *atnrt2.1a* est **déficient** pour le HATS

Les techniques en « omique »

Transcriptomique

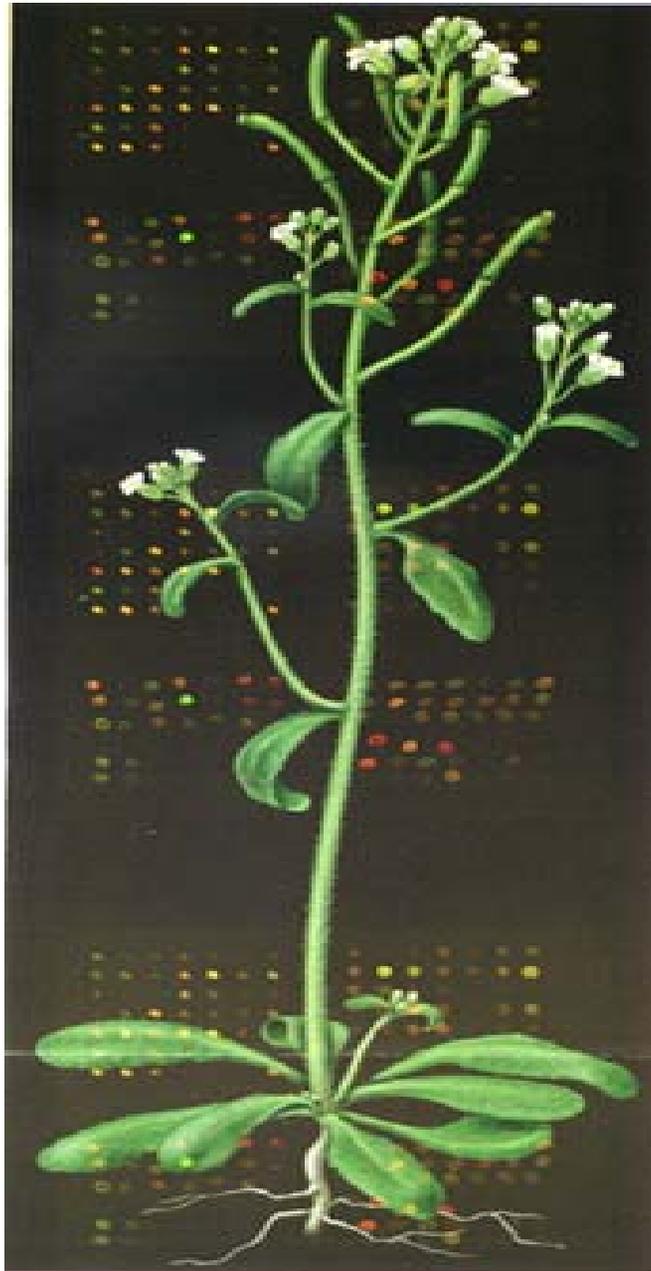
Protéomique

Métabolomique

Cytomique

Que peuvent apporter ces techniques?

Ces analyses à haut débit?



Etude du Transcriptome

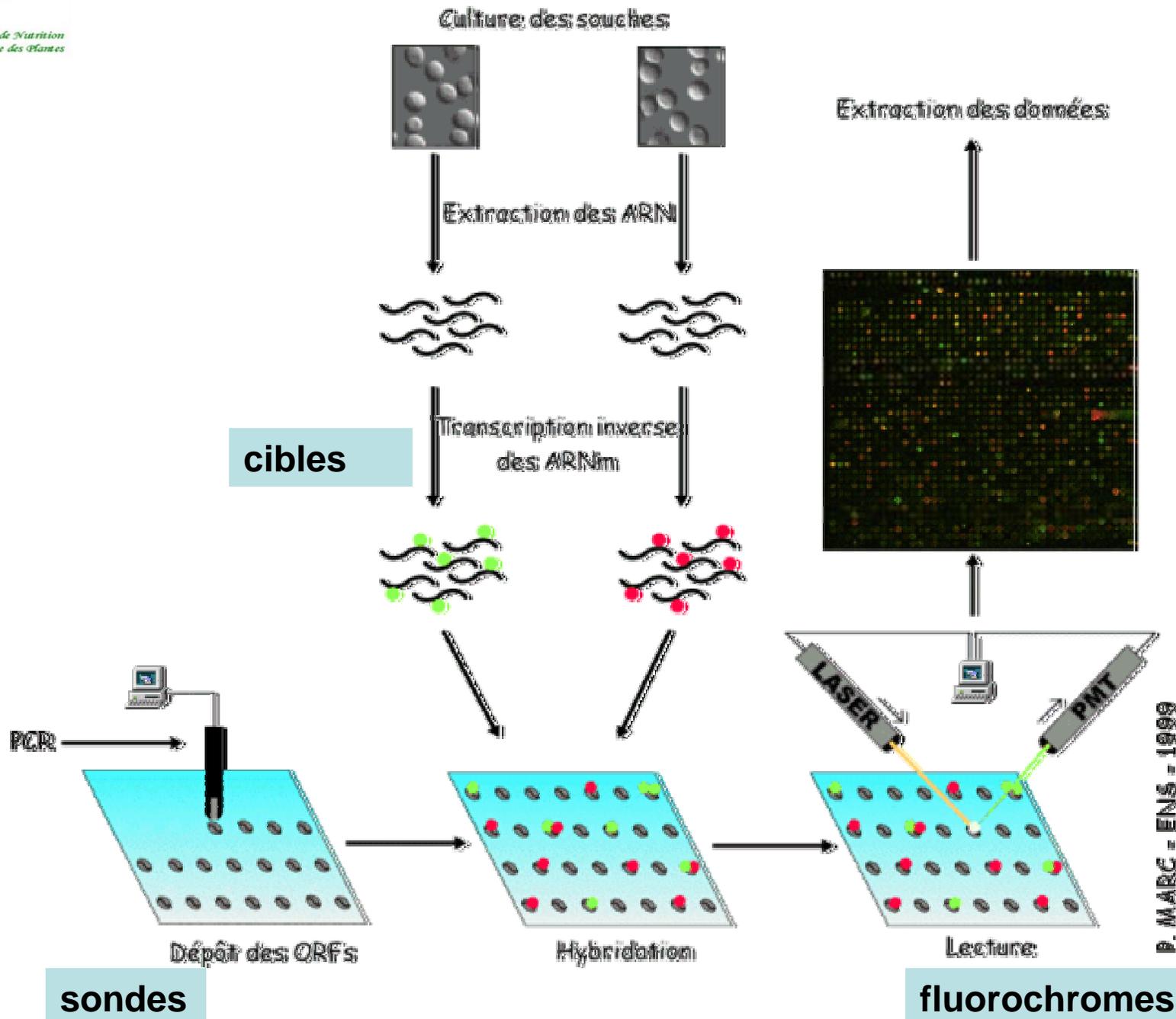
Méthode permettant l'analyse simultanée, systématique, à grande échelle, de l'ensemble des gènes exprimé dans une condition donnée.

Les puces à ADN permettent de mesurer et de visualiser très rapidement les différences d'expression entre les gènes et ceci à l'échelle d'un génome complet. Si la mise en oeuvre de la technique est assez compliquée, son principe est très simple. En voici les principales étapes.

Les puces à ADN

Méthode basée sur la capacité d'**hybridation** de deux brins d'acides nucléiques par appariement des bases complémentaires. Dans ce cas, une population d'acides nucléiques (ADNc, cadres ouverts de lecture ou oligonucléotides synthétiques = **sondes**), fixée sur un support solide est **hybridée** à un mélange complexe d'acides nucléiques (ARN ou ARNm rétrotranscrits en ADNc = **cibles**), issus de l'échantillon à analyser et **marqués** avec des fluorochromes ou des composés radioactifs.

Les informations obtenues permettent d'estimer l'abondance d'un seul polynucléotide marqué spécifique d'un gène donné.



Puces à ADN suite

Les échantillons marqués (cibles) sont hybridés aux sondes présentes fixées sur le support solide (puce).

Chaque fluorochrome est excité par un laser à longueur d'onde spécifique et le signal correspondant détecté par un scanner.

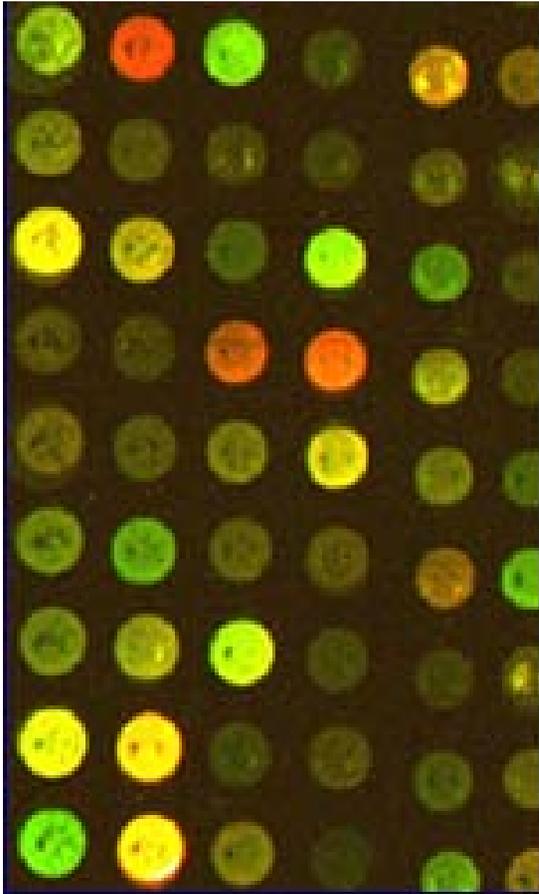
L'intensité relative des signaux de fluorescence correspondant à chaque sonde permet d'estimer l'abondance des transcrits correspondants contenus dans chaque échantillon cible.

Sondes = acides nucléiques déposés sur le support

Cibles = molécules à caractériser, issues de l'échantillon.

1) Marquage **radioactif** (^{32}P); méthode très sensible (μgramme) mais limitée quand la densité des sondes augmente.

2) Marquage par **fluorescence**; nombreux fluorophores, résolution élevée ($20\mu\text{m}$), utilisation simultanée de 2 cibles; problème de la réutilisation des puces?



La lecture:

Chaque spot est excité par un laser et on récupère la fluorescence émise via un photo-multiplicateur (PMT) couplé à un microscope confocal. On obtient alors **deux images** dont le niveau de gris représente l'intensité de la fluorescence lue. Si on remplace les niveaux de gris par des niveaux de **vert** pour la première image et des niveaux de **rouge** pour la seconde, on obtient en les **superposant** une image en fausses couleurs composée de spots allant du **vert** (seulement de l'ADN de la première condition fixé) au **rouge** (seulement de l'ADN de la seconde condition fixé) en passant par le **jaune** (de l'ADN des deux conditions fixé en quantité égal) .

		RIL045				RIL232				RIL310				
AT1G72610	germin-like protein (GER1)	9,25	12,69	-3,44	0,00E+0	11,00	13,06	-2,06	0,00E+0	12,06	11,68	13,75	-2,07	0,00E+0
AT2G34430	chlorophyll A-B binding protein / LHCII type I (LHB1B1)	9,03	12,21	-3,17	0,00E+0	10,67	12,64	-1,96	0,00E+0	11,61	11,09	12,60	-1,51	0,00E+0
AT1G03870	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA9)	8,92	11,53	-2,61	0,00E+0	10,58	11,66	-1,08	1,29E-3	9,97	9,78	11,72	-1,94	0,00E+0
AT2G18420	gibberellin-responsive protein, putative	7,41	9,80	-2,39	0,00E+0	7,25	8,86	-1,61	1,12E-11	7,42	7,05	8,78	-1,74	0,00E+0
AT5G57550	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglucosylase	7,57	9,95	-2,38	0,00E+0	7,39	8,75	-1,36	1,74E-7	7,12	7,13	8,17	-1,04	1,21E-5
AT4G35770	senescence-associated protein (SEN1)	7,75	10,10	-2,36	0,00E+0	7,39	9,25	-1,86	0,00E+0	7,10	6,78	8,09	-1,32	7,85E-11
AT1G31330	photosystem I reaction center subunit III family protein	9,42	11,73	-2,31	0,00E+0	10,56	11,77	-1,22	2,39E-5	11,45	10,81	12,05	-1,24	3,20E-9
AT1G19150	chlorophyll A-B binding protein, putative / LHCI type II, putative	8,73	10,89	-2,17	0,00E+0	10,69	11,72	-1,03	5,65E-3	11,24	11,09	11,89	-0,80	4,80E-2
AT5G38410	ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B / RuBisCO	9,55	11,71	-2,16	0,00E+0	11,04	12,29	-1,25	7,10E-6	10,68	10,66	12,21	-1,55	0,00E+0
AT3G54890	chlorophyll A-B binding protein / LHCI type I (CAB)	10,34	12,44	-2,11	0,00E+0	11,50	12,68	-1,19	5,63E-5	12,21	11,64	12,51	-0,87	4,45E-3
AT5G64040	photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative	9,44	11,49	-2,04	0,00E+0	10,71	11,91	-1,20	4,62E-5	10,72	10,36	11,33	-0,97	1,66E-4
AT5G65010	asparagine synthetase 2 (ASN2)	8,66	10,58	-1,92	0,00E+0	9,41	10,92	-1,51	7,79E-10	10,13	9,79	11,19	-1,40	0,00E+0
AT5G35630	glutamine synthetase (GS2)	7,86	9,15	-1,29	4,12E-6	8,54	9,61	-1,07	1,81E-3	9,20	8,72	9,86	-1,14	2,14E-7
AT2G15620	ferredoxin-nitrite reductase, putative	10,18	11,46	-1,28	5,72E-6	9,96	11,37	-1,42	2,67E-8	9,98	9,98	11,34	-1,36	1,12E-11
AT1G37130	nitrate reductase 2 (NR2)	9,65	10,86	-1,21	4,87E-5	9,33	10,35	-1,02	7,03E-3	9,81	9,71	10,85	-1,14	1,83E-7
AT1G73260	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	11,78	12,80	-1,01	1,23E-2	11,61	10,21	1,40	4,66E-8	13,17	12,87	11,91	0,95	2,72E-4
AT5G52390	photoassimilate-responsive protein, putative	9,59	8,57	1,02	1,02E-2	7,87	6,90	0,97	3,05E-2	7,99	8,20	7,10	1,10	1,23E-6
AT4G32940	vacuolar processing enzyme gamma / gamma-VPE	14,26	13,23	1,03	6,89E-3	14,11	12,83	1,27	3,71E-6	14,03	13,79	12,52	1,27	5,78E-10
AT2G29420	glutathione S-transferase, putative	11,10	9,89	1,20	5,44E-5	10,15	9,01	1,14	2,30E-4	10,13	10,53	9,48	1,06	6,18E-6
AT5G13930	chalcone synthase / naringenin-chalcone synthase	9,84	8,55	1,30	3,03E-6	10,86	9,49	1,36	1,68E-7	11,20	11,35	8,75	2,60	0,00E+0
AT1G17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 3-PGDH	13,30	11,60	1,70	0,00E+0	12,47	10,42	2,05	0,00E+0	13,08	13,40	11,41	1,99	0,00E+0
AT1G32900	starch synthase, putative	9,76	8,04	1,73	0,00E+0	9,72	8,42	1,30	1,45E-6	10,17	10,21	8,25	1,96	0,00E+0
AT5G45890	senescence-specific SAG12 protein (SAG12) / cysteine protease	9,98	8,17	1,80	0,00E+0	8,57	7,57	1,00	1,25E-2	9,36	8,88	7,80	1,09	1,97E-6
AT5G25110	CBL-interacting protein kinase 25 (CIPK25)	12,05	9,34	2,71	0,00E+0	10,84	8,95	1,89	0,00E+0	9,73	9,86	8,30	1,56	0,00E+0
AT1G66390	myb family transcription factor, putative / production of anthocyanin	11,93	8,09	3,84	0,00E+0	10,94	7,72	3,22	0,00E+0	10,87	11,29	7,11	4,18	0,00E+0

Dye swap **Rapport et probabilité**

Etude des proéines, du protéome

- 1- Séparation des protéines par **électrophorèse 2D** (pHi et masse);
- 2-Identification des protéines par **spectrométrie de masse** (SM à résonance cyclotronique par transformée de Fourier, couplée aux méthodes d'ionisation modernes);
- 3-**Bases de données**: cartes peptidiques massiques (outils bio-informatiques);
- 4-Problème des **modifications post-traductionnelles** des protéines (plus de 100 connues); analyse du phospho-protéome.

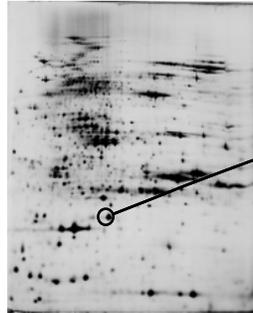
L'électrophorèse 2D

- L'électrophorèse 2D permet de séparer les protéines selon leurs **propriétés physico-chimiques**.
- Placées sur un **gel poreux** soumis à un champs électrique, les protéines y migrent plus ou moins selon leur **charge électrique** (déplacement dans l'un des axes du plan) et selon **leur masse moléculaire** (déplacement dans le second axe).

Spectrométrie de masse SM

- La SM permet d'identifier un grand nombre de protéines
- - soit avec l'établissement de cartes peptidiques massiques (**analyse par Maldi-Tof**);
- - soit grâce à l'analyse structurale (**SM en tandem**);
- - et grâce à des outils de **bioinformatique** adaptés.

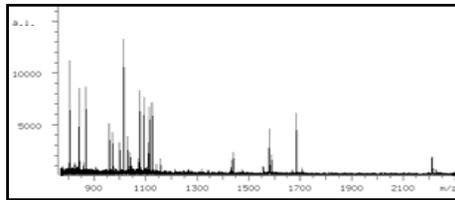
1. Séparation des protéines par électrophorèse



2. Digestion trypsique

mélange de peptides

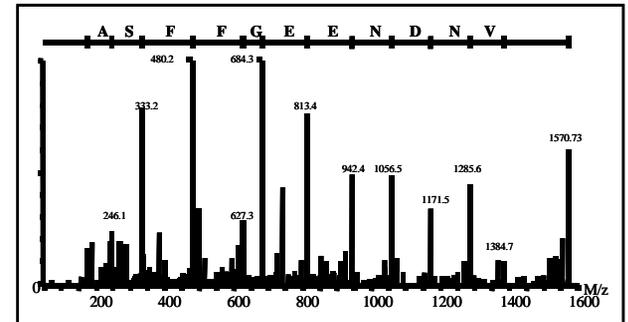
3. Analyse par spectrométrie de masse



Carte peptidique massique (MALDI-TOF)

4. Recherche dans les bases de données

Identification



spectre MS/MS séquences

Métabolomique: analyse de l'ensemble des composants d'un compartiment biologique.

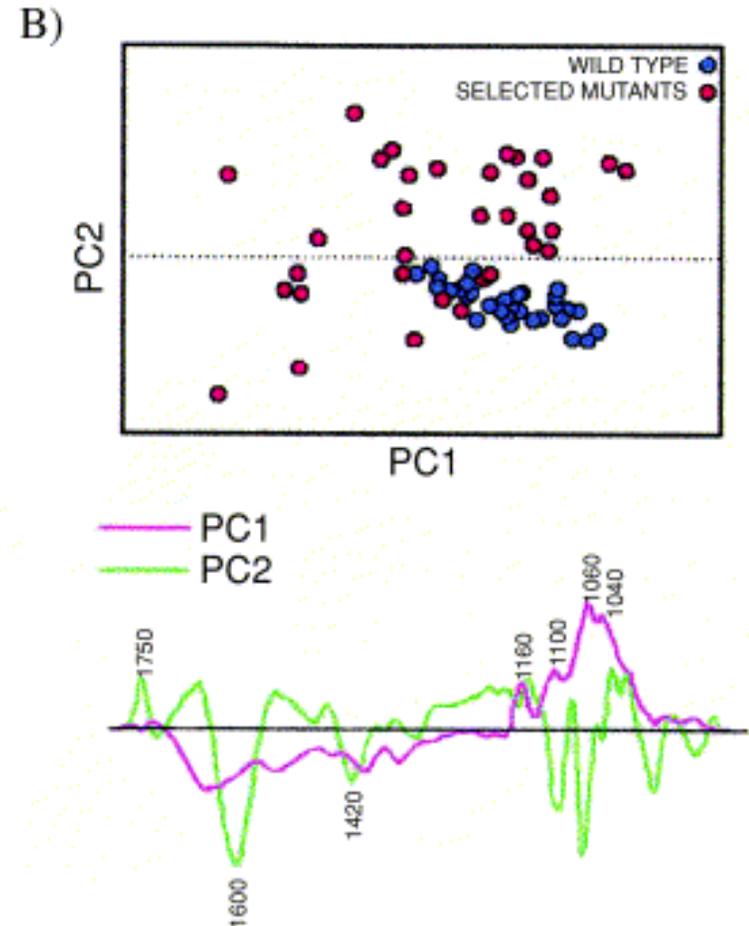
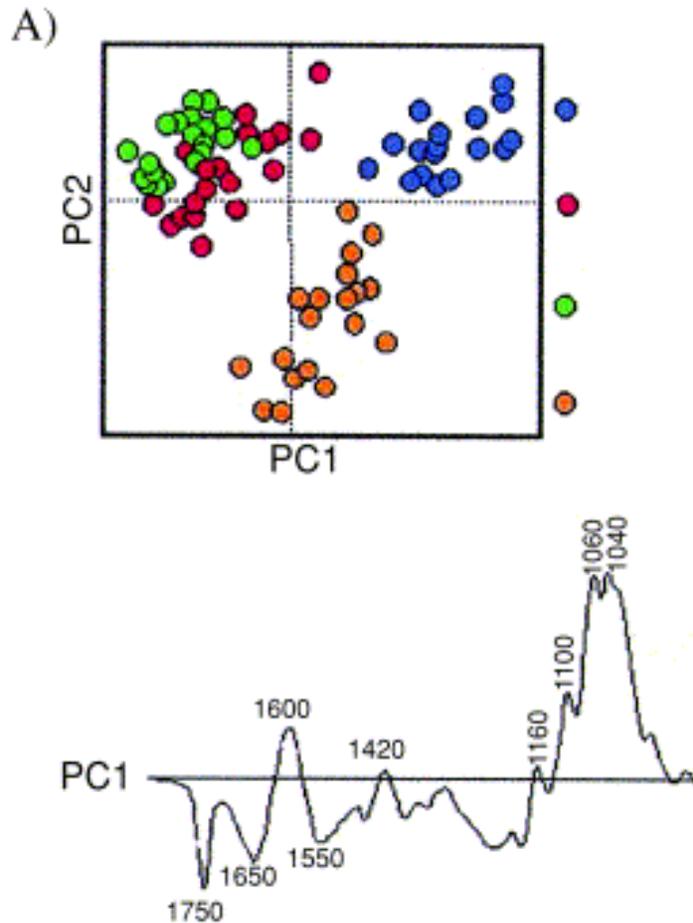


Chez *Arabidopsis thaliana*, 26 000 gènes (dont 5000 sont connus fonctionnellement) et sans doute des dizaines de milliers de métabolites supposés exister.

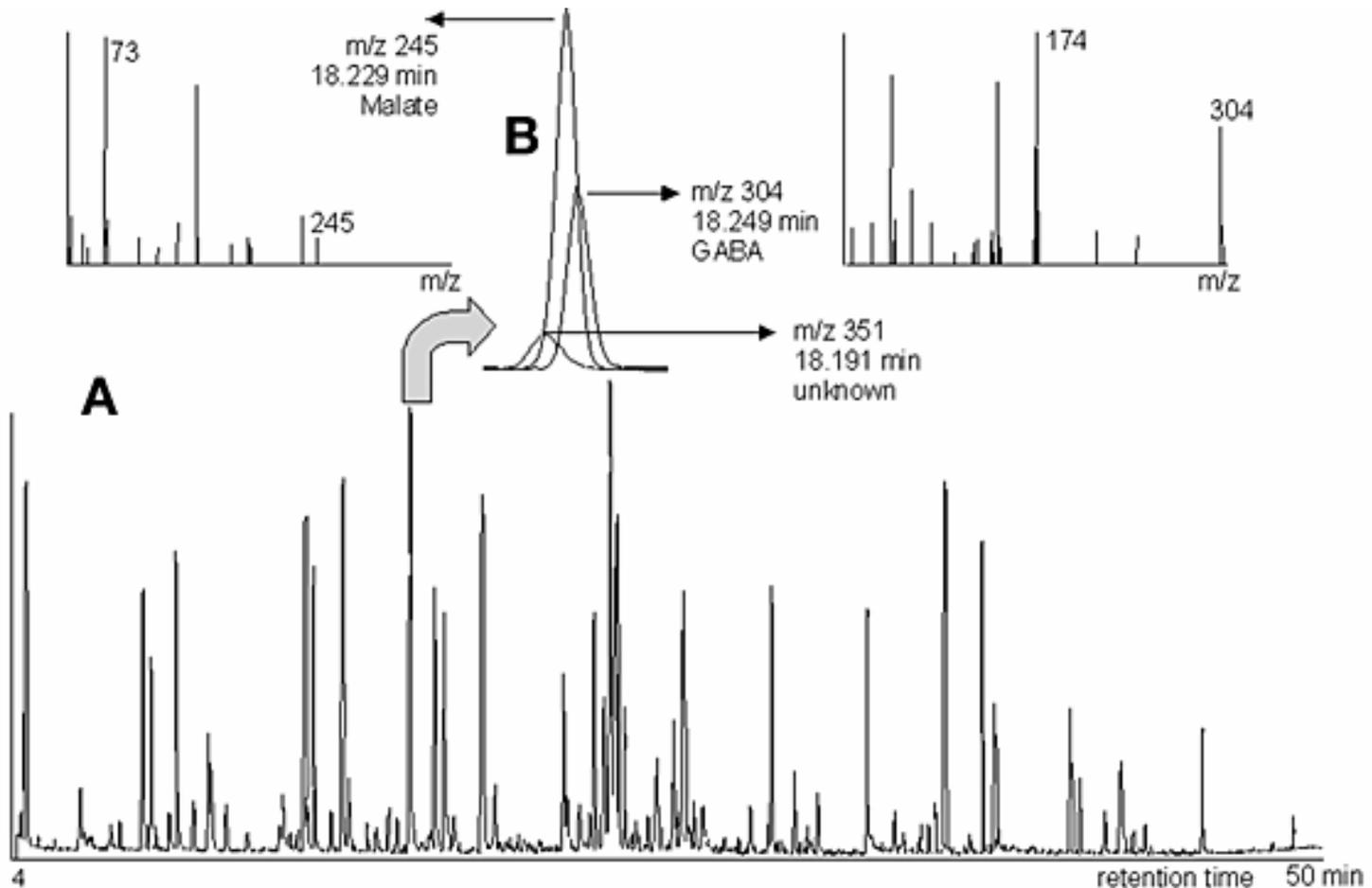
Profil métabolique: tous les métabolites d'une voie métabolique ou d'une classe de métabolites donnés.

Empreintes ou signatures métaboliques.

Analyse exhaustive du métabolome: analyse de l'ensemble des métabolites d'une cellule, d'un organisme; analyse non ciblée de tous les composés quelle que soit leur forme, quel que soit leur rôle (indépendante des méthodes d'analyse).



Analyse en composantes principales de résultats d'analyse par spectrométrie infrarouge (cellulose et pectine) d'hypocotyles de deux populations d'*A. thaliana* (wild type and *rsw1* mutant) (McCann et al., 2001).



Identification de composés de feuilles *d'Arabidopsis* par le système chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (Fiehn et al., 2000).

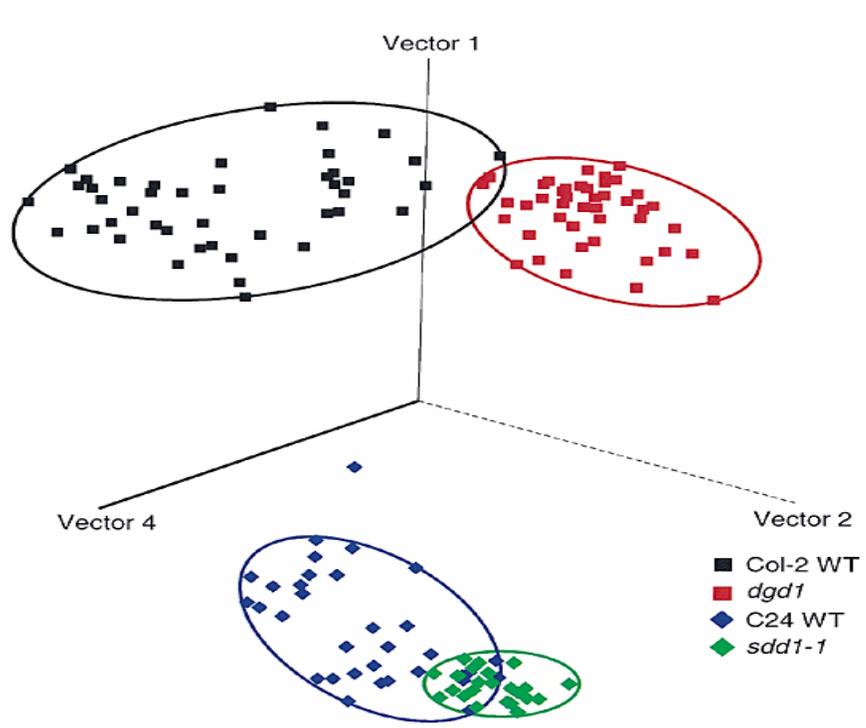
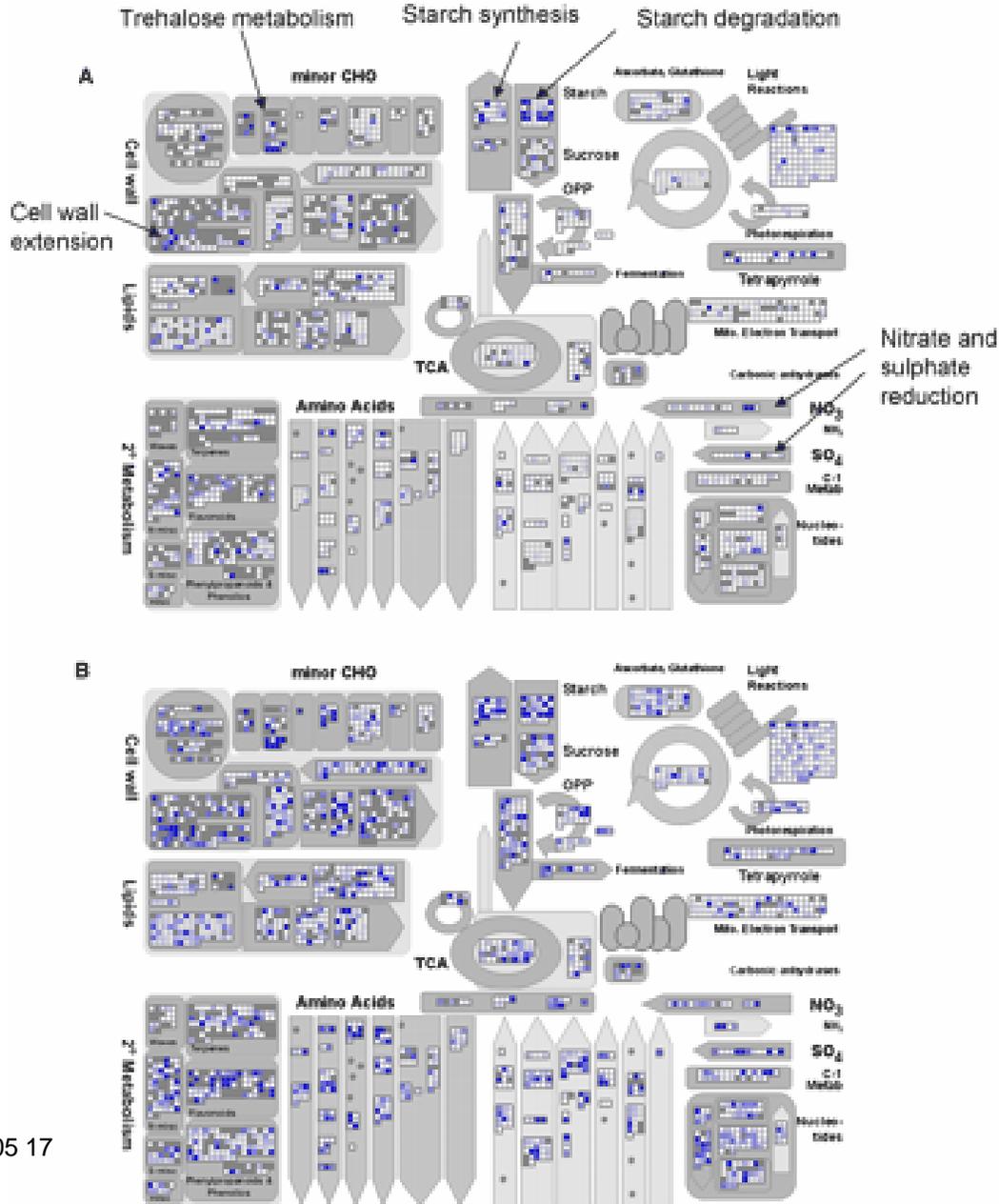
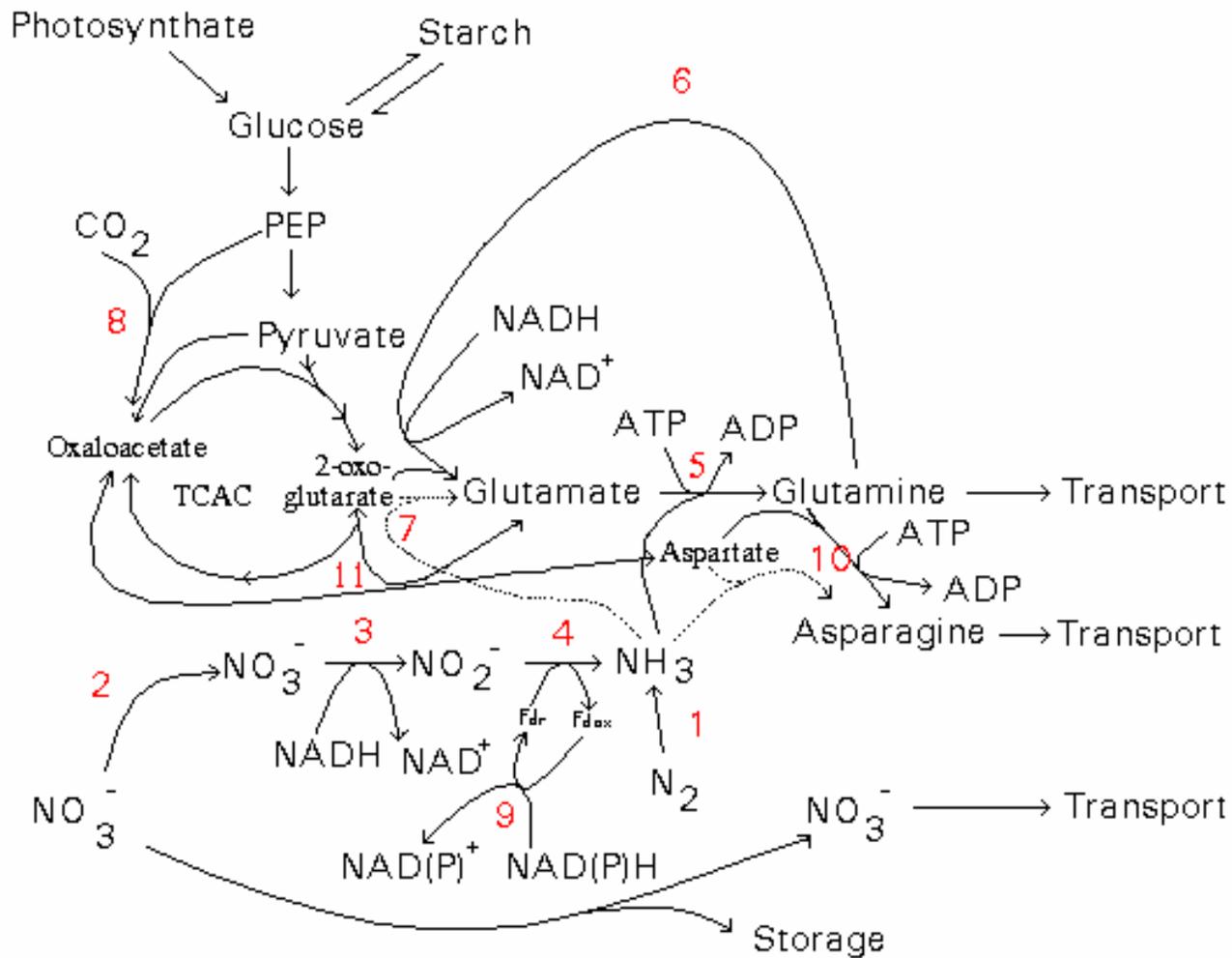


Figure 4. **Analyse en composantes principales** de données du métabolome concernant l'analyse de 4 génotypes différents - recherche de « metabolic phenotype clustering » (Fiehn et al., 2000)

Expression des gènes du métabolisme dans MapMan (Arabidopsis)





Nitrogen pathway in plants (A Oaks, 1992)

Cytosome, Imagerie

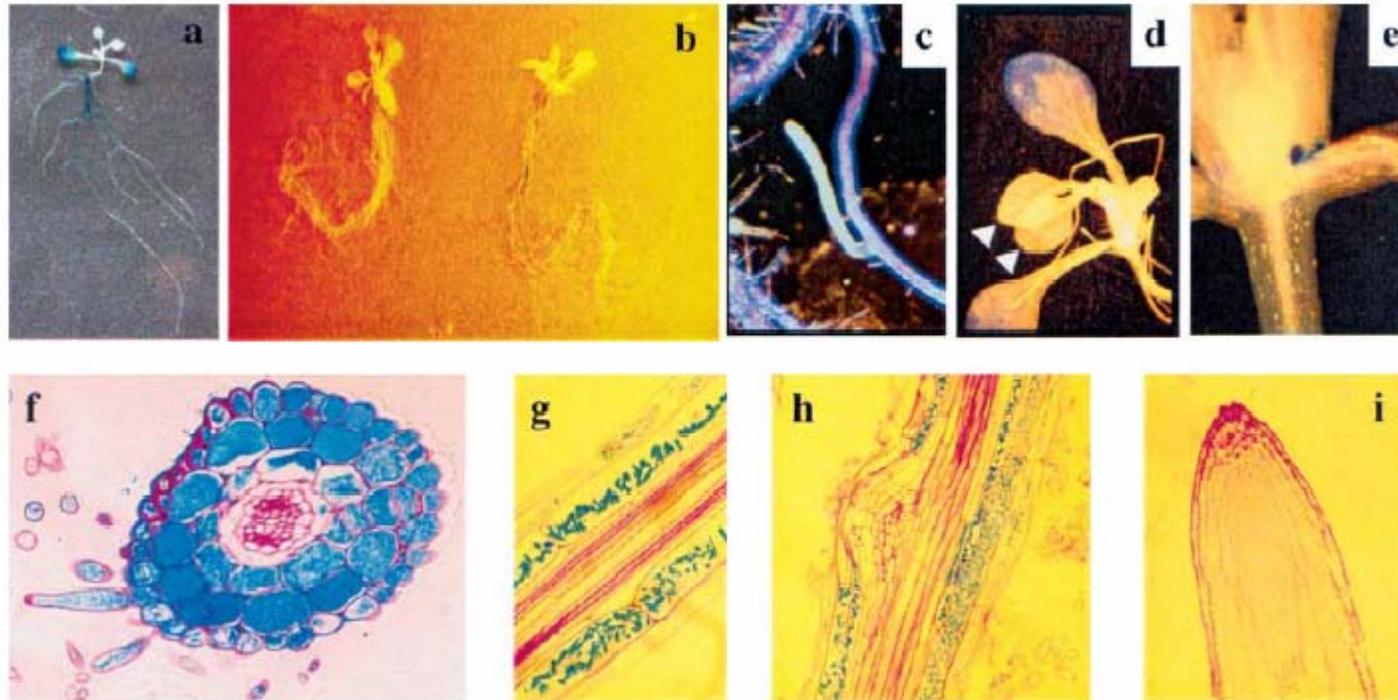
Exploration fonctionnelle de la cellule et des tissus biologiques par **microscopie** confocale, bi-photonique, à force atomique, à interférométrie, etc nanotopologie.

Parallèlement, développement des **techniques d'imagerie** (analyse d'image), d'utilisation de **sondes fluorescentes** (GFP), de **marqueurs**. **Hybridation in situ**: localisation du produit d'un gène (ARN ou protéine).

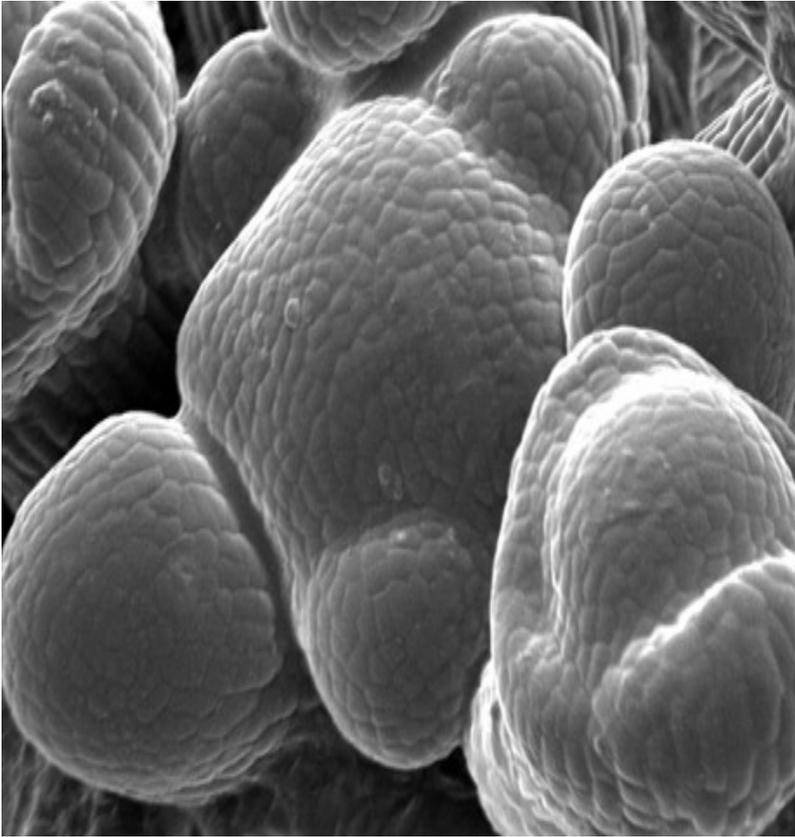
Observation de la **topologie cellulaire** sur des tissus vivants.

Expression du gène *AtNRT2.1* : Localisation tissulaire

Naoza *et al.*, 2003



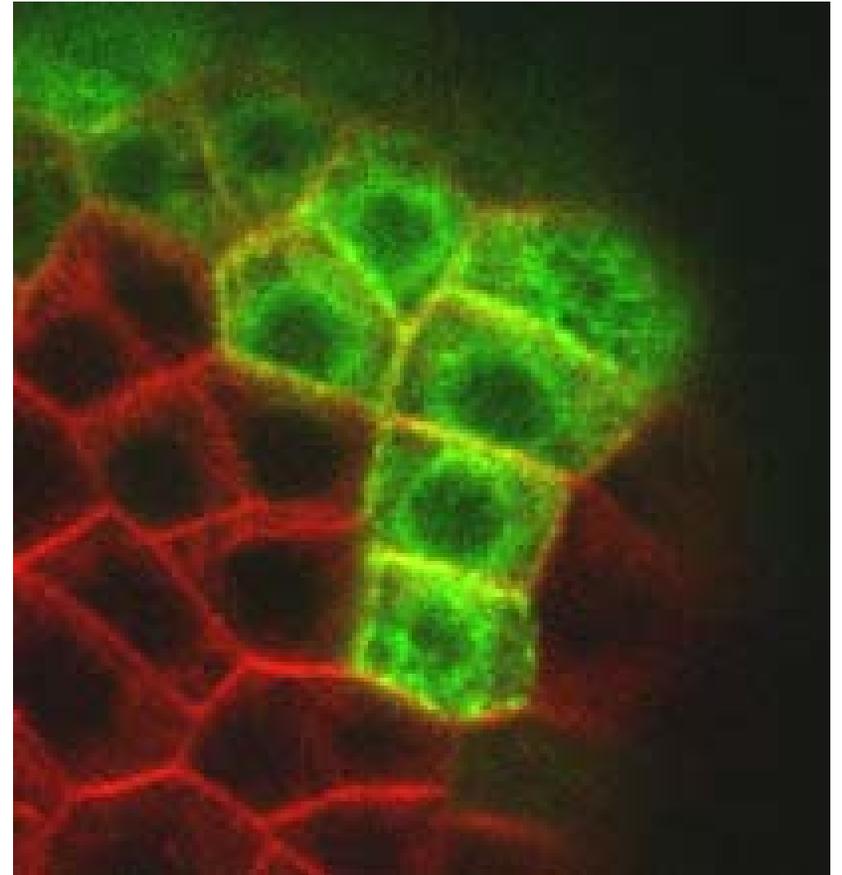
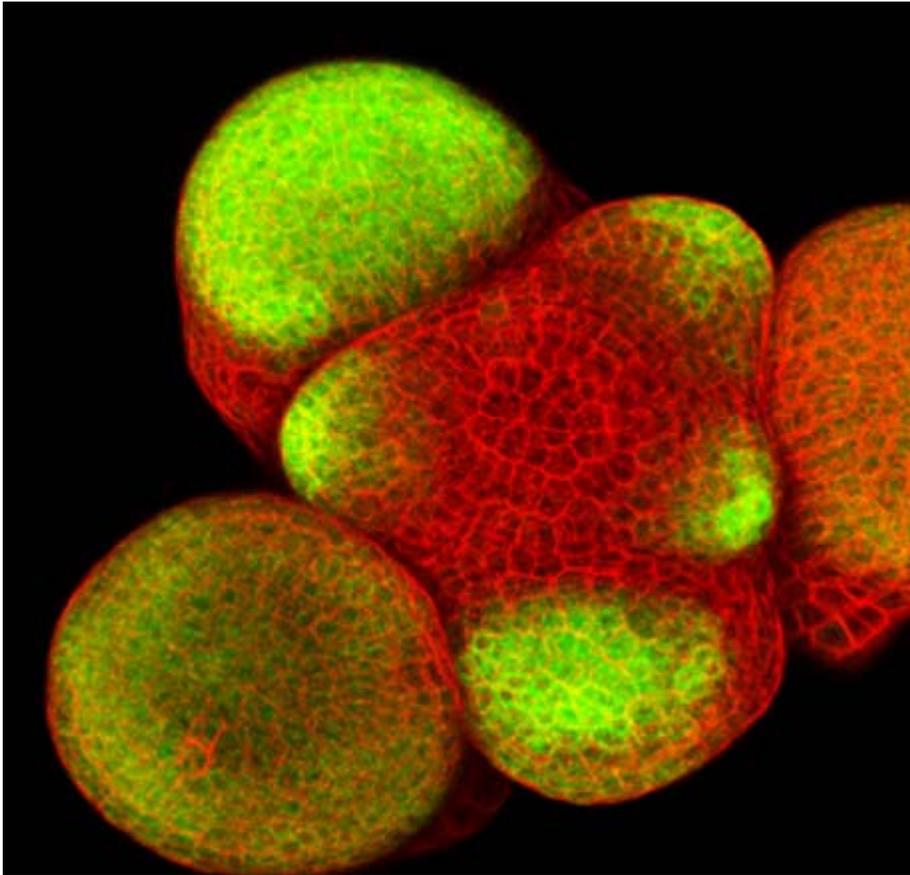
- Construction Promoteur *AtNRT2.1*::gène GUS
- Expression principalement dans les racines matures :
Epiderme, cortex et endoderme.



Méristème d'inflorescence
d'*Arabidopsis thaliana*.
Photo prise en microscopie
électronique à balayage.



Coupe longitudinale qui
traverse un jeune apex.
Le méristème apical (encerclé)
a déjà généré deux jeunes
feuilles. (J Traas)



Expression de la protéine fluorescente GFP sous contrôle d'un promoteur méristématique actif dans les très jeunes primordia du méristème d'inflorescence d'*Arabidopsis thaliana*. 5 J Traas et al. INRA Versailles

Biologie intégrative

Fonctionnement coordonné de milliers de gènes et de protéines (analyses simultanées de l'activité de vastes ensembles de gènes et de protéines).

Recherche pluridisciplinaire, à haut débit, à multi-échelle d'espace (molécule à population d'organismes), **à différents pas de temps** (développement) et **en relation avec l'environnement biotique et abiotique**.

Instrumentation complexe et abondance de données.

Le sens biologique et l'interprétation quantitative de la saga des « omiques », en particulier leur signification et rapports de causalité par rapport au phénomène étudié, dépend en grande partie d'une validation expérimentale indépendante et d'un affinement ultérieur des résultats.

Etude des **mutants** pour identifier les fonctions des gènes: **génétique inverse**.

Collections de mutants; étude de la variabilité génétique et de l'évolution des génomes.

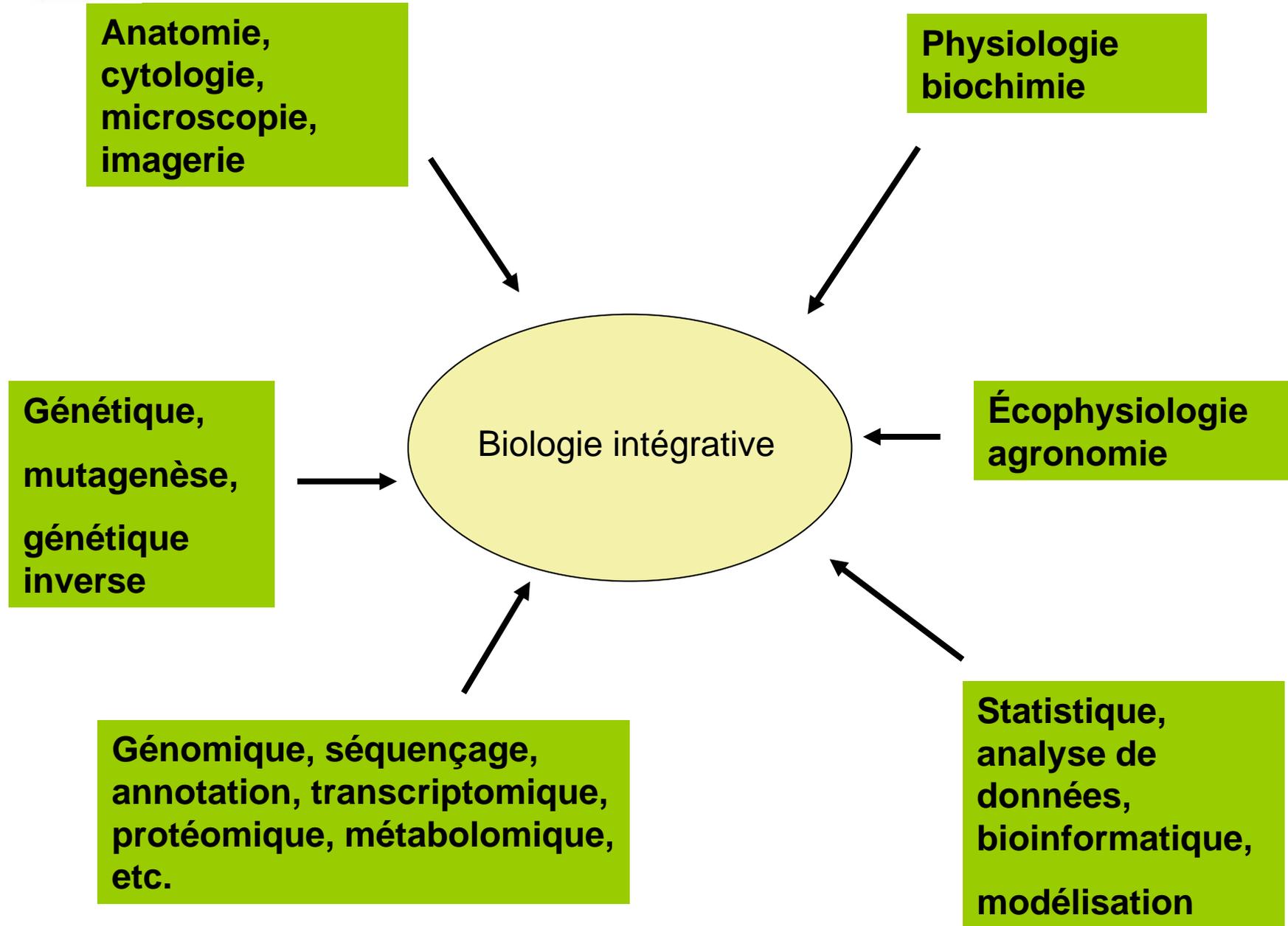
Analyse du polymorphisme couplée à celle des phénotypes permet d'établir des liens entre caractères quantitatifs et variabilité allélique. Les approches dites de QTL permettent d'identifier les allèles intervenant de manière majeure dans un caractère particulier.



Ces 40 dernières années, les approches analytiques portant sur des parties et des mécanismes de plus en plus fins ont largement dominé la biologie et ont abouti à une fragmentation des savoirs en biologie (**réductionisme**).

Récemment, un besoin de plus en plus clairement exprimé par les biologistes est de reconsidérer l'organisme vivant dans son intégralité et son fonctionnement global, en interaction avec son environnement (**biologie intégrative**)

L'avènement des techniques en « omique » permet cette approche pluridisciplinaire intégrée.



Au cours des années 90, une approche nouvelle de la Biologie, qualifiée de 'Biologie intégrative' s'est développée. Elle est actuellement considérée par certains comme une véritable révolution pour les Sciences de la Vie. En grande partie, elle a pour origine le développement spectaculaire, des nouvelles technologies de la génomique et du séquençage des génomes aux techniques d'analyse fonctionnelle des réseaux de gènes et de protéines. Les masses de données disponibles, sans commune mesure avec celles manipulées auparavant par les biologistes, nécessitent un véritable changement de paradigme pour, au delà de la description mécaniste des réseaux moléculaires en jeu, parvenir à une interprétation pertinente intégrant les différents niveaux d'organisation biologique. » [\[1\]](#).

[1\]](#) Extrait de : La Biologie Intégrative Végétale. Groupe de réflexion du Conseil Scientifique INRA, 21/02/2005