



## 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>

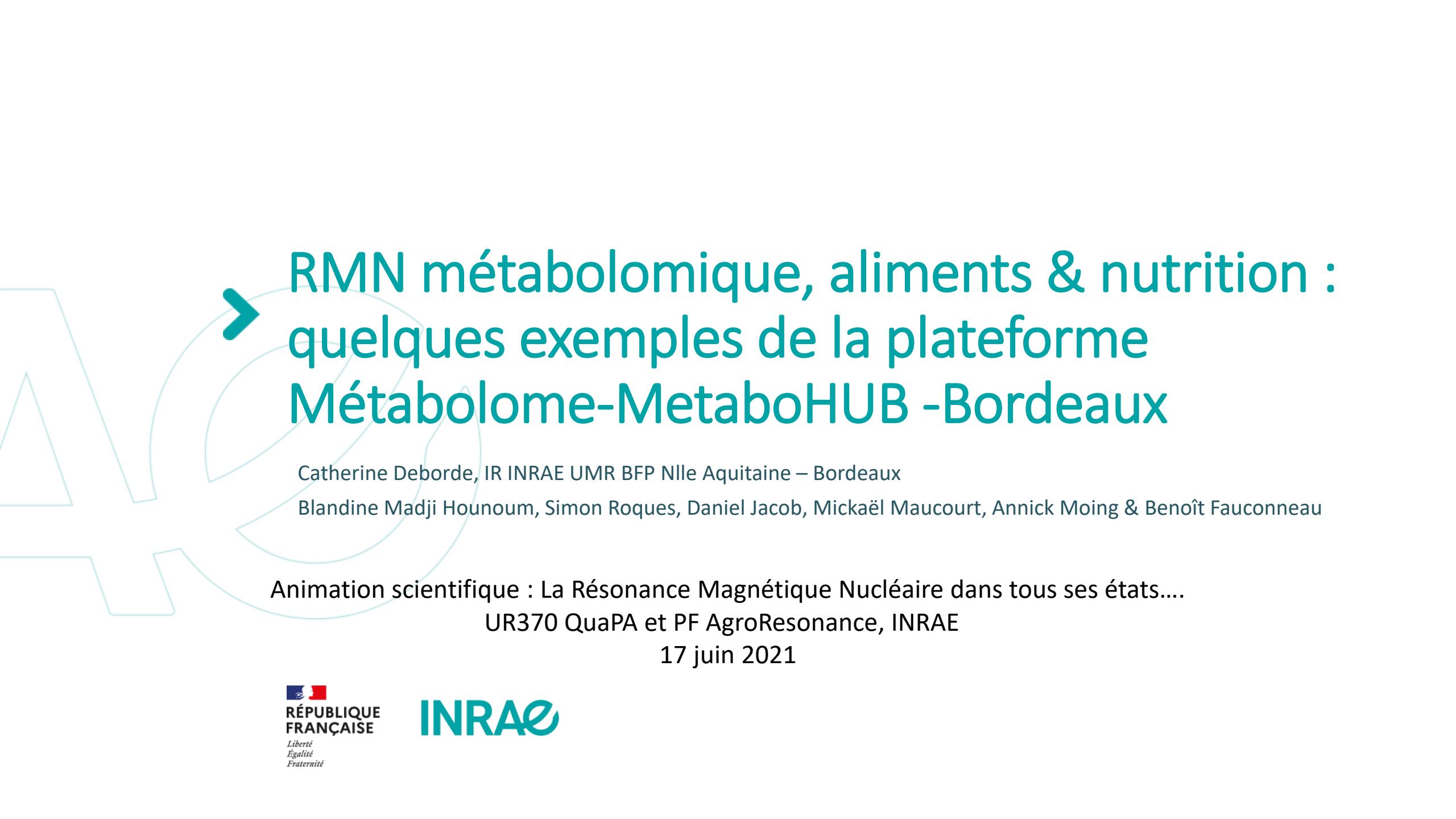
Submitted on 20 Jul 2022

**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



**INRAE**

# Plateforme Métabolome-MetaboHUB –Bordeaux

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



université  
de BORDEAUX

## Bordeaux Metabolome Facility



Scientific leader: A Moing  
2006-2018



Metabolomics  
*Current talk*



Polyphenols



**Bordeaux  
Metabolome  
Facility**

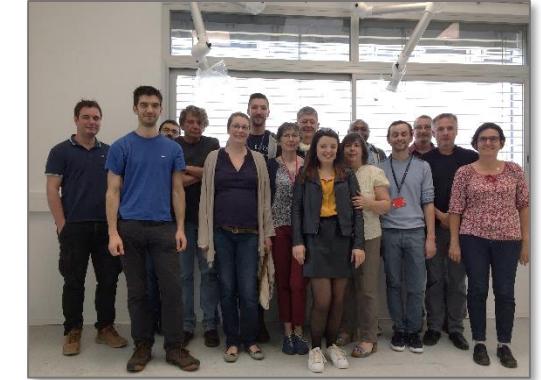
Lipidomics



Biochemical  
phenotyping



Scientific leader: P Pétriacq  
2019-



20 permanent staff (7.3 FTE)

# ➤ 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

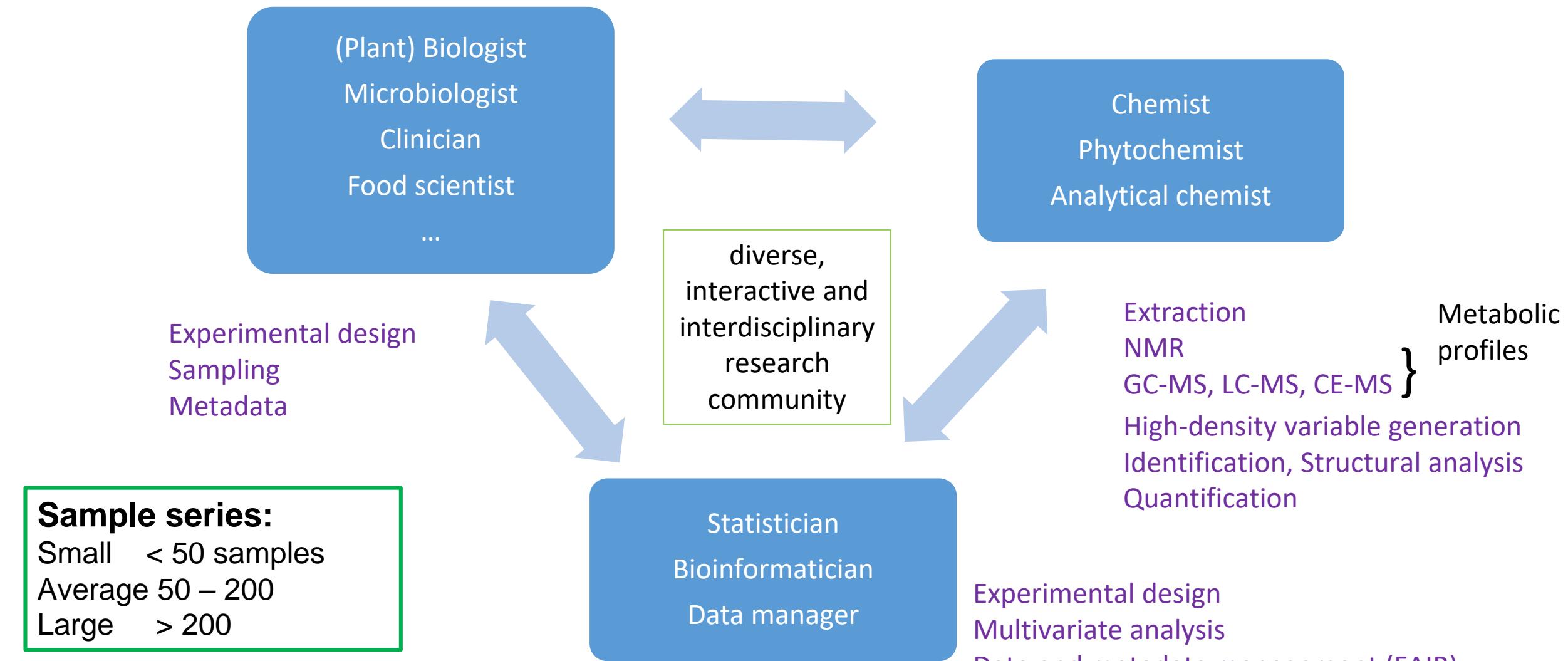
The term “metabolome” is usually restricted to non-polymeric metabolites with molecular weight under 1,500 Da

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.**

## ➤ Metabolomics ecosystem Expertise and Savoir-faire



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

Pipeline example : main steps

## 0. Sample metadata

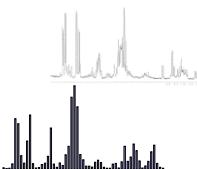
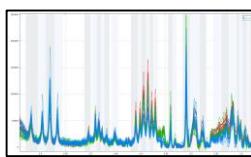
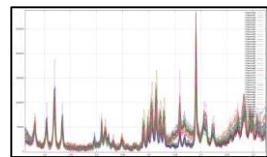
### 1. Cryogrinding & Extraction(s)



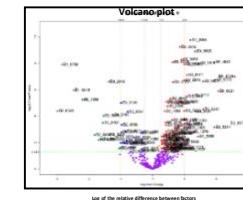
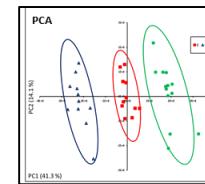
### 2. Targeted or untargeted chemical analyses



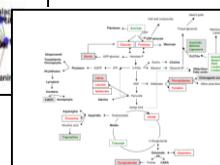
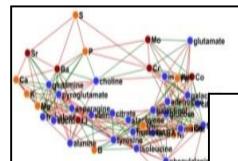
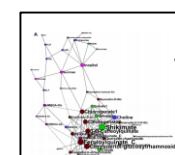
### 3. Data pre-treatment



### 4. Data visualisation and mining



### 5. Data integration, fusion and sharing



1-5 Metadata

INRAe

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

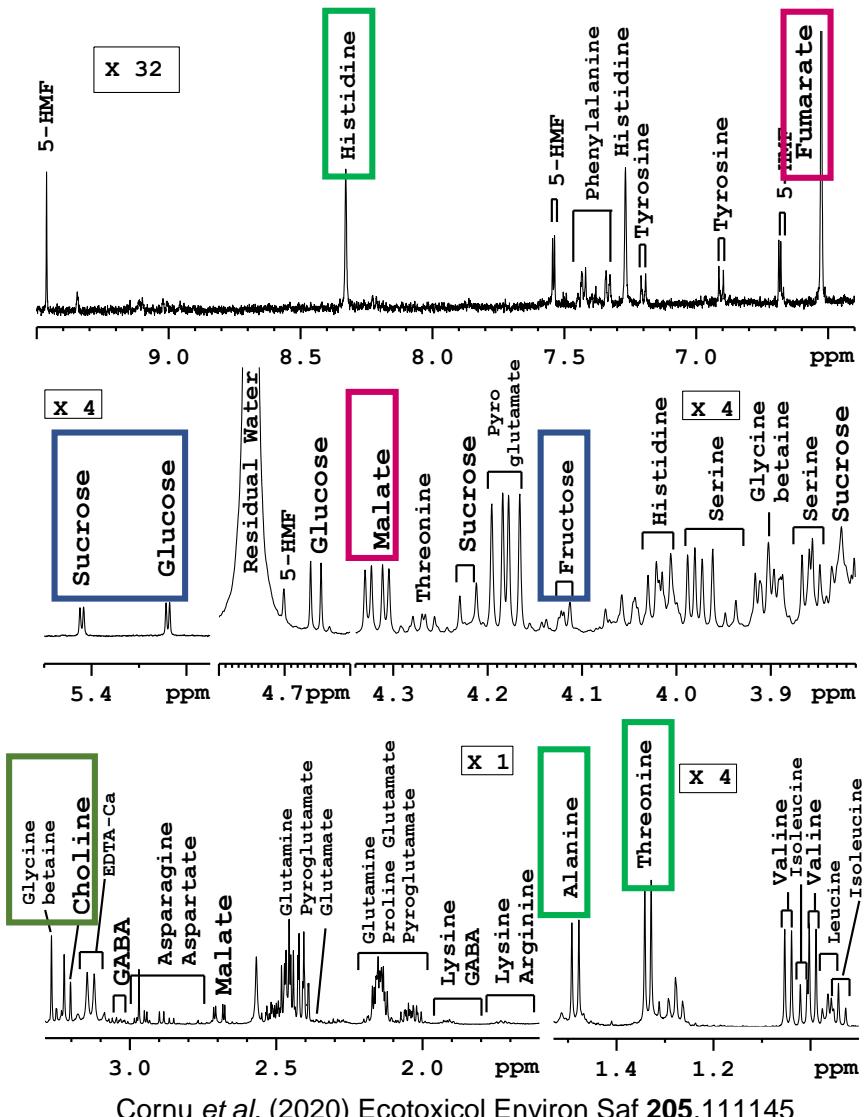
17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

# RMN & Métabolomique



Extrait de  
sève  
xylémienne  
de tournesol

nutrition des  
plantes &  
exposition au  
cadmium



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

1<sup>H</sup> RMN : sensible, mais la plupart des signaux se situent dans un fenêtre spectrale 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
- PC2 marqueur alimentaire



RMN  
LC-MS

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

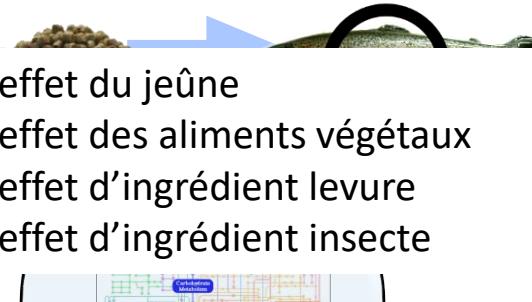
## Caractérisation des composés de l'aliment

- 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

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 Debordé, 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



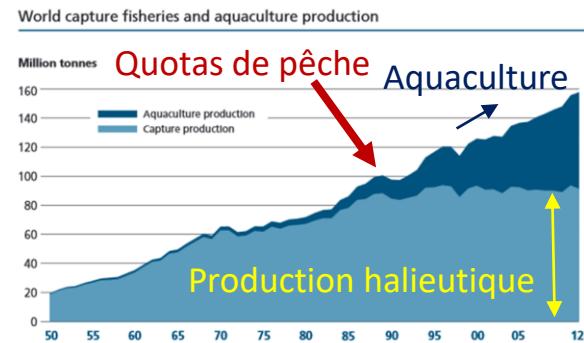
Donzacq **INRAE**



## 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

3

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

➤ *Microbiota*

- Metabolism in tissues (liver and muscle)

3

NMR Profiling of soluble compounds in polar (ethanolic) or apolar ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) extracts

➤ *Characterisation of metabolic pathways involved in feed effects*

➤ *Putative mechanisms*

# Sampling and extraction of Experimental feeds



B Madji Hounoum  
(M2)



## Experimental feeds

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

F. Terrier , UE INRAE Donzacq

Trout rearing time 15 months



### Feed extraction\*\*:

- Grinding/ Drying
- Ethanolic extraction
- Supernatant lyophilisation

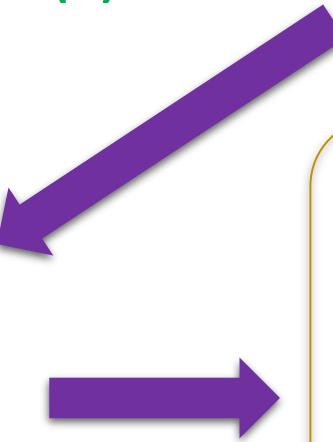
\*\* Adapted from Moing et al. (2004), *Funct Plant Biol.*

INRAE

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



### 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  $D_2O$ - $PO_4$  buffer solution;
- pH adjustement at  $pH_{apparent}$  7.4 with BTpH;
- Lyophilisation;
- Solubilisation in 500  $\mu L$   $D_2O$  + TSP



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



AVANCE III Bruker  
ATMA BBI

# > Spectra Visualisation and processing tool



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

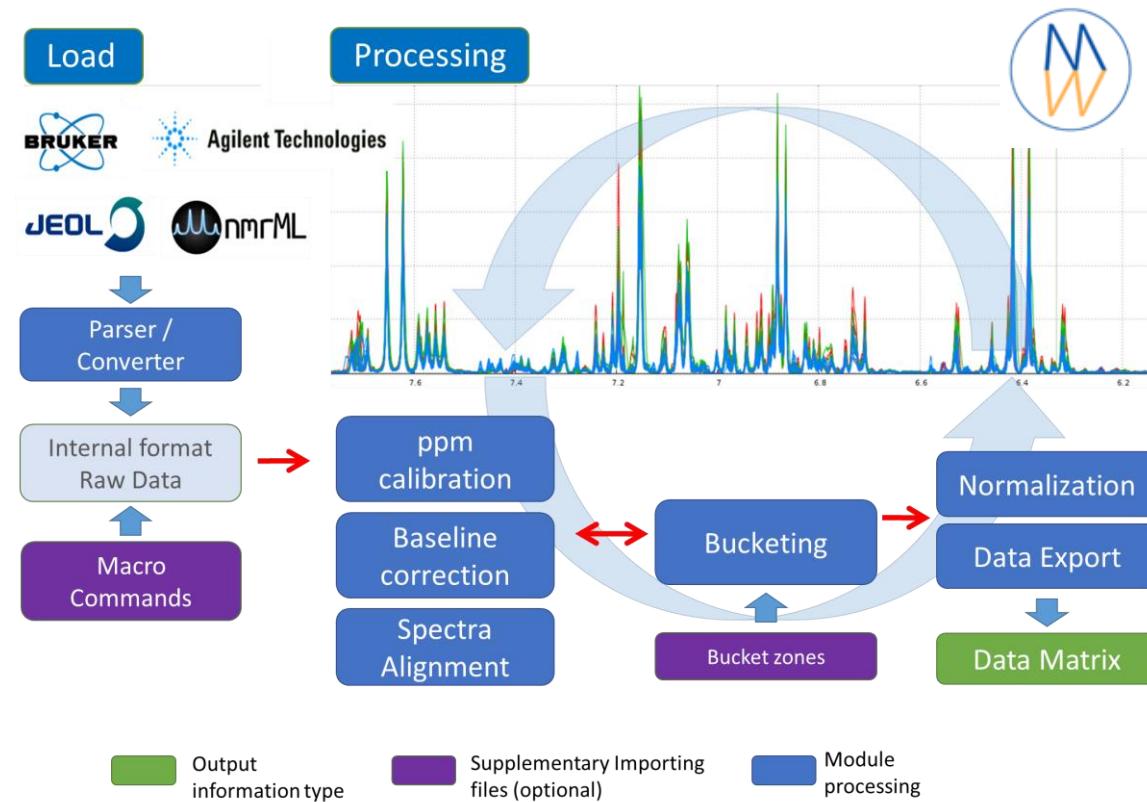


D Jacob

NMRProcFlow

[nmrprocflow.org](http://nmrprocflow.org)

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



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

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



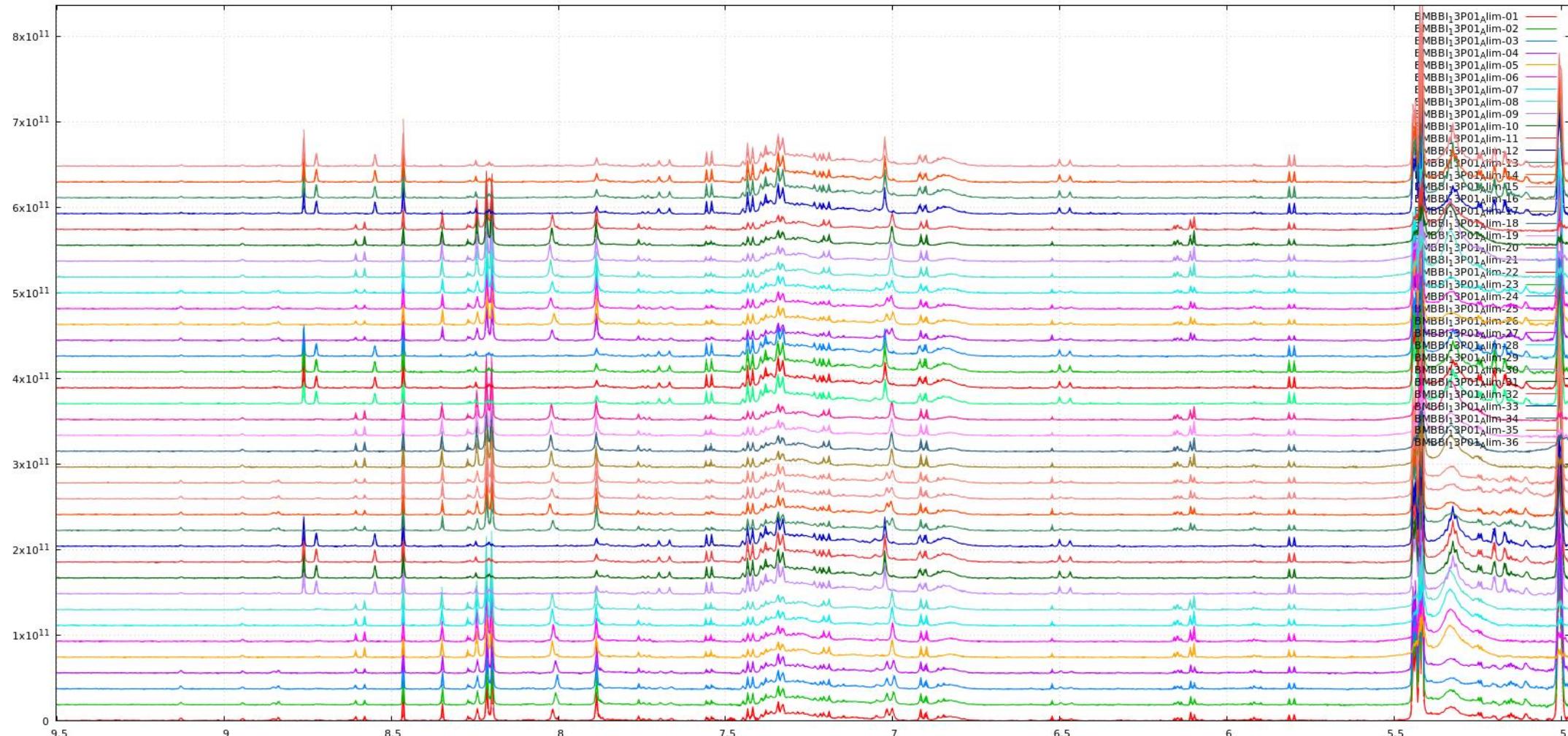
# Spectra Visualisation



NMRProcFlow



## Zoom in $^1\text{H}$ NMR spectra dataset



INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

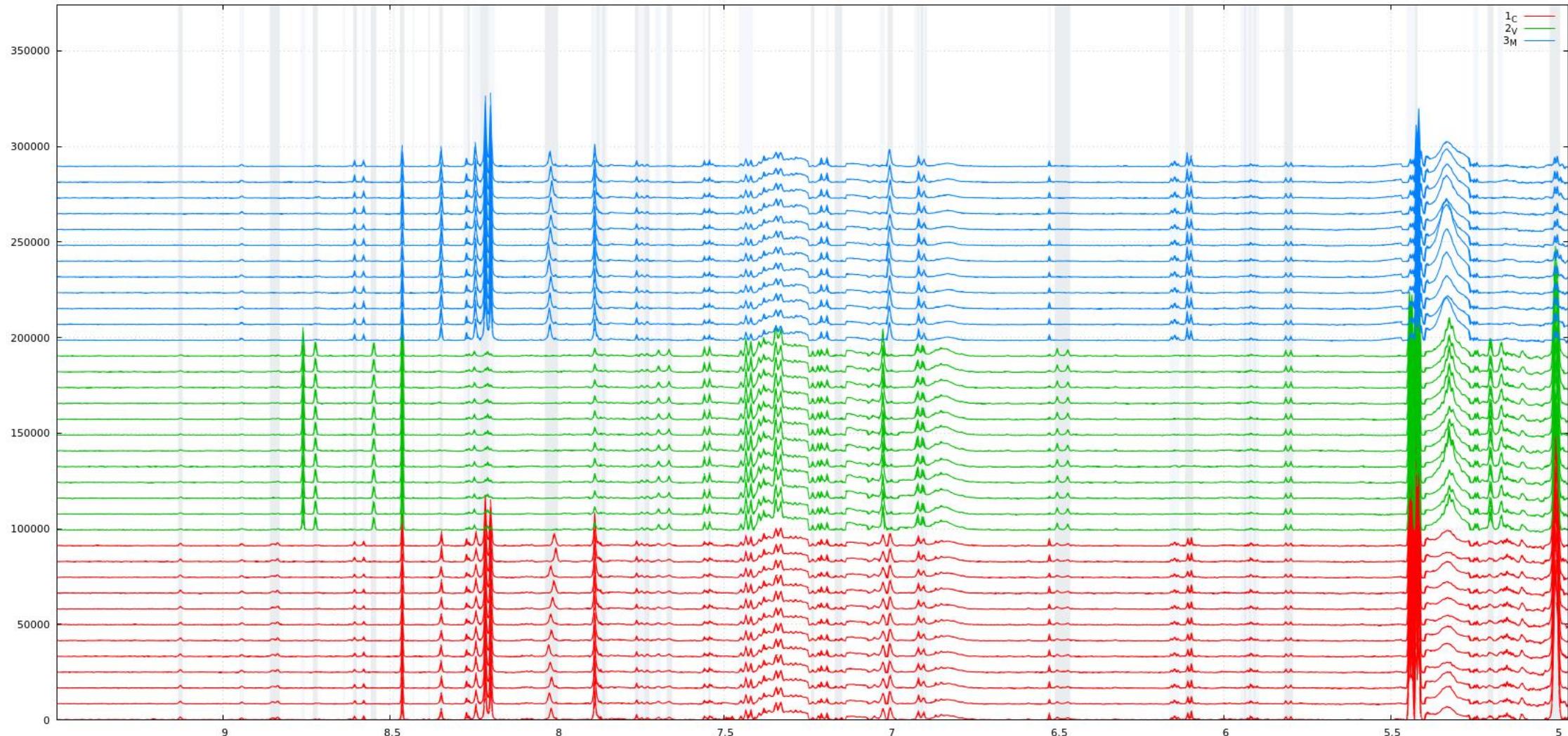
17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

C Deborde,  
PF Métabolome Bordeaux

## ► Spectra Visualisation as a function of factors C M V

+ Interactive processing  
Variable Size and Intelligent Bucketing

Commercial Plant-based Fish-based



2

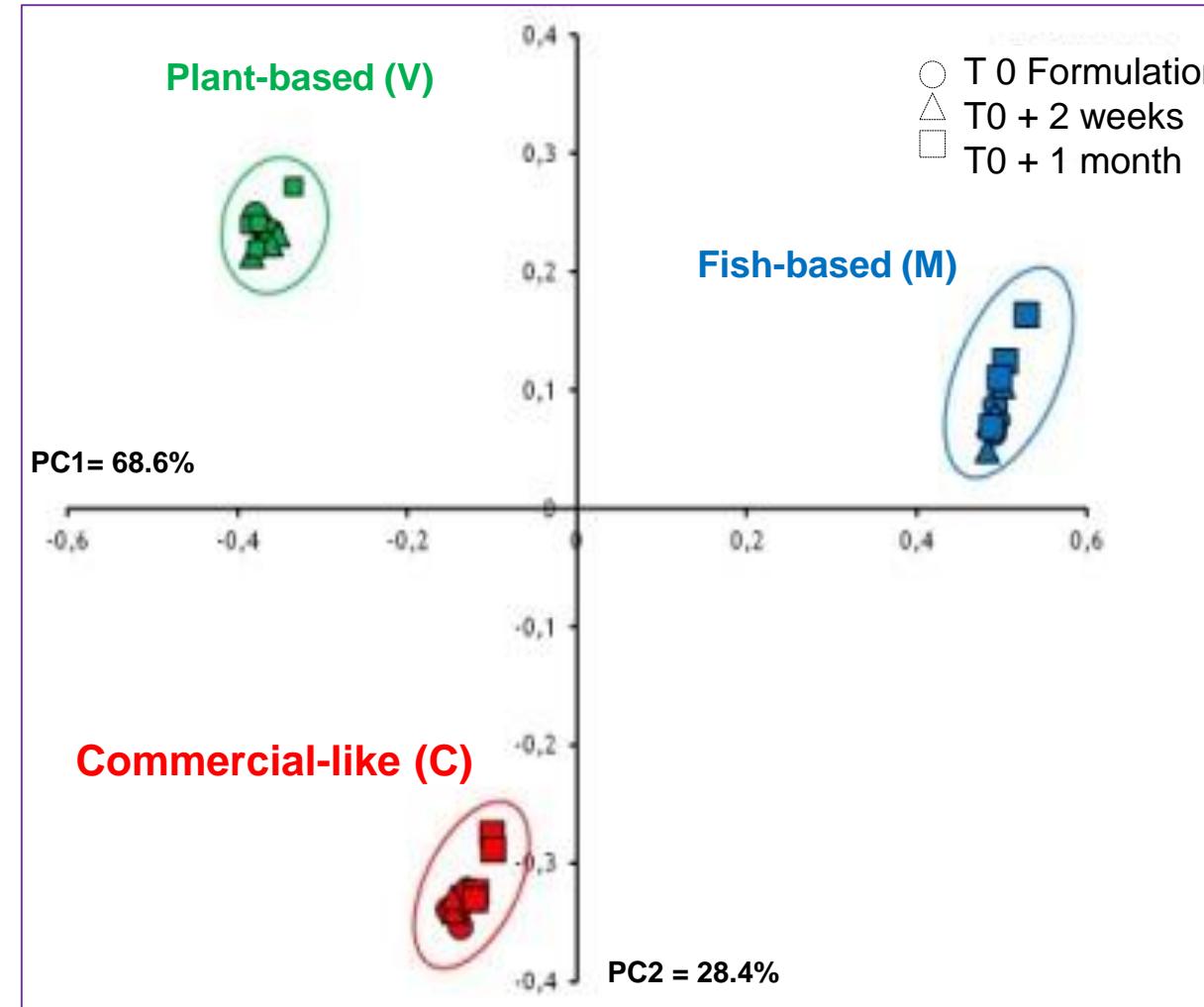
# Feed stability ( $^1\text{H}$ NMR of polar extracts) – fingerprinting & buckets

**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



**INRAe**

A Moing, B Fauconneau, C Deborde, B Madji Hounoum, M Maucourt,  
RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MétaboHUB-Bordeaux

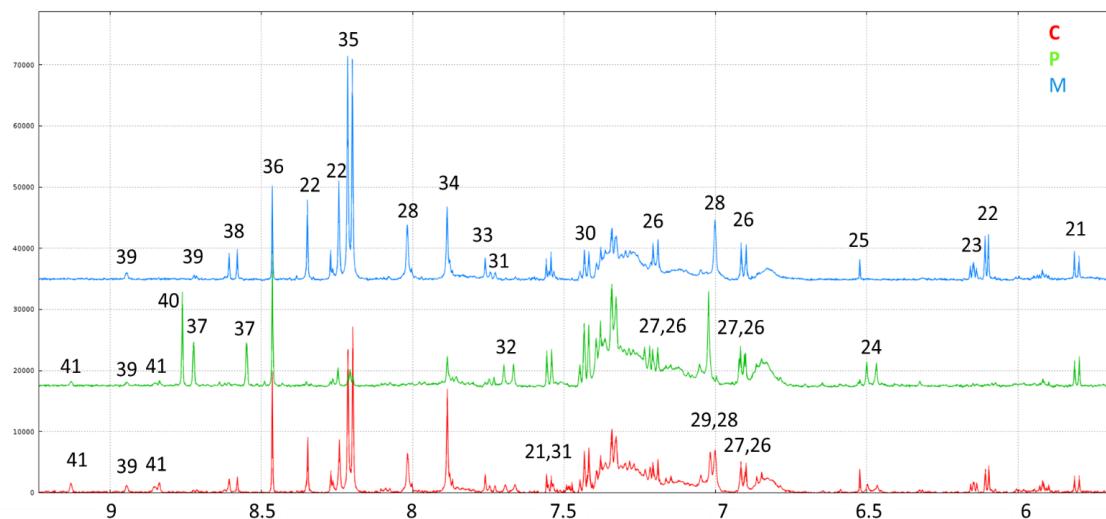
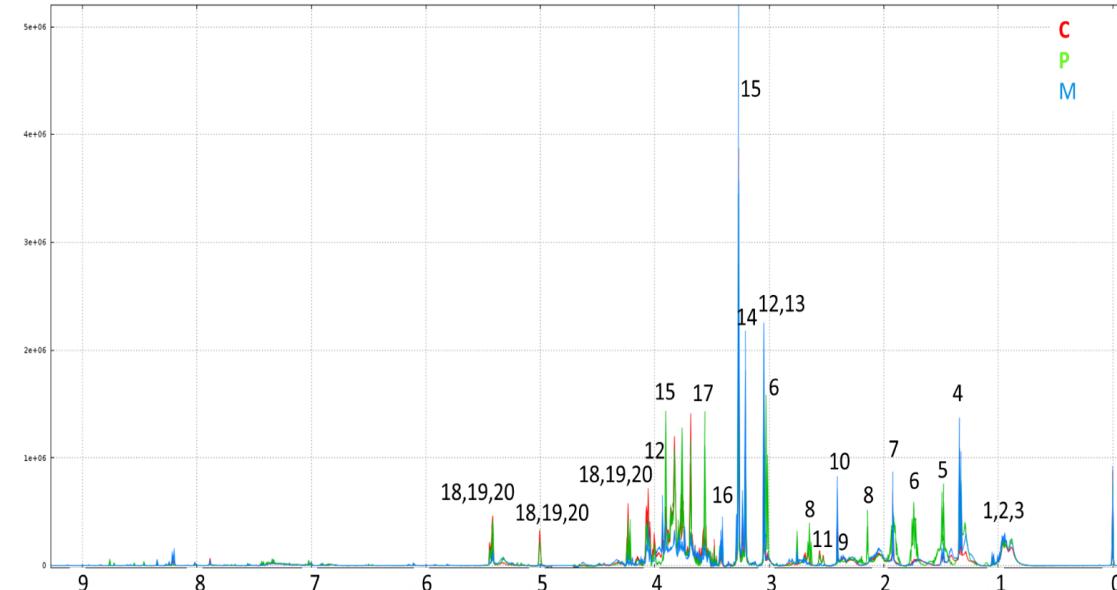
17 juin 2021 / Animation Scientifique « La RMN dans tous ses états... » INRAE QuaPA & AgroResonance / C Deborde

## Feed compound identification

**36 compounds identified:**  
amino acids & derivatives,  
sugars,  
organic acids,  
nucleotides,  
alkaloids  
vitamin precursors

in-house and open databases,  
spiking, 2D NMR

**31 patterns of resonances**  
remained as **unknowns**



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



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



# Feed compound quantification

µg/gDW

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, methionine, 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

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

INRAE

RMN métabolomique Aliments & Nutrition @ PF Métabolome MetaboHUB-Bordeaux

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



1

# ➤ Séparation de populations selon l'alimentation - 1



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



**NMRProcFlow**

## Spectra preprocessing

PPM calibration

Global and local baseline corrections

Spectra alignment

Non-uniform bucketing

Signal-to-Noise ratio determination

Total Sum Normalization

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

1

# ➤ Séparation de populations selon l'alimentation -2



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



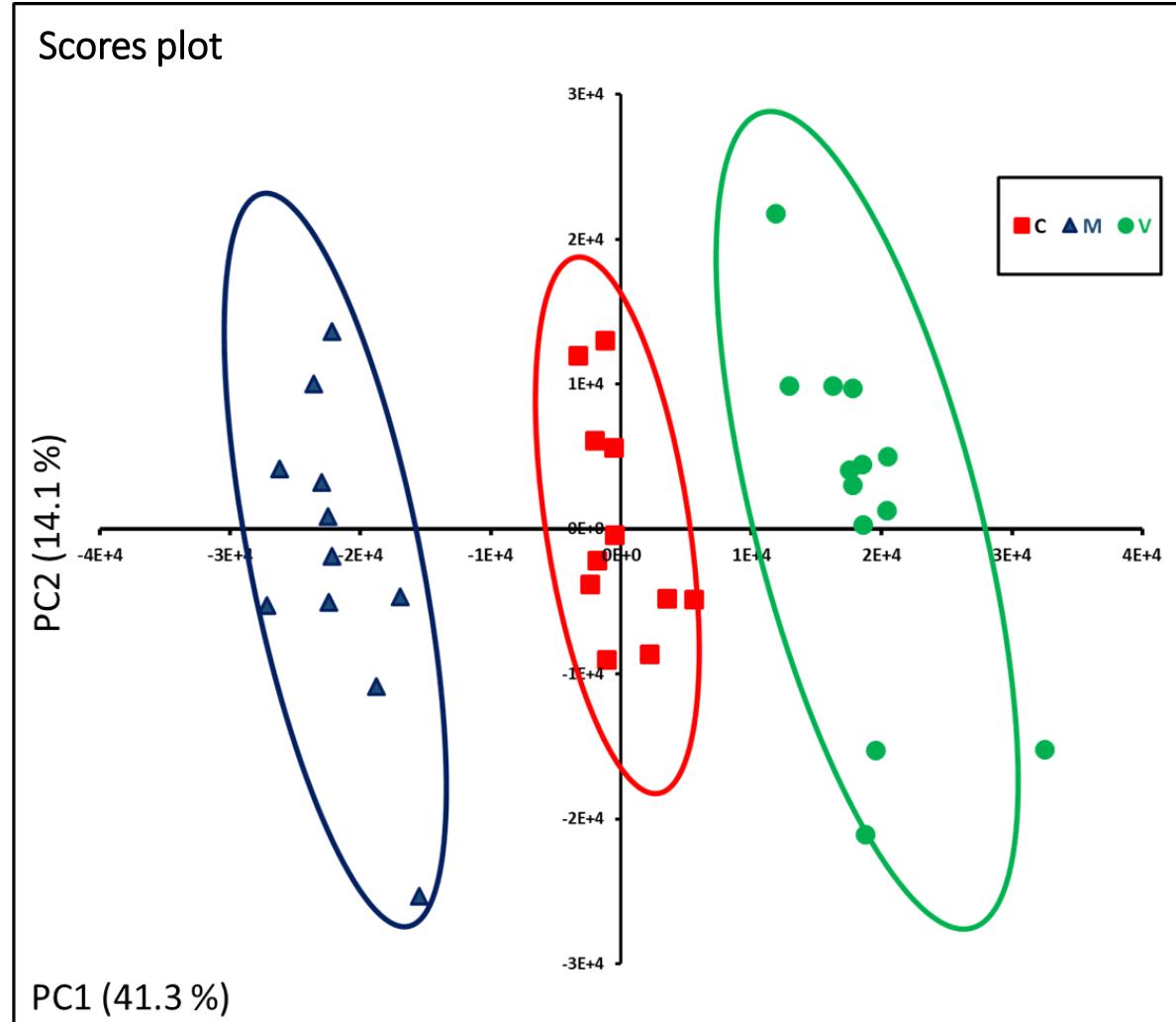
plasma



NMR

**2 acquisitions / tube**

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



Moing, B Fauconneau, C Deborde, B Madji Hounoum

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).

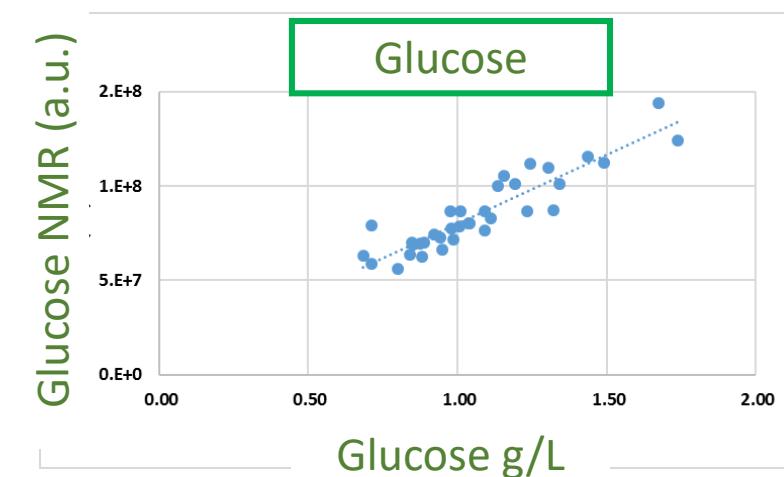
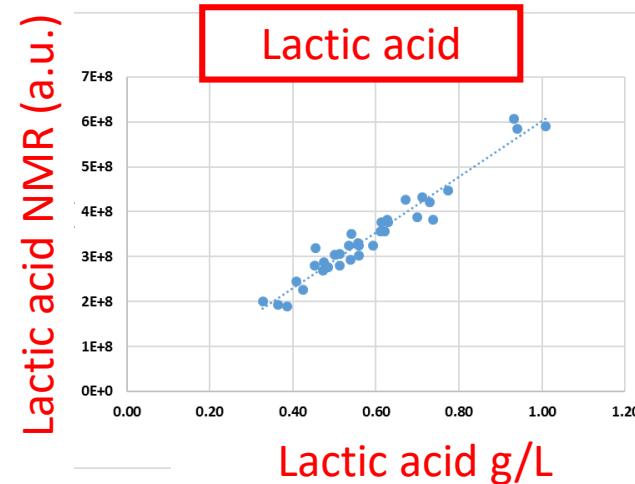
**BioStatFlow**

# ➤ 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  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra bucketing and the annotation status according to MSI [1].

Bucket	Annotation	MSI status
B4_0802	Lactate	CH
B4_0594	Lactate	CH
B4_0413	Lactate	CH
B4_0238	Lactate	CH
B1_2778	Lactate	$\text{CH}_3$
B1_2564	Lactate	$\text{CH}_3$
B5_1811	$\alpha$ -Glucose	$\alpha$ -CH
B5_1493	$\alpha$ -Glucose	$\alpha$ -CH
B4_5927	$\beta$ -Glucose	$\beta$ -CH
B4_5755	$\beta$ -Glucose	$\beta$ -CH



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)	$10.4 \pm 2.15$	$8.45 \pm 1.35$	$7.03 \pm 0.95$	ANOVA	<0.001
Plasma Lactate NMR (a u)	$3.70 \pm 1.27$	$3.32 \pm 0.76$	$3.58 \pm 1.26$	ANOVA	0.728

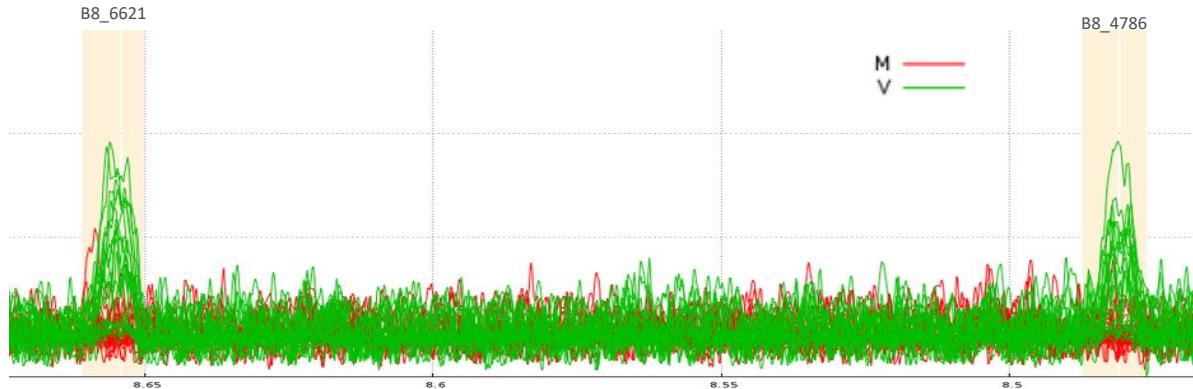
Gatesoupe *et al.*, (2018) Aquaculture Nutrition 24:1563–1576

1

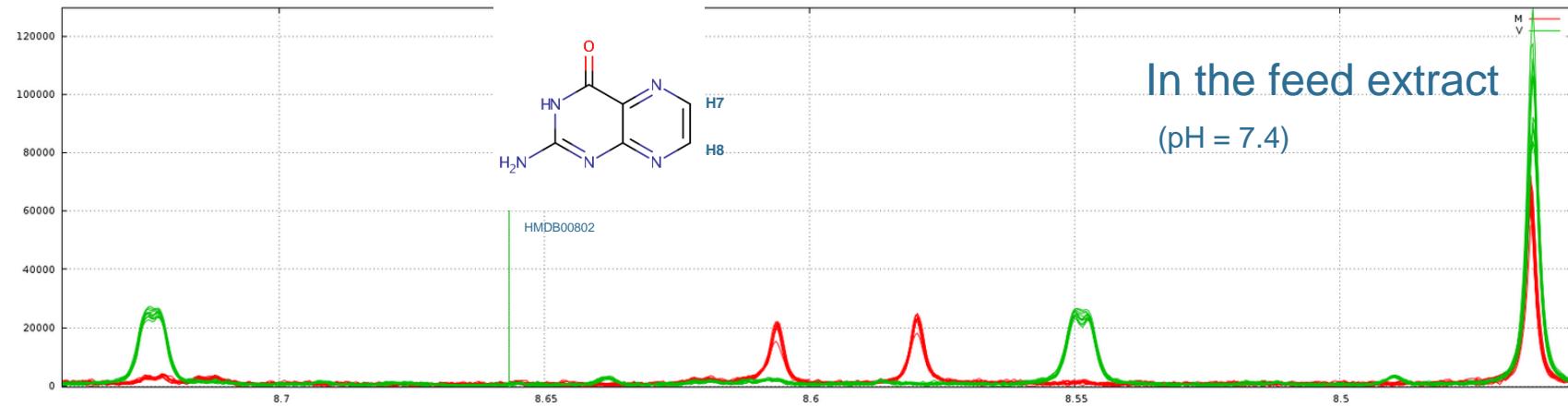
## ➤ Séparation de populations selon l'alimentation - 4 : biomarqueur « plante »



Putative candidate: Pterin



In plasma  
(pH  $\geq 7$ )



In the feed extract  
(pH = 7.4)

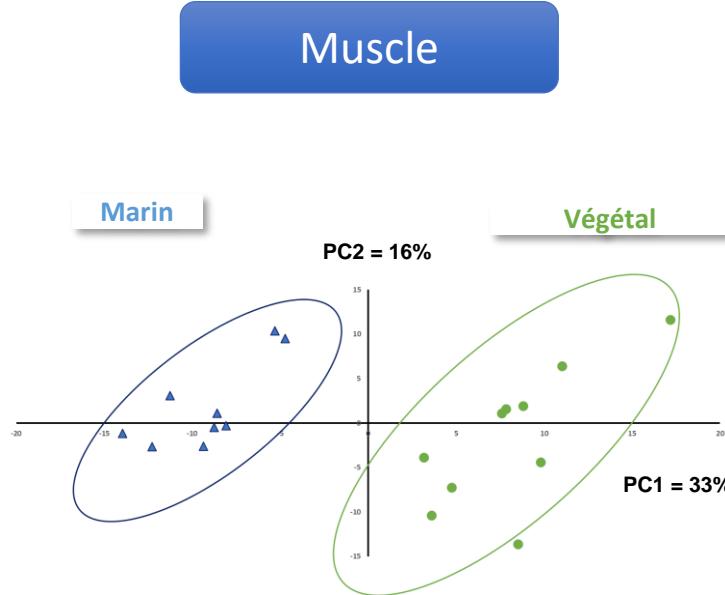
Pterin:  $262 \pm 15 \mu\text{g/gDW}$  plant-based feed

3

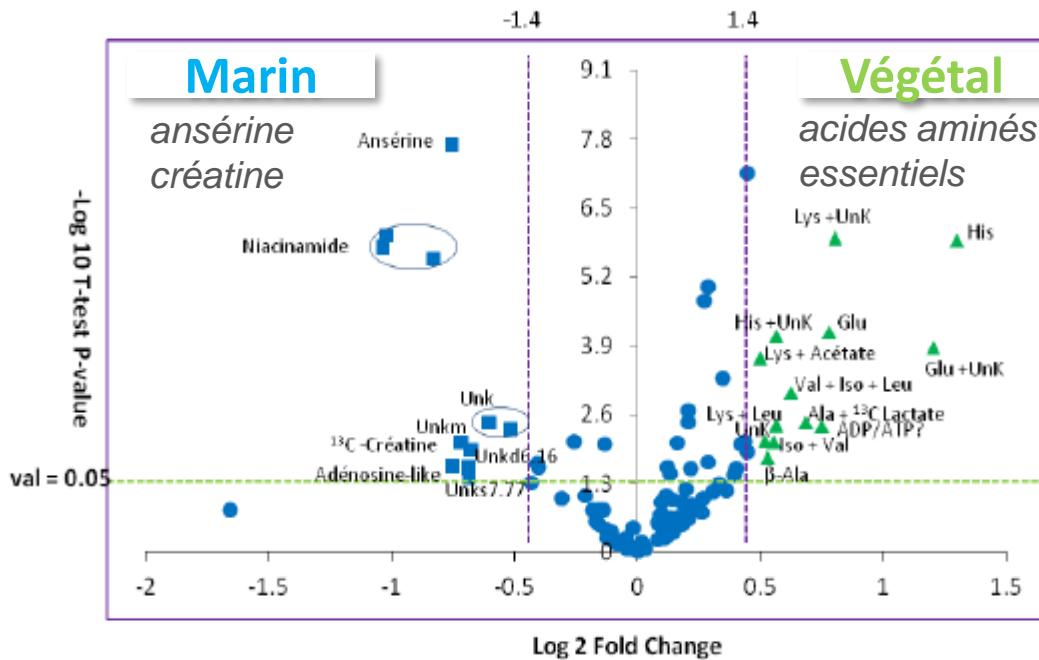
# Effet métabolique de l'alimentation -1

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

## ▶ profils $^1\text{H}$ -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

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

B Fauconneau, A Moing

ARRAINA

23

## ➤ 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  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN et  $^{31}\text{P}$ -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
  - ✓ 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 Nivelle

F Médale  
G Corraze  
J Gatesoupe  
L Larroquet  
V Lazzarotto  
SJ Kaushik  
S Skiba-Cassi  
B Fauconneau



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

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



NMRProcFlow  
nmrprocflow.org



D Rolin  
ML Lombard

BioStatFlow

biostatflow.org



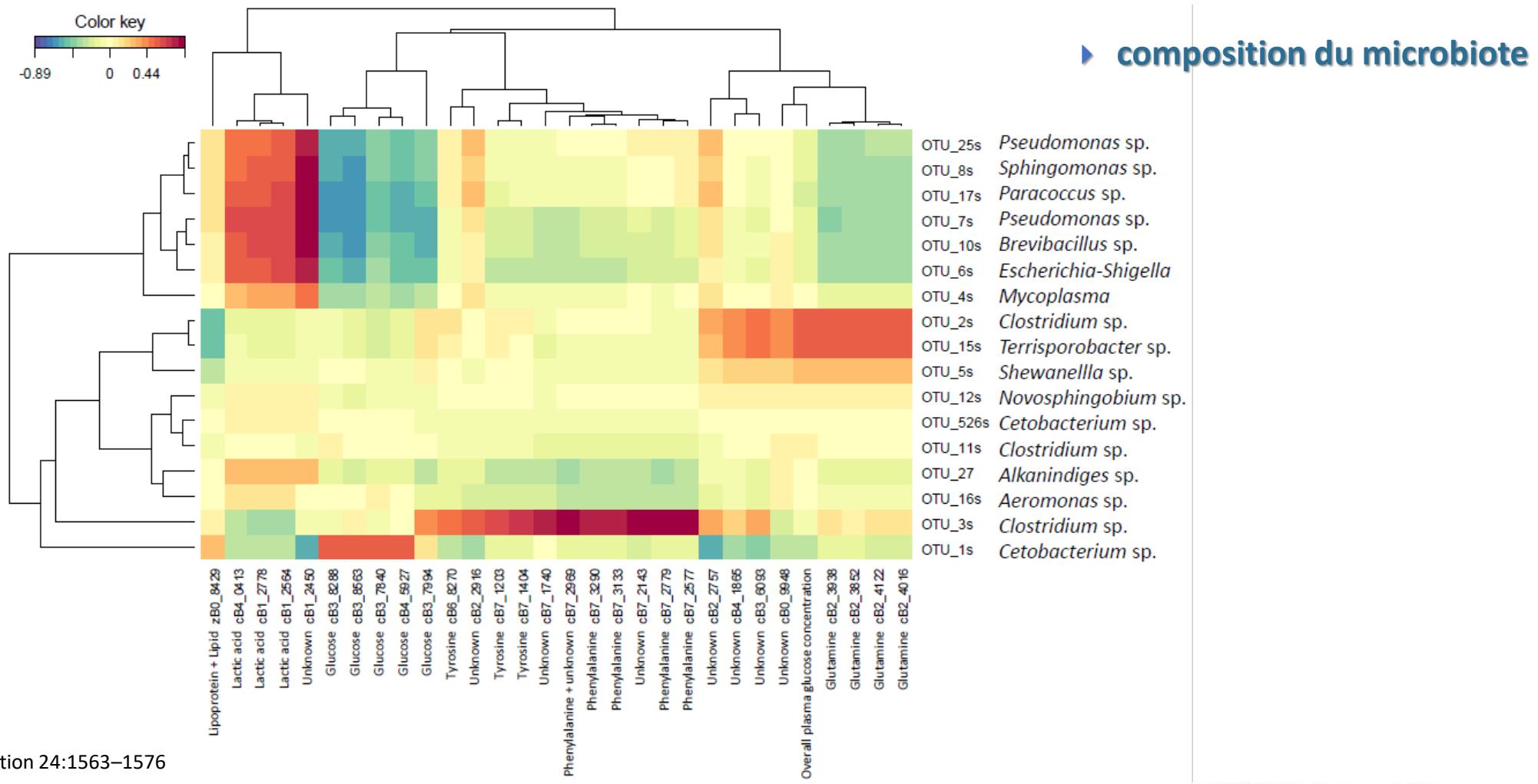
**Financial Supports:**

ARRAINA FP7-KBBE-2011-5, FUI NINAqua  
MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 and INRAE





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



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

▶ Molécules circulantes dans le plasma

