



HAL
open science

RMN métabolomique, aliments & nutrition : quelques exemples de la plateforme Métabolome-MetaboHUB -Bordeaux

Catherine Deborde, Blandine Madji Hounoum, Simon Roques, Daniel Jacob, Mickaël Maucourt, Annick Moing, Benoît Fauconneau

► **To cite this version:**

Catherine Deborde, Blandine Madji Hounoum, Simon Roques, Daniel Jacob, Mickaël Maucourt, et al.. RMN métabolomique, aliments & nutrition : quelques exemples de la plateforme Métabolome-MetaboHUB -Bordeaux. Animation scientifique: La Résonance Magnétique Nucléaire dans tous ses états....., UR370 QuaPA et PF AgroResonance, INRAE, Jun 2021, distanciel, France. hal-03728319

HAL Id: hal-03728319

<https://hal.inrae.fr/hal-03728319>


Submitted on 20 Jul 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



➤ RMN métabolomique, aliments & nutrition : quelques exemples de la plateforme Métabolome-MetaboHUB -Bordeaux

Catherine Deborde, IR INRAE UMR BFP Nlle Aquitaine – Bordeaux

Blandine Madji Hounoum, Simon Roques, Daniel Jacob, Mickaël Maucourt, Annick Moing & Benoît Fauconneau

Animation scientifique : La Résonance Magnétique Nucléaire dans tous ses états....

UR370 QuaPA et PF AgroResonance, INRAE

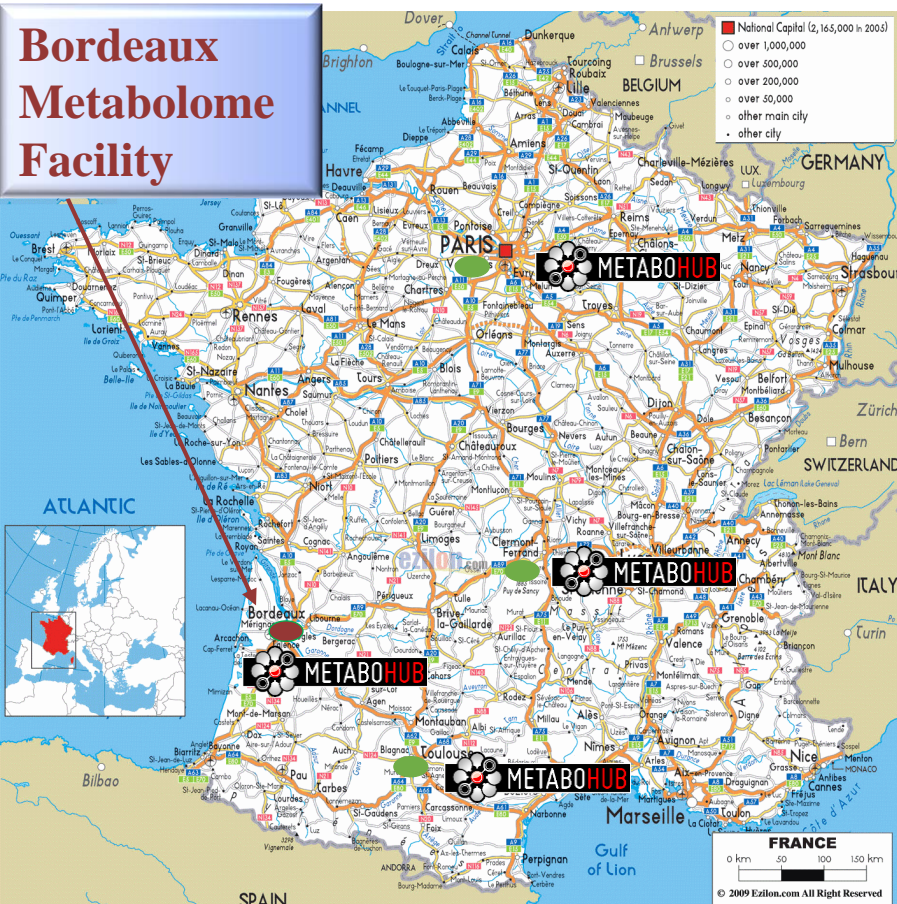
17 juin 2021

➤ Plateforme Métabolome-MetaboHUB –Bordeaux

<https://metabolome.cgfb.u-bordeaux.fr>



**Bordeaux
Metabolome
Facility**



Scientific leader: A Moing
2006-2018



Metabolomics
Current talk

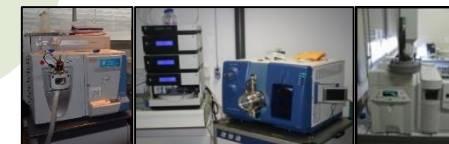


20 permanent staff (7.3 FTE)

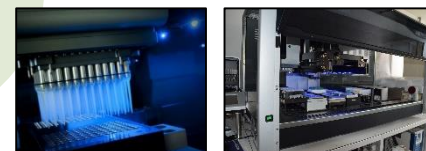
Polyphenols

**Bordeaux
Metabolome
Facility**

Lipidomics



Biochemical
phenotyping



Scientific leader: P Pétriacq
2019-



RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

➤ Metabolome & Metabolomics

What is metabolome?

Metabolome is the **complete set of metabolites**
found in a whole organism (or an organ, a tissue, a biofluid)
or a cell (or an organelle)
which reflects the interaction between its genome and environment

The term “metabolome” is usually restricted to non-polymeric metabolites with molecular weight under 1,500 Da

Oliver *et al.*, 1998 *Trends Biotechnol.* 16:373-8 ; Wishart, 2007, *Brief. Bioinform.*, 8:279-293

What is metabolomics?

Approaches leading to **measure metabolome** from extraction to identification and quantification,
to establish metabolic profile or fingerprint of series of samples
and to process the data along with metadata (e.g. environmental factors)
by means of analytical workflows and chemometrics.



INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

➤ Metabolomics ecosystem Expertise and Savoir-faire

(Plant) Biologist
Microbiologist
Clinician
Food scientist
...

Chemist
Phytochemist
Analytical chemist

diverse,
interactive and
interdisciplinary
research
community

Statistician
Bioinformatician
Data manager

Experimental design
Sampling
Metadata

Extraction
NMR
GC-MS, LC-MS, CE-MS } Metabolic profiles
High-density variable generation
Identification, Structural analysis
Quantification

Experimental design
Multivariate analysis
Data and metadata management (FAIR)

Sample series:
Small < 50 samples
Average 50 – 200
Large > 200



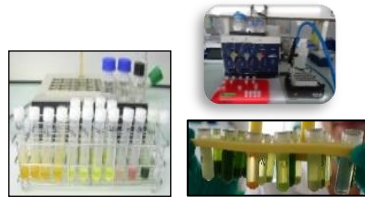
INRAE

➤ Profil et empreinte métaboliques basés sur la RMN, des métadonnées à l'intégration des données

Pipeline example : main steps

0. Sample metadata

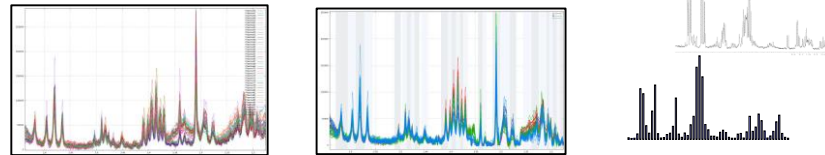
1. Cryogrinding & Extraction(s)



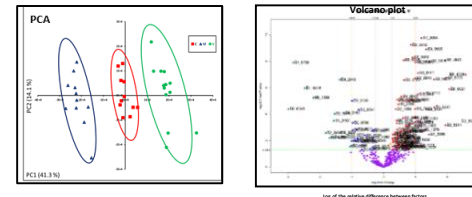
2. Targeted or untargeted chemical analyses



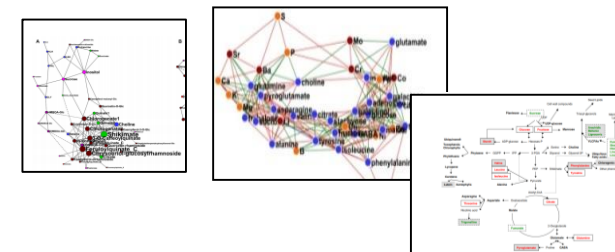
3. Data pre-treatment



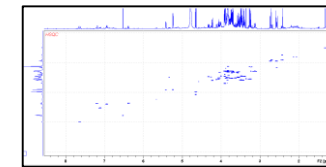
4. Data visualisation and mining



5. Data integration, fusion and sharing



2'. 2D NMR structural analyses – Metabolite identification



1-5 Metadata



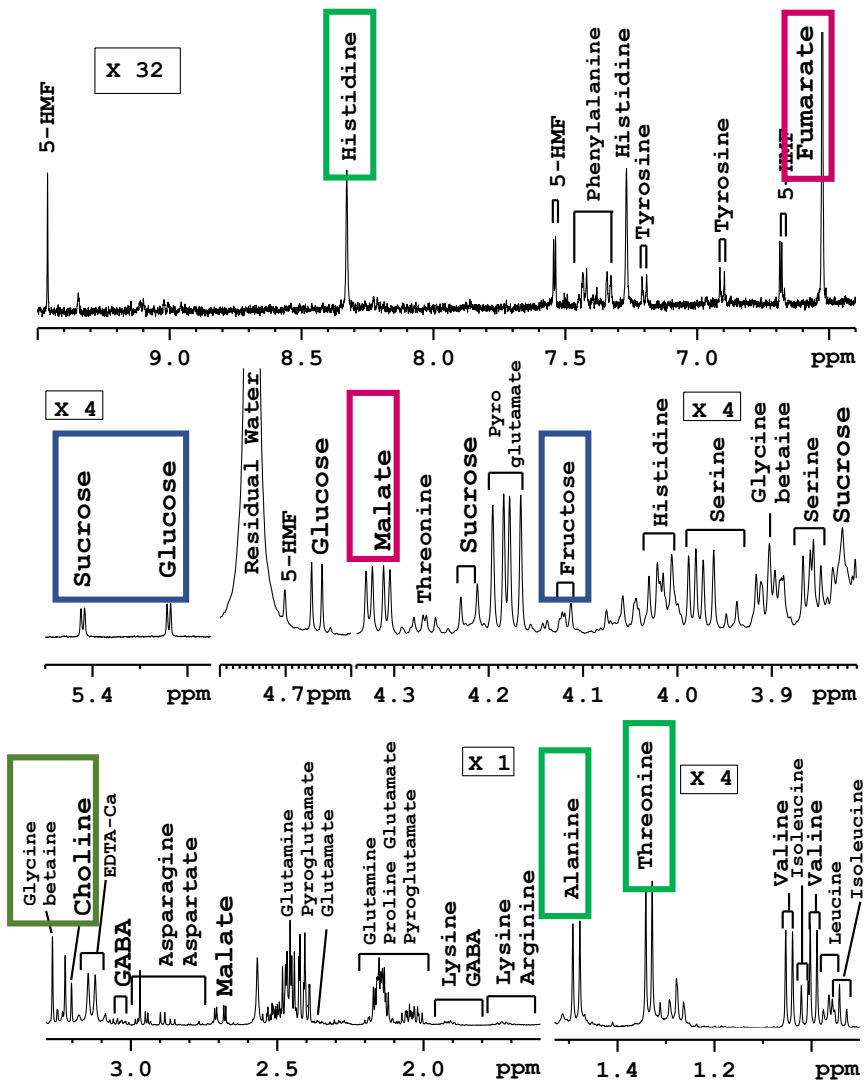
➤ RMN & Métabolomique

A



Extrait de sève xylémienne de tournesol

nutrition des plantes & exposition au cadmium



Cornu *et al.* (2020) *Ecotoxicol Environ Saf* **205**,111145

- ✓ Sans a priori
- ✓ Quantitative
- ✓ Reproductible
- ✓ Haut débit
- ✓ Non-destructive

¹H RMN : sensible, mais la plupart des signaux se situent dans un fenêtr spectral de 12 ppm environ

acides aminés et dérivés, amines biogènes
 sucres, cyclitols et polyols
 acides organiques,
 nucléotides,
 alcaloïdes,
 précurseurs de vitamine

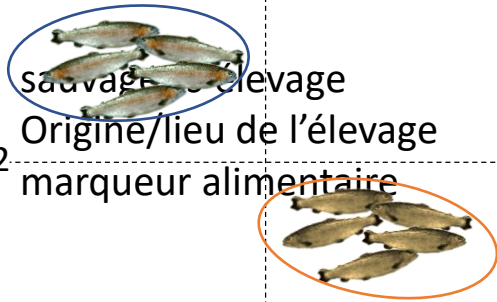
➤ Intérêt de la métabolomique en nutrition : exemple en aquaculture

Trois champs d'intérêt majeurs :

1

Séparation de populations selon l'alimentation

- sauvage
- élevage
- Origine/lieu de l'élevage
- marqueur alimentaire



Mannina *et al.* (2008) *Talanta* **77**, 433
Melis *et al.* (2014) *Electrophoresis* **35**, 1590
Maruhenda-Egea *et al.* (2015) *JAF* **63**, 10717
Aru *et al.* (2021) *Metabolomics* **17**, 50

2

Caractérisation des composés de l'aliment

- composés polaires
- issus du process de l'ingrédient
- stabilité de l'aliment
- vitamines

Jasour *et al.* (2017) *JAF* **65**, 10673
Jasour *et al.* (2018) *Aquaculture* **488**, 80
Gil-Solsona *et al.* (2019) *Aquaculture* **498**
Roques *et al.* (2018) *Metabolomics*, **14**, 1–12
Deborde *et al.* (2021) *Journal of Nutritional Science* **10**, e13.

3

Effet métabolique de l'alimentation

- effet du jeûne
- effet des aliments végétaux
- effet d'ingrédient levure
- effet d'ingrédient insecte

Kullgreen *et al.* (2010) *American Journal of Physiology* **299**, R1440
Gil-Solsona *et al.* (2017) *PeerJ* **5**, e2920
Casu *et al.* (2018) *Genomics & proteomics* **29**, 173.
Wagner *et al.* *Fishes* **4**, 46
Roques *et al.* (2020) *Metabolites* **1**, 83.
Deborde *et al.* (2021) *Journal of Nutritional Science* **10**, e13

RMN
LC-MS

Roques S, Deborde C, Richard N, Skiba-Cassy S, Moing A & Fauconneau B. (2020). Metabolomics and fish nutrition: A review in the context of sustainable feed development. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 261–282. <https://doi.org/10.1111/raq.12316>



S Roques

➤ Context of aquaculture feed development and fish nutrition



Bordeaux Metabolome Facility:

*C Deborde, D Jacob, V Joubert,
B Madji Hounoum,
M Maucourt, A Moing, S Roques*



INRAE Research Unit: NuMeA

Nutrition
Metabolism
Aquaculture

B Fauconneau, G Corraze
S Skiba-Cassy, L Larroquet



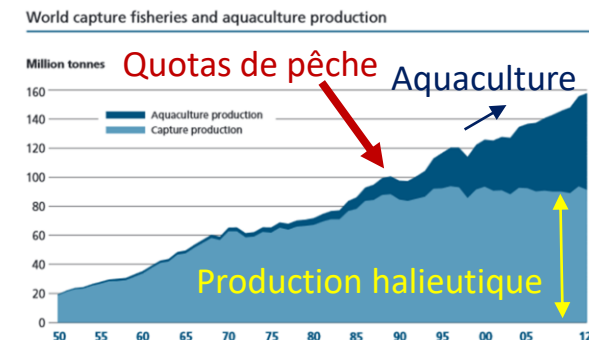
Donzacq INRAE

INRA Experimental fish farm:

- Feeding trials with Rainbow trout from first feeding to 2 kg.
- Complete feed manufacturing plant
- Wet lab facilities for *in vivo* work and samplings.



- **Aquaculture:**
 - Production has continued to increase and intensify in the last 30 years (FAO 2016)
 - Requires large inputs of wild-foraged fish for feed



Fish Meal and Fish Oil:

- Essential and highly-desirable dietary feedstuffs for carnivorous fish
- Finite resource, and exploited over the last 30 years

An alternative to fish meal and fish oil:

- Plant-based feeds (proteins and/or oils) + alternative ingredients
- Reducing the requirement for wild-foraged fish in fish feed

➤ Contexte du projet de NuMeA

- **Caractérisation des aliments et effets globaux induits par une alimentation à long terme sur le métabolisme des poissons**

- **Poisson :**

- Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)
- Le remplacement total de la farine et de l'huile de poisson par des produits d'origine végétale est réalisable à l'échelle expérimentale



- **Metabolomics:**

- La métabolomique basée sur la RMN pour les études sur la nutrition des poissons : première publication en 2008
- effet de la **composition de l'alimentation**: bar sauvage vs aquaculture (Maninna *et al.* 2008, Vidal *et al.* 2012)
- effet de l'alimentation : saumons d'élevage (Kullgreen *et al.* 2010)
- ...

➤ Besoins du projet de NuMeA

Développements méthodologiques pour l'utilisation d'approches métabolomiques

Étude de faisabilité chez le poisson pour les études nutritionnelles en complément des autres approches génomiques

Étudier des développements méthodologiques futurs

Évaluation de la qualité des aliments aquacoles: des aliments aux poissons
Approche non invasive basée sur l'analyse des fluides biologiques (plasma).



➤ Methodological developments in rainbow trout

- **Characterization of the feed: plant-based, fish-based or commercial feeds**

2

NMR Profiling of soluble compounds in polar (ethanolic) extracts

➤ *Quality of feed/ potential effects on feeding behaviour*

- **Circulating compounds in plasma at 6H and 48H after feeding**

1

NMR Profiling of soluble compounds in plasma

➤ *Sample analysis reveals information regarding absorption & metabolism ...*

3

➤ *Microbiota*

- **Metabolism in tissues (liver and muscle)**

3

NMR Profiling of soluble compounds in polar (ethanolic) or apolar (CH₂Cl₂) extracts

➤ *Characterisation of metabolic pathways involved in feed effects*

➤ *Putative mechanisms*



B Madji Hounoum (M2)

2 > Sampling and extraction of Experimental feeds



Experimental feeds

- Fish-based (M)
- Commercial-like (C)
- Plant-based (V)

F. Terrier, UE INRAE Donzacq

Trout rearing time 15 months

Three **dates** of feed collections

- Fabrication day (1d)
- During the test (2w)
- End of the test (4w)

4 replicates/sample – last formulation

Extract pre-analytic preparation:

- Solubilisation in D₂O-PO₄ buffer solution;
- pH ajustement at pH_{apparent} 7.4 with BTpH;
- Lyophilisation;
- Solubilisation in 500 µL D₂O + TSP

Feed extraction:**

- Grinding/ Drying
- Ethanolic extraction
- Supernatant lyophilisation



** Adapted from Moing *et al.* (2004), *Funct Plant Biol.*

B Madji Hounoum, M Maucourt
PF Métabolome Bordeaux



AVANCE III Bruker
ATMA BBI

NMR

Quantitative single-pulse (zg, 90, d1 15s)



INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde



➤ Spectra Visualisation and processing tool



D Jacob

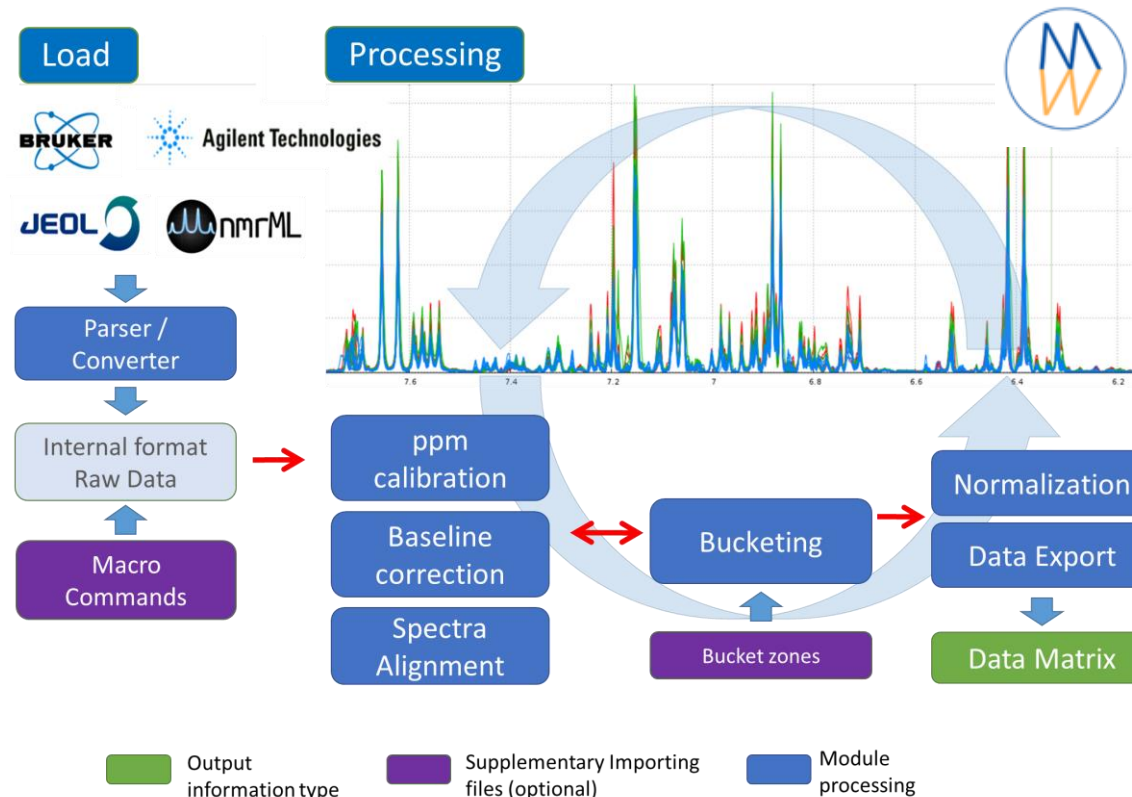


Spectra Visualisation as a function of factors, *i.e.* feed, time...
and processing Interactive processing
 Variable Size and Intelligent Bucketing



nmrprocflow.org

- Spectra preprocessing**
- PPM calibration
- Global and local baseline corrections
- Spectra alignment
- Non-uniform bucketing
- Signal-to-Noise ratio determination



INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

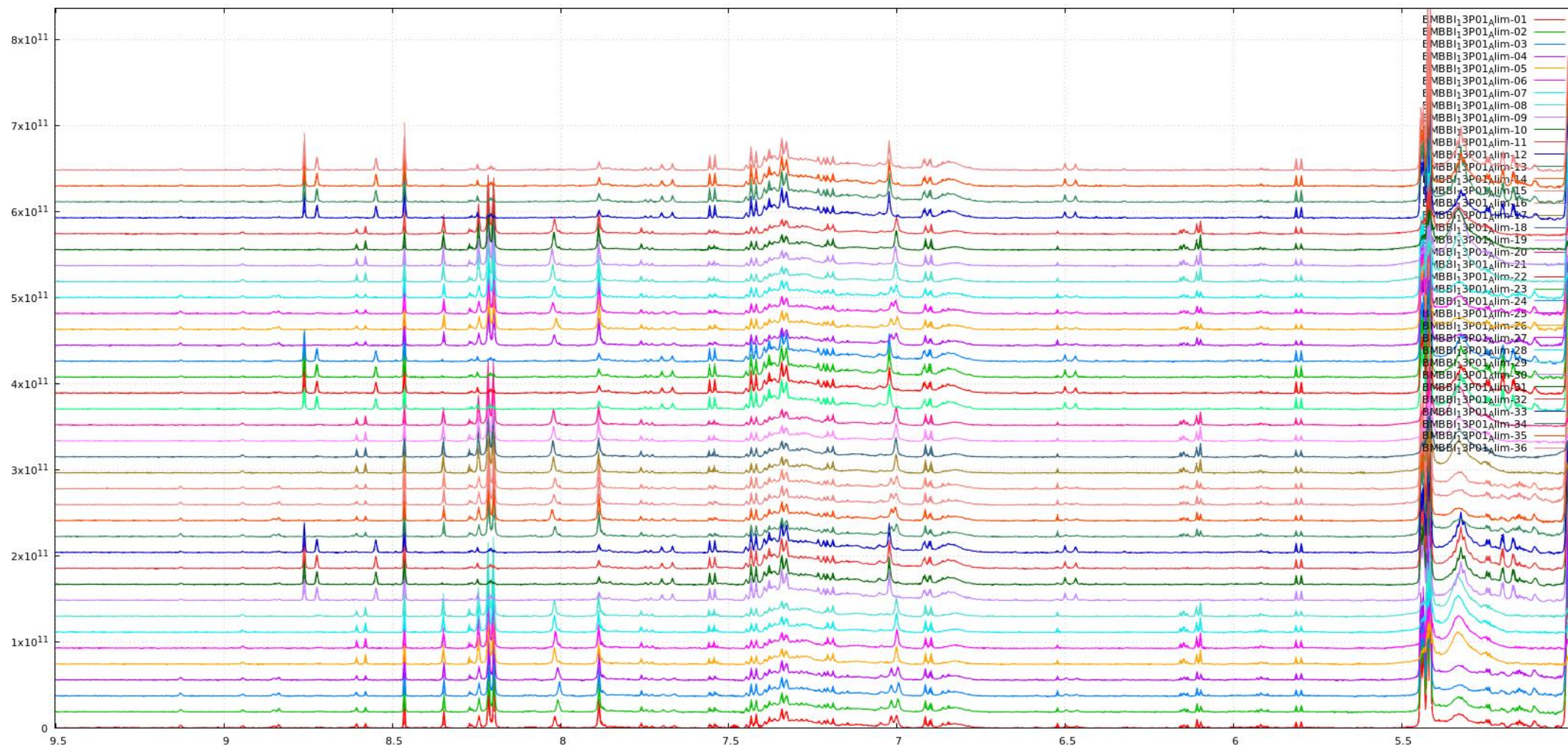
17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

Jacob *et al.*, *Metabolomics*, 2017 [doi:10.1007/s11306-017-1178-y](https://doi.org/10.1007/s11306-017-1178-y)



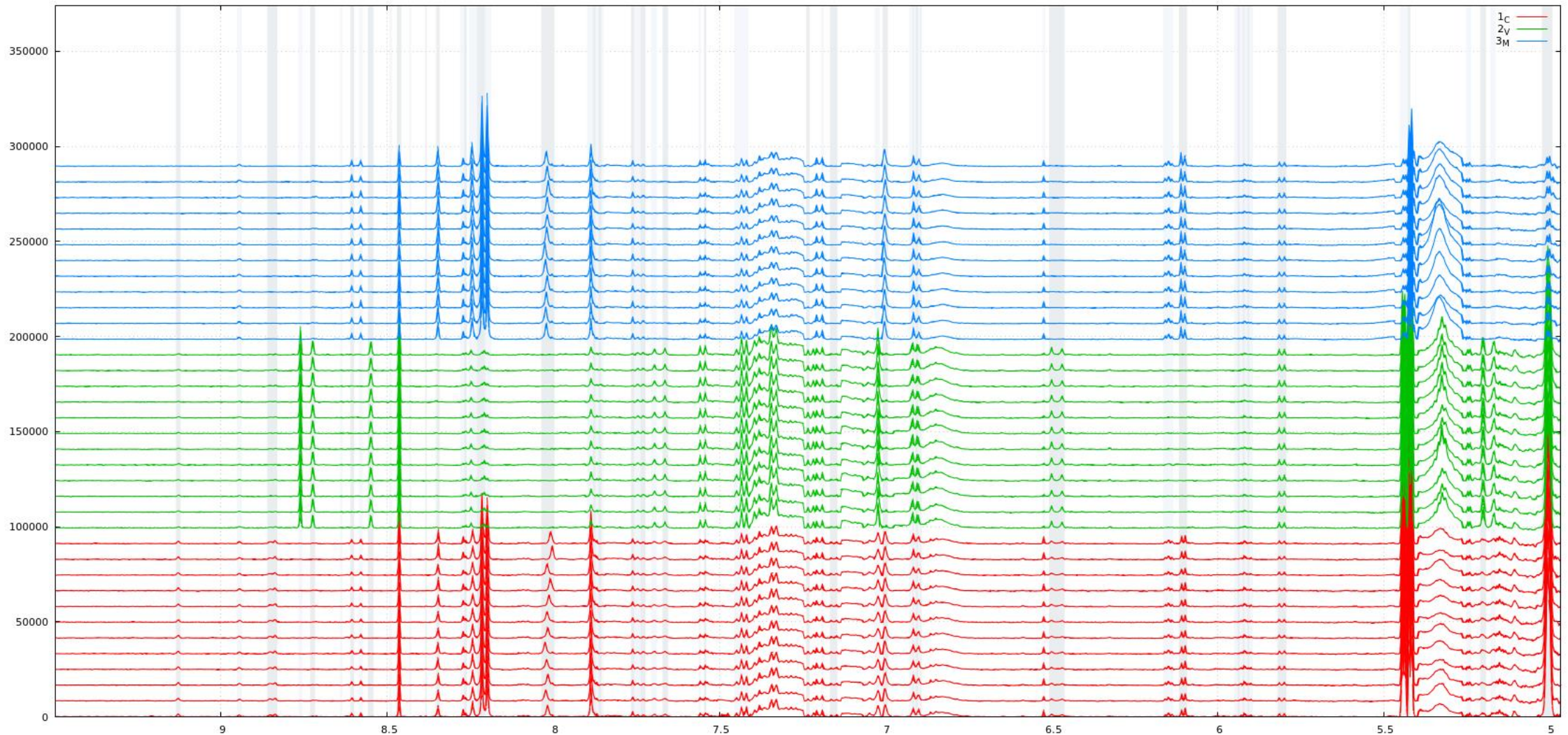
➤ Spectra Visualisation

Zoom in ^1H NMR spectra dataset



➤ Spectra Visualisation + Interactive processing
as a function of factors **C M V** Variable Size **and** Intelligent Bucketing

Commercial Plant-based Fish-based



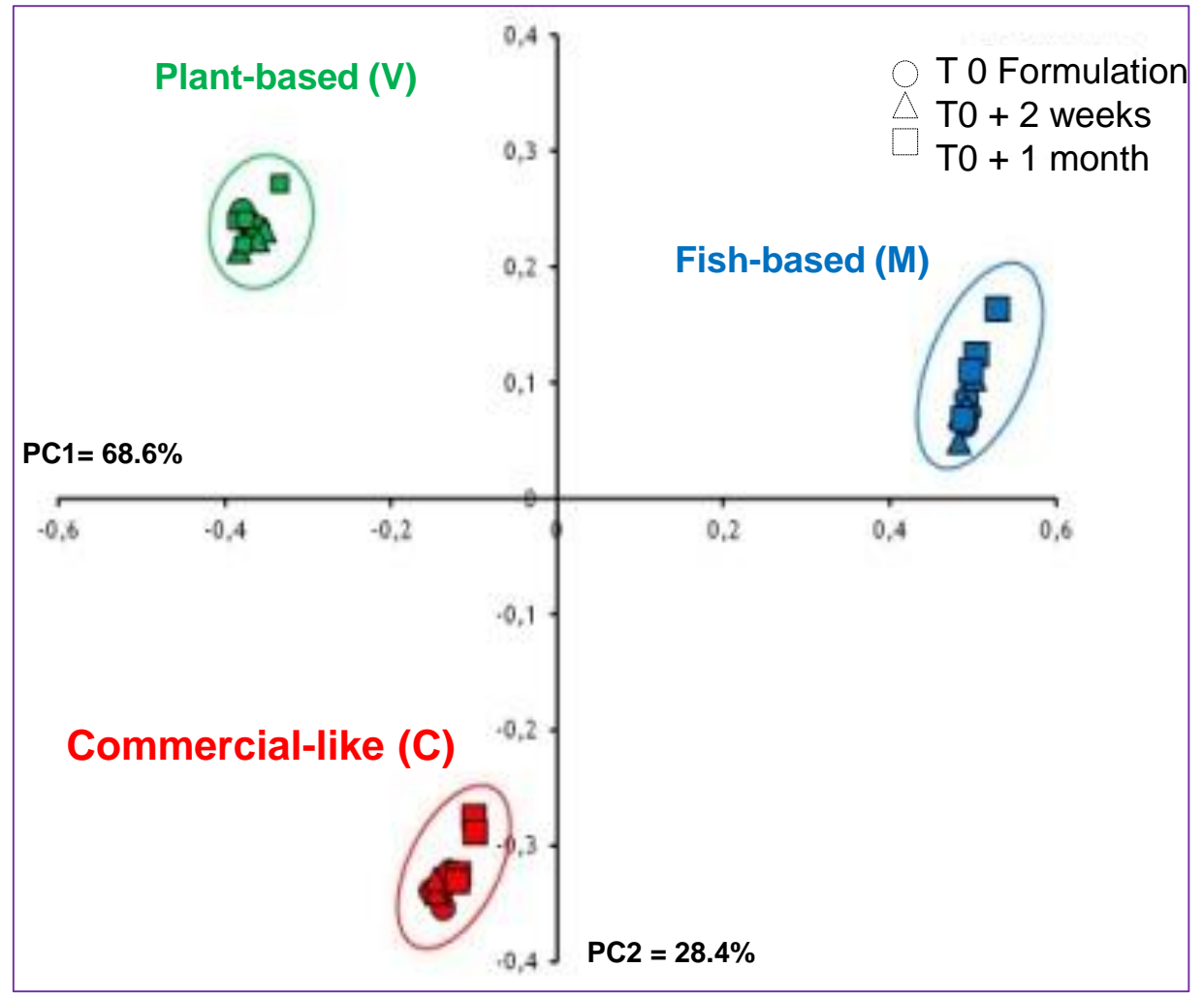
2 ➤ Feed stability (¹H NMR of polar extracts) – fingerprinting & buckets

PCA (z-score)
75 variable-sized buckets



**Clear discrimination
of
feed polar extracts**

Differences due to storage:
relatively low & non
significant, although such
differences higher in **M** diet
compared to **C** and **P** diets



➤ Feed compound quantification

36 compounds quantified

	Fish-based (M)	Commercial-like (C)	Plant-based (P)
Marine protein (FM)	54.32	30.00	-
Plant protein (corn, wheat, soja, dehulled pea, white lupin, rapeseed)	-	44.78	69.67
Marine oil (FO)	13.58	8.00	-
Plant oil (rapeseed, flax, palm)	-	8.00	17.67
Micro ingredients		0.05 (lysine)	6.38 (lysine, methionin, soja lecithin, calcium phosphate)
Vitamin and Mineral premix	2.00	2.00	2.00
Attract Mix			1.50 (glucosamine, taurine, betaine, glycine, alanine)
Excipient (extruded whole wheat)	30.10	7.17	2.78
Total	100.00	100.00	100.00

µg/gDW

Compounds	Fish-based (M)	Commercial-like (C)	Plant-based (V)
● Trigonelline	0	65	32
Niacinamide	47	44	28
● Biopterin	0	0	501
● Pterin	0	0	262
Formate	66	88	148
● Adenosine	596	371	0
● Hypoxanthine	983	667	0
● Anserine	1067	739	0
Xanthine	428	535	164
Tryptophan	75	70	78
Uracil	114	84	144
Phenylalanine	187	241	390
Tyramine	19	34	59
Tyrosine	76	57	69
Histidine		315	564
Fumarate	40	47	19
● Stachyose	0	13451	9836
● Raffinose	1103	0	0
Sucrose	1105	4724	4683
Glucose	168	255	415
Malate	156	377	523
Lactate	1656	1644	1516
● Creatine	1793	1134	0
● Betaine	574	294	2170
Glycine	358	172	1506
Taurine	3291	1862	2885
Choline	1054	1179	1012
Methionine	0	0	2029
Succinate	517	360	153
Glutamate	1014	719	140
Acetate	827	501	317
Lysine	566	845	10921
Alanine	1053	728	1984
Valine	341	269	193
Isoleucine	177	141	134
Leucine	244	219	261



C Deborde, B Madji
Hounoum, M Maucourt
PF Métabolome Bordeaux

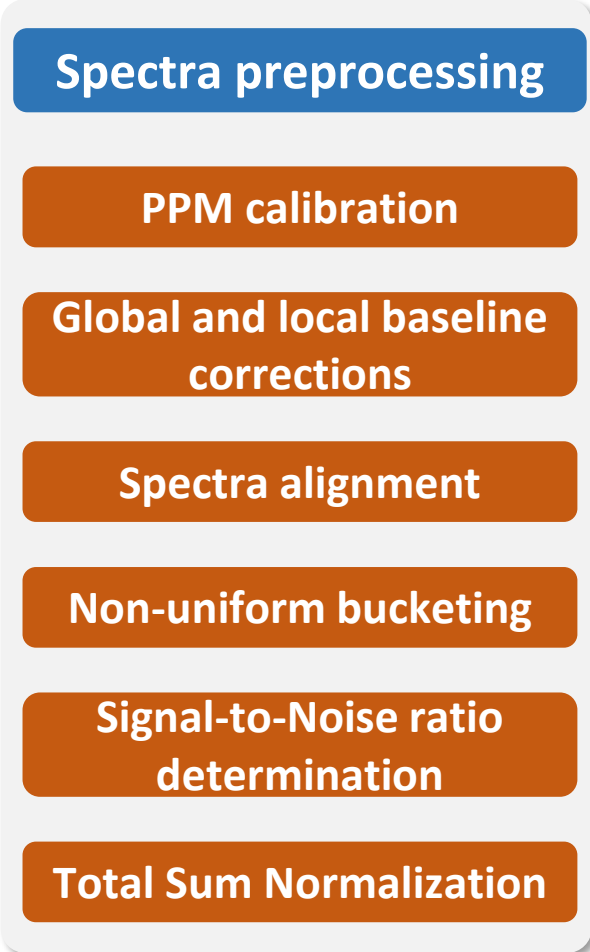


RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde



1 ➤ Séparation de populations selon l'alimentation - 1



NMR dataset	Spectral region of interest	Number of buckets (intelligent or variable-size bucketing)	Origin of resonances of interest
CPMG	8.7-0.1 ppm region	225	low molecular weight metabolites
zgpr	5.4-0.6 ppm region	13	lipids and lipoproteins



Blood was withdrawn at 48h after the last feeding
12 fishes / feeds



plasma
↓

- NMR**
2 acquisitions / tube
- single-pulse with presaturation (zgpr)
 - CPMG
 - Experiment time ≈ 15 min
 - 20 plasmas a day

C Deborde, B Madji Hounoum, A Moing, B Fauconneau,

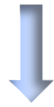
1 ➤ Séparation de populations selon l'alimentation -2



Blood was withdrawn at 48h after the last feeding
12 fishes / feeds



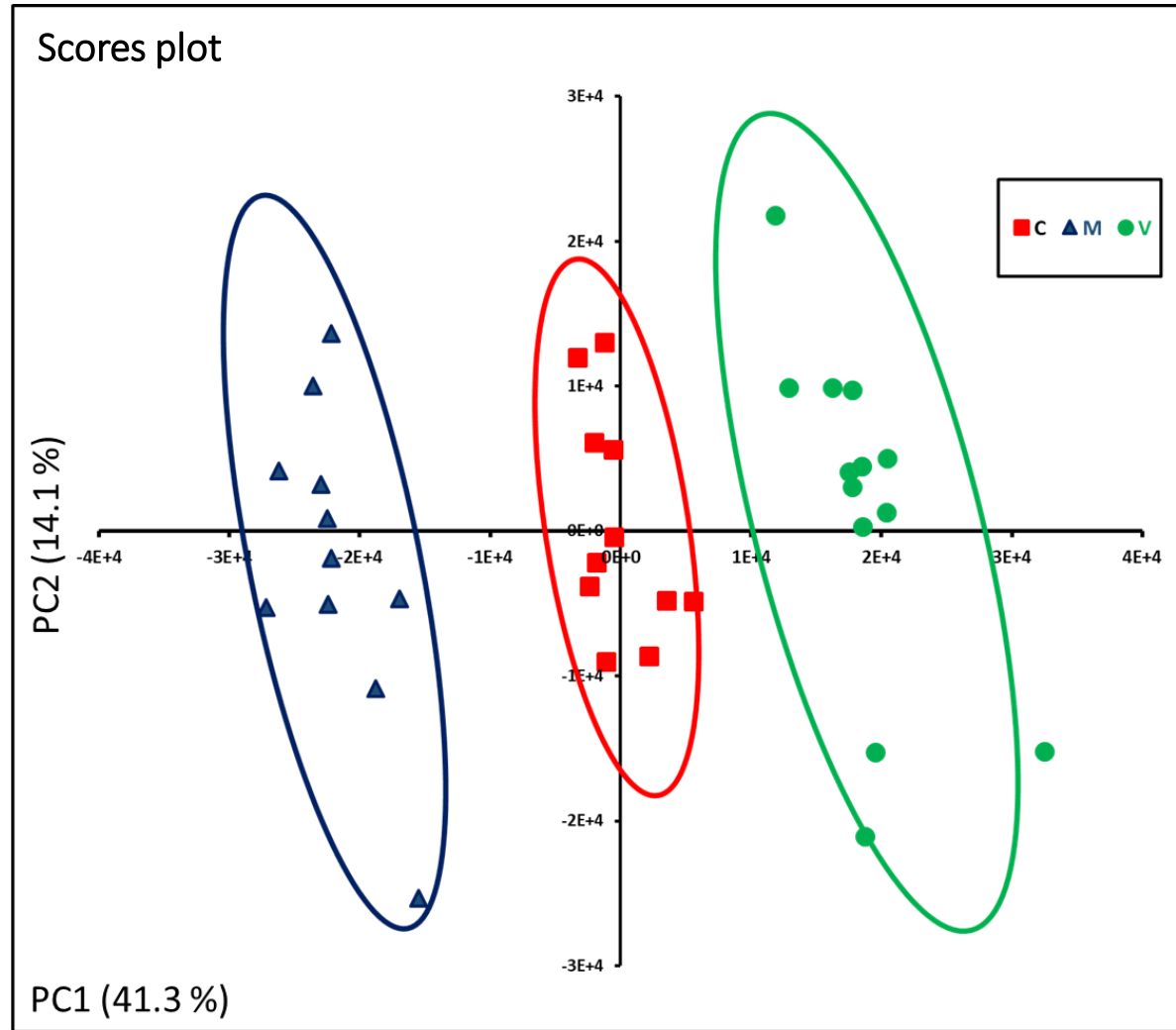
plasma



NMR

2 acquisitions / tube

- single-pulse with presaturation (zgpr)
- **CPMG**
- Experiment time \approx **15 min**
- 20 plasmas a day



238 buckets
in 44 samples
PCA, Pareto scaling

Clear discrimination of metabolic profiles between fish-based (M), plant-based (V) and commercial-like (C) feeds in plasma (48h).

BioStatFlow

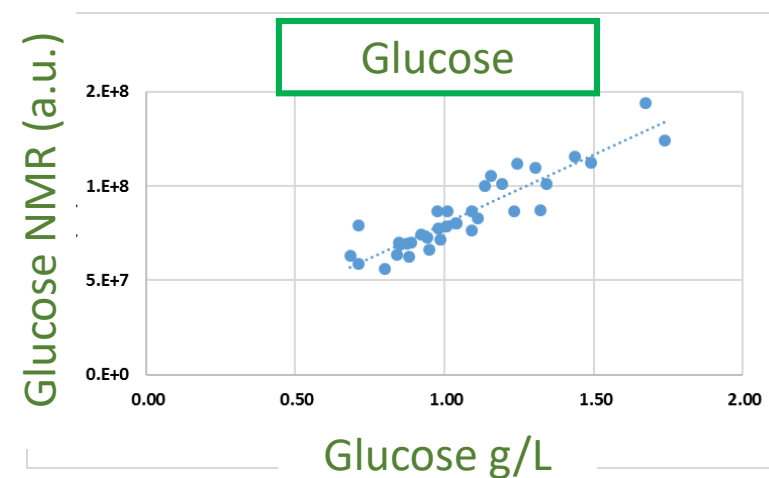
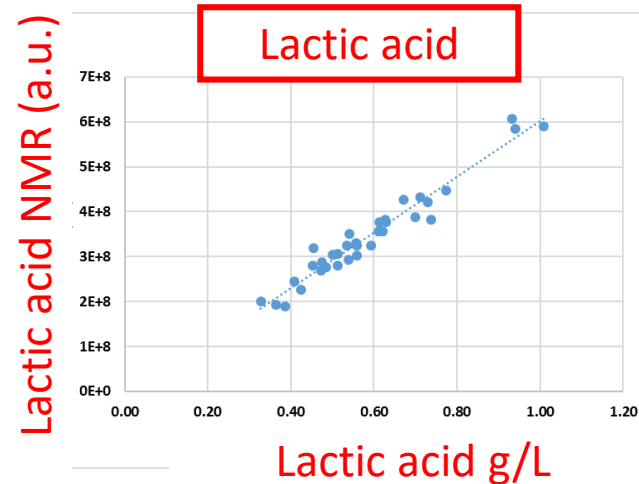


1 ➤ Séparation de populations selon l'alimentation -3 : RMN vs Biochimie

Comparaison entre les analyses biochimiques et les profils RMN du glucose et lactate plasmatiques

The dataset was derived from plasma ¹H nuclear magnetic resonance spectra bucketing and the annotation status according to MSI [1].

Bucket	Annotation		MSI status
B4_0802	Lactate	CH	1
B4_0594	Lactate	CH	1
B4_0413	Lactate	CH	1
B4_0238	Lactate	CH	1
B1_2778	Lactate	CH ₃	1
B1_2564	Lactate	CH ₃	1
B5_1811	α-Glucose	α-CH	1
B5_1493	α-Glucose	α-CH	1
B4_5927	β-Glucose	β-CH	1
B4_5755	β-Glucose	β-CH	1



The ten buckets were designed for the cpmgpr NMR dataset and their intensities expressed in arbitrary unit (a u), without normalization for relative quantification purposes, contrary to PCA analysis. For each spectrum of the fish plasmas, the six bucket intensities containing lactate resonances were added and the same was performed for the four bucket intensities containing glucose anomeric proton resonances. Those two intensities were plotted against biochemical values.

The correlation factor R was **0.976** for **lactic acid** and **0.913** for **glucose**.

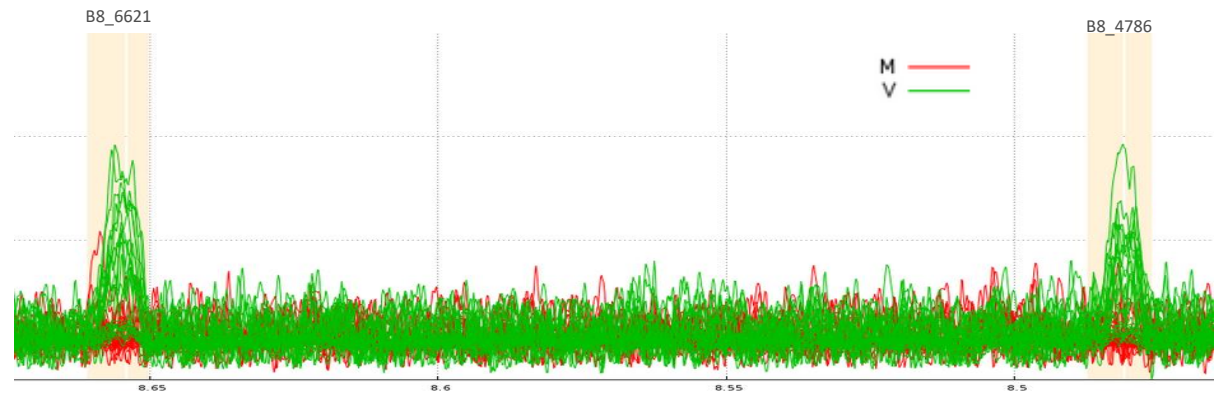
Index	M	C	V	Test	P
Plasma Glucose NMR (a u)	10.4 ± 2.15	8.45 ± 1.35	7.03 ± 0.95	ANOVA	<0.001
Plasma Lactate NMR (a u)	3.70 ± 1.27	3.32 ± 0.76	3.58 ± 1.26	ANOVA	0.728

Gatesoupe *et al.*, (2018) Aquaculture Nutrition 24:1563–1576

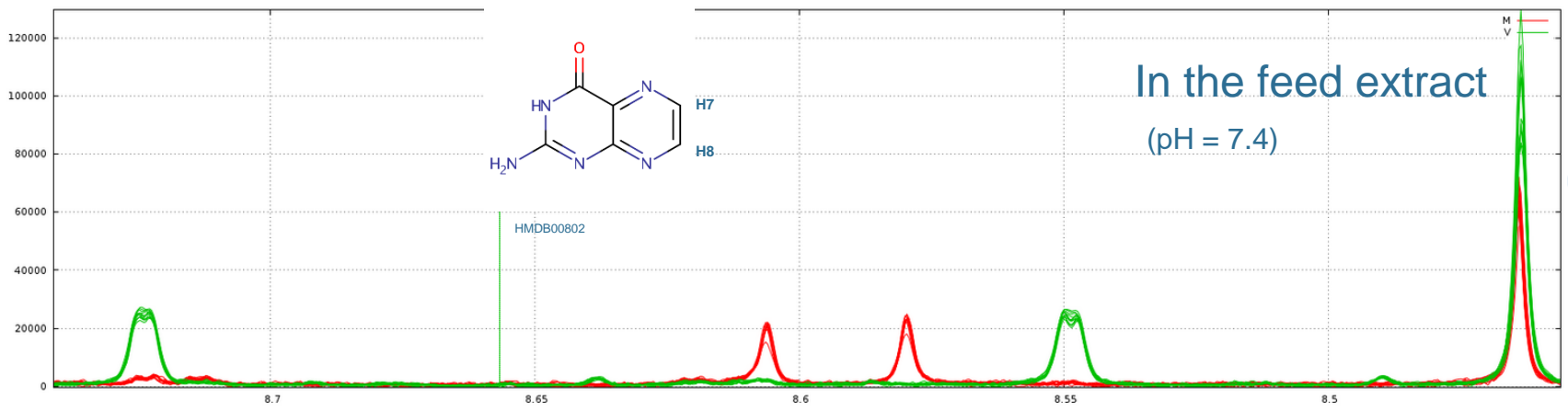
1 ➤ Séparation de populations selon l'alimentation - 4 : biomarqueur « plante »

NMRProcFlow

Putative candidate: Pterin



In plasma
(pH ≥ 7)



In the feed extract
(pH = 7.4)

Pterin: 262 +/- 15 µg/gDW plant-based feed



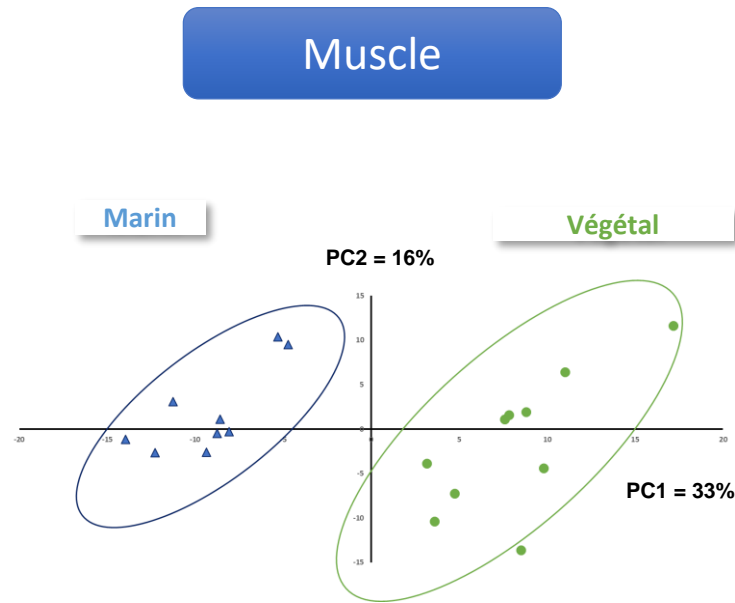
INRAE



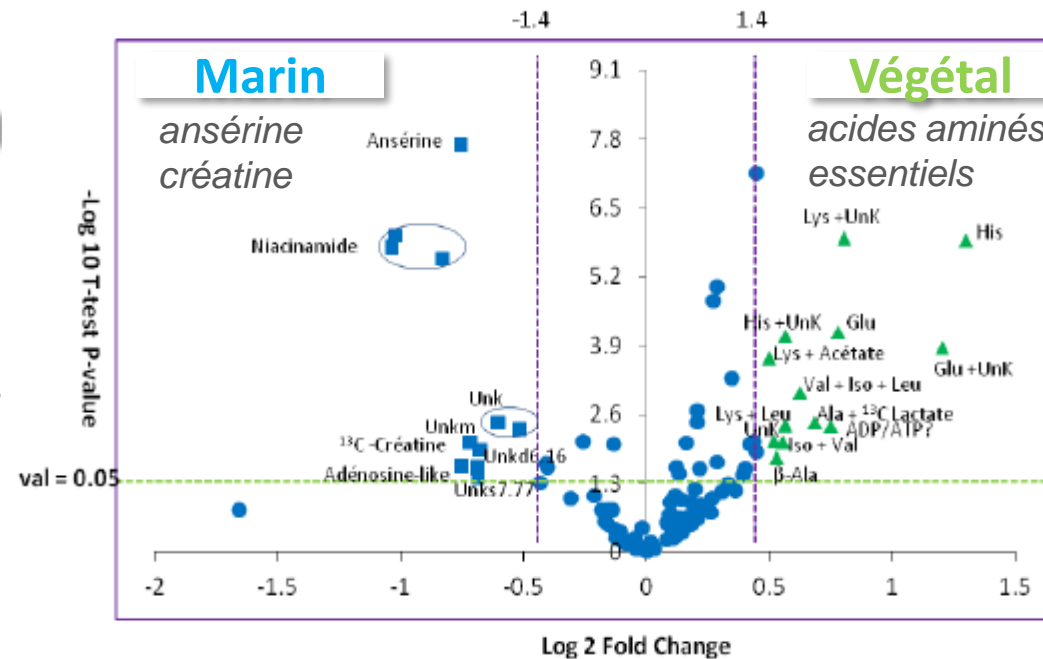
3 ➤ Effet métabolique de l'alimentation -1

Effet à long terme des régimes à base de matières premières d'origine végétale chez la truite

► profils ¹H-RMN des composés polaires solubles



Discrimination significative régimes marin & végétal




Accumulation de certains acides aminés essentiels apportés en complément (lysine, méthionine)

Déficit en certains composés indispensables : créatine, niacinamide, anserine

➔ Altération du métabolisme du muscle

➤ Conclusions & Perspectives -1

- ✓ **RMN : technique analytique pertinente pour les approches métabolomiques en nutrition aquacole**

- ✓ **Nombreux travaux méthodologiques depuis 2008 :**
 - ✓ Mise au point & faisabilité des approches ^1H -RMN, ^{13}C -RMN et ^{31}P -RMN :
 - de la préparation d'échantillon (natif ou extraction) à l'acquisition des spectres RMN
 -  **NMRProcFlow** permet le traitement des séries de spectres 1D (empreintes ou profils)
 - ✓ Annotation des profils RMN de biofluides et tissus -> base de données bibliographiques et expérimentales « poisson »

- ✓ **Développement des approches non ciblées / empreintes métaboliques :**
 - ① ✓ **Séparer de populations selon l'alimentation**
 - ② ✓ **Contrôler/screener des matières premières**
 - ③ ✓ **Mener une approche intégrée des matières premières -> aliment -> poisson**
 - ③ ✓ **Développer des méthodes non invasives : valeur prédictive du plasma natif**



➤ Conclusions & Perspectives -2

- ✓ **RMN : technique analytique pertinente pour les approches métabolomiques en nutrition aquacole**

- ✓ **Développement des approches ciblées / profils métaboliques (identification & quantification)**
- ② ✓ **Caractérisation de l'ingrédient, de l'aliment par l'identification des marqueurs spécifiques de matières premières**
 - ✓ **Traçabilité et contrôle**
 - ✓ **Facteurs anti-nutritionnels**

- ✓ **Effet métabolique de l'alimentation : génération d'hypothèses, pistes originales sur l'adaptation du poisson**
- ① ✓ **Étude descriptive démontrant des effets très nets sur la modification du processus digestif**
- ③ ✓ **ex: microbiote & profils métabolomiques de plasma (Gatesoupe *et al.*, (2018) *Aquaculture Nutrition* 24:1563–1576)**
- ✓ **ex : qualité des matières premières végétales et métabolisme du muscle -> outils de diagnostic en aquaculture**



➤ Remerciements Principaux Collaborateurs et Financeurs

Merci pour votre attention



NuMeA St Pée sur Nivelles

F Médale

G Corraze

J Gatesoupe

L Larroquet

V Lazzarotto

SJ Kaushik

S Skiba-Cassi

B Fauconneau



Bordeaux Metabolome Platform

C Deborde

B Madji Hounoum (M2)

D Jacob

V Joubert (M2)

M Lefebvre

M Maucourt

S Roques (PhD)

A Moing (Facility leader)



université
de BORDEAUX



MÉTABOLOME



BORDEAUX
METABOLOME



nmrprocflow.org

BioStatFlow

biostatflow.org



D Rolin

ML Lombard

Financial Supports:

ARRAINA FP7-KBBE-2011-5, FUI NINAqua

MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 and INRAE



special thanks to

NuMeA technical staff,

INRAE experimental facility Donzacq

staff, F Terrier

for their contribution to this work



RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

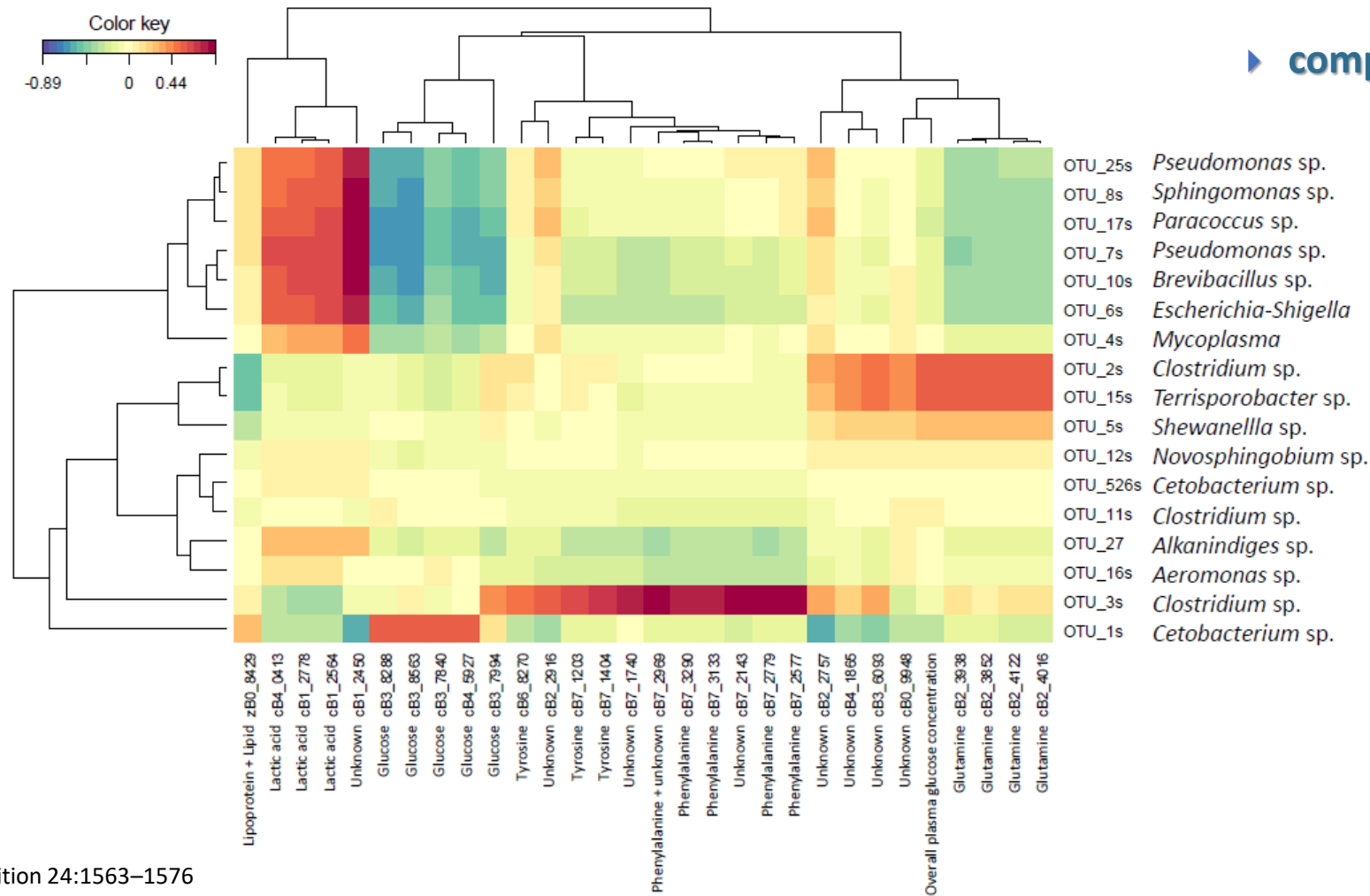


INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

➤ Effet des régimes à base de matières premières végétales chez la truite



► composition du microbiote

► Molécules circulantes dans le plasma

Gatesoupe *et al.*, (2018) *Aquaculture Nutrition* 24:1563–1576



INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

