



**Plateau Technique Spécifique de Chimie du Végétal, IJPB, INRA
route de Saint Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.**

Les enjeux de la quantification des phytohormones dans une matrice complexe par l'HPLC-ESI-MS-MS.

Alessandra MAIA-GRONDARD

Lucien KERHOAS

Sommaire

- ⇒ Introduction sur les phytohormones
- ⇒ Problématique de la quantification
- ⇒ Application et adaptation de la méthode
- ⇒ Conclusion

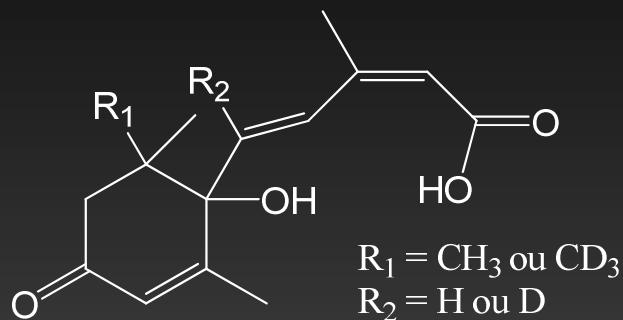
Introduction

⇒ **Phytohormone** : il s'agit d'une hormone produite par une plante. C'est une substance chimique organique qui régule la croissance végétale ou qui intervient dans la communication entre individus végétaux différents.

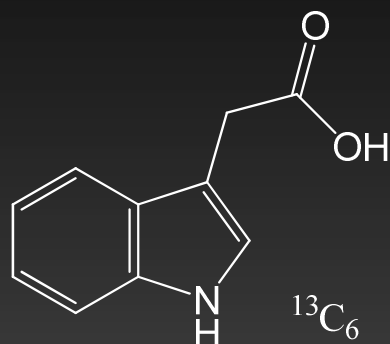
⇒ **Pour être une phytohormone, une substance doit être:**

- ⇒ endogène
- ⇒ oligodynamique
- ⇒ vectrice d'une information

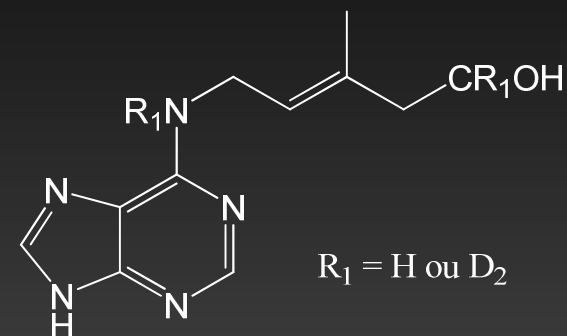
⇒ Les hormones d'intérêt :



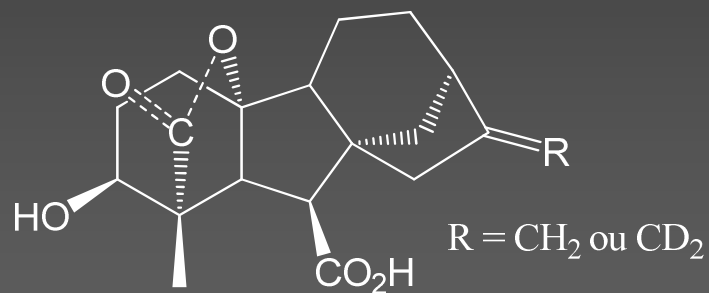
Acide Abscissique (ABA)



Auxine (AIA)



Cytokinines (Ck)
(10 dérivés)



Gibbérellines (Gb)
(8 dérivés)

⇒ Contexte du travail :

- Nous sommes en relation étroite avec les équipes de biologistes.
- Les substrats sont variés : feuilles, racines, graines, cals, etc...
- Plantes variées : *Arabidopsis thaliana*, Coton, Pois, mousse, etc...

Problématique de la quantification

⇒ Préparation des échantillons :

- recherche d'un bon compromis entre la simplicité et l'efficacité,
- extraction exhaustive par broyage en présence du solvant choisi (acétone/eau/acide acétique 80/19/1).
- concentration et reprise des extraits avec 50/50 ACN/H₂O.

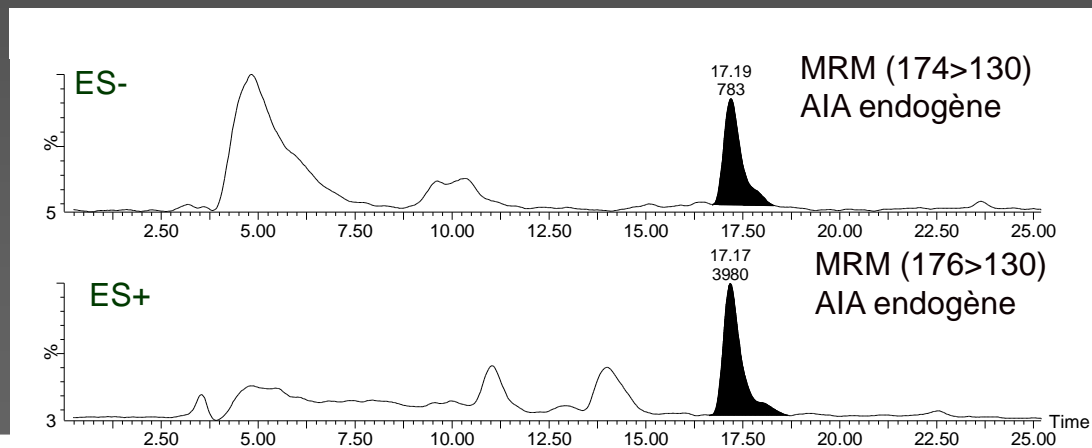
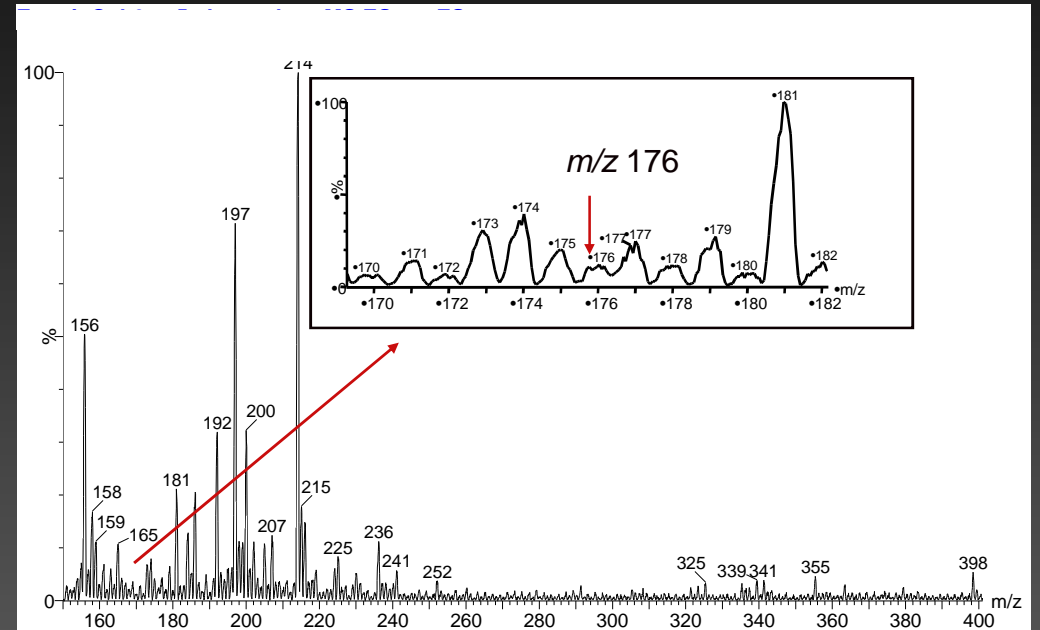
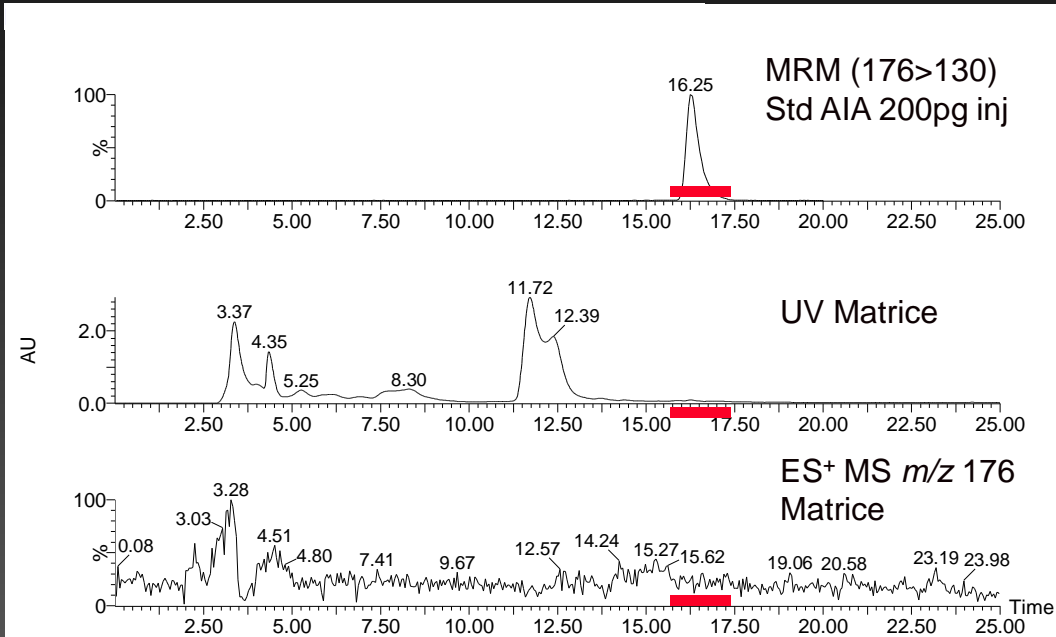
⇒ Analyse :

Méthodes de quantifications déjà publiées :

- GC-MS (Muller et al *Planta* 216 :44-56, 2002)
- ELISA
- LC-MSMS: en mode SIM et MRM (Zhou R J. *Chromatogr A* 1010 :75-85, 2003 ; Gomes-Cadenas A *Phytochem Analysis* 13 :228-234, 2002)

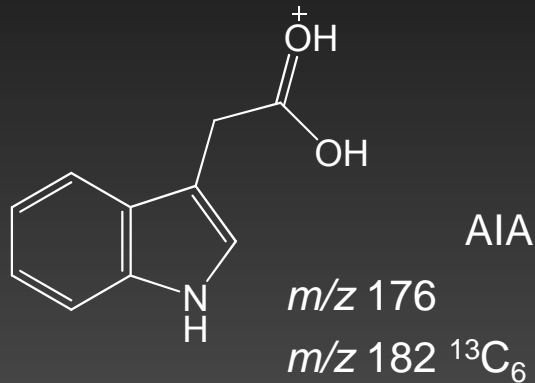
Appareil utilisé : HPLC (Alliance 2695, Waters) et un spectromètre de masse du type quadripolaire Quattro LCZ (Waters) muni d'une source ESI «Z-spray ».

➔ Matrice complexe :
 – Extrait brut d'une rosette d'*Arabidopsis*.

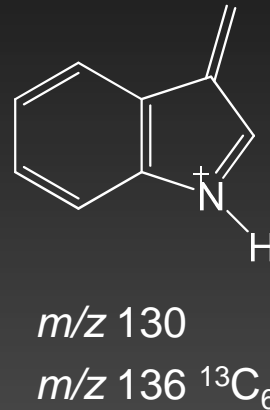
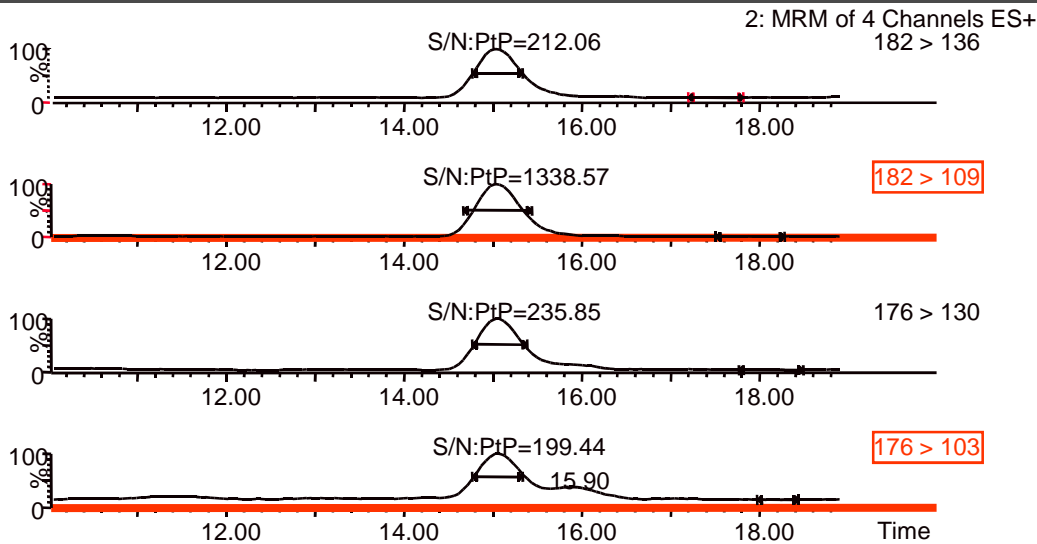


➔ Mise au point d'analyse :

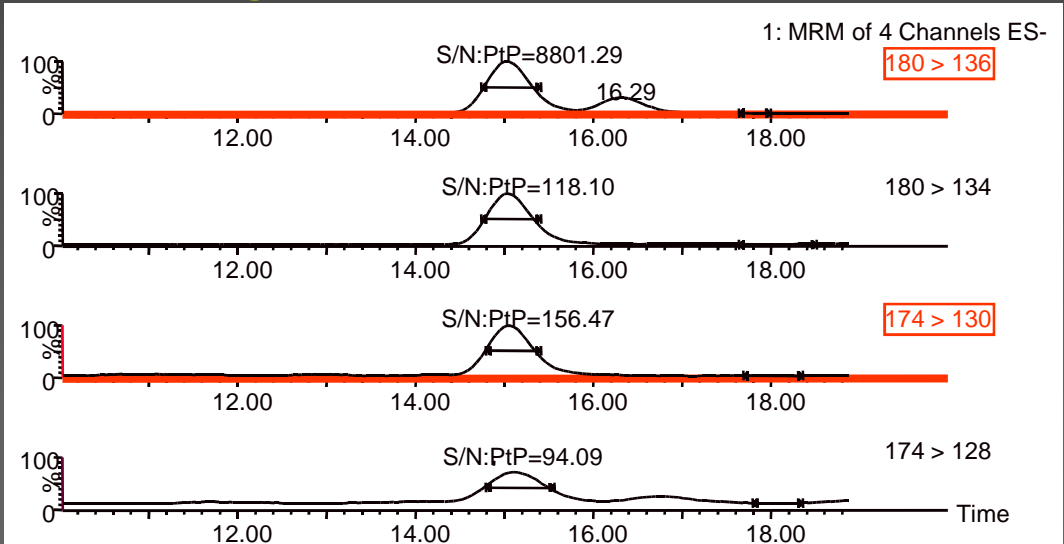
- **HPLC**: établir les paramètres de l'analyse pour chaque hormone,
- **MSMS**: Optimiser les réglages source et définir les meilleures transitions MRM.



Mode positif

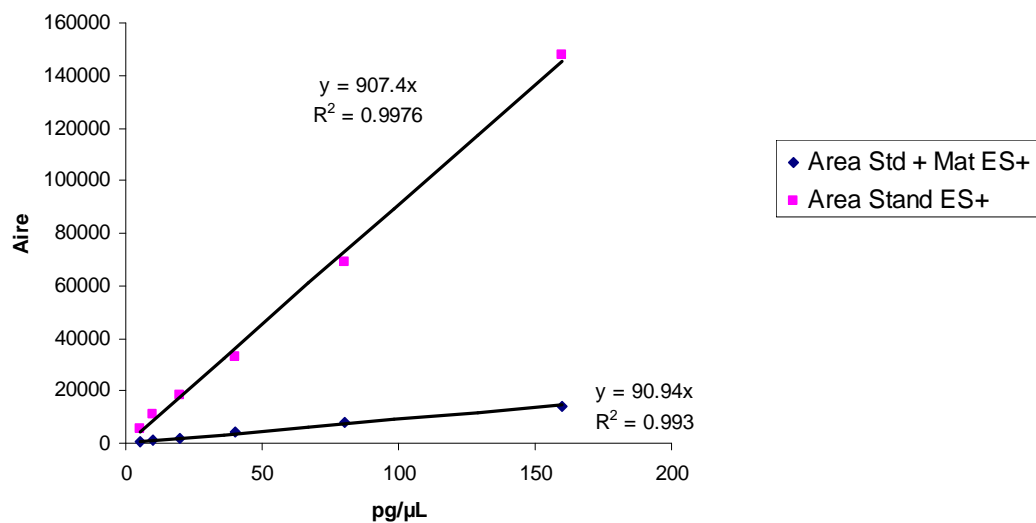


Mode négatif

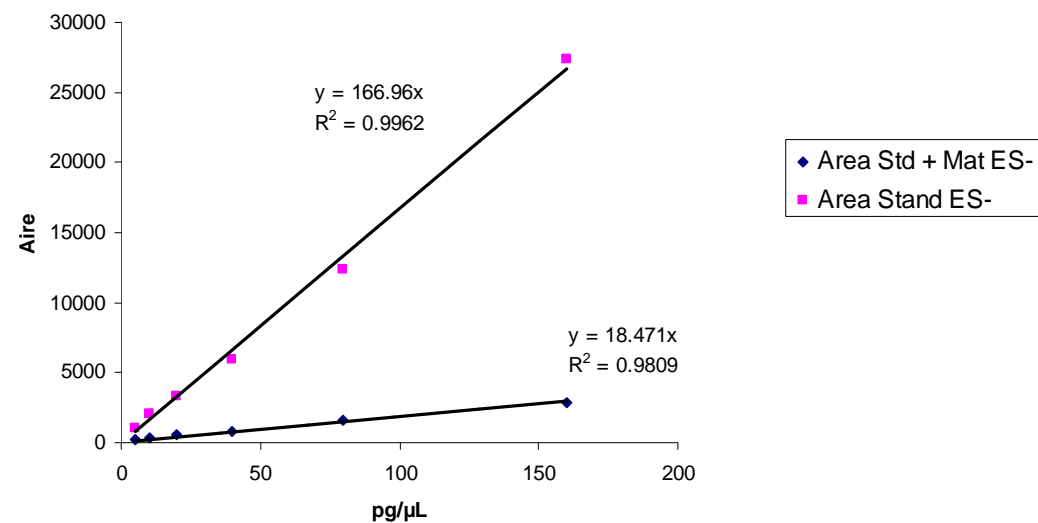


➔ Effet de Matrice :

L'effet de matrice en ES+

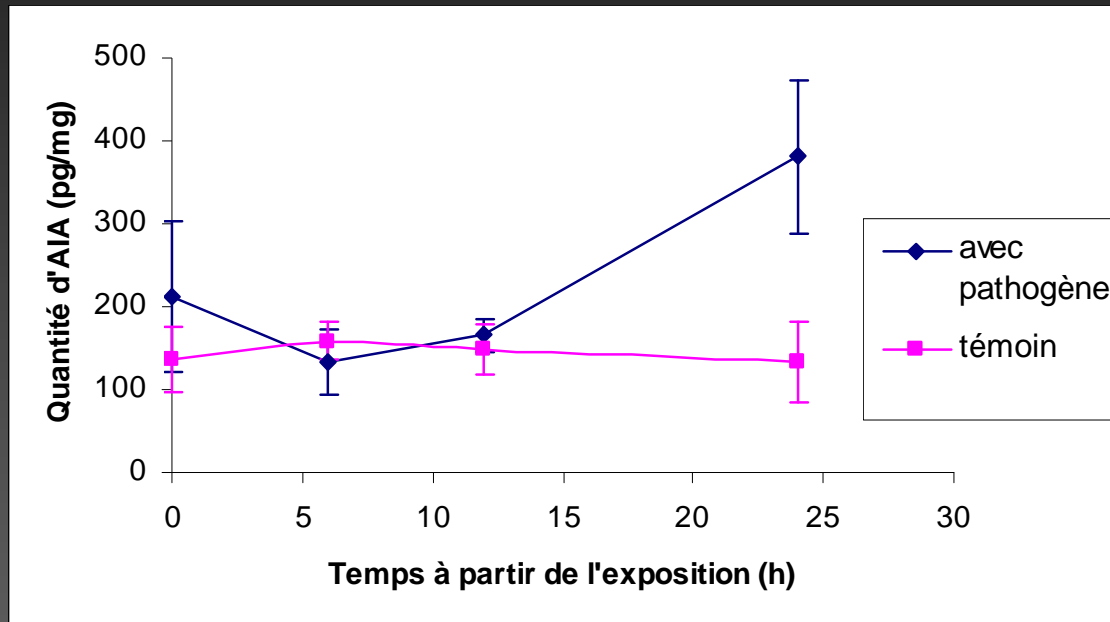


L'effet de matrice en ES-



➔ Application et adaptation de la méthode:

➔ Dosage D'AIA dans un extrait de rosette d'*Arabidopsis*



AIA $^{13}\text{C}_6$ 500 pg injecté
LOD: 0.73 pg/mg
LOQ: 1.94 pg/mg
(poids sec)

➔ Dosage des hormones simultanément :

- AIA et CKs
- ABA et Gbs.

- Variation entre les rapports des ions des hormones marquées et non marquées.
 - Solution des standards d'AIA $^{13}\text{C}_6$ (m) et AIA (nm) (concentrations égales).

Analyse en Mode MS

	<i>m/z</i> 176/182 en ES+	<i>m/z</i> 174/180 en ES-
Inj 1	104.4	107.5
Inj 2	106.2	125.7
Inj 3	108.84	99.5
Moyenne	107	110

Analyse en Mode ES+ MSMS

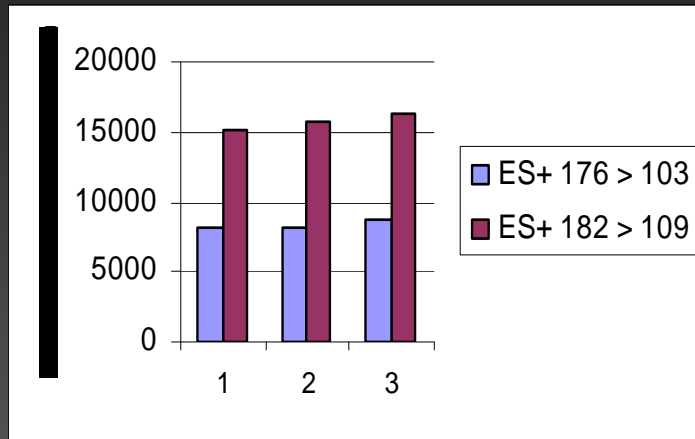
	nm	m	nm	m	nm/m	nm/m
	<i>m/z</i> 103	<i>m/z</i> 109	<i>m/z</i> 130	<i>m/z</i> 136	<i>m/z</i> 103/109	<i>m/z</i> 130/136
Aire	2829226	2813359	10680474	10040608	101	106

➔ Réglage des temps d'acquisition : (inter-channel-delay ICD et inter-scan-delay ISD)

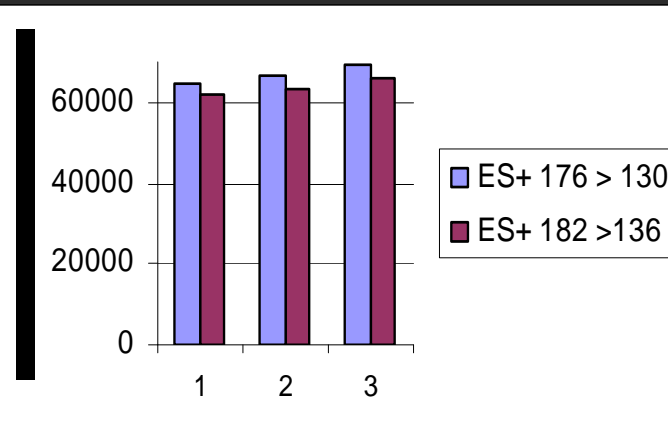
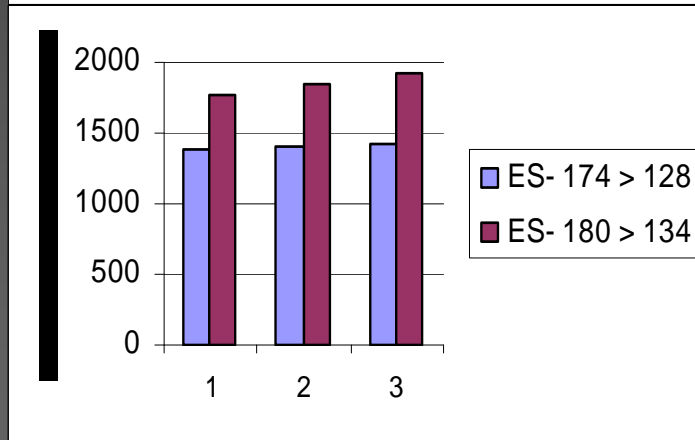
–Acquisitions en mode MRM (total 8 transitions).

–ICD = 0.1 s et ISD = 0.05 s

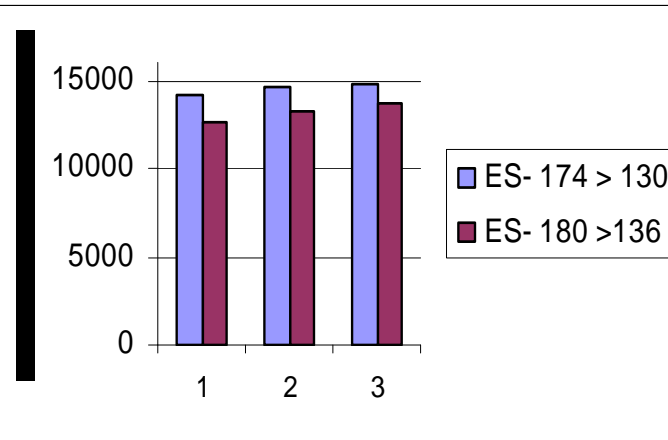
marqué >>
non marqué



marqué >
non marqué



marqué ~
non marqué



marqué ~
non marqué

⇒ Réglage des ICD et ISD :

	Mode positif		Mode négatif	
	176>103 / 182>109	176>130 / 181>136	174>128 / 180>134	174>130 / 180>136
ICD 0.1s ISD 0.05s	25551 / 42850 60	145742 / 132303 110	1063 / 1188 90	8041 / 7229 111
ICD 0.1s ISD 0.1s	13296 / 24536 54	75904 / 69163 110	1425 / 1539 93	10974 / 8985 122
ICD 0.1s ISD 0.2s	10537 / 26188 40	82167 / 76527 107	1280 / 1535 83	11180 / 9504 118

	Mode positif		Mode négatif	
	176>103 / 182>109	176>130 / 181>136	174>128 / 180>134	174>130 / 180>136
ICD 0.1s ISD 0.05s	25551 / 42850 60	145742 / 110	1063 / 1188 90	8041 / 7229 111
ICD 0.2s ISD 0.05s	21400 / 26225 82	80840 / 77153 105	1661 / 1560 107	11079 / 9370 118
ICD 0.25s ISD 0.05s	10515 / 26353 40	82702 / 78436 105	1236 / 1517 81	11347 / 9499 119

⇒ Réglage des ICD et ISD :

	Mode positif		Mode négatif	
Transitions	176>103 / 182>109	176>130 / 181>136	174>128 / 180>134	174>130 / 180>136
ICD 0.2s	47357/47081	158786/142956	1858/1703	11393/9844
ISD 0.2s	101	111	109	115

⇒ **conclusion** : avec ICD et ISD à 0.2 s nous pouvons travailler avec 4 transitions différentes simultanément. (un pic de 30 s à mi-hauteur = 15 points de mesure par transition)

Conclusion :

- Actuellement nous avons la possibilité de réaliser les dosages des phytohormones: **ABA, AIA, CKs (10 dérivés) Gibbérellines (8 dérivés)**.
- Nos méthodologies sont validées:
 - répétitivité ,
 - LOD et LOQ,
 - justesse,
 - effet de matrice,
 - linéarité.

Conclusion :

- Difficultés pour réaliser les dosages :
 - **concentration extrêmement faible** des composés à doser et les **limites de sensibilité** de plus en plus faibles sont exigées,
 - leur dispersion dans des matrices **complexes** et **variées**,
 - le **nombre de composés différents** appartenant à des **familles chimiques différentes**,
 - **la quantification**.

- Dans le cas des analyses sur des plantes :
 - la **variabilité biologique**
 - la **taille des échantillons** ~ volumes très faibles

Remerciements

- ⇒ Lucien KERHOAS
- ⇒ François PERREAU
- ⇒ Les équipes de biologie du IJPB.

**Plateau Technique Spécifique de Chimie du Végétal
Versailles**