



HAL
open science

Profiling of tannins, flavonoids and hydroxycinnamic esters in the fruits of a cider apple progeny

Nathalie Marnet, Nicolas Childebrand, Gildas Le Bail, Alexandra Leroux, Romain Mabon, Camille Baron, Jean-Michel Le Quéré, Cindy Verdu, Francois Laurens, Yves Lespinasse, et al.

► To cite this version:

Nathalie Marnet, Nicolas Childebrand, Gildas Le Bail, Alexandra Leroux, Romain Mabon, et al.. Profiling of tannins, flavonoids and hydroxycinnamic esters in the fruits of a cider apple progeny. 6. Journées Scientifiques RFMF, May 2012, Nantes, France. 131 p. hal-02749342

HAL Id: hal-02749342

<https://hal.inrae.fr/hal-02749342>

Submitted on 3 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.

Sixièmes Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique

21-23 Mai 2012

Université de Nantes

Comité Local Scientifique et d'Organisation

Serge Akoka, Patrick Giraudeau, Illa Tea,	CEISAM , Nantes
Jean-Philippe Antignac, Frédérique Courant	Laberca , Nantes
Alain Bouchereau	P2M2, UMR Igepp, Le Rheu
Véronique Ferchaud-Roucher, Michel Krempf	CNRH , Nantes
Sophie Goulitquer, Philippe Potin	Métabomer , Station Biologique de Roscoff
Laurent Rivet	Corsaire Biogenouest , Le Rheu

Comité National d'Organisation

Catherine Deborde, Dominique Rolin	PF Métabolome Bordeaux & UMR1332 BFP - Bordeaux
Muriel Gauthier, Marie-Lou Lombard	UMR1332 BFP - Bordeaux
Alain Girard	Communication - INRA Bordeaux

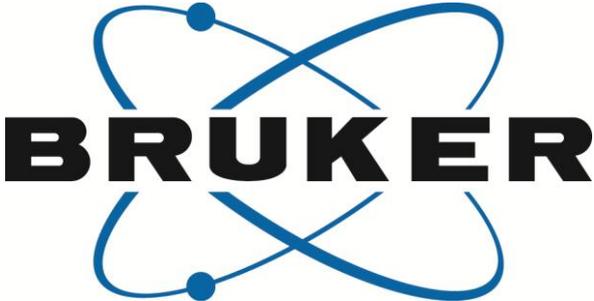
Conseil d'Administration du Réseau

Cécile Canlet	UMR Toxalim INRA - Toulouse
Catherine Deborde	PF Métabolome Bordeaux & UMR1332 BFP - Bordeaux
Anne-Marie Delort	ICCF - Aubière
Fabien Jourdan	UMR Toxalim - Toulouse
Christophe Junot	DSV/iBiTec-S/SPI CEA Saclay
Marie-Lou Lombard	UMR1332 BFP - Bordeaux
Jean-Charles Martin	Biomet_NORT - Marseille
Alain Paris	UMR Metarisk - Paris
Jean-Charles Portais	Métatoul & LISBP - Toulouse
Estelle Pujos	PFEM Clermont-Ferrand
Dominique Rolin	PF Métabolome Bordeaux & UMR1332 BFP - Bordeaux

Partenaires des Sixièmes Journées Scientifiques

	<p>Institut national de la recherche agronomique</p> <p>147 rue de l'Université F-75338 Paris Cedex 07</p> <p>Site web: http://www.inra.fr/</p>	
	<p>Biogenouest</p> <p>INRA IGEPP, Domaine de la Motte BP 35327 F-35653 Le Rheu Cedex</p> <p>Site web: http://www.biogenouest.org/index.php</p>	
	<p>GIS IBISA</p> <p>Site web: http://www.ibisa.net/</p>	
	<p>ITMO Technologies pour la Santé</p> <p>Institut Thématique Multi-Organismes "Technologies pour la Santé"</p> <p>175 rue du Chevaleret F-75013 Paris</p> <p>Site web: http://www.aviesan.fr/fr/aviesan/accueil/menu-header/instituts-thematiques-multi-organismes/technologies-pour-la-sante</p>	
	<p>INRA Département Biologie Végétale</p> <p>Centre de Recherche INRA de Montpellier 2, place Pierre Viala - Bât. 7 F-34060 Montpellier cedex 01</p> <p>Site web: http://www4.inra.fr/biologie-vegetale/</p>	

 <p>UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES</p>	<p>Université de Nantes</p> <p>1, quai de Tourville, BP 13522 F-44035 Nantes Cedex 1</p> <p>Site web: http://www.univ-nantes.fr/</p>	
 <p>Région BRETAGNE</p>	<p>Région Bretagne</p> <p>283, avenue du Général Patton, CS 21 101, F-35 711 Rennes Cedex</p> <p>Site web : http://www.bretagne.fr/internet/jcms/j_6/accueil</p>	
 <p>Région PAYS DE LA LOIRE</p>	<p>Région Pays de la Loire</p> <p>Direction de la Communication 1, rue de la Loire F-44966 Nantes Cedex 9</p> <p>Site web : www.paysdelaloire.fr/</p>	
<p>Waters THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™</p>	<p>Waters</p> <p>5 rue Jacques Monod F-78280 Guyancourt</p> <p>Site web : http://www.waters.com/</p>	STAND
 <p>Thermo S C I E N T I F I C</p>	<p>Thermo Fisher Scientific</p> <p>16 avenue du Québec - Silic 765 Villebon-sur-Yvette F-91963 Courtaboeuf cedex</p> <p>Site web : http://www.thermoscientific.com/</p>	STAND

	<p align="center">AB SCIEX</p> <p align="center">Parc Technopolis - Bâtiment Sigma 3 avenue du Canada F-91940 Les Ulis</p> <p>Site web : http://www.absciex.com/</p>	<p align="center">STAND</p>
	<p align="center">Bruker BioSpin S.A.</p> <p align="center">34, rue de l'industrie - BP 10002 F-67166 Wissembourg cedex</p> <p>Site web : http://www.bruker.fr</p>	<p align="center">STAND</p>
	<p align="center">Chenomx</p> <p align="center">4350, 10230 Jasper Ave., Edmonton, AB, Canada T5J 4P6</p> <p>Site web : http://www.chenomx.com/</p>	<p align="center">STAND</p>
	<p align="center">AGILENT TECHNOLOGIES</p> <p align="center">33 rue du Dr Georges Levy Parc/Club du moulin à vent 69693 Vénissieux</p> <p>Site web : http://www.agilent.com</p>	<p align="center">STAND</p>
 <p align="center">YOUR PARTNER FOR LABELLED COMPOUNDS — (13C, 15N, D, 18O) —</p>	<p align="center">Euriso-Top</p> <p align="center">Parc des Algorithmes ,Bâtiment Homère Route de l'Orme F-91194 Saint Aubin</p> <p>Site web: http://www.eurisotop.com/</p>	<p align="center">STAND</p>

 <p>ACD / Labs</p>	<p>Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)</p> <p>3 quai Kléber, Tour Sébastopol, F-67000 Strasbourg</p> <p>Site web: http://www.acdlabs.com/home/</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">STAND</p>
 <p>Delivering the Right Results</p>	<p>LECO France</p> <p>ZAC Les Doucettes 22 avenue des Morillons BP 70074 F-95144 Garges-Les-Gonesse cedex</p> <p>Site web: http://www.lecofrance.com/</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">STAND</p>
 <p>SIGMA PLUS</p>	<p>SIGMA PLUS</p> <p>6 rue Collange F-92300 Levallois-Perret</p> <p>Site web: http://www.sigmaplus.fr</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">STAND</p>
 <p>nonlinear D Y N A M I C S</p>	<p>Nonlinear Dynamics</p> <p>Keel House Garth Heads NJ1 2 JE Newcastle Upon Tyne UK</p> <p>Site web: http://www.nonlinear.com/</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">STAND</p>

Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique
6^{èmes} Journées Scientifiques - 21 au 23 mai 2012
Nantes

Programme

Lundi 21 mai 2012

10h00 – 11h00 *Initiative IBiSA RFMF : Atelier « Test Circulaire Métabolomique »*
Animateur : Jean-Charles Martin.

11h00 – 12h30 *Initiative IBiSA RFMF : Atelier « Etude de la reproductibilité des spectres MS/MS pour la constitution d'une banque de données de métabolites »*
Animateur : Christophe Junot.

13h00 – 14h00 *Accueil des participants – Buffet – Amphi Pasteur*

14h00 – 14h10 **Allocution de Bienvenue – Amphi A**
Michel Evain, Doyen UFR Sciences et Techniques

14h10 – 14h20 **Allocution de Bienvenue.**
Michel Renard, Directeur de Biogenouest

14h20- 14h30 **Introduction aux Journées.**
Laurent Rivet, représentant le Comité local d'organisation des 6 JS RFMF, et
Dominique Rolin président du RFMF.

14h30 – 15h15 Conférence Plénière invitée 1
Chairwoman : Frédérique Courant, Nantes, France

14h30 – 15h15 **Towards an improved and automated pipeline for metabolite identification.**
Leon Coulier, Zeist, Pays-Bas

O1

15h20 – 15h40 Session «Méthodologie»
Chairman : Olivier Collin, Rennes, France

15h20 – 15h35 **Nouvelles approches en RMN 2D rapide et ultrarapide pour la quantification de métabolites.**
Patrick Giraudeau, Nantes, France **O2**

15h40 Session Flash 1

(Présentations de 5 minutes (2-3 diapos) faites par les participants sur la base de leur poster.)

15h40 **Recherche de déterminants métaboliques associés à la résistance polygénique du colza à la hernie des crucifères.**
Antoine Gravot, Rennes, France **F1-P1**

15h45 **MALDI mass spectrometry imaging applied to small molecules localization.**
Yann Guitton, Lille, France **F2-P2**

15h50 **Exploration du transfert materno-fœtal des nutriments et du statut métabolique des nouveau-nés prématurés au travers d'une analyse métabolomique du sang de cordon par CL-HR-SM.**
Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Nantes, France **F3-P3**

15h55 – 16h35 Session «Méthodologie» 1
Chairman : Olivier Collin, Rennes, France

15h55 – 16h10 **Apport de l'analyse en composantes indépendantes à l'annotation de jeux de données d'analyse métabolomique.**
Minale Ouethrani, Gif-sur-Yvette, France **O3**

16h15 – 16h30 **NMR based metabolomics study of a cerebral ischemia model: a practical look into the metabolic profiling pipeline of small tissue amounts**
Silvia Mari, Milan, Italie **O4**

16h35 – 17h05 PAUSE

17h05 – 17h25 Session «Méthodologie» 2
Chairman : Serge Akoka, Nantes, France

17h05 – 17h20 **Stratégies statistiques pour la mise en relation de données protéomiques et métabolomiques: étude de cas en nutrition humaine.**
Thomas Moyon, Nantes, France **O5**

17h25 Session Flash 2

(Présentations de 5 minutes (2-3 diapos) faites par les participants sur la base de leur poster.)

- 17h25 **L'analyse métabolomique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour stratifier les patients atteints de diabète de type 2.**
Samia Boudah, Gif-sur-Yvette, France **F4-P4**
- 17h30 **Elucidating the strategies of females *Anopheles gambiae* complex, during dry season at Burkina Faso by metabolic fingerprinting and proteomics.**
Kevin Hidalgo, Rennes, France **F5-P5**
- 17h35 **Production of 3,5-di-O-cafeoylquinic acid by *Cichorium intybus* cell suspension culture : metabolomic study by LC-DAD, LC-ESI-MSn and gene expression monitoring by RT-PCR.**
Adeline Harant, Lille, France **F6-P6**

17h40 – 18h00 Session « Méthodologie » 3

Chairman : Serge Akoka, Nantes, France

- 17h40–17h55 **Développements méthodologiques pour la caractérisation des mélanges de substances naturelles : Application à un extrait végétal valorisé en dermocosmétique.**
Jane Hubert, Reims, France **O6**

18h00 – 18h40 Session « Initiatives IBiSA RFMF »

- 18h00 – 18h15 **Utilisation d'une procédure d'analyse standardisée en vue de la comparaison de spectres MS/MS sur différentes plateformes instrumentales.**
Farid Ichou, Paris, France **O7**
- 18h20 – 18h35 **Peut-on faire confiance à la métabolomique: résultats de l'initiative MetaboRing.**
Jean-Charles Martin, Marseille, France **O8**

18h40 – 19h00 Session « Industriel »

- 18h40 – 18h55 **Hybrides Orbitrap et analyse différentielle : approches instrumentales et solutions logicielles.**
Eric Génin, Courtaboeuf, France **O9**
- 19h00 – 19h15 **Infusion MS/MSALL Workflow for complete lipids characterization on the AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System.**
Pierrick Daniel, Nantes, France **O10**

19h30 **Apéritif Huîtres-Muscadet**

19h30 – 20h30 : Réunion du Conseil d'Administration du RFMF (réservée aux membres du Conseil d'Administration)

Mardi 22 mai 2012

8h30 **Session « Industriels » 1**

Chairwoman : Véronique Ferchaud-Roucher, Nantes, France

8h30 – 8h45 **Profiling and Quantitation of Metabolomic “Signatures” for Breast Cancer Cell Progression.**
Lucy Fernandes, Manchester, UK **O11**

8h50 **Session « Lipidomique »**

Chairwoman : Véronique Ferchaud-Roucher, Nantes, France

8h50 – 9h05 **Mise au point d'une approche globale par LC-MS à très haute resolution pour la détection des molécules lipidiques dans les biofluides et les tissus.**
Benoit Colsch, Gif-sur-Yvette, France **O12**

9h10 – 9h25 **La lipidomique dans la compréhension du film hydrolipidique cutané.**
Rime Michael-Jubeli, Chatenay-Malabry, France **O13**

9h30 – 9h45 **Le Céramide et la sphingomyélinase acide secrétés, marqueurs de la réponse à la radiothérapie.**
François Paris, Nantes, France **O14**

9h50 **Session Flash 3**

(Présentations de 5 minutes (2-3 diapos) faites par les participants sur la base de leur poster.)

Chairwoman : Véronique Ferchaud-Roucher, Nantes, France

9h50 **Compositional changes of tomato seeds during development and maturation**
Cécile Cabasson, Villenave d'Ornon, France **F7-P7**

9h55 **Ultrafast multidimensional NMR methods for measuring isotopic enrichments in complex metabolic samples.**
Meerakhan Pathan, Nantes, France **F8-P8**

10h00

GC-MS metabolomic at INRA-Versailles.

Gilles Clément, Versailles, France

F9-P9

10h05 -10h35 PAUSE - Echanges informels

10h35 – 11h30 Conférence Plénière invitée 2

Chairman : Fabien Jourdan, Toulouse, France

10h35 – 11h25 Determining drug action with Metabolomics - The Scottish Metabolomics Facility

Mike Barrett, Glasgow, UK

O15

Session parallèle A – Amphi A

11h35 – 12h30 Session « Santé » 1

Chairwoman : Illa Tea, Nantes, France

11h35 – 11h50 The effects of hyperglycaemia, inflammatory cytokines and dietary polyphenols on the human vascular endothelial cell metabolome assessed using non-targeted ¹H NMR profiling.

Besim Ozyel, Norwich, UK

O16

11h55 – 12h10 Evaluation of Dose- and time-dependent effects of drugs on metabolic profiling in Human HepaRG cells – Analysis of time series-data.

Hubert Chassaigne, Ispra, Italie

O17

12h15 – 12h30 Impact de la composition du lait maternel sur les dérégulations du métabolisme de la descendance dans un modèle de programmation nutritionnelle.

Aurore Martin-Agnoux, Nantes, France

O18

Session parallèle B – Amphi Pasteur

11h35 – 12h30 Session « Fluxomique, Biotechnologie & Microbiologie » 1

Chairwoman : Anne-Marie Delort, Clermont-Ferrand, France

11h35 – 11h50 A robotic platform for high-throughput fluxome analysis.

Juliette Poinot, Toulouse, France

O21

11h55 – 12h10 IsoCor et influx_'s : deux outils pour la ¹³C-fluxomique haut-débit.

Pierre Millard, Toulouse, France

O22

12h15 – 12h30 **Identification de nouvelles fonctions métaboliques par des approches métabolomiques chez la bactérie du sol aérobie stricte, *Acinetobacter baylyi* ADP1.**
Alain Perret, Evry, France

O23

12h35 – 14h REPAS

Session parallèle A (Suite) – Amphi A

14h00 – 14h40 Session « Santé » 2

Chairman : Patrick Giraudeau, Nantes, France

14h00 – 14h15 **Analyses métabolomiques par RMN ¹H de lignées cellulaires de mélanome humain.**
Stéphane Ballayssac, Toulouse, France

O19

14h20 – 14h35 **High-field NMR Metabonomics for Cancer Diagnosis and Phase II Evaluation of Chemotherapy Strategies.**
Elodie Jobard, Lyon, France

O20

Session parallèle B (Suite) – Amphi Pasteur

14h00 – 12h30 Session « Fluxomique, Biotechnologie & Microbiologie » 2

Chairwoman : Anne-Marie Delort, Clermont-Ferrand, France

14h00 – 14h15 **First characterisation of *in situ* bacterial metabolism in model cheeses using mass spectrometry metabolic fingerprinting.**
Clémentine Le Boucher, Rennes, France

O24

14h20 – 14h35 **Etude métabolomique de la réponse au froid d'une bactérie isolée des nuages. Premiers résultats.**
Isabelle Canet, Clermont-Ferrand, France

O25

14h40 – 15h35 Conférence Plénière invitée 3

Chairwoman : Sophie Goulitquer, Roscoff, France

14h40 – 15h30 **Diatom endo and exometabolome analysis supported deciphering of ecological interactions in the plankton.**
Georg Pohnert, Jena, Allemagne

O26

Mercredi 23 mai 2012

8h45 Session «Etudiants Toulousains»

Chairman : Dominique Rolin, Villenave d'Ornon, France

- 8h45 – 9h50 **Présentation du Master Pro de Biochimie Structurale Protéomique et Métabolomique.**
Maxime Julien, Nantes, France
- 8h50 – 9h00 **Cancer et métabolomique: intérêt pour la clinique.**
Lenaïc Leroux, Toulouse, France
- 9h00 – 9h10 **Cancer et métabolomique: intérêt pour la compréhension fine de la cellule cancéreuse.**
Florian Cappelleso, Toulouse, France

9h20 – 10h40 Session «Agronomie et Environnement»

Chairman : Alain Bouchereau, Rennes, France

- 9h20 – 9h35 **Effets métaboliques de l'hormone de croissance sur des poneys mis en évidence après filtration des effets saisonniers.**
Mohamed N. Triba, Bobigny, France O29
- 9h40 – 9h55 **Analyse de données de métabolomique issues d'un plan expérimental : l'ASCA**
Marie Tremblay-Franco, Toulouse, France O30
- 10h00 – 10h15 **Metabolomics for the functional analysis of Cytochrome P450 in plants**
Raphaël Lugan, Strasbourg, France O31
- 10h20 – 10h35 **Metabolic signatures of oilseed rape (*Brassica napus* L.) source and sink leaves under nitrogen and/or water limiting conditions**
Benjamin Albert, Rennes, France O32

10h40 - 11h10 PAUSE - Echanges informels

11h10 – 12h25 Session «Agronomie et Environnement » 1

Chairman : Jean-Philippe Antignac, Nantes, France

- 11h10–11h25 **Physiological plasticity of insects: metabolic differences in salinity tolerance between two sympatric subantarctic flies.**
David Renault, Rennes, France **O33**
- 11h30–11h45 **Interaction entre l'abeille domestique et un microorganisme pathogène : étude des conséquences sur l'hémolymphe par une approche métabolomique.**
Cyril Jousse, Clermont-Ferrand, France **O34**
- 11h50–12h05 **Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances.**
Gaud Pinel, Nantes, France **O35**
- 12h10–12h25 **Métabolomique semi-ciblée par LC-HRMS de métabolites de pesticides dans des urines : vers une caractérisation de l'exposition humaine ?**
Emilien Jamin, Toulouse, France **O36**

12h30 – 12h40 **Clôture des Journées** Laurent Rivet, représentant le Comité local d'organisation des 6 JS RFMF, et Dominique Rolin président du RFMF.

12h40 – 13h45 BUFFET

14h00 – 17h00 Atelier 1 «Atelier sur le traitement post-acquisition des données métabolomiques générées par couplage chromatographie – spectrométrie de masse.» Laberca
Jean-Philippe Antignac et Frédérique Courant, Nantes, France.

14h00 – 17h00 Atelier 2 « Méthodes d'acquisition et de traitement des données en RMN métabolomique» Amphi Pasteur
Serge Akoka et Patrick Giraudeau, Nantes, France.

14h00 – 17h00 Atelier 3 « Evaluation of metabolomics data with multivariate methods in SIMCA-13 and Quantitative Systems biology in SIMCA 13 » Amphi A
Erik Johansson, Umea, Suède, et Christian Charles, Levallois-Perret, France.

Résumés

Communications Orales

01- Conférencier Invité

Towards an improved automated workflow for metabolite identification

Leon Coulier^{1,2}, Julio Peironcely^{1,2,3}, Justin van der Hooft^{1,4}, Miguel Rojas-Cherto^{1,3}, Pjotr Kasper^{1,3}, Velitckha Mihaleva^{1,5}, Jacques Vervoort^{1,5}, Theo Reijmers^{1,3}, Ric de Vos^{1,4}, Rob Vreeken^{1,3}, Thomas Hankemeier^{1,3} and Albert Tas^{1,2}

¹ *Netherlands Metabolomics Centre, Leiden, the Netherlands,*

² *TNO, Zeist, the Netherlands,*

³ *Leiden University, Leiden, the Netherlands,*

⁴ *Plant Research International, Wageningen, the Netherlands,*

⁵ *Wageningen University, the Netherlands*

Identification of unknown metabolites is one of the major bottlenecks in metabolomics. This hampers the use of untargeted analytical platforms and has a negative impact on the discovery of new biomarkers and biological knowledge.

Within the Netherlands Metabolomics Centre several groups are working on an improved automated pipeline for metabolite identification by developing a set of novel (semi-)automatic tools. This includes the acquisition and processing of high resolution MS and MSⁿ data, calculation of possible chemical structures from elemental composition and candidate rejection using substructure information and physical/chemical properties. Additional information obtained from LC-SPE-NMR-MSⁿ, NMR prediction tools and chemometric tools to determine metabolite-likeness will further reduce the number of candidates and/or rank the possible chemical structures.

The principles of the different tools will be shown as well as the first examples of integration of the different tools using examples from plants and biofluids.

Nouvelles approches en RMN 2D rapide et ultrarapide pour la quantification de métabolites

Patrick Giraudeau, Illa Tea, Estelle Martineau, Meerakhan Pathan, Serge Akoka

Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, Nantes, France

Les études métabolomiques par RMN reposent généralement sur un protocole d'acquisition très standardisé par RMN 1D, associé avec un traitement statistique multivarié. Cependant, la quantification des métabolites à partir de telles expériences est souvent rendue difficile par le recouvrement important entre les pics. Nous avons récemment proposé un ensemble d'approches originales, basées sur la RMN 2D optimisée pour l'analyse quantitative rapide de mélanges métaboliques complexes. D'une part, nous avons soigneusement optimisé les expériences de RMN 2D existantes (COSY, spectroscopie J-résolue, INADEQUATE proton, etc.) afin de pouvoir les utiliser pour une analyse quantitative juste et précise en un temps minimal [1,2]. En particulier, nous avons récemment proposé une méthode reposant sur la RMN ^1H INADEQUATE [2] que nous avons appliquée à la quantification des métabolites dans des extraits cellulaires de cancer du sein, permettant ainsi de révéler des différences métaboliques entre différentes lignées [3]. D'autre part, nous explorons les approches de RMN 2D « ultrarapide », permettant d'obtenir un spectre de RMN 2D en une fraction de seconde [4]. Nous avons récemment montré l'intérêt de cette méthodologie pour l'analyse quantitative rapide et précise d'échantillons d'intérêt métabolique [5,6]. Les résultats obtenus en RMN 2D rapide et ultrarapide ouvrent de nouvelles perspectives pour la métabolomique quantitative par RMN.

Références bibliographiques

- [1] Giraudeau, P. *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, 43 : 1243-1248.
- [2] Martineau, E. *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54 : 252-257.
- [3] Martineau, E. *et al.*, NMR Biomed., 2012, *in press*.
- [4] Frydman, L. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99 : 15858-15862.
- [5] Giraudeau, P. *et al.*, Anal. Chem., 2011, 83 : 3112-3119.
- [6] Pathan, M. *et al.*, Analyst 2011, 136 : 3157-3163.

Mots-clés

RMN 2D, RMN ultrarapide, analyse quantitative, métabolomique quantitative

Apport de l'analyse en composantes indépendantes à l'annotation de jeux de données d'analyse métabolomique

Minale Ouethrani¹, Rémi Dubroca², Etienne Thévenot², Antoine Souloumiac², Christophe Junot¹

¹ CEA-DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

² CEA, LIST, Data Analysis Tools Laboratory, Gif-sur-Yvette, France

Les développements mathématiques et informatiques sont devenus une composante essentielle dans l'analyse des données métabolomiques. Différents logiciels de traitement des données sont actuellement utilisés. Certains d'entre eux sont des logiciels commerciaux, fournis ou non par les fabricants d'instruments, d'autres sont des logiciels libres. Parmi les logiciels libres, XCMS et CAMERA, développés en langage R, figurent parmi les outils les plus utilisés. XCMS permet la détection automatique des signaux ainsi que leur alignement dans le domaine des masses précises et des temps de rétention, et CAMERA intervient ensuite pour regrouper les signaux redondants afin de faciliter leur annotation et l'identification des métabolites. Cependant, l'étape de regroupement des signaux reste encore mal maîtrisée, ainsi l'objectif de cette présentation est d'évaluer l'intérêt de l'Analyse en Composantes Indépendantes (ACI), comme outil complémentaire d'annotation et d'identification de métabolites.

L'analyse en composantes indépendantes (ACI) et plus généralement la séparation aveugle de sources (SAS) analyse un signal complexe comme une superposition linéaire de sources élémentaires. Lorsque ces sources sont positives on parle de méthodes de factorisation en matrices non-négatives (FMN). Appliquées aux données de métabolomique LC-MS ou GC-MS, ces méthodes ont l'avantage de fournir séparément les contributions de chaque métabolite sous la forme de leur profil chromatographique et de leur spectre de masse. Les divers signaux dus à un même métabolite (isotopes, adduits, fragments, dimères, etc.) sont automatiquement regroupés au sein de la même source. Plusieurs études ont montré la pertinence de la SAS pour la spectrométrie de masse en GC-MS [1] et en protéomique [2]. Cependant à notre connaissance, aucune étude n'a utilisé la FMN pour l'annotation de jeux de données d'analyse métabolomique par LC-MS. Nous comparons dans cette communication les performances – pour l'annotation d'un jeu de données métabolomiques – d'un algorithme de FMN [3] avec les outils traditionnellement utilisés au laboratoire (XCMS ET CAMERA).

Références bibliographiques

- [1] Wang et al. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (2006) 82 : 137-144
- [2] Mantini et al. *Bioinformatics* (2008) 24 : 63 – 70
- [3] Dubroca R., Junot C., Souloumiac A (2011), 5èmes journées du RFMF.

Mots-clés : Analyse en composantes indépendantes, métabolomique

NMR based metabolomics study of a cerebral ischemia model: a practical look into the metabolic profiling pipeline of small tissue amounts

Mari Silvia^{1,5}, Cambiaghi Marco², Peruzzotti-Jametti Luca³, David Chang⁴, Gaude Edoardo¹, Leocani Letizia², Martino Gianvito³, Musco Giovanna¹

¹Dulbecco Telethon Institute c/o S. Raffaele Scientific Institute, Milan (Italy);

²Experimental Neurophysiology, San Raffaele Scientific Institute, Milan (Italy)

; ³Neuroimmunology, San Raffaele Scientific Institute, Milan (Italy);

⁴Chenomx Inc, Edmonton, Alberta (Canada)

; ⁵R4R, Rodano (Italy) www.research4rent.com; mari.silvia@hsr.it

Focal cerebral ischemia is caused by the occlusion of a cerebral vessel resulting in a significant reduction of cerebral blood flow into a discrete region of the brain. The lack of energetic substrates (mainly oxygen and glucose) induces a shift to anaerobic metabolism with a consequent decrease in the mitochondrial respiratory activity. The striking imbalance between energy use and production, irremediably leads to complex biological maladaptive responses (including release of excitatory neurotransmitters and activation of apoptotic pathways) that perpetuate the extensive ischemic damage. As it has been already pointed out, further experimental research is still needed to analyze this complex response to ischemia, and to identify early biochemical markers of injury as well as potential targets for future therapies (1). With the aim to investigate the metabolic signature of cerebral ischemia we have performed a metabolomics study in a mouse-model of proximal middle cerebral artery occlusion (pMCAO). We have collected tissues from cerebral cortex and striatum on both *ipsilateral* and *contralateral* hemispheres of five animals. Despite the limited amount of tissue collected (weights 10-20mg) we were able to extract metabolites according to Viant protocol (2) and acquire NMR spectra of the polar phase extracts by mean on a Bruker 600MHz equipped with cryo-probe. About 30 different metabolites were recognized and quantified using Chenomx NMR Suite software. Finally metabolite concentration matrix was the input for an in-house developed R-package, the so-called MUMA (Multivariate Univariate Metabolomic Analysis). MUMA package will be freely available and downloadable with its easy-to-way correlated tutorial. Briefly, once the matrix has been read MUMA performs sample normalization on the sum of all variables of each sample (total spectrum normalization) and different possible scalings (auto-, pareto-, vast- or range-scaling). Once data are scaled MUMA can perform both univariate (Shapiro Wilk's test for normality, Welch_'s T-test or Mann Whitney-Wilcoxon test between all possible class combinations and finally outputs Volcano plots) or multivariate analysis (such as PCA, PLSDA or O-PLSDA). MUMA also includes further correlation analysis such as STOCYSY and RANSY. Here we present an integrated application based on the R-package MUMA and Chenomx software for the analysis, and classification of different brain regions in a pMCAO mouse model.

Références bibliographiques

(1) Schaller B., Graf R., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2004, 24:351–371

(2) Wu H. et al., Anal. Biochem., 2008, 372:204-212

Mots-clés : NMR, tissue extract, R-package

Stratégies statistiques pour la mise en relation de données protéomiques et métabolomiques: étude de cas en nutrition humaine.

Thomas Moyon¹, **Fabien Le Marec**¹, **El Mostafa Qannari**², **Evelyne Vigneau**², **Aurélie Le Plain**², **Frédérique Courant**², **Jean-Philippe Antignac**², **Patricia Parnet**¹, **Marie-Cécile Alexandre-Gouabau**¹

¹ *INRA et Université de Nantes, UMR1280 PHAN, CHU Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau, HNBI, 44093 Nantes Cedex 1, France.*

² *ONIRIS, Unité de Sensométrie et Chimiométrie, site de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes cedex 3, France.*

Les études présentées ont été conduites dans le cadre d'une étude de cas en nutrition dont l'objectif était d'évaluer l'impact postnatal de la restriction protéique maternelle durant la gestation et la lactation sur le métabolome plasmatique et le protéome hypothalamique de rats. Les données générées par les approches « omiques » sont souvent considérées et analysées séparément, alors que leur croisement peut offrir une opportunité très intéressante pour étudier le concept émergent d'« approches intégratives ». La stratégie globale d'analyse a premièrement explorée le prétraitement des données et la sélection des variables pour chaque jeu de données. Ensuite, deux analyses multivariées ont été appliquées afin d'étudier les liens entre l'abondance de métabolites et l'expression de protéines collectées sur les mêmes échantillons. L'Unfold Principal Component Analysis ne tenait pas compte de la présence de groupes d'animaux. Au contraire, la méthode MultiBlock Partial Least Squares utilisait cette information. L'Unfold Principal Component Analysis s'est avérée être une approche pertinente pour l'étude des liens entre les deux jeux de données. Cependant, afin de mettre en avant les composés moléculaires associés dans des voies métaboliques communes ou inter-agissantes, la MultiBlock Partial Least Squares s'est révélée être la méthode la plus appropriée, pour cette étude de cas en nutrition.

Mots-clés : Empreinte Nutritionnelle - Métabolomique - Protéomique - Unfold Principal Component Analysis - MultiBlock Partial Least Squares

Développements méthodologiques pour la caractérisation des mélanges de substances naturelles : Application à un extrait végétal valorisé en dermocosmétique.

Jane Hubert^a, Jean-Marc Nuzillard^a, Mahmoud Hamzaoui^a, Romain Reynaud^b and Jean-Hugues Renault^a

^aUMR CNRS 7312, Université de Reims Champagne-Ardenne, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims2, France

^bSoliance, Route de Bazancourt - 51110 Pomacle, France

Malgré la modernisation des techniques d'extraction, de criblage et d'évaluation biologique des molécules naturelles, la caractérisation et la standardisation des mélanges nécessite aujourd'hui le développement de nouvelles stratégies permettant d'appréhender les extraits végétaux ou microbiens non plus sous la forme de composés individuels à purifier mais plutôt comme des mélanges complexes au sein desquels une association particulière de molécules serait à l'origine d'une activité recherchée¹.

Le présent travail illustre une nouvelle combinaison de protocoles d'extraction et d'analyse permettant de caractériser les différentes molécules d'un mélange naturel sans les isoler individuellement. Le modèle choisi est un extrait brut obtenu de l'écorce d'un arbre sub-saharien valorisé en Europe pour des applications dermocosmétiques. Un procédé original d'Extraction de Partage Centrifuge (EPC)² basé sur l'utilisation d'un système tri-phasique de solvants a tout d'abord été optimisé pour fournir des mélanges sélectifs et simplifiés de molécules en fonction de leur polarité. L'analyse globale des différentes fractions par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du carbone ¹³C suivie d'une classification ascendante hiérarchique des données spectrales a permis de détecter l'ensemble des résonances de chaque fraction et de discriminer la présence de squelettes carbonés appartenant à des familles chimiques particulières. En d'autres termes, le développement d'outils statistiques reposant sur l'analyse spectroscopique des différentes fractions a permis de dégager des indicateurs objectifs des différentes structures présentes dans l'extrait initial sans mettre en œuvre de longues procédures de purification combinées sur les composés individuels.

Références bibliographiques

Wagner H. *Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Fitoterapia* **2011**, 82, 34-37.

Hamzaoui M., Hubert J., Hadj-Salem J., Richard B., Harakat D., Marchal L., Foucault A., Lavaud C., Renault J.H. *Intensified extraction of ionized natural products by ion-pair centrifugal partition extraction. J Chromatogr A* **2011**, 1218, 5254-5262.

Mots-clés : Substances naturelles, extraction de partage centrifuge, RMN 13C, métabolomique

Utilisation d'une procédure d'analyse standardisée en vue de la comparaison de spectres MS/MS sur différentes plateformes instrumentales

Farid Ichou¹ ; Denis Lesage¹ ; Xavier Machuron-Mandard² ; Christophe Junot³, Jean-Claude Tabet¹

1 UPMC, IPCM/CSOB, 4 place Jussieu F-75005 Paris

2CEA, DAM/DIF, F-91297 Arpajon

3CEA, DSV/iBiTec-SPI/LEMM, F-91191 Gif-sur-Yvette

La reproductibilité et la comparabilité des instruments sont des enjeux majeurs dans la création de banques de données spectrales. Les spectres CID («Collision induced dissociation», de l'anglais «dissociation induite par collision») de basse énergie pour les tandems spatiaux et temporels sont difficilement comparables en raison d'une part de différences d'apports en énergie interne sur les ions selon la géométrie de l'instrument, la pression de la cellule de collision, la nature du gaz tampon, etc..., et, d'autre part, du fait de déplacements cinétiques différents. Le déplacement cinétique correspondant à l'énergie interne supplémentaire nécessaire pour casser l'ion dans la fenêtre d'observation temporelle définie par la géométrie de l'appareil.

Une étude préliminaire réalisée dans le cadre du Réseau Français de Métabolomique et de Fluxomique a démontré l'importance d'utiliser des conditions rigoureuses afin de niveler les différences entre les plateformes instrumentales, et ainsi favoriser une meilleure comparabilité entre les laboratoires. A l'issue de ce test, une méthode de calibration a été proposée afin de limiter la dépendance des spectres CID selon les plateformes instrumentales utilisées. La procédure de standardisation se veut peu contraignante en vue d'une application en routine d'où la nécessité de réduire le nombre de paramètres à moduler pour arriver à des conditions reproductibles. Elle repose sur la calibration de l'énergie CID en mode positif et négatif. Deux calibrants sont utilisés pour le mode positif et négatif : un mélange de PolyÉthylèneGlycols 200 et 300 (PEG200/300 : 70/30 v/v) et un diacide. L'emploi additionnel d'une molécule thermomètre, telle que la leucine-enképhaline, se révèle intéressante pour permettre l'analyse qualitative de l'énergie déposée selon la géométrie de l'appareil et ainsi rectifier, ou tout du moins limiter, son impact sur l'allure du spectre de masse.

A partir de spectres de références fournis par l'analyse du mélange de PEG200/300 par différentes plateformes instrumentales [TSQ Quantum (Thermo-Fisher®); LTQ-Orbitrap XL (Thermo-Fisher®); micrOTOF-Q II (Bruker)] en ESI, les autres appareils sont calibrés en essayant d'avoir les spectres du PEG200/300 les plus similaires possibles à ceux établis à l'aide des différents instruments cités précédemment. Cette procédure a ensuite été appliquée sur l'étude de 20 composées de références présentant des structures physico-chimiques variées représentative de la diversité chimique rencontrée en analyse métabolomique. Le panel de molécules a été choisi pour leurs propriétés et leurs comportements caractéristiques selon le spectromètre de masse utilisé (cas des ions avec peu de fragmentations, des ions avec plus de 3 fragments, des ions isobares et des isomères). La comparaison des spectres CID a été faite à l'aide d'un logiciel commercial (SmileMS®).

Les résultats obtenus démontrent la pertinence de notre approche pour les molécules présentant des spectres de CID comportant au moins 2 ions fragments. Cependant, selon les propriétés de la molécule, comme par exemple pour les molécules ayant peu de fragments et les molécules isomères, certaines limites subsistent. Pour d'autres composés, des différences subsistent

du fait des compétitions et du contrôle thermocinétiques des fragmentations. Cette compétition est étroitement liée à la géométrie de l'appareil. L'utilisation de trois énergies de collisions en MS/MS permet de compenser ce phénomène rendant davantage comparable les spectres MS/MS entre les différents instruments.

En conclusion, les résultats montrent une atténuation des différences d'intensités des pics caractéristiques de chaque composé de référence initialement observés dans les spectres CID obtenus avec différents types de spectromètres de masse en l'absence de procédure de standardisation. Les scores élevés d'identifications obtenus par notre approche sont encourageants pour la création d'un réseau d'échange de données spectrales.

Remerciements: ces travaux soutenus par le GIS IBiSA. Ils ont été réalisés dans le cadre d'un groupe de travail du Réseau Français de Métabolomique et de Fluxomique.

Références bibliographiques

X-Rank: A Robust Algorithm for Small Molecule Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Roman Mylonas, Yann Mauron, Alexandre Masselot, Pierre-Alain Binz, Nicolas Budin, Marc Fathi, Véronique Viette, Denis F Hochstrasser, and Frederique Lisacek, *Analytical Chemistry* 2009 81 (18), 7604-7610

Peut-on faire confiance à la métabolomique: résultats de l'initiative MetaboRing

Alexandre Verdu, Bernard Lyan, Carole Migne, Catherine Defoort, Cécile Canlet, Christophe Junot, Claude Guillou, Claudine Manach, Christophe Cordella, Daniel Jabob, Delphine Bouveresse, Douglas Rutledge, Estelle Paris, Estelle Pujos, Fabien Jourdan, Franck Giacomoni, Frédérique Courant, Gaëlle Favé, Gwenaëlle Le Gall, Hubert Chassigne, Jean-Charles Martin, Jean-Claude Tabet, Jean-Francois Martin, Jean-Philippe Antignac, Laetitia Shintu, Marianne Defernez, Marie-Cécile Alexandre-Gouaubau, Marie-Jo Amiot-Carlin, Mathilde Bossis, Matthieu Maillot, Mohamed Nawfal Triba, Natali Stojilkovic, Nathalie Banzet, Roland Molinié, Romain Bott, Sophie Goulitquer, Stefano Caldarelli, Thomas Moyon.

L'initiative « Metabo-Ring », soutenue par l'INRA et le RFMF, rassemble 11 plateformes comprenant un parc de 5 RMN (Bruker 500 et 600MHz, Varian 500MHz) et 8 spectromètres de masse (4 QTOF et 4 orbitrap). Cette initiative vise à estimer la part commune de l'information biologique extraite à partir d'échantillons identiques analysés par des instruments de technologies plus ou moins proches, utilisés en routine, et en l'absence de toute normalisation. Ce test comprend deux volets. Le premier volet examine la reproductibilité inter-instrument issue de l'analyse d'échantillons obtenus dans des conditions à faible contraste biologique. Les échantillons proviennent d'un protocole nutritionnel conduit chez des rats (10 échantillons par groupe) ayant reçu ou non un supplément en vitamine D (20kUI/kg) pendant 6 semaines. Le second volet examine des échantillons d'urine humaine (14 échantillons par groupe) à fort contraste biologique obtenu par l'addition ou non d'un mélange de 33 métabolites standard (0.1mg/mL pour la masse, 1mg/mL pour la RMN). Il était demandé à chaque participant d'utiliser ses propres procédures de traitement machine, seule la préparation des échantillons étant normalisée, tant pour la masse que pour la RMN.

En raison du découpage spectrale (RMN) ou des conditions chromatographique comme des conditions d'ionisation et d'alignement des pics (LC-MS) versatiles d'un instrument à l'autre, les signaux spectroscopiques générés par chaque plate-forme ne pouvait être comparés pair à pair. Afin de déterminer la part commune de l'information biologique extraite par chaque plate-forme et afin de s'affranchir des aspects technologiques liés aux instruments, nous avons donc calculé la proximité statistique de l'information extraite par chaque instrument, indépendamment du mode d'analyse. Pour cela, les données générées ont été découpées en autant de blocs que de plate-formes. Deux types d'analyses statistiques complémentaires ont ensuite été appliquées à ces blocs: l'analyse Statis, examinant le « lien » entre les blocs grâce aux coefficients RV (approximativement similaire à un coefficient de corrélation (r^2) entre 2 variables); l'analyse « Common Dimension », recherchant plusieurs composante(s) commune(s) à l'ensemble des blocs. Les contributions des blocs aux composantes communes ont ensuite été estimées. Cette technique permet de mettre en évidence les blocs ayant des structures de données communes (et donc une information commune).

S'agissant des résultats consacrés au premier volet (faible contraste biologique), seuls des traitements statistiques forcés à base d'orthogonal PLS permettaient aux participants de discriminer les rats traités des rats non traités par la vitamine D. En fonction des instruments et de la nature des traitements informatiques des signaux, une forte hétérogénéité du nombre de signaux retenus pour l'analyse était constatée, de $n = 170$ (orbitrap 1) à $n = 9550$ (RMN2), avec en moyenne $n = 1855$ pour les spectromètres de masse et $n = 3483$ pour la RMN. En analyse Statis, les plateformes de masses et de RMN étaient indistinguables sur le premier axe factoriel (61% de la variance), sauf RMN3 et orbi3 qui apparaissaient comme atypique. Le second axe factoriel (12 % de la variance) permettait de distinguer les RMN des spectromètres de masses. Les coefficients RV représentant la proximité statistique (\approx coefficients de corrélation r^2) fluctuaient de 0.57 à 0.87 entre les spectromètres de masse, et de 0.78 à 0.91 entre les RMN; seuls orbitrap3 et RMN3 avaient des coefficients inférieurs avec les autres instruments (0.33 et 0.4 en moyenne, respectivement). Les coefficients RV entre RMN et MS étaient inférieurs, fluctuant de 0.37 à 0.73. L'analyse ComDim confirmait l'homogénéité de l'information extraite en MS ou en RMN, sauf pour les PF orbitrap 3 et RMN3.

Les résultats consacrés au second volet (fort contraste biologique) sont en cours de traitement et seront présentés lors des 6èmes journées RFMF.

En conclusion, le premier volet a examiné la proximité statistique intra (RMN d'une part et MS d'autre part) et inter-instruments (RMN x MS) dans une situation à faible contraste biologique où la variabilité interindividuelle apparaît comme relativement importante. Bien que le nombre de variables (i.e. signaux) soit très différent entre les plateformes, ces deux analyses montrent une assez bonne homogénéité entre les 11 plateformes dans l'information extraite. On note toutefois que l'homogénéité intra-instrument (RMN ou MS) est plus élevée que l'homogénéité inter-instrument (RMN x MS). A cet égard, s'agissant des instruments de MS, le type d'architecture technologique ne parait pas influencer les résultats (orbitrap indistinguables des QTOF). Les plateformes RMN ont un degré d'homogénéité légèrement supérieur à celui des plateformes LC-MS. Sur la base de ses résultats obtenus dans des conditions d'analyse absolument non standardisées, on peut espérer améliorer facilement la comparabilité interplateforme en faisant converger les procédures du flux d'analyse, surtout s'agissant des instruments MS. Pour cela, il est nécessaire que chaque étape de ce flux soit scrupuleusement testé et validé dans le cadre d'un protocole dédié.

Mots-clés : test circulaire, métabolomique, RMN, spectrométrie de masse

09

Hybrides Orbitrap et analyse différentielle : approches instrumentales et solutions logicielles

Eric Genin

*Thermo Fisher Scientific, 16 avenue du Québec - Silic 765 Villebon-sur-Yvette
FR - 91963 Courtaboeuf Cedex, France*

**Infusion MS/MSALL Workflow for complete lipids characterization on the
AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System.**

Pierrick Daniel

AB SCIEX, Nantes, France

Qualitative mass spectrometry experiments are most commonly performed by information dependent acquisition strategies, where a survey scan is collected, and precursors are selected for MS/MS analysis based on a set of user defined criteria. This is widely applied for LC-MS/MS analyses in qualitative screening, semi-quantitative profiling, and compound identification experiments. However, for some experiments such as the analysis of complex lipid samples, information independent strategies can offer some key advantages. A simple information independent technique involves stepping a mass isolation window across a set mass range in small increments, fragmenting selected precursor ions in a collision cell, and recording all product ions. As previously attempted with ion trapping MS platforms in past years^{1,2}, MS/MS of all precursors ions is highly desirable as an un-biased profiling technique as nothing is missed and all product ion data can be mined retrospectively.

Profiling and Quantitation of Metabolomic “Signatures” for Breast Cancer Cell Progression

Lucy Fernandes

Waters Corporation, Atlas Park, Manchester M22 5PP, UK
lucy_fernandes@waters.com

Metabolic reprogramming is required both during the initial breast cancer transformation process (primary tumor) and during the acquisition of metastatic potential (metastases). The initial process includes altered glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP), and fatty acid synthesis, as well as decreased GSH/GSSG redox pool. While the second step is correlated with the gain of the general metastatic ability and includes further changes in glycolysis and tricarboxylic acid cycle (TCA cycle), further depletion of the glutathione species, and increased nucleotides. Staging of the metabolic reprogramming using metabolomics, could pinpoint metabolic processes essential for transformation and invasiveness and has the potential to yield biomarkers and new directions for therapeutics. We present here a study of combining targeted and untargeted approach for cancer biomarkers analysis.

Mise au point d'une approche globale par LC-MS à très haute résolution pour la détection des molécules lipidiques dans les biofluides et les tissus.

Benoit Colsch, Samia Boudah, Christophe Junot.

CEA, DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM, F-91191 Gif-sur-Yvette

Les lipides sont des constituants essentiels des membranes cellulaires de tous les organismes vivants. Ils représentent une large famille de biomolécules dotées d'une très grande diversité structurale du fait de leur caractère hydrophobe (lipides neutres) ou amphiphile (lipides polaires). Chez les mammifères, les classes majoritaires de lipides sont représentées par les acides gras libres, les stérols et dérivés, les glycérolipides, les glycérophospholipides et les sphingolipides. Si certaines familles de lipides jouent le rôle de réserves intracellulaires d'énergie (Glycérolipides), d'autres familles sont des composants essentiels des membranes cellulaires (Sphingolipides, stérols, glycérophospholipides) ou participent à la signalisation cellulaire (Céramides, lysolipides). Leur implication dans certaines maladies neurologiques dites « neuropilidoses » ont nécessité le développement de méthodes analytiques spécifiques permettant leur caractérisation mais aussi leur quantification dans les matrices biologiques telles que les biofluides (plasma, LCR) ou les tissus.

Durant ces vingt dernières années, l'analyse des lipides dans les matrices biologiques a donné lieu à de nombreux développements, notamment avec l'évolution d'outils analytiques tels que la spectrométrie de masse ou la RMN. Différentes approches par spectrométrie de masse, utilisant des sources à pression atmosphérique sont utilisées pour la détection des lipides. Parmi elles, l'électronebulisation (ESI), pouvant être facilement utilisée en infusion directe ou couplée à la chromatographie liquide, représente une technique de choix pour l'analyse des lipides. Du fait de leur grande hétérogénéité structurale, les lipides sont principalement analysés par des approches dites « ciblées », par familles de molécules, qui nécessitent des extractions spécifiques, ou le développement de méthodes de dérivation permettant leur détection. Depuis peu, les approches dites « globales », permettant la détection d'un maximum de familles de composés lipidiques dans les matrices biologiques se sont développées avec l'apparition d'analyseurs à très haute résolution de type FT-ICR ou Orbitrap couplés à la chromatographie liquide (LC-MS). A partir d'extraits lipidiques totaux de cerveau de rat et de plasma humain, nous développons, au laboratoire, une base de données de « lipides » en fonction de la masse précise, du temps de rétention et de la fragmentation des molécules par LC-MS/MS permettant la caractérisation d'un maximum de familles de lipides. Pour ce faire, nous comparons l'intérêt d'une pré-séparation des lipides par famille en phase normal avant LC-MS en phase inverse par rapport à l'analyse directe en phase inverse d'un extrait lipidique total. Ces approches ont permis de détecter et de caractériser de nombreuses familles de lipide tel que les glycérophospholipides (LPC, PC, LPE, PE, PS, PI, PG), les sphingolipides (SM, Galcer, Su, Cer, Gangliosides) et les lipides neutres (MG, DG, TG) en utilisant les modes d'ionisation positif et négatif.

Dans le cadre de cette communication, nous présenterons la démarche utilisée pour la construction de la base de données et son application à l'étude de la composition lipidique de différents milieux biologiques (extraits de cerveau de rat, plasma et liquide céphalorachidien humains).

Mots-clés : Lipidomique, LC-MS, haute résolution, biofluides, tissus

La lipidomique dans la compréhension du film hydrolipidique cutané

Rime Michael-Jubeli^{1a}, Ali Tfayli^{1a}, Jean Bleton^{1b}, Dominique Bertrand², Arlette Baillet-Guffroy^{1a}

¹EA 4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud 11,

^aFaculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry,

^bLETIAM-IUT d'Orsay, Université de Paris-Sud. r.michael-jubeli@hotmail.fr

²Equipe Bioinformatique, Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes.

Le film hydrolipidique est l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement. Il offre à la peau une protection efficace et contribue à ses propriétés de barrière. Les lipides cutanés de surface (LCS) qui le constituent, résultent de l'activité des glandes sébacées et de la desquamation de l'épiderme. Leur composition est étroitement liée à l'activité enzymatique à la surface cutanée et peut être modifiée quand le film hydrolipidique est impliqué dans certaines perturbations cutanées.

Le but de notre travail était, tout d'abord, d'obtenir un profil global de l'ensemble des LCS, riche en informations structurales, et d'autre part, de proposer différentes approches permettant de suivre l'évolution physiologique et pathologique du film hydrolipidique au niveau moléculaire.

La caractérisation des LCS a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS). Le protocole analytique a été développé en conservant les structures lipidiques dans leur état initial. Plus de 200 composés ont été identifiés et répartis en 5 classes (1).

Plusieurs approches analytiques ont été développées afin d'extraire de ces profils complexes, d'éventuels marqueurs biologiques liés à des situations physiologiques variées.

Après une normalisation interne permettant l'analyse quantitative par classe, nous avons pu établir des descripteurs chromatographiques. Par exemple, la répartition des LCS sur différentes zones corporelles se traduit par un ratio squalène/cholestérol plus élevé dans les zones riches en glandes sébacées que dans les zones pauvres (1). Ce descripteur est un bon critère d'évaluation de la balance sécrétion sébacée/desquamation, et par conséquent du diagnostic de maladies cutanées dues au dysfonctionnement de ces activités.

L'exploitation chimométrique globale des composés considérés individuellement (approche lipidomique) nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

Dans l'étude portant sur l'évolution des LCS en fonction de la localisation géographique et/ou la couleur de la peau, l'analyse multivariée de la globalité des données analytiques a exalté une différence de composition liée à localisation géographique. Le facteur majeur à l'origine de cette différence est un composé spécifique de l'activité sébacée chez l'homme : l'acide sapiénique (C16:1Δ6) (2). Il peut être utilisé comme marqueur de l'adaptation de l'activité sébacée à des conditions de vie différentes (climatiques, culturelles, hygiéniques, alimentaires...).

Dans l'étude portant sur l'évolution des LCS du nouveau-né dans les premiers mois de sa vie, après une étape de réduction des données analytiques sans perte d'information, l'analyse univariée a montré une augmentation sélective de cholestérol estérifié par des acides gras d'origine épidermique. Cela indique un accroissement de la participation relative des lipides épidermiques dans le film hydrolipidique comme résultat d'une diminution de la sécrétion sébacée. De plus, la représentation cartographique de l'ensemble des données permet une lecture rapide de l'évolution des LCS révélant, notamment, une diminution de la quantité globale de sécrétion sébacée. Cette cartographie pourrait constituer une aide aux thérapeutes pour le diagnostic précoce d'une perturbation du mécanisme d'auto-équilibre de la peau avec l'âge.

Les approches analytiques développées dans ce travail permettent une caractérisation moléculaire fine des LCS. Les outils statistiques et chimométriques ont permis une exploitation plus poussée des résultats pour extraire des informations inaccessibles par les approches classiques.

Références bibliographiques

1. Michael-Jubeli R. et al. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling. *Journal of Lipid Research*. JLR. 2011. **52**: 143-151.
2. Michael-Jubeli R. et al. Chemometric approach for investigating the skin surface lipids (SSLs) composition: influence of geographical localization. *European Journal of Dermatology*. EJD. 2011. **21**: 63-71.

Mots-clés : Lipidomique, film hydrolipidique cutané, HT-GC/MS, caractérisation structurale, traitement chimométrique, évolution physiologique et pathologique.

Le Céramide et la sphingomyélinase acide secrétés, marqueurs de la réponse à la radiothérapie

Marie-Hélène Gaugler^{1,2}, Nolwenn Dubois^{2,3}, Natacha Ripoché², Emeline Lemarié²,
Véronique Ferchaud Roucher⁴, François Paris^{2,3}

1 IRSN, DRPH, Fontenay aux Roses, F92260 France

2 Inserm UMR892, Nantes F-44000, France

3 ICO-Nantes, St Herblain F-44800, France

4 Plate forme Spectrométrie de Masse, CRNH, SFR UMS016, Nantes F-44000, France

La radiothérapie reste un traitement de choix pour éradiquer les tumeurs, mais peut malheureusement induire des pathologies aiguës (nécrose) ou tardive (fibrose). Les sphingolipides sont des acteurs importants de la réponse à la radiothérapie. Ainsi, le taux intracellulaire des facteurs pro-apoptotiques céramide, et pro-survie, sphingosine 1 phosphate (S1P) constitue un rhéostat dans les cellules endothéliales agissant directement sur leur létalité et dans la réponse tissulaire et tumorale radioinduite (Corre *et al.* 2011). Ces sphingolipides peuvent être secrétés modulant de nombreuses fonctions biologiques comme l'inflammation pour le céramide ou l'angiogénèse pour la S1P. Par contre, le rôle de ces formes secrétées dans la réponse à la radiothérapie reste mal évalué. Ainsi, nous avons apprécié si le céramide et son enzyme la sphingomyélinase acide (ASM) sont des facteurs paracrines augmentant la radiotoxicité dans l'intestin grêle. Tout d'abord, nous avons montré que l'irradiation induit une sécrétion d'ASM et de céramide par les cellules endothéliales, favorisant le dysfonctionnement de cellules épithéliales intestinales de T84. De plus, une augmentation statistiquement significative persistante d'ASM et de céramides secrétés dans le plasma de souris irradiées est corrélée avec la gravité histopathologique de l'entéropathie. Ces études prometteuses doivent être étendues aux autres sphingolipides.

O15 - Conférencier Invité

Determining drug action with Metabolomics – The Scottish Metabolomics Facility

Michael Barrett

University of Glasgow

The Glasgow Polyomics Facility (GPF) specialises in data acquisition and analysis of Next generation sequencing, proteomics and metabolomics. The Scottish Metabolomics Facility part of the GPF uses a range of mass spectrometry and NMR approaches to study the metabolomes of many systems. Exact mass, mass spectrometry using an Orbitrap has been the central platform used in analyses and we have also developed a robust data analysis platform to optimise analysis of data using this platform. As an example project I will present data obtained from the parasitic protozoan, *Trypanosoma brucei*, showing how its metabolome changes during its various life cycle stages and also how the modes of action of drugs can be ascertained using an untargeted mass spectrometry approach. Eflornithine, an inhibitor of the polyamine pathway enzyme ornithine decarboxylase, for example, was shown to cause an increase in the enzyme's substrate, ornithine and a concomitant reduction in its product putrescine. The previously unknown N-acetyl derivatives of both metabolites were also found in trypanosomes. The same approach has also been used to show how a loss of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase caused an increase in abundance of 6-phosphogluconate, whereas a series of inhibitors previously believed to hit this target apparently act through other mechanisms as ascertained by a lack of a specific increase in this substrate. A novel class of nitro-containing compound that shows pronounced activity against trypanosomes was shown to cause a rapid depletion of the cellular thiol content. The same methodology can be rapidly adapted to study drug modes of action in other systems.

The effects of hyperglycaemia, inflammatory cytokines and dietary polyphenols on the human vascular endothelial cell metabolome assessed using non-targeted ^1H NMR profiling

Besim Ozyel, Mark Philo, Ian Colquhoun, Gwénaëlle Le Gall and Paul A Kroon

Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, UK

Diabetes mellitus is a major risk factor for cardiovascular disease. The hyperglycaemic conditions experienced during diabetes mellitus induce vascular inflammation and endothelial cell apoptosis and this is thought to disrupt the integrity and functions of the endothelium and lead to vascular dysfunction. Vascular dysfunction is associated with atherosclerosis and is an independent risk factor for CVD. There are numerous reports demonstrating that polyphenols have anti-inflammatory activities, but the mechanisms by which polyphenols protect against high glucose- or inflammatory cytokine-induced endothelial damage is not well understood. Because perturbations in metabolism are intricately associated with inflammation, we explored the use of metabolomics to investigate the effects of hyperglycaemic and pro-inflammatory conditions, and polyphenol treatments, on human vascular endothelial cells, with a view to understanding the effects at a mechanistic level on the entire system

There are very few reports describing metabolite profiling of adherent cells, and metabolite profiling of HUVECs by ^1H NMR is a novel approach. An initial method for extracting metabolites from cultured cells was established based on a review of the available literature. The method was then optimised to achieve maximum recovery of ^1H NMR metabolite signals and minimize media carry-over. The optimised method facilitates rapid and effective freezing of cellular metabolism and extraction of metabolites. The extracted metabolites were analysed using ^1H NMR which produced non-biased and reproducible results when the effects of several known metabolic effectors on HUVECs were tested. The optimised method has been used to explore the effects of high glucose, pro-inflammatory cytokines and polyphenols on the HUVEC metabolome. As a result, significant changes in the HUVEC metabolome in response to treatment with high glucose concentrations or $\text{TNF}\alpha$ have been demonstrated. Further, it was shown that selected dietary polyphenols can shift the metabolome of high glucose or $\text{TNF}\alpha$ -stressed cells back towards that of the resting (not stressed) cells, which is in keeping with an anti-inflammatory action. These findings provide novel insights into the effects of hyperglycaemia, inflammatory cytokines and polyphenol treatments on primary metabolic pathways in HUVECs, and provide evidence of novel mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of polyphenols.

Mots-clés: ^1H -NMR, HUVEC, inflammation, polyphenols, hyperglycaemia

Evaluation of Dose- and time-dependent effects of drugs on metabolic profiling in Human HepaRG cells – Analysis of time series-data

Hubert Chassaigne, Donatella Carpi, Mathilde Bossis, Claude Guillou

European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Systems Toxicology unit, Via Enrico Fermi 2749, I-21027 Ispra, Italy (E-mail: Hubert.chassaigne@ec.europa.eu)

Understanding the toxicity of drugs is essential for progress in the pharmaceutical industry, medicine and scientific research. Owing to ethical concerns, there is a need to develop alternatives to conventional toxicity testing incorporating animals. Among these alternatives, in vitro systems are considered promising. The cell line HepaRG is used as an alternative to human hepatocytes (HepG2) in investigating drug metabolism and hepatotoxicity.

This work is focused on chemical-induced changes in metabolic profiles, particularly on the effects of two distinct chemical substances used in disease treatments. HepaRG cells treated with two doses (a high dose corresponding to the in vitro cytotoxicity value IC10 and a low dose at 10% of the IC10 value) for a period of 14 days are confronted to a control (untreated cells). At 3 different time points cells are collected and intracellular metabolites are extracted. Cell culture medium is sampled at 6 time points to monitor a possible release of metabolites from the cells.

Both cell extract containing intracellular metabolites and culture medium (for possible cell release) are subjected to LC-MS analysis. The multi-metabolite analytical technique used in this work is the Ultimate 3000 liquid chromatography system (Dionex, CA, USA) coupled on-line with a Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, MA, USA). An objective of the study is to find chemically relevant information out of large raw datasets.

The purpose of data processing is to convert raw spectra into a data matrix suitable for statistical analyses. The spectra processing is performed using R/XCMS package [1] that was implemented in-house. This is followed by the data normalisation step using Pareto scaling. The peak intensity table is organised in row and columns, where columns correspond to samples and rows to a sample feature (peak area). As a first filter, peak intensity tables are annotated for isotopes and potential adducts using the Camera package.

Specially designed methods are needed in order to analyse data from complex study designs such as time-series data. In our work, the data contains 3 samples (control, low and high doses) measured at 3 and 6 time points for the medium and cell extract, respectively. Data analysis is performed using MetaboAnalyst [2]. MetaboAnalyst is a web-based program that includes a tool especially designed for time-series repeated measurements and two-factor metabolomics data analysis.

Filtering using the Two-Way ANOVA tool offers the possibility to generate three distinct peak lists. Metabolites that have a p-value less than a specified cutoff (0.05) (treatment and time) are found to be significant among groups defined by the first or second parameter. Metabolites with a p-value less than the specified cutoff for the "interaction" may show a link between the two parameters tested (treatment and time).

All three peak lists are also compared using a Venn diagram, to observe overlap between lists. It allows to generate peak lists that intersect between different categories, such as peaks that support comparisons of times series across different experimental conditions (control, low and high doses).

Peak annotation remains a challenge in large metabolomic experiments. Even using restricted peak lists after filtering with Camera and then using advanced statistical tools, the number of unknown compounds matching a mass value is so large that a correct identification is not always possible. In this work, the peak lists are tentatively annotated using the human HMDB library [3] as specific database for in vitro model systems such as HepaRG are not yet available.

Références bibliographiques:

[1] Smith C.A. et al., XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification, *Anal. Chem.*, 2006, 78:779–787. Web access: <http://metlin.scripps.edu/xcms/index.php>

[2] Wishart D.S. et al., HMDB: a knowledgebase for the human metabolome, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37: D603–610. Web access: <http://www.hmdb.ca>

[3] Xia J, Wishart D.S., Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst., *Nature Protocols*, 2011, 6:743–760. Web access: <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp>

Mots clés: LC-MS, Metabolic profiling, HepaRG cells, hepatotoxicity, dose-and time-dependent effects

Impact de la composition du lait maternel sur les dérégulations du métabolisme de la descendance dans un modèle de programmation nutritionnelle.

Martin-Agnoux A¹, Antignac J-P², Parnet P¹, Alexandre-Gouabau MC¹

¹ INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes, France ;

² Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments, ONIRIS, USC INRA 2013, Nantes, France.

Selon le concept de « programmation nutritionnelle », le fœtus soumis à une malnutrition serait « reprogrammé » en cas d'exposition postnatale à des apports alimentaires excessifs, déficients ou normaux vers un phénotype responsable d'un risque accru de développer des maladies métaboliques. Notre hypothèse est que le déséquilibre protéique fœtal et postnatal des nouveau-nés pourrait être à l'origine d'anomalies dans la régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques qui se traduiraient, chez l'adulte, par des désordres métaboliques tels que le syndrome métabolique et le diabète.

Nous avons choisi d'explorer ce concept « d'empreinte nutritionnelle » par une analyse métabolomique plasmatique par CL-HR-SM sur un modèle de rats nés de mères ayant un apport protéique équilibré (20%) pendant la gestation puis allaités par des mères restreintes (CR) ou non (CC) en protéines (8%) ou nés de mères restreintes en protéines pendant la gestation, puis allaités (RC) ou non (RR) par des mères recevant un apport protéique équilibré ce qui conduit à un rattrapage rapide (RC) ou à un retard (RR) de croissance post-natale. En parallèle, le lait de ces mères a été caractérisé par une approche métabolomique couplée à une analyse fine de la composition en acides gras par CPG.

La restriction protéique maternelle impacte fortement sur les empreintes métaboliques plasmatiques des nouveau-nés comme le démontre la séparation des groupes de rats CC, CR, RC et RR par une analyse non supervisée de type Analyse en Composantes Principales. Les différences significatives observées entre ces groupes confirment donc l'idée d'une dérégulation métabolique induite par un environnement nutritionnel délétère *in utero* ou postnatal. Parmi les métabolites identifiés, nous avons mis en évidence une diminution significative, chez les rats maintenus sous des mères restreintes en protéines en phase périnatale (RR) ou nés contrôles et allaités par des mères restreintes (CR), d'un acide aminé essentiel, la tyrosine, précurseur de la dopamine, connue pour jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la prise alimentaire. La diminution de la méthionine, précurseur de la cystéine, et l'augmentation d'un acide aminé non essentiel, la carnitine et de ses dérivés acétylés, suggèrent une dérégulation respectivement, de la voie du système redox-glutathion et du métabolisme des acides gras à la fois chez les rats nés de mères soumises à une restriction protéique durant la gestation et prolongée durant la période postnatale ou chez les rats nés contrôles et allaités par des mères restreintes en protéines.

La mise en relation de la composition du lait maternel avec les altérations du métabolome plasmatique observées dans la descendance suite à une manipulation nutritionnelle de la mère, devrait nous permettre d'évaluer l'effet de la malnutrition maternelle périnatale sur la qualité nutritionnelle du lait et de mieux appréhender le rôle clé que peut jouer le lait maternel sur les adaptations métaboliques du nouveau-né dans ses premiers jours de vie, adaptations qui pourraient être à l'origine du développement de pathologies à l'âge adulte.

Analyses métabolomiques par RMN ¹H de lignées cellulaires de mélanome humain

Stéphane Balayssac¹, Thomas Cruz¹, Jérôme Kluza², Véronique Gilard¹, Philippe Marchetti², Myriam Malet-Martino¹

¹Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Toulouse,
²INSERM U837 Equipe 4, Ciblage Moléculaire Cellulaire et Traitement du Cancer, Centre de recherche Jean Pierre Aubert, Lille.

Une grande majorité de cancers, dont le mélanome, possède un métabolisme bioénergétique modifié. Ce mécanisme, appelé effet « Warburg », est caractérisé par une augmentation de la glycolyse quel que soit le taux d'oxygène environnant et cela au détriment de la phosphorylation oxydative mitochondriale [1]. Ce métabolisme particulier favorise le développement de la cellule tumorale et l'invasion des tissus périphériques.

Parmi les différentes protéines impliquées dans le maintien du métabolisme énergétique des cellules tumorales, le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) pourrait jouer un rôle prépondérant. D'un point de vue métabolique, HIF-1 va réprimer les fonctions mitochondriales en contrôlant plusieurs enzymes qui interviennent au niveau du cycle de Krebs [2]. L'accumulation de certains métabolites tels le fumarate, le 2-hydroxyglutarate, le succinate, appelés oncométabolites, pourrait expliquer la régulation d'HIF-1 [3].

Pour évaluer le rôle d'HIF-1 dans le métabolisme énergétique de la cellule et appréhender l'ensemble des modifications métaboliques qui interviennent dans le mélanome, nous avons centré notre étude sur la réactivation forcée de la mitochondrie. Nous avons utilisé une approche basée sur la métabolomique par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ¹H) pour analyser des lignées cellulaires humaines dans lesquelles l'expression de la protéine HIF-1 a été fortement atténuée. Après acquisition et traitement des spectres RMN, attribution et quantification des signaux, des analyses statistiques multivariées nous ont permis de mettre en évidence plusieurs perturbations métaboliques, notamment au niveau du cycle de Krebs.

Références bibliographiques

- [1] Hersey P. et al. *Clinical Cancer Research* 2009; 15: 6490-6494
- [2] McFate T. et al. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 22700-22708
- [3] Dang L. et al. *Nature* 2009; 462: 739-744.

Mots-clés : Mélanome, Métabolomique, RMN, HIF-1

High-field NMR Metabonomics for Cancer Diagnosis and Phase II Evaluation of Chemotherapy Strategies

Elodie Jobard^{1,2}, Clément Pontoizeau¹, Bénédicte Elena-Herrmann¹ and Olivier Trédan²

1. Université de Lyon, CNRS/ENS Lyon/UCB-Lyon-1, Centre de RMN à Très Hauts Champs, Villeurbanne, France

2. Université de Lyon, Département d'oncologie médicale, Centre Léon Bérard, Lyon, France

email : Elodie.Jobard@ens-lyon.fr

Over the past three decades, broadband biological analytical tools or omic methods have dramatically evolved and can now be potentially exploited for effective patient management, predicting the aggressiveness of tumors (eg the risk of relapse) and / or the response to cancer treatment. Cancers induce multiple modifications of the metabolism that lead to production of characteristic metabolites, the result of host-tumor interactions and metabolic pathways (anabolism and catabolism) activated or inactivated during tumor progression. When applied to peripheral blood, metabonomic analysis can provide key elements for clinical oncology, offering a metabolic snapshot of the global metabolism rather than local morphological pictures of the tumor.

We show the implementation of a metabonomics approach by high field NMR by the study of metabolic changes detected in the blood serum in case of metastatic breast cancer, highlighting a discriminant metabolic signature compared to patients with a localized tumor.

Serum samples were collected from female patients suffering from early breast cancer (EBC) and female patients suffering from metastatic breast cancer (MBC). We first show a comparison of metabolic profiles obtained by high-field ¹H-NMR spectroscopy for patients with either EBC or MBC. NMR data were exploited using supervised multivariate statistical analyses and revealed a metabolic signature discriminating EBC from MBC patients. The obtained statistical model was further validated by exploiting additional NMR data from a second, independent, cohort of female patients. This validation protocol demonstrated a sensibility of 71% and a specificity of 89%. Finally, 11 statistically significant metabolites (biomarkers) were identified.

Then, we assess, in the case of phase II study, chemotherapy strategies to understand and predict treatment response and toxicity of these treatments. We first show, as part of the study Landscape, a clinical study evaluating the efficacy of lapatinib and capecitabine combination in patients with brain metastases from non-pretreated breast cancer, how metabonomics analysis allows the dynamic study of the metabolic response associated with disease progression during therapy [1]. Finally, as part of a clinical study evaluating the efficacy of three first-line treatment of kidney cancer (TORAVA), that metabolic signature of a patient may be associated with its treatment [2].

Références bibliographiques

[1] Bachelot T.D. et al., J Clin Oncol, 2011, 29 (suppl. ; abstr 509).

[2] Négrier S. et al., Lancet Oncol, 2011, 12 : 673 :80.

Mots-clés: Metabonomics ; peripheral blood ; High-field NMR ; Cancer

A robotic platform for high-throughput fluxome analysis

S. Heux^{1,2,3}, J. Poinot^{1,2,3}, C. Nicolas^{1,2,3}, S. Massou^{1,2,3}, J.C. Portais^{1,2,3}

1- Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France,

2- INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France,

3- CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

High-throughput (HT) platforms do not exist for rapidly analysing the state and the activity of metabolic networks of the engineered cells with respect to the acquired properties. Here we present the development of a fully integrated HT solution for microbial fluxome analysis. This flexible and modular platform consist of first, a robotic system that allows preparing, running monitoring (growth, pH and oxygen) and controlling (pH, temperature, stirrer speed) of 48 micro-scale (10 ml) fermentations in parallel. The robot encompasses an automatic process for metabolite harvesting and extraction that is sufficiently rapid for quenching metabolic activity, so that isotope patterns can be measured for either metabolic end-products (proteinogenic amino acids) or pathway intermediates. Second, an automated measurement of samples based on NMR with the sensitivity and speed to meet the criteria for HT experimentation. And last, numerical solutions for HT data processing that provides powerful tools and statistical algorithms for semi-automated data interpretations. The power of this HT workflow, to discriminate mutant phenotypes on the basis of their 'fluxome profiles', was demonstrated with *E. coli* mutants. By screening for interesting flux phenotypes among large sets of strains, engineered mutants, or physiological conditions, this platform will undoubtedly facilitate the development of efficient microbial cells factories while providing in depth understanding of biological processes. Thereby represents a foundation for systems biotechnology.

Mots-clés : Fluxomique, Haut débit, automatisation, microorganismes

IsoCor et influx_'s : deux outils pour la ^{13}C -fluxomique haut-débit

Pierre MILLARD, Serguei SOKOL, Fabien LETISSSE, Jean-Charles PORTAIS.

¹Université de Toulouse; INSA, UPS, INP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse,

²INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse,

³CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France.

email : pierre.millard@insa-toulouse.fr

L'analyse des flux métaboliques par marquage isotopique (^{13}C -fluxomique) permet de mesurer les vitesses réelles des réactions métaboliques. La fluxomique est devenue un outil puissant de caractérisation fonctionnelle des systèmes vivants, que ce soit pour identifier de nouvelles voies métaboliques, pour quantifier l'activité des réseaux métaboliques, ou pour comprendre les mécanismes systémiques d'adaptation métabolique. L'émergence de la biologie des systèmes et de la biologie de synthèse suscite une forte demande pour des approches de fluxomique haut-débit. Le développement récent de systèmes de culture contrôlés, parallélisés et miniaturisés, ainsi que les gains de sensibilité et de temps d'analyse qu'autorisent les instruments modernes pour la collecte des données isotopiques, permettent de mettre en place des approches haut-débit de ^{13}C -fluxomique. Le facteur limitant se situe en grande partie au niveau du traitement de la masse importante de données isotopiques générées, que ce soit dans le traitement primaire des données analytiques ou pour l'étape de calcul des flux métaboliques, rendant en pratique très difficile la mise en place de ce type d'approche.

Nous avons développé deux outils bioinformatiques, IsoCor [1] et influx_s [2], dédiés à la ^{13}C -fluxomique en état stationnaire. Le logiciel IsoCor est un outil de traitement des données de spectrométrie de masse qui corrige les massifs isotopiques mesurés de l'abondance naturelle des différents isotopes afin d'extraire les données isotopiques réellement exploitables pour l'analyse des flux (*i.e.* la distribution des isotopologues). Cet outil inclut de nouvelles fonctionnalités (*e.g.* la prise en compte de la pureté du traceur isotopique) afin d'améliorer la précision des données exploitées pour le calcul des flux. Par ailleurs, il peut être utilisé pour n'importe quel traceur isotopique (^{13}C , mais aussi ^{15}N , ^2H , ^{18}O , etc). Le logiciel influx_s est un outil de calcul de flux à partir de données RMN et/ou MS. Il intègre un algorithme particulièrement stable et précis (NLSIC) dont la vitesse de convergence permet de réduire les temps de calcul de quelques heures à quelques minutes seulement, pour des réseaux métaboliques de grande dimension. Une analyse statistique combinant méthode linéaire et analyse de Monte-Carlo permet d'identifier les flux calculables à partir du jeu de données disponible et de déterminer la précision des flux calculés. Ces deux outils disposent d'algorithmes rapides qui facilitent la prise en charge de jeux de données importants en nombre et en volume, et sont donc particulièrement adaptés à la ^{13}C -fluxomique haut-débit. De plus, ils constituent une base solide pour de futurs développements visant à l'analyse des flux en états isotopique ou métabolique non-stationnaires.

Références bibliographiques

[1] Millard P. *et al.*, Bioinformatics, 2012, 28(9) : 1294-1996.

[2] Sokol S. *et al.*, Bioinformatics, 2012, 28(5):687-693.

IsoCor et *influx_s* sont distribués sous licence OpenSource et sont téléchargeables sur <http://metasys.insa-toulouse.fr/software/>

Mots-clés : Flux métaboliques, haut-débit, marquage isotopique, logiciels

Identification de nouvelles fonctions métaboliques par des approches métabolomiques chez la bactérie du sol aérobique stricte, *Acinetobacter baylyi* ADP1

Lucille Stuani¹²³, Christophe Lechaplais¹²³, Sabine Tricot¹²³, Aaro Salminen⁴, Véronique de Berardinis¹²³, Marcel Salanoubat¹²³, Alain Perret¹²³

CEA, DSV, IG, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, Evry F-91057, France¹, CNRS-UMR 8030, Evry F-91057, France², UEVE, Université d'Evry, Evry F-91057, France³, Tampere University of Technology, Finland⁴

Les microorganismes constituent les formes de vie les plus diverses et les plus abondantes sur terre et sont impliqués dans le fonctionnement de tous les écosystèmes. Environ 2700 séquences de génomes bactériens sont aujourd'hui disponibles dans les bases de données [1], ce qui constitue une ressource inestimable pour mieux comprendre leur métabolisme et leur mode de vie. Pourtant, entre 30 et 40% des gènes d'un organisme dont le génome a été séquencé restent sans fonction associée ce qui ne permet qu'une compréhension partielle du fonctionnement d'une cellule et en particulier de son métabolisme.

Nous essayons de compléter l'inventaire des activités métaboliques chez la bactérie du sol *Acinetobacter baylyi* ADP1 par différentes approches. Nous avons, dans un premier temps, séquencé et annoté son génome en apportant un soin particulier à l'annotation des gènes du métabolisme [2]. Sur les ~3300 gènes annotés, 400 codent pour des enzymes de fonction 'putative' et plus de 800 gènes sont de fonction inconnue. Nous avons également construit et analysé la croissance sur différentes sources de carbone et d'azote d'une collection pangénomique de 2800 mutants de délétion [3]. Des approches de transcriptomique ont déjà été initiées et aujourd'hui, nous souhaitons découvrir de nouvelles activités enzymatiques par des approches métabolomiques.

L'analyse globale du métabolome par spectrométrie de masse à haute résolution doit nous donner accès aux variations de métabolites (composition/concentration), suite à une modification génétique ou environnementale. Dans certains cas favorables, il doit être possible de relier la délétion d'un gène, ou le changement de source de carbone, à la perturbation d'un petit nombre de métabolites et donc de se rapprocher de la fonction des gènes impliqués dans ces modifications du métabolisme.

Dans un premier temps, nous avons voulu suivre l'adaptation du métabolisme de la souche sauvage à l'utilisation d'une source de carbone alternative. L'étude comparée des métabolomes de cellules se développant sur succinate ou sur quinate a effectivement pu mettre en évidence les nombreux intermédiaires cataboliques connus entre le quinate et le cycle de Krebs [4]. Par ailleurs, et contrairement à ce que nous dit la littérature [4], les voies de dégradation du quinate et de biosynthèse des acides aminés aromatiques, qui possèdent des métabolites communs, ne seraient pas compartimentées entre le périplasma et le cytoplasme et pourraient interagir. Enfin, la présence de métabolites non attendus chez *Acinetobacter*, identifiés principalement sur le métabolome obtenu sur quinate, laisse entrevoir des voies métaboliques de recyclage ignorées pour ces acides aminés aromatiques.

Références bibliographiques

- [1] www.genomesonline.org
- [2] Barbe V. et al. Nucleic Acids Res. 2004 ; 32 :5766
- [3] de Berardinis V. et al. Mol Syst Biol. 2008; 4:174
- [4] Young DM et al. Annu Rev Microbiol. 2005; 59:519

Mots-clés : métabolomique microbienne, métabolisme, génomique fonctionnelle, spectrométrie de masse

First characterisation of *in situ* bacterial metabolism in model cheeses using mass spectrometry metabolic fingerprinting

Sophie Jeanson^{1,2*}, Frédérique Courant³, Sylvain Chereau³, Valérie Gagnaire^{1,2}, Clémentine Le Boucher^{1,2}, Michel Piot^{1,2}, Marie-Bernadette Maillard^{1,2}, Anne Thierry^{1,2}, Gaud Dervilly-Pinel³, Bruno Le Bizec³ and Sylvie Lortal^{1,2}

¹ INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

² Agrocampus-Ouest, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France

³ LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France

Contact: clementine.leboucher@rennes.inra.fr

Metabolic fingerprinting is an untargeted approach used in many scientific areas [1], which has shown potential to investigate food quality and safety [2]. So far, untargeted metabolic investigations of cheese have only been undertaken using nuclear magnetic resonance (NMR). The aim of this study was to assess for the first time the ability of mass spectrometry (MS) metabolic fingerprinting to investigate modifications induced by bacterial metabolism in cheese over time, for two different spatial distributions of bacterial colonies [3].

Model cheeses were prepared from an ultrafiltered milk concentrate inoculated with *Lactococcus lactis* LD61 at 105 cfu/mL and incubated at 19°C for 48 h. For the same number of bacteria, two different spatial distributions of bacterial colonies were generated in these model cheeses (n=5 for each condition): one with small and close colonies and another one with large and distant colonies. Metabolic fingerprints were performed after 0, 8 and 48 hours on two different fractions of the metabolome: the water-soluble fraction (after 10 kD filtration) using Liquid Chromatography-High Resolution-MS (LC-HRMS) and the volatile compounds fraction using Gas Chromatography-MS.

Fingerprints of the water-soluble fraction allowed discrimination according to incubation time, showing that LC-HRMS is relevant to investigate changes over time in cheese. Structural identification of differential metabolites showed the accumulation of amino-acids from proteolysis and the consumption of vitamins as growth factors. Fingerprints of volatile compounds discriminated samples according to both incubation time and distribution of colonies. Carbonyl compounds (diacetyl, acetoin, 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione), sulphur compounds (dimethyl disulfide and methional), esters (ethyl acetate and ethyl butanoate), benzeneacetaldehyde, and acetic acid, were shown to increase in amount over time. Carbonyl compounds also discriminated the two spatial distributions of colonies. Most of these compounds can result from lactococci metabolism.

These promising results show the interest of untargeted approaches to generate new findings and to detect even slight quantitative differences. We will further combine this approach to other untargeted “omics” techniques to explore strain biodiversity and the influence of ripening factors on microbial metabolism.

Références bibliographiques

- [1] Fiehn, O. (2002) *Plant Molecular Biology* 48, 155-171.
- [2] Antignac et al., (2011) *Trends in Analytical Chemistry* 30, 292-301.
- [3] Jeanson et al. (2010) *AEM* 77, 247-257.

Etude métabolomique de la réponse au froid d'une bactérie isolée des nuages. Premiers résultats

Cédric Mendes¹, Balentin Bichindaritz¹, Marion Picard¹, Cyril Jousse^{1,3}, Isabelle Canet¹,
Martine Sancelme¹, Pierre Amato^{1,2} et Anne-Marie Delort^{1,2}

^[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand

^[2] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière

^[3] Plateforme d'exploration du métabolisme, Université Blaise Pascal, BP 80026, F-63171 Aubière
Courriel : isabelle.canet@univ-bpclermont.fr

Si l'on s'intéresse depuis longtemps aux écosystèmes microbiens terrestres et aquatiques, ce n'est que récemment que l'on a découvert la présence de microorganismes dans les nuages [1]. Le milieu atmosphérique est très particulier car il est soumis à d'incessants changements : cycles de gel-dégel, de condensation-évaporation, exposition aux UV et au froid ... Se pose ainsi la question de la résistance aux stress et à la survie de ces microorganismes dans un tel environnement. Notre laboratoire a isolé un grand nombre de souches dans des nuages prélevés au sommet du puy de Dôme, le suivi d'une dizaine d'années montre que certains genres sont majoritaires, c'est le cas du genre *Pseudomonas* [2]. Des études récentes ont montré que l'approche en « omique » pouvait apporter des informations intéressantes pour étudier la réponse au froid des microorganismes [3]. Nous avons entrepris une étude par métabolomique de la souche *Pseudomonas syringae* 32B74 incubée à 17°C et à 5°C, ces deux températures correspondent aux températures moyennes estivales et annuelles au sommet du puy de Dôme.

Les bactéries ont d'abord été cultivées sur milieu solide KB, le tapis bactérien a été ensuite récupéré dans l'eau stérile à une concentration de 10¹⁰ cellules/mL. Deux lots ont été constitués, un lot a été incubé pendant 18h à 5°C, l'autre à 17°C. Chaque échantillon a été centrifugé, lavé et le culot bactérien a été extrait par un mélange acétonitrile/méthanol/eau. Chaque lot a été ensuite décomposé en 12 réplicats chacun. Ces extraits ont été ensuite analysés sur une plateforme Metabolic Profiler en RMN ¹H et en LC-MS. Les données ont ensuite été traitées par des analyses ACP et PLS-DA. Les premiers résultats montrent la présence de 120 ions (MS) et de 73 buckets (RMN) discriminants. L'identification de ces marqueurs de la réponse au froid de *Pseudomonas syringae* 32B74 est en cours d'analyse.

Références bibliographiques

1. Delort *et al.*, Atmos Res, 2010, 98:249-260
2. Vaitilingom *et al.*, Atmos Environ, 2012, in press
3. Dalmaso *et al.*, PLoS One, 2012, 7: e29083

Mots-clés : Stress, froid, nuage, *Pseudomonas*, RMN, spectrométrie de masse

O26 - Conférencier Invité

Diatom endo and exometabolome analysis supported deciphering of ecological interactions in the plankton.

**Georg Pohnert, Charles Vidoudez, Carsten Paul, Astrid Spielmeyer, Emily Prince,
Alexandra Barofsky**

*Friedrich Schiller University, Department of Bioorganic Analytics, Lessingstr. 8, D-07749 Jena, Germany,
Georg.Pohnert@uni-jena.de*

It is well established that unicellular algae from the plankton have established means to interact with other organisms in their environment. Especially interactions mediated by chemical compounds have gained a lot of attention during the last years. Algal exudates and metabolites stored in the cells can mediate feeding activity of herbivores, algal algal interactions but also interactions of an alga with the surrounding microbial community. We introduce an approach to address such chemically mediated interactions based on the metabolomic investigation of the cellular and released metabolites of diatoms (microalgae of the phytoplankton). The metabolomic survey indicates that diatoms exhibit a high plasticity of metabolite production during their development. Metabolite concentration changes dramatically in between growth phases but also pronounced circadian variability can be observed. Our results indicate that the regulation of biosynthetic pathways in diatoms is highly dependent on environmental abiotic factors. But co-culturing experiments also reveal that biotic interactions influence the diatom metabolome. We used bioassays to demonstrate that the variable chemical properties of the algae are also causing pronounced variability of the chemical interaction of phytoplankton with the environment. Consequences for future investigations of diatom physiology and chemical interactions are discussed.

Transcriptomic and metabolomic approaches to study defense responses against grazers in kelps

Ritter A ⁽¹⁾, Goulitquer S ⁽²⁾, Cosse A ⁽³⁾, Thomas F ⁽³⁾, Fasshauer C ⁽³⁾, Brillet L ⁽²⁾, Corre E ⁽²⁾,
Potin P ⁽³⁾, Faugeron S ⁽¹⁾, Leblanc C ⁽³⁾

⁽¹⁾ CASEB, Pontifica Universidad de Chile, Santiago, Chile

⁽²⁾ FR2424, CNRS-UPMC, Station Biologique, BP 74, 29680 Roscoff, France

⁽³⁾ UMR7139, CNRS-UPMC, Station Biologique, BP 74, 29680 Roscoff, France

In collaboration with a Chilean research group, we are studying macro-algae/grazers interactions on two emblematic species from kelp belts, *Laminaria digitata* from North-Atlantic Brittany and *Lessonia nigrescens* from Chilean coasts, by developing global transcriptomic and metabolomic analyses. For this purpose, the main associated herbivores were identified, respectively *Helcion pellucidum* for *L. digitata* and the limpet *Scurria scurra* for *L. nigrescens* and used to induce grazing effects on algae under laboratory controlled conditions. Four cDNA libraries were constructed from sporophytes grazed up to 48 hours, and from algae maintained in similar conditions without herbivores. High-throughput expressed sequence tags (EST) sequencing was carried out using 454 technology and four sets of 44,363 to 68,185 ESTs were generated from each library, corresponding to a total amount of data up to 16 Mbases. The best clustering sets were obtained with pooled sequences (control and grazed 454-generated and public databases sequences) using Newbler and led to 15,457 and 16,518 unigenes (i.e contigs and singletons) for *L. digitata* and *L. nigrescens*, respectively. *In silico* analyses were carried out to assign a putative function for unigenes and identify those specifically regulated during grazing. Several specific gene markers of herbivory responses have been further validated by qPCR. In parallel, metabolic profiling of surrounding seawater and algal tissues have been analysed to monitor chemical responses during time-course of grazing in laboratory conditions. Similarly to transcriptomic responses, global analyses showed a clear regulation of metabolism in both kelps upon grazing. Both molecular and chemical markers will be further used for functional studies in natural populations.

Mots-clés : biotic interaction, macroalga, defense

Recherche de biomarqueurs pour le contrôle de PBR microalgaux dédiés à la production de biodiesel

Graziella Rabin¹, Olivier Gonçalves¹, Frédérique Courant², Benjamin Moutel¹, Arnaud Martzloff¹, Jean-Philippe Antignac², Bruno Le Bizec², Dominique Grizeau¹, Jérémy Pruvost¹, Jack Legrand¹

¹ GEPEA, Université de Nantes, CNRS, UMR 6144, 37 bd de l'Université, CRTT-BP 406, F-44602 Saint-Nazaire Cedex

² ONIRIS, Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Atlanpole - La Chantrerie, BP 40706, Nantes F-44307

Les microalgues font actuellement partie des candidats les plus prometteurs pour la production industrielle de biocarburant. En effet, lorsque soumises à un stress nutritif contrôlé, celles-ci se montrent capables d'accumuler de grandes quantités de lipides de réserve, facilement transestérifiables en vue d'une utilisation en tant que biodiesel. Avant d'envisager une production à grande échelle de ce nouveau type de ressource bioénergétique, il est cependant nécessaire de lever certains verrous scientifiques. En effet, le contrôle du stress nutritif des microalgues est actuellement réalisé à l'aide d'indicateurs macroscopiques (suivi de la biomasse ou dosage des pigments) d'une perturbation du métabolisme microalgal. Toutefois, ces indicateurs ne deviennent pertinents qu'après plusieurs jours de culture. Nous avons donc cherché à évaluer le potentiel d'une approche de caractérisation globale et non ciblée de type métabolomique, afin de mettre en évidence des marqueurs précurseurs des perturbations métaboliques générées lors de ces stress nutritifs. Une pré-étude a ainsi été réalisée sur la microalgue modèle *Chlamydomonas reinhardtii*, cultivée en condition optimale et en milieux présentant des limitations croissantes en azote. La spectrométrie infrarouge a tout d'abord été exploitée afin de contrôler l'effet de ces limitations, avant de réaliser un métabotypage systématique par couplage chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Les signatures métaboliques ainsi générées ont permis d'identifier plusieurs groupes de métabolites différenciellement exprimés au cours de ces stress progressifs. Ces biomarqueurs potentiels sont actuellement en cours d'élucidation structurale et pourront être exploités, après validation fonctionnelle, comme indicateurs pour le contrôle en vue d'une meilleure maîtrise de la production de lipides par des microalgues cultivées en photobioréacteurs.

Mots-clés : biocarburant, microalgues, métabolomique, photobioréacteur, contrôle

Effets métaboliques de l'hormone de croissance sur des poneys mis en évidence après filtration des effets saisonniers.

Mohamed N. Triba¹, Florian Messier², Eric Barrey³, Laurence Le Moyec²

1 Université Paris 13, Laboratoire CSPBAT UMR 7244, Bobigny, France

2 Université d'Evry, UBIAE, INSERM U902, Genopole, Evry, France

3 Université d'Evry, UBIAE U902, Genopole, Evry, France et GABI UMR 1313, INRA, Jouy-en-Josas, France

L'étude a pour but de détecter les effets métaboliques de l'administration d'hormones de croissance (GH) sur des poneys. Parallèlement aux effets tissulaires et cellulaires mieux connus, l'hormone de croissance a des effets métaboliques complexes sur les métabolismes glucidiques protéiques et lipidiques. La GH a été injectée à des poneys gras et maigres et les sérums analysés ont été prélevés avant traitement puis après 3 mois de traitement. Pour détecter les effets métaboliques de la GH sur les animaux maigres et sur les animaux gras, il était nécessaire de distinguer ces effets recherchés des changements liés aux saisons (variations hormonales, alimentaires...). Pour cela, nous avons éliminé les variations du métabolisme corrélées au temps en utilisant comme référence des animaux non traités.

L'étude a été effectuée sur 20 poneys de race Welsh dont 10 ont suivi un régime enrichi en céréales (groupe gras) et 10 un régime hypoénergétique (groupe maigre). Après le régime, 10 juments (5 grasses et 5 maigres) ont reçu une injection de 30 mg/kg de GH par jour. Les 10 autres animaux (5 grasses et 5 maigres) n'ayant pas reçu de traitement sont les témoins de l'étude. Les échantillons sanguins ont été prélevés avant le traitement (T0) et trois mois après le début du traitement (T3). Au total 40 spectres proton RMN 1D ont été obtenus sur les 40 sérums correspondants. Un premier modèle OPLS a été construit en comparant les échantillons non traités aux temps T0 et T3. La composante prédictive de ce modèle a été soustraite de l'ensemble des données (animaux traités et non traités aux temps T0 et T3) afin de ne conserver que les variations indépendantes du temps.

Nous montrons d'une part que cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet de la GH sur le métabolisme protéique pour l'ensemble des animaux et d'autre part que cet effet est plus important chez les juments grasses que chez les juments maigres.

Mots-clés : RMN du proton, OPLS, filtration statistique

Analyse de données de métabolomique issues d'un plan expérimental : l'ASCA

M. Tremblay-Franco^{1,2}, C. Canlet^{1,2}, J. Riquet³, Noblet J. ⁴, D. Renaudeau⁵ ...

¹Plateau AXIOM, INRA, UMR 1331, ToxAlim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, ²Université de Toulouse, INP, UMR1331, Toxalim, F-31000 Toulouse,

³Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA, UMR 444,

⁴Pegase, INRA, UMR 1348, F35590 Saint Gilles,

⁵Unité de Recherches Zootechniques, INRA, F9710, Petit-Bourg.

Les données de métabolomique issues d'un plan expérimental sont de plus en plus fréquentes, notamment pour étudier l'effet d'un traitement sur l'évolution dynamique du métabolome.

L'Analyse de Variance Multivariée (MANOVA) habituellement utilisée pour analyser des données issues d'un plan expérimental n'est pas applicable aux données de métabolomique : le nombre d'observations étant inférieur au nombre de variables, les hypothèses de normalité et d'égalité des variances ne sont ni supposables, ni testables. Les méthodes multivariées, telles que l'ACP ou la PLS-DA, généralement utilisées pour le traitement de données de métabolomique, ne prennent pas en compte la dimension temporelle. Une grande partie de l'information contenue dans les données est donc perdue quand la MANOVA ou l'ACP est utilisée seule pour traiter des données de métabolomique issues d'un plan expérimental. Cette étude a pour but d'appliquer une méthode qui combine les deux méthodes précédemment décrites : ANOVA-SCA [1]. Les données sont séparées en blocs selon les différentes sources de variation (facteurs du plan d'expérience), puis la SCA est appliquée à chaque bloc indépendamment. Le test des permutations [2] est utilisé pour tester la significativité des différents paramètres du modèle.

Cette méthode a été appliquée à des données de métabolomique obtenues sur du plasma de porc par RMN du proton à 600 MHz. L'objectif de cette étude est de rechercher des biomarqueurs de caractères d'adaptation aux variations de température via un profil métabolomique obtenu sur plasma sanguin. Deux lots de 8 porcs (issus de deux lignées divergentes : lignée R+ et lignée R-) ont été soumis à un challenge thermique (passage d'un environnement de 24°C pendant 7 j à 30°C pendant 13 j). Des prises de sang ont été réalisées sur ces animaux cathétérisés à des temps variables (T-5: 5 jours précédant la mise à 30°C, T-1: veille de la mise à 30°C, T1: 1 journée à 30°C, T2: 2 jours à 30°C, T7: 7 jours à 30°C, et T13 : 13 jours à 30°C) afin d'étudier l'effet du changement de température et la capacité des animaux à s'adapter. Les échantillons de plasma ont été ensuite analysés par RMN du proton.

L'utilisation de cette méthode qui combine analyse de variance et analyse multivariée des données de métabolomique issues d'un plan expérimental nous a permis de mettre en évidence un effet Temps et un effet Lignée, par contre l'interaction Temps*Lignée est non significative.

Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus en utilisant une technique multivariée telle que la PLS-DA.

Références bibliographiques

[1] Smilde A.K. et al. *Bioinformatics*, 2005, 21 :3043-3048.

[2] Vis D.J. et al. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 :322-329.

Mots-clés : Données de métabolomique longitudinales, ASCA, RMN

Metabolomics for the functional analysis of Cytochrome P450 in plants

Lugan R., Heintz D., Debayle D., Heitz T., Pinot F., Werck-Reichhart D.

The metabolomic platform of the IBMP [1] supports research devoted to integrative plant biology and functional genomics, especially for the investigation of biosynthetic pathways and regulation of secondary metabolites. We report here recent breakthroughs in the understanding of mechanisms of evolution and functions of Cytochromes P450 (CYP), the largest family of enzymes in plant metabolism. CYP catalyze critical steps in many biochemical pathways, mostly oxygenations, of which less than 30% have been functionally described.

The first example concerns two genes of the CYP94 family, shown to be critical in the oxidative turnover of fatty-acid derived jasmonate-related hormones that are involved in the reproduction of plants and their responses to insect and pathogen attacks [2]. The combination of *in vitro* biochemistry, reverse genetics, RT-PCR, and UPLC-MS/MS targeted quantitative analysis of jasmonoyl-isoleucine and oxidated derivatives, led to the demonstration that CYP94 enzymes account for the production of 12-OH-jasmonoyl-isoleucine and 12-COOH-jasmonoyl-isoleucine and are involved in the attenuation of jasmonate signaling. The second example describes a retroposition, neofunctionalization and duplication of the *CYP98A3* gene (encoding a 3'-hydroxylase of phenolic esters), leading to the evolution of a novel phenolic pathway in Brassicaceae [3,4]. First, the *in silico* analysis of CYP gene expression in a large scale in-house database, CYPedia (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>), generated the hypothesis of an overlooked branch of the phenylpropanoid pathway, involving two CYP of unknown function. Gene structure, proteins and cDNA phylogeny indicated that these two CYPs resulted from a recent retroposition and accelerated evolution from *CYP98A3*. Mapping of the residues under high selective pressure on homology models of the protein/substrate complex revealed targeted modifications predicted to enlarge the distal region of the active-site cavity and to increase enzyme flexibility, suggesting a larger substrate. Gene expression pattern pointed to a function in anther and pollen development. The enzyme function was thus investigated by differential UPLC-UV-MS/MS profiling of young flowers and anthers of KO, silenced and over-expressing lines. The data were confirmed by enzyme expression in yeast, revealing a new phenolamide pathway involving successive meta-hydroxylation steps of phenolamides of spermidine into hydroxyferuloylspermidines to form major pollen coat constituents.

These two examples highlight how metabolomic-orientated strategies provide crucial information to draw up the full picture of new biochemical pathways.

Références bibliographiques

- [1] Institut de Biologie Moléculaire des Plantes - UPR2357. <http://ibmp.u-strasbg.fr/>
- [2] Heitz T *et al.*, J Biol Chem, 2012, doi:10.1074/jbc.M111.316364
- [3] Ehrling J *et al.*, BMC Plant Biol, 2008, Vol 8: 47
- [4] Matsuno M *et al.*, Science, 2009 Vol 325: 1688-92.

Metabolic signatures of oilseed rape (*Brassica napus* L.) source and sink leaves under nitrogen and/or water limiting conditions

B. Albert, F. Le Cahérec, L. Leport, S. Berardocco, A. Gravot, P. Faes, MF Niogret and A. Bouchereau

UMR 1349 IGEPP, INRA - Agrocampus Ouest - Université de Rennes 1, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France.

Compared to other crops, oilseed rape (OSR) needs very high amounts of nitrogen (N) fertilisers, since this species is known to have low nitrogen use efficiency (NUE), which is mainly due to a weak organic N remobilisation performance from senescing source leaves to developing sink tissues and to seed filling. Nevertheless reduction of N inputs in attempt to limit energetic cost and environmental impact is becoming a central focus. Moreover, in areas with temperate climate OSR is often subjected to drought stress periods that affect plant growth, development and yield.

In this context, improvement of NUE (and water use efficiency) in OSR is an actual challenge in prevision to lower N supply and limitation of water availability. Thus appreciation of N fertilization management impact on plant water stress susceptibility should be anticipated and conversely water shortage impact on plant NUE should be evaluated. In that way, attention about regulation of nitrogen metabolism in leaves as a major source of remobilized nutritive compounds and stress protective metabolites is of prime interest.

The goal of our work was to fingerprint (UPLC-DAD ; UPLC-MS ; GC-FID ; GC-MS ; multivariate statistical analysis) leaf metabolites rank by rank at the whole plant level under different nitrate and water regimes under greenhouse conditions, to investigate at vegetative stages the metabolic impact of combined N and water shortages, and to search for biochemical attributes of N remobilisation and stress protection. A focussed attention was dedicated to quantitative analyses of individual free amino acids, non-structural carbohydrates and organic acids at several time points in senescing source, intermediate and developing sink leaves. Metabolite profiling data were integrated into exploratory multivariate statistical analyses. Metabolic signatures of leaf development and nutritional status have been outlined. Interestingly, metabolic adjustments in response to drought were strongly affected by preliminary nitrogen availability and leaf source-sink status. A special attention has also been targeted to proline metabolism (through proline amount and RT-Q-PCR BnP5CS and BnPDH gene transcript levels measurements) as a major metabolic syndrome of OSR response to water stress and as a putative interference to NUE under water depletion. In prospect, this original work disclosed possible new components of the regulatory metabolic network for nitrogen use efficiency and plant stress response in oilseed rape.

Mots-clés: Brassica crops ; Nitrogen Use Efficiency ; Source-Sink relationships ; Metabolic profiling

Physiological plasticity of insects: metabolic differences in salinity tolerance between two sympatric subantarctic flies

Laparie M., Larvor V., Renault D.

Université de Rennes 1, UMR CNRS 6553 Ecobio, Rennes, France

Within sub-Antarctic islands, most insects are decomposers and feed in coastal areas, where organic matter is gathered. At the Kerguelen Islands, the two native wingless flies, *Anatalanta aptera* and *Calycopteryx moseleyi*, compete for food in or around foreshore. Individuals of *A. aptera* have a high locomotor activity and occur in a wide range of habitats, from foreshore to further inland (up to 600 meters asl), and should thus face a wide range of saline conditions. Conversely, the development of *C. moseleyi* is restricted to two distinct habitats: Kerguelen cabbages and foreshore, which are under contrasted salinities. Using Gas Chromatography, we examined the metabolic responses to salinity in adults of the two species sampled in the same foreshore. They were exposed to different salinity levels (0, 35, 70 ‰) up to two weeks under controlled conditions. We hypothesized that (i) adult *A. aptera* have a large physiological plasticity and can endure a wide range of salinities thanks to the accumulation of compatible solutes, whereas (ii) adult *C. moseleyi* are specialized to conditions of either cabbage or foreshore habitats. The duration of survival at 0 ‰ was similar in both species, but *A. aptera* better survived higher salinity levels and exposure durations than *C. moseleyi*. Osmoprotectants such as erythritol, pipercolic acid and free amino-acids were found in higher amounts in *A. aptera*, and increasing salinity resulted in their accumulation in this species only. Our results support rapid osmoregulatory adjustments in response to hypersaline conditions in *A. aptera*. Contrariwise, the plasticity was comparatively negligible in *C. moseleyi*, suggesting that saline habitats are sub-optimal. The colonization of foreshore habitats by *C. moseleyi* may thus be secondary and result from the regression of the cabbages due to climate changes, native colonies of fur seals or gentoo penguins, and introduced rabbits. The question remains whether wild *C. moseleyi* respond behaviorally rather than physiologically to withstand the high salinity of foreshore, e.g. by avoiding prolonged salt exposure

Interaction entre l'abeille domestique et un microorganisme pathogène : étude des conséquences sur l'hémolymphe par une approche métabolomique.

Cyril Vidau^{1,2}, Cyril Jousse^{3,4}, Marie Lagrée³, Mounir Traïkia^{3,4}, Régis Fontbonne^{1,2}, David G. Biron^{1,2}, Frédéric Delbac^{1,2}

^[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, **Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement**, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand

^[2] CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière

^[3] Plateforme d'exploration du métabolisme, Université Blaise Pascal, BP 80026, F-63171 Aubière

^[4] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand
Courriel : cyril.jousse@univ-bpclermont.fr

Nosema ceranae est une microsporidie qui colonise l'épithélium intestinal des abeilles. Ce parasite a été détecté pour la première fois en 2006 dans des colonies d'abeilles européennes *Apis mellifera*. Cette découverte a coïncidé avec de lourdes pertes des colonies d'abeilles recensées en France et dans le reste de l'Europe [1,2]. Etant donnée l'importance écologique (biodiversité), agronomique (rendement agricole) et économique (apiculture) que revêt l'abeille de par ses activités de pollinisation et de production de miel, l'émergence de ce microorganisme a soulevé de nombreuses interrogations et inquiétudes au sein des communautés scientifique et apicole. Les études publiées durant les 5 dernières années indiquent que les abeilles infectées par *N. ceranae* présentent les signes d'un stress énergétique associé à la fois à une baisse de l'immunité et à une altération de la production de phéromones. Toutefois, les connaissances sur la physiopathologie des abeilles infectées sont limitées, et l'impact réel de ce parasite sur la santé des abeilles reste controversé.

L'objectif général de ce travail est de caractériser et d'interpréter par une approche métabolomique, l'impact de *N. ceranae* sur la physiologie des abeilles. L'hémolymphe de l'abeille, dont le métabolome n'a jusqu'ici jamais été exploré, constitue un tissu de choix pour une telle analyse [3] car elle permet d'avoir une vision globale des perturbations métaboliques induites.

Pour répondre à cet objectif, des abeilles émergentes, issues d'une colonie maintenue dans le rucher expérimental du LMGE (Clermont-Ferrand), sont placées en contention, et réparties en 2 groupes expérimentaux (abeilles infectées *versus* non-infectées) constitués de 3 cagettes de 30 abeilles chacun. L'infection est réalisée manuellement en proposant à chaque abeille 5µl d'eau sucrée contenant 125000 spores de *N. ceranae*. Après 10 jours d'infection, la récolte de l'hémolymphe est réalisée sur 15 abeilles de chaque modalité. En parallèle, le tube digestif de chaque abeille échantillonnée est disséqué pour effectuer un diagnostic clinique (mesure de la charge parasitaire) et associer les changements métabolomiques mesurés avec le niveau d'infection. L'ensemble des hémolymphe est analysé sur le Metabolic Profiler [4,5] (PFEM, Clermont-Ferrand), par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (¹H RMN 500MHz) puis par chromatographie liquide (UPLC) couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (ESI-µToF). Le traitement des données ainsi obtenues, l'analyse statistique multivariée et l'interrogation des banques de données, ont permis d'identifier des métabolites marqueurs expliquant les différences significatives entre lots d'individus.

Cette expérience s'inscrit en préliminaire de plus vastes études sur d'autres compartiments tissulaires de l'abeille qui peuvent être aussi une cible privilégiée de l'action parasitaire (intestin et cerveau).

Références bibliographiques

1. Higes *et al.*, J Invertebr Pathol, 2006, 92: 93-95
2. Martin-Hernandez *et al.*, Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 6331-6338
3. Poyton *et al.*, Environ Sci Technol, 2011, 45: 3710-3717
4. Godjohann, J Chromatogr A, 2007, 1156: 87-93
5. Sun *et al.*, J Chromatogr B, 2008, 871: 328-340

Mots-clés : Abeille, pathogène, métabolomique, hémolymphe

Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances.

Gaud Dervilly-Pinel¹, Sylvain Chéreau¹, Frédérique Courant¹, Fanny Boyard-Kieken^{1,3}, Jean-Philippe Antignac^{1,2}, Fabrice Monteau¹ and Bruno Le Bizec¹

¹LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France.

gaud.pinel@oniris-nantes.fr

²INRA, Nantes, F-44307, France

³LCH, Verrières le Buisson, F-91970, France

Metabolomics is a science of interest in Food Analysis to describe and predict properties of food products and processes. It includes the development of analytical methods with the ultimate goal being the identification of so-called quality markers, i.e. (sets of) metabolites that correlate with e.g. quality, safety, taste or fragrance of foodstuffs. In cases where the routine-based measurement of a food property faces some limitations such as the lack of knowledge regarding the target compounds to monitor, monitoring based on a limited set of crucial biomarkers, is a good alternative, which is of great interest for food safety purposes regarding growth promoting practices. Growth promoting practices for cattle fattening purposes are still encountered all around the world and detection of these illegal practices classically relies on residue monitoring in a targeted approach with methods based on gas- or liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry which are today considered as the state-of-the-art. These strategies are however challenged when facing new xenobiotic growth promoting agents or new ways of application, such as the administration of low dose cocktails. In this context, screening strategies allowing detection of the physiological response resulting from anabolic compounds administration are promising approaches to detect their misuse. A global metabolomics workflow has therefore been developed and implemented at LABERCA for such studies and tackle the related issue [1-5]. This emerging tactic has allowed highlighting candidate biomarkers [3, 4, 6] which have been implemented in robust statistical models to screen for anabolic treated bovines with different classes of compounds (various steroids, beta-agonists,...) and different protocols of administration [7].

Références bibliographiques

1. Dervilly-Pinel, G., et al., Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. *Anal Chim Acta*, 2011. 700(1-2): p. 144-154.
2. Boyard-Kieken, F., et al., Comparison of different liquid chromatography stationary phases in LC-HRMS metabolomics for the detection of recombinant growth hormone doping control. *J Sep Sci*, 2011. 34(24): p. 3493-3501.
3. Courant, F., et al., Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst*, 2009. 134(8): p. 1637-1646.
4. Antignac, J.P., et al., Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2011. 30(2): p. 292-301.
5. Kieken, F., et al., Development of a metabolomic approach based on LC-ESI-HRMS measurements for profiling of metabolic changes induced by recombinant equine growth hormone in horse urine. *Anal Bioanal Chem*, 2009. 394(8): p. 2119-28.
6. Pinel, G., et al., Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2010. 29(11): p. 1269-1280.
7. Dervilly-Pinel, G., et al., Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances. *Drug Testing and Analysis*, 2012(In press).

Mots-clés: Chemical food safety, LC-HRMS profiling, metabolomics, anabolic practices, cattle

Métabolomique semi-ciblée par LC-HRMS de métabolites de pesticides dans des urines : vers une caractérisation de l'exposition humaine ?

Emilien Jamin¹, Marion Gaudicheau¹, Nathalie Bonvallot^{1,2,3}, Marie Tremblay-Franco¹, Jean-Pierre Cravedi¹, Cécile Chevrier³, Sylvaine Cordier³, Laurent Debrauwer¹

1 INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France

2 EHESP – School of public health, Rennes – Sorbonne Paris Cité, France

3 INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de recherche en santé, environnement, travail, Rennes, France

L'évaluation de l'exposition aux pesticides reste un défi important dans la mesure où les volumes d'échantillons disponibles à partir de cohortes sont souvent faibles et où la recherche de composés présents doit être la plus exhaustive possible. De plus, dans le cas d'échantillons urinaires, les pesticides potentiellement présents le sont généralement sous forme de métabolites, dont les structures ne sont pas forcément connues a priori. Dans ce contexte, ce travail a consisté à évaluer le potentiel d'une approche semi-ciblée par UHPLC-HRMS pour la recherche de métabolites de pesticides dans des échantillons urinaires issus de la cohorte PELAGIE (Perturbateurs Endocriniens Etude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance). L'étude PELAGIE conduite par l'INSERM, consiste à évaluer les conséquences des expositions à divers contaminants, en particulier les pesticides, à partir d'une cohorte de 3421 femmes enceintes de la région Bretagne afin d'évaluer l'influence de cette exposition sur le déroulement de la grossesse, son issue et sur le développement psychomoteur de l'enfant.

Dans ce travail, 40 échantillons ont été tirés au sort parmi les quatre groupes d'individus plus ou moins exposés aux pesticides selon leur environnement : population urbaine / population rurale plus ou moins entourée de cultures céréalières. Ces échantillons ont été directement analysés par UHPLC-HRMS (phase stationnaire C18, ionisation Electrospray en mode positif et négatif, spectromètre de masse LTQ-Orbitrap). Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel MetWorks (Thermo Scientific) afin d'extraire et d'intégrer les signaux correspondant à 47 pesticides et leurs métabolites connus ou théoriques, soit environ 450 molécules au total. L'intérêt de cette approche semi-ciblée vient du fait que l'acquisition des données est réalisée de manière globale (full HRMS) et qu'il est donc possible a posteriori de rechercher des pesticides ou leurs métabolites non sélectionnés initialement. Tous les signaux détectés ont été analysés par des expériences MSⁿ afin d'étayer les hypothèses d'identification des métabolites détectés. Certains d'entre eux ont pu être confirmés par comparaison avec des métabolites issus d'une expérimentation animale conduite en parallèle.

24 variables ont ainsi pu être détectées en mode négatif et ensuite analysées par PLS-DA. Les résultats obtenus en mode positif n'ont pas apporté d'informations supplémentaires. Les résultats obtenus après filtrage OSC des données générées en mode négatif, montrent qu'une meilleure séparation des groupes d'exposition est obtenue à partir de données normalisées à l'aide d'un étalon interne. Les groupes ont ainsi été séparés grâce à 6 variables correspondant à 3 pesticides dont 2 fongicides utilisés en culture céréalière.

Mots-clés : Cohorte, pesticides, exposition

Communications Flashs

F1-P1

Recherche de déterminants métaboliques associés à la résistance polygénique du colza à la hernie des crucifères

Antoine Gravot(1,4), Geoffrey Wagner(2,4), Christine Lariagon (3), Sophie Charton (3),
Nathalie Marnet (5), Alain Bouchereau(1,4), Régine Delourme(3), Maria Manzanares-
Dauleux (2,4)

¹Université Rennes 1, UMR1349 IGEPP, F-35000 Rennes, France

²AGROCAMPUS OUEST, UMR1349 IGEPP, F-35000 Rennes, France

³INRA, UMR1349 IGEPP, F-35653 Le Rheu, France

⁴Université Européenne de Bretagne, France

⁵INRA, UR117 Cidricoles et Biotransformation des fruits et légumes, F-35653 Le Rheu, France

Des avancées très importantes ont été réalisées depuis 20 ans sur les résistances aux agents pathogènes chez les végétaux. Cependant, très peu de connaissances sont aujourd'hui disponibles sur les mécanismes cellulaires sous-jacents aux résistances quantitatives à déterminisme polygénique. Le travail présenté vise à identifier des réponses métaboliques sous-jacentes à la résistance polygénique à la hernie des crucifères chez le colza. Dans un premier temps, nous avons relié la multiplication de l'agent pathogène dans les racines infectées (durant une période de 42 jours après inoculation), avec les perturbations globales du métabolisme primaire et secondaire, chez un génotype sensible à la hernie (Yudal) et chez un génotype présentant une résistance partielle sous contrôle polygénique (Darmor-bzh). Les résultats obtenus suggèrent que la résistance à la hernie se met en place au cours des semaines 2 et 3 après l'inoculation ; plusieurs analytes potentiellement impliqués dans le processus infectieux ou dans le processus de résistance ont été identifiés. Dans un second temps, de la réponse métabolique à l'infection a été étudiée par une combinaison de profilages ciblés et non-ciblés chez une descendance en ségrégation issue d'un croisement entre Yudal et Darmor-bzh. Les données obtenues nous a permis de réaliser une analyse QTL des réponses métaboliques métaboliques et de mettre en relation les QTLm avec les QTL de résistance. Ce travail permet ainsi de réaliser une typologie des différents QTL de résistance sur la base d'empreintes métaboliques et d'affiner les hypothèses sur les liens de causalité reliant les réponses métaboliques à l'infection et le contrôle génétique de la multiplication de l'agent pathogène.

Références bibliographiques

- Gravot A, Deleu C, Wagner G, Lariagon C, Lugan R, Todd C, Wendehenne D, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux M.J. (2012) Arginase Induction Represses Gall Development During Clubroot Infection In Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 2012; doi: 10.1093/pcp/pcs037
- Gravot A, Grillet L, Wagner G, Jubault M, Lariagon C, Baron C, Deleu C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ (2011) Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* 191: 1083-1094.
- Jubault M, Gravot A, Lariagon C, Deleu C, Bouchereau A, Delourme R and Manzanares-Dauleux MJ. 2009. Integrative analysis of the Arabidopsis thaliana–Plasmodiophora brassicae interaction:deciphering mechanisms associated with partial resistance. Report on Plasmodiophorids and related organisms. *Plant Protection Science* 45 (1): 32.
- Jubault M, Hamon C, Gravot A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ. Differential regulation of root arginine catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant Arabidopsis genotypes (2008) *Plant Physiology* 146(4):2008-19.

Mots-clés : Interactions plantes-pathogènes, génétique quantitative, QTL métaboliques, résistance à la hernie des crucifères

F2-P2

MALDI mass spectrometry imaging applied to small molecules

**Yann Guitton^a, Florence Mondeguer^c, Elodie Nicolau^c, Florence Royer^c, Jean-Louis Hilbert^a,
Isabelle Fournier^b, Maxence Wisztorski^b**

^a INRA USTL UMR SADV 1281, Stress Abiotiques et Différentiation des Végétaux Cultivés
Université Lille Nord de France, Lille 1, SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b MALDI Imaging Team, Laboratoire de Spectrométrie de masse Biologique, Fondamentale, Appliquée, EA-4550,
Université Lille Nord de France, Lille 1, SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

^c Laboratoire Phycotoxines, IFREMER Rue de l'île d'Yeu, BP 21105 44311 Nantes, France

MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) is a two-dimensional MALDI-mass spectrometric technique used to visualize the spatial distribution of a large variety of biological molecules (from small metabolites to large proteins) without extraction, purification, separation or labelling of biological samples [1]. Since its introduction by Caprioli *et al* in 1997 [2], it has become one of the most important molecular histology methods for biomarker hunting and for understanding the spatial distribution of biomolecules in various tissues. MALDI-MSI is thus ideal for complementing the expanding field of metabolomics [3]. Despite the fact that MALDI-MSI have been very successfully applied in divers studies (even in clinical applications) its use remains far from routine, and there is still a need to adapt protocols to suit specific tissues [4] or metabolites. Here we describe the MALDI-MSI methodology employed in two studies. The first one was conducted on animal tissues and the second on plant organs. In the first study, we have followed the spatial localization of the lipophylic toxin okadaic acid in *Mytilus edulis* digestive gland submitted to differential contamination with *Prorocentrum lima* (Microalga: Dinoflagelleta) (0 day, 14 and 21 days). Quantifications of okadaic acid (OA) and derivatives (DTX1 and DTX3) were done by LC-MS and show a clear difference in the contamination level (14.5µg eq OA.g⁻¹ of digestive glands after 21 days). The second study tries to describe the metabolic differences between organs of different individuals from *Cichorium intybus*.

Références bibliographiques

- [1] Zaima N. *et al*, IJMS, 2010, 11:5040-55
- [2] Caprioli R.M. *et al*, Anal Chem, 1997, 69 :4751-60
- [3] Franceschi P. *et al*, J Exp Bot, 2011, 63 :1123-33
- [4] Kaspar S. *et al*, Proteomics, 2011, doi:10.1002/pmic.201000756

Mots-clés: Metabolomic, MALDI imaging, okadaic acid, *Cichorium intybus*, *Mytilus edulis*

F3-P3

Exploration du transfert materno-fœtal des nutriments et du statut métabolique des nouveau-nés prématurés au travers d'une analyse métabolomique du sang de cordon par CL-HR-SM.

Alexandre-Gouabau MC¹, Courant F², Le Gall G³, Küster A¹, Illa Tea⁴, Darmaun D¹, Antignac J-P².

¹ INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes, France ;

² LUNAM, Oniris, USC INRA 1329 LABERCA, Nantes, France ;

³ Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UA, UK ;

⁴ EBSI, Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM), UMR 6230, CNRS–Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, F-44322 Nantes, France

La nutrition maternelle pendant la grossesse joue un rôle central dans la régulation du développement placentaire-fœtal, affectant ainsi la trajectoire de croissance foetale et le devenir du bébé. Une nutrition maternelle sous-optimale peut dès lors conduire à un petit poids de naissance, voir à une naissance prématurée (10% des naissances), avec un effet substantiel sur la morbidité à court terme du nouveau-né. Dans ce contexte, nous avons exploré les dérégulations touchant le transport nutritif materno-fœtal, pouvant conduire à un environnement délétère pour la croissance du fœtus et induire des altérations dans le statut métabolique du nouveau-né. L'approche méthodologique utilisée a été une approche métabolomique, par CL-HR-SM, à partir de prélèvements de sang maternel et de sang de cordon ombilical (tant veineux qu'artériel) prélevés lors de l'accouchement sur une cohorte de bébés nés soit à terme (n=8) soit avec un très petit poids de naissance (n=8).

Les signatures métaboliques plasmatiques des nouveau-nés ayant un petit poids de naissance sont apparues significativement différentes de celles des bébés nés à terme, de même que celles des mères de bébés prématurés versus celles des mères de bébés nés à terme. Des nutriments essentiels impliqués dans le métabolisme des carbohydrates (valine, panthothenic acid) et des lipides (dérivés acétylés de carnitine) sont en particulier apparus significativement plus abondants dans le sang ombilical veineux que le sang maternel veineux chez les bébés prématurés, traduisant ainsi un transfert materno-fœtal en faveur d'un métabolisme énergétique accru chez le nouveau-né de petit poids de naissance. En parallèle, le transfert materno-fœtal de composés impliqués dans les voies métaboliques des purines et pyrimidines (kynurenine, hypoxanthine), le développement neuronal et synaptique (glutamine), ainsi que la régulation de la prise alimentaire via la dopamine (phénylalanine et tyrosine) sont augmentés dans les cas de prématurité.

Le profilage métabolomique du sang de cordon par CL-HR-SM apparait donc comme une méthode de choix pour évaluer le statut nutritionnel et métabolique des nouveau-nés au travers du transport materno-fœtal dans l'objectif de mettre en place des stratégies de supplémentation nutritive périnatale des mères afin de limiter les risques de prématurité.

Mots-clés : métabolomique, CL-HR-SM, sang du cordon, prématurité

F4-P4

L'analyse métabolomique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour stratifier les patients atteints de diabète de type 2.

**Samia Boudah¹, Benoit Colsch¹, Etienne Thévenot², Edwige Nicodème³, Etienne Larger⁴,
Christophe Junot¹**

¹ CEA, DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM, F-91191 Gif-sur-Yvette

² CEA, DRT/LIST/LOAD, F-91191 Gif-sur-Yvette

³ Laboratoires GSK, Centre de Recherche François Hyafil, F-91140 Villebon sur Yvette

⁴ Service de Diabétologie, Hôpital Hôtel-Dieu, F-75004 Paris

Le diabète est défini par l'élévation de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie) et regroupe dans un véritable syndrome, plusieurs maladies de pathogénies différentes (trouble de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline). Dans la classification des diabètes, le diabète de type 2 (T2D) autrefois appelé diabète non-insulino-dépendant ou diabète de la maturité représente 90 à 95% des cas et n'a pourtant toujours pas de définition positive. En effet, le diagnostic est posé en l'absence des marqueurs d'autoimmunité qui caractérisent le diabète de type 1 (T1D) et en l'absence d'une autre cause de diabète. Il est admis que plusieurs maladies coexistent sous le qualificatif de diabète de type 2 d'où la nécessité d'explorer les bases biochimiques qui permettent de mieux le caractériser et d'éventuellement séparer ce groupe en plusieurs entités homogènes.

Lors d'une étude préliminaire réalisée sur les empreintes métaboliques plasmatiques et érythrocytaires de 55 sujets diabétiques admis en hôpital de jour au service de diabétologie de l'Hôtel-Dieu (18 diabétiques de type 1 « T1D », 32 diabétiques de type 2 « T2D » et 5 patients Latent Auto immune Diabetes of Adults « LADA »), nous avons démontré la pertinence de l'approche métabolomique LC-ESI-MS développée au laboratoire à discriminer des patients atteints de T1D et T2D. Plus de 500 variables plasmatiques extraites d'XC-MS étaient à l'origine de cette discrimination dont 60% sont impactées par des facteurs confondants physiologiques tels que l'âge, l'indice de masse corporelle ou l'état de la fonction rénale.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux que nous nous proposons de présenter est de développer des outils de phénotypage métabolique par spectrométrie de masse (analyse des métabolites et des lipides dans des échantillons plasmatiques et de globules rouges). Ces outils seront ensuite appliqués à des modèles animaux et des cohortes médicales afin de proposer des biomarqueurs permettant de stratifier les patients atteints de T2D.

Mots-clés : Métabolomique. LC/MS. Diabète. Plasma

F5-P5

Elucidating the strategies of females *Anopheles gambiae* complex, during dry season at Burkina Faso by metabolic fingerprinting and proteomics

Hidalgo K.¹, Wadaka M.², Mouline K.², Simard F.³, Renault D.¹

¹*Université de Rennes 1, UMR CNRS 6553 Ecobio, Rennes, France*

²*MIVEGEC, UMR IRD224-CNRS 5290-UMSF, Bobo Dioulasso, Burkina Faso*

³*MIVEGEC, UMR IRD224-CNRS5290-UMSF, Montpellier, France*

West African countries are characterized by the occurrence of two contrasted seasons: dry and wet seasons. The alternation of these two distinct seasons drives the phenology of mosquitoes' populations, and has a strong incidence on their life cycle, of which the responses are of particular interest. The comparative population dynamics of *Anopheles gambiae* complex in these regions is particularly intriguing. *Anopheles gambiae* species is subdivided in two molecular forms, *A. gambiae* M and *A. gambiae* S, which are ecologically and genetically very different. However, the mechanisms by which *A. gambiae* S and M survive to the desiccating dry season conditions in the arid savannas of Africa, and are able to readily transmit malaria as soon as the rains start, remain largely unknown. The present work examined potential strategies developed by females *Anopheles* to cope with the high seasonality of their environment, which makes them the most efficient and adaptive malaria vector system in the world. We used metabolic and proteomic fingerprints to compare, differential allocation of energy acquired at larval stages, between individuals bred in optimal condition corresponding to wet season, and individuals bred in dehydrating stressful condition equivalent to dry season. We also confronted responses between M and S form in order to understand the discrepancy between populations dynamics observed. Our results revealed specific adaptive responses to dehydrating environment between M and S species, as cuticle adjustments and aerobic activities.

F6-P6

Production of 3,5-di-O-cafeoylquinic acid by *Cichorium intybus* cell suspension culture : metabolomic study by LC-DAD, LC-ESI-MSn and gene expression monitoring by RT-PCR

Adeline Harant, Yann Guitton, Philippe Hance, Mathieu Vanderriele, Monika Morchen, Nadja Voedt, David Gagneul, Christophe Vuylsteker

*INRA USTL UMR SADV 1281, Stress Abiotiques et Différentiation des Végétaux Cultivés
Université Lille Nord de France, Lille 1, SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France*

In plants, cell suspension cultures are used to product compounds of interest and study metabolic pathways [1]. In our laboratory we have demonstrated that the ratio between 5-mono-O-cafeoylquinic acid (5CQA) and 3,5-di-O-cafeoylquinic acid (3,5diCQA) observed in Chicory roots (*Cichorium intybus* var. *sativum*) extracts is reversed in cell suspension culture initiated from Chicory roots. In the latter, 3,5diCQA contents (6.24 $\mu\text{mol/g MS}$) are 3 fold higher than 5CQA (2.05 $\mu\text{mol/g MS}$). Thus this model could give information about the biosynthetic pathway of 3,5diCQA who remained not elucidated [2]. For this purpose, we investigated conditions giving contrasting 3,5diCQA/CQA ratios by eliciting cells with methyljasmonate (MeJa), a known activator of the phenylpropanoid pathway [3].

Phenolic acids were extracted using a methanol/water/acetic acid method (75:23:2) and quantified using LC-DAD (Liquid Chromatography with Diode-Array Detection). Extracts were also analyzed by LC-ESI-MSⁿ. Mass spectrometry data were analyzed with R XCMS and in house R scripts that allows us to get more information about the evolution of other secondary metabolites in presence MeJa compared to control condition. In our kinetic study MeJa mainly enhanced chlorogenic acids contents. At 50 μM MeJa, the content of 3,5diCQA increased up to 26 fold and the content of 5CQA up to 40 fold, seven days after MeJa elicitation.

We have completed our study with a comparison of the expression levels variations of 8 genes. We have selected genes involved in metabolic pathway from phenylalanine to 5CQA (HQT, HCT, PAL1, PAL2, PAL3, C4H, C4L, C3H). For that study, the RNAs were extracted and amplified by Reverse Transcriptase PCR using home-designed primers of these 8 chicory genes and we have tried to correlate gene expression levels to metabolomic patterns.

Références bibliographiques

- [1] Kieran P. M. *et al.*, Journal of Biotechnology, 1997, 59 :39-52
- [2] Sonnante G. *et al.*, Plant Physiol, 2010, 153 :1224-38
- [3] Pauwels L. *et al.*, Trends in Plant Science, 2009, 14 :87-91

Mots-clés : Chicory, CQAs, Suspension culture, Metabolomic, Gene expression, R XCMS

F7-P7

Compositional changes of tomato seeds during development and maturation

**Cécile Cabasson^{1*}, Ousmane Harouna Koré¹, Catherine Deborde^{2*}, Mickaël Maucourt^{1*},
Annick Moing^{2*}, Dominique Rolin^{2*}, Duyen Prudhomme¹, Yves Gibon^{2*},
Jean-Jacques Bessoule^{3*}**

1- Université de Bordeaux, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, 71 avenue E. Bourloux, 33140 Villenave d'Ornon, France.

2- INRA, UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, 71 avenue Edouard Bourloux, 33140 Villenave d'Ornon, France.

3- CNRS, UMR 5200, Laboratoire de Biogenèse membranaire, Université Bordeaux Segalen, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.

* Plateforme Métabolome du Centre de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, IBVM, Centre INRA Bordeaux, 71 av Edouard Bourloux, 33140 Villenave d'Ornon, France.

Tomato pomace is the by-product of tomato processing for vegetable juice and concentrates (passata, purée, and paste). In Europe, it represents a potential amount of 4 million tons per year of bioactive molecules recoverable in human and animal food [1]. Tomato processing waste is mainly composed of seeds (60% of the total of waste) [2]. The seed quality depends of the reserve accumulation and partitioning during the seed development. However, the biology of seeds in fleshy fruit is less characterized than that of dry fruits. The present work aimed at characterizing the compositional changes of tomato seed during its development.

Mature seeds: Tomato (*Solanum lycopersicum* L., cv Ferum) plants were grown in a growth-chamber. Red ripe tomato fruits were harvested, and seeds were extracted, washed, dried under laminar flow, ground in liquid nitrogen and lyophilized. To evaluate the overall biochemical composition, metabolomic profiles were acquired by ¹H-NMR of polar or semi-polar extracts of seeds. It allowed estimating the composition of mature tomato seed in major sugars, organic acids, amino acids and other amino compounds, and phytates....

Developping seeds: Tomato cv. Ferum plants were grown in a greenhouse. Tomato fruits were harvested at 20, 30, and 40 days post-anthesis and at red ripe stage in order to determine compound accumulation kinetics in tomato seeds. The major components of primary metabolism and seed reserves were quantified using targeted analyses at different stages of seed development: enzymatic measurements of polar extracts and starch, GC-MS analysis of apolar extracts, colorimetric analysis of proteins.

The results are in general agreement with previous data obtained on tomato pomace analysis [3]. The tomato seeds composition was similar to that of sunflower with 30% proteins and 20% lipids [4]. Metabolomics is a step in research that will provide knowledge on the biology of seeds in fleshy fruit to improve crop seed quality, adapted to various used (food, animal feed, green chemistry).

Références bibliographiques

[1] European project BIOACTIVE-NET 2006/2008

[2] Schieber et al. (2001), Trends Food Sci Techno, 12: 401-413

[3] Lazos et al., Grasas Y Aceites, (1998), 49: 440-445

[4] Abdel-Rahman, Food Chem., (1982), 9: 315-318

Mots-clés: ¹H-NMR; Seed ;Tomato ; *Solanum lycopersicum*

F8-P8

Ultrafast multidimensional NMR methods for measuring isotopic enrichments in complex metabolic samples

Meerakhan Pathan, Serge Akoka, Patrick Giraudeau

Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, Nantes, France

The determination of specific ^{13}C isotopic enrichments (IE) in complex mixtures of ^{13}C -labeled metabolites is a powerful tool for studying metabolic fluxes in living systems. Existing methods rely on homonuclear 2D NMR experiments where IE are measured from ^{13}C satellites [1]. However, these methods suffer from long acquisition times, thus limiting their use as a quantitative tool for fluxomics. We designed an ensemble of methods for measuring specific ^{13}C -enrichments in a very fast and accurate way, by using experiments based on ultrafast 2D NMR [2]. This approach is capable of providing a complete 2D correlation in a single scan. A new ultrafast heteronuclear J-resolved spectroscopy strategy [3] will be presented. It is characterized by excellent analytical performances. However, ultrafast and conventional 2D methods are still limited by overlaps due to ^1H - ^{13}C splittings, thus limiting the metabolic information accessible for complex biological mixtures. To bypass this limitation, we also propose a fast 3D NMR method, UFJCOASY, which gives unambiguous access to isotopic enrichments in biological mixtures in a few minutes [4]. The principles and the analytical evaluation of these methods will be presented. The site – specific ^{13}C enrichments measurement on a model sample were found identical to those measured by 1D NMR. These methods are applied to the measurement of ^{13}C -enrichments on a biomass hydrolyzate obtained from *E. coli* cells.

Références bibliographiques

- [1] S. Massou et al., *Phytochemistry* 2007, 68, 2330.
- [2] Frydman, L. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99 : 15858-15862.
- [3] M. Pathan et al., *J. Magn. Reson.* 2012, 214, 335.
- [4] P. Giraudeau et al., submitted for publication.

Mots-clés : NMR; methodology; multidimensional NMR; ultrafast NMR; ^{13}C enrichments

F9-P9

GC-MS metabolomic at INRA-Versailles

Gilles CLEMENT

Plateau technique spécifique de chimie du végétal. INRA Versailles-Grignon

Gas Chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) metabolomic at the platform of INRA-Versailles has now reached a maturity allowing it to perform around twelve hundred vegetal samples a year using a simple-quadrupole instrument (Agilent). For the last three years, this number of samples has allowed us to gain a great confidence in the data generated by the technique. Particularly the quality of the amino acids measurements which had been challenged recently was checked by comparison with ion-exchange chromatography followed by online ninhydrin reaction (JEOL). The values obtained by the two methods were very close for most of the amino acids and prompted us to make a quantitative evaluation of the contents in amino acids determined by GC-MS by a one point external calibration. The significance of the contents in amino-acids was further verified by using several mutants and several diurnal or environmental conditions and specific amino-acids always varied in the expected way: for example glycine content was high in light and close to zero in the night, glutamine and asparagine varied with nitrate nutrition coherently and an *Arabidopsis thaliana* mutant overexpressing tryptophan had indeed an higher content in tryptophan. We now make for 75 metabolites the same quantitative evaluation and we found expected pattern of variations for other types of metabolites such as organic acids, sugars, polyols, sterols also. For *Arabidopsis thaliana* certain metabolites such as raffinose, proline or stigmasterol are very responsive to different kinds of stress but often very strong genotypes associated with a drastic environmental stress are needed to get clear answers to biological functions. Nevertheless GC-MS profiling is now a very useful tool at the Versailles INRA center.

Références bibliographiques

- Mutations in the Arabidopsis Homolog of LST8/G β L, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days.
- Moreau M, Azzopardi M, Clément G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Taconnat L, Renou JP, Robaglia C, Meyer C., Plant Cell. 2012 Feb;24(2):463-81. Epub 2012 Feb 3. PMID: 2230785 [PubMed - in process]
- An Arabidopsis mutant disrupted in ASN2 encoding asparagine synthetase 2 exhibits low salt stress tolerance. Maaroufi-Dguimi H, Debouba M, Gaufichon L, Clément G, Gouia H, Hajjaji A, Suzuki A. Plant Physiol Biochem. 2011 Jun;49(6):623-8. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21478030 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Mots-clés : GC-MS, simple-quadrupole, *Arabidopsis thaliana*, metabolites

F10-P10

A Batch Profiling Correction Strategy for Robust NMR Metabonomic Data Analysis

Anne Fages¹, Pietro Ferrari², Claire Lopez¹, Mazda Jenab², Cécile Vercherat³, Martine Cordier-Bussat³, Bénédicte Elena-Herrmann¹

¹ *Université de Lyon (CNRS/ENS Lyon/UCB Lyon 1), Institut des Sciences Analytiques, Centre de RMN à très hauts champs, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.*

² *International Agency for Research in Cancer (IARC-WHO), 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France.*

³ *Inserm, U1052, CRCL team4, Faculté de médecine RTH Laennec, 7-11 rue Guillaume Paradin, Lyon, F-69372 France ; Univ Claude Bernard, Lyon1, LYON, F-69372 France.
Contact: anne.fages@ens-lyon.fr*

Metabonomic investigations aim at identifying variations among biological samples for biomarker discovery or sample classification. In the context of molecular epidemiology, these approaches can potentially provide valuable insight for the diagnosis, prognosis or etiology exploration of various diseases. A range of large-scale epidemiological initiatives has recently illustrated the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) metabonomic studies for such purposes. NMR is a well suited, robust and a non-destructive analytical method, for high-throughput acquisition of metabolic fingerprints in biofluids.

Large-scale epidemiological studies require the use of quality control standards and methods to assess the stability and reproducibility of the analytical protocol over time. While spectral acquisition for hundreds or thousands of samples can take place over periods of weeks to several years and possibly involved multi-site data acquisition, depending on the design of the studies, many technical factors can in fact reveal as possible sources of systematic variation (affecting the signal line shapes, spectral baseline, etc...), despite the intrinsic robustness of the NMR technique.

We propose here a simple and robust method to correct systematic variation. The grouped-batch profile correction method, originally proposed for genomics data normalization [1], can be adapted to estimate typical batch profiles by using quality control reference samples and remove inter-batch variability among large datasets. A cohort of 620 serum samples from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) initiative was used to illustrate the approach. 800 MHz ¹H NMR (NOESY and CPMG) spectral profiles for the individual EPIC serum samples as well as 33 additional quality control serum samples were included in this analysis.

We also show that this method can be more generally exploited to compensate observable biological batches effects in the context of high-resolution magic-angle spinning (HR-MAS) NMR studies of model systems, such as mammalian cell lines, and enhance the subsequent predictivity of multivariate statistical modeling.

Référence bibliographique

1. Chu T.M. et al., Batch effects and noise in microarray experiments: Sources and solutions, 2009.

Mots-clés: Metabonomics, NMR, epidemiological studies, systematic variations

F11-P11

Etude de l'influence des corps gras chauffés sur les processus métaboliques chez le porc par une approche multi-plateforme LC/MS et RMN

Christophe Thibaudeau¹, Guilhem Sivadier², Jean-François Martin², Marie-Lagree¹, Corinne Pouyet², Robert Ringseis³, Bruno Combourieu⁴, Estelle Pujos-Guillot², Jean-Louis Sebedio²

1 UBP - UFR Sciences, ICCF-UMR6296, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, F-63171 Aubière, France

2 INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, F-63122, Saint Genès Champanelle, France, and Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000, Clermont-Ferrand, France

3 Institute of Animal Nutrition and Nutrition Physiology, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35392 Gießen, Allemagne

4 UCB- Lyon 1, Laboratoire d'Ecologie Microbienne et Centre d'Etude des Substances Naturelles, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, VetAgroSup, 69100 Villeurbanne, France

Dans les pays industrialisés, la contribution des corps gras chauffés à l'apport énergétique alimentaire a beaucoup augmenté du fait d'une consommation croissante d'aliments frits. Des études sur des modèles animaux ont révélé que l'ingestion de corps gras chauffés, tels que des huiles de friture, provoquent de multiples effets biologiques dont un stress oxydant et des modifications du métabolisme lipidique. Cependant les études publiées à ce jour ont été réalisées sur des modèles pas très adaptés à la nutrition humaine et concernaient des fractions isolées à partir de corps gras chauffés.

Afin d'avoir une vue plus globale de l'effet de la consommation de corps gras ayant subis des traitements thermiques, nous avons à l'aide d'une étude métabolomique multi-plateformes LC-MS et RMN, combinant des approches ouvertes et semi-ciblées évalué l'influence de l'ingestion d'huiles de colza et de tournesol haut oléique chauffées ou non, sur les processus métaboliques chez le porc par un suivi cinétique durant 4 semaines.

Une méthodologie de screening plasmatique des phospholipides a été mise au point par LC/MS/MS permettant le suivi des principales classes de composés (PC, PE, PI, PS, SM, lyso PC, lyso PE, formes oxydées). En parallèle, une approche non ciblée a été développée par spectroscopie RMN HRMAS sur des échantillons de tissus intacts (foie, muscle, tissu adipeux et aorte). Ces analyses ont été complétées par la détermination des profils métaboliques des biofluides (plasma, urine) par LC/QToF et RMN liquide haute résolution à très haut champ.

Nos études ont révélé une modulation de l'effet du chauffage sur les profils métaboliques obtenus, en fonction du type d'huiles (degré d'insaturation) en particulier pour le plasma et l'urine alors que les profils métaboliques des organes semblent moins ou peu modifiés. Différentes corrélations ont également été recherchées afin de déterminer les mécanismes mis en jeu.

Mots-clés : métabolomique, nutrition, LC-MS, RMN

Communications Posters

P12

Comment des signaux macroévolutifs et des réponses actuelles des plantes à l'environnement peuvent-ils coexister? La réponse du métabolome

Hennion F.1, Hermant M.1,2, Bouchereau A.3, Gauthier C.1, Litrico I.4, et Prinzing A.1

1UMR 6553 Ecobio, Université de Rennes 1, CNRS, Av du Général Leclerc, 35042 Rennes, francoise.hennion@univ-rennes1.fr; 2FRE CNRS 3268, GEPV, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq; 3UMR 118 INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, Av du Général Leclerc, 35042 Rennes; 4Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, INRA, Centre Poitou-Charentes, Lusignan

Chez les plantes, le métabolome est connu à la fois pour sa flexibilité de réponse à l'environnement et pour sa spécificité taxinomique. Cependant, les modalités selon lesquelles flexibilité écologique et background macroévolutif peuvent coexister au sein des métabolomes des espèces restent inconnus. Peut-on observer ces deux déterminants du métabolome chez les espèces dans leurs environnements actuels? En outre, on peut se demander si les caractéristiques du métabolome d'une espèce sont influencées par sa biogéographie ou sa valence écologique. Pour résoudre ces questions, nous avons étudié la variabilité de réponse du métabolome à des facteurs abiotiques (altitude, eau, salinité) et/ou biotiques (proximité phylogénétique, diversité spécifique et/ou fonctionnelle de la communauté environnante). La réponse à des facteurs abiotiques a été abordée aux îles subantarctiques de Kerguelen chez des espèces prélevées simultanément dans des conditions abiotiques contrastées. Les compositions en amines de toutes les espèces, même présentes dans le même environnement, sont significativement différentes. Les différences reflètent la position phylogénétique des taxons. De plus, quelle que soit l'espèce, le métabolisme des amines est corrélé avec le type d'environnement abiotique. Ainsi, les compositions des taxons changent de façon similaire entre les environnements, au-delà des compositions spécifiques. Pour la question sur la différenciation microévolutive du métabolisme en réponse aux contraintes biotiques, nous avons étudié les variations du phénotype biochimique de l'espèce *Dactylis glomerata* cultivée en communautés contrôlées dans l'expérience « Biodiversité » de Jena. Ici, la composition en amines répond plutôt à l'identité des espèces voisines qu'à la diversité de la communauté. Les résultats montrent comment la flexibilité écologique d'un métabolisme est rendue possible malgré le conservatisme phylogénétique par des changements relatifs similaires des compositions des espèces dans un environnement différent, ce malgré les différences interspécifiques absolues. Ces résultats indiquent des mécanismes possibles de l'adaptation du métabolisme des plantes aux changements climatiques et biotiques.

Mots-clés : métabolome, amine aliphatique, amine aromatique, flexibilité écologique, environnement abiotique, environnement biotique, phylogénie, conservatisme phylogénétique, adaptation du métabolisme, communauté végétale, îles subantarctiques de Kerguelen, expérience Biodiversité de Jena

P13

Mise en évidence et identification par une approche de type métabolomique de sous-produits de perturbateurs endocriniens formés lors de procédés de traitement des eaux potables

Marc Bourgin¹, Gaël Gervais¹, Emmanuelle Bichon¹, Jean-Philippe Antignac^{1,2}, Fabrice Monteau¹, Gaëla Leroy³, Laurianne Barritaud³, Mathilde Chachignon³, Valérie Ingrand³, Pascal Roche⁴, Bruno Le Bizec¹

1LUNAM Université, Oniris, LABERCA, Nantes; 2INRA, Nantes, 3Veolia Environnement Recherche et Innovation, Saint Maurice, 4 Veolia Environnement Recherche et Innovation, Maisons-Laffitte

La surveillance et le contrôle des contaminants émergents de l'environnement sont deux préoccupations fortes des traités d'eau potable [1-3]. Un des critères principaux permettant d'évaluer la qualité de l'eau potable, et donc l'efficacité du traitement appliqué, est la diminution significative de la concentration de composés à activité biologique indésirable, comme les perturbateurs endocriniens [4, 5]. Cependant, l'abattement du contaminant peut induire la formation de sous-produits dont le risque chimique mérite également d'être évalué [6, 7]. Les études décrites dans la littérature pour mettre en évidence ce type de sous-produits ont généralement été réalisées en condition de laboratoire, i.e. à des niveaux de concentration élevés (de l'ordre du mg/L) et dans des milieux de réaction simplifiés (eau ultrapure ou tamponnée), donc par définition assez éloignées des conditions réelles rencontrées en usine de traitement où des espèces inorganiques mineures mais réactives sont également présentes dans le milieu.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a été de mettre en évidence, en conditions réelles, les éventuels sous-produits d'ozonation et de chloration de trois perturbateurs endocriniens modèles, à savoir l'éthinylestradiol EE2, l'estrone-sulfate E1-3S et le bisphénol A BPA.

Pour cela, des échantillons d'eaux collectées en sortie d'usine de traitement ont été supplémentés en BPA (50 µg/L), en E1-3S (50 µg/L) ou en EE2 (5 µg/L) avant de réaliser soit une chloration (par ajout d'hypochlorite de sodium pendant 120 min, concentration en chlore de 0,8 mg/L), soit une ozonation (1 mg/L, 10 min de temps de contact) [8]. Les échantillons (250-500 mL) ont été pré-concentrés par RP-SPE et les extraits ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution (LC-HRMS) de type Orbitrap. Une analyse ciblée des composés parents a tout d'abord montré un fort abattement des molécules parents après 10 min de traitement (respectivement 97 % et 99 % après chloration pour l'EE2 et le BPA et 80 % après ozonation de l'E1-3S).

Une approche de profilage chimique différentiel de type métabolomique a ensuite été envisagée pour révéler les sous-produits formés [9]. Celle-ci consiste à comparer ces profils globaux et non ciblés, acquis par couplage LC-HRMS, entre un premier groupe d'échantillons d'eau contenant le composé parent et ayant subi un traitement et un second groupe contenant (i) des échantillons non dopés et non traités, (ii) des échantillons dopés et non traités et (iii) des échantillons non dopés et traités.

Les données brutes générées ont été pré-traitées par le logiciel XCMS. Une liste de signaux discriminants les deux groupes (ions caractérisés par un temps de rétention et une masse exacte donnée) a alors été dressée. Après contrôle des chromatogrammes d'ions extraits et application d'un ensemble de critères de sélection, une liste de sous-produits de dégradation a été établie pour chaque composé parent, réunissant respectivement 8, 21 et 11 sous-produits pour l'EE2, le BPA et l'E1-3S. La précision en masse ($R=30\,000$) a permis de proposer une formule brute pour chacun des composés formés. L'approche utilisée a notamment permis de mettre évidence la formation de sous-produits encore jamais reportés dans la littérature, ce qui a permis de démontrer l'intérêt de cette approche pour révéler des sous-produits de traitement. Par ailleurs, une élucidation structurale par (HR)MSn a été réalisée et une structure chimique a pu être proposée pour la plupart des composés mis en évidence. Une approche de type métabolomique est donc apparue pertinente pour la mise en évidence de sous-produits formés dans des conditions de traitement réelles.

Références bibliographiques

- [1] Kolpin, D.W. et al., *Environmental Science & Technology*, 2002, 36: 1202-1211.
- [2] Richardson, S.D., Ternes, T.A., *Analytical Chemistry*, 2011, 83: 4614-4648.
- [3] Daughton, C.G., Ternes, T.A., *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107: 907-938.
- [4] Cargouët, M. et al., *Science of The Total Environment*, 2004, 324: 55-66.
- [5] Snyder, S.A., *Ozone: Science & Engineering*, 2008, 30: 65-69.
- [6] Alum, A. et al., *Environmental Toxicology*, 2004, 19: 257-264.
- [7] Ning, B. et al., *Ozone: Science & Engineering*, 2007, 29: 153 - 176.
- [8] Roche, P. et al., *Ozone: Science & Engineering*, 1994, 16: 135-155.
- [9] Antignac, J.P. et al., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30: 292-301.

Mots-clés : Traitement des eaux; Perturbateurs endocriniens; LC-HRMS; Identification des sous-produits

P14

The importance of peak annotation and structure elucidation in LC-MS based metabolomic experiments – background metabolic profile of HepaRG cells

Mathilde Bossis, Hubert Chassaing, Fabiano Reniero, Claude Guillou

*European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Systems Toxicology Unit,
Via Enrico Fermi 2749, I-21027 Ispra, Italy*

In-vitro models are essential as an alternative to animal testing in toxicological studies. A variety of in vitro models have been developed and the static cell culture is the most commonly used system. The cell line HepaRG is used in investigating chemical metabolism and hepatotoxicity. A first challenge for such a study is to obtain a reliable and repeatable background metabolic fingerprinting (without chemical exposure) of the cellular model examined.

Bile acids, almost exclusively produced by hepatocytes, are amphipathic molecules with a steroid backbone that are synthesised from cholesterol. Several biochemical pathways, catalysed by enzymes localised in different cellular compartments, are necessary to convert water-insoluble cholesterol molecules into water-soluble bile acids. When intracellular bile acids concentrations are elevated, likely due to a perturbation, bile acids may become cytotoxic for hepatocytes (cholestasis).

In this context, bile acids may be indicators of the cellular behaviour before and after exposure to chemicals. In this work, untreated cells are used to establish the baseline metabolic profile of differentiated HepaRG cells. At different time points cells are collected and intra-cellular metabolites are extracted. Cell culture medium is also sampled to monitor the release of metabolites from the cells.

Both cell extract containing intracellular metabolites and culture medium are subjected to LC-MS analysis. The multi-analyte analytical technique is based on the use of the Q-TOF Premier (Waters, Manchester, UK) and the LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, MA, USA) mass spectrometers coupled to LC separation. An objective of the study is to find chemically relevant information out of large raw LC-MS datasets.

The purpose of data processing is to convert raw spectra into a data matrix suitable for statistical analyses. LC-MS data processing is performed using XCMS [1]. The obtained peak intensity table is organised in a matrix whose columns correspond to samples and rows to a sample feature (peak). As a first filter, peak intensity tables are annotated for isotopes and potential adducts using the Camera package [2].

The aim of metabolic profiling is the correct annotation and identification metabolites obtained from a large datasets. Massive peak annotation with MS (using publicly available database) - which means to assign a chemical name to all peaks - is still far from becoming reality. The number of unknown compounds is so large and the concentration range covers 3-4 orders of magnitudes so that a correct annotation based on the exact mass only is not realistic. The name and chemical formula must be obtained by experiment and multiple matching factors like the exact mass, isotopic profile, and often MS/MS fragmentation spectra for structure elucidation.

MassBank is a public repository of mass spectra of small chemical compounds [3]. One of the most important applications in the life sciences is metabolite identification. In our work, standards of major bile acids (glycocholic, taurocholic, cholic and chenodeoxycholic acids) have been characterised by MS/MS (in ESI+ and ESI- modes, using different collision-induced dissociation conditions) and data have been imported on our MassBank server.

The main functions tested in MassBank are the following ones:

- to use the Mass++ programme to directly import mass spectra data of two instruments in the MassBank record format and deposit the formatted data on our own MassBank data server.

- Peak Search to retrieve MS/MS data identical or similar to the data obtained (m/z values within a specified error tolerance) for bile acids. The search results are returned with a score indicating the order of the similarity between the two spectra to be compared.

Initial MS results would indicate the presence of glycocholic and taurocholic acids in HepaRG medium (in low concentration with regard to the most abundant compounds, factor of 300 to 1500) whereas only glycocholic acid is detected in cell extract (factor of 5000). For glycocholic acid, the protonated form is observed while for taurocholic acid, the sodium adduct and a pseudo-molecular ion (after loss of 2H₂O) are detected. Results would need to be confirmed by MS/MS fragmentation data for further identification and matching of MS/MS spectra to database.

Références bibliographiques

- [1] Smith C.A. et al., XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification, *Anal. Chem.*, 2006, 78:779–787. Web access: <http://metlin.scripps.edu/xcms/index.php>
- [2] Kuhl C. et al., CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets, *Anal. Chem.*, 2012, 84:283–289.
- [3] Horai H. et al., MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences, *J. Mass Spectrom.*, 2010, 45:703-714. Web access: <http://www.massbank.jp>

Mots-clés: LC-MS based metabolomics, HepaRG cells, bile acids, peak annotation, structure elucidation, MassBank

P15

La métabolomique : un outil au service du lien entre environnement et santé ?

Frédérique Courant 1, Sabine Sévère 1,2, Jean-Philippe Antignac 1,3, Philippe Marchand 1, Floriane Morio 2, Fabrice Monteau 1, Jérôme Abadie 2 et Bruno Le Bizec 1

1 LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France.

2 LUNAM Université, Oniris, Cancers animaux, modèles pour la recherche en oncologie comparée (AMaROC) Nantes, F-44307, France

3 INRA, Nantes, F-44307, France

laberca@oniris-nantes.fr

Le Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) est une Unité de recherche de l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (Oniris), labellisée par la Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (DGER, MAAP) et l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, département AlimH). Du point de vue scientifique, le domaine d'activité général de l'Unité est celui de la sécurité chimique de l'aliment, et s'inscrit dans une démarche globale et intégrée d'appréciation du risque, depuis l'agrofourmiture jusqu'à l'Homme et sa descendance. Le LABERCA s'attache en effet à générer des données et des connaissances relatives aux sources, transfert et métabolisme des composés étudiés, afin de caractériser à la fois l'exposition (occurrence dans les denrées) et l'imprégnation (occurrence dans les fluides et tissus biologiques) des consommateurs vis-à-vis de ces polluants chimiques. Parallèlement aux approches conventionnelles et historiques de type ciblées développées et appliquées au sein de l'unité depuis sa création, le LABERCA a également concentré ses efforts de recherche vers le développement et la mise en œuvre de nouvelles méthodologies plus globales telle que la métabolomique. Essentiellement basées sur une stratégie différentielle (comparative), ces approches visent à caractériser les bouleversements biologiques survenant suite à une exposition à un polluant chimique et/ou révéler de nouveaux marqueurs d'exposition et/ou d'effet associés à ces polluants. Cette démarche a été validée pour mettre en évidence l'usage d'hormones de croissance chez les animaux de production et de compétition. Indépendamment, elle a également démontré sa faisabilité afin d'évaluer les perturbations métaboliques du système endocrinien signant des anomalies de développement et de reproduction chez l'homme (qualité spermatique, cancer des testicules). Elle sera prochainement utilisée afin d'étudier l'impact de l'environnement sur l'incidence des cancers chez le modèle chien. L'objectif sera de mettre en évidence des biomarqueurs sanguins corrélés à une empreinte de l'environnement et à des perturbations physiologiques liées au développement du cancer. Les résultats attendus seront considérés afin d'envisager la faisabilité d'un nouveau modèle de recherche à visée cognitive et prédictive des effets des contaminants chimiques sur l'apparition du cancer, dans une perspective d'oncologie comparée avec l'homme.

Mots-clés : Métabolomique Santé Environnement

P16

Profiling of tannins, flavonoids and hydroxycinnamic esters in the fruits of a cider apple progeny

Nathalie Marnet¹, Nicolas Childebrand², Gildas Le Bail¹, Alexandra Leroux¹, Romain Mabon¹, Camille Baron¹, Jean-Michel Le Quéré¹, Cindy Verdu², François Laurens², Yves Lespinasse², Sylvain Guyot¹.

*1 INRA, UR117 Recherches Cidricoles et Biotransformation des Fruits et Légumes, F-35653 Le Rheu
2 INRA, UMR1259 Génétique et Horticulture, BP 60057, F-49071 Beaucozézé.*

Polyphenols are well-known secondary metabolites significantly present in apples. These compounds are generally highly concentrated in cider apple cultivars [1]. They are largely responsible for major organoleptic qualities of French ciders including colour, bitterness, astringency and shelf-life. In addition, polyphenols may have some positive nutritional effects. Apple polyphenols are divided into six classes, namely hydroxycinnamic esters, catechins, dihydrochalcones, flavonols, anthocyanins and tannins (i.e. procyanidins oligomers and polymers). Many data have been published concerning the polyphenols composition of dessert and cider apple varieties. However, as far as we know, the genetic variability of polyphenols in fruits resulting from an apple progeny has never been described to date. The presented work was included in the INNOVACIDRE program that aims to the development and the evaluation of new cider apple varieties.

The qualitative and quantitative polyphenol composition was investigated in the fruits of 218 individuals descending from a single progeny P3R16A46 x P35R14A1 that included the cider variety Kermerrien as one of the grand fathers. The sampling of the fruits was carefully carried out to avoid intra-individual variability and a batch of individuals was analysed for two successive years. Polyphenol profiling was performed by HPLC coupled to diode array UV-visible detection. Simple phenolics were analysed after classical acidified methanol extraction. In addition, acidic depolymerisation of tannins in the presence of phloroglucinol was used prior to HPLC analysis for the accurate quantification and characterisation of the tannins including the average degree of polymerisation (aDP) and nature of the constitutive catechins units. A total of 1676 HPLC analyses were performed over three years.

A series of 16 phenolic compounds were identified and quantified. The statistical processing of the data reveals the great genetic variability of polyphenols in the progeny with some phenolic compounds varying of a 10-20 concentration factor depending on the individuals. Procyanidins were generally the major polyphenols class in individuals with concentrations varying from 2.3 to 18,4 g/kg MS and aDP varying from 2.8 to 9.5. Then, hydroxycinnamic esters were the second class of importance in term of concentration. Caffeoylquinic acid varied from 0.5 to 7.9 g/kg MS. The intra-individual variability of polyphenols from one year to another was in the 20-40 % range.

This database will be further used to identify QTLs involved in the biosynthetic control of polyphenols in apple and will be also useful to explore possible correlations between polyphenols and other phenotypic characters.

Acknowledgement : We thank the “Pôle Agronomique Ouest” for their contribution to the management of the INNOVACIDRE program (2008-2011).and the regions Bretagne, Basse-Normandie and Pays de la Loire for their financial support.

[1] Sanoner, P., Guyot S., et al. J. Agric. Food Chem. 1999, 47:4847-4853.

P17

Non targeted LC-MS/NMR exploration for urinary biomarkers related to nitrogen utilization efficient in dairy cows

H. Boudra^a, J.F. Martin^b, M. Traikia^c, C. Jousse^c, E. Pujos-Guillot^b & D. P. Morgavi^a

a INRA, UMRH1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

b INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

c ICCF, UMR 6296, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, F-63171 Aubière, France.

For ruminant nutrition, there is a need to characterise the use of dietary nitrogen (N) to ensure that it is used at maximum efficiency for production and to minimise losses through excretion which contribute to water and air pollution. The excess, deficiencies and utilisation of dietary N by the animal affect its metabolism and, in this context, a metabolomic approach may be a strategy for discovering markers of N use efficiency.

A hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy (LC-MS/NMR) were developed to simultaneously measure metabolic profiles in dairy cows urine. The aim of this study was to compare spot versus total urine collection as the most adequate sampling technique for discriminating the metabolome and, potentially, for finding new biomarkers. Urine samples were collected from dairy cows fed two different levels of N with starch or fibre as the main energy source in a 4×4 Latin square design.

Multivariate data analysis showed that metabolic profiles were strongly influenced by sampling with only 24% of significant ions common to both sampling techniques. Total collection seemed better than spot to discriminate diets as quantitative criteria such as number of discriminant ions was higher and the quality of the predictive parameter Q² for partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) was better (0.68 vs 0.57). However, this result needs to be corroborated based on markers identification.

For both NMR and MS data, PLS-DA models showed a grouping of the four different diets in both sampling techniques, but with no clear separation between N diets (high vs low). However, data allowed a better distinction between contrasting dietary treatments: high N-Starch vs low N-Fiber and high N-Fiber vs low N-Starch. More than fifty marker candidates with a variable importance plot (VIP >1) could be ascribed to diet discrimination. Some of the most discriminating were confirmed by NMR 2D and assigned as lactate, pyruvate, phenylalanine and hippurate. Identification of MS markers is in its final step; it is based on accurate mass and mass spectral fragmentations that are produced by a high-resolution MS.

Mots-clés : LC-MS/NMR; Ruminant nutrition; environmental pollution; markers for nitrogen use; urine

P18

Etude du métabolisme de *Daphnia magna* soumise à un stress par RMN HRMAS du proton

Blondel CE.¹⁻², Fauvelle F.¹, Fouqueray M.², Garric J.²

1 : IRBA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées), Unité Rayonnements Non Ionisants.
2 : 38702 La Tronche. 2 : IRSTEA (Cemagref), Laboratoire d'écotoxicologie, 69336 Lyon.

Contexte : La biodiversité des écosystèmes aquatiques est menacée par la pollution de l'eau. Bien souvent, il s'agit de faibles doses de toxiques rendant l'évaluation du risque délicate.

Objectif : Le but de cette étude est d'évaluer la capacité de la métabolomique par RMN HRMAS d'organismes entiers à décrire les réponses physiologiques des individus soumis à un stress. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à *Daphnia magna*, organisme sentinelle classiquement utilisé en écotoxicologie. Deux xénobiotiques : Le cadmium et le propranolol, dont les effets métaboliques sur la daphnie ont déjà été étudiés par d'autres méthodes analytiques [1,2], ont été sélectionnés.

Parallèlement, l'impact du jeûne, auquel sont soumis les organismes lors des tests à court terme (OCDE N° 202) a aussi été évalué.

Méthodes : Des tests de toxicité aiguë (48h) ont été réalisés sur des daphnies néonates (moins de 24h) afin de déterminer la CE50 (Concentration Efficace immobilisant 50% des individus). Puis des organismes juvéniles (5j) et adultes (14j) de plus grande taille (permettant l'analyse RMN individuelle) ont été exposés 48h à des doses croissantes non létales (CE8 à CE20). Les daphnies ont été congelées rapidement à l'azote liquide puis analysées par RMN HRMAS proton 1D à 400MHz. Les spectres obtenus ont été segmentés et des statistiques multivariées de type ACP et PLS-DA ont été réalisées avec le logiciel SIMCA v12.

Résultats : Comme déjà observé *in vivo* [3], les spectres RMN proton de daphnies sont essentiellement constitués de pics lipidiques. Cependant, dans la zone spectrale 0.7-0.9 ppm, contenant les groupements méthyls terminaux des acides gras, deux doublets non identifiés ont été détectés, indépendamment de la présence ou non du xénobiotique. L'analyse statistique multivariée réalisée à partir des données RMN n'a pas permis de séparer les individus intoxiqués des témoins, alors que le manque de nourriture affecte clairement le profil lipidique des organismes.

Conclusion : La RMN HRMAS a permis de mettre en évidence l'effet d'un jeûne de courte durée sur les réserves lipidiques de la daphnie. Aucun effet additionnel n'a été mis en évidence suite aux expositions par les contaminants utilisés. Ces résultats montrent la limite de la méthodologie pour les stress jouant sur les réserves lipidiques, et mettent en évidence l'impact des conditions d'exposition pour l'analyse RMN.

Références bibliographiques

- [1] Taylor N et al., *Metabolomics*, 2009, 5(1): 44-58.
- [2] Taylor N et al., *Toxicol.Sci*, 2010, 118(1): 307-17.
- [3] Bunescu A et al., *Mol.BioSyst.*, 2009 ,6(1): 121-5.

Mots-clés : *Daphnia magna*, RMN HRMAS 1H, Métabolomique, Cadmium, Propranolol

P19

Stratégie de mesure non ciblée de type métabolomique (couplage LC-HRMS) pour identifier différents groupes de composés bioactifs accumulés dans les mollusques bivalves.

F. Mondeguer¹, Jean-Philippe Antignac², Yann Guitton³, Fabrice Monteau², Sabrina Le Borgne², P. Hess¹

Une première étude de faisabilité conduite en collaboration avec les Laboratoires LABERCA (Oniris) et PHYCOTOXINES (Ifremer) a permis de caractériser une toxicité atypique (crise sanitaire 2006) observée sur des échantillons d'huîtres du bassin d'Arcachon, par une approche analytique basée sur le couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Cette approche de mesures non ciblées a clairement démontré la possibilité de différencier des échantillons non toxiques des échantillons toxiques sur la base de leur profil métabolique global et de révéler des signaux spectrométriques plus particulièrement impliqués dans cette différenciation. La seconde partie de notre étude a eu pour objectif de différencier quels groupes de composés bioactifs pourraient s'accumuler dans des mollusques bivalves, en considérant en considérant cette fois les aspects quantitatifs et sanitaires et, pour la première fois, en analysant les effets sur la bioactivité des biotransformations ou de la métabolisation relevant de l'accumulation des phycotoxines dans les glandes digestives de ces bivalves filtreurs. En effet si l'exploration de la bioactivité des toxines naturelles phytoplanctoniques, accumulées dans les coquillages est presque systématiquement testée sur animal de laboratoire (souris), la capacité de ce test à expliquer la nature de cette bioactivité reste limitée. De fait le contrôle sanitaire est actuellement basé sur une méthode d'identification et de quantification des toxines connues par LC - MS/MS. Mais cette méthode ne permet pas de détecter des toxines encore inconnues. Nous avons donc poursuivi notre stratégie de traitement de donnée (XCMS -Bioconductor version 2.13.2) sur un autre sous ensemble de la surveillance sanitaire, soit le suivi d'extraits de moules issues du bassin d'Arcachon (2009-2010) liés au dépistage des toxines lipophiles dans des coquillages. Le but étant d'obtenir une aide à l'identification de substances toxiques inconnues à partir de cette nouvelle série d'échantillons, qui avait montré une toxicité positive chez la souris, sans que les substances connues pour être potentiellement responsables de cet effet toxique n'aient été dosées en quantité suffisantes. Les premiers résultats obtenus donnent un nouvel éclairage aux phénomènes toxiques de type atypique en révélant l'existence inattendue d'ions discriminants très marqués, signature des échantillons non toxiques, qu'il nous faudra confirmer.

Une première étude de faisabilité conduite en collaboration avec les Laboratoires LABERCA (Oniris) et PHYCOTOXINES (Ifremer) a permis de caractériser une toxicité atypique (crise sanitaire 2006) observée sur des échantillons d'huîtres du bassin d'Arcachon, par une approche analytique basée sur le couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Cette approche de mesures non ciblées a clairement démontré la possibilité de différencier des échantillons non toxiques des échantillons toxiques sur la base de leur profil métabolique global et de révéler des signaux spectrométriques plus particulièrement impliqués dans cette différenciation. La seconde partie de notre étude a eu pour objectif de différencier quels groupes de composés bioactifs pourraient s'accumuler dans des mollusques bivalves, en considérant en considérant cette fois les aspects quantitatifs et sanitaires et, pour la première fois, en analysant les effets sur la bioactivité des biotransformations ou de la métabolisation relevant de l'accumulation des phycotoxines dans les glandes digestives de ces bivalves filtreurs. En effet si l'exploration de la bioactivité des toxines naturelles phytoplanctoniques, accumulées dans les coquillages est presque systématiquement testée sur animal de laboratoire (souris), la capacité de ce test à expliquer la nature de cette bioactivité reste limitée. De fait le contrôle sanitaire est actuellement basé sur une méthode d'identification et de quantification des toxines connues par LC - MS/MS. Mais cette méthode ne permet pas de détecter des toxines encore inconnues. Nous avons donc poursuivi notre stratégie de traitement de donnée (XCMS -Bioconductor version 2.13.2) sur un autre sous ensemble de la surveillance sanitaire, soit le suivi d'extraits de moules issues du bassin d'Arcachon (2009-2010) liés au dépistage des toxines lipophiles dans des coquillages. Le but étant d'obtenir une aide à l'identification de substances toxiques inconnues à partir de

cette nouvelle série d'échantillons, qui avait montré une toxicité positive chez la souris, sans que les substances connues pour être potentiellement responsables de cet effet toxique n'aient été dosées en quantité suffisantes. Les premiers résultats obtenus donnent un nouvel éclairage aux phénomènes toxiques de type atypique en révélant l'existence inattendue d'ions discriminants très marqués, signature des échantillons non toxiques, qu'il nous faudra confirmer.

Références bibliographiques

1. Antignac, J.P., F. Mondeguer, F. Monteau, Z. Amzil, B. Le Bizec, and Development and application of a metabolomic approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry as new screening tool for assessing toxicity in oysters. in 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. 2009. Nantes, France.
2. Fux, E., D. McMillan, R. Bire, and P. Hess, Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1157(1-2):273-280.10.1016/j.chroma.2007.05.016
3. Hess, P., Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. 397(5):1683-1694.10.1007/s00216-009-3444-y
4. Rossini, G.P. and P. Hess, Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, A. Luch, Editor. 2010, Birkhäuser Basel. p. 65-122.
5. Osek, J., K. Wiczorek, and M. Tatarczak, Seafood as potential source of poisoning by marine biotoxins. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006. 62(4):370-373
6. Amzil, Z., M. Sibat, F. Royer, and V. Savar, First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish. *Toxicon*, 2008. 52(1):39-48.10.1016/j.toxicon.2008.05.006
7. Gerssen, A., P.P.J. Mulder, and J. de Boer, Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2011. 685(2):176-185.10.1016/j.aca.2010.11.036
8. These, A., C. Klemm, I. Nausch, and S. Uhlig, Results of a European interlaboratory method validation study for the quantitative determination of lipophilic marine biotoxins in raw and cooked shellfish based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I: collaborative study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. 399(3):1245-1256.10.1007/s00216-010-4383-3
9. Suzuki, T. and M.A. Quilliam, LC-MS/MS Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) Toxins, Okadaic Acid and Dinophysistoxin Analogues, and Other Lipophilic Toxins. *Analytical Sciences*, 2011. 27(6):571-584
10. Antignac, J.P., F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, C. Elliott, and B. Le Bizec, Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2011. 30(2):292-301.10.1016/j.trac.2010.11.003
11. Pinel, G., S. Weigel, J.P. Antignac, M.H. Mooney, C. Elliott, M.W.F. Nielen, and B. Le Bizec, Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2010. 29(11):1269-1280.10.1016/j.trac.2010.06.010
12. Roux, A., Analyse du métabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. 2011, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI: Paris. p. 153.
13. Rew, R. and G. Davis, NETCDF - AN INTERFACE FOR SCIENTIFIC-DATA ACCESS. *Ieee Computer Graphics and Applications*, 1990. 10(4):76-82.10.1109/38.56302
14. Pedrioli, P.G.A., J.K. Eng, R. Hubley, M. Vogelzang, E.W. Deutsch, B. Raught, B. Pratt, E. Nilsson, R.H. Angeletti, R. Apweiler, K. Cheung, C.E. Costello, H. Hermjakob, S. Huang, R.K. Julian, E. Kapp, M.E. McComb, S.G. Oliver, G. Omenn, N.W. Paton, R. Simpson, R. Smith, C.F. Taylor, W.M. Zhu, and R. Aebersold, A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nature Biotechnology*, 2004. 22(11):1459-1466.10.1038/nbt1031
15. CoreTeam, R.D., R: A language and environment for statistical computing, in *R Foundation for Statistical Computing*, R.F.f.S., Editor. 2008, In Computing: Vienna, Austria.
16. Roux, A., D. Lison, C. Junot, and J.-F. Heilier, Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 2011. 44(1):119-135.10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016

Mots-clés : Analyse métabolomique –spectrométrie de masse haute résolution – métabolites secondaires – biotoxines marines - traitement de donnée XCMS

P20

Impact d'une exposition maternelle à des pesticides, seuls ou en mélange, chez la souris, sur le métabolisme de la descendance par une approche métabonomique

Cécile Canlet, Marie Tremblay-Franco, Roselyne Gautier, Jérôme Molina, Florence Blas-Y-Estrada, et Laurence Gamet-Payraastre

INRA, UMR 1331 Toxalim, 180 Chemin de Tournefeuille BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3

La présence des pesticides dans l'environnement et l'alimentation pose aujourd'hui un problème de santé publique puisque ces composés sont soupçonnés d'exercer des effets nocifs sur la santé humaine.

L'objectif des travaux présentés est d'étudier chez la souris l'impact d'une exposition alimentaire à long terme à de faibles doses de pesticides (Atrazine, Chlorpyrifos et Endosulfan) seuls ou en mélange, sur le métabolisme plasmatique, hépatique et au niveau du cerveau en utilisant une approche globale sans a priori : la métabonomique par RMN du proton.

Les souris ont été exposées via l'alimentation à l'atrazine, au chlorpyrifos, à l'endosulfan et au mélange des 3 pesticides à des doses correspondant à la Dose Journalière Admissible définie chez l'homme dès l'accouplement et pendant toute la durée de la gestation et de la lactation. Après le sevrage, les souriceaux sont alimentés pendant une période additionnelle de 11 semaines avec l'aliment reçu par leur mère respective. A l'euthanasie le plasma, le foie et le cerveau sont récupérés pour les analyses en RMN du proton à la fréquence de 600 MHz.

Les analyses PLS-DA obtenues à partir des spectres RMN de plasma, de foie et de cerveau des souris âgées de 14 semaines exposées ou non avec de l'atrazine, endosulfan, chlorpyrifos ou le mélange des trois pesticides montrent clairement des empreintes métaboliques spécifiques du traitement et du sexe des souriceaux.

En conclusion, l'exposition alimentaire aux pesticides seuls, aux doses auxquels ils sont supposés ne pas exercer d'effet sur la santé, est caractérisée par une empreinte métabolique spécifique. L'effet du mélange de pesticides n'apparaît pas toujours comme la somme des effets des pesticides seuls. Il est parfois supérieur à l'effet des pesticides seuls ou correspond à l'effet d'un seul pesticide du mélange, en fonction du tissu étudié et du sexe de l'individu.

Mots-clés : métabolomique, RMN, pesticides, faibles doses, mélanges

P21

Etude RMN 1H HRMAS de racines de maïs (*Zea mays*) soumises à un polluant organochloré, le lindane

Farid Khelalfa,^{1,2} Florence Fauvelle,¹ Claire Blondel,² Muriel Raveton²

1- IRBA-CRSSA – Laboratoire de RMN, 38702 La Tronche

2- LECA, Equipe P3E, 38041 Grenoble

Objectifs

Le taux de pollution des sols et des eaux de surface de la région Rhône-Alpes est préoccupant, 25% des eaux de surfaces sont classées de qualité moyenne à mauvaise. Parmi les polluants, les organochlorés se montrent particulièrement rémanents dans les matrices sol/sédiments.

Un des objectifs de recherche du Laboratoire d'écologie alpine de Grenoble – Equipe P3E – est de définir les capacités de décontamination (phytoremédiation) des sols pollués aux organochlorés par une plante modèle, le maïs (*Zea mays*).

La caractérisation de marqueurs pertinents par RMN de plantes soumises à des toxiques permettrait de proposer des outils de détection précoce et ciblée, de prédire l'effet des toxiques à plus long terme, et d'évaluer les capacités d'écoremédiation des plantes étudiées. La méthodologie HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) permet quant à elle l'analyse de tissus intacts, évitant ainsi l'étape d'extraction longue et coûteuse en temps et matière. Elle est déjà largement utilisée dans le domaine biomédical, et commence à être utilisée en écotoxicologie, notamment pour l'étude d'organismes aquatiques (par exemple : daphnie, poisson). Cependant, peu d'études ont été déjà réalisées sur des plantes [1-2].

Le but de cette étude, dans un premier temps, est de mettre en place la méthodologie d'analyse RMN HRMAS de racines de maïs contaminées au lindane. Notamment, la taille de l'échantillon à analyser (permettant un rapport signal sur bruit acceptable en un temps le plus court possible), les conditions d'acquisition (vitesse de rotation, température, séquences) et l'évolution des spectres dans le temps (due à la dégradation de l'échantillon) seront à déterminer.

Résultats

Les premiers tests montrent une bonne sensibilité de la méthode, avec notamment la détection majoritaire des sucres, mais aussi des amino-acides comme l'alanine, la glutamine, sur des échantillons de racine intacte de 5 à 8mg.

Références bibliographiques :

[1] Deshmukh A.P. et al., Phytochemistry, 2003, 64: 1163-1170

[2] Deshmukh A.P. et al., Org. Geochem., 2005, 36: 1072-1085

Mots-clés : lindane, *Zea mays*, phytoremédiation, RMN HRMAS

P22

Développement et validation analyse métabolique des insectes par GC-MS

Larvor V., Renault D.

Université de Rennes 1, UMR CNRS 6553 Ecobio, Rennes, France

Les études menées dans les différents domaines de l'écologie apparaissent de plus en plus intégratives et pluridisciplinaires. Au cours des dernières années, de nombreuses méthodes de haute technologie ont été mises au point, et progressivement intégrées dans différents champs disciplinaires de l'écologie. Parmi celles-ci, les approches 'omiques', telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique apparaissent fortement prisées. En métabolomique, qui correspond à l'étude des variations des métabolites dans un système biologique (arthropodes par exemple) en fonction de ses conditions de vie, les écologues tentent notamment d'identifier et de quantifier des molécules organiques dans des matrices complexes à intérêt environnemental où les molécules peuvent être présentes à de faibles concentrations. Cependant, les données relatives aux techniques analytiques spécifiques aux modèles arthropodes apparaissent peu nombreuses et disparates dans la littérature.

Notre but est donc de proposer une méthode analytique validée pour l'analyse des métabolites chez des arthropodes en GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse). Le développement de cette analyse passe par la validation de quatre étapes principales :

- La préparation
- L'extraction
- La dérivation
- L'analyse GC-MS

La validation de l'analyse s'effectue ensuite par étude de la calibration, la limite de détection (LD), la limite de quantification (LQ), la sélectivité et la spécificité.

P23

Diatom's genome: which carbon's pathways and for what use?

Véronique Martin-Jézéquel¹, Benoit Schoefs², Parisa Heidaryzadeh³

1- Mer Molécules Santé, LUNAM, University of Nantes, EA 2160. Faculté des Sciences et Techniques, 2 rue de la Houssinière, 44322, Nantes.

veronique.martin-jezequel@univ-nantes.fr

2- Mer Molécules Santé, LUNAM, University of Le Mans, EA 2160, Faculté des Sciences et Techniques, avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans.

3-College of Agriculture, Agronomy and Plant Breeding Department, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran

Diatoms (*Bacillariophyceae*) are microalgae responsible for 50 % of oceanic carbon fixation. Genome comparisons have revealed a greater homology to the animal kingdom than the plant kingdom (1). This uniqueness in diatoms is linked to their phylogenetic distinctiveness, and it would not be surprising to find that they have unique regulatory aspects of their physiology.

In this contribution, the major pathways of carbon metabolism are reconstituted using the annotated genome of *Phaeodactylum tricornutum* (2). Our work focuses on the enzymes of the central carbon metabolism, such as glycolysis & gluconeogenesis, pentose-phosphates pathway, TCA cycle, but also glyoxylate cycle (Tolbert cycle) and the enzymes involved in the C3/C4 metabolism. In addition, we are interested by the metabolic conversion of carbon related to stress conditions, in particular for lipids synthesis. The specificities of diatoms as well as their differences in carbon regulation are compared with those of higher plants and green algae.

Methods

The whole genome sequences were obtained from 100 000EST, by JGI (Joint Genome Institute, Walnut Creek- USA). The in silico genes annotation is made by homology with models identified in *Phaeodactylum tricornutum*, using blast for the proteic or nucleotidic sequences of different organisms provided in NCBI, TrEMBL or Swiss-Prot.

Signal peptides are identified with SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Transit peptides for targeting proteins to the plastid are identified using ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>), Leader sequences for mitochondria are assigned if predicted by at least two of TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), Predotar (<http://urgi.infobiogen.fr/predotar/predotar.html>), and PSORT (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/>). Trees for groups of proteins are constructed with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) or Phylogena (intelligent branching).

1-Armbrust E. V. et al, Science, 2004, 306: 79-86.

2-Bowler C. et al, Nature, 2008, 456: 239-244.

P24

High throughput Metabolomics using FIA and a novel MSMS technique.

Ron Bonner, Stephen Tate
AB SCIEX, Concord, Canada.

Pierrick Daniel
AB SCIEX, Nantes, France. Pierrick.Daniel@absciex.com

In metabolomics studies it is often desirable to analyze many samples in order to obtain good statistical power or to study many different conditions, time courses, etc. LC-MS based methods are generally too slow to analyze 1000's of samples in a realistic time, while infusion based methods are prone to ion suppression. Compound identification (annotation) is a challenge for all MS based methods. Infusion with high resolution MS has been used to identify relatively large differences in plants (1) and when combined with a complete ¹³C labeling strategy generated definitive elemental compositions and allowed non-plant contaminants to be identified. However, this does not generate MSMS data to assist annotation and may not be able to detect changes in compounds with the same elemental composition. Here we introduce the concept of combining infusion or FIA analyses, for speed, with a novel data independent acquisition scheme (SWATH-MS) which generates MSMS data that can be used to distinguish isobaric compounds with different structures and provide insights into those structures. SWATH-MS (Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra) has been developed (2) as a technique permitting the quantitative analysis of all peptides in a sample by combining a data independent acquisition strategy with targeted data analysis based on spectral libraries. The technique sequentially fragments all ions within 25 amu windows (with 2 amu overlaps) during the course of an LCMS run; the collection of spectra from any precursor window is a swath and can be viewed as a map of fragment m/z vs. retention time. An MS scan can be included in the cycle if desired. Here we have applied the technique to flow-injection analyses and summed the spectra collected across the sample plug to obtain a single spectrum for each swath (MSMS) and for the optional MS scan. This is still a fast analysis but generates an information-rich data set with a several advantages:

- MSMS data is collected so it is possible to distinguish isobaric compounds as long as these contain unique fragments
- Distributing the ions across the swaths isolates very intense peaks and allows smaller ones to be detected
- The total variance is also distributed across the swaths making it easier for techniques such as PCA to detect real differences as long as each swath is processed individually
- Correlation across the samples can be used to extract the MSMS spectra, i.e. find fragments and residual precursor that have the same profiles.

REFERENCES

1. Giavalisco P, Hummel J, Lisec J, Inostroza AC, Catchpole G and Willmitzer L, *Anal Chem* 2008, 80, 9417
2. Gillet LCJ, Navarro P, Roest H, Tate SA, Bonner R, Aebersold R, submitted to *Nature Biotech.*

P25

Identification de biomarqueurs potentiels de l'administration d'hormones naturelles dans l'espèce bovine par profilage stéroïdomique

Sébastien Anizan¹, Emmanuelle Bichon¹, Fabrice Monteau¹, Jean-Philippe Antignac^{1,2} et Bruno Le Bizec¹.

1 LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France.

2 INRA, Nantes, F-44307

emmanuelle.bichon@oniris-nantes.fr

L'utilisation de promoteurs de croissance tels que les hormones stéroïdiennes chez les animaux de rente est prohibée au sein de l'Union Européenne (96/22/EC). De telles substances représentent toujours un vrai challenge pour les scientifiques en charge de leur contrôle. Ainsi, si pour des composés xénobiotiques stricts, des méthodes efficaces sont mise en œuvre pour dépister ou confirmer une fraude (via la GC-MSn ou LC-MSn), il en est autrement pour le dépistage d'un abus de stéroïdes naturels comme l'estradiol, la testostérone ou encore l'androstenedione dont les concentrations urinaires en métabolites directs sont trop variables pour envisager la fixation d'un seuil de suspicion d'administration fiable. Ainsi de nouvelles approches dites « omic » basées sur l'analyse non ciblée de la totalité ou d'une fraction de l'échantillon pourraient permettre de révéler de nouveaux métabolites potentiellement biomarqueurs d'une administration frauduleuse.

Appliquée à l'urine de bovin, une approche semi-ciblée de type stéroïdomique a été mise en place portant sur 2 fractions d'intérêt de la matrice urinaire : d'une part les métabolites de phase I et d'autre part ceux de phase II. Ce choix part du postulat que certaines voies métaboliques pourraient être affectées de manière préférentielle suite à l'administration d'un stéroïde et ainsi moduler des métabolites potentiellement marqueurs issus d'une fonctionnalisation (phase I) ou d'une conjugaison (phase II). Deux méthodes de profilage ont donc été développées à ces fins [1,2] impliquant la standardisation des échantillons, une étape de purification ciblée sur la fonction d'intérêt (MEPS C18 ou SPE SAX) et une acquisition des empreintes par différentes méthodes d'analyse (GC-qMS vs MS/MS et LC-MS/MS) orientées vers les voies métaboliques a priori impliquées suite à une administration. Les données ont ensuite été retraitées et analysées statistiquement afin de dégager des premiers biomarqueurs d'administration d'androstenedione chez le bovin [3,4] et de mettre en place à terme un nouvel outil diagnostique permettant la suspicion d'une administration frauduleuse.

Références bibliographiques

- [1] Anizan S, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP and Le Bizec B. A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010;1217:6652-6660.
- [2] Anizan S, Di Nardo D, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP, Le Bizec B. Targeted phase II metabolites profiling as new screening strategy to investigate natural steroid abuse in animal breeding. *Analytica Chimica Acta* 2011;700:105-113.
- [3] Anizan S, Bichon E, Di Nardo D, Monteau F, Cesbron N, Antignac, JP, Le Bizec B. Screening of androstenedione misuse in cattle by LC-MS/MS profiling of glucuronide and sulfate steroids in urine. *Talanta* 2011;86:186-194
- [4] Anizan S, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP, Le Bizec B. Gas chromatography coupled to mass spectrometry based metabolomic to screen anabolic practice in cattle. *Journal of Mass Spectrometry* 2012;47:131-140.

Mots-clés : stéroïdomique, profilage, biomarqueurs, spectrométrie de masse

P26

Phénotypage métabolique de lins mutants, *Linum usitatissimum*, pour la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

Marie-Aude Tribalat^a, Sullivan Renouard^a, Ophélie Fliniaux^a, Roland Molinié^a, Dominique Cailleu^b, Paulo Marcelo^c, Christophe Hano^d, Frédéric Lamblin^d, Eric Laine^d, François Mesnard^a

^aLaboratoire de Phytotechnologie, EA 3900-BioPI, Université de Picardie Jules Verne, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens Cedex 01, France. marie.aude.tribalat@etud.u-picardie.fr

^bUPJV, Plate-Forme Analytique, 33 rue Saint-Leu, 80039 Amiens, France

^cUPJV, Plateforme ICAP, 1-3 rue des Louvels, 800036 Amiens, France.

^dLaboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures UPRES EA 1207, Université d'Orléans, Equipe Lignanes des Linacées, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres, 21 rue de Loigny la Bataille F-28000 Chartres, France

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes décrite chez l'espèce *Linum usitatissimum* aboutit notamment à la production de lignine dans la tige et de lignanes dans la graine. Les lignanes sont des métabolites secondaires très peu représentés dans la nature mais dont l'accumulation est particulièrement importante dans les graines de lin [1]. Jusqu'à présent, l'intérêt porté à ces composés s'est essentiellement concentré sur les propriétés pharmacologiques qu'ils développent (anticancéreux, anti-oxydants, anti-inflammatoires), et paradoxalement le rôle joué par ces composés *in planta* n'est actuellement pas défini [2]. La proximité de la voie de biosynthèse des lignanes avec celle de la lignine et la présence d'un précurseur commun (l'alcool coniférylique) suggèrent de fortes interactions entre les deux voies.

Pour mieux comprendre les relations existantes entre lignanes et lignines, des analyses métabolomiques par RMN de graines issues de différents mutants pour la voie des phénylpropanoïdes ont été réalisées. Deux types de mutants sont étudiés : d'une part, des plantes déficientes pour la voie de biosynthèse du sécoisolaricirésinol (lignane majoritaire chez le lin) par inhibition de l'expression du gène codant la Pinorésinol-Laricirésinol-Réductase (PLR) ; et d'autre part des plantes surexprimant le gène codant la Férulate-5-Hydroxylase (F5H), enzyme conduisant à la synthèse d'unités syringyles (lignines) à partir de l'alcool coniférylique.

[1] Lamblin,F ; Hano,C *et al.*, Med Sci, 2008, Vol.24, pp.511-519

[2] Adolphe,J.L.;Whiting S.J., *et al.*, British Journal of Nutrition, 2009, Vol.103, pp.929-938

The challenges of metabolomics approaches applied to toxicological studies on cultivated cells.

Claude Guillou, Hubert Chassaigne, Donatella Carpi, Giorgio Tomasi

European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Systems Toxicology Unit, Via Enrico Fermi 2749, I-21027 Ispra, Italy (E-mail: claude.guillou@jrc.ec.europa.eu)

In the course of the past decade the development of “Omics” research has led to a broader and deeper understanding of systems biology. One of the ultimate goal of this science would be to decipher the mechanisms in action in living organisms and the interactions or perturbations caused by the environment. At the JRC, our Unit Systems Toxicology is interested in testing these approaches for application to toxicological studies with in-vitro cell models. This leads to a number of scientific, technical and organisational challenges that are faced in the FP7 European project PREDICT-IV and in complementary experiments performed in the Joint Research Centre (JRC) [1]. The overall aim of PREDICT-IV is to develop strategies to improve the assessment of drug safety in the early stage of development and late discovery phase. One approach developed in the project is based on the integration of “omics” data (transcriptomics, proteomics, metabolomics) obtained from toxicological experiments performed on in-vitro models of cultivated of target organs. Several human hepatocytes in-vitro models, and also the HepaRG cells have been included in the experiments regarding liver toxicity of xenobiotics. Neurotoxicity is investigated on well-characterized primary neuronal rodent cell culture models including a 3D reaggregating brain cell model. Nephrotoxicity is studied on the human renal proximal tubular RPTEC/TERT1 cell culture. PREDICT-IV consortium has made a significant effort for harmonization of the design of toxicological experiments to be carried out with these various cell models and for “standardization” of preparation of samples for the successive transcriptomics, proteomics and metabolomics (NMR and MS) measurements. The JRC, which is in charge of the MS metabolomics measurements, had to propose, test and validate fast and convenient metabolite extraction protocols as well as set-up and optimize efficient MS analytical conditions suitable for these various cell models. In practice, successes and difficulties encountered while performing these developments led to prioritization of experiments on certain cell models and to test possible alternative for those found more problematic. A specific attention was given to the HepaRG model for which detailed information regarding toxicological experiments and the complete MS metabolomics workflow will be presented in another oral presentation [2]. The current presentation will summarise the general approach that has been developed for production and handling of MS metabolomics data for the various models along the same principles of traceability, quality control and validation of each step of the pre-processing, extension and integration with other Omics data and further bioinformatic processing. An attempt for cross-Omics data integration will be undertaken by the partners during the PREDICT-IV Omics workshop organized in the JRC Ispra on 2-4 April. The efficiency and gaps of the methodologies developed throughout the project will then be assessed. The lessons learnt during this process will be important for next toxicological Omics experiments and for setting up realistic strategies for further exploitation of the rich and huge amount of data produced during the project.

Références bibliographiques

[1] FP7 PREDICT-IV (21 European partners including two major pharmaceutical companies)

Web access: <http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/>

[2] Chassaigne H. et al, Evaluation of Dose- and time-dependent effects of drugs on metabolic profiling of HepaRG cells – How to deal with time series-data? (oral presentation submitted to the 6e journées du RFMF)

Mots-clés : cell culture, toxicology, mass spectrometry

P28

Etude de l'implication du métabolisme primaire dans la réponse à la hernie des crucifères chez le colza par une approche de métabotypage.

Geoffrey Wagner¹², Sophie Charton³, Christine Lariagon³, Anne Laperche¹², Raphaël Lugan⁴, Julie Hopkins⁵, Alain Bouchereau²⁶, Régine Delourme³, Antoine Gravot²⁶, and Maria J. Manzanares-Dauleux¹²

1 AGROCAMPUS OUEST, UMR1349 IGEPP, F-35000 Rennes, France

2 Université Européenne de Bretagne, France

3 INRA, UMR1349 IGEPP, F-35653 Le Rheu, France

4 CNRS, UPR IBMP, Plate-forme métabolomique, F-67084 Strasbourg, France

5 INRA-CNRS, UMR IPMSV, F-06903 Sophia-Antipolis, France

6 Université Rennes 1, UMR1349 IGEPP, F-35000 Rennes, France

La hernie des crucifères est une maladie tellurique causée par le biotrophe obligatoire *Plasmodiophora brassicae* qui touche toutes les espèces de la famille des Brassicaceae. L'infection provoque le développement de galles racinaires qui constituent un nouveau puits remobilisant le carbone assimilé par les feuilles. Afin de comprendre l'implication du métabolisme primaire dans le processus d'infection, les réponses métaboliques de *Brassica napus* ont été étudiées sur un panel de 18 géotypes de colza couvrant une gamme de réponses, de la sensibilité à la résistance à la hernie. Des profils quantitatifs d'acides aminés et des profilages de sucres/polyols/acides organiques ont été réalisés par UPLC-UV/MS-MS et GC-FID/MS respectivement, aboutissant à la quantification d'un total de 37 composés identifiés. Par ailleurs, un composé spécifiquement accumulé dans les racines infectées – la S-méthylcystéine – a été pour la première fois caractérisé chez une Brassicaceae. Nos résultats montrent que le degré de sensibilité à la hernie est essentiellement corrélé avec des perturbations des contenus en acides aminés et en glutathion et faiblement corrélé aux altérations du métabolisme carboné (sucres, acides organiques, polyols). Une analyse dynamique de la réponse métabolique à l'infection, chez le géotype sensible Yudal, a permis de distinguer des réponses métaboliques précoces (< 28 jours après inoculation) et des réponses tardives (>28 jours après inoculation). L'accumulation précoce de glutamate, d'aspartate et d'asparagine, associée à une augmentation du contenu en azote total dans les racines infectées, suggère l'établissement d'un puits métabolique azoté important. Les rôles possibles de l'accumulation racinaire de glutathion et de S-méthylcystéine dans le processus infectieux sont discutés

Mots-clés : Interactions plantes-pathogènes / Métabolisme primaire / Résistance à la hernie des crucifères

P29

Modèle de calibration simplex pour le suivi de la diversité végétale dans un écosystème à partir d'une simple analyse HPLC d'un échantillon mélange

Nabil SEMMAR

1) INRA 1260/ Plateau BioMeT/ Faculté de Médecine de la Timone/ Marseille/France

2) Université Tunis El Manar (UTM)/ ISSBAT/ Tunis/Tunisie

Les écosystèmes sont caractérisés par une dynamique conditionnée par la balance des variations de divers facteurs biotiques, abiotiques et anthropiques. Cette dynamique peut être assimilée à une série d'états affectant l'écosystème dans le temps. Elle peut être cyclique (liée à des rythmes biologiques et saisonniers) ou monotone (suite à des perturbations anthropiques ou à des catastrophes naturelles). La quantification et la qualification des variations dynamiques d'un écosystème peuvent être tracées par un suivi routinier de ses ressources naturelles (biodiversité). Par ailleurs, les contrôles de routine nécessitent des paramètres sensibles aux variations des divers facteurs environnementaux. Cette sensibilité peut être vérifiée par des analyses chimiques de métabolites secondaires chez les plantes. Dans l'optique d'une gestion des ressources écologiques, une nouvelle approche métabolomique a été développée pour estimer la diversité végétale in situ à partir d'un simple profil HPLC de métabolites secondaires obtenu sur un mélange de plantes. L'approche simplexe est basée sur un ensemble complet de mélanges de taxons végétaux représentés par différents profils HPLC dont les importances relatives (ou poids) varient entre les différents types de mélanges. Partant de taxons végétaux distincts, leurs profils HPLC ont été combinés in silico selon un ensemble complet de mélanges impliquant des variations graduelles de leurs poids. A la sortie de chaque combinaison, un profil HPLC moyen a été calculé pour obtenir une image multivariable (intégrant plusieurs métabolites secondaires à la fois) sur les dilutions des différents taxons végétaux les uns par les autres au sein des différents mélanges. Enfin, une analyse discriminante bayésienne a été appliquée pour prédire les poids des différents taxons végétaux en fonction des teneurs relatives des métabolites secondaires caractérisant les profils HPLC des mélanges. Le modèle a été ensuite validé sur un ensemble de données d'individus extérieurs. Cette nouvelle approche simplexe a été développée et illustrée sur 4 métabotypes d'*Astragalus caprinus* (*Fabaceae*) identifiés a priori par leurs profils HPLC de flavonoïdes dans les feuilles. Les résultats montrent que les poids d'un métabotype en mélange peuvent être prédits avec d'autant plus de précision que le métabotype se distinguait par certains métabolites caractéristiques (présence exclusive de métabolites). Par ailleurs, les variations quantitatives (de régulations métaboliques) se sont révélées fiablement prédictives des poids de métabotypes dans des cas extrêmes de mélanges (dominance ou rareté d'un métabotype dans un mélange). Cette approche métabolomique peut être aisément extrapolée pour la quantification d'abondances relatives d'espèces végétales mélangées puisque la présence et l'absence de métabolites secondaires représente un paramètre chimique fiable pour la distinction des espèces (et des familles). Le développement de modèles de calibration simplex peut aider : (i) au suivi de routine de la diversité végétale dans des milieux de mélanges naturels (herbes en prairies, plancton marin), ou (ii) pour quantifier la diversité végétale extraite dans un échantillon hétérogène de plantes résultant d'activités anthropiques (abatages industriels de forêts, fauchages ciblés de certains phénotypes) ou de catastrophes naturelles.

Références bibliographiques

Nabil SEMMAR, Maurice Jay, Muhammad Farman, Maurice Roux, 2008. A new approach to plant diversity assessment combining HPLC data, simplex mixture design and discriminant analysis. *Environmental Modeling and Assessment* 13, 17-33.

Mots-clés : Diversité végétale, variations taxonomiques, métabotypes, HPLC, flavonoïdes, plan simplex de mélanges, analyse discriminante bayésienne

P30

Étude du transfert des acides aminés vers des nourrissons exclusivement nourris en lait maternel par analyse en $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans le lait et dans les cheveux

Maxime Julien(1), Marine Frasquet-Darrieux (2), Ingrid Antheaume(1), Régis Hankard(2), Richard Robins(1), Illa Tea(1)

(1) Laboratoire CEISAM, Groupe EBSI, CNRS-Université de Nantes UMR6230, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France e-mail : maxime.julien44@gmail.com

(2) Centre d'investigation Clinique CIC-P 0802 CHU de Poitiers, France

L'environnement nutritionnel du fœtus et du nourrisson contribue à l'état de santé à l'âge adulte. Des études menées par spectrométrie de masse de rapports isotopiques sur différentes populations ont indiqué que l'analyse isotopique comparative des nouveaux nés et de leurs mères pourrait permettre d'estimer l'apport protéique dans une population donnée. Il a été récemment montré un enrichissement systématique en ^{15}N dans les cheveux de nourrissons vis-à-vis de leurs mères dans une population de 240 paires mère-bébé (1). L'objectif de la présente étude est de suivre l'évolution de cet enrichissement naturel en ^{15}N du métabolisme protéique entre mère et enfant au cours du premier mois d'allaitement.

Dans un premier temps, nous avons observé un enrichissement en ^{15}N dans les cheveux de nourrissons vis-à-vis du lait de leurs mères de $^{15}\text{N}=3.1\text{‰}$ (2), cet écart est plus marqué qu'entre mère et bébé in utero ($^{15}\text{N}=0.4\text{‰}$). Deuxièmement, la valeur en ^{15}N ne diminue que de 0.3 ‰ environ entre les cheveux de l'enfant recueillis à la naissance et ceux prélevés après un mois d'allaitement exclusif (1cm à partir de la racine). Cette observation peut impliquer un fort enrichissement au cours du métabolisme azoté du nourrisson ou un enrichissement spécifique des acides aminés incorporés dans les cheveux.

Cette communication présentera une analyse des ^{15}N (‰) des acides aminés des protéines du lait par GC-irm-MS dans le but de corrélérer leurs teneurs dans le lait et leurs teneurs dans les cheveux.

Financement : PHRC Interrégional 2009 projet N° 23-4 ; REGULACT

Références bibliographiques

(1) De Luca; A., Boisseau, N., Tea, I., Louvet, I., Robins, R.J., Forhan; A., Charles, M.-A., Hankard, R. 2012 ^{15}N content in newborns' hair and their mothers: a cohort study. Ped. Res. (in press).

(2) Marine Frasquet-Darrieux 2011 Composition isotopique des cheveux des nourrissons et du lait en fonction de la corpulence maternelle. Mémoire de DES Pédiatrie, Université de Poitiers.

Mots-clés : métabolisme protéique, acides aminés, GC-C-IRMS, analyse isotopique, lait

P31

Profilage sensométabolique par LC-DAD et LC-ESI-MSn des produits alimentaires de la racine de chicorée industrielle (*Cichorium intybus* var. *sativum*)

Honorine Willeman^a, Anne Fertin^b, Yann Guitton^a, Najja Voedts^a, Philippe Hance^a

a INRA USTL UMR SADV 1281, Stress Abiotiques et Différentiation des Végétaux Cultivés Université Lille Nord de France, Lille 1, SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

b Département Génie biologique, Université Lille Nord de France, Lille 1, IUT A, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

L'amertume perçue dans la racine de chicorée industrielle confère aux produits alimentaires dérivés une qualité organoleptique qui module leur consommation. Si dans le produit brut cette saveur implique des lactones sesquiterpéniques (LST) [1], ces composés ne sont que très faiblement observés dans les formes torréfiées, en dépit du degré d'amertume persistant [2].

Dans le cadre des programmes d'amélioration de la chicorée, nous avons développé une approche sensométabolique pour identifier les voies de biosynthèse des composés amers ou précurseurs de l'amertume. Le phénotypage d'une collection de variétés de chicorée cultivées, et des produits transformés correspondants, permet la démarche d'association de la variabilité du caractère organoleptique à celle de la composition chimique. Pour cela, les sont couplées aux analyses sensorielles.

L'extraction méthanolique s'est révélée efficace pour couvrir la détection d'un ensemble de métabolites (acides chlorogéniques, LST, acides organiques, acides aminés et sucres) présents dans trois produits de transformation (racine brute, farine, produits torréfiés). Comparativement au produit frais qui contient 0.34 mg/g de MS de LST, les analyses par LC-UV ont confirmé les différences quantitatives au niveau des lactones sesquiterpéniques notamment le taux très faible dans le torréfié (0,074 mg/g de MS), mais ont démontré aussi un effet de concentration dans le produit séché (0,68 mg/g de MS). Par ailleurs, l'analyse en LC-ESI-MSn a permis d'enrichir le profil signalétique moléculaire de chaque produit selon un fractionnement polaire et lipidomique. L'identification des composés derrière ces signaux est en cours. En parallèle, l'analyse sensorielle sur 5 variétés, issues de la collection, a été réalisée par un panel de 25 personnes représentatives de la population et entraînées à la détection de l'amertume. Lors d'un premier test de classement, deux variétés se sont distinguées ($p < 0,05$) parmi les racines brutes. Ces résultats ont été confirmés par un test triangulaire mené sur la farine ($p < 0,05$) et les produits torréfiés ($p < 0,01$).

Les différences entre les produits au niveau de l'analyse sensorielle restent à corréliser avec la présence de marqueurs de l'amertume.

Références bibliographiques

[1] Rees S. B., Harborne J. B., *Phytochemistry*, 1985, 24:2225-2231

[2] Hance P. et al., *Food Chemistry*, 2007, 105:742-748

Mots-clés : Analyse sensorielle, Chicorée, Amertume, Lactones sesquiterpéniques, LC-ESI-MSn, Métabolisme secondaire, Sélection variétale.

MSeasy: an R package dedicated to ecologists for untargeted processing of GC-MS data

Yann Guitton^d, Florence Nicolè^a, Elodie Courtois^b, Sandrine Moja^a, Laurent Legendre^a,
Martine Hossaert-Mckey^c,

a Université de Lyon, F-42023, Saint Etienne, France; Université de Saint Etienne, Jean Monnet, F-42023, Saint Etienne, France; LBVpam, EA 3061, F-42023A, Saint Etienne, France

b Laboratoire Evolution & Diversité Biologique UMR CNRS 5174 Bâtiment 4R3 Université Paul Sabatier 118, route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 4, France

c Behavioural Ecology Group, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR CNRS 5175, 1919 route de Mende, F-34293 Montpellier, cedex 5, France

d INRA USTL UMR SADV 1281, Stress Abiotiques et Différentiation des Végétaux Cultivés Université Lille Nord de France, Lille 1, SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

Motivation: The democratization of metabolic analyses has extended the scope of metabolomics to ecological questions. Chemical ecology interprets the variation and diversity of chemical signals of non-model organisms in the light of species interactions. Elucidating the biological information within untargeted complex signals requires efficient bioinformatics tools.

Results: We developed an unsupervised and untargeted processing of GC-MS data that efficiently detects putative compounds within complex mixtures. The method is based on the clustering of similar mass spectra and does not require any profile correction, retention time alignment or normalization. It is robust to the use of different types of columns and to shifts in retention times particularly common for large/long-term experiments.

We validated our method, and compared it to other processing approaches by carrying out analyses on two different experimental datasets. We found that the best clustering method for grouping similar mass spectra into putative molecules was the hierarchical clustering analysis with Euclidean distance and Ward linkage. Since other clustering algorithms could be better for other datasets, the function `MS.test.clust` allow testing for the best clustering algorithm on any new dataset.

MSeasy provides fingerprinting or profiling matrices together with information and graphical displays for quality control. For Windows users, MSeasy allows direct interrogation of the NIST database via the NIST `mssearch` software and interrogation in the webtool ARISTO[1] (Automatic Reduction of Ion Spectra To Ontology, <http://www.ionspectra.org/ARISTO/>).

For R novices, a user-friendly interface of MSeasy that skip the writing of command lines was developed and named MSeasyTkGUI.

Availability and implementation: the R packages MSeasy and MSeasyTkGUI are freely available on the R CRAN web site (<http://cran.r-project.org/web/packages/MSeasy/index.html>). MSeasy can read CDF or `mzXML` raw data via the R `XCMS`[2] package.

Références bibliographiques

[1] Askenazi M. and Linial M., *Nucleic Acid Research*, 2011, 39:505-10

[2] Smith C.A. et al, *Anal. Chem.* 2006, 78, 779-787

Mots-clés: GC-MS, R package, Graphical user interface, clustering, NIST, XCMS

Pilot study on biosynthesis of sesquiterpenoids and hydroxycinnamic acids in *Cichorium intybus*

Mathieu Vanderriele^a, Pauline Henin^a, Céline Leclerc^a, Yann Guitton^a, Najia Voedts^a, Nicolas Henry^c, Caroline Rambaud^a, Jean-Louis Hilbert^a, Christophe Vuylsteker^a, Philippe Hance^{a,b}

*a*UMR SADV USTL/INRA 1281, Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés
Université Lille 1 Sciences et Technologies, SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

*b*GIS GENOCHIC (UMR SADV, Florimond Desprez SAS, Leroux SAS), Florimond Desprez Veuve et Fils SAS, F-59242 Cappelle-en-Pévèle, France

c Florimond Desprez Veuve et Fils SAS, Laboratoire Betteraves, F-59242 Cappelle-en-Pévèle, France

Industrial chicory root (*Cichorium intybus* var. *sativum*) is used as dried or roasted foodstuffs. Secondary metabolites of the plant confer to the food products valuable nutritional and sensorial properties [1]. In fact, chicory is distinguished by the main accumulation of two classes of organic compounds: hydroxycinnamic acids (HCA) and sesquiterpene lactones (SQL) [2]. In crop plants, by means of LC-MS/MS and LC-ESI-MSn, we identified thirteen major compounds among which chicoric, 5-mono-O-cafeoylquinic (5-CQA) and 3,5-di-O-cafeoylquinic acids (3,5-diCQA), as well as the SQL lactucin and lactucopicrin are the most abundant (up to 1% of dry weight). Data from variety trials showed that metabolite content depended upon genotype ($p < 0.05$), but also revealed variable accumulation profiles within same varieties ($p < 0.05$). In order to better control the environmental conditions, we are developing in vitro experimental systems to induce production of the cafeoylquinic and sesquiterpenic derivatives. Cultures of cell suspensions and plantlets are used to study biosynthesis of HCA and SQL and the genetic basis, by transcriptomic and enzymatic approach.

LC-DAD targeted analysis of polar extracts from root cell suspension (15-days old) showed 3,5-diCQA as the main compound produced (2.5 mg/g of dry biomass), seven fold upper than 5-CQA. Using an aqueous chloroform extraction, SQL were detected only in the plantlets (4-week old), which the total content (6.25 mg/g of dry weight) was distributed between the root (51%) and the foliar organs (49%). Then, these systems were used under methyl jasmonate, UV-B, salicylic acid or β -cyclodextrin elicitation and various sucrose amounts to promote contrasted levels in metabolic compounds. We determined that 10 g/l sucrose in the medium was required to promote both a basis level for the production and a significant induction of the metabolites. Kinetic experiments on plantlet and cell cultures indicated that metabolism was mainly induced by the methyl jasmonate at 50 μ M. The response reached a maximum at 3 and 7 days after exposure for SQL and for HCA, respectively. The 3,5-diCQA content was enhanced by up to 20 fold, whereas sesquiterpene lactones level in whole plantlet was increased of 35%.

Overall, these inducible systems offer an integrated biological model to study the production of biologically active compounds. The combination with the metabolomic approach allows a direct insight into the metabolic pathways of cafeoylquinic and sesquiterpenic derivatives. Targeted simultaneous determination (one extraction, one analysis) of the two classes of compounds is in progress.

Références bibliographiques

- [1] Quanzhen W. and Jian C., African Journal of Biotechnology, 2011, 10(11):1966-1977
[2] Rees S. B. and Harborne H. B., Phytochemistry, 1985, 24(10): 2225-2231

Mots-clés: Chicory, CQAs, sesquiterpene lactones, elicitation, metabolomic, transcriptomic

P34

Evolution des profils métabolomiques au cours du développement du mésocarpe et de la graine du fruit de palmier à huile.

Etienne Legrand^{1,2}, **Mickaël Maucourt**^{2,3*}, **Catherine Deborde**^{2,3}, **Bertrand Beauvoit**², **Daniel Jacob**^{2,3}, **Stéphane Bernillon**^{2,3}, **Georges-Frank Ngando-Ebongue**⁴, **Annick Moing**^{2,3}, **Vincent Arondel**¹.

1 CNRS, UMR5200, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.

2 INRA, UMR1332, Biologie du Fruit et Pathologie, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

3 Plateforme Métabolome du Centre de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, IBVM, Centre INRA Bordeaux, 71 av Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

4 Centre de Recherche sur le Palmier à Huile (CEREPAH) de La Dibamba, IRAD, BP243, Douala, Cameroun

Le mésocarpe du fruit de palmier à huile (*Elaeis guineensis*) est le tissu végétal le plus riche en huile connu (jusqu'à 90% du poids sec). Une étude préliminaire comparant le mésocarpe du fruit de palmier à huile avec celui du palmier dattier a montré une baisse de la teneur en sucres concomitante à l'accumulation d'huile (Bourgis et al. 2011). L'albumen de la graine de palmier à huile contient également de l'huile, à une teneur (50% du poids sec) comparable à celle des autres graines oléagineuses comme le colza mais aussi des mannanes et des protéines de réserve. Dans le cadre d'un travail visant à étudier et comparer la mise en place des réserves dans ces deux systèmes, nous avons déterminé la composition en métabolites primaires susceptibles de participer à la synthèse de ces composés au cours du développement du mésocarpe et de la graine.

Les acides gras totaux ont été quantifiés dans le mésocarpe et la graine du fruit à différents stades de développement par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats obtenus montrent une composition et un profil d'accumulation similaire à ceux décrits dans la littérature. Sur les mêmes échantillons, les évolutions des teneurs en différents métabolites primaires ont été estimées à l'aide de profils métabolomiques par RMN-1H d'extraits polaires. Les acides aminés ont été mesurés par UPLC-fluorimétrie. Les nucléotides phosphorylés ont été déterminés par bioluminescence sur des extraits perchloriques.

Afin d'avoir un vue globale des différences de composition des échantillons, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des signatures spectrales RMN obtenues après réduction des données à 186 domaines spectraux de taille variable. Les deux premières composantes expliquent 67 % de la variabilité totale et mettent en évidence les différences entre les deux tissus. Une 2^{ème} ACP a été réalisée sur les 20 échantillons issus de 5 stades de développement du mésocarpe (15, 17, 19, 21 et 23 semaines après pollinisation). Les deux premières composantes expliquent 74 % de la variabilité totale et séparent les échantillons de mésocarpe en fonction du stade du fruit. Les domaines spectraux participant à la séparation des stades incluent notamment le saccharose, le glucose et le glycérol.

Au cours du développement, l'état énergétique (i.e. rapport ATP/ADP) reste constant dans les deux tissus alors que contenu en nucléotides totaux (i.e. somme ATP+ADP) augmente dans le mésocarpe et diminue dans la graine.

Ce travail s'insère dans une étude intégrée de la synthèse de l'huile chez le palmier combinant métabolomique, lipidomique, transcriptomique et protéomique, et visant à appréhender les mécanismes permettant au mésocarpe d'accumuler plus d'huile que les graines.

Référence bibliographique : Bourgis F et al. (2011) PNAS USA 108: 12527-12532.

**Développement et évaluation de stratégies métabolomique et fluxomique ¹³C
chez une microalgue modèle : *Chlamydomonas reinhardtii***

**E. Cahoreau¹, L. Peyriga¹, S. Sokol¹, S. Massou¹, JC Portais¹, G. Peltier², J.Plet²,
A.Martzolff³, G. Cogne³**

1 Groupe MetaSys, UMR5504, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
CNRS, INRA, INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4 - France

2CEA Cadarache – France;

3GEPEA Saint-Nazaire – France

email : cahoreau@insa-toulouse.fr

Les approches de métabolomique et de fluxomique permettent de caractériser et de quantifier le réseau métabolique d'organismes vivants. La mise en place d'analyses du métabolome et surtout du fluxome chez des micro-organismes photosynthétiques requiert cependant le développement de techniques de marquage et d'échantillonnage particuliers. En conditions de photoautotrophie, l'utilisation de CO₂ comme unique source de carbone nécessite de réaliser des expériences de marquage ¹³C non stationnaires tout en maintenant et un état métabolique stationnaire stable, ce qui demande la mise au point de protocoles de culture, d'échantillonnage et d'analyse spécifiques et maîtrisés. Dans le contexte du projet ANR ALGOMICS, réunissant 6 laboratoires partenaires français (CEA Cadarache, INSA Toulouse, CEA Grenoble, GEPEA Nantes, IBPC Paris, CEA Genoscope) dans l'objectif d'améliorer les connaissances sur la conversion, la régulation et le stockage énergétique de *Chlamydomonas reinhardtii*, nous avons développé des stratégies expérimentales permettant l'analyse quantitative du réseau métabolique de cette microalgue modèle. Ce travail a nécessité le développement d'un photobioréacteur adapté aux expériences de marquage isotopique en dynamique ainsi que la mise en place d'une méthodologie complète d'analyse métabolique (échantillonnage, séparation des métabolites, techniques analytiques, outils de calculs des flux). Nous présentons ici les méthodes d'échantillonnage et analytiques mise au point pour l'analyse quantitative du métabolisme central (cycle de Calvin, glycolyse, pentoses-phosphate, cycle de Krebs). Différentes méthodes de quenching et d'extraction dédiées à la mesure des pools métaboliques et du marquage ¹³C ont été évaluées sur des échantillons biologiques, analysés et quantifiés par IC-MS/MS.

Mots-clés : métabolomique quantitative, marquage ¹³C dynamique, microalgues, photobioréacteur, IC-MS/MS

P36

A metabolomics approach to identify biomarkers of coffee consumption in subjects from the SU.VI.MAX2 cohort

J.A. Rothwell¹, B. Lyan², J-F. Martin², M. Touvier³, S. Gueho³, N. Meklat², L. Fezeu³, B. Comte¹, S. Hercberg³, P. Galan³, E. Pujos-Guillot², C. Manach¹.

1Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA / Université Auvergne, Clermont-Ferrand, France;

2Plate-forme d'Exploration du Métabolisme, INRA Clermont-Ferrand, France;

3Unité Recherche Epidémiologie Nutritionnelle, INSERM U557 / INRA / CNAM / PARIS 13, Bobigny, France.

The “food metabolome” is the subset of all in vivo metabolites originating from the consumption and digestion of food components. Global analyses of these metabolites by high-resolution mass spectrometry, coupled with multivariate statistical methods, allow individuals with different dietary patterns to be distinguished. In addition, the comparison of groups of low and high consumers of a given food allows the detection of signals which discriminate these groups and can then be used as a basis for the identification of biomarkers of consumption. As part of the PhenoMeNEp project, a metabolomics approach was used to identify and validate potential biomarkers of coffee consumption. Coffee is one of the most widely consumed beverages in the West and contains various bioactives implicated with health and the prevention of disease. Using 24 hour dietary recall and food frequency questionnaire data, 43 high coffee consumers (consumption of 182-540 ml coffee/day) and 56 low coffee consumers (0-39 ml/day) were selected from a pool of 250 subjects from the French SU.VI.MAX2 cohort. Morning spot urine samples for each subject were analysed by high resolution mass spectrometry (UPLC-ESI-QToF and LTQ-Orbitrap). After univariate and multivariate analysis of the spectroscopic data, low and high coffee consumers were clearly distinguished by 49 highly significant ($p > 0.001$) discriminant ions. By interpreting spectral data, querying online and custom in-house databases and comparing with commercial analytical standards, we have been able to identify a number of these discriminant ions. Some of the most intense and significant were found to be metabolites of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), which is demethylated and hydroxylated in vivo by cytochrome P450 enzymes to produce various methylxanthine and methyluric acid derivatives. Well-validated biomarkers for the consumption of foods are valuable as alternatives and complements to traditional dietary assessment methods.

Mots-clés: food metabolome, coffee, mass spectrometry, phytochemicals, urinary metabolites, biomarkers of intake

Développement d'une approche métabolomique semi ciblée par LC/(ESI) MS/MS pour la détermination de profils de phospholipides plasmatiques

Corinne Pouyet¹, Guilhem Sivadier¹, Jean-François Martin¹, Franck Giacomoni¹, Robert Ringseis², Jean-Louis Sebedio¹, Estelle Pujos-Guillot¹

1 INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, F-63122, Saint Genès Champanelle, France, and Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000, Clermont-Ferrand, France

2 Institute of Animal Nutrition and Nutrition Physiology, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35392 Gießen, Allemagne

Deux approches coexistent pour l'étude des phospholipides plasmatiques par spectrométrie de masse : une par couplage avec des systèmes de chromatographie liquide destinée à la quantification, et l'autre, par injection directe sur des spectromètres de masse haute résolution utilisés en lipidomique. Compte tenu du coût et des contraintes des spectromètres de masse à haute résolution, une approche semi-ciblée par LCMSMS a été développée afin de réaliser un screening sur 5 classes de phospholipides et de sphingolipides. Cette approche est testée sur une étude destinée à évaluer l'influence de l'ingestion d'huiles chauffées (tournesol et de colza), sur les phospholipides plasmatiques chez le porc (n=48) au cours d'une cinétique d'un mois.

Les lipides totaux plasmatiques sont injectés sur une chromatographie liquide en phase normale. Chacune des cinq classes (PC, PE, PI, PS, SM) est séparée chromatographiquement et sélectionnée par balayages spécifiques, d'ions précurseurs ou pertes de neutres, à l'aide d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle, afin de les détecter sélectivement.

L'extraction automatique des ions est réalisée avec le logiciel XCMS. Les résultats obtenus sont évalués sur la base de la richesse des empreintes (nombre d'ions détectés) et détermination de la variabilité associée à l'analyse sur les temps de rétention et intensités d'échantillons pools. Les données obtenues sont exploitées avec le logiciel SIMCA (Unitrics) pour les analyses multivariées. Les ions discriminants mis en évidence sont ensuite putativement identifiés par interrogation par famille de composés dans la base de données Lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org/>).

La méthode développée a permis d'effectuer un screening de 96 échantillons plasmatiques. 500 ions révélant une variabilité biologique ont pu être détectés en 40 min d'analyse. Les résultats mettent en évidence un effet lié à la nature de l'huile et au chauffage sur certaines classes de phospholipides plasmatiques (PC, PE, SM) dont 44 % des signaux ont été putativement annotés après requête en base de données (7% avec une réponse unique).

Les résultats obtenus pour cette étude montrent qu'il est possible d'utiliser une approche semi ciblée par LCMS/MS comme screening et qu'elle permet d'obtenir avec un bon pourcentage de réponses lors de l'interrogation en bases de données. L'étape suivante est de valider les identifications putatives par quelques injections sur un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap.

Mots-clés : Phospholipides, spectrométrie de masse, métabolomique

Profils métabonomiques de cellules cancéreuses par RMN 2D quantitative

Estelle Martineau, Illa Tea, Serge Akoka, Patrick Giraudeau

Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, Nantes, France

La quantification précise de biomarqueurs par RMN 1H à une dimension est limitée du fait de forts recouvrements entre les pics d'intérêt des métabolites [1,2]. Au contraire, la RMN 2D présente un fort potentiel pour mesurer de façon non ambiguë la concentration d'un grand nombre de métabolites [3-4]. Récemment, nous avons développé une méthode de RMN 2D utilisant la séquence INADEQUATE 1H pour déterminer rapidement la concentration de métabolites au sein de mélanges modèles [5]. Les spectres INADEQUATE 1H sont obtenus en 7 minutes avec une répétabilité inférieure à 2%. Ce protocole a été évalué en termes de précision et de linéarité sur des mélanges de métabolites allant jusqu'à une concentration de 0,1 mM, constituant donc un outil prometteur pour réaliser des études métabonomiques. Nous avons ensuite évalué les potentialités de la séquence INADEQUATE 1H pour quantifier un grand nombre de métabolites extraits à partir de cellules de cancer du sein [6].

Trois lignées cellulaires (MDA-MB-468, MCF-7 et SKBR3) ont été cultivées, leur métabolisme ayant été interrompu avec du méthanol. Le protocole d'extraction méthanol/chloroforme/eau a été optimisé pour obtenir un maximum de métabolites en quantité suffisante [7]. Afin d'obtenir les concentrations des métabolites intracellulaires, une procédure d'ajouts dosés a été mise en place : un mélange modèle de 15 métabolites est ajouté à différentes concentrations dans chaque échantillon d'extraits préparé en triple exemplaire. Le protocole est caractérisé par de très bonnes performances analytiques (justesse supérieure à 1%, excellente linéarité). La concentration absolue des 15 métabolites est ainsi déterminée dans les 3 lignées, révélant des différences significatives entre leurs profils métaboliques. Les concentrations mesurées sont en bon accord avec les résultats connus sur le métabolisme du cancer du sein. Cette méthodologie offre un haut degré de discrimination et un outil puissant pour la quantification de biomarqueurs.

Références bibliographiques

- [1] Slupsky, CM. et al., *Anal. Chem.*, 2007, 79 : 6995-7004.
- [2] Tredwell, GD. et al., *Anal. Chem.*, 2011, 83 : 8683-8687.
- [3] Lewis, IA. et al., *Anal. Chem.* 2007; 79: 9385–9390.
- [4] Gronwald, W. et al., *Anal. Chem.* 2008; 80: 9288–9297.
- [5] Martineau, E. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54 : 252-257.
- [6] Martineau, E. et al., *NMR Biomed.*, 2012, in press.
- [7] Martineau, E. et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401 : 2133-2142.

Mots-clés : Méthodologie, RMN 2D, analyse quantitative, métabolomique, cancer

Evaluation analytique de la RMN 2D ultrarapide pour la quantification de métabolites dans les mélanges complexes

Adrien Le Guennec, Illa Tea, Serge Akoka, Patrick Giraudeau

Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, Nantes, France

Les analyses d'échantillons métaboliques par RMN sont souvent limitées à l'acquisition et au traitement statistique de spectres 1D pour une identification des métabolites et une discrimination entre de nombreux échantillons. La détermination précise des concentrations est alors rendue difficile par le recouvrement important entre les pics. Pour contourner ce problème, l'utilisation de méthodes 2D peut être envisagée [1] afin d'obtenir une meilleure discrimination entre les signaux des métabolites. Cette approche est toutefois limitée par le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir un spectre 2D avec une résolution suffisante. Cependant, une approche récente, nommée RMN 2D « ultrarapide » [2] permet de se libérer de cette contrainte, par la possibilité d'obtenir un spectre 2D en un seul scan. Pour l'analyse quantitative, le temps d'acquisition n'est plus limité que par le nombre d'accumulations nécessaires à la détection et la quantification des métabolites. Nous avons démontré récemment [3] la supériorité, en termes de sensibilité, de l'approche ultrarapide par rapport à l'approche conventionnelle pour une même durée d'expérience. Afin de comparer les performances analytiques des deux approches, des mélanges modèles de 14 métabolites ont été étudiés. Pour des concentrations allant de 2 à 10 mM et un temps d'expérience de 10 minutes, la répétabilité à moyen terme (évaluée sur 3 séries de 5 expériences) est de l'ordre de 2 à 3% en RMN ultrarapide, contre 6 à 9% pour la RMN conventionnelle. Ces résultats démontrent l'intérêt de l'approche ultrarapide, qui est également caractérisée par une meilleure linéarité (0.9901 à 0.9995 en 2D ultrarapide, et de 0.9775 à 0.9989 en 2D conventionnelle). Ces performances nous permettent d'envisager l'application de la RMN 2D ultrarapide au dosage de métabolites dans les échantillons biologiques. Les tout premiers spectres ultrarapides obtenus sur des extraits de lignées de culture cellulaire seront présentés.

Références bibliographiques

- [1] Martineau, E. et al., NMR Biomed., 2012, in press.
- [2] Frydman, L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99 : 15858-15862.
- [3] Pathan, M. et al., Analyst 2011, 136 : 3157-3163.

Mots-clés : Méthodologie, RMN 2D, RMN ultrarapide, analyse quantitative

P40

Etude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques par analyse des réseaux de corrélation chez *Datura innoxia* Mill.

Kieu Oanh Nguyen, Rebecca Dauwe, Eric Gontier

Université de Picardie Jules Verne, BIOPI, UFR des Sciences, Ilot des poulies, 33 rue Saint Leu, 80039
Amiens cedex, France
nguyen.thi.kieu.oanh0711@gmail.com

Les alcaloïdes tropaniques sont des métabolites secondaires d'intérêt pharmacologique et produits par de nombreuses espèces de la famille des *Solanaceae*. En particulier, la scopolamine est utilisée comme agent anticholinergique. Dans la plante, elle est synthétisée dans les jeunes cellules racinaires. La transformation par *Agrobacterium rhizogenes* de plantes telles que *Datura* conduit à un développement exacerbé de racines (hairy roots) et, en conséquence, stimule fortement la biosynthèse de la scopolamine (1). La bioaccumulation de scopolamine reste toutefois limitée pour une production commerciale. Une compréhension plus fine des voies de biosynthèse mises en jeu pourrait permettre le développement de stratégies relevant du génie métabolique: augmentation de la synthèse de molécules d'intérêt par stimulation des étapes limitantes ou par blocage de voies compétitives. A ce jour, la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques a été largement étudiée via l'utilisation de marquages isotopiques. Cependant, des ambiguïtés majeures persistent dans la littérature. A titre d'exemple, le rôle de l'hygrine dans la voie de biosynthèse de la scopolamine n'est pas clair à ce jour (2). Pour progresser dans cette voie, nous avons réalisé une étude métabolique portant sur des racines d'un grand nombre d'individus de *Datura innoxia* cultivés en hydroponie et en présence ou en l'absence d'*Agrobacterium rhizogenes*. Après réalisation d'un profilage métabolique par GC-MS, nous avons analysé les corrélations entre métabolites. Cette approche a permis : i) d'élaborer des hypothèses concernant le fonctionnement de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques, ii) d'identifier les étapes limitantes et, iii) de caractériser les modifications induites par la transformation avec *A. rhizogenes*.

Références bibliographiques

- (1) L. Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101: 6786-6791
(2) T.W. Abraham T.W., Leete, E., J. Am. Chem. Soc., 1995, 117 : 8100

Mots-clés : métabolomique, corrélations, alcaloïdes tropanique

Cigaretanalysis : metabolomics analysis of tobacco from cigarettes

Laetitia Shintu, Stefano Caldarelli, Mylene Campredon

Ism2-UMR-CNRS 7313, Aix-Marseille Université, 13397 Marseille cedex 20, France

Traceability and quality control of the cigarettes delivered to the market represent major stakes in terms of human health and economic development. The chemical composition of cigarette tobacco is a complex molecular mixture resulting from the blend of several tobacco varieties, humectants, sugars and flavor ingredients. Generally, the main blend of tobacco varieties are made with a mixture of flue-cured, oriental and burley tobaccos [1]. During the cigarette processing, propylene glycol [2] and glycerol [3] are used to increase the moisture holding capacity of the tobacco while additives as menthol [4] are added to enhance the aroma or smoke flavor.

In this study, we evaluated the potential of HR-MAS NMR-based metabolomics to discriminate cigarette tobacco according to their brands. Experiments were conducted on six types of international cigarette brands (Kool, Camel, Marlboro, Ducados, Gauloises and Pueblo). Ducados and Gauloises are constituted with dark tobaccos while Camel, Marlboro, Kool and Pueblo are light cigarettes. Kool are mentholed cigarettes and Pueblo are additive-free tobaccos cigarettes. In the first part of this poster, we show that Cigaretanalysis, i.e. the metabolomics analysis of tobacco from cigarettes, is efficient for the discrimination between dark and blond tobacco cigarettes. Moreover, we show that Cigaretanalysis could be a tool of choice for the identification of counterfeit cigarettes. Indeed, NMR profile database of specific cigarette brand tobaccos could be created and used to identify counterfeit cigarettes. As a proof-of principle, we present here how the Cigaretanalysis approach was able to discriminate counterfeit Marlboro cigarettes from genuine ones coming from seven different countries.

Références bibliographiques

- [1] Giokas, D. L.; Thanasoulis, N. C.; Vlessidis, A. G.; Multivariate chemometric discrimination of cigarette tobacco blends based on the UV–Vis spectrum of their hydrophilic extracts. *J. Hazard. Mater.* 2011, 185, 86–92.
- [2] Gaworskia, C. L.; Oldhama, M. J.; Cogginsb, C. R. Toxicological considerations on the use of propylene glycol as a humectants in cigarettes. *Toxicology* 2010, 269, 54–66.
- [3] Carmines, E. L.; Gaworski, C. L. Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. *Food Chem. Toxicol.* 2005, 43, 1521–1539.
- [4] Gaworski, C. L.; Dozier, M. M.; Gerhart, J. M.; Rajendran, N.; Brennecke, L. H.; Aranyl, C.; Heck, J. D. 13-Week Inhalation Toxicity Study of Menthol Cigarette Smoke. *Food Chem. Toxicol.* 1997, 35, 683-692.

Mots-clés :cigaretanalysis, quality control, metabolomics, cigarette tobacco

Metabolomics of small samples: Miniaturized sample-preparation for GC×GC-TOFMS based metabolite analysis.

Alexander Erban¹, Joachim Kopka¹, Sjaak de Koning², Lorraine Kay²

¹*Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Germany*

²*LECO European Technical Centre (ETC), Separation Science, Mönchengladbach, Germany*

Within the last years robust GC-MS metabolite fingerprinting and profiling platforms and routines were established for fresh plant material in a range of 50mg to 150mg basic raw material. Since the scientific progress shows a tendency towards observations of more specific cell-types and organs from plants, miniaturization during sample-preparation became necessary.

A range of miniaturization methods during sample-preparation are presented, such as manual tissue micro dissections, liquid micro sampling and laser-microdissection coupled to laser pressure catapulting of cyrosections, in short laser-microdissections (LMD). An outlook into the potential of GC×GC-ToF-MS will be given, with focus on plant cyrosamples prepared with LMD.

Metabolite isolation and confident identification were made possible of Micro-level, single cell, LMD prepared cryosamples using this new approach. Despite the complexity of the embedding material, which caused sample matrix interferences, the use of GCxGC provided superior chromatographic resolution. Hence, it was possible to overcome the previous interference & contamination problems from the embedding material. Additionally, high data acquisition rates of the GC×GC-TOFMS (≥ 100 spectra/sec) enabled accurate identification of metabolites of interest by taking advantage of automated deconvolved Mass Spectra.

Mots-clés : Metabolomics, GCxGC TOF MS

Approche métabolomique sur plusieurs souches de microalgues

Coralie AUDOIN (1,2), Laurent RIOS (2), Olivier P. THOMAS (1)

(1) *Université de Nice Sophia-Antipolis, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272 CNRS, Parc Valrose, 06108 NICE email : coralie.audoin@unice.fr*

(2) *GREENSEA, Parc scientifique et environnemental promenade du sergent Navarro 34140 MEZE*

Les microalgues présentes à la fois dans les eaux douces et salées compteraient plus de 200 000 espèces [1]. Cette diversité en fait une source potentielle de métabolites secondaires originaux. En effet, à ce jour, de nombreuses molécules produites par plusieurs espèces de microalgues sont utilisées dans la cosmétique, la pharmacétique ou l'alimentaire [2,3]. Parmi les principales familles de substances naturelles valorisées on peut citer pigments, lipides, protéines, polysaccharides, caroténoïdes avec des activités cytotoxiques, antioxydantes, antimicrobiennes [4]. Une vision plus globale du métabolome de chacune des espèces apparaît aujourd'hui nécessaire pour mieux mettre en valeur le potentiel commercial que représente cette « biodiversité ».

Pour cela, nous avons tout d'abord choisi d'approcher le métabolome de différentes souches de microalgues que nous cultivons en s'appuyant sur les techniques de RMN pour une visualisation large. Cette étude nous a permis de regrouper les espèces par analogie métabolomique après traitement statistique des données.

L'analyse ciblée du métabolome de quelques espèces a également été entreprise. En particulier, la caractérisation d'une famille de glycolipides issus d'une souche de microalgue a pu être effectuée par des méthodes usuelles de chimie des substances naturelles.

Références bibliographiques

- [1] Pulz O., Gross W., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 65: 365-648
- [2] Plaza M. et al, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57: 7159-7170
- [3] Spolaore P. et al, *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, 101: 87-96
- [4] Singh S. et al, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2005 25:73-95

Mots-clés : métabolites secondaires, microalgues, glycolipides

P44

Evaluation of GC x GC-TOF MS for human metabolic disorders research and diagnostics.

**Jitka Zrostlíková, PhD¹, Tomáš Kovalczuk, PhD¹, Doc. Tomáš Adam, PhD², Petr Wojtowič²,
Jakub Schůrek¹**

1- LECO Application laboratory, Sokolovská 219, 190 00 Praha 9, Czech Republic

2- Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, I.P.Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic

In the presented work, the GC x GC-TOF MS (LECO Pegasus 4D) method has been developed for the analysis of derivatized (TMS) samples of urine extracts as well as extracts from human fibroblasts. The presented paper shows the quantitative results for urines from healthy persons and patients suffering from inherited metabolic diseases diagnostically challenging by GC-MS (e.g. mitochondrial respiratory chain and beta-oxidation defects) as well as initial results from human cultured skin fibroblast analysis. The performance of the method is compared to a classic quadrupole GC-MS method.

Références bibliographiques

- [1] Fiehn et al., Nat Biotechnol., 18 (2000) 1157-1161.
- [2] O'Hagan et al., Anal. Chem, 79 (2005) 464-476.
- [3] Shellie et al., J. Chromatogr. A 1086 (2005) 83-90.
- [4] Konstantinos et al., J. of Chromatogr. A, 1217 (2010) 104-111.

Mots-clés : GC x GC-TOF MS Metabolomics LECO

P45

L'approche métabolomique pour le dépistage de stanozolol dans l'urine équine par LC/HRMS

Natali STOJILJKOVIC¹, Marie-Agnès POPOT¹, Yves BONNAIRE¹, Alain PARIS², Jean-Claude TABET³, Christophe JUNOT⁴

1LCH, Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières-le-Buisson

2Met@risk INRA, 16, rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05

3 LCSOB-IPCM, UMR 7201, CNRS, UPMC, Bat.F72, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

4CEA, Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire d'analyse du Métabolisme du Médicament, Centre de Saclay, Bat 136, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

n.stojiljkovic@lchfrance.fr

L'approche métabolomique dans le domaine du contrôle du dopage a déjà fait ses premiers pas. La possibilité de suivre l'ensemble des perturbations métabolique suite à l'administration des produits prohibés nous a dirigés vers un profilage métabolique global. Plus particulièrement, dans le cadre du dépistage des stéroïdes anabolisants, le stanozolol, un stéroïde anabolisant exogène, a été choisi pour l'étude métabolomique, dans l'urine de cheval.

Une étude animale en deux temps a été réalisée à la station expérimentale des Haras Nationaux de Chamberet. Afin d'étudier les variations physiologiques du profil métabolomique, 14 juments ont été suivies pendant près d'un an et des échantillons d'urine ont été recueillis deux fois par mois. Ensuite, les mêmes juments ont été impliquées dans le protocole d'administration. Deux groupes de 5 juments ont reçu un traitement chronique de stanozolol (4 fois tous les 4 jours) à deux doses différentes (total de 0.4 et 1.2 mg/kg), par voie intramusculaire. Les 4 autres juments ont reçu le véhicule d'administration. La collecte des échantillons d'urine a été réalisée pendant environ huit mois.

Après une précipitation à l'acétonitrile, les échantillons ont été analysés sur un micrOTOF-QII (Bruker) couplé à un système HPLC Ultimate (Dionex). La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne de phase inverse Uptisphere C18 (100 * 2.1 mm, 2.2 µm) en 25 minutes de temps d'analyse. L'acquisition des empreintes HR/MS s'est déroulée sous ESI dans les deux modes de détection, positif et négatif. Les données ainsi obtenues ont été retraitées sous R avec le logiciel XCMS et par la suite, les analyses statistiques multivariées ont été réalisées avec le logiciel SIMCA P 12 (Umetrics).

Une modification du métabolome urinaire des chevaux après traitement au stanozolol a été mise en évidence. Un modèle descriptif pour différencier une population traitée au stanozolol d'une population de chevaux non traitée a été développé. Toutefois, une population plus nombreuse est nécessaire pour obtenir un modèle prédictif robuste. Afin d'améliorer ce modèle, nous avons rajouté 19 échantillons positifs en hydroxy-stanozolol et 19 échantillons négatifs de la routine de notre laboratoire et les résultats qui en découlent seront présentés et discutés.

Mots-clés : dopage, stéroïdes anabolisants, urine équine, chromatographie liquide, spectrométrie de masse

Développement d'un modèle métabolomique pour dépister l'administration de facteurs de croissance chez le cheval.

F. Boyard-Kieken, P. Garcia, AC. Paris, B. Loup, L. Bailly-Chouriberry, MA. Popot, et Y. Bonnaire.

Laboratoire des Courses Hippiques (LCH), 5 Rue de paradis - 91370 Verrières le Buisson.

Contact : b.loup@lchfrance.fr, f.boyard@lchfrance.fr

En compétitions sportives, l'amélioration des performances physiques peut conduire à l'usage de substances ayant pour but de stimuler les effets endogènes de l'hormone de croissance (GH). Dans le domaine des courses hippiques, l'utilisation de la GH et d'autres facteurs de croissance est strictement interdite. Pour ces substances, des tests de détection basés sur des méthodes analytiques ont déjà été développés et sont utilisés de manière routinière [1][2]. Cependant, la mise au point de nouvelles méthodes permettant un dépistage plus large de ces produits dopants, via la métabolomique, semble être un axe de recherche adapté afin d'améliorer le contrôle et la lutte anti dopage [3][4].

L'objectif de notre étude est de développer un modèle statistique unique permettant de suspecter une administration de facteur de croissance quelle que soit sa forme : reGH (« recombinant equine GH »), rpGH (« recombinant porcine GH ») ou IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor »). Des échantillons d'urines provenant de chevaux exposés et non-exposés à ces composés ont ainsi été analysés par LC HRMS et les données obtenues traitées statistiquement selon une analyse multivariée de type régression PLS-DA (« Partial Least Squares regression - Discriminant Analysis »).

Dans un premier temps, des analyses exploratoires descriptives ont été conduites par Analyses en Composantes Principales (ACP), puis des modèles statistiques prédictifs ont été développés pour chacune des substances permettant de discriminer les individus traités des individus non traités. Subséquemment, un modèle statistique unique basé sur une sélection de 470 métabolites communs aux trois traitements et pertinents d'un point de vue statistique et chimique a été mis en place. Ce modèle est capable de détecter chez le cheval l'usage de reGH, de rpGH et d'IGF-1 jusqu'à respectivement 16, 15 et 30 jours après le début du traitement.

Notre travail met alors en évidence que l'utilisation d'un protocole expérimental rapide, comportant peu d'étapes, couplée à l'application d'un modèle statistique prédictif unique permet de suspecter l'usage de trois facteurs de croissance différents chez le cheval. Il serait maintenant intéressant d'étendre cet outil à la détection d'autres facteurs de croissance tels que les GHRP (« GH Releasing Peptides ») et d'appliquer cette méthodologie au suivi anti dopage des chevaux de course (passeports équin) en réduisant le nombre de métabolites nécessaires au modèle, tout en conservant une bonne discrimination.

[1] Bailly-Chouriberry L et al., *Anal Chem.*, 2008, Nov 1;80(21):8340-7.

[2] Bailly-Chouriberry L et al., *Analyst.*, 2008, Feb;133(2):270-6.

[3] Boyard-Kieken F et al., *J Sep Sci.*, 2011, Dec;34(24):3493-501.

[4] Kieken F et al., *Anal Bioanal Chem.*, 2009, Aug;394(8):2119-28.

Ce travail fait suite à des travaux de thèses partagés entre le LCH et LABERCA.

Approche métabolomique de l'amélioration de la tolérance au stress hydrique induite par l'acide β -amino butyrique (BABA) chez le lin (*Linum usitatissimum*)

Anthony Quéro¹, Ophélie Fliniaux¹, Redouan Elboutachfaiti¹, Xavier Guillot², Corinne Pau-Roblot¹, François Mesnard¹ et Josiane Courtois¹.

¹ *Laboratoire de BIOlogie des Plantes & Innovations UPJV, IUT / GB, Avenue des Facultés, Le Bailly, 80025 Amiens Cedex, France. Email : queroanthony@yahoo.fr*

² *Laboulet Semences, 1 rue Carnot, 80270 Airaines, France*

La culture du lin oléagineux (*Linum usitatissimum*), tombée en désuétude au siècle dernier, trouve un regain d'intérêt au travers d'une teneur élevée en composés valorisables par leurs activités pharmacologiques (acide α -linoléique, lignanes)[1]. Malgré ce regain d'intérêt, le lin est encore considéré comme une culture trop peu productive notamment à cause de son exposition régulière à un stress hydrique qui perturbe le rendement. Afin de revaloriser cette espèce et de limiter les pertes de rendement attribuées à ce manque de disponibilité en eau, l'apport de BABA (acide aminé non-protéinogène ayant déjà prouvé son efficacité contre ce type de stress chez d'autres espèces végétales [2-3]) a été étudié dans le cadre d'une approche pharmacologique pour lutter contre ce problème de tolérance au stress hydrique.

Les travaux conduits ont permis de mettre en évidence que les plantes préalablement traitées avec le BABA conservent une teneur en eau plus importante en situation de stress hydrique que les plantes non traitées, et résistent mieux au stress hydrique. Cette amélioration de la tolérance est associée à une reconfiguration majeure du métabolome foliaire qui se traduit essentiellement par une accumulation de solutés organiques. Cette réorganisation du métabolome présente de forts chevauchements de réponse avec celle obtenue dans les feuilles de lin suite à l'application d'un choc osmotique léger (-0,30 MPa). L'amélioration de la tolérance au stress hydrique induite par le BABA est également associée à une diminution du potentiel osmotique des feuilles. Cette déviation du potentiel osmotique n'est pas due à l'accumulation des solutés organiques mais provient d'une diminution de la teneur en eau. L'ensemble de ces résultats montre que le BABA induit un stress hydrique léger chez le lin et suggère que le BABA conduit à une acclimatation de la plante qui se traduit par une réorganisation du métabolome et par une diminution du potentiel osmotique.

[1] Touré A et Xueming X, CRFSFS, 2010, vol.9, pp. 261-269

[2] Jakab et al., Plant Physiol, 2005, vol.139, pp. 267-274

[3] Macarasin et al., Plant Cell Environ, 2009, vol.32, pp 1612-1631

Data-processing and metabolites identification: toward a comprehensive automation in Metabolomics studies.

Sylvain CHEREAU¹, Anne-Lise ROYER^{1, 3}, Frédérique COURANT¹, Jean-Philippe ANTIGNAC^{1, 2}, Fabrice MONTEAU¹, Bruno LE BIZEC¹

1 LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France.

2 INRA, Nantes, F-44307, France.

3 INRA, Rennes, F-35653, France.

*Contacts : Sylvain CHEREAU (sylvain.chereau@oniris-nantes.fr),
Anne-Lise ROYER (anne-lise.royer@oniris-nantes.fr)*

Metabolomics is an area of increased interest in many scientific fields among which food quality and safety. It includes the development of analytical methods with the ultimate goal being the identification of so-called biomarkers. To reach this aim, many steps are needed and one significant bottleneck in 'MS-omics' approaches remains probably to relate differential signals to biological metabolites. By nature and principle, metabolomics studies generate huge amounts of data. To have access to the information, the deconvolution of global chemical profiles is an essential post acquisition step in an LC-MS based 'omics' applications [1]. To perform this step, XCMS software is used through an automation script developed according to the laboratory needs and analytical conditions, giving access to all MS signals (ions) detected. The identification of revealed biomarkers is needed for biological interpretation purposes and it may be achieved through a databank. Different public databanks are available but the most straightforward approach to obtain the unambiguous confirmation of the identity of metabolites in a biological sample is to test commercially available standard compound on the same analytical system. As a result, an in house-databank was developed in order to facilitate metabolite structural elucidation, using ACD/Labs software [2]. This databank, containing more than 130 fully characterized compounds (retention time, exact mass, ionization behavior, fragmentation patterns...) is in constant development to better cover as much metabolic pathways as possible. Furthermore, an automatic Excel© macro was developed to help filtering and allowing a fast and direct annotation of compounds in the XCMS table. Principle and main advantages of this macro will be presented.

[1] J.-P. Antignac, F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, C. Elliott, B. Le Bizec. Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30, 2011, P. 292-301.

[2] G. Dervilly-Pinel, F. Courant, S. Chéreau, A.-L. Royer, F. Boyard-Kieken, J.-P. Antignac, F. Monteau and B. Le Bizec. Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances. *Drug. Test Analysis* 2012, 4 (Suppl. 1), 1-11

CORSAIRE (COopérationS en métAbolomIque du gRand ouEst) : la plate-forme de BIOGENOUEST dédiée au profilage métabolique et à la métabolomique.

Laurent Rivet¹, Alain Bouchereau², Michel Krempf³ et Jacques Guéguen⁴

¹Animateur, INRA, UMR IGEPP, Domaine de la Motte, BP 35327 - 35653 Le Rheu Cedex, laurent.rivet@rennes.inra.fr

²Coordinateur, UMR IGEPP, INRA-Agrocampus Ouest-Université de Rennes 1, Amélioration des plantes et Biotechnologies Végétales, Rennes alain.bouchereau@univ-rennes1.fr

³Coordinateur, INSERM CRNH l'institut du thorax SFR Santé, F Bonamy – IRT UN. 8 quai Moncousu BP 70721 44007 Nantes Cedex 1, Michel.Krempf@univ-nantes.fr

⁴Responsable, UR 1268 BIA, INRA rue de la Géraudière 44316 NANTES CEDEX 3 Jacques.Gueguen@nantes.inra.fr

La plate-forme *Corsaire*, créée en 2010, est la dernière née des plates-formes technologiques en Sciences du Vivant portées par le GIS Biogenouest. Elle a vocation à réunir compétences et technologies analytiques associées au profilage métabolique et à la métabolomique et à proposer un dispositif coordonné soutenant l'activité des structures de recherche adossées à Biogenouest et accessible à la communauté scientifique nationale.

Corsaire est structuré en réseau de plateaux techniques supportés par différentes tutelles académiques (INRA, Universités, CNRS, INSERM) et implantées autour de 3 grands pôles géographiques du nord Ouest (Brest-Roscoff, Nantes et Rennes). La coordination centralisée du dispositif en réseau repose sur les complémentarités technologique et thématique des différents plateaux, sur l'harmonisation des procédures de fonctionnement et de conditions d'accès et sur le partage et la mutualisation d'outils bioinformatiques.

Le réseau *Corsaire* couvre un large spectre de champs thématiques :

- Santé humaine, nutrition.
- Agronomie : production animale et végétale, qualité et santé
- Mer : valorisation, adaptation, évolution.
- Environnement.

Les savoir-faire relèvent à la fois de capacités d'analyses (qualitative, quantitative, structurale) ciblées de produits des métabolismes primaire, secondaire, de xénobiotique, médicaments, polluants à partir de matrices biologiques d'origines diversifiées (microbienne, animale, végétale) mais aussi d'approches holistiques à caractère métabolomique. La plate-forme dispose d'un très large parc analytique basé sur les technologies de RMN et de spectrométrie de masse en couplage avec différents moyens de chromatographie.

Contact : Laurent Rivet, laurent.rivet@rennes.inra.fr

Metabolic profiling: a tool to develop elicitor on *Cucumis melo* for sustainable agriculture.

Bellvert F¹, Hamzaoui J¹, Gonçalves-Martin M¹, Guerrand J², Hallier S², Meiffren G¹,
Michalet S¹, Brachet M-L³, Comte G¹

¹ CESN, UMR 5557, CNRS Université Claude Bernard Lyon1, Villeurbanne F-69622 France

² Vegenov, Penn Ar Prat, 29250 Saint Pol de Léon France

³ CTIFL, Centre de Balandran, 751 Chemin de Balandran 30127 Bellegarde France

The reduced use of pesticides is an essential component of sustainable agricultural practices and must be in compliance competitiveness with our agriculture. Among the alternatives for crop protection, elicitor which stimulates natural plant defenses represents an important field of research methodology. In the present state of the use of elicitor, too many contradictions are observed between field experiments and laboratory tests, without knowing if the product doesn't have the expected action, or if the activated plant defense is sufficient or not to limit the development of the pathogen. Therefore to increase the reliability of experiments and provide explanatory material, efficient biological indicators of potentiation and activation of natural plant defenses have to be developed. Secondary metabolites including phenylpropanoids that play an important role in the defense mechanism of plants [1], are one of the main runways as biomarkers of defense stimulation.

Our main objective is to better understand the action of the elicitor in vitro and identify biological markers to permit monitoring of the effectiveness of this elicitor in field condition. For this we used the *Cucumis melo* / *Podosphaera xanthii* pathosystem in which we investigated the impact of 6 different developing elicitors on phenolic content of melon's leaves by UHPLC/DAD/QTOF. This work is inserted in the DefiLeg project which aim is to develop alternative solution for vegetable crop.

First the metabolic profiling of phenolic compounds in leaves of melon, before and after inoculation of *P. xanthii*, helped to highlight fifteen flavonoids among which ten have never been described. These flavonoids are glycosylated flavone type (mono, di or tri-glycoside) substituted or not with cinnamic acid (caffeic or p-coumaric acid). Quantitative results indicated that this class of compounds is involved in the defense reaction of melon.

In a second step we looked at the impact of elicitor on these identified compounds in leaf melon. The main difference between elicitor treatment and control appears after the inoculation with the pathogen as shown in figure 1. The plant treated with elicitor show a better resistance than untreated plant. We are following now the evolution of flavonoid content on melon's leaves for 3 elicitors in field experiment.

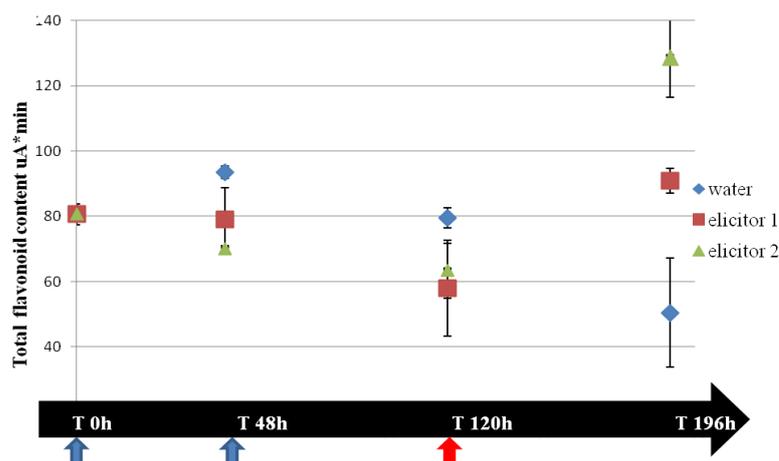


Figure 1 Impact of elicitor treatments on total flavonoid content in leaves of melon

↑ Elicitor or water treatment

↑ Inoculation of *P. xanthii*

These results show the potentiation action of the elicitor in the melon and suggest that metabolic profiling can be used in the development of induced resistance in melon for crop protection.

Reference :

[1] Dixon, R. et al (2002) Molecular plant pathology. 3: 371-390.

Phenols involvement in invasive ability of *Fallopia* species complex.

Meiffren G¹, Bellvert F¹, Walker V¹, Bertrand C², Comte G¹, Piola F³

1 CESN, UMR 5557, CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne F-69622 France

2 LCBE, Université de Perpignan, Perpignan F-66860 France

3 UMR 5023, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne F-69622 France

There is growing concern about the potential impact of invasive exotic plants upon ecosystems. Most invasive plants are phytochemically unique in their habitats, and many of the phytoconstituents from these plants have been reported to have multiple activities, including antiherbivore, antifungal, antimicrobial and allelopathic effects, which provide the plants with several advantages in their new environments [1].

Giant Knotweeds *Fallopia japonica* and *F. sachalinensis* are well-known East Asian perennials that are established throughout USA and Europe, modifying ecosystems and threatening endemic biodiversity [2, 3]. Recent hybridization events implicating *F. japonica* and *F. sachalinensis* in the invasive range have lead to a new species *F. x bohémica* or more precisely to a complex of polyploid hybrids [4]. In Europe, studies have shown that the two most widespread species of the genus are *F. japonica* and *F. x bohémica* [5]. *F. x bohémica* tends to replace *F. japonica*, with a greater aggressiveness, a bigger ecological amplitude and a capacity of regeneration by vegetative reproduction surpassing that of its parents [6, 7].

As the presence of different metabolites might confer ecological advantages to the introduced varieties, the aim of this work is to correlate the invasive ability of a *Fallopia* species complex with their phenolic composition. Parental species and hybrids roots hydro-alcoholic extracts have been performed and analyzed by HPLC-DAD-ESIMS.

First level of investigation reveals a great variability in metabolic profiles between parental species. Qualitative and quantitative richness of phenolic compounds, including piceid and resveratrol for which interesting bioactivities have already been reported [8, 9], is more important in roots extracts of *F. japonica* than *F. sachalinensis*. Considering invasiveness of *F. x bohémica* close to that of *F. japonica*, as expected, chemical content of both plant extracts present a great similarity.

Second level of investigation based on statistical analysis confirms differences between the parental species while *F. x bohémica* tends to get closer to *F. japonica* with transgressive segregation for some constituents of hybrids.

These results give new insights in the invasive ability of the different *Fallopia* species and suggest that the most invasive species could present the most important amount and diversity of phenols.

References :

- [1] Cappuccino, N.; Arnason, J. T. (2006) *Biology Letters*. 2: 189-193.
- [2] Dassonville, N. et al. (2007) *Ecoscience*. 14: 230-240.
- [3] Gerber, E. et al. (2008) *Biological Conservation*. 141: 646-654.
- [4] Bailey, J. P.; Conolly, A. P. (2000) *Watsonia*. 23: 93-110.
- [5] Tiébré, M. S. et al. (2007) *Journal of Botany*. 94: 1900-1910.
- [6] Mandak, B. et al. (2003) *Annals of Botany*. 92: 265-272.
- [7] Pysek, P. et al. (2003) *American Journal of Botany*. 90: 1487-1495.
- [8] Arichi, H. et al. (1982) *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 30: 1766-1770.
- [9] Jayatilake, G. et al. (1993) *Journal of Natural Products*. 56: 1805-1810.

Influence d'un stress environnemental sur l'expression du métabolome de coraux sclérectiniaires ; mise au point méthodologique.

Fahoullia Mohamadi, Isabelle Bonnard, Cédric Bertrand et Bernard Banaigs

*Laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement, Université de Perpignan,
66860 Perpignan.
fahoullia.mohamadi@gmail.com*

Les récifs coralliens comptent parmi les écosystèmes les plus diversifiés de la planète mais aussi parmi les plus menacés. Le récif est en déclin ; 10% des récifs dans le monde sont irrémédiablement condamnés et 30% d'entre eux sont très fortement menacés.

Les perturbations environnementales, induites par les changements climatiques et les activités humaines, affectent aujourd'hui grandement toutes les fonctions physiologiques des coraux et conduisent au phénomène de blanchissement (expulsion des algues symbiotiques ou perte des pigments chlorophylliens) et éventuellement à la mort des coraux ^[1, 2]. La symbiose corallienne impliquerait une reconnaissance mutuelle et un échange de métabolites entre les deux partenaires ^[4]. Le déclin des récifs coralliens souligne l'importance de comprendre les mécanismes qui régulent le maintien de la symbiose et plus généralement de la biodiversité au sein de l'écosystème.

Des perturbations, biotiques ou abiotiques, peuvent affecter la physiologie des coraux et induire des variations dans l'expression du métabolome des espèces coralliennes. Le but de cette étude est de mettre au point une méthode globale d'analyse du métabolome de coraux sclérectiniaires.

L'extraction des métabolites est réalisée sur l'holobionte (polypes, zooxanthelles, et squelette calcaire), différents solvants polaire et apolaire ont été testés dans diverses proportions afin d'optimiser l'extraction des métabolites ciblés. Le partage des deux phases (polaire et apolaire) ainsi obtenues permet de réaliser, séparément, les empreintes chimiques (RMN, LC-PDA-MS, GC-MS) des molécules polaires et apolaires ^[4]. La méthode d'extraction a été validée sur deux espèces de sclérectiniaire : *Stylophora pistillata* et *Pocillopora damicornis*.

Références :

- [1] Baker A.C. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2008, Vol 80 : 435-471.
- [2] Hughes T. Science, 2003, Vol 301 : 929-933.
- [4] Braid.A.H. et al, Trends in Ecology and Evolution, 2008, Vol 24 :16-20.
- [5] Wu H. et al, Analytical Biochemistry, 2008, Vol 372 : 204-212.

La lipidomique dans la compréhension du film hydrolipidique cutané

Rime Michael-Jubeli^{1a}, Ali Tfayli^{1a}, Jean Bleton^{1b}, Dominique Bertrand², Arlette Baillet-Guffroy^{1a}

¹EA 4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud 11,

^aFaculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry,

^bLETIAM-IUT d'Orsay, Université de Paris-Sud. r.michael-jubeli@hotmail.fr

²Equipe Bioinformatique, Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes.

Le film hydrolipidique est l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement. Il offre à la peau une protection efficace et contribue à ses propriétés de barrière. Les lipides cutanés de surface (LCS) qui le constituent, résultent de l'activité des glandes sébacées et de la desquamation de l'épiderme. Leur composition est étroitement liée à l'activité enzymatique à la surface cutanée et peut être modifiée quand le film hydrolipidique est impliqué dans certaines perturbations cutanées.

Le but de notre travail était, tout d'abord, d'obtenir un profil global de l'ensemble des LCS, riche en informations structurales, et d'autre part, de proposer différentes approches permettant de suivre l'évolution physiologique et pathologique du film hydrolipidique au niveau moléculaire.

La caractérisation des LCS a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS). Le protocole analytique a été développé en conservant les structures lipidiques dans leur état initial. Plus de 200 composés ont été identifiés et répartis en 5 classes (1).

Plusieurs approches analytiques ont été développées afin d'extraire de ces profils complexes, d'éventuels marqueurs biologiques liés à des situations physiologiques variées.

Après une normalisation interne permettant l'analyse quantitative par classe, nous avons pu établir des descripteurs chromatographiques. Par exemple, la répartition des LCS sur différentes zones corporelles se traduit par un ratio squalène/cholestérol plus élevé dans les zones riches en glandes sébacées que dans les zones pauvres (1). Ce descripteur est un bon critère d'évaluation de la balance sécrétion sébacée/desquamation, et par conséquent du diagnostic de maladies cutanées dues au dysfonctionnement de ces activités.

L'exploitation chimométrique globale des composés considérés individuellement (approche lipidomique) nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

Dans l'étude portant sur l'évolution des LCS en fonction de la localisation géographique et/ou la couleur de la peau, l'analyse multivariée de la globalité des données analytiques a exalté une différence de composition liée à localisation géographique. Le facteur majeur à l'origine de cette différence est un composé spécifique de l'activité sébacée chez l'homme : l'acide sapiénique (C16:1Δ6) (2). Il peut être utilisé comme marqueur de l'adaptation de l'activité sébacée à des conditions de vie différentes (climatiques, culturelles, hygiéniques, alimentaires...).

Dans l'étude portant sur l'évolution des LCS du nouveau-né dans les premiers mois de sa vie, après une étape de réduction des données analytiques sans perte d'information, l'analyse univariée a montré une augmentation sélective de cholestérol estérifié par des acides gras d'origine épidermique. Cela indique un accroissement de la participation relative des lipides épidermiques dans le film hydrolipidique comme résultat d'une diminution de la sécrétion sébacée. De plus, la représentation cartographique de l'ensemble des données permet une lecture rapide de l'évolution des LCS révélant, notamment, une diminution de la quantité globale de sécrétion sébacée. Cette cartographie pourrait constituer une aide aux thérapeutes pour le diagnostic précoce d'une perturbation du mécanisme d'auto-équilibre de la peau avec l'âge.

Les approches analytiques développées dans ce travail permettent une caractérisation moléculaire fine des LCS. Les outils statistiques et chimométriques ont permis une exploitation plus poussée des résultats pour extraire des informations inaccessibles par les approches classiques.

Références bibliographiques

1. Michael-Jubeli R. et al. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling. *Journal of Lipid Research*. JLR. 2011. **52**: 143-151.
2. Michael-Jubeli R. et al. Chemometric approach for investigating the skin surface lipids (SSLs) composition: influence of geographical localization. *European Journal of Dermatology*. EJD. 2011. **21**: 63-71.

Mots-clés : Lipidomique, film hydrolipidique cutané, HT-GC/MS, caractérisation structurale, traitement chimométrique, évolution physiologique et pathologique.

Towards real-time metabolic profiling of a biopsy specimen during a surgical operation by ^1H high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance.

Martial PIOTTO¹, Francois-Marie MOUSSALLIEH^{2,3}, Agnès NEUVILLE⁴, Jean-Pierre BELLOCQ⁴, Karim ELBAYED², Izzie-Jacques NAMER^{3,5}

¹ Bruker BioSpin, 34 Rue de l'Industrie, 67166 Wissembourg, France.

² Université de Strasbourg, Institut de Chimie, UMR 7177, 4 Rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France.

³ Service de Biophysique et Médecine Nucléaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France.

⁴ Service d'Anatomie Pathologique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France.

⁵ Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Institut de Physique Biologique, UMR 7237, 4 Rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France.

email: fmmoussallieh@chimie.u-strasbg.fr.

Introduction:

Providing information on cancerous tissue samples during a surgical operation can help surgeons delineate the limits of a tumoral invasion more reliably. Here, we describe the use of metabolic profiling of a colon biopsy specimen by high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy to evaluate tumoral invasion during a simulated surgical operation.

Case presentation:

Biopsy specimens (n = 9) originating from the excised right colon of a 66-year-old Caucasian women with an adenocarcinoma were automatically analyzed using a previously built statistical model [4].

Conclusions:

Metabolic profiling results were in full agreement with those of a histopathological analysis. The time-response of the technique is sufficiently fast for it to be used effectively during a real operation (17 min/sample). Metabolic profiling has the potential to become a method to rapidly characterize cancerous biopsies in the operation theater.

Références bibliographiques :

Bathen TF et al. Cancer Research 2010, 70: 6692-6696.

Beckonert O et al. Nat Protoc 2010, 5: 1019-1032.

Kinross JM et al. Lancet 2011, 377: 1817-1819.

Piotto M et al. Metabolomics 2009, 5: 292-301.

Mots-clés: Metabolic profiling, real time, HRMAS NMR, biopsy, surgical operation.

La métabolomique pour étudier l'adaptation à la salinité chez l'algue brune modèle *Ectocarpus*

Goulitquer S. ⁽¹⁾, Dittami S. ⁽²⁾, Delage L. ⁽²⁾, Leblanc C. ⁽²⁾, Potin P ⁽²⁾ & Tonon T. ⁽²⁾

⁽¹⁾ *MetaboMER, FR2424, CNRS-UPMC, Station Biologique, Roscoff, France.*

⁽²⁾ *CNRS, UPMC Univ Paris 6, UMR 7139, Végétaux marins et biomolécules, Station Biologique, Roscoff, France.*

La colonisation des eaux douces par des espèces marines est un événement rare, et peu de données sont disponibles sur ces mécanismes d'adaptation. Les algues brunes sont une lignée indépendante d'organismes photosynthétiques et multicellulaires dont peu d'espèces sont recensées dans les eaux douces. L'algue brune marine *Ectocarpus* [1], dont une souche est présente dans les eaux douces des chutes Hopkins en Australie, apparaît dans ce contexte comme un modèle de choix pour l'analyse et la compréhension des transitions entre habitats.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation, nous nous sommes intéressés à la tolérance à la salinité et à l'adaptation à de faibles salinités de la souche d'eau douce d'*Ectocarpus*. Parallèlement à des études morphologique et transcriptomique [2], nous avons mené une étude métabolomique de ces transitions.

Une approche d'UPLC/MS a été développée pour suivre les modifications métabolomiques selon la salinité. Nous montrons que le métabolome de la souche d'eau douce cultivée dans l'eau de mer s'apparente en partie à celui de la souche marine. Nous avons identifiés certains métabolites caractéristiques de la culture en eau de mer, ainsi que d'autres relatifs aux bouleversements métaboliques induit par le changement de milieu de culture.

Les résultats de transcriptomique montrent l'augmentation de l'expression du gène de la polykétide synthase de type III (PKS) impliquée dans la synthèse des phlorotannins lors de la culture d'*Ectocarpus* en eau de mer. De plus, le dosage du phloroglucinol, synthétisé par la PKS, met en évidence une forte augmentation de ce métabolite en condition d'eau de mer. Ainsi, la voie de synthèse des phlorotannins apparaît comme impliquée dans l'adaptation à la salinité.

Ces analyses ont permis de décrire les mécanismes métaboliques d'adaptation en réponse à des changements de salinité d'une souche d'eau douce comparée à une souche d'eau de mer et d'en extraire des bio-marqueurs d'intérêt [3]. Ces résultats illustrent comment des études de métabolites ciblés et de métabolomique couplées à la transcriptomique permettent de mieux comprendre les phénomènes d'adaptation.

Références bibliographiques:

- [1] Cock JM et al., *The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae*. Nature. 2010 Jun 3;465(7298):617-21.
- [2] Dittami et al., *Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in Ectocarpus (brown algae)*. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04982.x
- [3] Goulitquer et al., *Mass spectrometry-based metabolomics to elucidate functions in marine organisms and ecosystems*. Marine Drugs, 2012, 10, 849-880.

Mots clés: Mer, UPLC-MS, Adaptation, Salinité

Communications Etudiants Master Toulousains

EM1

Présentation du Master Pro de Biochimie Structurale Protéomique et Métabolomique.

Maxime Julien

*Laboratoire CEISAM, Groupe EBSI, CNRS-Université de Nantes UMR6230, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes,
e-mail : maxime.julien44@gmail.com*

EM2

Cancer et métabolomique: intérêt pour la clinique.

Lenaic Leroux^{1,2}, Claire Bonnet², Maxime Julien^{2,3}, Audrey Gargaros²

¹ *Toxalim INRA, 180 chemin de Tournefeuille, St-Martin-du-Touch BP 3, 31931 Toulouse cedex.
lerouxlenaic@yahoo.fr*

² *Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse*

³ *Laboratoire CEISAM, Groupe EBSI, CNRS-Université de Nantes UMR6230, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes*

EM3

Cancer et métabolomique: intérêt pour la compréhension fine de la cellule cancéreuse

**Florian Cappelleso, Mohammed Kebdani, Mama Lazaz,
Romain Trouillard, Malia Yaici**

*Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse
e-mail : florian.cappelleso@gmail.com*

Atelier 1

Le traitement post-acquisition des données métabolomiques générées par couplage chromatographie – spectrométrie de masse

Une des approches classiquement utilisée en métabolomique consiste en la collection de profils (empreintes) métaboliques globales par des techniques spectrométriques, en vue de la mise en évidence, par une approche différentielle, de modifications du métabolome entre une population d'échantillons 'témoins' et une population d'échantillons 'tests'. Un premier objectif est ainsi de mieux comprendre, sur le plan biologique, les modifications métaboliques consécutives à un ou plusieurs facteurs donnés. Un second objectif peut être la mise en place de modèles diagnostiques basés sur des biomarqueurs candidats. Divers outils, procédures et méthodes ont ainsi été développés par la communauté scientifique œuvrant dans ce domaine afin de conduire de telles études métabolomiques, s'agissant de la préparation des échantillons, de la génération des profils métaboliques, du retraitement des données brutes ou encore de l'analyse statistique de ces données par des techniques multi-variées. Toutefois, les stratégies analytiques et les algorithmes de traitement utilisés restent très variables, et une absence de solutions consensuelles est constatée en dépit de nombreux travaux menés dans ce domaine par différentes équipes. Les deux étapes les plus en aval du 'métabolomic workflow', consistant d'une part à retraiter les signaux bruts générés et d'autre part en l'élucidation structurale de potentiels biomarqueurs mis en évidence, qui se situent à l'interface entre la chimie analytique et la bioinformatique, restent en particulier un sujet de débat qui mérite aujourd'hui un échange entre les différents acteurs et utilisateurs de ces techniques. Dans ce contexte, cet atelier proposera une discussion autour de deux étapes clés des études métabolomiques que sont i) la déconvolution des données brutes et ii) l'élucidation structurale des signaux différentiels mis en évidence au cours de l'analyse. Il sera co-animé par Jean-Charles Martin (INRA - Alim H), Christophe Junot (CEA) et Frédérique Courant (Oniris).

i) En effet, de nombreux outils sont disponibles afin de déconvoluer les données acquises par spectrométrie de masse, que ce soient des logiciels développés par les constructeurs (Sieve, MassHunter, MarkerLynx, MarkerView...) ou par des équipes académiques (MetAlign, xcms, MZmine, MET-IDEA...). Parmi ces différentes solutions, le script xcms, développé sous l'environnement de programmation R, a l'avantage d'être téléchargeable gratuitement et est largement utilisé par la communauté métabolomique. Toutefois, son utilisation peut apparaître complexe si les différentes commandes de ce script ne sont pas totalement maîtrisées. Le premier objectif de cet atelier sera donc d'amener les participants à une meilleure compréhension de cet outil par l'explicitation des différentes fonctions et arguments régissant son utilisation. Cet atelier permettra aux différents utilisateurs de R-xcms de confronter leur solution de paramétrage et favorisera une discussion autour de l'influence des différents paramètres choisis sur les résultats obtenus.

ii) Lorsqu'il s'agit de caractériser des profils métaboliques plus largement que suivant une liste définie a priori de substances recherchées, l'étape finale d'élucidation structurale reste encore aujourd'hui un exercice extrêmement long et difficile, et qui n'est pas encore compatible avec le niveau de fiabilité et de traitement à haut débit visé. Celui-ci nécessite en effet à la fois une bonne connaissance du système biologique étudié, l'exploitation correcte de différentes informations analytiques (poids moléculaire expérimentalement mesuré en haute résolution, massifs isotopiques, règles d'or classiquement utilisées en chimie...), ou encore l'interrogation de bases de données en ligne. Il peut de plus nécessiter des étapes supplémentaires de pré-concentration, de purification, ou

encore l'emploi de plusieurs techniques spectrales complémentaires lorsque les niveaux de concentration et le volume d'échantillon disponible le permettent. Malgré ces différents moyens disponibles, cette étape reste actuellement un réel challenge, et la mise en place d'une stratégie permettant l'annotation rapide d'un maximum de composés organiques clés au sein d'empreintes métabolomiques globales et non ciblées représente aujourd'hui un enjeu majeur pour le développement de cette thématique. Le LABERCA s'est intéressé au développement d'un tel outil par le biais de l'acquisition de différents modules du logiciel ACD labs. Ainsi, la création d'une banque de données spectrales a été initiée, et celle-ci est le support du mécanisme d'annotation automatique d'empreintes spectrométriques générées par différents instruments au sein de l'Unité. Le second objectif de cet atelier sera de présenter cet outil, depuis sa conception jusqu'à son implémentation et ses premières applications. Cet atelier permettra ensuite de favoriser les échanges entre les différents laboratoires utilisateurs de spectrométrie de masse concernant cette étape clé d'élucidation structurale des biomarqueurs candidats.

Date : le 23 mai 2012 de 14h à 17h

Lieu: LABERCA – ONIRIS Route de Gachet 44300 Nantes

Une navette sera assurée entre la faculté des sciences et ONIRIS après le déjeuner et un retour vers la gare SNCF de Nantes sera organisé à 17h. Une visite des locaux du LABERCA sera intégrée dans le programme de l'après-midi.

Contacts : Jean-Philippe ANTIGNAC : jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr

Frédérique COURANT : frederique.courant@oniris-nantes.fr

Atelier 2

Méthodes d'acquisition et de traitement des données en RMN métabolomique

Cet atelier s'adresse en priorité à un public désirant acquérir des connaissances de base en acquisition et traitement des données pour l'analyse métabolomique par RMN. Il sera réalisé en collaboration avec la société Bruker Biospin.

Programme prévisionnel

14h00-15h00 : Présentation des méthodes d'acquisition et de traitement

15h00-16h30 : Mise en pratique d'outils de traitement des données métabolomiques

16h30 : Discussions et clôture

Date : le 23 mai 2012 de 14h à 17h

Lieu: Université de Nantes , Amphi Pasteur, (site des 6 JS RFMF)

Contacts : Serge AKOKA : Serge.Akoka@univ-nantes.fr
Patrick GIRAUDEAU : patrick.giraudeau@univ-nantes.fr

Atelier 3

Evaluation of metabolomics data with multivariate methods in SIMCA-13 & Quantitative Systems biology in SIMCA 13

TUTORIEL UMETRICS – SIGMA PLUS

Erik Johansson, Umea, Suède, et Christian Charles, Levallois-Perret, France.

Computer Room (18 computers with SIMCA 13 trial system installed)

Basic Omics example and a more complex one.

Evaluation of metabolomics data with multivariate methods in SIMCA-13

A chemometric approach in metabolomics consists of four steps: (1) definition of the aim, (2) selection of objects or samples, (3) sample preparation and characterization, and (4) evaluation of the collected data.

The demo will focus on the fourth step using Principal Components Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) of Metabolomics data. OPLS-DA was found to be a top contender for omics analysis in a recent Nature Biotechnology article. doi:10.1038/nbt.1665. The presentation will be on Gc-Ms metabolomics data and follow the strategy outlined in Anal. Chem. 2008, 80, 115-122.

Plenary Session (1.5 hour) Amphi A

Quantitative Systems biology in SIMCA 13

Data integration refers to the amalgamation of data from disparate parts of a system to produce an understanding of the system as a whole. In a systems biology-based research paradigm, these efforts often involve combining data from multiple analytical platforms (*i.e.*, metabolomics, proteomics, transcriptomics, genomics) into a single concatenated data set to identify biologically relevant shifts.

PLS finds linear regression models by projecting the predicted variables and the observable variables to a new space. While OPLS and PLS have identical predictive performance, the orthogonal components in OPLS provide a powerful tool for model interpretation. O2PLS defines the joint variations that exist between data from differing analytical platforms, separating predictive variations unique to each analytical platform, as well as orthogonal variation for each platform.

We present a preliminary example workflow of how O2PLS can be used to integrate and reduce omics datasets from two different technology platforms.

Liste des Participants

Aguesse Audrey

Plate forme de spectrometrie de masse
CRNH/SFR F Bonamy UMR_S1087 IRT-UN
8 quai Moncoussu BP 70721
44007 Nantes
audrey.aguesse@univ-nantes.fr

Aidoud Nacima

UMR S 1062 Nutrition obésité et risque
thrombotique
27 bvd Jean Moulin, Fac Méd La Timone
13005 Marseille
Nacima.AIDOUD@univ-amu.fr

Akoka Serge

CEISAM - Bat9
2 rue de la houssinière,
44322 Nantes cedex
serge.akoka@univ-nantes.fr

Albert Benjamin

UMR INRA 1349 IGEP
campus de beaulieu bat14A rdc
263 Avenue du General Leclerc
35042 Rennes
Rennes benjamin.albert@univ-rennes1.fr

Alexandre-Gouabau Marie-Cécile

INRA, UMR Physiologie des Adaptations
Nutritionnelles, CHU-Hôtel Dieu, HNB 1,
Place Alexis Ricordeau
44093 Nantes cedex
Marie-Cecile.Alexandre-Gouabau@univ-
nantes.fr

Amiot-Carlin Marie-Josèphe

INRA1260 NORT
27 bvd Jean Moulin, Fac Méd La Timone
13005 Marseille
marie-josephe.amiot-carlin@univ-amu.fr

Antheaume Ingrid

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
ingrid.antheaume@univ-nantes.fr

Antignac Jean-Philippe

ONIRIS-LABERCA
ONIRIS Chantrerie, Route de Gachet
44307 Nantes
jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr

Assemat Olivier

BRUKER
34 rue de l'Industrie, BP 10002
67166 Wissembourg
olivier.assemat@bruker.fr

Audoin Coralie

Institut de Chimie de Nice
28 avenue Valrose - Parc Valrose
06100 Nice
coralie.audoin@unice.fr

Bailly Xavier

Station biologique de Roscoff FR2424
Place George Tessier
29280 Roscoff
bailly@sb-roscoff.fr

Balayssac Stéphane

Groupe de RMN Biomédicale Laboratoire de
Synthèse et Physico-Chimie de Molécules
d'Intérêt Biologique (SPCMIB) UMR CNRS
5068, Université Paul Sabatier
118, Route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex 9
balayssac@chimie.ups-tlse.fr

Baltenweck-Guyot Raymonde

UMR1131 INRA/UdS - équipe MSV-
Métabolisme secondaire de la Vigne
28 rue de Herrlisheim
68021 COLMAR
raymonde.baltenweck@colmar.inra.fr

Banaigs Bernard

LCBE - Université de Perpignan
52 avenue Paul Alduy
66860 Perpignan
banaigs@univ-perp.fr

Barrett Mike

Scottish Metabolomics facility (ScotMet)
University of Glasgow
Glasgow, G12 8QQ, Scotland
Michael.Barrett@glasgow.ac.uk

Bayle Kevin

CEISAM - Bat9
2 rue de la houssinière,
44322 Nantes cedex
kevin.bayle@univ-nantes.fr

Bellvert Floriant

Centre d'Etude des Substances Naturelles
CESN
Université Lyon 1 la Doua
Bât. Forel 4^{ème} étage –
43 bd du 11 Novembre 1918
69100 Villeurbanne
floriant.bellvert@univ-lyon1.fr

Berardocco Solenne

UMR INRA 1349 IGEPP
campus de beaulieu bat14A rdc
263 Avenue du General Leclerc
35042 Rennes cedex
solenne.berardocco@univ-rennes1.fr

Bernillon Stéphane

Plateforme Métabolome de Bordeaux &
UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie
INRA Université de Bordeaux
71, avenue E. Bourleaux, BP 81
33140 Villenave d'Ornon
stephane.bernillon@bordeaux.inra.fr

Bichon Emmanuelle

ONIRIS-LABERCA
ONIRIS Chantrerie, Route de Gachet
44307 Nantes
emmanuelle.bichon@oniris-nantes.fr

Biran Marc

RMSB
146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux
marc.biran@rmsb.u-bordeaux2.fr

Blanchet Elodie

MMS - Université de Nantes
9, rue Bias BP53508
44035 Nantes
elodie.blanchet@etu.univ-nantes.fr

Blondel Claire

LECA (CNRS), Université Joseph Fourier
BP53X
F-38041 Grenoble cedex 09
blondel.claire@yahoo.fr

Boisseau Renaud

CEISAM - Bat9
2 rue de la houssinière,
44322 Nantes cedex
renaud.boisseau@etu.univ-nantes.fr

Bossis Mathilde

European Commission, Joint Research
Centre, Institute for Health and Consumer
Protection
TP 281, Via Enrico Fermi 2749
I-21027 Ispra (VA)
Italie
mathilde.bossis@jrc.ec.europa.eu

Bouchereau Alain
UMR IGEPP
Domaine de la Motte
35653 Le Rheu
alain.bouchereau@univ-rennes1.fr

Boudah Samia
CEA, DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM
CEA, Centre d'étude de saclay
91191 Gif-sur-Yvette
samia.boudah@cea.fr

Boudra Hamid
INRA, UR1213 Herbivores
63122 Saint Genès Champanelle
abdelhamid.boudra@clermont.inra.fr

Bourgin Marc
ONIRIS-LABERCA
ONIRIS Chantrerie, Route de Gachet
44307 Nantes
marc.bourgin@oniris-nantes.fr

Bringaud Frédéric
RMSB UMR5536
Université Bordeaux Segalen,
146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux
Bringaud@rmsb.u-bordeaux2.fr

Bulteau Gaëlle
CSTB
11, rue Henri Picherit
44323 Nantes cedex 03
gaelle.bulteau@cstb.fr

Cabasson Cécile
Plateforme Métabolome de Bordeaux &
UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie
INRA Université de Bordeaux
71, avenue E. Bourleaux, BP 81
33140 Villenave d'Ornon
ccabasso@bordeaux.inra.fr

Cahoreau Edern
Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes
Biologiques et des Procédés / MetaSys
135 avenue de Rangueil
31077 Toulouse
cahoreau@insa-toulouse.fr

Canet Isabelle
ICCF
Université Blaise Pascal,
24 av des Landais, BP 80026
63177 Aubière Cedex
isabelle.canet@univ-bpclermont.fr

Canlet Cécile
UMR INRA 1331 TOXALIM
180, chemin de Tournefeuille
31931 Toulouse cedex 9
ccanlet@toulouse.inra.fr

Cannet Claire
Bruker BioSpin GmbH
Silberstreifen
76287 Rheinstetten, Germany
Claire.Cannet@bruker-biospin.de

Cappelleso Florian
Université Paul Sabatier
118 route de Narbonne
31062 Toulouse
florian.cappelleso@gmail.com

Caron Christophe
Station Biologique – CNRS
Place Georges Teissier
29680 Roscoff
christophe.caron@sb-roscoff.fr

Carvalho Maryline
UNITY LAB SERVICES
3 route de Dourdan
91520 Egly
maryline_carvalho@hotmail.com

Charles Christian
SIGMA PLUS
6 rue Collange
92300 Levallois-Perret
ccharles@sigmaplus.fr

Chassaigne Hubert

European Commission, Joint Research
Centre, Institute for Health and Consumer
Protection
TP 281, Via Enrico Fermi 2749
I-21027 Ispra (VA)
Italie
hubert.chassaigne@ec.europa.eu

Chéreau Sylvain

ONIRIS-LABERCA
ONIRIS Chantrerie, Route de Gachet
44307 Nantes
sylvain.chereau@oniris-nantes.fr

Clément Gilles

LC2V INRA
INRA versailles-Grignon
78026 Versailles
gilles.clement@versailles.inra.fr

Collin Olivier

Symbiose
INRIA/Irisa - Campus de Beaulieu
35042 Rennes Cedex - France
olivier.collin@irisa.fr

Colsch Benoit

CEA, DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM
Centre CEA-SACLAY
91190 Gif sur Yvette
benoit.colsch@cea.fr

Corbin Agnès

NonLinearDynamics
Keel House Garth Heads
NJ1 2 JE
Newcastle Upon Tyne, UK
Agnes.Corbin@nonlinear.com

Corman Bruno

Profilomic
31 rue d'Aguesseau
92100 Boulogne Billancourt
bruno.corman@profilomic.com

Correc Gaëlle

UMR 7139 végétaux marins et biomolécules
Station biologique de Roscoff
Place George Tessier
29280 Roscoff
correc@sb-roscoff.fr

Corrihons Fabien

LECO France
ZAC Les Doucettes
22 avenue des Morillons
F-95144 Garges-Les-Gonesse cedex
Fabien.Corrihons@lecofrance.fr

Cotton Jérôme

Profilomic
31 rue d'Aguesseau
92100 Boulogne Billancourt
Jerome.cotton@profilomic.com

Coulier Leon

Netherlands Metabolomics Centre, Leiden,
TNO, Zeist,
Pays-Bas
leon.coulier@tno.nl

Courant Frédérique

ONIRIS-LABERCA
ONIRIS Chantrerie, Route de Gachet
44307 Nantes
frederique.courant@oniris-nantes.fr

Coze Fabien

DEINOVE
CAP ALPHA Avenue de l'Europe
34830 Clapiers
fabien.coze@deinove.com

Creis Emeline

UMR 7139 végétaux marins et biomolécules
Station biologique de Roscoff
Place George Tessier
29280 Roscoff
ecreis@sb-roscoff.fr

Culioli Gérald
MAPIEM
Avenue Georges Pompidou
83162 La Garde
culioli@univ-tln.fr

da Costa Jacob Cristina
ONIRIS-LABERCA
ONIRIS Chantrerie, Route de Gachet
44307Nantes
cristina.da-costa-jacob@oniris-nantes.fr

Dabadie Christophe
Thermo Scientific
16 avenue du Québec - Silic 765
91140 Villebon-sur-Yvette
Christophe.Dabadie@thermofisher.com

Dalgalarrondo Michèle
BIA
BP 71627
44316 Nantes Cedex 3
michele.dalgalarrondo@nantes.inra.fr

Daniel Pierrick
AB SCIEX
Nantes
Pierrick.Daniel@absciex.com

Dariy Ekaterina
LGBM, Genoscope
2 rue Gaston Crémieux
91000 Evry
edariy@genoscope.cns.fr

de Oliveira Samira
Plate forme de spectrometrie de masse
CRNH/SFR F Bonamy UMR_S1087
IRT-UN 8 quai Moncousu BP70721
44007 Nantes
samira.de-oliveira@etu.univ-nantes.fr

Deborde Catherine
Plate-forme Métabolome-Fluxome,
&UMR1332 Biologie du Fruit & Pathologie,
INRA Université Bordeaux
71, avenue E. Bourlaux, BP 81
33140 Villenave d'Ornon
cdeborde@bordeaux.inra.fr

Defoort Catherine
UMR INSERM 1062
27 Bd Jean Moulin
13005 Marseille
catherine.defoort@univmed.fr

Delanoue Benoît
CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
benoit.delanoue@etu.univ-nantes.fr

Delort Anne-Marie
ICCF
CNRS-Université Blaise Pascal
24 avenue des Landais
63177 Aubière cedex
A-Marie.Delort@univ-bpclermont.fr

Dervilly-Pinel Gaud
LABERCA - Oniris
Chantrerie, Route de Gachet
44307Nantes
gaud.pinel@oniris-nantes.fr

Desvallees Jean-Luc
Agilent Technologies
33 rue du Dr Georges Levy
Parc/Club du moulin à vent
69693 Vénissieux
jean-luc_desvallees@non.agilent.com

Diomande Gbe Didier
CEISAM - Bat9
2 Rue de la houssinière,
44322 Nantes cedex
dggbe@yahoo.fr

Drouy  Freddy
Waters S.A.S.
BP 608
78056 Saint-Quentin en Yvelines Cedex
freddy_drouye@waters.com

Dubois Nolwenn
U892
8 quai Moncousu
44007 Nantes
Nolwenn.Dubois@inserm.fr

Emond Patrick
UMR INSERM 930
10 bd Tonnellé BP3223
37032 Tours cedex 1
emond@univ-tours.fr

Fages Anne
Centre de RMN à très hauts champs de Lyon
5 rue de la doua
69100 Villeurbanne
anne.fages@ens-lyon.fr

Fauvelle Florence
CRSSA
24 avenue des Maquis du Grésivaudan
38700 La Tronche
florence.fauvelle@free.fr

Favé Gaëlle
UMR 1062 INSERM / 1260 INRA / AMU
27 Bd Jean Moulin
13005 Marseille
Gaelle.FAVE@univ-amu.fr

Ferchaud-Roucher Véronique
Plateforme spectrométrie de masse CRNH,
U915
IRT-UN 8 quai Moncoussu BP70721
44007 Nantes
veronique.ferchaud-roucher@univ-nantes.fr

Fernandes Lucy
Waters Corporation,
Atlas Park, Manchester M22 5PP
Royaume-Uni
lucy_fernandes@waters.com

Fillâtre Yoann
UMR1019 Nutrition Humaine
Centre de Recherche de Clermont-
Ferrand/Theix
63122 Saint-Genes-Champanelle
yoann.fillatre@clermont.inra.fr

Gaillard Vincent
Centre d'Etude des Substances Naturelles -
UMR5557 Ecologie Microbienne
UCB Lyon 1
Bât. Forel 4^{ème} étage - 43 bd du 11 Novembre
1918
69622 Villeurbanne Cedex
vincent.gaillard@univ-lyon1.fr

Genin Eric
Thermo Scientific
16 avenue du Québec - Silic 765
91140 Villebon-sur-Yvette
Eric.Genin@thermofisher.com

Gharsallah Abdelkader
MMS - Université de Nantes
9, rue Bias BP53508
44035 Nantes
gharsallah.abdelkader@yahoo.fr

Giacomoni Franck
INRA - UNH-PFEM
Centre INRA de Theix
63122 St Genes Champanelle
franck.giacomoni@clermont.inra.fr

Gilard Françoise
Plateforme Métabolisme-Métabolome
IBP - Bat 630 - Université Paris Sud 11
91400 Orsay
francoise.gilard@u-psud.fr

Giraudeau Patrick
CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
patrick.giraudeau@univ-nantes.fr

Gonçalves Olivier
GEPEA - UMR CNRS 6144
Bât. CRTT, 37 bd de l'Université, BP 406
44602 Saint-Nazaire Cedex
olivier.goncalves@univ-nantes.fr

Gontier Eric

BIOPI EA3900-UPJV "Biologie des Plantes
et Innovation" Ilot des poulies, UFR de
Sciences,
33 rue Saint Leu
80039 Amiens
eric.gontier@u-picardie.fr

Goulitquer Sophie

MétaboMER
Place Georges Tessier
29680 Roscoff
sophie.goulitquer@sb-roscoff.fr

Grappin Philippe

AgroParisTech, UFR Physiologie Végétale
16 Rue Claude Bernard,
75231 Paris Cedex 05
philippe.grappin@agroparistech.fr

Gravot Antoine

UMR 1349 IGEPP INRA/Agrocampus
Ouest/Université Rennes 1
INRA, Domaine de la Motte, BP 35327
35653 Le Rheu
Antoine.Gravot@univ-rennes1.fr

Greff Stéphane

IMBE UMR CNRS 7263 - IRD 237
Centre Saint-Charles
3, place Victor Hugo
13331 Marseille cedex 03
stephane.greff@imbe.fr

Grovel Olivier

MMS - Université de Nantes
9, rue Bias BP53508
44035 Nantes
olivier.grovel@univ-nantes.fr

Gueguen Jacques

INRA
Rue de la Géraudière-BP 71627
44316 Nantes cedex 3
jacques.gueguen@nantes.inra.fr

Guillou Claude

Joint Research Centre of the European
Commission Institute for Health & Consumer
Protection - Systems Toxicology unit
TP281 via Fermi, 2
21020 Ispra
Italie
claud.guillou@jrc.ec.europa.eu

Guitton Yann

UMR USTL/INRA1281 SADV "Stress
abiotiques et différenciation des végétaux
cultivés" IFR147
Bâtiment SN2 USTL
59655 Villeneuve d'Ascq
yann.guitton@univ-lille1.fr

Guyot Sylvain

INRA, UR117 Cidricoles, Biotransformation
des Fruits et légumes
Domaine de la Motte, BP35327
35653 Le Rheu
sylvain.guyot@rennes.inra.fr

Hamzaoui Jihane

Centre d'Etude des Substances Naturelles -
UMR5557 Ecologie Microbienne
UCB Lyon 1
Bât. Forel 4^{ème} étage - 43 bd du 11 Novembre
1918
69622 Villeurbanne Cedex
jihane.hamzaoui@univ-lyon1.fr

Hance Philippe

UMR USTL/INRA1281 SADV "Stress
abiotiques et différenciation des végétaux
cultivés" IFR147
Bâtiment SN2 USTL
59655 Villeneuve d'Ascq
philippe.hance@univ-lille1.fr

Harant Adeline

UMR USTL/INRA1281 SADV "Stress
abiotiques et différenciation des végétaux
cultivés" IFR147
Bâtiment SN2 USTL
59655 Villeneuve d'Ascq
adeline.harant@gmail.com

Hay Anne-Emmanuelle
CESN ISPB UMR5557 Ecologie
Microbienne UCB Lyon 1
Pavillon Netien 2^{ème} étage - 8 av. Rockefeller
69373 Lyon
hay.de-bettignies@univ-lyon1.fr

Hennion Françoise
UMR 6553 Ecobio, Université de Rennes 1 –
CNRS
Campus de Beaulieu
35042 Rennes
francoise.hennion@univ-rennes1.fr

Herrenknecht Christine
MMS - Faculté de Pharmacie de Nantes
9 rue Bias - BP 53508
44035 Nantes Cedex 01

Heux Stéphanie
LISBP INSA
135 Avenue de Rangueil
31077 Toulouse
heux@insa-toulouse.fr

Hidalgo Kevin
UMR CNRS 6553, ECOBIO, Université
Rennes 1
Avenue Général Leclerc, Campus Beaulieu,
bât 14a, CS 74205
35042 Rennes Cedex
kevin.hidalgo@univ-rennes1.fr

Hivin Patrick
DEINOVE
CAP ALPHA Avenue de l'Europe
34830 Clapiers
Patrick.hivin@deinove.com

Hubert Jane
Institut de Chimie Moléculaire Reims
Université de Reims Champagne-Ardenne,
Moulin de la Housse, BP 1039
51687 Reims
jane.hubert@univ-reims.fr

Humeau Philippe
CSTB
11, rue Henri Picherit
44323 Nantes Cedex 03
philippe.humeau@cstb.fr

Ichou Farid
IPCM/ CSOB
4 place Jussieu- BAT F 7^{ème} étage
75252 Paris
farid.ichou@upmc.fr

Jacob Daniel
Plate-forme Métabolome-Fluxome,
&UMR1332 Biologie du Fruit & Pathologie,
INRA Université Bordeaux
71, avenue E. Bourleaux, BP 81
33140 Villenave d'Ornon
djacob@bordeaux.inra.fr

Jamin Emilien
Toxalim INRA
180 chemin de Tournefeuille
St-Martin-du-Touch BP 3
31931 Toulouse cedex
jamin@toulouse.inra.fr

Jobard Elodie
Centre de RMN à très hauts champs de Lyon
5 rue de la doua
69100 Villeurbanne
elodie.jobard@ens-lyon.fr

Johansson Erik
Umetrics
Box 7960,
907 19 Umeå
Suède
erik.johansson@umetrics.com

Joly Charlotte
Centre de Theix-PFEM
63122 St Genes Champanelle
charlotte.joly@clermont.inra.fr

Jouan-Rimbaud Bouveresse Delphine
INRA, UMR 1145 "Ingénierie Procédés
Aliments"
16, rue Claude Bernard
75231 Paris Cedex 05
delphine.bouveresse@agroparistech.fr

Jourdain Sabine
Bruker Daltonique
34 rue de l'industrie
67166 Wissembourg
Sabine.jourdain@bruker.fr

Jourdan Fabien
Toxalim INRA
180 chemin de Tournefeuille
St-Martin-du-Touch BP 3
31931 Toulouse cedex
fjourdan@toulouse.inra.fr

Jousse Cyril
ICCF
Chimie 4 (1^{er} étage),
24 avenue des Landais, BP 80026
63171 Aubière
cyril.jousse@univ-bpclermont.fr

Julien Maxime
CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
maxime.julien44@gmail.com

Junot Christophe
CEA
DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM
91191 Gif sur Yvette cedex
christophe.junot@cea.fr

Kerzaon Isabelle
CESN ISPB UMR5557 Ecologie
Microbienne UCB Lyon 1
Pavillon Netien 2^{ème} étage
8 av. Rockefeller
69373 Lyon
isabelle.kerzaon@univ-lyon1.fr

Khelalfa Farid
IRBA-CRSSA / LECA
24 avenue des maquis du Grésivaudan
38702 La Tronche cedex
farid.khelalfa@gmail.com

Kouame Bi Koffi François
CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
Francois.Kouame@etu.univ-nantes.fr

Krempf Michel
Institut du Thorax UMR_S1087
IRT-UN
8 quai Moncouso BP 70721
44007 Nantes
michel.krempf@univ-nantes.fr

Lagrée Marie
Centre Régional de Mesures Physiques
(CRMP)
24 avenue des Landais
63000 Aubière
marie.lagree@univ-bpclermont.fr

Larvor Vanessa
Université de Rennes 1
263 Avenue du Gal Leclerc, CS 74205
35042 Rennes
vanessa.larvor@univ-rennes1.fr

Le Bizec Bruno
LABERCA – Oniris
Route de gachet
44307 Nantes
bruno.lebizec@oniris-nantes.fr

Le Boucher Clémentine
INRA-STLO
65 Rue de Saint Briec
35042 Rennes
clementine.leboucher@rennes.inra.fr

Le Gall Gwénaëlle
Institute of Food Research
Norwich Research Park,
Norwich NR2 2BD
Royaume-Uni
gwenaelle.legall@bbsrc.ac.uk

Le Guennec Adrien
CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
adrien.le-guennec@etu.univ-nantes.fr

Le Moyec Laurence
UBIAE INSERM U902
rue du père Jarlan
91025 Evry
laurence.lemoyec@univ-evry.fr

Leblanc Catherine
UMR Végétaux Marins et Biomolécules
Station Biologique
29680 Roscoff
leblanc@sb-roscoff.fr

Lechaplais Christophe
LGBM, Genoscope
2, rue Gaston Cremieux - CP5706
91057 Evry Cedex
chaplais@genoscope.cns.fr

Lees Michèle
EUROFINS Analytics France
Site de la Géraudière
44300 Nantes
MicheleLees@eurofins.com

Leroux Lenaïc (M.)
Toxalim INRA
180 chemin de Tournefeuille
St-Martin-du-Touch BP 3
31931 Toulouse cedex
lerouxlenaic@yahoo.fr

Leroy Gaëla
Veolia Environnement Recherche et
Innovation
Immeuble "LeDufy", 1 Place de Turenne
94417 Saint Maurice Cedex
gaela.leroy@veolia.com

Lombard Marie-Lou
UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie
SFR Biologie Intégrative et Ecologie
INRA, BP 81
33140 Villenave d'Ornon
lombard@bordeaux.inra.fr

Loquet Denis
CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
denis.loquet@univ-nantes.fr

Lorrain Yves
Advanced Chemistry Development
(ACD/Labs)
3 quai Kléber, Tour Sébastopol,
67000 Strasbourg
Yves.Lorrain@acdlabs.com

Loup Benoît
Laboratoire des Courses Hippiques
15 rue de Paradis
91370 Verrières le Buisson
loup_benoit@hotmail.com

Lugan Raphael
Plate-forme métabolomique de l'IBMP
12, rue du général Zimmer
67084 Strasbourg cedex
raphael.lugan@ibmp-cnrs.unistra.fr

Lyan Bernard
Centre de Theix – PFEM
63122 St Genès Champanelle
bernard.lyan@clermont.inra.fr

Mari Silvia

Dulbecco Telethon Institute
Via Olgettina 58
20132 Milano
Italy
mari.silvia@hsr.it

Marion Didier

INRA Unité Biopolymères Interactions
Assemblages
La Géraudière
44316 Nantes cedex 3
marion@nantes.inra.fr

Maout Etienne

Thermo Scientific
16 avenue du Québec - Silic 765
91140 Villebon-sur-Yvette
etienne.maout@thermofisher.com

Marnet Nathalie

Inra- Unité de Recherches Cidricoles
Domaine de la Motte
BP 35327
35653 Le Rheu Cedex
Nathalie.Marnet@rennes.inra.fr

Martin Jean-Charles

Biomet_NORT
Faculté de médecine de La Timone
27 bd Jean Moulin
13385 Marseille
jean-charles.martin@univmed.fr

Martin Jean-François

INRA UNH UMR1019
63122 Saint Genes Champanelle
martin@clermont.inra.fr

Martin-Agnoux Aurore

INRA UMR Physiologie des Adaptations
Nutritionnelles, CHU-Hôtel Dieu, HNB 1,
Place Alexis Ricordeau
44093 Nantes cedex
Aurore.Martin-Agnoux@univ-nantes.fr

Martineau Estelle

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
estelle.martineau@univ-nantes.fr

Martin-Jézéquel Véronique

MMS, EA 2160
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
veronique.martin-jezequel@univ-nantes.fr

Maucourt Mickaël

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie &
Plateforme Métabolome-Fluxome Bordeaux
71 Avenue Edouard Bourlaux
33140 Villenave d'Ornon
maucourt@bordeaux.inra.fr

Maunoir-Regimbal Séverine

irba-crssa
24 avenue des Maquis du Grésivaudan
38700 La Tronche
irba-crssa.maunoirregimbal@sfr.fr

Mauve Caroline

Plateforme Metabolisme Metabolome
IBP- bat 630 Université paris Sud
91430 Orsay
caroline.mauve@u-psud.fr

Meiffren Guillaume

Centre d'Etude des Substances Naturelles
CESN
Université Lyon 1 la Doua
Bât. Forel 4^{ème} étage –
43 bd du 11 Novembre 1918
69100 Villeurbanne
guillaume.meiffren@univ-lyon1.fr

Michael-Jubeli Rime (Mme)

Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud
5 rue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry
r.michael-jubeli@hotmail.fr

Michalet Serge

Centre d'Etude des Substances Naturelles
CESN
Université Lyon 1 la Doua
Bât. Forel 4^{ème} étage –
43 bd du 11 Novembre 1918
69100 Villeurbanne
serge.michalet@univ-lyon1.fr

Migné Carole

INRA UNH UMR1019
63122 Saint Genes Champanelle
carole.migne@clermont.inra.fr

Millard Pierre

Equipe MetaSys INSA de Toulouse
135 avenue de Rangueil
31077 Toulouse
millard@insa-toulouse.fr

Mohamadi Fahoullia (Mme)

LCBE- Université de Perpignan
52 Av Paul Alduy
66000 Perpignan
fahoullia.mohamadi@gmail.com

Molinié Roland

Laboratoire de Phytotechnologie - EA3900 -
BioPI UFR de Pharmacie – UPJV
1, rue des Louvels
80037 Amiens
roland.molinie@u-picardie.fr

Mondeguer Florence

Ifremer, centre Atlantique, Laboratoire
Phycotoxines
rue de l'île d'Yeu
44311 Nantes
fmondeg@ifremer.fr

Moussallieh François-Marie

Université de Strasbourg, Institut de Chimie,
UMR 7177
4 Rue Blaise Pascal
67000 Strasbourg
fmmoussallieh@chimie.u-strasbg.fr

Moutel Benjamin

GEPEA - UMR CNRS 6144
Bât. CRTT, 37 bd de l'Université, BP 406
44602 Saint-Nazaire Cedex
benjoutel@gmail.com

Moyon Thomas

UMR PHAN
CHU Hotel Dieu HNB1,
Place Alexis Ricordeau
44093 Nantes Cedex 1
Thomas.Moyon@univ-nantes.fr

Nael Boisrobert Charlotte

Plate forme de spectrometrie de masse
CRNH/SFR F Bonamy UMR_S1087
IRT-UN 8 quai Moncouso BP 70721
44007 Nantes
charlotte.nael@univ-nantes.fr

Nguyen Thi Kieu Oanh (Mme)

Laboratoire de Phytotechnologie - EA3900 -
BioPI UFR de Pharmacie – UPJV
1, rue des Louvels
80037 Amiens
nguyen.thi.kieu.oanh0711@gmail.com

Ouethrani Minale (Mme)

CEA DSV/iBiTec-S/SPI/LEMM
91191 Gif sur Yvette cedex
minale.ouethrani@cea.fr

Ouguerram Khadija (Mme)

Institut du Thorax UMR_S1087
IRT-UN 8 quai Moncouso BP 70721
44007 Nantes
khadija.ouguerram@univ-nantes.fr

Ozyel Besim (M.)

Institute of Food Research
Norwich Research Park,
Norwich NR2 2BD
Royaume-Uni
besim.ozyel@ifr.ac.uk

Paris Alain

Mét@risk - INRA
16, rue Claude Bernard
75231 Paris cedex 05
alain.paris@paris.inra.fr

Paris François

UMR_S892
IRT-UN 8 quai Moncousu BP 70721
44007 Nantes
francois.paris@nantes.inserm.fr

Pathan Meerakhan (M.)

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
meerakhan.pathan@univ-nantes.fr

Perez Thierry

IMBE UMR CNRS 7263 - IRD 237
Station Marine d'Endoume,
Chemin de la batterie des lions
13007 Marseille
thierry.perez@imbe.fr

Perret Alain

LGBM, Genoscope
2, rue Gaston Crémieux CP5706
91057 Evry cedex
aperret@genoscope.cns.fr

Pohnert Georg

Friedrich Schiller University, Department of
Bioorganic Analytics,
Lessingstr. 8,
D-07749 Jena,
Allemagne
Georg.Pohnert@uni-jena.de

Poinot Juliette

Ingénierie des Systèmes Biologiques et des
Procédés, UMR5504, UMR792 CNRS,
INRA, INSA, INSA Toulouse
31077 Toulouse cedex 4
poinot@insa-toulouse.fr

Portais Jean-Charles

Ingénierie des Systèmes Biologiques et des
Procédés, UMR5504, UMR792 CNRS,
INRA, INSA, INSA Toulouse
31077 Toulouse cedex 4
jean-charles.portais@insa-toulouse.fr

Portela José

Waters S.A.S.
BP 608
78056 Saint-Quentin en Yvelines Cedex
jose_portela@waters.com

Pouchus Yves-François

MMS - Université de Nantes
9, rue Bias BP53508
44035 Nantes
yves-francois.pouchus@univ-nantes.fr

Pouyet Corinne

INRA
1 chemin du Chalard
63122 St Genes Champanelle
corinne.pouyet@clermont.inra.fr

Pujos-Guillot Estelle

INRA
Plateforme d'Exploration du Métabolisme
UNH INRA
63122 Saint-Genès-Champanelle
epujos@clermont.inra.fr

Quéro Anthony

Laboratoire de Phytotechnologie - EA3900 -
BioPI UFR de Pharmacie – UPJV
1, rue des Louvels
80037 Amiens
queroanthony@yahoo.fr

Remaud Gérard

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
gerald.remaud@univ-nantes.fr

Renault David

Université de Rennes 1
263 Avenue du Gal Leclerc, CS 74205
35042 Rennes
david.renault@univ-rennes1.fr

Rivet Laurent

Plate-forme Corsaire Biogenouest
Domaine de la Motte - BP 35327
35653 Le Rheu cedex
laurent.rivet@rennes.inra.fr

Robins Richard

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
richard.robins@univ-nantes.fr

Rolin Dominique

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie
71, avenue E. Bourlaux, BP 81
33140 Villenave d'Ornon
rolin@bordeaux.inra.fr

Rouger Laetitia

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
pauline.rouger@etu.univ-nantes.fr

Royer Anne-Lise

LABERCA - Oniris
Route de Gachet
44307 Nantes
anne-lise.royer@oniris-nantes.fr

Ruiz Nicolas

MMS - Université de Nantes
9, rue Bias BP53508
44035 Nantes
nicolas.ruiz@univ-nantes.fr

Sabarly Victor

Profilomic
31 rue d'Aguesseau
92100 Boulogne Billancourt
victor.sabarly@profilomic.com

Sebedio Jean-Louis

INRA
Plateforme d'Exploration du Métabolisme
UNH INRA
63122 Saint-Genès-Champanelle
jean-louis.sebedio@clermont.inra.fr

Seeburn Gaëtan

EURISO-TOP
Parc des Algorithmes, Bât Homère,
Route de l'Orme
91194 Saint-Aubin Cedex
gseeburn@eurisotop.com

Semmar Nabil

Biomet_NORT,
Faculté de Médecine La Timone
27 Bd Jean Moulin
13385 Marseille
nabil.semmar@univ-amu.fr

Shintu Laetitia

Institut des Sciences Moléculaires de
Marseille
av escadrille Normandie Niemen
13013 Marseille
laetitia.shintu@univ-amu.fr

Silvestre Virginie

CEISAM - Bat9
2 Rue de la Houssinière,
44322 Nantes cedex
virginie.silvestre@univ-nantes.fr

Sorin Elise

UMR INRA 1349 IGEPP
bat A N°301 Domaine de la Motte
35653 Le Rheu
elise.sorin@etudiant.univ-rennes1.fr

Stojiljkovic Natali

Laboratoire des Courses Hippiques
15 rue de Paradis
91370 Verrières le Buisson
n.stojiljkovic@lchfrance.fr

Stuani Lucille
LGBM, Genoscope
2, rue Gaston Cremieux - CP5706
91057 Evry Cedex
stuani@genoscope.cns.fr

Surroca Yannick
Agilent Technologies
33 rue du Dr Georges Levy
Parc/Club du moulin à vent
69693 Vénissieux
yannick_surroca@agilent.com

Taylor Neil
Chenomx
4350, 10230 Jasper Ave.,
Edmonton, AB, Canada T5J 4P6
ntaylor@chenomx.com

Tcherkez Guillaume
IBP
Université Paris-Sud
91405 Orsay cedex
guillaume.tcherkez@u-psud.fr

Tea Illa (Mme)
CEISAM UMR CNRS 6230
2 rue de la Houssinière
44322 Nantes
illa.tea@univ-nantes.fr

Thibaudeau Christophe
INRA
Plateforme d'Exploration du Métabolisme
UNH INRA
63122 Saint-Genès-Champanelle
christophe.thibaudeau@clermont.inra.fr

Thomas Freddy
EUROFINS Analytics France
Site de la Géraudière
44300 Nantes
FreddyThomas@eurofins.com

Thomas Olivier
ICN, UMR 7272 CNRS,
Parc Valrose
06108 Nice
olivier.thomas@unice.fr

Traïkia Mounir
ICCF
Clermont Université, Université Blaise Pascal
63000 Clermont-Ferrand
Mounir.TRAIKIA@univ-bpclermont.fr

Tremblay-Franco Marie
UMR INRA TOXALIM 1331
180 chemin de Tournefeuille
31027 Toulouse
marie.tremblay-franco@toulouse.inra.fr

Triba Mohamed Nawfal
CSPBAT
74 rue Marcel Cachin
93017 Bobigny
triba@smbh.univ-paris13.fr

Tribalat Marie-Aude
Laboratoire de Phytotechnologie BioPI
1, rue des Louvels
80037 Amiens
marieaude.tribalat@sfr.fr

Vansteelandt Marieke
MMS - Université de Nantes
9, rue Bias BP53508
44035 Nantes
Marieke.Vansteelandt@univ-nantes.fr

Verdu Alexandre
Bruker Daltonique
4, allée Hendrik Lorentz
77447 Marne la Vallée Cedex 02
alexandre.verdu@bruker.fr

Willeman Honorine
UMR USTL/INRA1281 SADV "Stress
abiotiques et différenciation des végétaux
cultivés" IFR147
Bâtiment SN2 USTL
59655 Villeneuve d'Ascq
honorine.willeman@etudiant.univ-lille1.fr

Wolff Marc
Bruker BioSpin GmbH
Silberstreifen
76287 Rheinstetten, Germany
Marc.Wolff@bruker-biospin.de

