

Le Comité d'Organisation

Comité local d'organisation

- Frédérique Courant (MCU, Université Montpellier) : [UMR Hydrosciences](#)
- Elena Gomez (PU, Université Montpellier) : [UMR Hydrosciences](#)
- Hélène Fenet (PU, Université Montpellier) : [UMR Hydrosciences](#)
- Benilde Bonnefille (Doctorante, Université Montpellier) : [UMR Hydrosciences](#)
- Aurélie Escande (MCU, Université Montpellier) : [UMR Hydrosciences](#)
- Christelle Reynes (MCU, Université Montpellier) : [Institut de Génomique Fonctionnelle](#)
- Emilie Farcy (MCU, Université de Montpellier) : [UMR Marbec](#)
- Véronique Vidal (IR, Université d'Avignon) : [UMR Qualisud](#)
- Cédric Bertrand (MCU, Université de Perpignan) : [CRIOBE USR 3278](#)
- Claire Vigor (MCU, Université Montpellier) : [IBMM](#)

Comité francophone d'organisation

- Anne-Emmanuelle Hay-de Bettignies (MCU, Université de Lyon 1, ISPB) : [UMR Ecologie Microbienne 5557](#),
- Fabien Jourdan (CR, INRA toulouse) : [UMR Toxalim](#), [MetaboHUB](#)
- Floriant Bellvert (IE, CNRS) : [Plateforme MetaToul-MetaboHUB](#)
- Julien Boccard (Maitre-assistant, Université de Genève) : [Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne](#)
- Pascal de Tullio (Maitre de Recherche, Université de Liège) : [CIRM](#)
- Catherine Deborde (IR, INRA Bordeaux) : [UMR BFP&PMB](#), [MetaboHUB](#)
- Marie-Lou Lombard (Administrative, INRA Bordeaux) [UMR BFP](#)
- Etienne Thevenot (Chercheur CEA, Saclay) : [CEA LIST](#), [MetaboHUB](#)

Le Comité Scientifique

Comité scientifique local

- Eric Rivals (DR, CNRS) : [LIRMM](#)
- Sophie Lebre (MCU, Université Paul Valéry, Montpellier) : [IMAG](#)
- Jean-Charles Martin (DR, INRA Marseille) : [UMR NORT](#), plateformes BiomeT et [CRIBIOM](#)
- Laetitia Shintu (MCU, Université Aix-Marseille) : [iSm2](#), plateforme de RMN métabolomique
- Catherine Defoort (MCU, Université Aix-Marseille) : [UMR NORT](#), plateformes BiomeT et [CRIBIOM](#)
- Gaëlle Favé (Chercheuse contractuelle, Université Aix-Marseille) : [UMR NORT](#), plateformes BiomeT et [CRIBIOM](#)
- Mehdi Yemloul (MCU, Université Aix-Marseille) : [iSm2](#), plateforme de RMN métabolomique
- Valérie Tomao (MCU, Université d'Avignon) : [SQPOV](#)
- Raphael Lugan (MCU, Université d'Avignon) : [UMR Qualisud](#)
- Isabelle Bonnard (MCU, Université de Perpignan) : [CRIOBE USR 3278](#)

Comité scientifique national (conseil d'administration du RFMF)

- Floriant Bellvert (IE, CNRS) : [Plateforme MetaToul-MetaboHUB](#), Toulouse, France
- Julien Boccard (Maitre-assistant, Université de Genève) : [Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne](#) Suisse
- Alain Bouchereau (PU, Université de Rennes) : [IGEP](#), Rennes, France
- Frédérique Courant (MCU, Université Montpellier) : [UMR Hydrosociences](#), Montpellier, France
- Pascal de Tullio (Maitre de Recherche, Université de Liège) : [CIRM](#), Liège, Belgique
- Patrick Giraudeau (MCU, Université de Nantes) : [CEISAM](#), Nantes, France
- Yann Guitton (IR, Oniris) : [Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments](#), France
- Anne-Emmanuelle Hay-de Bettignies (MCU, Université de Lyon 1) : [UMR Ecologie Microbienne 5557](#), Lyon, France
- Fabien Jourdan (CR, INRA toulouse) : [UMR Toxalim](#), [MetaboHUB](#), Toulouse, France
- Jean-Charles Martin (DR, INRA) : [UMR NORT](#), plateformes BiomeT et [CRIBIOM](#), Marseille, France
- Etienne Thevenot (Chercheur CEA, Saclay) : [CEA LIST](#), [MetaboHUB](#), Saclay, France

Comité scientifique national Junior

- Nacima Aidoud (Doctorante, INSERM) : [UMR NORT](#), Marseille, France
- Sandrine Aros-Calt (IR, MedDay pharmaceuticals, CEA) : [medday-pharm](#), [iBiTecS/SPI/LEMM](#), Saclay, France
- Samia Boudah (IR, Global Bioénergies) : [global-bioenergies](#), Evry, France
- Céline Conan (Doctorante, CNRS) : [UMR8227 UPMC-CNRS](#), Roscoff, France
- Binta Dieme (IR, Université Aix-marseille) : [iSm2](#), Marseille, France
- Maximilien Gonçalves-Martins (AI, CNRS) : [CESN](#), Villeurbanne, France
- Corentine Goossens (Doctorante, Université Paris 13) : [CSPBAT](#), Bobigny, France
- Hyacinthe Le Gall (Doctorante, Université de Picardie Jules Verne) : [BIOPI](#), Amiens, France
- Blandine Madji Hounoum (Doctorante, Université François Rabelais) : [INSERM U930](#), Tours, France
- Guillaume Meiffren (IE, UCB Lyon 1) : [CESN](#), Villeurbanne, France
- David Renaud (IE, INRA) : [IGEPP](#), Rennes, France

Table des matières

Partenaires des 10^{èmes} Journées Scientifiques du RFMF.....	6
Séminaires industriels.....	12
Programme détaillé.....	15
Ateliers.....	21
Résumés des Communications orales (OP1-OP4, O1-O20, OJ1-OJ6, OS1-OS5, F1-F12, dans l'ordre chronologique).....	25
Résumés des Communications par affiche (P1-P71).....	73
Liste des participants.....	143

Partenaires Institutionnels des dixièmes Journées Scientifiques *du RFMF*

	<p style="text-align: center;">GIS IBiSA</p> <p style="text-align: center;">Site web: www.ibisa.net</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>LANGUEDOC ROUSSILLON</p> <p>LA RÉGION MIDI PYRÉNÉES</p> </div>	<p style="text-align: center;">Hôtel de Région Languedoc Roussillon</p> <p style="text-align: center;">201 Avenue de la Pompignane, 34064 Montpellier</p> <p style="text-align: center;">Site web : www.regionlrmp.fr/</p>
 <p style="font-size: 2em; color: red; margin-left: 20px;">UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER</p>	<p style="text-align: center;">Université de Montpellier</p> <p style="text-align: center;">163 rue Auguste Broussonnet 34090 Montpellier</p> <p style="text-align: center;">Site web: http://www.umontpellier.fr/</p>
 <p style="text-align: center; font-size: 0.8em;">UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE</p>	<p style="text-align: center;">Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse</p> <p style="text-align: center;">74 Rue Louis Pasteur, 84000 Avignon</p> <p style="text-align: center;">Site web: www.univ-avignon.fr/</p>

	<p>Université de Perpignan</p> <p>52 Av. Paul Alduy, 66100 Perpignan</p> <p>Site web : www.univ-perp.fr/</p>
	<p>Chaire Véolia</p> <p>HydroSciences Montpellier</p> <p>Site principal TRIOLET - Université de Montpellier - Bât. 39</p> <p>300 Avenue du Professeur Emile Jeanbrau, 34090 Montpellier</p> <p>Site web : http://www.hydrosciences.org/</p>
	<p>MetaboHUB</p> <p>Centre INRA Bordeaux - Aquitaine 71 Av. Edouard Bourlaux - CS 20032 33140 Villenave d'Ornon - France</p> <p>Site web : www.metabohub.fr/</p>
	<p>Institut national de la recherche agronomique</p> <p>147 rue de l'Université F-75338 Paris Cedex 07</p> <p>Site web: www.inra.fr</p> <p>Département Biologie et Amélioration des Plantes</p>



Université de Montpellier

HydroSciences Montpellier

Site principal TRIOLET - Université de
Montpellier - Bât. 39

300 Avenue du Professeur Emile Jeanbrau,
34090 Montpellier

Site web : <http://www.hydrosciences.org/>



Université de Montpellier

UFR Pharmacie

15 Avenue Charles Flahault,
34000 Montpellier

Site web: www.pharmacie.edu.umontpellier.fr/



Metabolomics Society

Site web <http://metabolomicssociety.org/>



Université Aix Marseille

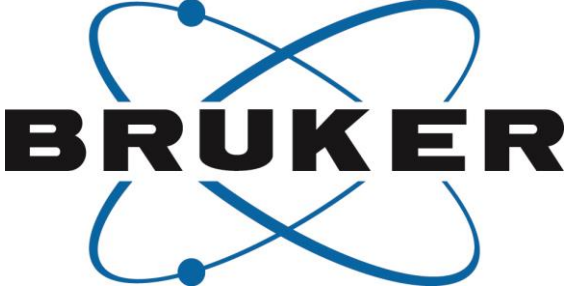



Jardin du Pharo

58, bd Charles Livon

13284 Marseille Cedex 07

Site web : <http://www.univ-amu.fr/>

Partenaires industriels des dixièmes Journées Scientifiques *du RFMF*

	<p style="text-align: center;">Bruker BioSpin S.A.</p> <p style="text-align: center;">34, rue de l'industrie - BP 10002 F-67166 Wissembourg cedex</p> <p style="text-align: center;">Site web : www.bruker.fr</p>	STAND + Séminaire
	<p style="text-align: center;">Chenomx</p> <p style="text-align: center;">10230 Jasper Ave #4350, Edmonton, AB T5J 4P6, Canada</p> <p style="text-align: center;">Site web : www.chenomx.com/</p>	STAND + Séminaire
	<p style="text-align: center;">Shimadzu France SAS</p> <p style="text-align: center;">Le Lizard II - Bat. A Bd Salvador Allende Noisiel 77448 Marne la Vallée Cedex 2</p> <p style="text-align: center;">Site web : www.shimadzu.fr</p>	STAND + Séminaire
	<p style="text-align: center;">Thermo Fisher Scientific</p> <p style="text-align: center;">16 avenue du Québec - Silic 765 Villebon-sur-Yvette</p> <p style="text-align: center;">F-91963 Courtaboeuf cedex</p> <p style="text-align: center;">Site web : www.thermoscientific.com/</p>	STAND + Séminaire

 <p>Waters THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™</p>	<p>Waters</p> <p>5 rue Jacques Monod F-78280 Guyancourt</p> <p>Site web : www.waters.com/</p>	<p>STAND + Séminaire</p>
	<p>SCIEX</p> <p>3 Avenue du Canada Parc Technopolis, Bâtiment Omega F-91940 Les Ullis</p> <p>Site web : www.sciexnow.com</p>	<p>STAND + Flash</p>
	<p>SIGMA ALDRICH</p> <p>80 rue de Luzais F-38297 Saint Quentin Fallavier cedex</p> <p>Site web : www.sigma-aldrich.com</p>	<p>STAND + Flash</p>
	<p>AGILENT TECHNOLOGIES</p> <p>33 rue du Dr Georges Levy Parc/Club du moulin à vent F-69693 Vénissieux</p> <p>Site web : www.agilent.com</p>	<p>STAND</p>

	<p>Roaltain Research Company</p> <p>Bâtiment B, 1 Avenue de la Gare, 26300 Alixan</p> <p>Site web : https://roaltainresearch.com</p>	
	<p>Proteomic solutions</p> <p>7 Rue Léo Lagrange, 27950 Saint-Marcel</p> <p>Site web : http://www.proteomicsolutions.fr/</p>	STAND
	<p>Proteigene</p> <p>7 Rue Léo Lagrange, 27950 Saint-Marcel</p> <p>Site web : www.proteigene.com/</p>	STAND
	<p>Research Institute for Chromatography</p> <p>Parc Technologique de Lyon 4 place Berthe Morisot-bât A3 69800 Saint Priest</p> <p>Site web : www.richrom.com/</p>	STAND
	<p>Euriso-Top</p> <p>Parc des Algorithmes, Bâtiment Homère Route de l'Orme F-91194 Saint Aubin</p> <p>Site web: www.eurisotop.com/</p>	STAND

Conférences/Séminaires/Flashes industriels des 10^{èmes} JS RFMF

Conférence WATERS - Mardi 31 Mai 12h00 à 12h15

Christophe Siroit, Spécialiste MS, Waters

Coordonnées : Waters, BP 608, 78056 Saint-Quentin en Yvelines cedex - Tél : 01 30 48 72 00 - Email : france@waters.com

La mobilité ionique : une dimension analytique supplémentaire pour la métabolomique et la lipidomique

L'identification de métabolites dans des matrices complexes telles que les fluides biologiques se révèle être un vrai défi.

La résolution en masse seule, trouvera rapidement ses limites, quant à l'inverse, une approche combinant résolution chromatographique, résolution en masse et mobilité ionique les repoussera. Nous reviendrons sur la nécessité d'accroître la capacité de pics d'un système d'analyse dans sa globalité, à travers d'une part, le rappel des géométries des plateformes Synapt et Vion, et d'autre part, de quelques exemples. L'augmentation du nombre de molécules identifiées devant aller de paire avec la confiance associée, nous montrerons que les critères d'identification d'un métabolite, à savoir le rapport masse sur charge et le temps de rétention, peuvent être complétés par l'utilisation de la section efficace de collision afin d'augmenter la qualité globale des résultats d'analyse.

Conférence Bruker - Mardi 31 Mai 15h50 à 16h05

Claire Cannet, Bruker

La place de la RMN dans le dépistage sélectif des maladies métaboliques

Le dépistage sélectif des maladies métaboliques héréditaires est principalement réalisé par une analyse multi-plateforme utilisant GC/MS, chromatographies/méthodes enzymatiques et LC/MS. Cependant de plus en plus d'échantillons de patients ayant des symptômes neurologiques non spécifiques sont envoyés aux laboratoires spécialisés où les analyses standards ne suffisent malheureusement pas. Une étude en cours a déjà montré que l'utilisation de la RMN pouvait couvrir l'analyse de différentes classes de substances permettant ainsi de détecter des maladies très souvent sous-diagnostiquées. Un exemple d'identification par RMN d'un déficit en transporteur de la créatine chez deux patients sera présenté.

Conférence Shimadzu – Mercredi 1er Juin – 15h50 à 16h05

Etienne Maout, Shimadzu

Travers MS, nouvel outil logiciel pour le traitement multivarié de données MRM pour la métabolomique

Conférence Chenomenex – Jeudi 2 Juin 10h30 à 10h45

Andrei Bunescu, PhD, Bioaster, Lyon

Heat-quenching of mouse liver tissue for metabolic profiling

One of the crucial steps in the metabolomics studies workflow is the sampling part. Taking snapshots of a given metabolic state of biopsy may become very difficult due to fast turning autophagy enzymatic reaction. Thus, the common method to prevent autophagy processes is quenching by snap freezing with liquid nitrogen or dry ice. However, the implementation of such a quenching approach is difficult in some laboratories or particularly in clinical environment. Additionally, during sample preparation, some enzymatic processes could be reactivated, leading to artefacts with no biological relevance.

An alternative method consists in permanent quenching of the enzymatic activity, based on fast conductive heating stabilization (HS). To evaluate this approach, we used the Stabilizer™ system to preserve mice liver tissues. Thus, the study was performed on mouse livers from 30 healthy mice, randomized in 5 groups of 6 animals designed to compare snap freezing at -80°C to 3 groups of heat stabilization conditions (freezing just after the heat stabilization, after 1 hour and after 3 hours) and to a negative control samples maintained at room temperature during 10 minutes before freezing. The polar metabolic profile analysis of the methanol and PBS extracts was done by NMR. The metabolites were identified and quantified using Chenomx software. The results based on the methanol extracts show similar qualitative and quantitative results regardless of the quenching method. Then, the efficiency of the heat-quenching was proved by no notable enzymatic reactivation in the PBS heat-quenched tissue extracts.

Séminaire Thermo – Mercredi 1er Juin

- Présentation flash – 10h30

Mr. Yann Simon

En GCMS Haute-résolution, Analyse Quantitative, Screening et identification structurale enfin réunis!!!

- Présentation de 30 minutes - 13h15 à 13h45

Mme Marie-Pierre Pavageau

Increased Throughput, Sensitivity, and Confidence for Metabolomics Research Using Ultra-High-Field Orbitrap Mass Spectrometers.

Présentation flash ABSciex – Mardi 31 Mai 16h40 à 16h45

Olivier Hutinel, ABSciex

Approches métabolomiques, ciblées ou non-ciblées ?

Présentation Flash Merck – Mercredi 1er Juin 14h45 à 14h50

Virginie Lemaire, Sigma-Aldrich groupe Merck

Introduction aux solutions pour simplifier l'analyse de vos échantillons cliniques

Introduction rapide à nos différentes solutions pour simplifier vos échantillons :

- la plateforme Hybrid SPE pour supprimer efficacement les phospholipides et les protéines de vos échantillons et ainsi améliorer l'ionisation en LC/MS.

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/hybridspe

- les SupelMIP polymères à empreinte moléculaire pour isoler directement vos molécules cibles de vos matrices complexes.

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/supelmip

- Les fibres BioSPME pour une microextraction sélective directe des petites molécules d'échantillons complexes tel que le plasma, ou les tissus.

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/biospme

- La technologie Seppro une solution pour éliminer les protéines abondantes de vos échantillons

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/seppro

Nous avons aussi de nombreuses solutions pour la séparation de vos composés avec nos différentes colonnes HPLC, et des outils pour simplifier vos recherches de métabolites, donc n'hésitez pas à nous rendre visite sur notre stand pour les découvrir.

Programme des Dixièmes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique

30 mai - 2 Juin 2016

UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Montpellier
15 avenue Charles Flahault, 34090 Montpellier

lundi 30 mai 2016

- 10:30 - 12:30 : Atelier Identification des métabolites par spectrométrie de masse : retours sur CASMI 2016 (Grégory Genta-Jouve)**
[Préfa 1](#)
(sur inscription préalable validée)
- 10:30 - 12:30 : Atelier Méthodes d'intégration multi-omiques (Jean-Charles Martin)**
[Préfa 2](#)
(sur inscription préalable validée)
- 14:00 - 16:00 : Atelier Présentation interactive pour le traitement d'une série de RMN 1D 1H à l'aide d'une boîte à outil en ligne sur le WEB (Daniel Jacob et Catherine Deborde)**
[Préfa 1](#)
(sur inscription préalable validée)
- 14:00 - 17:00 : Atelier Initiation à la lipidomique ciblée ou globale : intérêts et limites (Justine Bertrand-Michel, Benoît Colsh et Pauline Le Faouder)**
[Préfa 2](#)
(sur inscription préalable validée)
- 16:00 - 18:00 : Atelier ¹³C Fluxomique : du design expérimental à l'obtention d'une carte de flux (Florian Bellvert, Jean-Charles Portais, Edern Cahoreau et Lindsay Peyrigua)**
[Préfa 1](#)
(sur inscription préalable validée)

mardi 31 mai 2016

- 8:30 - 9:00 : Accueil des participants Halls A**
- 9:00 - 9:10 : Allocution de Bienvenue Amphi A**
Ouverture des 10^{èmes} JS du RFMF par Philippe Augé, Président de l'Université de Montpellier
- 9:10 - 9:25 : Introduction aux 10^{èmes} Journées Scientifiques Amphi A**
Fabien Jourdan, Président du RFMF et Frédérique Courant, Coordinatrice du Comité Local d'Organisation

9:30 - 10:15 : Conférence invitée Amphi A

Chairman : Patrick Giraudeau, Nantes, France

9h30 - 10h15 : **Strategies to integrate NMR and mass spectrometry in metabolomics.**
Arthur Edison, Georgie, USA **OP1**

10:15 - 10:45 : Session Santé & Nutrition (première partie) Amphi A

Chairman : Patrick Giraudeau, Nantes, France et Binta Dieme (RFMF Junior), Marseille, France

10h15 - 10h20 : **NMR-based metabolomics for health: applications to porphyria and to chronic kidney disease.**
Gildas Bertho, Paris, France **F1-P1**

10h20 - 10h25 : **Comparative lipidomic analyses of Huntington's disease mouse models.**
Alexandre Seyer, Paris, France **F2-P2**

10h25 - 10h45 : **A CE/MS pipeline for long term comparable assessment of the urinary metabolome.**
Bénédicte Buffin-Meyer, Toulouse, France **O1**

10:45 - 11:15 : Pause – Échanges informels – Visite des stands Halls A & B

11:15 - 12:15 : Session Santé & Nutrition (deuxième partie) Amphi A

Chairman : Patrick Giraudeau, Nantes, France et Binta Dieme (RFMF Junior), Marseille, France

11h15 - 11h35 : **Molecular networking of MS/MS as a tool to target antiviral diterpenoids from Corsican Euphorbia.**
Mélicca Esposito, Gif-sur-Yvette, France **O2**

11h35 - 11h55 : **NMR investigation of targeted therapy effects on the host metabolism for HER-2 positive breast cancer.**
Elodie Jobard, Lyon, France **O3**

12h00 - 12h15 : **La mobilité ionique : une dimension analytique supplémentaire pour la métabolomique et la lipidomique.**
Christophe Siroit, Waters, France **OS1**

12:15 - 14:00 : Buffet et visite des posters Halls A & B, Salle des Actes pour les posters

14:00 - 14:45 : Conférence invitée Amphi A

Chairman: Floriant Bellvert, Toulouse, France

14h00 - 14h45 : **DynaMet, a fully automated pipeline for dynamic LC-MS data.**
Patrick Kiefer, Zurich, Suisse **OP2**

14:45 - 16:05: Session Microbiologie Amphi A

Chairman: Floriant Bellvert, Toulouse, France et Sandrine Aros-Calt (RFMF Junior), Paris, France

14h45 - 15h05 : **Natural and synthetic methylotrophy : a metabolic challenge.**
Jean-Charles Portais, Toulouse, France **O4**

15h05 - 15h25 : **Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of S. cerevisiae strains from diverse environments.**
Thibault Nidelet, Montpellier, France **O5**

- 15h30 - 15h45 : **Development of a high throughput (HT) flux analysis workflow.**
Cécilia Berges, Toulouse, France **O1-RFMF Junior**
- 15h45 - 15h50 : **The GCMS characterization of the central carbon metabolism of Arthrospira platensis brings insights to its original exopolysaccharide composition when submitted to various culture conditions.**
Olivier Gonçalves, Nantes, France **F3-P3**
- 15h50 - 16h05 : **La place de la RMN dans le dépistage sélectif des maladies métaboliques.**
Claire Cannet, Bruker, France **OS2**
- 16:05 - 16:35 : Pause – Échanges informels – Visite des stands Halls A & B**
- 16:35 - 18:00 : Session Biostatistique & Bioinformatique Amphi A**
Chairman: Yann Guittou, Nantes, France et David Renaud (RFMF Junior), Rennes, France
- 16h35 - 16h40 : **Biosigner : a new method for the discovery of significant molecular signatures from omics data.**
Étienne Thévenot, Paris, France **F4-P4**
- 16h40 - 16h45 : **Approches métabolomique, ciblé ou non-ciblé ?**
Olivier Hutinel, ABSciex, France **F5-P5**
- 16h45 - 17h00 : **Inferring missing compounds from metabolic profile using network topology analysis.**
Clément Frainay, Toulouse, France **O2-RFMF Junior**
- 17h00 - 17h15 : **proFIA: An R package for FIA-HRMS metabolomics data preprocessing.**
Alexis Delabrière, Paris, France **O3-RFMF Junior**
- 17h20 - 17h40 : **Comparaison des empreintes métabolomiques produites par LC/MS et FIA/MS à très haute résolution.**
Baninia Habchi, Paris, France **O6**
- 17h40 - 18h00 : **Non Stationary Metabolic flux analysis in isotope labeling experiments using the adjoint approach.**
Stéphane Mottelet, Compiègne, France **O7**
- 18:00 - 19:00 : Assemblée Générale du RFMF Amphi A**
Ouverte à tous les participants des 10^{èmes} JS du RFMF et aux membres du RFMF
- 19:00 - 20:00 : Apéritif régional de Bienvenue Halls A**
Cocktail d'accueil, échanges informels

Mercredi 1 juin 2016

- 8:45 - 9:30 : Conférence invitée Amphi A**
Chairman : Raphaël Lugan, Avignon, France
- 8h45 - 9h30 : **Getting insight into plant aromatic metabolism via Candidate Substrate Product Pairs.**
Kris Morreel, Gent, Belgique **OP3**

9:30 - 10:35 : Session Plantes & Agro-alimentaire (première partie) Amphi A

Chairman : Raphaël Lukan, Avignon, France et Maximilien Gonçalves-Martins (RFMF Junior), Lyon ,France

- 9h30 - 9h50 : **Plant metabolomics for agriculture in New Zealand : A LC-MS investigation of the biochemical diversity of secondary metabolites among perennial ryegrass populations.**
Karl Fraser, Palmerston North, Nouvelle-Zélande O8
- 9h50 - 10h10 : **Welcoming green metabolomic : using supercritical fluid chromatography, tandem mass spectrometry and molecular networking, to target bioactive compounds.**
Loui-Félix Nothias, Paris, France O9
- 10h15 - 10h30 : **Xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacteria, Azospirillum lipoferum CRT1.**
Camille Rozier, Lyon, France O4-RFMF Junior
- 10h30 - 10h35 : **En GCMS haute-résolution, analyse quantitative, screening et identification structurale enfin réunis!!!**
Yann Simon, Thermo, France F6-P6

10:35 - 11:05 : Pause – Échanges informels – Visite des stands Halls A & B

11:05 - 12:00 : Session Plantes & Agro-alimentaire (deuxième partie) Amphi A

Chairman : Raphaël Lukan, Avignon, France et Maximilien Gonçalves-Martins (RFMF Junior), Lyon ,France

- 11h05 - 11h10 : **Étude des interactions chimiques dans le cas de la maladie du dépérissement de la lavande et du lavandin : à la recherche de moyen de lutte biologique.**
Florence Nicolé, Saint-Étienne, France F7-P7
- 11h10 - 11h15 : **Leaf ageing in oilseed rape, a qualitative and quantitative metabolomic view.**
Sylvain Dechaumet, Rennes, France F8-P8
- 11h20 - 11h40 : **Étude métabolomique par RMN du proton de l'effet du stress osmotique chez le lin.**
Hyacinthe Le Gall, Amiens, France O10
- 11h40 - 12h00 : **Flux balance modelling in developing tomato fruit : the respiration climacteric as an emergent property.**
Sophie Colombié, Bordeaux, France O11

12:00 - 14:00 : Buffet, visite des stands et séminaire industriel, Session parallèle A - Halls A & B, Amphi A pour le séminaire Thermo

- 13h15 - 13h45 : **Increased throughput, sensitivity, and confidence for metabolomics research using ultra-high-field orbitrap mass spectrometers.**
Marie-Pierre Pavageau, Thermo, France OS3

12:00 - 14:00 : Buffet, visite des stands et atelier RFMF Junior, Session parallèle B - Halls A & B, Amphi D pour l'atelier

- 12h30 - 14h00 : **Interventions et discussions autour des problématiques propres aux juniors dans les domaines de la métabolomique et de la fluxomique (Maximilien Gonçalves-Martins et Sandrine Aros-Calt).**
(sur inscription préalable validée)

14:00 - 14:45 : Conférence invitée Amphi A

Chairman: Elena Gomez, Montpellier, France

14h00 - 14h45 : **Metabolomics for characterising the chemical exposome and its effects.**
Elizabeth Hill, Brighton, Royaume-Uni **OP4**

14:45 - 16:35: Session Écotoxicologie Amphi A

Chairman: Elena Gomez, Montpellier, France et Guillaume Meiffren (RFMF Junior), Lyon, France

14h45 - 14h50 : **Introduction aux solutions pour simplifier l'analyse de vos échantillons cliniques.**
Virginie Lemaire, Sigma-Aldrich groupe Merck, France **F9-P9**

14h50 - 15h05 : **Exposition de moules au diclofénac : recherche des métabolites par analyse non ciblée chez Mytilus galloprovincialis.**
Bénilde Bonnefille, Montpellier, France **O5-RFMF Junior**

15h10 - 15h30 : **Effets métaboliques des développements cyanobactériens sur l'ichtyofaune : approche éco-métabonomique.**
Benoît Sotton, Paris, France **O12**

15h30 - 15h50 : **A lipidomic approach led to standardized biomarkers highlighting ecotoxicological effects of soil pollutants on plants.**
Marina Le Guédard, Bordeaux, France **O13**

15h50 - 16h05 : **Travers MS, nouvel outil logiciel pour le traitement multivarié de données MRM pour la métabolomique.**
Étienne Maout, Shimadzu, France **OS4**

16:05 - 16:35 : Session Masters Amphi A

16:35 - 17:30 : Pause – Echanges informels - Visite des posters Salle des Actes

17:30 - 19:00 : Assemblée Générale du RFMF Junior Amphi A

Ouverte à tous les participants des 10^{èmes} JS du RFMF et aux membres du RFMF

19:00 - 23:00 : Dîner de Gala des 10^{èmes} JS du RFMF

Domaine de Verchant, Castelnau-le-Lez

Jeudi 2 juin 2016

9:00 - 10:45 : Session Développements Analytiques Amphi A

Chairman : Pascal de Tullio, Lièges, Belgique et David Renaud (RFMF Junior), Rennes, France

9h00 - 9h20 : **Does the LC-HRMS non-targeted metabolomics platform influence the markers ? An interplatform comparison for wine origin discrimination.**
Hector Gallart-Ayala, Stockholm, Suède **O14**

9h20 - 9h40 : **Investigation of metal-catalyzed regioselective H/D exchange as an efficient and flexible tool to produce stable isotope labelled compounds for quantitative metabolomics.**
Anne-Laure Damont, Paris, France **O15**

9h40 - 10h00 : **Pushing the limits of metabolomics by NMR : more sensitive, highly resolved and quantitative tools for tracking metabolites in plants.**
Jonathan Farjon, Paris, France **O16**

10h05 - 10h25 : **Hyperpolarized NMR Metabolomics.**
Aurélien Bornet, Lausanne, Suisse **O17**

10h25 - 10h30 : **Analyse des phospholipides oxydés par LC(ESI)-MSMS : une approche lipidomique.**
Spiro Khoury, Clermont-Ferrand, France **F10-P10**

10h30 - 10h45 : **Heat-quenching of mouse liver tissue for metabolic profiling.**
Andrei Bunescu (Bioaster), Lyon, France, pour Chenomx **OS5**

10:45 - 11:15 : Pause – Échanges informels – Visite des stands Halls A & B

11:15 - 12:45 : Session Santé & Nutrition (troisième partie) Amphi A

Chairman : Jean-Charles Martin, Marseille, France et Binta Dieme (RFMF Junior), Marseille, France

11h15 - 11h20 : **Développement de méthodes «omiques» pour analyser la composition du lait maternel et son évolution lors des premiers jours de lactation.**
Mikaïl Berdi, Paris, France **F11-P11**

11h20 - 11h25 : **Crosstalk between astrocytes and motor neurons : a metabolomics study.**
Blandine Madji Hounoum, Tours, France **F12-P12**

11h25 - 11h45 : **Urinary metabolomic profiling by 1H-NMR and HRMS-Biomarker identification of the organic diet.**
Adeline Delcambre, Toulouse, France **O18**

11h45 - 12h05 : **Metabolic flexibility in human acute myeloid leukemia with IDH mutation.**
Lucille Stuani, Toulouse, France **O19**

12h10 - 12h25 : **Evolution of urine metabolomic profiles in newborns.**
Aurélien Scalabre, Lyon, France **O6-RFMF Junior**

12h25 - 12h45 : **Analyse métabolomique et lipidomique dans le cancer gastrique : Le projet MAGICC (MetAbolism in Gastric Cancer by Corsaire).**
Laurent Corcos, Brest, France **O20**

12:45 - 13:00 : Clôture des 10^{èmes} JS du RFMF Amphi A

13:00 - 13:45 : Panier Repas Halls A & B

Ateliers

Lundi 30 Mai

Atelier 1 : ^{13}C Fluxomique : du design expérimental à l'obtention d'une carte de flux – 16h00 à 18h00

Personnes encadrant la formation / animant la table ronde:

Florian BELLVERT Correspondant de l'atelier (bellvert@insa-toulouse.fr), Jean-Charles PORTAIS (portais@insa-toulouse.fr), Edern CAHOREAU (cahoreau@insa-toulouse.fr), Lindsay PEYRIGA (peyriga@insa-toulouse.fr).

Public envisagé et les prérequis :

Etudiants, Ingénieurs et chercheurs avec des notions de métabolomique et de spectrométrie de masse

Objectif de la formation :

L'objectif est d'acquérir une connaissance de théorique sur l'ensemble du workflow de l'approche ^{13}C Fluxomique.

Compétences acquises à la sortie de la formation :

- Une connaissance générale des besoins expérimentaux pour une analyse en fluxomique au niveau expérimental, analytique (analyse des isotopologues par MS et RMN) ainsi qu'au niveau du traitement des données spécifique au flux.
- Une compréhension générale du potentiel et des limites de la fluxomique pour l'étude du métabolisme

Atelier 2 : Identification des métabolites par spectrométrie de masse : retours sur CASMI 2016 – 10h30 à 12h30

Personnes encadrant la formation / animant la table ronde:

Grégory GENTA-JOUE Correspondant de l'atelier (gregory.genta-jouve@parisdescartes.fr), Samuel BERTRAND (samuel.bertrand@univ-nantes.fr).

Public envisagé et les prérequis :

Etudiants, Ingénieurs et chercheurs avec des connaissances en spectrométrie de masse et bioinformatique (R, python ou matlab).

Objectif de la formation :

L'objectif est de revenir sur les résultats du CASMI 2016 et de présenter les méthodes et outils utilisés pour l'élucidation des structures proposées cette année.

Compétences acquises à la sortie de la formation :

Une compréhension générale de l'utilisation:

- (1) d'un langage de programmation pour le traitement des données LC-MS;
- (2) des outils existants pour l'élucidation structurale assistée par ordinateur.

Atelier 3 : Méthodes d'intégration multi-omiques – 10h30 à 12h30

Personnes encadrant la formation / animant la table ronde:

Jean-Charles MARTIN Correspondant de l'atelier (jean-charles.martin@univ-amu.fr).

Public envisagé et les prérequis :

Atelier avant tout destiné aux biologistes ou toute personne souhaitant interpréter des données métabolomiques, omiques et/ou biologiques (thésard, chercheurs) avec des connaissances en biologie/biochimie.

Objectif de la formation :

- Organisation : séminaire sur les concepts d'organisation du vivant, illustré en deuxième partie par une application pratique avec démonstration des outils informatiques.
- Général : Donner des bases pour organiser les données en vue de leur traitement statistique et de l'interprétation biologique. Condenser l'information et la restituer sous forme de nouvelles connaissances.
- Spécifique : Utilisation des modèles multiblocks (multiéchelle) pour modéliser et analyse des réseaux de corrélations. Agréger des données hétérogènes générées à partir de plateformes différentes (multiomique, physiologie, phénotypes). Comprendre comment hiérarchiser l'importance des fonctions biologiques dans le déterminisme des phénotypes. Calculer des équations prédictives à l'aide de SIMCA.

Compétences acquises à la sortie de la formation :

- Comprendre comment organiser les données en vue de leur interprétation ;
- Comprendre la notion de modules biologiques ;
- Connaitre certains outils informatiques de traitement de l'information.

Atelier 4 : Présentation interactive pour le traitement d'une série de RMN 1D ¹H à l'aide d'une boîte à outil en ligne sur le WEB – 14h00 à 16h00

Personnes encadrant la formation :

Daniel JACOB Correspondant de l'atelier (djacob@bordeaux.inra.fr), Catherine DEBORDE (cdeborde@bordeaux.inra.fr).

Public envisagé et les prérequis :

Novice ou initié en traitement de spectres RMN 1D ^1H avec des connaissances du principe de la métabolomique par RMN.

Objectif de la formation :

Initiation au traitement de données de métabolomique obtenues par RMN, et ce à l'aide d'outils accessibles en ligne (internet). L'atelier sera concentré principalement sur les étapes de traitements de série de spectres à l'aide de l'outil NMRProcFlow. Les étapes de traitements statistiques des données issues des étapes de traitement seront abordées rapidement à l'aide de l'outil en ligne BioStatFlow. L'atelier s'organisera autour d'une présentation interactive (questions/réponses) et de discussions.

Compétences acquises à la sortie de la formation :

Bonne compréhension des étapes de traitements de série de spectres à l'aide d'une boîte à outil en ligne pour une mise en autonomie rapide dans l'utilisation de ces outils :

- à l'aide de l'outil en ligne NMRProcFlow

- à l'aide de l'outil en ligne BioStatFlow :

- Calibration de l'échelle des PPM (cas avec le plasma par exemple)
- Correction de la ligne de base globalement et localement
- Réalignements locaux de pics,
- Elimination post-acquisition du signal solvant,
- Binning simple ou uniforme, Binning de taille variable et Binning dit « intelligent »,
- Traitement statistique simple (ACP, ...)

Durée de la formation : 2 heures.

Date et lieu : Lundi 30 mai à 14h (la salle sera précisée ultérieurement)

Nb de places max : 25 personnes max.

Atelier 5 : Initiation à la lipidomique ciblée ou globale : intérêts et limites – 14h00 à 17h00

Personnes encadrant la formation / animant la table ronde:

Justine BERTRAND-MICHEL (justine.bertrand-michel@inserm.fr) Correspondant de l'atelier, Benoit COLSH (benoit.colsch@cea.fr), Pauline LE FAUDER (pauline.le-faouder@inserm.fr).

Public envisagé et les prérequis :

Etudiants, Ingénieurs et chercheurs avec des notions de métabolomique et de spectrométrie de masse

Objectif de la formation :

L'objectif est d'initier le public aux généralités de l'analyse lipidomique, de comprendre l'intérêt et les limites de la lipidomique globale vs ciblée, et être capable d'initier un plan d'expérience dans le domaine. L'objectif final sera d'éditer des recommandations pour l'analyse lipidomique

Compétences acquises à la sortie de la formation :

Acquérir les bases de l'analyse lipidomique.

Intro : généralité sur l'analyse lipidomique

Table ronde autour de l'analyse globale en lipidomique

Table ronde autour de l'analyse ciblée en lipidomique

Conclusion : rédaction des recommandations pour l'analyse lipidomique

Mercredi 1^{er} Juin

Atelier Junior : Interventions et discussions autour des problématiques propres aux juniors dans les domaines de la métabolomique et de la fluxomique – 12h30 à 14h00

Personnes encadrant la formation / animant la table ronde:

Maximilien GONCALVES-MARTINS Correspondant de l'atelier (maximilien.goncalves-martins@univ-lyon1.fr), Sandrine AROS-CALT (saros.calt@gmail.com).

Public envisagé et les prérequis :

Juniors (Doctorant, post-doc, ingénieur, M2, -33 ans). Aucun prérequis

Objectif de la formation :

Echanger sur les difficultés rencontrées par les juniors dans les domaines de la métabolomique et de la fluxomique. Faire intervenir des acteurs confirmés du domaine pour aborder ces sujets :

- Intégration professionnelle (employabilité, réseau professionnel, bourses, plateformes nationales,...)
- Construction de projets (réussir sa thèse, publication en métabolomique, ...).

Compétences acquises à la sortie de la formation :

- Avoir des éléments d'informations pour optimiser la construction de son réseau professionnel et de son projet scientifique en métabolomique et fluxomique.
- Avoir une vision plus élargie des questions et problèmes rencontrés par les juniors.

Durée de la formation : 1,5 heures.

Date et lieu : Mercredi 1^{er} Juin à 14h (la salle sera précisée ultérieurement)

Nb de places max : Limitation en fonction des places dans l'amphi.

Résumés

Communications Orales

Les résumés de l'ensemble des communications orales figurant sur le programme (i.e. les conférences invitées, juniors, industrielles et flashes) sont regroupés dans cette section dans l'ordre chronologique

OP1 – Conférence invitée

Strategies to Integrate NMR and Mass Spectrometry in Metabolomics

Arthur Edison

*University of Georgia – Departments of Biochemistry and Genetics, Institute of Bioinformatics,
Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA, États-Unis*

NMR and MS are the primary analytical platforms for metabolomics. They each have great strengths and some weaknesses. There are several challenges in the field of metabolomics, most notably compound identification and quantification. We have been developing new approaches to NMR metabolomics using both traditional ^1H and also ^{13}C detection (Clendinen et al, 2014; Clendinen et al, 2015a; Clendinen et al, 2015b). ^{13}C -based metabolomics offers advantages both for NMR and LC-MS studies. Our NMR methods are greatly facilitated by high sensitivity ^{13}C -optimized superconducting cryogenic probes, which we have made in partnership with the National High Magnetic Field Laboratory (Ramaswamy et al, 2013a; Ramaswamy et al, 2013b; Ramaswamy et al, 2016). At natural abundance ^{13}C , we have shown that it is possible to record 1D ^{13}C and ^1H data and statistically correlate resonances, which can be matched to databases. I will describe a new project to develop a novel 5-mm ^{13}C -optimized high temperature superconducting probe for 18.8 T (800 MHz ^1H). We estimate that this probe will be able to detect and quantify ^{13}C NMR of natural abundance metabolites as low as 90 mM in about 2 hours. We will be able to lower this by including LC and solid phase extraction approaches. In addition to the NMR approaches, we also have been using an LC-MS method called Isotopic Ratio Outlier Analysis (IROA), which was developed by Dr. Chris Beecher (Stupp et al, 2013). IROA utilizes specific patterns of ^{13}C enrichment and can provide a great deal of information, including the exact number of carbon atoms in each molecule and the relative concentrations of a test vs. reference sample. The difficulty with IROA (and LC-MS in general) is that it is not very easy to identify molecules that are not in libraries or databases. I will demonstrate our approaches to combine ^{13}C NMR with IROA to improve the identification of unknown metabolites. Our primary biological application is the nematode *Caenorhabditis elegans*, and I will also describe strategies to for large-scale metabolomics in this model organism.

References

- Clendinen et al (2014) ^{13}C NMR metabolomics: applications at natural abundance. *Analytical Chemistry* 86(18):9242-9250.
- Clendinen et al (2015a) ^{13}C NMR Metabolomics: INADEQUATE Network Analysis. *Anal Chem* 87(11):5698-5706.
- Clendinen et al (2015b) An Overview of Methods using ^{13}C for Improved Compound Identification in Metabolomics and Natural Products. *Frontiers in Plant Science* 6:611.
- Ramaswamy et al (2013a) Development of a ^{13}C -optimized 1.5-mm high temperature superconducting NMR probe. *Journal of Magnetic Resonance* 235C:58-65.
- Ramaswamy et al (2013b) Microsample Cryogenic Probes: Technology and Applications. *eMagRes* 2:215-228.
- Ramaswamy et al (2016) Development of a ^1H - ^{13}C Dual-Optimized NMR Probe Based on Double-Tuned High Temperature Superconducting Resonators. *IEEE Transactions of Applied Superconductivity* In Press.
- Stupp et al (2013) Isotopic ratio outlier analysis global metabolomics of *Caenorhabditis elegans*. *Analytical Chemistry* 85(24):11858-11865.

Mots-Clés : NMR, mass spectrometry, metabolomics

F1 – P1

NMR-based metabolomics for health: applications to porphyria and to chronic kidney disease

Gildas Bertho

*Chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques (CBPT) – CNRS : UMR8601
Université Paris V - Paris Descartes, 45 Rue des Saints-Pères 75270 PARIS CEDEX 06, France*

The potential of NMR for health problematics is currently under investigation by the scientific community using metabolomics. We will present results obtained during our studies of a metabolic disorder and of a public health problem.

Porphyria

Porphyrias are a group of rare diseases caused by genetic mutation of enzymes involved in the production of heme. They can be classified according to their symptoms and the pathophysiology. Symptomatically, acute porphyrias (AIP) result in nervous system troubles, in severe abdominal pain, vomiting, neuropathy and mental disorders. Cutaneous porphyrias (PC) lead to skin manifestations often after sun exposure due to accumulation of porphyrins near the surface of the skin. PCs are easily diagnosed by physicians on the basis of characteristic symptoms. However, the AIP is rarely mentioned during a diagnosis because of the lack of specific clinical signs. In addition, many drugs may worsen the AIP disease. Therefore, it is very important to conduct an early diagnosis.

We found and quantified discriminant biomarkers of AIP, helping to bring new pathophysiological tracks (Carichon et al, 2014). Even if the model still has to be improved by additional data including normal patients, the use of NMR for the diagnosis in a clinical environment can be plan in light of our results. Interestingly, we identified a possible biomarker of separation of AIP patients in two new groups. In conclusion, we think that it is possible to monitor the response to medical treatment of AIP, and we propose a prognosis of high recurrence of crises for AIP patients.

Chronic kidney disease (CKD)

We hope to provide early diagnosis of CKD, a chronic disease that affects about 3 millions people in France. We formulated hypotheses related to the pathogenesis of CKD and characterized a 1H-NMR-based fingerprint of urine metabolites found differentially altered in 111 consecutive CKD patients (Pallet et al, 2014) referred for a kidney biopsy.

An OPLS-DA model using the normal value of eGFR (60 ml/min) as classifier, provided a clustering of patients. Among the variables that influenced the most the projection, 7 buckets corresponding to biomarkers were identified. When extrem values of eGFR (< 30 and > 90 ml/min) were included in the model, the clustering was even better, and the buckets with the higher contribution to the principal component were also those corresponding to metabolites previously identified. These results confirm on a large and prospective cohort the usefulness of 1H-NMR spectroscopy for the discovery of urinary biomarkers of CKD by identifying discriminating metabolites and provides cues to better understand the pathophysiology of the metabolic disturbances associated with CKD.

References

M. Carichon, N. Pallet, C. Schmitt, T. Lefebvre, L. Gouya, N. Talbi, J.-C. Deybach, P. Beaune, P. Vasos, H. Puy, G. Bertho. The urinary metabolic fingerprint of Acute Intermittent Porphyria analyzed by 1H-NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* 2014.

N. Pallet, E. Thervet, P. Beaune, A. Karras, G. Bertho. The urinary metabolome of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014.

Mots-Clés : NMR, public health

F2 – P2

Comparative lipidomic analyses of Huntington's disease mouse models

**Alexandre Seyer¹, Marion Poiriel¹, Andrea Del Bondio², Céline Ducruix¹, Bruno Corman¹,
Marta Valenza², Elena Cattaneo²**

¹ *Profilomic SA – Boulogne-Billancourt, France*

² *Department of BioSciences, Centre for Stem Cell Research – Università degli Studi di Milano, Milan, Italie*

Huntington's disease (HD) is an adult-onset neurodegenerative disorder characterized by motor and psychiatric disturbances, as well as dementia and is caused by an expansion of the CAG repeat in the HD gene coding for huntingtin (HTT). HD pathology involves various mechanisms that affect nearly all aspects of cellular physiology. Among these mechanisms, abnormalities in cholesterol metabolism have already been reported in HD cellular and animal models and in tissues from HD patients. To highlight others specific perturbations in their lipid composition, lipidomic analyses of cortex and striatum of Q175 HD mouse models as well as wild type mouse model were conducted.

Total lipid extracts were prepared from 10 mg of frozen tissue using a modified Folch extraction before liquid chromatography - high resolution mass spectrometry analysis. Using comparative lipidomics, we were able to measure close to 600 individual lipid species spanning the 5 major families and 20 lipid classes. Among those are glycerophosphatidylcholines involved in membrane constitution as well as complex gangliosides involved in cell-to-cell communications.

Specific changes in lipid levels were observed between wild type and Q175 mice. Among these various classes of lipids, the levels of free cholesterol was significantly decreased only in striatum of both male and female HD models (p value = 0.006). Levels of GM1 and GM2 gangliosides (total gangliosides: p value=0.009) decreased as well as those of phospholipids lysophosphatidylcholine (p value = 0.033) and phosphatidylcholine (p value = 0.031) in striatum of Q175 mouse compared to wild type. In cortex, only the dihexosylceramides were found significantly increased (p value = 0.008) in HD compared to wild type.

This work illustrates how lipidomics could be a powerful tool to explore lipidome disruption driven by specific mutations of neurological diseases models. Well documented perturbations in the cholesterol homeostasis have been confirmed by these experiments and new alterations/modifications in the content of several lipid classes have been highlighted.

Mots-Clés : Huntington's disease, neurodegenerative disorder, lipidomic analysis, high resolution mass spectrometry

O1

A CE/MS pipeline for long term comparable assessment of the urinary metabolome

Panagiotis Moulos¹, Valérie Brunchault¹, Benjamin Breuil¹, Franck Boizard¹, Julie Klein¹, Stéphane Decramer², Jean-Loup Bascands¹, Joost Schanstra¹, Bénédicte Buffin-Meyer³

¹ Inserm 1048 - INSERM – 1 avenue Jean Poulhès BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4, France

² CHU Toulouse, Hôpital des Enfants – CHU Toulouse – Service de Néphrologie–Médecine Interne–Hypertension Pédiatrique, 31059 Toulouse, France

³ Inserm U1048 - INSERM – 1 avenue Jean Poulhès BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4, France

Many diseases are silent killers. While minimum symptoms are detectable in early stages, clinically apparent symptoms only appear at advanced stages, when unfortunately treatment is less efficient. The main challenge is therefore to develop tools for early disease detection before the development of the clinically apparent symptoms. 'Urinary omics'-based strategies are promising tools of high relevance in the clinical setting as they have already led to the design of multimarker protein-based models for the diagnosis of complex diseases. Compared to proteins, metabolites are in the closest biological proximity to the phenotype and can thereby provide functional signatures of pathological states. However, although the field of metabolomics has advanced significantly in the past 10 years, there has been little progress in the discovery of clinically useful urinary metabolite biomarkers. Most metabolomics studies use nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). In contrast, capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE/MS) has been rarely used for metabolome analysis due to issues related to stable coupling of CE to the MS instrument and the limited loading capacity of CE columns.

Here, we report an optimized CE/MS setup and data analysis pipeline that allows comparing the metabolite content in urine samples analyzed over a period of several years. A novel normalization procedure using endogenous stable urinary metabolites was developed based on the combined metabolome of 75 different urine samples from healthy and disease individuals. Using this new normalization procedure, the CE/MS platform displayed high performance in terms of long-term stability as it allowed comparison of the same sample analyzed nearly 130 times over a range of 4 years. Next we evaluated the clinical utility of the CE/MS pipeline for the discovery of urinary metabolite biomarkers for diagnosis of obstructive nephropathy in infants. We compared the urine metabolome of 34 newborns with ureteropelvic junction (UPJ) obstruction and 15 healthy newborns. This led to the identification of 32 differentially excreted metabolite features. When combined in a SVM classifier, these 32 metabolites predicted with 88% sensibility and 86% specificity whether a new sample belonged to the UPJ obstruction or healthy group in a separate validation cohort of 24 individuals.

In conclusion, this proof-of-concept study demonstrates that CE/MS can be used as a tool for the profiling of urinary metabolites aiming to identify clinically relevant metabolites.

Mots-Clés : metabolomics, biomarkers, capillary electrophoresis, mass spectrometry, chronic kidney disease

Molecular networking of MS/MS as a tool to target antiviral diterpenoids from Corsican Euphorbia

Mélissa Esposito^{1,2}, Louis-Félix Nothias-Scaglia^{1,2}, Pieter Leyssen³, Fanny Roussi¹, David Touboul¹, Jean Costa², Julien Paolini², Marc Litaudon¹

¹ Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – CNRS : UPR2301,
Avenue de la terrasse 91198 Gif sur Yvette cedex, France

² Laboratoire de chimie de produits naturels (CPN) – Université de Corse – 7 avenue Jean Nicoli, 20250 Corte, France

³ Rega Institute for Medical Research – KULeuven, Mindebroedersstraat, B3000 Leuven, Belgique

Recently, we showed that EtOAc extracts prepared from various parts of Euphorbia spp. exhibited significant and selective antiviral activity against chikungunya virus replication (CHIKV; Nothias-Scaglia et al, 2015a). Our previous works also demonstrated that various diterpene esters were endowed with antiviral properties, in particular anti-HIV and anti-CHIKV (Nothias-Scaglia et al, 2015b; Olivon et al, 2015; Márquez et al, 2008). Thus, an LC-MS/MS-based method was developed to investigate whether the anti-CHIKV activity found for the different EtOAc extracts could be associated with the presence of known antiviral diterpenoids (Nothias-Scaglia et al, 2015a). A preliminary chemical investigation of *E. pithyusa* ssp. *pithyusa* led to the isolation of dideoxyphorbol-, myrsinol-, and premyrsinol-ester derivatives. These diterpenoids and others were used as reference compounds in a MS/MS molecular network, which was built using diterpene-enriched fractions from whole plant EtOAc extracts of the latter, and a taxonomically close subspecies, *E. pithyusa* ssp. *cupanii*. LC-ESI-MS/MS analyzes were performed on a high-resolution mass spectrometer (Agilent QTOF 6540). GNPS web platform was used to generate MS/MS molecular networks (GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking, <http://gnps.ucsd.edu/>) and, results were visualized with Cytoscape software (Shannon et al, 2003).

In this study, the comparison of the molecular content of the two subspecies, *E. pithyusa* ssp. *pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii*, indicated that key clusters of secondary metabolites, among which various classes of diterpenoids, were detected in each species, and permitted to distinguish them unambiguously. The presence of putative new analogues of tiglane-, premyrsinane- and myrsinane-type diterpenoids, prompted us to carry out a structure-guided purification on the two extracts. Several new compounds were isolated and their antiviral properties against CHIKV replication evaluated.

References

- Nothias-Scaglia LF, Dumontet V, Neyts J, Roussi F, Costa J, Leyssen P, Litaudon M, Paolini J. LC-MS2-Based dereplication of Euphorbia extracts with anti-Chikungunya virus activity. *Fitoterapia* 2015a, 105: 202–209.
- Nothias-Scaglia LF, Pannecouque C, Renucci F, Delang L, Neyts J, Roussi F, Costa J, Leyssen P, Litaudon M, Paolini J. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J Nat Prod* 2015b, 78: 1277–1283.
- Olivon F, Palenzuela H, Girard-Valenciennes E, Neyts J, Pannecouque C, Roussi F, Grondin I, Leyssen P, Litaudon M. Antiviral Activity of Flexibilane and Tiglane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J Nat Prod* 2015, 78: 1119–1128
- Márquez N, A. Calzado M, Sánchez-Duffhues G, Pérez M, Minassi A, Pagani A, Appendino G, Diaz L, Muñoz-Fernández MA, Muñoz E. Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation. *Biochem Pharmacol* 2008, 75: 1370–1380
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang J T., Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003, 13: 2498–504.

Mots-Clés : molecular networking, MS/MS, Euphorbiaceae, Euphorbia pithyusa, diterpenoids, premyrsinane, myrsinane, tiglane, chikungunya.

O3

NMR investigation of targeted therapy effects on the host metabolism for HER-2 positive breast cancer

**Elodie Jobard^{1,2}, Thomas Bachelot², Mario Campone³,
Olivier Trédan², Bénédicte Elena-Herrmann¹**

¹ Institut des Sciences Analytiques, Centre de RMN à Très Hauts Champs, Université de Lyon (ISA-CRMN) – CNRS : UMR5280, ENS - Lyon, Université Claude Bernard - Lyon I (UCBL), 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

² Centre Léon Bérard (CLB) – Université de Lyon – 28, rue Laennec 69373 Lyon Cedex 08, France

³ Institut de Cancérologie de l'Ouest, Centre René Gauducheau – Centre de recherche en cancérologie (CRCL), CRCLL – Boulevard Jacques Monod 44805 Saint-Herblain, France

Many advances in recent years, such as the use of targeted therapies, have enabled to improve the management of cancer patients. Understanding the effect of targeted therapies on the human metabolism is essential to predict the response to treatments and adjust personalized therapy. mTOR is an attractive target for cancer's therapeutic intervention because of its key role in the regulation of protein translation, cell growth and metabolism. We present here a metabolomic investigation exploring the impact of mTOR inhibition on serum metabolic profiles from patients with non-metastatic breast cancer overexpressing HER-2. We detail the metabolic signatures associated with the response to an HER-2 inhibitor standard treatment (trastuzumab), or a combined HER-2 and mTOR (everolimus) inhibitors therapy.

Pre-treatment, on-treatment and post-treatment serum samples were available for 79 patients with HER-2 positive breast cancer from the French multicentre, randomized phase II trial RADHER. Fasting patients were randomized between two treatments: trastuzumab (group A) and a trastuzumab and everolimus combination (experimental group B). For each patient, clinicopathological data were recorded. 340 serum metabolic profiles were obtained using ¹H NMR spectroscopy (800MHz). Statistical multivariate methods were exploited to build models for sample classification and extract group-specific metabolic signatures. ANOVA analysis and multiple testing corrections of the p-values were used to derive statistically significant associations of individual metabolites.

The longitudinal series of serum samples available for each patient was exploited to investigate the effect of the combination B on the patient's metabolism over time and to compare it with the standard reference treatment A. For each arm, serum metabolic profiles are compared before, over and after treatment. Similarly, the fingerprints are compared between treatments. Clear and significant O-PLS discrimination is observed only for the arm B between metabolic profiles at baseline and after one week of treatment (N: 57, R2Y = 0.404, Q2 = 0.199), after four weeks of treatment (N: 54, R2Y = 0.603, Q2 = 0.301), one week after the end of treatment (N: 53, R2Y = 0.734, Q2 = 0.569), three weeks after the end of treatment (N =51, R2Y = 0.767, Q2 = 0.493). The trastuzumab and everolimus combination causes faster changes in patient metabolism than standard treatment and a residual effect is also observed several weeks after ending of the treatment (up to 3 weeks). Analysis of metabolic fingerprints highlights the involvement of several metabolic pathways reflecting a systemic effect, particularly on the liver and visceral fat. Furthermore, comparison of the metabolic profiles between the two arms (either four or seven weeks after the beginning of the treatment) shows that everolimus, an mTOR inhibitor, is responsible for the host metabolism modification observed in the experimental arm.

Mots-Clés : serum, breast cancer, RMN, targeted therapies, mTOR inhibitor

OS1 – Communication industrielle

La mobilité ionique : une dimension analytique supplémentaire pour la métabolomique et la lipidomique

Christophe Siroit

Waters, BP 608, 78056 Saint-Quentin en Yvelines cedex - Tél : 01 30 48 72 00 - Email : france@waters.com

L'identification de métabolites dans des matrices complexes telles que les fluides biologiques se révèle être un vrai défi.

La résolution en masse seule, trouvera rapidement ses limites, quant à l'inverse, une approche combinant résolution chromatographique, résolution en masse et mobilité ionique les repoussera. Nous reviendrons sur la nécessité d'accroître la capacité de pics d'un système d'analyse dans sa globalité, à travers d'une part, le rappel des géométries des plateformes Synapt et Vion, et d'autre part, de quelques exemples. L'augmentation du nombre de molécules identifiées devant aller de paire avec la confiance associée, nous montrerons que les critères d'identification d'un métabolite, à savoir le rapport masse sur charge et le temps de rétention, peuvent être complétés par l'utilisation de la section efficace de collision afin d'augmenter la qualité globale des résultats d'analyse.

OP2 – Conférence invitée

DynaMet, a fully automated pipeline for dynamic LC-MS data

Patrick Kiefer

Institute of Microbiology, ETH Zurich – Vladimir-Prelog-Weg 4, HCI F431 8093 Zürich, Suisse

Dynamic isotope labeling data provide crucial information about the dynamics of metabolites in biological systems because the speed of labeling incorporation into metabolite pools depends on the corresponding pathway activities. Depending on the sample frequency over time, metabolic processes with different turnover rates can be elucidated. In dynamic labeling experiments, samples are taken before the labeling switch and at selected time points after addition of the ¹³C feed. Sampling includes metabolite quenching and extraction and is followed by LC-MS for data generation. However, metabolome-wide analysis of such samples is challenging as it results in highly complex data sets and requires grouping of metabolite features over different samples changing over time. To overcome these challenges we developed DynaMet a comprehensive, fully-automated data analysis workflow to extract metabolite labeling profiles from ¹³C time course labeling experiments starting from LC-MS raw data (Kiefer et al, 2015). The tool extracts features with significant labeling incorporation and provides their labeling profiles as well as their isotopologues distributions over time. Moreover, it matches features with data base(s) for metabolite identification and provides integrated tools for expressive data visualization. To validate DynaMet we first used time course labeling data generated from *Bacillus methanolicus* MGA3 samples, a thermophilic Gram positive bacterium of biotechnological relevance capable to grow on one carbon compound methanol as sole source of carbon and energy. Since all multicarbon compounds are produced from the one carbon source methanol via addition of labeled formaldehyde (generated from methanol) to (initially unlabeled) ribulose-5-phosphate, complex isotopic patterns and thus spectra are generated. Analysis of two biological replicates revealed high robustness and reproducibility of the pipeline. In total, DynaMet extracted almost 400 features showing dynamic labeling within ten minutes. Of these features, 92 % could be fitted by implemented kinetic models. Feature identification against KEGG database resulted in more than 200 matches covering multiple pathways of core metabolism and major biosynthetic routes. Remarkably, automated extraction of labeling profiles from central metabolites resulted in kinetic fits very similar to those obtained by targeted extraction and manual treatment which underlines the high quality of automatically generated profiles. Moreover, we performed time course labeling experiment with *Escherichia coli* on uniformly labeled ¹³C glucose resulting in a comparable number of detected features with labeling profiles of high quality. DynaMet is freely available as an extension package for Python based eMZed2, an open source framework built for rapid development of LC-MS data analysis workflows (Kiefer et al, 2013).

References

Kiefer, P et al. *Anal Chem.* 2015 6;87, 9679-86

Kiefer, P.; Schmitt, U.; Vorholt, J. A. *Bioinformatics* 2013, 29, 963-964

Mots-Clés : fluxomics, software

04

Natural and synthetic methylotrophy: a metabolic challenge

Stéphanie Heux, Marc Carnicer, Gilles Vieira, Jean-Charles Portais

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) – INSA - Toulouse, INRA : UMR792, CNRS : UMR5504, Université Paul Sabatier - Toulouse III – 135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04, France

Comprehensive understanding of cellular metabolism allows efficient control and optimization of the metabolism of industrially-relevant microorganisms (e.g. *E. coli*). The use of systems-level studies makes it possible to better determine not only the impact of pathway engineering within the context of the entire host metabolism, but also to diagnose stresses due to product synthesis or to extreme environmental conditions, thereby providing the rationale for efficient and cost-effective optimization of production systems (knowledge-based metabolic optimization). In close collaboration with groups in Switzerland (ETH Zurich) and Norway (SINTEF Trondheim), we are more specifically investigating natural and synthetic methylotrophy, a process that represents a true metabolic challenge given the formation of a toxic compound, formaldehyde. Our aim is both to improve our fundamental understanding of bacterial methylotrophy and to develop microbial cell factories for sustainable production of value-added products from methanol. A survey of current knowledge regarding natural and synthetic bacterial methylotrophy, and how metabolomics and fluxomics provided critical information on these systems, will be given in this presentation.

Remerciements: MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : bacterial methylotrophy, metabolic networks, synthetic biology, metabolomics, fluxomics

O5

Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments

Thibault Nidelet, Pascale Brial, Carole Camarasa, Sylvie Dequin

UMR 1083 Sciences pour l'oenologie INRA (UMR 1038-SPO) – Bat 28 2 place Viala 34060 Montpellier, France

Background: *S. cerevisiae* has attracted considerable interest in recent years as a model for ecology and evolutionary biology, revealing a substantial genetic and phenotypic diversity. However, there is a lack of knowledge on the diversity of metabolic networks within this species.

Results: To identify the metabolic and evolutionary constraints that shape metabolic fluxes in *S. cerevisiae*, we used a dedicated constraint-based model to predict the central carbon metabolism flux distribution of 43 strains from different ecological origins, grown in wine fermentation conditions. In analyzing these distributions, we observed a highly contrasted situation in flux variability, with quasi-constancy of the glycolysis and ethanol synthesis yield yet high flexibility of other fluxes, such as the pentose phosphate pathway and acetaldehyde production. Furthermore, these fluxes with large variability showed multimodal distributions that could be linked to strain origin, indicating a convergence between genetic origin and flux phenotype.

Conclusions: Flux variability is pathway-dependent and, for some flux, a strain origin effect can be found. These data highlight the constraints shaping the yeast operative central carbon network and provide clues for the design of strategies for strain improvement.

Mots-Clés : diversity, flux balance analysis, metabolic flux, modeling, *S. cerevisiae*

O1 – RFMF Junior

Development of a high throughput (HT) flux analysis workflow

Cécilia Berges^{1,2}, Edern Cahoreau^{1,2}, Lindsay Peyriga^{1,2}, Stephanie Heux¹, Pierre Millard¹, Sergueï Sokol^{1,2}, Floriant Bellvert^{1,2}, Jean-Charles Portais^{1,2}

¹ Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) – INSA,
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04, France

² Metatoul - MetaboHUB – INRA : UMR792, CNRS : UMR5504, INSA, France

High-throughput (HT) omics approaches enable the large scale analysis of metabolism and its regulation. Among those, fluxomics (metabolic flux analysis) aims at measuring the actual rates of biochemical reactions in metabolic networks. It is a powerful and growing approach to get comprehensive understanding of cellular metabolism in many fields of investigation, ranging from basic biology to biotechnology.

Fluxomics is originally a low throughput method, which limits the number of organisms, strains and conditions which can be investigated. To increase fluxomics throughput and robustness while reducing experimental costs and human efforts, a complete workflow for automated and parallelized ¹³C-fluxomics experiments was set-up.

The ¹³C-labeling experiment and sampling of labeled samples are parallelized and automatized using an original robotic platform. This robot prepares, runs, monitors and controls 48 micro-scale fermentations in parallel (pH, oxygen, temperature, stirrer speed), and performs automated sampling of the biological material. A second robot allows automated preparation of labeled samples for NMR and MS analysis, thereby increasing throughput capacities while reducing manipulation errors. A full set of fast and reliable methods for measuring the isotopic content of metabolites were established by NMR and mass spectrometry. Finally, different bioinformatics and mathematical tools were developed for optimizing the experimental design of the ¹³C-labelling experiments, for processing the analytical data, and for performing flux calculations. To validate the quality of the flux data obtained by the HT fluxomics platform, flux maps were obtained for *E. coli* cells grown on glucose and compared to data obtained in the same cultivation conditions using the classical (manual) set-up. The closeness of the flux data between the two types of investigations clearly indicated the reliability of the HT fluxomics platform for measuring flux data, but also the biological relevance of the obtained flux data. This platform allows currently a 20-fold increase in fluxomics throughput while improving significantly the robustness of flux measurements.

References

Millard et al, *Anal. Chem* (2014). Sampling of intracellular metabolites for stationary and non-stationary (¹³C) metabolic flux analysis in *Escherichia coli*.

Heux et al, *Metabolic Eng.* (2014). A novel platform for automated high-throughput fluxome profiling of metabolic variants.

Millard et al, *Biotech. Bioeng* (2014). IsoDesign: a software for optimizing the design of ¹³C-metabolic flux analysis experiments.

Cahoreau et al, *Anal. Biochem* (2012). Isotopic profiling of ¹³C-labeled biological samples by two-dimensional heteronuclear J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Sokol et al, *Bioinformatics* (2012). influx_s: increasing numerical stability and precision for metabolic flux analysis in isotope labelling experiments.

Millard et al, *Bioinformatics* (2011). IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : fluxomic, high throughput, metabolic network

F3 – P3

The GCMS characterization of the central carbon metabolism of *Arthrospira platensis* brings insights to its original exopolysaccharide composition when submitted to various culture conditions

Olivier Goncalves¹, Myriam Phélippé¹, Guillaume Cogne¹, Céline Laroche², Gérald Thouand¹

¹ Laboratoire de génie des procédés - environnement - agroalimentaire (GEPEA) – Université de Nantes, CNRS : UMR6144, École Nationale Supérieure des Mines - Nantes – 4, rue Alfred Kastler B.P. 20722 44307 Nantes, France

² Institut Pascal – CNRS : UMR6602, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 24 avenue des Landais 63171 Aubiere Cedex, France

Micro-algae are photosynthetic micro-organisms that are able to produce at reduced cost high value products. To control this potential, the understanding of the photosynthetic and energetic metabolism of these micro-organisms at cellular and molecular level is often mandatory. Among the latest available approaches, the characterization and the analysis of the metabolic fluxes distribution is known to contribute accurately to a better understanding of the mobilized metabolic pathways and of the micro-organism behavior in response to environmental changes. For that purpose, metabolomics plays a key role since it enables to characterize these fluxes through high-throughput profiling of tremendous number of metabolites.

Among the most cultivated photosynthetic micro-organisms, *Arthrospira platensis* is a cyanobacteria known to produce exopolysaccharides (EPS) and more particularly under light stress. Even though it is worldwide cultivated, only few major articles (Klanchui et al, 2012; Hasunuma et al, 2013) focused on the characterization of its central metabolism since Cogne et al. (2003). Therefore, there is a lack of knowledge to understand the effect of environmental conditions on its energetic regulation metabolism. Knowing these mechanisms would finally enable more efficient production of specific compounds.

In this study, the characterization of the carbon central metabolism of *Arthrospira platensis* cultivated in photobioreactor under growth and EPS production conditions was performed. The approach allowed assessing a better understanding of its behavior facing environmental changes impacting more particularly its EPS composition. Indeed, in the tested cultivation conditions it was possible to increase the amount of EPS, but also to modify its composition. The main observed differences concerned the amount of the uronic acids that was found to be drastically inferior to what was previously described (Cogne et al, 2003). The GCMS profiling of the carbon central metabolism extended to the elementary bricks constitutive of the protein, lipids and polysaccharides suggested more over that an alternative pathways for the uronic acid biosynthesis could be used.

As perspective, this observation will serve as starting point for the development of a metabolic model of *Arthrospira platensis* PCC 8005, built using genomic data from Klanchui et al. (2012). It will be therefore possible to perform Metabolic Flux Analysis to reinforce the hypothesis found using the low resolution metabolomic approach.

References

Klanchui, A., Khannapho, C., Phodee, A., Cheevadhanarak, S., Meechai, A., 2012. iAK692: A genome-scale metabolic model of *Spirulina platensis* C1. *BMC Syst Biol* 6, 1–15. doi:10.1186/1752-0509-6-71

Hasunuma, T., Kikuyama, F., Matsuda, M., Aikawa, S., Izumi, Y., Kondo, A., 2013. Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *Journal of Experimental Botany* 64, 2943–2954. doi:10.1093/xb/ert134

Cogne, G., Gros, J.-B., Dussap, C.-G., 2003. Identification of a metabolic network structure representative of *arthrospira* (*spirulina*) *platensis* metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 84, 667–676. doi:10.1002/bit.10808

Wittmann, C., 2007. Fluxome analysis using GC-MS. *Microbial Cell Factories* 6, 6. doi:10.1186/1475-2859-6-6

Mots-Clés : central metabolite profiling, GC, MS, *Arthrospira platensis*, photobioreactor, exopolysaccharides

OS2 – Communication industrielle

La place de la RMN dans le dépistage sélectif des maladies métaboliques

Claire Cannet

Bruker BioSpin S.A., 34, rue de l'industrie - BP 10002, F-67166 Wissembourg cedex
www.bruker.fr

Le dépistage sélectif des maladies métaboliques héréditaires est principalement réalisé par une analyse multi-plateforme utilisant GC/MS, chromatographies/méthodes enzymatiques et LC/MS. Cependant de plus en plus d'échantillons de patients ayant des symptômes neurologiques non spécifiques sont envoyés aux laboratoires spécialisés où les analyses standards ne suffisent malheureusement pas. Une étude en cours a déjà montré que l'utilisation de la RMN pouvait couvrir l'analyse de différentes classes de substances permettant ainsi de détecter des maladies très souvent sous-diagnostiquées. Un exemple d'identification par RMN d'un déficit en transporteur de la créatine chez deux patients sera présenté.

F4 – P4

***biosigner*: a new method for the discovery of significant molecular signatures from omics data**

Philippe Rinaudo¹, Samia Boudah², Christophe Junot², Etienne Thévenot¹

¹ CEA, LIST, Laboratoire Analyse de Données et Intelligence des Systèmes, MetaboHUB, Digiteo Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, Cedex, France

² Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, DRF/iBiTec-S/SPI, MetaboHUB, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

High-throughput technologies such as transcriptomics, proteomics and metabolomics show great promise for the discovery of biomarkers for diagnosis and prognosis. Selection of the most promising candidates between the initial untargeted step and the subsequent validation phases is critical within the pipeline leading to clinical tests. Several statistical and data mining methods have been described for feature selection: in particular, wrapper approaches iteratively assess the performance of the classifier on distinct subsets of variables. Current wrappers, however, do not estimate the significance of the selected features.

We therefore developed a new methodology to find the smallest feature subset which significantly contributes to the model performance, by using a combination of resampling, ranking of variable importance, significance assessment by permutation of the feature values in the test subsets, and half-interval search. We wrapped our biosigner algorithm around three reference binary classifiers (Partial Least Squares - Discriminant Analysis, Random Forest, and Support Vector Machines) which have been shown to achieve specific performances depending on the structure of the dataset.

By using three real biological and clinical metabolomics and transcriptomics datasets (containing up to 7,000 features), complementary signatures were obtained in a few minutes, generally providing higher prediction accuracies than the initial full model. Comparison with alternative feature selection approaches further indicated that our method provides signatures of restricted size and high stability. Finally, by using our methodology to seek metabolites discriminating type 1 from type 2 diabetic patients, several features were selected, including a fragment from the taurochenodeoxycholic bile acid.

Our methodology, implemented in the biosigner R/Bioconductor package and Galaxy/Workflow4metabolomics module, should be of interest for both experimenters and statisticians to identify robust molecular signatures from large omics datasets in the process of developing new diagnostics.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : feature selection, biostatistics, bioinformatics, R software, workflow4metabolomics, partial least squares, machine learning, random forest, support vector machines, transcriptomics, proteomics, metabolomics

F5-P5

Approches métabolomiques, ciblé ou non-ciblé ?

Olivier Hutinel

SCIEX, 3 Avenue du Canada, Parc Technopolis, Bâtiment Omega, F-91940 Les Ulis
www.sciexnow.com

O2 – RFMF Junior

Inferring missing compounds from metabolic profile using network topology analysis

**Clement Frainay¹, Nicolas Weiss², Benoit Colsch³, Frédéric Sedel⁴, Dominique Thabut⁵,
Christophe Junot³, Fabien Jourdan¹**

¹ *Toxalim, Université de Toulouse – INRA UMR1331 180 Chemin de Tournefeuille,
BP 93173 F31027 Toulouse Cedex 3 France*

² *Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix – 83 boulevard de l'hôpital – 75013 Paris, France*

³ *DRF/iBiTec-S/SPI/LEMM, MetaboHUB-Paris, CEA-Saclay, 91400 Saclay, France*

⁴ *Medday Pharmaceuticals, ICM-Brain and Spine Institute-iPEPS – Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière
47 Boulevard de l'Hôpital 75013, Paris, France*

⁵ *Brain Liver Pitié-Salpêtrière (B-LIPS) study group – Hôpital Pitié-Salpêtrière,
83 boulevard de l'hôpital – 75013 Paris, France*

Monitoring and understanding the metabolic status of an organism under various environmental or genetic conditions is a key challenge in human health or bioengineering. Untargeted metabolomics, combined with multivariate statistics, allow detecting metabolites with significant changes in concentration. The resulting list is a metabolic profile that characterizes the physiological response of the organism to the perturbation being studied. Those profiles allow to compare perturbations and to understand the underlying biological mechanism using pathway enrichment, path search among genome-scale metabolic network or in silico flux analysis. However, no single metabolomics technology enables all metabolites to be monitored and metabolomic experiments driven from biofluid sample overshadow non-excreted compounds. Thus, metabolic profiles remain incomplete.

Taking advantage of the increasing availability of genome-scale metabolic network gathering all the biochemical reaction for a given organism, we propose a new bioinformatics method to infer potential missing compounds from a metabolic profile, based on the identification of nodes of influence in a metabolic network. This kind of analysis is derived from the Google's PageRank computation, allowing ranking nodes given their influence on a specified set of nodes of interest, which was successfully applied on social network and World Wide Web analysis. Several adaptations have been led to take into account the complex nature of relationship between compounds in a metabolic network, in order to ensure biologically meaningful results. The method was applied to metabolic profiles identified in cerebrospinal fluid from patients with hepatic encephalopathy and raised some unidentified compounds that could be linked to the syndrome according to the literature. This method will soon be implemented in the MetExplore web server and will be applicable to any user-defined network and does not require advanced settings, as purely topology-based.

Mots-Clés : metabolic network, centrality analysis, metabolic profile

O3 – RFMF Junior

proFIA: An R package for FIA-HRMS metabolomics data preprocessing

Alexis Delabrière¹, Ulli Hohenester², Christophe Junot², Etienne Thévenot¹

¹ CEA, LIST, Laboratoire Analyse de Données et Intelligence des Systèmes, MetaboHUB, Digiteo Saclay F-91191 Gif-sur-Yvette, Cedex, France

² Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM), DRF/iBiTec-S/SPI, MetaboHUB, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Flow Injection Analysis (FIA) coupled to mass spectrometry is a promising approach for high-throughput untargeted analysis due to the fast acquisition time. Recently, high-resolution mass spectrometers (HRMS) have opened new opportunities to discriminate between isobaric compounds. FIA-HRMS signal, however, is specific and complex (e.g. peak shape, proximity of masses) and no available software tool can handle the preprocessing of such high-resolution data.

We therefore developed a workflow which takes the acquisition files as input and generates the peak table with the signal intensities. The workflow consists in 1) the detection of peaks on each mass trace using the injection peak as a model, 2) the grouping of peaks between samples by using the mass dimension, and 3) the filling of zero intensity values in the final peak table.

The proFIA package, implemented in R, is fast (less than 10 seconds per sample), and requires only one parameter (mass deviation between scans). In addition, several graphics and metrics are provided to flag peaks which are affected by signal suppression or by the solvent, and assess the quality of the results.

A proof of concept was performed with plasma samples spiked with 40 molecules from distinct chemical classes. The resulting peak table contained 1,740 features. A total of 38 of the 40 compounds were correctly detected down to 40 ng/ml spiking concentration, and the coefficient of variation between replicates was less than 20%.

In conclusion, our workflow efficiently processes data from FIA-HRMS. The proFIA software, which will be soon available both in the Bioconductor repository and within the Workflow4Metabolomics.org computational infrastructure, should therefore open new opportunities for high-throughput FIA metabolomics.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : flow injection analysis, preprocessing, workflow, w4m, workflow4metabolomics, R, mass spectrometry, high, resolution, signal processing

Comparaison des empreintes métabolomiques produites par LC/MS et FIA/MS à très haute résolution

Baninia Habchi^{1,2}, Sandra Alves², Bilel Moslah¹, Alain Paris³, Yannick Lécluse⁴, Pascal Gauduchon⁵, Pierre Lebailly⁴, Douglas N. Rutledge¹, Estelle Rathahao-Paris¹

¹ UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 16, rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

² UPMC, Laboratoire CSOB, Institut Parisien Chimie Moléculaire UMR8232, Université Pierre et Marie Curie Paris VI – F-75252 Paris, France

³ Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7245 MNHN-CNRS – F-75005 Paris, France

⁴ UMR 1086 Cancers Préventions, INSERM Université de Caen Normandie, Centre François Baclesse, F-14076 Caen cedex 05 France, France

⁵ UMR 1199 Biology and Innovative Therapeutics for Locally Aggressive Cancer, INSERM Université de Caen Normandie, Centre François Baclesse, F-14076 Caen cedex 05, France

La métabolomique désigne l'étude de tous les métabolites détectables dans un organisme et de leurs rôles dans la croissance, l'homéostasie métabolique et l'étiologie de certaines maladies. Elle est fondée sur la quantification des métabolites présents dans un système biologique et, possiblement, sur leur identification. Cette démarche utilise des méthodes analytiques telles que la spectrométrie de masse combinée à des outils statistiques et chimiométriques de traitement de données pour la détection des métabolites d'intérêt, ceci afin de caractériser un état physiologique ou pathologique donné.

L'objectif de notre travail est de comparer deux approches analytiques de production des données métabolomiques par spectrométrie de masse à très haute résolution sur un instrument LTQ-Orbitrap. La première, couramment utilisée, correspond à l'analyse par chromatographique liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) alors que la seconde consiste à introduire l'échantillon directement en mode injection en flux continu (FIA-MS). Cette dernière approche, comparée à celle utilisant le couplage à la chromatographie, permet de minimiser considérablement le temps d'analyse. Ainsi, il est possible d'analyser plusieurs centaines d'échantillons par jour. Ce type d'approche est plus approprié à l'étude de cohortes. Mais si l'approche directe permet des analyses à haut débit, elle s'accompagne d'une perte en information. En effet, l'étape de séparation par chromatographie donne accès à une dimension supplémentaire (temps de rétention) qui permet une séparation ainsi qu'une identification plus simple des métabolites, grâce à l'élimination (ou la réduction très importante) des effets « matrice ». En revanche, quel que soit le mode de production des données, le traitement chimiométrique des données reste une étape primordiale pour détecter les métabolites caractéristiques des différentes classes d'échantillons.

Dans ce travail, nous nous intéressons à l'analyse des empreintes métabolomiques d'urines d'agriculteurs exposés professionnellement à différents produits phytosanitaires afin d'évaluer les risques chez cette population d'individus. Ceci entre dans le cadre d'une enquête épidémiologique dont le but est d'établir un lien entre l'exposition à des pesticides et l'apparition possible de certaines maladies. Etant donnée la complexité des données (LC/MS et FIA/MS), une étape de prétraitement des données dont la dernière étape correspond à l'application d'une correction orthogonale par OPLS (Trygg and Wold, 2002) afin d'éliminer la variance non contrôlée, a précédé les traitements chimiométriques proprement dits. Ensuite, deux méthodes chimiométriques ont été utilisées, l'une fondée sur l'analyse en composantes indépendantes (ICA) (Trygg and Wold, 2002 ; Rutledge and Bouveresse, 2013 and 2015 ; Hyvärinen, 2000), nommé IC-DA (Independent Components - Discriminant Analysis) et l'autre sur l'analyse multi-tableaux dite ComDim ou CCSWA (Common Components and Specific Weights Analysis ; Quannri et al, 2000) afin d'extraire le maximum d'information pertinente.

Cette étude préliminaire a montré une discrimination des groupes d'individus exposés aux pesticides grâce à l'analyse discriminante par OPLS/ComDim et OPLS/IC-DA. Finalement, les méthodes d'analyses rapides par introduction directe fournissent ici des résultats assez comparables et complémentaires de ceux obtenus après séparation chromatographique, montrant ainsi la validité de ce type d'approche analytique à haut débit.

References

Trygg and Wold, *Journal of Chemometrics*, 2002, 16, 119–128.

Rutledge and Bouveresse, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.50, pp. 22-32, 2013 & Vol.67, pp. 220, 2015.

Hyvärinen, *Neural networks*, Vol.13, pp. 411-430, 2000.

Qannari et al, *Food Qual. Prefer.*, Vol.11 pp.151–154, 2000.

Mots-Clés : LC/MS, FIA/MS, OPLS/IC, DA, OPLS/ComDim, HRMS, metabolomics.

Non stationary metabolic flux analysis in isotope labeling experiments using the adjoint approach

Stéphane Mottelet¹, Gil Gaullier²

¹ EA 4297 Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR) – Université de Technologie de Compiègne, 60200 Compiègne, France

² EA 2222 Laboratoire de Mathématiques Appliquées de Compiègne (LMAC) – Université de Technologie de Compiègne, 6200 Compiègne, France

Comprehension of metabolic pathways is considerably enhanced by metabolic flux analysis (MFA-ILE) in isotope labeling experiments. The balance equations are given by hundreds of algebraic (stationary MFA) or ordinary differential equations (nonstationary MFA), and reducing the number of operations is therefore a crucial part of reducing the computation cost. The main bottleneck for deterministic algorithms is the computation of derivatives, particularly for nonstationary MFA. In this communication we explain how the overall identification process may be speeded up by using the adjoint approach to compute the gradient of the residual sum of squares. The proposed approach shows significant improvements in terms of complexity and computation time when it is compared with the usual (direct) approach. Numerical results are obtained for the central metabolic pathways of *Escherichia coli*. The methods and algorithms described in this paper are included in the Sysmetab software package distributed under an Open Source license at <http://forge.scilab.org/index.php/p/sysmetab/>

Mots-Clés : non stationary MFA, adjoint approach, Scilab, open source

OP3 – Conférence invitée

Getting insight into plant aromatic metabolism via candidate substrate product pairs

Kris Morreel

Department of Plant Systems Biology, VIB, Ghent University – Technologiepark 927 9052 Ghent, Belgique

During the last decade, many new MS-based algorithms have been developed in metabolomics to gain insight in both the molecular structures of the many profiled metabolites and in pathway architecture. Mostly, these new approaches are based on the concept of mass differences which is itself rooted in the knowledge that MS features are related via (combinations of) well-known biochemical conversions. Using such a mass difference approach, called Candidate Substrate Product Pair (CSPP), on LC-MS data allowed defining the function of the most abundant protein present in the lignifying tissues of stems of angiosperm trees such as poplar, i.e. phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER). Together with the metabolite profiling data, this unraveled a previously unknown role of lignin oligomers in oxidative stress. Further support was obtained via a combination of CSPP network propagation and co-feeding studies performed in Arabidopsis protoplast cultures.

Mots-Clés : metabolomics, MS

Plant metabolomics for agriculture in New Zealand: A LC-MS investigation of the biochemical diversity of secondary metabolites among perennial ryegrass populations

Karl Fraser

AgResearch – Tennent Drive, Palmerston North, Nouvelle-Zélande

Perennial ryegrass is a critical part of the New Zealand (NZ) pasture as a key low input/low cost feed component of most NZ farm systems. Given the importance of perennial ryegrass to the NZ pastoral sector, a large and diverse population (based on geographic origin) of wild and cultivated ryegrass plants (724 accessions x 5 clonal replicates) was collected and analysed using targeted and non-targeted, high throughput mass spectrometry metabolomics to discover metabolic traits and diversity. Freeze-dried and ground plant material from a single harvest date was extracted using 4 different extraction procedures and analysed with 8 complementary analytical streams (GC-MS, and UHPLC-high resolution MS) to maximise the extraction and measurement coverage of the ryegrass metabolome. Including quality control samples, this gave rise to around 32,000 MS datafiles and approximately 17 Gb of MS data. Interrogation of this data to search for novel metabolic associations with genetic factors requires post selection of the appropriate sample groupings. From this large population, a subset of 21 cultivars with at least 4 genotypes with 5 clonal replicates was selected for more detailed data analysis of the secondary metabolite profiles. Approximately 200 secondary metabolites were detected and measured, many of which were flavonoids or alkaloids and their glycosides, and these metabolites were subsequently used to investigate population diversity. There was excellent reproducibility of the secondary metabolites within both the clonal replicates and genotypes, and considerable metabolic variation across the populations, indicating opportunities to associate to observed traits or genetic markers when they become available. Data analysis of the full metabolomics dataset will reveal further differences between genotypes and the combination of these diverse metabolic features will potentially allow the breeding and production of new high value forage cultivars.

Mots-Clés : non targeted metabolomics, flavonoid, LC, MS, secondary metabolites

Welcoming green metabolomic: using supercritical fluid chromatography, tandem mass spectrometry, and molecular networking, to target bioactive compounds

Louis-Félix Nothias^{1,2}, Stéphanie Boutet-Mercey¹, Xavier Cachet^{1,3}, Humberto E. De La Torre⁴, Julien Paolini⁵, Jean Costa⁵, Luis Miguel Bedoya⁴, Pieter Leyssen⁶, José Alcami⁴, Alain Brunelle¹, Fanny Roussi¹, Marc Litaudon¹, David Touboul¹

¹ Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris-Saclay – CNRS : UPR2301, 1 Avenue de la terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France

² Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego (UCSD), Gilman drive, CA 92093, La Jolla, États-Unis

³ Laboratoire de Pharmacognosie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, UMR 8638 COMETE CNRS – rue de l'observatoire, 75006 Paris, France

⁴ Unidad de Immunopatología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Pozuelo Km.2, 28220-Majadahonda, Madrid, Espagne

⁵ Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Université de Corse – UMR CNRS 6134 – Corte, 20250, France

⁶ Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven – Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgium

Procedures required to isolate compounds from natural extracts are costly, fastidious, and not environmentally friendly. Indeed, several chromatography steps in normal-phase and/or reversed-phase silica gel are typically required, leading to the consumption of a significant amount of toxic and hazardous organic solvent. Furthermore, a dereplication process must be conducted in order to avoid re-isolation of known molecule. This process is typically performed through LC-MS/MS experiments. Recently, molecular networking emerged as powerful data mining tool to explore results of LC-MS/MS analyses, allowing dereplication of known molecules, but also to capture the presence of analogues by spectral similarity (Yang et al, 2013).

In this context, we aimed at building a green and efficient metabolomic workflow. For this purpose, a targeted-purification workflow, relying on supercritical fluid chromatography (SFC) and MS/MS molecular networks (MS2MN), was developed.

To evaluate the efficiency of this SFC-MS2MN-based workflow, we investigated the diterpenoid content of fractions of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* displaying potent inhibition of chikungunya virus replication (Nothias-Scaglia et al, 2015). Taking into account that phorboids were isolated previously from this plant (Appendino et al, 1998), and that these latter can possess strong anti-CHIKV properties (Nothias-Scaglia et al, 2015) a search for these molecules was undertaken. The best separation conditions were optimized using seven diterpene esters of various sub-classes. Analysis by SFC-MS/MS of bioactive fractions from the plant extract and interpretation by MS2MN (with GNPS web platform; <http://gnps.ucsd.edu/>) indicated that unknown jatrophone esters (JE) and phorboids, were present in the samples. This SFC-MS2MN-targeted purification procedure led to the isolation of two new JE, along with four new 4-deoxyphorbol esters, of which one of them was able to inhibit CHIKV and HIV-1 replication in the nM range.

The effective development of this SFC-MS2MN-based workflow opens new prospects toward a green metabolomic era.

References:

Yang et al. *J. Nat. Prod.* 2013, 76 (9), 1686–1699.

Nothias-Scaglia et al. *Fitoterapia* 2015, 105, 202–209.

Appendino et al. *J Nat Prod* 1998, 61 (6), 749–756.

Nothias-Scaglia et al *J. Nat. Prod.* 2015, 78 (6), 1277–1283.

GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking. Wang et al. *Nature Biotech.* 2016. Accepted manuscript.

Mots-Clés : supercritical fluid chromatography, molecular networking, MS/MS, green metabolomic, Euphorbia, diterpenoids, jatrophone ester, chikungunya, HIV

O4 – RFMF Junior

Xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacteria, *Azospirillum lipoferum* CRT1

Camille Rozier¹, Alexander Erban², Jihane Hamzaoui¹, Claire Prigent-Combaret¹, Gilles Comte¹, Joachim Kopka², Sonia Czarnes¹, Laurent Legendre¹

¹ UMR 5557-CNRS Ecologie microbienne – CNRS : UMR5557 – 6 rue Raphael Dubois 69622 Villeurbanne, France

² Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology – 1 Am Muehlenberg 4476 Golm, Germany, Allemagne

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) colonize the plant rhizosphere from where they enhance the growth and tolerance to biotic and abiotic stresses of roots and also of distant leaves (Faramazi et al, 2012). To harness the potential agronomic benefits of PGPRs, many wild strains have been isolated, some of their genomes have been fully sequenced and the functions of a multitude of their genes on their hosts' physiology have been described. Despite these efforts, the mechanisms of action of PGPRs on their host remain poorly understood. In this study, we probed the ability of a commercial PGPR strain, *Azospirillum lipoferum* CRT1, to affect root-to-shoot communication in maize by conducting a metabolomic analysis of xylem (ascending) sap. Two cultivars of maize, FuturiXX and Seiddi, were selected because previous studies have shown that only the second one displays growth enhancement after seed inoculation by *A. lipoferum* CRT1 (Walker et al, 2011).

Maize seeds were pre-germinated with the PGPR strain in petri dishes. Plants were grown indoors in natural soil fertilized according to commercial practices and maintained at field capacity. At 12 days post-sowing, the photosynthetic quantum efficiency (Fv/Fm) of the most recent and mature leaf was measured with a fluorimeter and found to be enhanced for Seiddi and not for FuturiXX, in parallel to root growth elicitation responses. Xylem sap was collected with a Scholander pressure chamber (adapted from Goodger et al, 2005), derivatized with a trimethyl silylation agent (BSTFA) and analysed by GC-MS(TOF). Xylem metabolite fingerprints differed between maize cultivars and were modified for both cultivars upon bacterial inoculation. Nevertheless, the photosynthesis (growth)-enhancing interaction generated the largest xylem sap metabolite profile change. In conclusion, the analysis of plant xylem sap metabolites is a novel plant metabolomics tool, hereby coined as xylenome, that proved to be informative to explore the mechanisms of plant-microbe interactions.

References

- A. Faramazi et al., *Journal of Food, Agriculture & Environment* (2012), 10 (1): 299-301
- V. Walker et al., *New phytologist* (2011), 189: 494-506
- J. Goodger et al., *Journal of experimental botany* (2005), 56 (419): 2389-2400

Mots-Clés : xylem sap, maize, PGPR, root, to, shoot communication, GC, MS(TOF)

F6-P6

En GCMS Haute-résolution, Analyse Quantitative, Screening et identification structurale enfin réunis !!!

Yann Simon

Thermo Fisher Scientific, 16 avenue du Québec - Silic 765, Villebon-sur-Yvette, F-91963 Courtaboeuf cedex
www.thermoscientific.com

F7 – P7

Etude des interactions chimiques dans le cas de la maladie du dépérissement de la lavande et du lavandin : à la recherche de moyen lutte biologique

Juliane Daussy¹, Sandrine Moja², Florence Nicole²

¹ Centre d'écologie fonctionnelle et évolutive (CEFE) – CNRS : UMR5175, Université Montpellier II - Sciences et techniques, Université Montpellier I, Université Paul Valéry - Montpellier III, École Pratique des Hautes Études [EPHE], Campus CNRS - 1919 route de Mende - 34293 Montpellier cedex 5, France

² Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales (LBVPAM), Université Jean Monnet - Saint-Etienne : EA3061 – 23, rue Paul Michelon 42023 Saint Etienne cedex 2, France

La lavande fine (*Lavandula angustifolia* Miller) et le lavandin (*Lavandula x intermedia*) sont des plantes à parfum, aromatiques et médicinales qui constituent des cultures historiques et emblématiques de la Provence pour la production d'huile essentielle. Pourtant, depuis une vingtaine d'années, la lavande subit un déclin sévère qui se mesure par une baisse des surfaces cultivées et une diminution de la production en huile essentielle. Cette régression est due aux effets de la maladie du dépérissement et des événements de sécheresse climatique répétés et intenses.

Le dépérissement de la lavande est principalement dû au phytoplasme du Stolbur (*Candidatus phytoplasma solanii*), une bactérie dépourvue de paroi cellulaire qui peut effectuer son cycle de vie chez l'insecte vecteur ou au sein de la plante dans les vaisseaux du phloème. A ce jour, le seul vecteur connu est un insecte qui se nourrit de sève, *Hyalesthes obsoletus*. En obstruant les canaux du phloème, le phytoplasme empêche la montée de sève et provoque le jaunissement et le dessèchement de la plante. Ces symptômes mènent à la mort prématurée des plantes entre 1 et 3 ans après l'infection.

Les moyens de lutte sont à ce jour assez réduits. La lutte directe contre le phytoplasme n'est pas concevable car les antibiotiques sont interdits d'utilisation sur les cultures en France. La lutte chimique visant à contenir les populations d'insectes est inenvisageable car l'usage d'insecticides tuerait également les abeilles, acteurs majeurs de la pollinisation des lavandes.

Une alternative biologique efficace pour diminuer les populations de cicadelles vectrices pourrait être la mise en place de piège olfactif. Dès lors, pour identifier les molécules impliquées dans l'attraction de *H. obsoletus*, nous nous sommes intéressés aux interactions chimiques entre cette bactérie, sa cicadelle vectrice, la lavande et le lavandin.

Des approches expérimentales en conditions contrôlées et en champ ont été menées pour comparer les composés volatils de plantes saines et de plantes infectées. Le statut infecté ou sain des plantes a été validé par qPCR. Les composés organiques volatils ont été extraits par headspace dynamique et par lavage au solvant puis analysés en GC-MS. Des analyses discriminantes multivariées performantes sous R ont permis de mettre en évidence des différences de profils chimiques et de cibler des composés d'intérêt.

Que ce soit sur la lavande ou le lavandin, sur les émissions ou les composés stockés dans la plante, en champ ou en laboratoire, certains composés apparaissent significativement surexprimés chez les plantes infectées, en particulier le β -caryophyllène et le β -farnésène. A l'inverse, des composés comme le camphre et le 1,8-cinéole sont retrouvés préférentiellement chez les plantes saines. Des tests de GC-EAD montrent que ces molécules sont perçues par *H. obsoletus*. Cette année, des tests comportementaux permettront de vérifier l'attractivité de ses composés sur la cicadelle et les premiers tests de pièges olfactifs seront menés. En parallèle, une approche métabolomique est initiée pour identifier des composés non volatils impliqués dans la perception gustative.

Mots-Clés : lavande, lavandin, dépérissement, phytoplasme, piège olfactif, composés volatils, GCMS, headspace

F8 – P8

Leaf ageing in oilseed rape, a qualitative and quantitative metabolomic view

**Sylvain Dechaumet¹, Françoise Le Caherec¹, Laurent Leport¹, Solenne Berardocco¹,
Sophie Rolland¹, Nathalie Marnet¹, Catherine Jonard¹, Yann Guitton², Alain Bouchereau¹**

¹ Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP) – INRA : UMR1349, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1 – Agrocampus Ouest, UMR1349 IGEPP, F-35042 Rennes, France

² Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (ONIRIS) – Ministère de l'alimentation de l'agriculture et de la pêche – Route de Gachet - Site de la Chantrerie - 44307 Nantes, France

Rapeseed (*Brassica napus* L.) has become the main oilseed crop in Europe mainly grown for edible oil and biofuel. Residual seed meal is used for livestock feeding. Despite high capacity for mineral nitrogen (N) absorption from soil, organic nitrogen remobilization (NRE) within the plant is considered inefficient, resulting in low nitrogen use efficiency (NUE). Therefore, oilseed rape production is suffering significant energetic and environmental penalties. To meet current challenge of agro-ecology and sustainable agriculture through limitation of N fertilization inputs, these metabolic remobilization processes taking place during sequential leaf senescence to transfer nutrients from ageing to growing tissues, should be optimized. However, cellular and metabolic processes associated with leaf senescence are poorly understood. Our goals are both to help elucidating those metabolic processes associated with leaf ageing, and to discover metabolite biomarkers to assist selection towards more efficient oilseed rape genotypes in terms of NRE.

First, to assess the sequential evolution of leaf senescence along the main stem axis, leaf development was followed during the vegetative stages of plant growth under optimized conditions by non-destructive physiological measures (image analysis: RGB ; leaf area evolution, chlorophyll content, PSII efficiency: f_v / f_m ; water content). Meanwhile, the intensity of photosynthetically active radiations (PAR), which is one of the main exogenous factors influencing the onset of senescence, was measured on each leaf. Secondly, the qualitative and quantitative profiles of targeted primary metabolites (carbohydrates, organic acids, and amino acids) and hormones were acquired. Simultaneously, non-targeted metabolomic investigations by high resolution mass spectrometry (HRMS) were realized from polar and non-polar extracts. HRMS results were treated under R (IPO and XCMS) and identified ions were then grouped accordingly to their profiles.

The first elements of information assess of major changes to the primary metabolism during leaf development, with qualitative and quantitative adjustments most likely related to the conversion of leaf status from sink to source for nutrient partitioning. Hormone profiles were also particularly affected by leaf ageing. Thus, if the position of the leaf along the main stem axis, related to its age, should be highly determinant to qualify its metabolic profile, the light microenvironment together with hormonal and trophic relationships between adjacent leaves should have a significant impact that must be assessed. Indeed, supplementary experiments proved a very strong influence of shading on parameters used to evaluate senescence progression.

Comparative analysis of these results unravel potential leaf ageing-specific metabolite biomarkers. However, molecular identification of these biomarkers remains a priority in order to understand the metabolic pathways affected. Nevertheless, to be used in varietal selection of oilseed rape, their contribution to NRE must be clarified, using environmental and genetic diversity.

Mots-Clés : *Brassica napus*, senescence, NUE, HRMS

Etude métabolomique par RMN du proton de l'effet du stress osmotique chez le lin

**Hyacinthe Le Gall¹, Jean-Xavier Fontaine¹, Roland Molinié¹, Jérôme Pelloux¹,
François Mesnard¹, Anca Lucau-Danila², Simon Hawkins²,
Françoise Gillet¹, Ophélie Fliniaux¹**

¹ Laboratoire de Biologie des Plantes et Innovation (BIOPI) – Université de Picardie Jules Verne : EA3900,
80000 Amiens, France

² Laboratoire Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés (SADV) – INRA : UMR1281
Université de Lille 1, Cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Depuis de nombreuses années, le lin (*Linum usitatissimum* L.) est cultivé pour sa fibre riche en cellulose ou son huile, naturellement riche en acides gras ω -3, avec des applications dans le domaine du textile, des biomatériaux pour la fibre et dans les domaines de la nutrition, de la cosmétique, de la pharmacie, des matériaux de construction pour l'huile (Shim et al., 2014). Comme pour les autres grandes cultures, les conditions climatiques influencent le rendement et la qualité du produit récolté (Mahajan and Tuteja, 2005; Zlatev and Cebola Lidon, 2012). Parmi les facteurs environnementaux, le manque d'eau peut avoir des répercussions importantes sur la culture du lin. Dans un contexte de changements climatiques, il est ainsi important de comprendre les mécanismes mis en jeu chez le lin lors d'un stress hydrique (Quero et al, 2014). L'approche métabolomique par RMN du proton est largement utilisée pour les études de stress biotiques et abiotiques chez les plantes (Kim et al, 2011). Ici, cette approche sera envisagée pour étudier les changements de contenu métabolique des différents organes de lin (feuilles, tiges, racines) soumis ou non à un stress osmotique (mimant un stress hydrique) pendant 1, 4 et 10 jours. L'analyse en composante principale (ACP) des données spectrales montre une discrimination entre les groupes témoins et les groupes stressés à J4 et à J10 pour chaque organe. Le groupe stressé à J1 est plus proche des groupes témoins. Chez les plantes stressées, des variations en contenu métabolique communes aux trois organes ont été observées, avec notamment des augmentations concernant de nombreux acides aminés (dont les principaux sont la proline, la leucine, l'isoleucine et la glycine), l'acide malique et le fructose, et avec une diminution du contenu en cyanogènes, choline et aspartate. Ces variations témoignent d'une stratégie adaptative commune aux trois organes de la plante de lin. Par ailleurs, ces résultats ont pour but d'être associés aux analyses transcriptomiques et protéomiques générées dans le cadre du projet NoStressWall (ANR BIOADAPT) afin d'avoir une vision intégrative des mécanismes mis en place par la plante lors d'une période de sécheresse.

References

- Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2011. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology* 29, 267–275. doi:10.1016/j.tibtech.2011.02.001
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018
- Quero, A., Molinié, R., Elboutachfati, R., Petit, E., Pau-Roblot, C., Guillot, X., Mesnard, F., Courtois, J., 2014. Osmotic stress alters the balance between organic and inorganic solutes in flax (*Linum usitatissimum*). *Journal of Plant Physiology* 171, 55–64. doi:10.1016/j.jplph.2013.07.006
- Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., Reaney, M.J., 2014. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2014.03.011
- Zlatev, Z., Cebola Lidon, F., 2012. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24.

Mots-Clés : *Linum usitatissimum*, stress hydrique, RMN

Flux balance modelling in developing tomato fruit: the respiration climacteric as an emergent property

**Sophie Colombie¹, Bertrand Beauvoit¹, Christine Nazaret², Camille Bénard¹,
Cécile Cabasson¹, Mickaël Maucourt¹, Stéphane Bernillon¹, Annick Moing¹,
Martine Dieuaide-Noubhani¹, Jean-Pierre Mazat³, Yves Gibon¹**

¹ *Biologie du fruit et pathologie (BFP) – Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, Université Victor Segalen, Bordeaux II, INRA : UMR1332 – Centre INRA Bordeaux-Aquitaine
71 avenue Bourlaux BP81 F-33883 Villenave d'Ornon, France*

² *IMB (Institut de Mathématiques de Bordeaux) – IMB – Institut de Mathématiques de Bordeaux, ENSTBB, Institut Polytechnique de Bordeaux, 351 Cours de la Liberation, 33400 Talence., France*

³ *Institut de biochimie et génétique cellulaires (IBGC) – CNRS : UMR5095, Université Victor Segalen - Bordeaux II, 1 rue Camille Saint-Saens 33077 Bordeaux cedex, France*

Mathematical modelling of metabolism is particularly promising as it offers systems biology approaches enabling the characterisation of the behaviour of complex metabolic systems. Modelling fluxes through the metabolic pathways, which supply cofactors and constituents for biomass synthesis, provides an active depiction of metabolic phenotypes. Constraint-based modelling like flux balance analysis (FBA) allows the prediction of metabolic steady-state fluxes by applying mass balance constraints to a stoichiometric model. Glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, and miETC are central features of carbon metabolism and bioenergetics in aerobic organisms in which the respiration is connected with the sugar supply. One major interest with constraint-based modelling is the possibility to study the energy metabolism under conditions where both redox and energy cofactors are balanced. Although respiration is essential for growth and maintenance of plant tissues, this process is poorly investigated and integrated in plant or ecosystem models. In plant biology, tomato fruit is a model organism to study the development of fleshy fruit including ripening initiation. Unfortunately few studies deal with the brief phase of accelerated ripening associated with the respiration climacteric because of practical problems involved in measuring fruit respiration. We developed a constraint-based model describing the cytochromic respiration and its bypasses (alternative oxidase and uncoupling proteins) and we transformed a metabolic dataset into constraints in order to solve the model on a daily basis throughout the tomato fruit development. The model revealed a peak of CO₂ release and the simultaneous dissipation of excess energy at the onset of ripening (about 40 days post anthesis) supporting the concept of respiration climacteric. We pointed out the unbalanced carbon allocation with the sharp slowdown of accumulation (for syntheses and storage) and the beginning of degradation from starch and cell wall polysaccharides. With fruits harvested on plants cultivated under environmental stress conditions (water limitation and shading) modifying the fruit carbon content, we confirmed the concept. Metabolic modelling appears as a way to fill the gap in our knowledge of fruit respiration because it gets round the difficulty of measuring gas exchange of fruit attached to the plant.

Mots-Clés : carbon allocation, central metabolism, constraint, based model, environmental stress, flux balance analysis (FBA), metabolic flux modelling, respiration climacteric, Tomato fruit development

OS3 – Communication industrielle

**Increased throughput, sensitivity, and confidence for metabolomics research
using ultra-high-field Orbitrap mass spectrometers**

Marie-Pierre Pavageau

Thermo Fisher Scientific, 16 avenue du Québec - Silic 765, Villebon-sur-Yvette, F-91963 Courtaboeuf cedex
www.thermoscientific.com

OP4 – Conférence invitée

Metabolomics for characterising the chemical exposome and its effects

Elizabeth Hill

School of Life Sciences, University of Sussex – Sussex House, Falmer Brighton, BN1 9RH, Royaume-Uni

Wildlife and humans are routinely exposed to complex mixtures of chemical contaminants, yet we know very little about their nature or consequent health effects. For example, in many countries fish inhabiting lowland rivers are often exposed to chemical mixtures arising from the discharges of wastewater effluents. In order to investigate the effect of exposure to trace levels of biologically active contaminants in wastewaters, my group has developed sensitive nanoflow-nanospray mass spectrometry techniques, normally used for proteomic analyses, for profiling the (xeno)metabolome of fish plasma and tissue extracts. These techniques have improved analytical sensitivity by up to 200 fold and allowed for detection of pharmaceuticals accumulating in fish tissues alongside changes in target signalling compounds such as neurotransmitter and prostaglandin pathways. Using these techniques, we have shown for the first time that exposure to final wastewater treated effluents results in widespread reduction of prostanoid production in the fish tissues which also accumulate non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), indicating possible effects on ion transport, immune function and reproduction. In addition, a wide range of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and other antipsychotic pharmaceuticals accumulated in the brain with the potential to alter fish behavioural ecology. The use of a holistic chemical profiling approach has proved an efficient tool to identify which contaminants and affected pathways to target for further quantitative analyses. The use of a combined xenobiotic/metabolomics profiling approach may also improve our understanding of the human chemical exposome and links between exposure to endocrine disrupting chemicals, reproductive dysfunction and other diseases.

Mots-Clés : metabolomics, exposome

F9-P9

Introduction aux solutions pour simplifier l'analyse de vos échantillons cliniques

Virginie Lemaire

Sigma-Aldrich groupe Merck, 80 rue de Luzais, F-38297 Saint Quentin Fallavier cedex

www.sigma-aldrich.com

Introduction rapide à nos différentes solutions pour simplifier vos échantillons :

- la plateforme Hybrid SPE pour supprimer efficacement les phospholipides et les protéines de vos échantillons et ainsi améliorer l'ionisation en LC/MS.

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/hybridspe

- les SupelMIP polymères à empreinte moléculaire pour isoler directement vos molécules cibles de vos matrices complexes.

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/supelmip

- Les fibres BioSPME pour une microextraction sélective directe des petites molécules d'échantillons complexes tels que le plasma, ou les tissus.

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/biospme

- La technologie Seppro une solution pour éliminer les protéines abondantes de vos échantillons

Informations complètes : www.sigma-aldrich.com/seppro

Nous avons aussi de nombreuses solutions pour la séparation de vos composés avec nos différentes colonnes HPLC, et des outils pour simplifier vos recherches de métabolites, donc n'hésitez pas à nous rendre visite sur notre stand pour les découvrir.

O5 – RFMF Junior

Exposition de moules au diclofénac : recherche des métabolites par analyse non ciblée chez *Mytilus galloprovincialis*

**Bénilde Bonnefille¹, Frédérique Courant¹, Lauren Arpin-Pont¹,
Evelyse Grousset², Hélène Fenet¹, Elena Gomez¹**

¹ Hydrosiences Montpellier (HSM) – UMR 5569, Université de Montpellier (UM) – HydroSciences Montpellier, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, 34 093 Montpellier Cedex 5, France

² Université de Montpellier (UM) – UMR 9190 MARBEC, Université de Montpellier (UM) – Université de Montpellier - Faculté des Sciences, Place Eugène Bataillon, 34 095 Montpellier Cedex 5, France

Les produits pharmaceutiques sont des contaminants émergents pouvant présenter des risques pour les organismes du milieu aquatique. En effet, ces composés synthétisés pour avoir une activité biologique chez l'Homme, passent la barrière des stations d'épuration et sont rejetés dans les milieux aquatiques. Les milieux marins sont également touchés en raison du développement d'émissaires en mer (rejets direct en mer des stations d'épuration) et des apports des bassins versants via les fleuves et rivières côtiers. Les moules, des organismes couramment rencontrés dans des zones côtières, sont concernées par une exposition aux produits pharmaceutiques. La Directive Cadre sur l'Eau (2013/39/EC) a récemment inclus dans sa liste de vigilance des produits pharmaceutiques, dont le diclofénac (DCF). Des effets du diclofénac tels que la modulation des prostaglandines (Courant et al, submitted) ou encore une fragilisation et une diminution de la quantité de byssus (Ericson et al, 2010) ont été renseignés pour des expositions à concentrations environnementale. A notre connaissance, aucune information n'est disponible concernant la métabolisation de ce produit pharmaceutique chez les bivalves. L'objectif de notre étude est donc de déterminer, lors d'une exposition en conditions contrôlées, les métabolites du DCF produits par la moule *Mytilus galloprovincialis* et de quantifier ceux pour lesquels des standards analytiques sont disponibles. Pour cela, une approche non-ciblée a été développée afin de mettre en évidence l'ensemble des métabolites du DCF produits par la moule. Puis, une méthode analytique ciblée a été développée pour quantifier les métabolites mis en évidence.

Deux groupes de 18 moules ont été constitués : un groupe contrôle et un groupe exposé durant 7 jours à 650 µg/L de DCF. Les analyses effectuées par la méthode non-ciblée ont été réalisées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution (LC/HRMS), en ionisation négative et positive. Un traitement par XCMS a été effectué, puis seuls les signaux avec un foldchange supérieur à 2 et d'une intensité proche du bruit de fond dans les contrôles ont été conservés. Une méthode ciblée utilisant la LC/HRMS a été développée pour quantifier le DCF, le 4'-hydroxy diclofenac (4'-OH-DCF) et le 5-hydroxy diclofénac (5OH-DCF) dans les tissus de moules et dans l'eau de mer d'exposition.

Différents métabolites du DCF ont été annotés : deux de ses quatre métabolites hydroxylés connus (le 4'-OH-DCF et le 5OH-DCF), le conjugué sulfate d'un de ses métabolites hydroxylés, un métabolite hydroxylé lactame déhydrate et le conjugué taurine du DCF. Un travail d'élucidation structurale est en cours sur d'autres signaux probablement reliés au DCF. Par ailleurs, les deux métabolites hydroxylés du DCF ont pu être identifiés formellement grâce à l'injection de standards analytiques dans les mêmes conditions d'analyse.

La quantification du DCF, du 4'-OH-DCF et du 5-OH-DCF a permis de mettre en évidence que le DCF est métabolisé et excrété par la moule en moins de 24h et que le 4'-OH-DCF est majoritaire par rapport au 5OH-DCF. Ces résultats sont un premier pas dans la caractérisation de l'exposition aux produits pharmaceutiques chez *M. galloprovincialis*.

Mots-Clés : diclofénac, métabolites, analyse non ciblée, LC, HRMS, *Mytilus galloprovincialis*

O12

Effets métaboliques des développements cyanobactériens sur l'ichtyofaune: approche éco-métabonomique

Benoît Sotton

*Muséum national d'histoire naturelle (MNHN) – Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie,
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, 57, rue Cuvier - 75231 Paris Cedex 05, France*

Suite à l'eutrophisation des milieux aquatiques et au réchauffement globale, les proliférations cyanobactériennes sont devenues une préoccupation majeure au cours de ces dernières années. Les cyanobactéries sont capables de produire en période estivale de très fortes biomasses, nommées efflorescences, qui sont à l'origine d'impacts néfastes sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Ces effets comprennent une perturbation des chaînes trophiques, une diminution de l'oxygénation des eaux de surface et également la production d'une grande diversité de métabolites secondaires toxiques, appelés cyanotoxines, susceptible d'impacter la santé des organismes aquatiques. D'une manière générale, si les effets toxicologiques (sensu stricto) des hépatotoxines, comme les microcystines (heptapeptides hépatotoxiques), ont fait l'objet de nombreuses études mécanistiques et sont aujourd'hui assez bien documentés, les études fondamentales en "écotoxicologie" permettant d'évaluer les effets concrets des proliférations de cyanobactéries et de la diversité de leurs métabolites sur les populations naturelles restent rares et difficiles à produire.

Récemment, le développement des analyses métabolomiques à haut-débit par résonance magnétique nucléaire (RMN) et/ou par spectrométrie de masse (MS), a permis de fournir un outil puissant pour l'évaluation et la caractérisation des réponses métaboliques entre organismes exposés à différents traitements et l'identification des voies métaboliques impliquées dans les réponses toxicologiques des organismes à divers composés toxiques testés. Ainsi, dans le but d'évaluer les changements métaboliques induits par la présence des cyanobactéries sur l'ichtyofaune, 3 espèces piscicoles représentatives des lacs péri-urbains d'Ile-de-France, la perche (*Perca fluviatilis*), le gardon (*Rutilus rutilus*), le carassin (*Carassius carassius*) et une espèce modèle, le medaka (*Oryzias latipes*), ont été exposées à des efflorescences de cyanobactéries via des expérimentations en mésocosmes et des encagements en milieu naturel. Parallèlement, des prélèvements in situ de perches et de perches soleil (*Lepomis gibbosus*) ont été réalisés en 2014 et 2015 sur 11 lacs d'Ile-de-France impactés ou non par les efflorescences de cyanobactéries. Pour l'ensemble de ces organismes, les foies ont été échantillonnés puis analysés par RMN 1H.

Les premiers résultats de nos études mettent clairement en évidence des métabotypes particuliers pour les organismes exposés aux cyanobactéries et ceci pour l'ensemble des espèces étudiées et nous permettent également de discriminer les signatures métaboliques spécifiques des poissons des lacs impactés de façon récurrentes par les cyanobactéries.

Mots-Clés : poisson, RMN, métabolites, signatures, cyanobactéries, cyanotoxines, in situ, expérimentale

A lipidomic approach led to standardized biomarkers highlighting ecotoxicological effects of soil pollutants on plants.

Marina Le Guedard¹, Jean-Jacques Bessoule²

¹ *LEB Aquitaine Transfert - ADERA – UMR 5200 CNRS - Université Bordeaux
Bâtiment A3 - INRA Bordeaux Aquitaine, 71 Avenue Edouard Bourlaux CS 20032 33140 Villenave d'Ornon, France*

² *Laboratoire de biogenèse membranaire (LBM) – UMR 5200 CNRS - Université Bordeaux
Bâtiment A3 - INRA Bordeaux Aquitaine, 71 Avenue Edouard Bourlaux CS 20032 33140 Villenave d'Ornon, France*

Soil is essential for human societies and ecosystems. Because soil is a non-renewable resource and is under increasing critical pressure (agricultural, urban and industrial), it is imperative to ensure its protection. To characterize soil pollution, the commonly used tools are mainly based on physicochemical analyses. However, such tools do not give information about the bioavailability of contaminants, their transfer or their toxic effects on living organisms, and about the effects of contaminant mixtures (synergy or antagonism). Bioindicators are particularly relevant tools to address these points. Therefore, to complement and to better orientate the physicochemical diagnosis of contaminated soils, the use of effective bioindicators is required to assess in an appropriate manner the exposure and effects of chemical pollutants on ecosystems.

The leaf fatty acid composition is proving to be a powerful biomarker to diagnose soil pollution. This biomarker is based on the fact that when plants are exposed to pollutants on soils, the reactive oxygen species (ROS) can increase dramatically and lead to cellular damages, including lipid peroxidation. The main target of lipid peroxidation is lipids containing polyunsaturated fatty acids, and more particularly linolenic acid (C18:3) mainly associated with plastid lipids.

In this context, we carried out numerous studies on the leaf fatty acid composition of lettuce grown under control conditions (ex situ approach) on contaminated and control soils and we showed that the %C18:3/(%C18:0 + %C18:1 + %C18:2) fatty acid ratio, called "Omega-3 index", decreased in leaves under stress. These ex situ studies highlighted the Omega-3 Index of lettuce leaves as an earlier bio-indicator than the standard tests addressing plants, namely emergence and growth inhibition. Moreover, we demonstrated that the Omega-3 index is a rapid (50-100 analyses/day), sensitive (metal and organic contaminants), robust, reproducible and repeatable biomarker of soil pollution which is then able to generate reliable data. These ex situ development of this biomarker led in 2012 to the publication by the French Agency for Standardization (AFNOR) of a soil quality standard (XP 31-233).

We then measured this biomarker on various plant species grown on several areas of contaminated sites during the French ADEME program "Bioindicators of Soil Quality". The results acquired during this program showed that the leaf fatty acid composition of plant species harvested on real sites also provided an excellent biomarker of organic and metal contamination of soils. From these in situ studies, it was also developed and published a "mathematical" method with which it is possible in complex situations to analyze results provided by the use of the Omega-3 Index in situ and to rank different areas of the same site according to their phytotoxicity.

Today, a standardization of the Omega-3 Index as a tool to assess ecotoxicological effects of soil pollutants through the International Organization for Standardization (ISO) goes underway with a desired applicability both ex and in situ.

Mots-Clés : ecotoxicological effects, toxicity tests, environmental quality, lipidomic approach, plant fatty acids, biomarker, soil pollution

OS4 – Communication industrielle

**Travers MS, nouvel outil logiciel pour le traitement multivarié de données MRM
pour la métabolomique**

Etienne Maout

Le Lizard II - Bat. A Bd Salvador Allende Noisiel 77448 Marne la Vallée Cedex 2
www.shimadzu.fr

Does the LC-HRMS non-targeted metabolomics platform influence the markers? An interplatform comparison for wine origin discrimination

**Hector Gallart-Ayala^{1,2}, Ramon Diaz³, Juan V. Sancho³, Oscar Nuñez^{1,4}, Tatiana Zamora³,
Claudia P.b. Martins⁵, Felix Hernandez³, Santiago Hernandez-Cassou¹,
Javier Saurina¹, Antonio Checa^{1,2}**

¹ Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona – Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Espagne

² Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Division of Physiological Chemistry II, Karolinska Institutet, Scheeles väg 2, SE - 17177, Stockholm, Suède

³ Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I – Av. Sos Baynat S/N, 12071 Castellón, Espagne

⁴ Serra Hünter Fellow, Generalitat de Catalunya – Barcelona, Espagne

⁵ Thermo Fisher Scientific – 355 River Oaks Parkway, 95134, San Jose, États-Unis

Non-targeted liquid chromatography – high resolution mass spectrometry approaches are the preferred ones for metabolomics studies. In order to be more informative than targeted approaches, the annotation of the obtained features either by using databases or by matching with pure standards is required. Some studies have pointed out consistent results when different mass spectrometers are used in non-targeted metabolomics approaches (Glaser et al, 2013; Gika et al, 2010). However, differences between metabolomic platforms from distinct laboratories include several additional variance factors, such as sample treatment, column, mobile phases and data processing. The influence of the analytical platform on the metabolic profiling level of urine samples has been recently evaluated (Martin et al, 2015). High convergence between the spectral information produced by the different platforms was obtained, but an approach to evaluate how this translates into fully identified or annotated features was not addressed.

This work focuses on the comparison of non-targeted LC-HRMS platforms from two independent laboratories when evaluating the differences between red wines from three Spanish Protected Denomination of Origin (PDO) (Penedes, Ribera del Duero and Rioja). Platforms differed in chromatographic separation and mass spectrometers (Orbitrap and Q-TOF), data processing and marker selection protocols.

Results revealed that both platforms were capable to classify samples based on the different PDO at the feature level. At the annotated metabolite level none of the identified metabolites was coincident between platforms. However, when such metabolites were screened in the original raw data most of them were identified and showed similar trends. Here we discuss some potential sources of divergence that may appear using these approaches including: risk of excluding features by a fixed %CV value on the QCs, presence of interfering coeluting compounds causing ion suppression and affecting identification and effects of ion-source geometry on fragmentation. Finally the advantages of using different platforms to both complement and validate the results thus increasing the confidence in the obtained results will be shown.

References

G. Glaser et al., *J. Chromatogr. A*, 1292 (2013) 151-159.

H.G. Gika et al., *Anal. Chem.* 82 (2010) 8226-8234.

J.-C. Martin et al., *Metabolomics* 11 (2015) 807-821.

Mots-Clés : interplatform comparison, non, targeted metabolomics

Investigation of metal-catalyzed regioselective H/D exchange as an efficient and flexible tool to produce stable isotope labelled compounds for quantitative metabolomics

**Anne-laure Damont¹, Sophie Feuillastre², Grégory Pieters²,
Christophe Junot¹, François Fenaille¹**

¹ Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, MetaboHUB-Paris
CEA Saclay – DRF/IBITEC-S/SPI, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

² Laboratoire de Marquage par le Tritium – CEA Saclay – DRF/IBITEC-S/SCBM, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

In the recent years, the extensive use of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) detection for metabolomics applications has demonstrated the power of this bioanalytical tool in the analyses of complex mixtures originating from human or animal bio-fluids, plant extracts or even environmental samples.

Quantitative LC/MS analyses of relevant metabolites in complex matrices are crucial in metabolomics to better understand biological processes. In targeted metabolomics, stable isotopically labelled internal standards are considered essential for the determination of absolute metabolites amounts. However, the commercial availability of such stable isotope labelled standards is limited and their costs are often prohibitive.

Thus, there is an urgent need for the development of synthetic methods allowing rapid, efficient and reliable preparation of stable isotope labelled standards dedicated to large-scale metabolomics. To avoid the laborious approach of total re-synthesis of labelled compounds, we focused on direct labelling strategies and more especially on H/D exchange processes. These processes involve metal-catalysed reactions. Many of them require harsh reaction conditions that lead to lack of selectivity. Nevertheless, the use of an appropriate metal-catalyst combined with adequate temperature and pressure conditions can lead to regioselective H/D exchanges. In this context, ruthenium-catalysed H/D exchanges are particularly appealing since they are known to be well-suited for the alpha-deuteration of amines and alcohols.

Since a large number of metabolites feature at least one hydroxy- or one amino- group in their structure, the use of ruthenium-based catalysts was first envisaged. The objective of this study was to achieve selective H/D exchange and high deuterium incorporation on a number of model metabolites. The labelling of amino acids mixtures was investigated and showed very high selectivity for H/D exchange at carbon atoms bearing an amine or alcohol function (> 95 %), with an average 85-90 % deuterium incorporation efficiency. The resulting deuterated compounds were used as internal standards for the quantitative monitoring of amino acids in biological samples by LC/MS. The extension of such a process to the labelling of a broad set of metabolites directly from complex biological matrices will also be discussed.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : metabolomics, quantification, H/D exchange

Pushing the limits of metabolomics by NMR: more sensitive, highly resolved and quantitative tools for tracking metabolites in plants

**Jonathan Farjon¹, Soumaya Khelifi², Caroline Mauve³, Françoise Gilard³,
Grégory Mouille⁴, Mickael Hodges³**

¹ Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) – CNRS : UMR8182, Université Paris XI - Paris Sud, Université Paris Saclay – bat. 410 Rue du doyen Georges Poitou 91405 Orsay cedex, France

² Université Paris Sud / Paris Saclay – 15 rue Georges Clémenceau 91405 Orsay cedex, France

³ Institut of Plant Sciences Paris Saclay – CNRS : UMR9213 – IPS2 - Bâtiment 630 - Rue Noetzlin Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France

⁴ Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech – INRA : UR0000 – Bâtiment 2 INRA Centre de Versailles-Grignon Route de St-Cyr (RD10) 78026 Versailles Cedex France

The development of a more sustainable agriculture and the utilization of plants for biomass energy need biochemical engineering to optimize plant metabolism. This is currently hindered by a poor understanding of key metabolic steps that control complex plant metabolic networks and by the lack of an integrative and dynamic view of plant metabolism.

Thus, tracking metabolites within a vegetal system is of main interest. NMR is one of the most used technique to access structures, dynamics and quantification of complexes mixtures. ¹H NMR is the most sensitive way to quantify low concentrated metabolites however, for complex mixture, the reduced spectral width could hamper the analysis. Despite its lower sensitivity ¹³C NMR provides a larger scale for enhancing the spectral dispersion in order to investigate complex mixtures from vegetal extracts. Moreover, 2D NMR and especially ¹H-¹³C HSQC allowed the enhancement of the spectral resolution and to obtain quantitative informations such as the concentration on each metabolite extracted from biological systems. The standard addition method (Kumar and Roy, 2012) is the most used way to quantify metabolites but require i) to use commercially available compounds ii) that the addition of metabolite do not induce behaviour changes of the studied system (Martineau et al, 2015).

To overcome such limitations, Quantitative NMR techniques (Heikkinen et al, 2003; Hu et al, 2011) allowed for obtaining in only one 2D map the concentration for each component of a given mixture by using an internal reference with a known concentration. In the context of metabolomics on plants, there is a need of quantitative, most sensitive and better resolved spectra. With this aim, new ¹H-X tools have been developed such as the QUantitative Perfected and pUre-shifted ¹H-X HSQC or QUIPU HSQC (Mauve et al, 2016). This technique combines the Q-HSQC (Hu et al, 2011), the perfect HSQC (Castanar et al, 2014) with pure shift spectroscopy (Paudel et al, 1997; Zangger and Sterk, 1997). The ¹H-¹³C QUIPU HSQC was successfully used on Krebs cycle oxidation products model mixture to reach concentrations with 5 -10 % precision. This method was also able to detect metabolites up to 100 μ M for acids embedded in extracts of Arabidopsis Thaliana leaves. For finishing such techniques allowed the detection of sugar phosphates as key biomarkers of the sugar synthesis in photosynthesis and photo-respiration processes.

References

- S. Kumar, R. Roy, *Trend Anal. Chem.*, 2012, 35,5-26.
- E. Martineau, K. El Khantache, M. Pupier, P. Sepulcri, S. Akoka, P. Giraudeau, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 108, 78-85
- S. Heikkinen, M. M. Toikka, P. T. Karhunen, and I. A. Kilpeläinen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 4362.
- K. Hu, W.M. Westler, J. M. Markley, *J Am Chem Soc.*, 2011, 133, 1662.
- C. Mauve, S. Khelifi, F. Gilard, G. Mouille, J. Farjon, *submitted* 2016
- L. Castañar, E. Sistaré, A. Virgili, R. T. Williamson, and T. Parella, *Magn. Reson. Chem.*, 2014, 53, 115.
- L. Paudel, R. Adams, P. Király, J. Aguilar, M. Foroozandeh, M. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, J. Waltho, and G. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 11616–11619
- K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.*, 1997, 124, 486

Mots-Clés : plants, NMR, metabolites, quantification, resolution, sensitivity

Hyperpolarized NMR Metabolomics

**Aurélien Bornet¹, Jean-Nicolas Dumez², Jonas Milani¹, Basile Vuichoud¹,
Julie Lalande-Martin³, Illa Tea^{3,4}, Maxime Yon^{3,5}, Mickaël Maucourt⁶, Catherine Deborde⁷,
Annick Moing⁷, Lucio Frydman⁵, Geoffrey Bodenhausen^{1,8}, Sami Jannin¹, Patrick Giraudeau³**

¹ Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) – 1015 Lausanne, Suisse

² Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – CNRS : UPR2301,
Avenue de la terrasse 91198 Gif sur Yvette cedex, France

³ Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM) – CNRS : UMR6230, Université de Nantes –
UFR des Sciences et des Techniques - 2 rue de la Houssinière BP 92208 - 44322 Nantes Cedex 3, France

⁴ Australian National University (ANU) – The Australian National University Canberra ACT 0200 Australia, Australie

⁵ Weizmann Institute of Science (WIS) – 234 Herzl Street, Rehovot 76100, Israël

⁶ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – Université de Bordeaux – Centre INRA de Bordeaux-
Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

⁷ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – INRA : UMR1332 – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine,
IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

⁸ UMR 7203 Département de Chimie – Ecole Normale Supérieure de Paris – 24 rue Lhomond, Paris 75005, France

NMR is a major analytical technique in the field of metabolomics, offering unambiguous information about the identity of metabolites and their concentrations. However, it suffers from a relatively low sensitivity due to the intrinsically low nuclear polarization in classical NMR analysis conditions. This is particularly true for NMR of heteronuclei such as ¹³C. We have recently demonstrated how dissolution dynamic nuclear polarization (d-DNP) assisted by cross polarization (CP; Bornet et al, 2012) provides a reliable way of enhancing the sensitivity of NMR detection by factors exceeding 50,000 in complex mixtures of dilute metabolites (Dumez et al, 2015). We report here a detailed analytical approach for recording natural abundance hyperpolarized 1D ¹³C as well as heteronuclear 2D correlation NMR spectra in a single scan in biological extracts such as breast cancer cells or plant extracts. The approach developed is robust, general, and repeatable (typically below 5%). The gain in information, time and sensitivity is considerable, leading to ¹³C signal-to-noise ratios exceeding 150 at natural abundance in a single scan of ethanolic extracts prepared from only 20 mg of lyophilized ground plant tissue. Moreover, preliminary tests on ¹³C enriched samples demonstrate that single-scan heteronuclear 2D spectra provide interesting isotopic information for fluxomics. Our preliminary study might offer promising perspectives for metabolomics, since it would significantly reinforce the complementarity between NMR and MS. Finally we will discuss how hyperpolarized NMR could be further developed to fulfill the requirements of large-scale and high-throughput metabolomics/fluxomics studies.

References

Bornet, et al., Boosting Dissolution Dynamic Nuclear Polarization by Cross Polarization, *J. Phys. Chem. Let.*, 2012.

Dumez, et al., Hyperpolarized NMR of plant and cancer cell extracts at natural abundance, *Analyst*, 2015.

Mots-Clés : ¹³C NMR, Hyperpolarization, d, DNP, sensitivity enhancement

F10 – P10

Analyse des phospholipides oxydés par LC (ESI) - MSMS: une approche lipidomique

Spiro Khoury, Corinne Pouyet, Franck Giacomoni, Estelle Pujos-Guillot

*Unité de Nutrition Humaine UMR 1019 INRA / Université Clermont 1 Plate-forme d'Exploration du métabolisme PFEM,
Centre de Clermont - Ferrand -Theix 63122 Saint Genès Champanelle, France*

Les phospholipides (PLs) sont des molécules biologiques complexes, de structures très variées et représentent une classe de métabolites d'intérêt pour l'étude des relations entre l'alimentation et le développement des maladies métaboliques. Cette classe de composés peut donner lieu à la formation d'un grand nombre de produits d'oxydation. Ainsi, les phospholipides oxydés (PLs-Ox) sont de plus en plus reconnus non seulement comme des marqueurs de stress oxydant, mais aussi des marqueurs de différentes pathologies associées à l'inflammation, telles que l'athérosclérose et le diabète. Cependant, très peu d'informations sont actuellement disponibles dans les bases de données pour identifier ces molécules, du fait de leur disponibilité commerciale limitée.

L'objectif de ce travail était d'acquérir des nouvelles connaissances sur les PLs-Ox afin de proposer une stratégie analytique pour leur analyse. Notre approche lipidomique s'est basée sur une méthode de profilage par LC-MS/MS d'un extrait de lipides totaux plasmatiques, associée à un workflow d'aide à l'identification des PLs implémenté dans la plateforme web Galaxy W4M (<http://workflow4metabolomics.org>).

Au cours de ce travail, une méthode de synthèse des PLs-Ox a tout d'abord été mise en place à partir des Phosphatidylcholines (PCs) ayant des longueurs de chaînes différentes, des degrés et une position des insaturations différentes.

Une méthode d'analyse par spectrométrie de masse (Qtrap 5500 Sciex) équipé avec une source d'ionisation electrospray a ensuite été développée pour caractériser des produits d'oxydation. Un couplage avec la chromatographie liquide par Injection en Flux Continu (FIA) a permis la mise au point de la méthode LC-MS pour pouvoir, par la suite, réaliser la séparation chromatographique des formes oxydés. La cinétique de formation des produits d'auto-oxydations a été étudiée.

Les premiers résultats obtenus montrent une grande diversité des produits d'oxydation à chaînes longues et/ou à chaînes courtes raccourcies. Il a été observé que la formation des produits d'oxydation était dépendante de la structure des PLs, le rapport de formes oxydées variant au cours du temps.

Ces résultats permettent d'envisager la mise en place d'une stratégie d'analyse lipidomique de ces composés, et l'enrichissement des bases de données existantes.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : phospholipides oxydés, lipidomique, spectrométrie de masse, chromatographie liquide

OS5 – Communication industrielle

Heat-quenching of mouse liver tissue for metabolic profiling

Andrei Bunescu

Bioaster, Lyon

Sponsored by Chenomx, 10230 Jasper Ave #4350, Edmonton, AB T5J 4P6, Canada

www.chenomx.com

One of the crucial steps in the metabolomics studies workflow is the sampling part. Taking snapshots of a given metabolic state of biopsy may become very difficult due to fast turning autophagy enzymatic reaction. Thus, the common method to prevent autophagy processes is quenching by snap freezing with liquid nitrogen or dry ice. However, the implementation of such a quenching approach is difficult in some laboratories or particularly in clinical environment. Additionally, during sample preparation, some enzymatic processes could be reactivated, leading to artefacts with no biological relevance.

An alternative method consists in permanent quenching of the enzymatic activity, based on fast conductive heating stabilization (HS). To evaluate this approach, we used the Stabilizer™ system to preserve mice liver tissues. Thus, the study was performed on mouse livers from 30 healthy mice, randomized in 5 groups of 6 animals designed to compare snap freezing at -80°C to 3 groups of heat stabilization conditions (freezing just after the heat stabilization, after 1 hour and after 3 hours) and to a negative control samples maintained at room temperature during 10 minutes before freezing. The polar metabolic profile analysis of the methanol and PBS extracts was done by NMR. The metabolites were identified and quantified using Chenomx software. The results based on the methanol extracts show similar qualitative and quantitative results regardless of the quenching method. Then, the efficiency of the heat-quenching was proved by no notable enzymatic reactivation in the PBS heat-quenched tissue extracts.

F11 – P11

Développement de méthodes « omiques » pour analyser la composition du lait maternel et son évolution lors des premiers jours de lactation

**Mikaïl Berdi^{1,2,3}, François Fenaille^{1,2}, Florence Castelli^{1,2},
Christophe Junot^{1,2}, Karine Adel-Patient^{1,3}**

¹ Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI) – CEA-Saclay, France

² Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM) – CEA-Saclay, France

³ Unité d'Immuno-Allergie Alimentaire (UIAA - UR 496) – INRA : UR0496 – CEA-Saclay, France

Durant les premiers jours de vie, des facteurs dérivés de l'alimentation ainsi que la colonisation du tube digestif vont permettre la maturation correcte de la barrière intestinale et du système immunitaire qui lui est associé. Ces événements sont essentiels pour prévenir le développement de pathologies liées à un désordre de la réponse immunitaire (allergies alimentaires, diabète...). Différents composants du lait maternel précoce pourraient donc influencer le développement ultérieur de ces pathologies chez l'enfant.

Mes travaux de thèse visent dans un premier temps à développer et valider des méthodes d'analyses non ciblées des facteurs nutritionnels (lipides, oligosaccharides, métabolites) présents dans le lait maternel précoce (< J6).

Le développement des analyses non ciblées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, a été réalisé à partir d'un mélange de colostrums commercial. En amont, différentes préparations d'échantillon ont été testées : une précipitation des protéines par du méthanol (MeOH) ainsi qu'une extraction à l'aide d'un mélange méthanol / méthyl tert-butyl éther (MTBE) ont été évaluées pour l'analyse des métabolites. L'extraction avec le mélange MeOH/MTBE a également été testée en comparaison à la méthode classique de Bligh and Dyer (méthanol/chloroforme/eau) pour l'analyse des lipides.

Les acquisitions de données « omiques » ont été ensuite réalisées sur différents appareils : LTQ OrbitrapTM, Impact HDTM Q-TOF et Q ExactiveTM Plus. Les rendements d'extraction ont été évalués à partir d'échantillons surchargés avec un mélange de 600 molécules.

L'analyse préliminaire des données a permis l'annotation de plus de 200 métabolites et d'environ 150 lipides à partir des bases de données du laboratoire. La méthode d'analyse des oligosaccharides du lait maternel a déjà été développée au sein du laboratoire et permet la détection d'environ 90 structures oligosaccharidiques différentes.

L'application de ces différentes méthodologies à des laits provenant d'une cohorte française mère-enfant composée de plus de 300 échantillons est actuellement en cours. Nous allons ainsi étudier les profils métaboliques et nutritionnels individuels et évaluer leurs cinétiques post-partum.

Mots-Clés : métabolomique, glycomique, lipidomique, colostrum, spectrométrie de masse haute résolution, chromatographie liquide

F12 – P12

Crosstalk between astrocytes and motor neurons: a metabolomics study

**Blandine Madji Hounoum¹, Hélène Blasco¹, Patrick Vourc'h¹, Emmanuelle Coque²,
Lydie Nadal-Desbarats¹, Patrick Emond¹, Philippe Corcia¹,
Christian Andres¹, Cédric Raoul², Sylvie Mavel¹**

¹ *Université François-Rabelais, INSERM U930 « Imagerie et Cerveau », CHRU de Tours – Inserm : UMR930,
10 Bv Tonnell  , 37044 Tours, France*

² *The Neuroscience Institute Montpellier, INSERM UMR1051, Saint Eloi Hospital, Montpellier, France*

No consensus exists about the more suitable cell model to assess the pathophysiology of neurodegenerative diseases. The metabolism alteration in the brain and the associated crosstalk between astrocytes and motor neurons are largely contributor of cell death but a comprehensive understanding of this crosstalk remain elusive. The main aim of this study was to assess the effects of co-culture system on the metabolism of astrocytes and motor neurons, using a metabolomics approach. We investigated for the first time, the metabolism of astrocytes and motor neurons by LC-HRMS-based metabolomics approach completed by a 1H-NMR study of extracellular medium. We used primary astrocytes and motor neurons in mono- and co-culture systems. Metabolic pattern showed a clear discrimination between motor neurons and astrocytes in mono- versus co-cultured system. Pathway analysis of discriminating metabolites revealed interactive partners, involving metabolic dysregulation in both cell types. Astrocytes induced dysfunction of arginine and proline metabolism, alanine; aspartate and glutamate metabolism, glutathione metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, tryptophan metabolism, and purine metabolism pathways in motor neurons-astrocytes co-culture. Motor neuron interactions in co-cultures induced dysfunction of lysine degradation, arginine and proline metabolism, tyrosine metabolism, purine metabolism, and pyrimidine metabolism pathways in astrocytes. Our study indicated that co-culture induced high metabolic changes. Thus we suggest that crosstalk between astrocytes and motor neurons is crucial to evaluate the mechanisms of motor neuron death. These findings show that it would make more sense to use co-culture system instead of monotypic cultures for in vitro pathophysiology studies in the context of neurodegenerative and neurologic disease.

Mots-Clés : coculture, crosstalk, neurodegenerative, LCHRMS, 1HRMN

Urinary metabolomic profiling by 1H-NMR and HRMS-Biomarker identification of the organic diet

**Adéline Delcambre¹, Cécile Canlet¹, Marie Tremblay-Franco¹, Julia Baudry²,
Nathalie Druesne-Pecollo², Emilien Jamin¹, Jean-François Martin¹,
Pilar Galan², Emmanuelle Kesse-Guyot², Jean-Pierre Cravedi¹, Laurent Debrauwer¹**

¹ ToxAlim (ToxAlim) – INRA : UMR1331 – 180 chemin de tournefeuille 31300 Toulouse, France

² Le Centre de Recherche Inserm Epidémiologie et Statistique Paris Sorbonne Cité (CRESS) – INSERM : U1153, Université Paris 13, U.F.R de Santé, Médecine et Biologie Humaine 74 rue Marcel Cachin 93017 Bobigny cedex, France

For several years now, the consumers' demand towards organic products is in constant increase and the annual increase of the production superior to 10 %. Although one of the major motives for organic food consumption is an expected health benefit, very few data are available concerning the impacts of this consumption on the individual plan (nutritional and toxicological status, health and risk of chronic diseases). In this context, the BioNutriNet research program was designed based on the NutriNet-Santé study, a large-scale web-based observational epidemiologic study launched in 2009. BioNutriNet represents the largest study ever conducted in the world on organic food consumption, aiming at better understanding the individual characteristics of organic food consumers as well as the links between organic food consumption and health. One of the objectives of the BioNutriNet study concerns the characterization of the nutritional status (vitamins and minerals), of the toxicological status (residues of pesticides) and of the urinary metabolome according to the level of consumption of organic food, with the aim of identifying biomarkers related to organic food consumption.

Two propensity-matched groups of 150 consumers from the BioNutriNet cohort were identified with similar sociodemographic, food consumption and health profiles but differing on the “organic” valence of their diet (< 10% for low consumers versus > 50% for heavy consumers).

The urinary metabolic fingerprints of these 300 individuals were generated by using the complementarity of high-resolution mass spectrometry (Orbitrap, Thermo Finnigan) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (600 MHz, Bruker). Mass spectrometric data were acquired in both positive and negative electrospray ionization modes.

The multivariate statistical analysis (PCA, PLS-DA) carried out on the NMR data did not highlight an effect related to sex, age (divided into quartile) or sampling date (autumn-winter and spring-summer). A valid and robust PLS-DA model was fitted on OSC filtered data, 137 NMR buckets were selected: VIP (threshold =1) and Kruskal-Wallis test p-value (threshold < 0.05). These 137 discriminant metabolites are currently under investigation using 2D-NMR. Their identification as well as preliminary interpretation of their nature and potential modulation will be presented.

After XCMS pre-processing of mass spectrometric data generated by both ionization modes, statistical analyses will also be performed in order to get complementary information. Besides the targeted analysis of 20 pesticide metabolites (mainly organophosphorous and pyrethroids), the obtained dataset will also be used for untargeted screening of pesticide metabolites in order to highlight potential exposure to other molecules in both groups.

Mots-Clés : urine, 1H, NMR, HRMS, metabolomics, exposomics, biomarkers

Metabolic flexibility in human acute myeloid leukemia with IDH mutation

**Lucille Stuani¹, Sonia Zaghdoudi¹, Marie Sabatier¹, Tony Palama², Estelle Saland¹,
Hélène Boutzen¹, Maud Heuillet², Fabien Riols³, Clément Larrue¹, François Vergez¹,
Lara Gales², Edern Cahoreau², Floriant Bellvert², Justine Bertrand Michel³,
Christian Récher¹, Jean Charles Portais², Jean-Emmanuel Sarry¹**

¹ Team ResistAML, Drug resistance oncometabolism in acute myeloid leukemia, CRCT – INSERM : UMR1037, CNRS : UMR5294, Université Paul Sabatier-Toulouse III - UPS – 2 avenue Hubert Curien 31037 Toulouse cedex 1, France

² MetaToul - Metabolomics and Fluxomics Core Facility – INRA : UMR792, CNRS : UMR5504, INSA – Toulouse, Université Paul Sabatier-Toulouse III - UPS – LISBP, INSA 135 avenue de Ranguel, 31400 Toulouse, France

³ MetaToul - Lipidomics Core Facility – INSERM : UMR1048 – I2MC, 1 avenue Jean Poulhès BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4, France

Metabolic reprogramming is now considered as one of the major characteristics of cancer cells. Actually, cancer cells have to adapt their metabolism in order to fuel their energetic and biosynthetic needs and ensure their proliferation.

In acute myeloid leukemia (AML), we and others have showed that intermediate and energetic metabolism plays a key role in AML biology and therapeutic response and that targeting mitochondrial oxidative phosphorylation, glycolysis, glutaminolysis or fatty acid β -oxidation are promising anti-leukemic approaches. Furthermore, recurrent mutations in two key metabolic genes (eg. isocitrate dehydrogenase 1/2) have been discovered in about 15% of AML patients and could impact a negative prognostic. Since IDH1 mutations are present in pre-leukemic hematopoietic stem cells and systematically conserved at relapse, this therapeutic strategy holds promise to specifically achieve a long-term remission for this AML patient subgroup. Wild type IDH1 catalyze the conversion of isocitrate to α -ketoglutarate (α -KG) generating NADPH, in the cytosol. Mutant IDH1 generates an oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) from α -KG using NADPH. However, the contribution of IDH1 and its variants to AML metabolism and chemoresistance has been overlooked thus far.

We hypothesized that IDH1 mutant AML cells harbor an important metabolic and energetic flexibility, which confers them a specific redox balance and regulate their capacity to resist therapies. In order to improve the understanding in IDH1 mutant AML cell metabolism, we are performing a biological system based approach combining complementary methods such as transcriptomics, metabolomics, lipidomics, enzyme assays, nutrients deprivations, metabolic pathways inhibitions and more recently C13-isotope nutrient-based fluxomics.

Among biological processes upregulated by IDH1 mutation (immune response, signaling and metabolic pathways, cell differentiation), functional annotation of IDH1 target metabolic genes revealed an enrichment of genes in glycolysis, trans-sulfuration, neutral lipid (triglyceride, glycerolipid, acylglycerol) metabolic processes and urea cycle. IDH1 mutant cells show also different sensitivities to nutrients deprivations (eg. glucose) and to metabolic inhibitors (eg. metformin and orlistat) when compared to wild-type cells. Finally, our fluxomics results suggest that IDH1 mutation drives changes in metabolic flux and compartments affecting pentose phosphate pathway, Krebs cycle and α -KG metabolism. The analysis of the lipid metabolism, redox status and mitochondrial bioenergetics of IDH1 mutant cells is under progress. These results will be confirmed by genetic and pharmacological invalidation in AML model cell lines and primary samples harboring IDH1 mutation in vitro and in vivo. This could represent significant progress towards uncovering new AML therapeutic targets for this specific group of patients.

Mots-Clés : AML, cancer metabolism, IDH1 mutation, metabolic flexibility, fluxomics, transcriptomics

O6 – RFMF Junior

Evolution of urine metabolomic profiles in newborns

**Aurélien Scalabre¹, Elodie Jobard¹, Ségolène Gaillard²,
Bénédicte Elena-Herrmann¹, Pierre-Yves Mure³**

¹ *Institut des Sciences Analytiques (ISA) – CNRS : UMR5280, PRES Université de Lyon, ENS - Lyon, Université Claude Bernard - Lyon I (UCBL) – 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France*

² *CIC CHU Lyon INSERM : CIC1407, Université Claude Bernard - Lyon I (UCBL), CHU Lyon, Villeurbanne, France*

³ *Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant (HCL) – Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel, 69500, Bron, France*

Metabolomics provides untargeted identification of all detectable low molecular-weight molecules by profiling without a priori the metabolic signatures of biological samples in connection to pathophysiological events. The goal of metabolomic studies is to identify relevant biomarkers or composite metabolic patterns associated with particular disease status. Urine is particularly suited for metabolomic analysis in newborns and children, due to its simple and non-invasive method of collection. Its biochemical composition is correlated to a number of factors such as genotype, gender, disease, nutritional state and age. The number of metabolomic studies in pediatrics is rising, but little is known concerning age-related changes in urine metabolic profiles and newborn metabolic maturation over time. The aim of this study was to investigate changes in urine metabolic profiles during the first four months of life using ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Urine samples were collected from 91 newborns under 4 months old without nephrologic or urologic disease. The mean age was 68 days ± 24. The ¹H-NMR spectra were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and the effect of age on the urinary metabolite profile was observed even from this unsupervised analysis. Further analysis using Orthogonal Partial Least Squares (OPLS) methodology was performed and a model with good predictive power was calculated, allowing the identification of an age-related metabolic profile. We observed the most significant evolution between 2 and 3 months of life. Our results allow a deeper understanding of newborn metabolic maturation. They contribute to identifying potential confounding factors in the application of metabolomics in newborns.

Mots-Clés : urine, metabolomic, NMR, newborns

O20

Analyse métabolomique et lipidomique dans le cancer gastrique : le projet MAGICC (MetAbolism in Gastric Cancer by Corsaire)

Laurent Corcos

Inserm U1078-ECLA – Faculté de médecine, 22 avenue Camille Desmoulins, 29200, Brest, France

Pour le réseau CORSAIRE de BIOGENOUEST Les statines, des médicaments hypocholestérolémiants utilisés pour prévenir l'évolution des maladies cardiovasculaires, sont des inhibiteurs compétitifs de l'hydroxy méthyl glutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA Red), ce qui conduit au blocage de la production de mévalonate, dans une étape « rate-limiting » de la voie de synthèse du cholestérol. En outre, les statines induisent l'apoptose de nombreux types de cellules cancéreuses. Nous avons caractérisé l'activité de la voie de biosynthèse du cholestérol après traitement par la lovastatine, en mesurant plusieurs activités enzymatiques et la production de deux des métabolites intermédiaires, le farnesyl pyrophosphate (FPP) et le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Le FPP et le GGPP sont essentiels pour fonctionnaliser les petites GTPases (Rho, Ras, Cdc- 42, etc.) qui activent la voie des MAP kinases. En l'absence de FPP et de GGPP, la cellule ne répond plus aux facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) et meurt par apoptose. Nous avons montré que l'association de lovastatine et de docétaxel, un agent anticancéreux inhibiteur de la re-polymérisation des microtubules, produit un effet synergique sur l'induction de l'apoptose de cellules cancéreuses gastriques humaines (HGT-1). Partant de ces observations, nous avons réalisé des analyses lipidomiques et métabolomiques (endo+exo) non ciblées, en utilisant les moyens analytiques disponibles au sein de plusieurs des équipes du réseau Corsaire de Biogenouest ((RMN -1H (Bruker), UPLC-LTQ-Orbitrap (Thermo), UPLC-ESI-MSE (Synapt G2 HDMS), GC/MS (Agilent)), des cellules traitées par la lovastatine et/ou par le docétaxel. Les analyses en composante principale montrent que le traitement par le docetaxel est pratiquement sans effet sur les profils de composés tandis que la lovastatine, seule ou en association avec le docetaxel, produit des profils très nettement séparés par ces analyses. De façon frappante, ces observations générales sont « superposables » avec les données transcriptomiques que nous avons produites antérieurement, dans lesquelles la lovastatine, seule ou associée au docétaxel induisait un grand nombre de changements d'expression de gènes, le docetaxel étant très peu actif (Follet et al., *Br J Cancer*. 2012 Feb 14;106(4):685-92). La nature des métabolites variant dans ce système expérimental et les liens potentiels avec les gènes montrant une expression altérée seront présentés.

Mots-Clés : métabolomique, lipidomique, statines, taxanes, cancer gastrique

Communications par affiche

P01

Preliminary metabolomic approach on structure of the bacterial community of the marine diatom *Haslea ostrearia*

**Florence Mondeguer¹, Thierry Lebeau², Alexandra Lepinay³,
Vincent Turpin³, Hervé Capiaux⁴**

¹ Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer,
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie,
Centre Atlantique. Laboratoire Phycotoxines, rue de l'île d'Yeu, BP 21105. 44311 Nantes Cedex 3, France
² Université de Nantes (UMR LPGN 6112 CNRS) – Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique,

2 rue de la Houssinière BP 92208 - 44322 Nantes Cedex, France

³ Université de Nantes - Faculté des Sciences et des Techniques (MMS EA 2160)
PRES Université Nantes Angers Le Mans [UNAM] – 2, rue de la Houssinière - BP 92208 - 44322 Nantes cedex 3, France

⁴ IUT Dpt Génie Biologique - (Plateforme d'Analyse Moléculaire Biodiversité-Environnement),
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique,
18 Boulevard Gaston Defferre - 85035 La Roche sur Yon France

The marine diatom *Haslea ostrearia* (Gastineau et al, 2014) produces a water-soluble blue-pigment named marennine (Lebeau et al, 2002) of economic interest. But the lack of knowledge of the ecological conditions, under which this microalga develops in its natural ecosystem, more especially bacteria *H. ostrearia* interactions, prevents any optimization of its culture in well-controlled conditions.

The structure of the bacterial community was analyzed by PCR-TTGE before and after the isolation of *H. ostrearia* cells recovered from 4 localities, to distinguish the relative part of the biotope and the biocenose and eventually to describe the temporal dynamic of the structure of the bacterial community at two time-scales.

The differences in genetic fingerprints, more especially high between two *H. ostrearia* isolates (HO-R and HO-BM) showed also the highest differences in the bacterial structure (Turpin et al, 1999) as the result of specific metabolomics profiles. The non-targeted metabolomic investigation showed that these profiles were more distinct in case of bacteria-alga associations than for the *H. ostrearia* monoculture

Here we present a Q-TOF LC/MS metabolomic fingerprinting approach (Mondeguer et al, 2012):

- to investigate differential metabolites of axenic versus non axenic *H. ostrearia* cultures.
- to focus on the specific metabolites of a bacterial surrounding associated with the activation or inhibition of the microalga growing.

The Agilent suite of data processing software makes feature finding, statistical analysis, and identification easier. This enables rapid transformation of complex raw data into biologically relevant metabolite information.

References

Gastineau et al, In *Advances in Botanical Research: sea plant* (2014) pp. 441-465.

Lebeau et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 153-159.

Turpin, *PhD Thesis*, University of Nantes (France), (1999) 208 pp.

Mondeguer et al, *Spectra Analyse* (2012) 24-33.

Mots-Clés : *Haslea ostrearia*, co-culture, microalgae, marine diatom, TTGE, HRMS, untargeted metabolomics

P02

Utilisation de la métabonomique pour l'exploitation des modèles invertébrés utilisés en écotoxicologie pour la recherche biomédicale

Aude Devalckeneer

Université de Mons (Umons) – 20, Place du parc 7000 Mons, Belgique

Introduction : Les études en laboratoire sur mammifères étant de plus en plus soumises à la législation, il devient important de mettre en œuvre des solutions permettant de répondre au mieux à la loi des 3Rs (Réduire, Remplacer, Raffiner). Les approches omiques permettant une réduction du nombre d'individus ainsi qu'un raffinement des expériences par une utilisation de méthodes non-invasives apportent une première solution aux contraintes de la loi des 3 Rs. Cependant, l'exploitation des mammifères reste quant à elle couramment appliquée dans la recherche biomédicale, impliquant de se diriger vers des solutions alternatives à leur utilisation. On pourrait dès lors se tourner vers les modèles animaux invertébrés déjà utilisés dans le risque environnemental et à transposer les tests écotoxicologiques à l'évaluation des risques sanitaires. En effet, de nombreuses similitudes existent entre les systèmes de détoxification (ex: système MDMX _æ système Mdr) ainsi que les voies métaboliques (CYP450, GST ...) impliquées.

But : L'objectif de notre recherche est de combiner l'analyse métabonomique et des modèles animaux invertébrés pour une réduction, voire une suppression des modèles vertébrés, dans l'évaluation du risque sanitaire.

Matériels et Méthodes : Le mollusque bivalve est déjà couramment utilisé dans le cadre des études écotoxicologiques pour ses caractéristiques bioindicatrices, à savoir : une espèce sédentaire, abondante et bioaccumulatrice. Des analyses spectroscopiques par RMN du proton ont porté sur la recherche de biomarqueurs chez l'espèce *Anodonta cygnea*, mollusque bivalve d'eau douce, suite à une exposition en laboratoire à un polluant anthropique de type HAP (Hydrocarbure aromatique polycyclique) : le phénanthrène.

La régénération cellulaire étant un processus biologique de réparation qui prend place lorsqu'un tissu a été lésé, l'évaluation par étude spectroscopique du processus de régénération a été effectuée sur le fluide coelomique du ver de terre *Eisenia fetida*.

Résultats : Après avoir établi le profil métabolique des organes de la glande digestive et des branchies d'*Anodonta cygnea*, des changements témoins d'activités de détoxification, d'activités osmoprotectrices et d'altérations énergétiques ont été détectés chez les individus exposés.

De même, l'évaluation métabonomique qui a été établie suite à une amputation partielle du corps chez le ver de terre, a permis de mettre en évidence des variations de certains métabolites clés comme la spermidine. Ces biomolécules pourraient potentiellement être développées comme biomarqueurs de la régénération.

Perspectives : Les résultats obtenus indiquent l'implication de mécanismes cellulaires similaires aux mécanismes présents chez les mammifères, preuves de leur maintien au cours de l'évolution. L'utilisation des modèles invertébrés pourrait de ce fait être appliquée afin de répondre à la demande de la loi des 3Rs par le remplacement des organismes vertébrés. Dès lors, l'association des invertébrés avec les techniques métabonomiques peuvent représenter un prélude pour la transposition des effets à la santé humaine.

Mots-Clés : Modèles invertébrés, RMN du proton, Ecotoxicologie, Risque sanitaire

P03

Plant Metabolomics at Bordeaux Metabolome Facility, a member of MetaboHUB and PHENOME IA projects. Tools and Applications.

Catherine Deborde¹, Patricia Ballias¹, Camille Bénard¹, Stéphane Bernillon¹, Thierry Berton¹, Cécile Cabasson², Virginie Cocureau¹, Salimata Diarrassouba¹, Yves Gibon¹, Daniel Jacob¹, Marie Lefebvre¹, Mickaël Maucourt², Dominique Rolin², Simon Roques¹, Laetitia Fouillen³, Sébastien Mongrand³, Jean-Jacques Bessoule³, Frédéric Domergue³, Marina Le Guédart⁴, Eric Testet⁵, Tristan Richard², Grégory Da Costa², Marie-Laure Iglesias², Eric Pédrot², Pierre Waffo-Teguou², Annick Moing¹

¹ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – INRA : UMR1332 – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

² Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – Université de Bordeaux – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

³ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – CNRS : UMR5200 – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

⁴ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – LEB Aquitaine Transfert-ADERA Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

⁵ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – IPB ENSTBB – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

Main collaborations: Canada (O Rowland, Carleton Univ.; Y Desjardins, Québec Univ.), Japan (Tsukuba Univ., T Ariizumi), UK (P Doerner, Edinburgh Univ.), France (INRA Avignon M Génard; INRA Lille C Giauffret ; INRA Montpellier, F Tardieu ; INRA Bordeaux, F Forget, J-Y Cornu, S Colombié, B Beauvoit, ISVV Bordeaux D Lecourieux, G Gambetta; Nantes Univ., P Giraudeau ; INRA Toulouse, N Langlade, Univ. Bretagne Occidentale, J-L Jung ; ENS Lyon, G Ingram).

Investissements d'Avenir : INBS projects: PHENOME (www.phenome-fppn.fr) and MetaboHUB (www.metabohub.fr) ; Biotechnologies & Bioressources projects: AMAIZING, BreedWheat, Sunrise

The Bordeaux Metabolome Facility (PMB) develops and applies plant metabolomics and high-throughput metabolic phenotyping for local, national and international projects. Applications range from the characterization of plant derived extracts to systems biology:

1- Quantitative metabolic profiling of plant organs or tissues by 1H-NMR [1,2,3] and Fast 2D NMR[4]. On-going developments by LC-MS.

2- Plant metabolomics by LC-HRMS [2,3,5] or lipidomics by LC-HRMS [6,7] and by GC-MS [8],

3- Robotised high-throughput measurements of metabolite concentrations and enzyme activities and kinetics [3,9,10],

4- Storage of metadata and raw data and biostatistical analysis through web-based applications: "MeRy-B" (Metabolomics Repository of Bordeaux, <http://bit.ly/meryb>) and BioStatFlow (<http://biostatflow.org>) [11],

5- Development of spectra processing methods for metabolite identification [12] and open source software for processing and visualization of 1H-NMR metabolomics data (<http://nmrproflow.org>),

6- Identification of metabolic markers for biotic or abiotic environmental changes [3,13], plant-pathogen interactions [15], or plant performance,

7- Characterization of plant extracts having bioactive properties by LC-MS and LC-NMR [16],

8- Modelling of fruit metabolism [17,18],

9- Integration of metabolomics data with other 'omics data for the study of fleshy fruit development and metabolism [19].

In this poster, we will provide an overview of the major features of some of these metabolomics studies and tools developed at Bordeaux and show that PMB has a commitment to develop solutions that will help creating knowledge rather than just data.

Recent references:

PNAS 2015 doi: 10.1073/pnas.1503362112 [2] J Exp Bot 2013 doi: 10.1093/jxb/ert349 [3] J Exp Bot 2015 doi : 10.1093/jxb/erv151 [4] Metabolomics 2015 doi:10.1007/s11306-015-0780-0 [5] Plant Mol Biol 2016 doi:10.1007/s11103-016-0445-z [6] Plant Cell 2015 doi: 10.1105/tpc.114.135731 [7] Mol Cell Biol 2016 doi:10.1128/MCB.00843-15 [8] Plant Physiol 2016 doi: 10.1104/pp.15.00564 [9] Plant Physiol 2014 doi: 10.1104/pp.113.231241 [10] Curr Protoc Plant Biol 2016 doi: 10.1002/cppb20003 [11] Methods Mol Biol 2014 doi: 10.1007/978-1-62703-661-0_1 [12] Anal Bioanal Chem 2013 doi: 10.1007/s00216-013-6852-y [13] Metabolomics 2013 doi: 10.1007/s11306-012-0429-1 [14] BMC Plant Biol 2013 doi: 10.1186/1471-2229-13-95 [15] Plant Sci 2015 doi: 10.1016/j.plantsci.2014.12.019 [16] Food Chem 2015 doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.079 [17] Plant J 2015 doi: 10.1111/tj.12685 [18] Plant Cell 2014 doi:10.1105/tpc.114.127761 [19] New Phytol 2011 doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03626.x

Remerciements: MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010) and PHENOME (ANR-11-INBS-0012) projects.

Mots-Clés : metabolomic, lipidomic, enzyme, NMR, LC, MS, GC, MS, biostatistiques, NMR spectra processing, modelling, plant extract

P04

Method development of metabolome compounds and biochemical alterations in *Mimachlamys varia* induced by low tides

Marine Breitwieser, Antoine Bonnet, Emmanuel Dubillot,
Hélène Thomas-Guyon, Marianne Graber

*Littoral ENvironnement et Sociétés [La Rochelle] (LIENSs) – CNRS : UMR7266, Université de La Rochelle,
Bâtiment Marie Curie Avenue Michel Crépeau, 17 042 La Rochelle cx1
Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle, France*

Studies in mollusks have documented a number of physiological changes that are associated with alternating tidal periods of immersion and aerial emergence that include compensatory changes in metabolic processes, oxygen consumption, heart rates, and valve opening/gape. Although the variegated scallop *Mimachlamys varia* seems to be a suitable bio-indicator species for contaminants monitoring in Atlantic Coast, no study has been performed to investigate how metabolism is orchestrated for this species in this variable environment.

We established a simulated intertidal environment in which scallops were acclimated during one month to alternating high and low tides, before collection of tissues in laboratory during 48 hours.

Our present research aimed to work out metabolomics assay on gills of scallops at France Brittany Atlantic coast site characterized by low contamination levels, in order to understand low tides effects on metabolism. A method using an extraction step followed by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (UPLC-QTOF) was developed after a grinding of pooled tissues.

The quantification of metabolites with the high resolution of mass system reveals changes in metabolomics pathways, with an alternating phase of aerobic and anaerobic conditions. Moreover, a qualitative approach allowed to highlight changes in other several compounds: lipids, amino-acids, nucleotides and fatty acids.

Mots-Clés : mollusk, metabolism, intertidal environment, liquid chromatography tandem, mass spectrometry

P05

Polyphenomics based on UPLC-QqQ-MS for deciphering the genetic bases of grapevine response to drought

**Nicolas Sommerer¹, Lucie Pinasseau¹, Arnaud Verbaere¹, Maryline Roques²,
Emmanuelle Meudec¹, Anna Vallverdu-Queralt¹, Loïc Le Cunff³, Agnès Ageorges²,
Nancy Terrier², Jean-Claude Boulet¹, Véronique Cheynier¹**

¹ INRA - UMR1083 SPO - Plateforme d'analyse des polyphénols (INRA - PFP), 2 place Viala 34060 Montpellier, France

² INRA – 2 place Viala, 34060 Montpellier, France

³ IFV Pôle national matériel végétal - UMT Génovigne (UMT Génovigne) – Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV),
2 place Viala 34060 Montpellier, France

Phenolic compounds represent a large family of grape secondary metabolites, essential for the quality of grape and wine and playing a major role in plant defense against biotic and abiotic stress. Phenolic composition is genetically driven but also greatly affected by environmental factors and in particular water stress. A major challenge for selection of grapevine cultivars adapted to climate change and with high potential for wine-making is to dissect the complex plant metabolic response involved in adaptation mechanisms.

A targeted metabolomics approach based on UPLC-QqQ-MS analysis in the MRM mode (Lambert et al., 2015) has been developed for high throughput profiling of the phenolic composition of grape skins. This method enables rapid, selective and sensitive quantification of 96 phenolic compounds (anthocyanins, phenolic acids, stilbenoids, flavones, flavanones, flavan-3-ol monomers and oligomers...), and of the constitutive units of proanthocyanidins (i.e. condensed tannin), giving access to detailed polyphenol composition.

It has been applied on the skins of mature grape berries from a core-collection of 279 *V. vinifera* cultivars grown with or without watering to assess the genetic variation for polyphenol composition as a function of environmental stress, in the frame of the EU project Innovine. Chemometrics analysis of the phenolic composition data has shed light on the genetic diversity of vine metabolic response to water stress.

Mots-Clés : vigne, sécheresse, changement climatique, polyphénols, spectrométrie de masse

Une modélisation multi-échelle incluant la métabolomique révèle l'impact différentiel de graisses laitières transformées sur le développement de l'athérosclérose chez le hamster

**Jean-Charles Martin¹, Jean-François Landrier²,
Bernadette Delplanque³, Marie-Christine Alessi⁴**

¹ UMR INRA 1260 / INSERM 1025 – Universités Aix Marseille,

27 Bvd Jean Moulin faculté de médecine de la Timone, 13385 Marseille, France

² UMR INRA 1260 – 27 Bvd Jean Moulin faculté de médecine de la Timone NORT, France

³ Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire (NMPA) – Université Paris-Sud XI, Orsay, F-91405, France

⁴ UMR INSERM 1060 – 27 Bvd Jean Moulin faculté de médecine de la Timone, NORT, France

Divers types de graisses laitières expérimentales ont été testées chez le hamster hyperlipémique pour évaluer leur efficacité sur le développement de l'athérosclérose. Ces graisses ont été comparées à une graisse laitière non modifiée (contrôle pro-athérogène) et à un mélange de graisses végétales (contrôle athéroprotecteur). Les 3 graisses expérimentales ont été modifiées pour obtenir une décholestérolisation partielle ou totale, et un abaissement des contenus en acides gras saturés pro-athérogènes de 20%. Ces graisses ont été administrées à 20% en poids de régime pendant 12 semaines, conduisant à ce niveau d'apport au développement de la maladie chez le Hamster. Des analyses multi-plateformes couplant approches omiques et conventionnelles ont été réalisées pour expliquer la sévérité des lésions athéromateuses : profilages métabolomiques LCMS haute résolution du plasma et de l'urine, profilage d'acides gras à haut débit des classes lipidiques du plasma et des lipides totaux du foie, bilan biochimique sanguin (lipoprotéines et bilan lipidique clinique), expression d'une cinquantaine de gènes dans le foie et le sang liés à l'inflammation, le stress oxydant, et la régulation du métabolisme lipidique et énergétique. En tout 1666 variables par hamster ont été retenues pour décrire le statut biologique de chaque hamster.

Les variables biologiques liées à la maladie ont été sélectionnées des méthodes PLS. Les variables sélectionnées (n=120) ont été intégrées dans un super modèle et leurs liens examinés dans un réseau d'interactions statistiques dense. L'examen des sous-régions du réseau et l'ontologie des variables hétérogènes a permis de les assembler dans 10 ensembles biologiques fonctionnels ou « modules biologiques » : métabolisme des acides aminés, régulation du métabolisme et transport des lipides, fonction mitochondriale, acides gras endogènes, dérivés lipidiques laitiers, métabolisme de la vitamine E, lien au cholestérol sanguin, inflammation, hémostasie, non-classés/ inconnus. Un score numérique pour chaque module a été calculé à l'aide d'une analyse multi-bloc (PLS hiérarchique). Ces scores ont été assemblés dans une régression PLS, permettant de prédire plus de 80% de l'athérosclérose observée, selon l'équation : $pred\ athero = 0.108091*[dairy\ fat\ derived\ fatty\ acids] + 0.152669*[endogenous\ derived\ fatty\ acids] - 0.0340185*[mitochondrion\ function] + 0.173429*[regul.\ Lipid\ metabol.\ Transport] - 0.0751566*[vitamin\ E\ metabolism] - 0.153142*[hemostasis] - 0.110269*[amino\ acid\ metabolism] + 0.110269*[blood\ cholesterol\ related] + 0.231903*[inflammation] - 0.00456344*[miscellaneous\ \&\ unidentified] + 4.06731$. Dans cette équation, le poids du module « regul. Lipid metabol. Transport » était essentiel pour expliquer l'athérosclérose. Une analyse des corrélations partielles en réseau des différents modules soulignaient encore l'importance de ce module sur le développement de l'athérosclérose, en raison de sa géocentralité et de son lien direct avec le score pathologique. Par ailleurs, nos résultats montraient que l'activation de certains modules biologiques était liée à la qualité des lipides ingérés, alors que d'autres associés à la maladie y étaient insensibles. Ainsi, le module « métabolisme de la vitamine E » était le meilleur contributeur de l'effet athéroprotecteur de la graisse transformée produisant le moins de lésions vasculaire.

En conclusion, notre approche de modélisation couplant la métabolomique à d'autres approches biologiques a permis d'identifier et de quantifier la contribution de facteurs complexes à l'athérogénèse dans chaque configuration nutritionnelle.

Mots-Clés : biologie des systèmes, LCMS, graisse, athérosclérose, modélisation, métabolomique

P07

Workflow methodology for rodent brain metabolome exploration using NMR, LC-HRMS and GC-MS analytical platforms

Binta Diémé, Antoine Lefevre, Lydie Nadal-Desbarats, Laurent Galineau, Frédéric Montigny, Hélène Blasco, Christian Andres, Patrick Emond, Sylvie Mavel

*Université François-Rabelais, INSERM U930 « Imagerie et Cerveau », CHRU de Tours,
10 Bv Tonnellé, 37044 Tours, France*

We developed a multiplatform approach for the metabolome exploration of rodent brain tissue using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), gas-chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The main steps for the widest and deepest metabolite exploration of cerebral tissues are lysis and metabolite extraction. We first analyzed the impact of freeze-drying on tissue and, four extraction methods to extract tissue metabolites were compared. The samples were analyzed by NMR and LC-HRMS using reversed phase liquid chromatography. Based on the number of metabolites extracted and their coefficient of variation (%CV), the most reproducible protocol (one-step extraction with acetonitrile on lyophilized material) was chosen to further test the impact of sample mass on method performance (3, 6, and 9 mg were tested). GC-MS analysis was also investigated using four different methoximation/silylation derivatization combinations. The optimal analytical protocols, for the three analytical platforms, were determined to establish the reliability and suitability of sample treatments required to achieve an untargeted brain tissue metabolomics. An example of the application of this workflow by analyzing three cerebral rodent brain regions (n=3x4) by 1H NMR, GC-MS and LC-HRMS was presented, and the different cerebral regions were distinguished based on their metabolic profiles.

Mots-Clés : méthodologie, tissu cérébrale, LC, HRMS, RMN, GC, MS

P08

Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Fanta Fall, Mikaël Croyal, Véronique Ferchaud-Roucher, Khadija Ouguerram, Maud Chétiveaux, Michel Krempf, Estelle Nobécourt

*Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) – INRA : UMR1280,
8 quai Moncoussu, 44000 Nantes, France*

Background. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has recently proved its efficiency for plasma protein quantification and enrichment measurements in kinetic studies involving a stable isotope labeled tracer.

Aim. We aimed to develop a simple, fast and accurate multiplexed LC-MS/MS assay to analyze in a single run twelve major human apolipoproteins (Apos) involved in lipoprotein metabolism: ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V, ApoB48, ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE, ApoM and Apo(a).

Methods. The LC-MS/MS method was validated in vivo in six subjects who received a 14 hour constant infusion of [5,5,5-2H3]-L-leucine at 10 $\mu\text{mol/kg/h}$. Plasma lipoprotein fractions were isolated from collected blood samples and were digested with trypsin. Proteotypic peptides were subsequently analyzed by LC-MS/MS. Enrichment measurements and concentrations obtained for ApoA-I and ApoB100 were compared to those obtained by the standard method using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and ELISA. Correlation (Pearson) and Bland-Altman tests were used for method suitability assessment.

Results. The enrichments from both methods were correlated for ApoA-I ($r = 0.994$; $p < 0.0001$) and ApoB100 ($r = 0.999$; $p < 0.0001$) and measured concentrations were similar whatever the method employed (ApoA-I; $r = 0.926$; $p < 0.0001$ - ApoB100; $r = 0.952$; $p < 0.0001$). The Bland–Altman plot also confirmed the similarity of the two methods and LC-MS/MS intra- and inter-assay variability did not exceed 10.7% and 12.5%, respectively. Finally, kinetic parameters were similar and/or in agreement with previous reported data.

Conclusion. LC-MS/MS can be considered as a useful tool for human protein kinetic studies using stable isotope labeled tracer.

Mots-Clés : apolipoproteins, fluxomics, LC, MS/MS, kinetics

P09

A simple and fast LC-MS/MS method to accurately quantify proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in human plasma

Fanta Fall, Mikaël Croyal, Michel Krempf, Aurélie Thédrez, Gilles Lambert, Estelle Nobécourt

Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) – INRA : UMR1280 – 8 quai Moncoussu, 44000 Nantes, France

Background. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a key regulator of LDL cholesterol (LDL-C) levels. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has recently proved its efficiency for plasma proteins quantification. Nevertheless, sample concentration by immunoaffinity is still required for low abundant protein like PCSK9 and involves laborious and expensive workflow.

Aim. We aimed to develop a simple, fast and accurate LC-MS/MS based assay for PCSK9 quantification in plasma samples without immunoaffinity enrichment.

Methods. 30 subjects (63% males, age 26 to 60 years) with familial hypercholesterolemia and on stable chronic lipid lowering treatment were used for method development. For PCSK9 quantification, plasma samples were trypsin digested and a signature peptide (GTVSGTLIGLEFIR) was concentrated by solid-phase extraction (SPE), and then analyzed by LC-MS/MS. PCSK9 concentrations were also assayed by ELISA for comparison. Correlation (Pearson) and Bland-Altman tests were used for method suitability assessment.

Results: The post proteolysis concentration of samples by SPE provided similar results for PCSK9 concentrations in plasma by ELISA (504 ± 231 ng/ml, range 183-1170 ng/ml) and LC-MS/MS (514 ± 217 ng/ml, range 164-1049 ng/ml). In addition, PCSK9 plasma concentrations were significantly correlated whatever the analytical method employed ($r=0.936$, $p < 0.0001$). The Bland-Altman test showed that only 2 points were out of the 95% confidence range.

Conclusion. We developed a simple and non-expensive method for PCSK9 measurements in plasma samples, which could be easily merged with already published LC-MS/MS method used for the quantification of several apolipoproteins in a single run.

Mots-Clés : PCSK9, LC, MS/MS, solid, phase extraction

P10

A web app to speed up data analysis and identify metabolites in high-throughput metabolomic assays

Florence Mehl^{1,2}, Roman Mylonas^{1,2}, Ioannis Xenarios², Julijana Ivanisevic¹

¹ *Université de Lausanne (UNIL) – Lausanne, Suisse*

² *Swiss Institute of Bioinformatics - Lausanne (SIB) – Bâtiment Génopode CH1015 Lausanne, Switzerland*

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LCMS) is the most versatile and widely used technique in metabolomics that allows us to measure thousands of metabolite features from minimal amounts of biological sample. However, the analytical processing, including the efficient removal of chemical noise, correct feature annotation and metabolite identification, remains a tedious and error-prone task and limits the biologically understandable conclusions.

Here we introduce a user-friendly web app to reduce the burden of redundant features identification, due to high levels of noise and adducts, and assess the fit from these features to metabolites, catalogued in publicly accessible databases (HMDB, MassBank...). The web app has been developed under a Django framework and programmed in Python and R and is accessible through a web browser. The raw data analyzed by XCMS or other software produce a peak table. Filters based on coefficient of variation and signal intensity are applied to this table to reduce data dimensionality and select only significant features. The web app allows the user to adjust easily the filtering thresholds depending on the results displayed on statistical analysis plots. These plots help user to determine if the applied filter gives relevant results and/or the threshold should be adjusted. The reduced list of features is then matched against one or several publicly available metabolite databases using the exact mass to charge ratio. Database of choice can be uploaded by user. Finally, the results are downloaded in the original data table format containing only relevant features matched to known biologically meaningful metabolites. This enables the use of typical downstream metabolomics software.

This application allows metabolomics scientists to use an interface without need of programming. Flexible design of this web app facilitates the implementation of new filters depending on users demand. It constitutes an effective tool to access relevant information contained in the large amount of data produced by high-throughput and high-resolution untargeted LC-MS analyses.

Mots-Clés : LC, MS, high-throughput, data filtering, data processing, database matching

P11

Analyses métabolomiques du liquide céphalo-rachidien et du plasma pour la caractérisation de l'encéphalopathie hépatique

Pierre Barbier Saint Hilaire¹, Nicolas Weiss², Benoit Colsch¹, Suleiman Attala¹, Foucauld Isnard¹, Frédéric Sedel³, Dominique Thabut⁴, Christophe Junot¹

¹ Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments – CEA – Saclay, France

² Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix – 83 boulevard de l'hôpital – 75013 Paris, France

³ Medday Pharmaceuticals, ICM-Brain and Spine Institute-iPEPS – Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital 75013, Paris, France

⁴ Brain Liver Pitié-Salpêtrière (B-LIPS) study group – Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'hôpital – 75013 Paris, France

L'encéphalopathie hépatique (EH) est une complication neurologique observée chez les patients souffrant de maladies du foie telle que la cirrhose. La proportion de patient cirrhotiques développant une EH est estimée à 20 %. Si les cas les plus avancés de la maladie conduisent à un état de coma, les cas de moindre gravité entraînent des diminutions des capacités cognitives difficilement objectivable. De plus, la physiologie de l'EH est encore mal comprise ce qui limite la mise en point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, des analyses métabolomiques non ciblées ont été menées afin de mettre en évidence les désordres métaboliques liés à cette maladie.

Les analyses ont été réalisées en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS). Afin d'identifier le plus grand nombre de métabolites, deux systèmes chromatographiques ont été utilisés (C18 et HILIC). Deux types d'échantillons différents ont été analysés et comparés : (i) du liquide céphalo-rachidien (LCR) prélevé chez 14 patients souffrant d'EH et 27 témoins, (ii) du plasma collecté chez 12 patients cirrhotiques présentant une complication d'EH, 13 cirrhotiques sans complications et 9 témoins. Les signatures métabolomiques ont été obtenues dans le LCR et dans le plasma avant d'être comparées entre elles.

L'analyse du LCR a permis de mettre en évidence 73 métabolites présentant une différence significative entre les patients encéphalopathes et les témoins. Sont notamment retrouvé des acides aminés, des acylcarnitines ou des acides biliaires. Une accumulation de composés acétylés est également observée, ce qui pourrait refléter une altération du cycle de Krebs. Dans le plasma, 67 métabolites sur les 73 métaboliques discriminants dans le LCR ont été retrouvés et 55% sont également significativement modifiés entre les patients encéphalopathes et les témoins. Cela montre que si la spécificité est plus marquée dans le LCR, les modifications métaboliques observées sont concordantes entre les deux biofluides analysés. L'ajout d'un groupe de patient cirrhotiques sans EH en plasma (difficilement envisageable en LCR pour des raisons éthiques) permet de faire ressortir 13 métabolites spécifiquement modifiés chez les patients encéphalopathes par rapport aux patients cirrhotiques sans complications (métabolisme de la phénylalanine, quelques composé acétylés...). De plus une quarantaine d'autres métabolites identifiés uniquement dans le plasma apparaissent spécifiques de l'EH et semblent suggérer des perturbations liées au métabolisme des lipides.

Ces analyses métabolomiques d'échantillons de patients encéphalopathes ont permis de mettre en évidence plusieurs voies métaboliques impliquées dans la physiopathologie de la maladie, notamment autour de l'ammoniac, des acides aminés ou du métabolisme énergétique. Des analyses complémentaires en lipidomique non ciblées seront également réalisées afin d'obtenir une signature métabolique plus complète de l'EH.

Mots-Clés : métabolomique, liquide céphalorachidien, plasma, encéphalopathie hépatique, cirrhose, HPLC, spectrométrie de masse à haute résolution

P12

Characterization of bioactive lipids in bacteria: from global to targeted lipidomic

Pauline Le Faouder¹, Julien Pujo², Matthieu Allagnat¹, Teresa Perez², Jean-Marie Galano³, Camille Oger³, Alexandre Guy³, Thierry Durand³, Nicolas Cenac², Justine Bertrand-Michel¹

¹ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) – Hôpital de Rangueil, Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse III, INSERM : U1048 – 1 avenue du Prof Jean Poulhes - BP 84225 - 31432 Toulouse Cedex 4, France

² Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP) – INSERM : U1043, CNRS : UMR5282, Université Paul Sabatier, Toulouse III, Hôpital Purpan Place du Docteur Baylac BP 3028 31024 Toulouse Cedex 3, France

³ Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) – CNRS : UMR5247, Université Montpellier I, Université Montpellier II, Sciences et techniques – Faculté de pharmacie 15, Avenue Charles Flahault 34060 Montpellier cedex 2, France

Recent study shows that PUFA metabolites are implicated in intestinal hypersensitivity associated to irritable bowel syndrome (IBS; Cenac et al, 2015). Moreover, the increase of knowledge regarding to this pathology reveals the importance of intestinal microbiota in the generation of symptoms. As it was established that bacteria are able to activate nerve (Chiu et al, 2013), we wonder if bacteria from intestinal flora can produce bioactive lipids and so activate sensory neuron. In this context, the aim of our study is to identify new bioactive lipids present in different strains of bacteria using an unknown-known approach by LC-HRMS around the family of fatty acids derivatives.

Four strains of E.Coli are cultivated on a minimal medium: two pathogenics, one commensal and one probiotic. Lipids are isolated from the pellet and the supernatant using solid phase extraction. Extracts are analyzed on a LC-Exactive system using negative ionization mode. Thanks to the accuracy mass and by the study of the fragmentation spectra we characterized 3 major families of lipids of interest: metabolites derived from linoleic and linolenic acid, hydroxylated fatty acid metabolites and fatty acid-amino acid metabolites. We confirmed then the structures using synthesized standards and finally developed a sensitive and robust targeted method to quantify them on a LC-QQQ system. We will present in details our approach and the first biological results which show the implication of this new biomarkers in neuronal activation.

References

Cenac et al, 2015. Quantification and Potential Functions of Endogenous Agonists of Transient Receptor Potential Channels in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 149:433–444

Chiu et al, 2013. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature*, 501(7465): 52-57.

Mots-Clés : bioactive lipid, LC HRMS, global lipidomic

P13

Liver tissue lipidomics reveals extensive alterations in lipid profiles of ApoE^{-/-} mice fed anthocyanin-rich purple tomatoes compared to anthocyanin-free red tomatoes.

Arnaud Garcia , Mark Philo, Sebastian Achterfeldt, Ian Colquhoun, Gwenaëlle Le Gall & Paul A Kroon

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

The purple tomatoes that were engineered to express the transcription factors Delila and Rosia1 by Prof. Cathie Martin's research group¹ are anthocyanin-rich foods that have been shown to have potential health benefits, e.g. they extended lifespan in a mouse model of tumorigenesis [1] and decreased the size of aortic plaque in atherosclerosis-prone mice (ApoE^{-/-}) (Achterfeldt, PhD thesis).

Transcriptomics and liver total bile acids quantitation from ApoE^{-/-} mice fed purple tomatoes for 17 weeks suggested that the beneficial effect was mediated by reverse cholesterol transport metabolism (Achterfeldt, PhD thesis).

The aim of this study was to extensively characterise the metabolite profiles of livers from ApoE^{-/-} mice fed diets supplemented with either purple tomatoes or anthocyanin-free red tomatoes using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/TOF-MS)-based lipidomics.

Using previous workflows [2] involving a modified Folch extraction, LC/MS and conversion of raw LC/MS data, two approaches were used to identify both markers and non-marker lipids.

The first method using TAVERNA [3] combined with XCMS [4] and led to the automated annotation of > 90% of the mass over charge/retention time (m/z/RT) features extracted (~10000 in total).

The second method involved the analysis of ~1000 marker m/z/RT features (p<0.05) sorted into clusters of m/z ions sharing the same RT. A strategy combining the finding of the molecular ions, adducts and fragments in the raw data chromatograms and the comparison of the experimental accurate masses with those stored in online databases like MzedDB and METLIN (error < 30 ppm) led to the identification of ~150 lipids. Comparing the two approaches we showed that the identification of TAVERNA was only ~ 50% correct at best. On this occasion, manual inspection of the data was essential to ensure the correct identification of the m/z/RT features.

We detected a global reduction in neutral lipids (tri, di and mono-glycerides), ceramides, glycosylceramides, sphingolipids, cholesteryl esters and a few cardiolipins in the livers of ApoE^{-/-} mice fed purple tomatoes compared to those fed red tomatoes.

[1] Butelli, et al., *Nature biotechnology* (2008) 26, 1301-1308

[2] Nygren, et al., *Metabolic Profiling: Methods and Protocols* (2011) 247-257

[3] Brown, et al., *Bioinformatics* (2011) 27, 1108-1112

[4] Smith, et al., *Analytical chemistry* (2006) 78, 779-787

Mots-Clés : lipidomics mouse atherosclerosis liver anthocyanins

P14

Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation: complementary tools for natural products dereplication

**Pierre-Marie Allard¹, Tiphaine Péresse², Jonathan Bisson³, Katia Gindro⁴,
Laurence Marcourt⁵, Van Cuong Pham⁶, Fanny Roussi²,
Marc Litaudon², Jean-Luc Wolfender⁵**

¹ Université de Genève (UNIGE) – 24 rue du Général-Dufour CH - 1211 Genève 4, Suisse

² Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – CNRS : UPR2301,
Avenue de la terrasse 91198 Gif sur Yvette cedex, France

³ Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy College of Pharmacy, Center for Natural Product
Technologies

University of Illinois at Chicago, 833 South Wood Street, Chicago, Illinois 60612, États-Unis

⁴ Mycology and Biotechnology group, Institute for Plant Production Sciences IPS, Agroscope,
Route de Duillier 50, P.O. Box 1012, 12 1260 Nyon, Suisse

⁵ Université de Genève – 24 rue du Général-Dufour CH - 1211 Genève 4, Suisse

⁶ Institute of Marine Biochemistry of the Vietnam Academy of Science and Technology (VAST),
18 Hoang Quoc Viet road, Cau Giay, Hanoi, Viêt Nam

Bioinformatics methods are required to address the complexity and challenges encountered when studying living organisms (plants, bacteria, fungi...). Recently, various tools have been developed and are changing the face of natural products chemistry (Hufsky et al, 2014). Molecular networking allows to arrange large sets of tandem MS/MS data according to the similarity of the fragmentation pattern, thus allowing to group detected metabolites in clusters of potentially related structures (Watrous et al, 2012). In addition, various in-silico fragmentation methods have also been developed and allow generating theoretical MS/MS spectra or helping in the interpretation of experimental ones (Hufsky and Böcker, 2016). Here, we propose a novel dereplication workflow based on the combination of molecular networking and an in-silico fragmentation database of more than 200'000 natural products (Allard et al, 2016). This dereplication procedure is generic and allows the user to navigate through the chemical complexity of analyzed extracts by visually depicting the dereplicated structures on the network. This approach was developed by combining free, open-source tools and the full in-silico fragmentation database was made available to all interested researchers, letting open the door for adaptations and further improvements. In this presentation the elaboration of the dereplication strategy will be discussed and examples will show how it can be implemented in a natural products research workflow.

References

Hufsky et al. *Nat. Prod. Rep.* 2014, 31, 807.

Watrous et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, 109, E1743–E1752.

Hufsky and Böcker *Mass Spectrom. Rev.* 2016, 47

Allard et al. *Anal. Chem.* 2016, 88, 3317-3323.

Mots-Clés : in silico fragmentation, molecular networking, natural products chemistry, bioinformatics, dereplication, databases

Trans-resveratrol metabolism in human via plasma samples and UHPLC-quadrupole-Orbitrap tandem mass spectrometry

Ljubica Svilar¹, Franck Tourniaire¹, Jean-Charles Martin², Catherine Defoort³, Marie-Pierre Pavageau⁴, Amandine Brochot⁵

¹ CriBioM – Aix-Marseille Université - AMU – 27 Bd Jean Moulin Faculté de médecine, La Timone, France

² UMR-INRA 1260 – Aix-Marseille Université – 27 Bd Jean Moulin Faculté de médecine, La Timone, France

³ Aix-Marseille Université (AMU) – 27 Bd Jean Moulin Faculté de médecine, La Timone, France

⁴ Thermo Fisher Scientific – Thermo Fisher Scientific – 16 avenue du Québec - SILIC 765, Courtaboeuf, France

⁵ PiLeJe – Larena Santé – 37 quai de grenelle - 75015 Paris cedex 15, France

Resveratrol is a stilbenoid polyphenol present in the various plants and particularly in grapes. It demonstrates a number of biological activities such as anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor activities, cardio-protective properties, antidiabetic, anti-ageing effects etc. For this reason a numerous studies have been focused on its bioavailability in different beverages as well as in animal models and in humans, and have shown its low bioavailability due to its rapid excretion. As t-resveratrol is rapidly absorbed, its transformed conjugates, essentially glucuronides and sulfates are often studied.

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is today widely used for quantifying metabolites from complex biological matrixes. Different mass spectrometric approaches have been applied for quantitation of resveratrol and its metabolites in different biological fluids but also in plants and beverages. This goes from selected reaction monitoring (SRM) on triple quadrupoles to full scan acquisition using high resolution mass spectrometry (HRMS). Whereas SRM on a triple quadrupole mass spectrometers improves sensitivity, high resolution mass spectrometry is more advantageous to gain selectivity.

With the recently developed hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer it is possible to gain sensitivity which is very important when dealing with the complex biological matrixes such as plasma. Parallel reaction monitoring (PRM) scan mode uses the quadrupole of the Q-Exactive MS to isolate a target precursor ion which is afterwards fragmented in the collision cell. Fragments are detected in the Orbitrap mass analyzer, which provides high selectivity as the whole MS/MS spectrum is recorded allowing to follow several or all fragment ions in acquired scan, together with high sensitivity as well as high-throughput quantification capabilities.

In this study a rapid and simple ultra-high performance liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer method has been developed to quantify trans-resveratrol and its metabolites: trans-resveratrol-3-O-d-glucuronide, trans-resveratrol-4-O-d-glucuronide, trans-resveratrol-3-sulfate, a,b-dihydro-resveratrol, trans-resveratrol-di-glucuronide and trans-resveratrol-glucuronide-sulfate in human plasma after intake of 200 mg of resveratrol. A rapid and simple ultra-high performance liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer method has been developed.

Mots-Clés : trans resveratrol, LCMS/MS, HRMS, quantification

P16

Unlocking the secrets of wine terroir: origin discriminations of rosé wines by shotgun UPLC-QTOF-MS metabolomics

Mélodie Gil¹, Robert Sabatier², Christelle Reynes², Guillaume Cazals³,
Christine Enjalbal³, Cédric Saucier¹

¹ Université de Montpellier, UMR 1083 INRA Supagro Sciences pour l'Œnologie, Centre de Formation et de recherche en Œnologie, 15 Avenue Charles Flahault, 34000 Montpellier, France

² Université de Montpellier, IGF, UMR 5203 CNRS INSERM – Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, 34000 Montpellier, France

³ Université de Montpellier, PT-LMP, IBMM UMR 5247 CNRS – Université de Montpellier, Pl. E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Wine is a widely consumed alcoholic beverage with a high commercial value. More specifically, the worldwide consumption of rosé wine has increased by 20% since 2002 (OIV Focus, 2015). But because of its high commercial value, it can become a subject of fraud, and authenticity control is necessarily required. More than one hundred polyphenols have been recently quantified in various rosé wines (Lambert et al, 2015). They are key components defining color, taste and quality of wines. Their amount and composition depend on many different factors such as grape variety, winemaking and age of the wine. In this study, the influence of geographic origin of some rosé French wines was investigated. An original and very fast UPLC-QTOF-MS method was developed and used to predict the geographic origin authenticity of rosé wines.

30 commercial rosés wines from three different regions of France (Bordeaux, Languedoc and Provence, 10 of each) were analyzed by classical chemical analysis (pH, IPT, SO₂...), color measurement, and UPLC-high resolution MS analysis using an adapted fast method (Delcambre et al, 2013). The goal of this six min shotgun analytical method was to give a rapid mass spectrometry fingerprint of these wines and be able to identify specific ions.

Statistical analyses were performed after 1) peak extraction in each spectrum, 2) peak alignment between all the 30 rosés wines and 3) specific peaks selection by genetic algorithm. The discrimination between the three regions was applied onto the described dataset and produces excellent classification results.

References

OIV Focus 2015, Le marché des vins rosés

Lambert M, Meudec E, Verbaere A. A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. *Molecules*. 2015, 20, 7890-7914.

Delcambre A, Saucier C. High-Throughput oenomics: shotgun polyphenomics of wines. *Analytical chemistry*, 2013, 85, 9736-9741.

Mots-Clés : wine metabolomics mass spectrometry

P17

Metabolic drift in the ageing brain

Julijana Ivanisevic¹, Kelly Stauch², Michael Petrascheck³, H. Paul Benton⁴, Adrian Epstein², Michael Boska⁵, Howard Gendelman², Howard Fox², Gary Siuzdak⁴

¹ *Université de Lausanne – Rue du Bugnon 19 1005 Lausanne, Suisse*

² *University of Nebraska Medical Center – Departments of Pharmacology and Experimental Neuroscience, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5800, États-Unis*

³ *Departments of Chemical Physiology, Molecular and Cellular Neuroscience, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, États-Unis*

⁴ *Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry, Departments of Chemistry, Molecular and Computational Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, États-Unis*

⁵ *University of Nebraska Medical Center – Department of Radiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-1045, États-Unis*

Brain function is highly dependent upon controlled energy metabolism whose loss heralds cognitive impairments. This is particularly notable in the aged individuals and in age-related neurodegenerative diseases however how metabolic homeostasis is disrupted in the aging brain is still poorly understood. Here we performed global, metabolomic and proteomic analyses across different anatomical regions of mouse brain at different stages of its adult lifespan. Interestingly, while severe proteomic imbalance was absent, global-untargeted metabolomics revealed an energy metabolic drift or significant imbalance in core metabolite levels, changing in opposing direction, in aged mouse brains. Metabolic imbalance was characterized by compromised cellular energy status (NAD decline, increased AMP/ATP, purine/pyrimidine accumulation) and significantly altered oxidative phosphorylation and nucleotide biosynthesis and degradation. The central energy metabolic drift suggests a failure of the cellular machinery to restore metabostasis (metabolite homeostasis) in the aged brain and therefore an inability to respond properly to external stimuli, likely driving the alterations in signaling activity and thus in neuronal function and communication.

Mots-Clés : metabolic drift, healthy brain ageing, metabolomics, energy metabolism, proteomics

Metabolomic study of Arabidopsis thaliana plants deficient for pinorensinol reductases in condition of abiotic stress

Monika Vranić¹, Cedric Decourtil¹, Jean Xavier Fontaine¹, Roland Molinie¹, Laurent Gutierrez², Stephanie Guenin², Herve Demailly², Gaelle Mongelard², Brigitte Chabbert³, Serge Pilard⁴, David Mathiron⁴, François Mesnard¹

¹ Laboratoire de Phytotechnologie et Pharmacognosie EA 3900 BIOPI, Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne : EA3900 – 1 rue des Louvels, 80037 Amiens, France

² Centre de ressources regionales en biologie moleculaire (CRRBM) – Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint-Leu, 80000 Amiens, France

³ Fractionnement des AgroRessources et Environnement (FARE) – INRA : UR0614,

Université de Reims - Champagne Ardenne – 32 esp Roland Garros, 51100 Reims, France

⁴ Plateforme analytique – Université de Picardie Jules Verne – 33 rue saint-Leu, 80000 Amiens, France

Phenylpropanoid biosynthesis is a fundamental pathway for the secondary metabolism which final products are flavonoids, coumarins, lignans and lignin. This last one is deposited in secondary cell walls as the most abundant biopolymers and it plays in biotic and abiotic stress responses. In planta, the role of lignans remains unknown, but it has been hypothesized that they could play a role in resistance against pathogens (bacteria, fungi...). In Arabidopsis thaliana, two pinorensinol reductase 1 and 2 (PRR) enzymes catalyse the biosynthesis of a lignan, the lariciresinol which could play a role in plant defence. Previous studies showed that BABA potentiates defence-signaling pathways, including the phenylpropanoid pathway (Slaughter et al, 2008; Zimmerli et al, 2000). Furthermore, auxin has been shown to be an important regulator of a secondary metabolism (Morant et al, 2012). In this study, prr1-prr2 and wild type A. thaliana seedlings were subjected to hormone stress by growing on BABA and auxin sufficient medium in order to look for some consequences on secondary metabolism. Fifteen-day-old seedlings were harvested and extracted to analyze the metabolite content by LC-MS and H1-NMR.

References

Zimmerli L, Jakab G, Métraux JP, Mauch-Mani B (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci.* 97(23):12920-5

Slaughter A, Daniel X, Flors V, Luna E, Hohn B, Mauch-Mani B (2012) Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol.* 158(2):835-43

Morant M, Ekstrøm C, Ulvskov P, Kristensen C, Rudemo M, Olsen CE, Hansen J, Jørgensen K, Jørgensen B, Møller BL, Bak S (2010) Metabolomic, transcriptional, hormonal, and signaling cross-talk in superroot2. *Mol Plant.* 3(1):192-211

Mots-Clés : Arabidopsis thaliana, phenylpropanoid pathway, pinorensinol reductases, abiotic stress

Cellular metabolomics by NMR: applications to the study of the exposome and to human pathology models

Cédric Caradeuc¹, Kawtar Ghiatt², Anne Bolopion³, Cécile Denis³, Céline Desseille³, Anne Gondry³, Nicolas Pallet^{3,4}, Odile Kellermann³, Robert Barouki^{3,5}, Benoit Schneider³, Frédéric Charbonnier³, Philippe Beaune^{3,4}, Etienne Blanc³, Gildas Bertho²

¹ FR 3567 CICB-Paris (CICB-Paris) – UFR des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Université Paris V- Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères 75006 PARIS, France

² Chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques (CBPT) – CNRS : UMR8601, Université Paris V- Paris Descartes – 45 Rue des Saints-Pères 75270 PARIS CEDEX 06, France

³ Université Paris 5, Paris Descartes (UP5) – PRES Sorbonne Paris Cité, Université Paris V - Paris Descartes, INSERM – 12, rue de l'École de Médecine - 75270 Paris cedex 06

⁴ Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP) – Assistance publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris V - Paris Descartes – 20-40 rue Leblanc 75908 Paris Cedex 15, France

⁵ Hôpital Necker - Enfants malades (Necker) – Université Paris V - Paris Descartes, Assistance publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP) – 149, rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15, France

The study of growth media and intracellular extracts allows to obtain an overview on the cellular metabolome. We investigate the effect of xenobiotics and pathological states on cells of interest for biomedical research. Our projects aim to explore the mechanism underlying the development of some pathologies.

1) Exposome and xenobiotics: The impact of drugs and pollutants (alone or in mixture) on the metabolome of human cells was investigated on hepatocytes.

Drug's exposition: Endocrine disrupters (ED) are present in our everyday environment and their effects on human are a growing public health concern. In an effort to elucidate their toxic mechanisms and to find out relevant signatures efficient to screen potential endocrine disruption effects, we studied the effects of typical EDs and their metabolites on a human hepatic cell line (HepG2) expressing or not CYP (3A4, 2D6, 1A2, 2C9, 2B6), treated with known EDs (Tamoxifen, Diclofenac, Flutamide). The analysis of the metabolome gave informations on the molecular modifications of the cell after CYP metabolism, crucial in the production of active metabolites and/or in the elimination of EDs. The toxicity pathways defined could then be used as biomarkers for the screening of potential EDs.

Low-dose exposition to POP: We study the molecular mechanisms related to the deleterious effects of persistent organic pollutants (POPs), which are environmental pollutants present at low doses on human cells. These mechanisms, multi-factorial, remain largely unknown. A team of biologists exposed human liver cells to low doses of POPs (Dioxin or/and alpha-Endosulfan), alone or mixed. NMR determined potential biomarkers of exposure. The results obtained should allow to decipher the disease mechanisms of these POPs and, ultimately, support the decision on their dangerousness.

2) Human model of pathologies: We study the impact on the motricity related to cellular and functional components, such as the motor neurone, glial cell and muscular fiber.

Charcot disease: In strong collaboration with physicians, we study pathologies related specifically to the motor neurone, such as the amyotrophic lateral sclerosis (ALS), an adult-onset neurological disorder also known as the Charcot disease. We aim to understand the fundamental mechanisms of these pathologies. In this context, the NMR-based metabolomics study on muscular tissue samples of mouse models of ALS indicates that NMR is suitable to follow the metabolic perturbations of muscular origin in these disease, and it would even be a rapid and reproducible technique for the evaluation of the putative benefits generated by therapeutics which are currently tested on humans.

Neurodegenerative diseases: This project aims to identify the mechanisms of neurodegeneration associated to the prion disease and Alzheimer. In these two pathologies, it is now well established that a modification of the functions of the cellular prion protein PrP (PrPc) by its pathogen prion forms or Ab peptides of Alzheimer is a key event of the neuropathogenesis associated to these diseases. The functional role of PrPc in the neurones remains enigmatic. The objective is to study PrPc knock-out cells, to better understand the role of the protein in the signalization or the control of the energetic metabolism.

Mots-Clés : NMR, cells, exposome, drugs, pollutants, neurodegenerative diseases, muscle, motor neurone

Molecular networking of MS/MS as a tool to target antiviral diterpenoids from Corsican Euphorbia

Mélissa Esposito^{1,2}, Louis-Félix Nothias-Scaglia^{1,2}, Pieter Leyssen³, Fanny Roussi¹, David Touboul¹, Jean Costa², Julien Paolini², Marc Litaudon¹

¹ Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – CNRS : UPR2301,
Avenue de la terrasse 91198 Gif sur Yvette cedex, France

² Laboratoire de chimie de produits naturels (CPN) – Université de Corse – 7 avenue Jean Nicoli, 20250 Corte, France

³ Rega Institute for Medical Research – KULeuven, Mindebroedersstraat, B3000 Leuven, Belgique

Recently, we showed that EtOAc extracts prepared from various parts of Euphorbia spp. exhibited significant and selective antiviral activity against chikungunya virus replication (CHIKV; Nothias-Scaglia et al, 2015a). Our previous works also demonstrated that various diterpene esters were endowed with antiviral properties, in particular anti-HIV and anti-CHIKV (Nothias-Scaglia et al, 2015b; Olivon et al, 2015; Márquez et al, 2008). Thus, an LC-MS/MS-based method was developed to investigate whether the anti-CHIKV activity found for the different EtOAc extracts could be associated with the presence of known antiviral diterpenoids (Nothias-Scaglia et al, 2015a). A preliminary chemical investigation of *E. pithyusa* ssp. *pithyusa* led to the isolation of dideoxyphorbol-, myrsinol-, and premyrsinol-ester derivatives. These diterpenoids and others were used as reference compounds in a MS/MS molecular network, which was built using diterpene-enriched fractions from whole plant EtOAc extracts of the latter, and a taxonomically close subspecies, *E. pithyusa* ssp. *cupanii*. LC-ESI-MS/MS analyzes were performed on a high-resolution mass spectrometer (Agilent QTOF 6540). GNPS web platform was used to generate MS/MS molecular networks (GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking, <http://gnps.ucsd.edu/>) and, results were visualized with Cytoscape software (Shannon et al, 2003).

In this study, the comparison of the molecular content of the two subspecies, *E. pithyusa* ssp. *pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii*, indicated that key clusters of secondary metabolites, among which various classes of diterpenoids, were detected in each species, and permitted to distinguish them unambiguously. The presence of putative new analogues of tiglane-, premyrsinane- and myrsinane-type diterpenoids, prompted us to carry out a structure-guided purification on the two extracts. Several new compounds were isolated and their antiviral properties against CHIKV replication evaluated.

References

- Nothias-Scaglia LF, Dumontet V, Neyts J, Roussi F, Costa J, Leyssen P, Litaudon M, Paolini J. LC-MS2-Based dereplication of Euphorbia extracts with anti-Chikungunya virus activity. *Fitoterapia* 2015a, 105: 202–209.
- Nothias-Scaglia LF, Pannecouque C, Renucci F, Delang L, Neyts J, Roussi F, Costa J, Leyssen P, Litaudon M, Paolini J. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J Nat Prod* 2015b, 78: 1277–1283.
- Olivon F, Palenzuela H, Girard-Valenciennes E, Neyts J, Pannecouque C, Roussi F, Grondin I, Leyssen P, Litaudon M. Antiviral Activity of Flexibilane and Tiglane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J Nat Prod* 2015, 78: 1119–1128
- Márquez N, A. Calzado M, Sánchez-Duffhues G, Pérez M, Minassi A, Pagani A, Appendino G, Díaz L, Muñoz-Fernández MA, Muñoz E. Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation. *Biochem Pharmacol* 2008, 75: 1370–1380
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang J T., Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003, 13: 2498–504.

Mots-Clés : molecular networking, MS/MS, Euphorbiaceae, Euphorbia pithyusa, diterpenoids, premyrsinane, myrsinane, tiglane, chikungunya.

P21

Influence des facteurs environnementaux et biologiques sur le métabolome musculaire du thon

**Aurélien Amiel^{1,2}, Edwin Fouché², Cécile Canlet¹, Marie Tremblay-Franco¹, Fany Sardenne^{2,3},
Laurent Debrauwer¹, Nathalie Bodin^{2,3}**

¹ *ToxAlim (ToxAlim) – INRA : UMR1331 – 180 chemin de tournefeuille, 31027 Toulouse, France*

² *MARine Biodiversity Exploitation and Conservation (MARBEC) – Institut de Recherche pour le Développement,
Avenue Jean Monnet 34203 Sète, France*

³ *MARine Biodiversity Exploitation and Conservation (MARBEC) – Fishing Port, Victoria, Mahé, Seychelles*

La pêche industrielle à la senne Européenne capture plus de 300 000 tonnes de thons tropicaux chaque année dans l'Océan Indien, dont la plupart est destinée à la conserverie. Cependant les rendements de la conserverie et la qualité de la chair de thon issue des boîtes de conserve varient significativement au cours de l'année, en particulier lors de la saison de pêche dans le canal du Mozambique. L'objectif du projet est d'étudier l'influence de paramètres externes (zone et saison de pêche), biologiques propres à l'espèce (taille, sexe, maturité, condition physiologique), et de stockage à bord du bateau (durée et mode de stockage, i.e. congélation à sec à -40°C ou immersion en saumure à -18°C) sur la composition biochimique (i.e. protéines, lipides, acides nucléiques, oligo-saccharides...) de la chair de thon.

Une étude métabolomique globale par RMN du proton a été réalisée sur les muscles blancs de 3 espèces majeures de thons tropicaux (Listao, Albacore et Patudo). Les données RMN obtenues à partir des extraits aqueux ont été analysées à l'aide de techniques statistiques multivariées, comme l'analyse en composantes principales (ACP) ou la PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis), permettant de séparer les groupes en fonction d'un ou plusieurs paramètres d'intérêt.

Les analyses PLS-DA permettent de mettre clairement en évidence des empreintes métaboliques spécifiques de l'espèce et de la taille des thons (Listao ; Albacore et Patudo 10kg). Pour chacune de ces 3 catégories, une augmentation significative d'ansérine/carnosine, hypoxanthine et de lactate est observée chez les poissons pêchés dans le canal du Mozambique par rapport à ceux pêchés dans le centre ouest de l'Océan Indien (Seychelles et Somalie). Dans la zone de pêche du canal du Mozambique, on observe chez les poissons de petite taille (Listao ; Albacore et Patudo < 10kg) une augmentation de choline et de phosphoéthanolamine tandis qu'aucune modification significative pour les poissons de grande taille (Albacore et Patudo > 10kg) n'est observée.

D'autre part, quelque soit l'espèce et la taille, la durée de stockage (inférieure / supérieure à 15 jours) a un impact sur le métabolome musculaire des thons, avec une augmentation significative d'inosine, d'hypoxanthine et d'acides aminés (valine, leucine, isoleucine, lysine et glutamate) chez les poissons stockés plus de 15 jours. Lors de stockage courts (inférieure à 15 jours) en immersion dans la saumure, on observe des faibles concentrations en inosine monophosphate et de fortes concentrations en inosine par rapport aux poissons congelés à sec.

L'approche métabolomique globale par RMN a permis de mettre en évidence des modifications majeures dans la concentration de certains marqueurs impliqués notamment dans le métabolisme énergétique, du stress, de la dégradation des phospholipides, et des acides aminés, en fonction des différents facteurs étudiés.

Mots-Clés : métabolomique, muscle blanc de thon, RMN, PLS-DA

Sparse methods for biomarker discovery in metabolomics studies

Baptiste Féraud¹, Bernadette Govaerts¹, Michel Verleysen², Carine Munaut³

¹ Institut de Statistique, Biostatistique et Sciences Actuarielles (ISBA) – Université Catholique de Louvain, Voie du Roman Pays 20, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgique

² Machine Learning Group (MLG) – Université Catholique de Louvain, Belgique

³ Laboratory of Tumor and Development Biology (GIGA-Cancer) – Université de Liège (ULg), Belgique

The predominance of partial least squares (-discriminant analysis), PLS(-DA), used to analyze metabolomics datasets, indeed it is the most well-known tool to perform classification and regression in the field of metabolomics, can be said to have led to the point that not all researchers are fully aware of alternative multivariate classification and regression algorithms. OPLS(-DA), an extension of PLS(-DA) which has proved to be very useful when interpretation is the main issue, is a more recent way to decompose the PLS solution into components correlated (predictive) to Y and components unique in X but uncorrelated (orthogonal) to Y. OPLS(-DA) is also well-known among the metabolomics community.

PLS and OPLS methods are useful and massively (exclusively?) used for classification and for biomarker identification. Indeed, the search for biomarkers remains a crucial issue in metabolomics studies and it is very important to most exactly possible target biomarkers or discriminating zones of interest. Most of the time, these methods are successful to do this job but a drawback can sometimes occur: too many points can be considered and proposed as potential biomarkers. However, for final users (in medical studies for instance), it can be advantageous to deal with only a small number of (very) significant and ideally easily interpretable biomarkers.

This drawback can be approached and filled via the use of sparse methods, with the objective to reinforce the more significant biomarkers and to force the nullity of the less significant biomarkers' coefficients (according to some LASSO-like penalties and to the LARS algorithm).

Three sparse solutions are taken into account currently in our laboratory:

- the sparse-PLS (sPLS) (Chun et al, 2010), an extension of PLS regression which promotes variable/feature selection (based on the spls and mixOmics R packages);

- A "Light sparse-OPLS" (L-sOPLS) approach (Van Gerven et al, 2010), in order to also take advantage of orthogonality. The idea here is to apply sparse algorithms (sPLS, Elastic Net and so on) on a decorrelated matrix X (deflated matrix which implies the removal of the Y-orthogonal component);

- and an Random Forests solution (Paul et al, 2015), based on highly interpretable decisions trees, which can class the importance of each points during the prediction of a binary Y and which can propose cutoffs to only select the more significant points as biomarkers.

Results will be shown principally on the basis of 1H-NMR spectra (detection of citrate and hippurate starting from urine of rats) but also on genomic q-PCR data.

Références

Chun et al *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.*, Vol.1, pp. 3-25, 2010

Van Gerven et al In *Benelux Conference on Artificial Intelligence*, 2010

Paul et al *Neurocomputing*, Vol.150, pp. 471-480, 2015

Mots-Clés : biomarker, sparse models, feature selection, (O)PLS, sparse (O)PLS, random forests

P23

Simultaneous analysis of the spatial and temporal response to wounding in *Arabidopsis thaliana* using multifactorial metabolomics and chemometrics

Julien Boccard, Serge Rudaz

*School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne,
Boulevard d'Yvoy 20, 1211 Geneva 4, Switzerland*

As a well-established model in plant biology, *Arabidopsis thaliana* constitutes an attractive basis for developing untargeted metabolomic approaches in plants. In that context, a metabolomic study mimicking herbivore attack was conducted to monitor the response of *A. thaliana* to wounding (Grata et al, 2008). A multifactorial experimental design composed of two factors, namely Distance with two levels (local and distal) and Time with a time-course monitoring based on cross-sectional data of four levels (1.5 h, 3 h, 6 h and 24 h), was carried out. A series of 64 individual plants were grown, harvested and extracted, and local leaves (damaged tissue) were collected separately from distal ones (undamaged tissue) at each time point. Plant extracts were analyzed using ultra-high pressure liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOF/MS). Such a study generates highly multivariate data including several sources of variation and their analysis remains a challenging task in metabolomics. The investigation of the two main effects of the factors Distance and Time, and their potential interaction (Distance \times Time) was carried out using a new chemometric tool dedicated to this type of experimental setup, namely ANOVA-Multiblock Orthogonal Partial Least Squares (AMOPLS; Boccard and Rudaz, 2016).

As a first step of analysis, the proportion of total variability due to the effects of the experimental conditions was computed as follows: Distance 8.2%, Time 16.6%, Distance \times Time 4.8% and Residuals 70.5%. The significance of the results was evaluated using random permutations and both main effects were deemed significant ($p < 0.0001$), while the interaction was found non-significant ($p < 0.6666$). AMOPLS scores and loadings associated with significant effects were further investigated, and tentative peak annotation was performed using expert knowledge and the AraCyc database. Local and distal leaves formed two clearly separated groups, in line with the massive local metabolic events occurring in the wounded tissue and the systemic synthesis of defense mediators. Local leaves were characterized by a marked accumulation of molecules from the oxylipin family related to the jasmonate pathway. The distal situation involving undamaged tissue was associated with the accumulation of Arabidopside A and metabolic precursors of the camalexin biosynthesis pathway. A clear distinction of the leaves collected after 24 h was observed, while more subtle differences between groups of plants collected earlier (1.5 h, 3 h and 6 h) were also highlighted. Metabolic patterns characterizing the first three harvest times (1.5 h, 3 h and 6 h) were predominantly associated with altered secondary metabolism including terpenoids and glucosinolates, whereas the last sampling point (24 h) was characterized by the presence of numerous mass features associated with tissue necrosis and chloroplast disruption.

These results are in accordance with current knowledge of *Arabidopsis* defense response and suggest a systemic increase in arabinosides levels due to wounding, together with a massive accumulation of active compounds in damaged tissue leading to tissue necrosis and chloroplast disruption. The AMOPLS algorithm was demonstrated as a relevant tool for the analysis of metabolomic data from multifactorial experiments with a simplified interpretation of signal variations related to significant effects.

References

- Grata et al, *Journal of Chromatography B*, 871 (2008) 261–270.
Boccard and Rudaz, *Analytica Chimica Acta*, 920 (2016) 18-28.

Mots-Clés : *Arabidopsis thaliana*, UHPLC, TOF/MS, experimental design, ANOVA, multiblock analysis, Orthogonal Partial Least Squares

P24

Prediction of retention time to help metabolite identification in reversed-phase liquid chromatography: Application to steroidomics

**Giuseppe Marco Randazzo¹, David Tonoli^{1,2,3}, Stéphanie Hambÿe¹, Davy Guillarme¹,
Fabienne Jeanneret^{1,2,3}, Alessandra Nurisso¹, Laura Goracci⁴,
Julien Boccard¹, Serge Rudaz^{1,2}**

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne,
Boulevard d'Yvoy 20, 1211 Geneva 4, Switzerland

² Swiss Centre for Applied Human Toxicology (SCAHT) – 20, Bd d'Yvoy - 1211 Geneva 4 - Switzerland

³ Human Protein Sciences Department, University of Geneva – Rue Michel-Servet 1 - 1211 Genève 4 - Switzerland

⁴ Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, University of Perugia – via Elce di Sotto, 8 - 06123 Perugia - Italy

The untargeted profiling of steroids, i.e. steroidomics, constitutes a growing research field because of their importance as biomarkers of endocrine disruption. New technologies in analytical chemistry, such as ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled with mass spectrometry (MS), offer today the possibility of a fast and sensitive analysis. Untargeted acquisition allows a wide range of putative steroids to be detected and automatically annotated based on their exact mass matched to databases (e.g. HMDB or LipidMaps). However, as often using "omics" strategies, the definite identification of steroids remains the main bottleneck when standards are not available. This is particularly true for isotopomeric compounds having the same exact mass but different molecular structures. The use of additional information is therefore mandatory for helping unambiguous identification and the prediction of retention time starting from the molecular structure constitutes a key element for that purpose [1]. Modelling retention in liquid chromatography is an active field of research both for theoretical and practical needs. It is experimentally established that in reversed-phase mode, the logarithm of the retention factor varies linearly with the percentage of organic modifier. These variations can be modelled by the linear solvent-strength model (LSS) that allows any retention times in any gradient conditions to be predicted using two parameters, i.e. Log kw and S.

In that context, quantitative structure retention relationship (QSRR) models based on the LSS theory were built using a dataset of 80 endogenous steroids. Retention times were acquired on an UHPLC-Q-TOFMS Xevo with a Cortecs C18 column using two linear gradients of 15 and 60 min. Three-dimensional in silico descriptors were computed using the VolSurf+ software to provide an extensive characterisation of the molecular structures. Additionally, a new Gonane Topological Weighted Fingerprint was developed to describe stereochemical information and subtle differences between chiral centers of steroid homologues. Two PLS regression models were computed to predict LSS parameters separately (Log kw and S), and the latter were then used to calculate retention times. Satisfactory performance was obtained during nested cross-validation with a predictive ability (Q₂) of 0.92. The generalisation ability of the model was further confirmed by an average error of 5% in external prediction.

QSRR modelling was demonstrated as a potent tool to predict the retention time of steroids under any gradient conditions. This allows the list of candidates associated with identical monoisotopic masses to be strongly reduced, facilitating definitive steroid identification. The additional advantage when predicting LSS parameters such as S and Log kw is to provide valuable information for optimising the isocratic separation of co-eluting analytes, including isotopomers.

Mots-Clés : retention time prediction, QSAR, LC, MS, steroidomics

UHPLC-HRMS steroidomic footprinting for in vitro endocrine disruptor evaluation

David Tonoli^{1,2,3}, Petra Strajhar⁴, Julien Boccard¹, Denis Hochstrasser⁵,
Fabienne Jeanneret^{2,5,6}, Alex Odermatt⁴, Serge Rudaz^{1,2}

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne,
Boulevard d'Yvoy 20, 1211 Geneva 4, Switzerland, Suisse

² Swiss Centre for Applied Human Toxicology (SCAHT) – 20, Bd d'Yvoy - 1211 Geneva 4 - Switzerland, Suisse

³ Human Protein Sciences Department, University of Geneva, Geneva, Switzerland
– Rue Michel-Servet 1 - 1211 Genève 4 - Switzerland, Suisse

⁴ Division of Molecular and Systems Toxicology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel, Basel,
Switzerland – Pharmacenter Klingelbergstrasse 50 CH-4056 Basel, Suisse

⁵ Department of Human Protein Sciences, Faculty of Medicine, University of Geneva,
1 rue Michel Servet 1211 Genève 4, Suisse

⁶ School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne,
Boulevard d'Yvoy 20, CH-1211 Geneva 4, Suisse

The development of efficient methods to screen chemicals and evaluate their potential effect on human steroidogenesis is pursued by regulatory agencies. This study presents the development of an untargeted steroidomic footprinting strategy based on UHPLC hyphenated to QTOFMS for the untargeted detection of steroids in human adrenal H295R cells culture media (Tonoli et al, 2015). This experimental setup was applied to the evaluation of triclocarban (TCC) toxicity, an antibacterial agent used in detergents, cosmetics and personal care products, and suspected to be an endocrine disruptor. H295R cells were incubated 48 h with solvent control (DMSO) or TCC at different concentrations (0.5, 1, 2.5, 5, and 10 μM ; n=5 for each condition). Due to the low concentrations exhibited in cells culture media, sample preparation using SPE HLB cartridges was devised to concentrate steroids in the most generic manner. Samples were then injected in ultra-high performance liquid chromatography coupled with high-resolution MS operated with an ESI source in positive mode.

Data filtering was performed by the selection of "steroid-like" compounds matching m/z values from an in-house curated database extracted from HMDB and Lipidmaps. Supervised OPLS modeling using Pareto scaling was carried out to highlight steroid alterations due to the addition of different amounts of TCC. A model with two latent variables (one predictive and one orthogonal) was obtained with high fit and prediction ability indices ($R^2Y=0.93$, $Q^2Y=0.91$). The corresponding S-Plot allowed a series of 50 candidate features to be selected, as the most promising steroid biomarkers of TCC toxicity. Among the 50 steroid-like compounds, 11 were identified with authentic chemical standard comparison. Among them, five high sensitive markers were identified as pregnenolone, progesterone, 17α -hydroxyprogesterone, 11-deoxycorticosterone, and DHEA. The results are fully in line with prior biological knowledge, as identified steroids correspond to upstream precursors in the steroidogenesis and are indicative of an early steroid biosynthesis disruption mechanism of TCC. The developed workflow, constitutes therefore a potent approach, to screen and classify an important number of potential endocrine disruptors in a straightforward manner.

References

Tonoli et al, Steroidomic footprinting based on ultra-high performance liquid chromatography coupled with qualitative and quantitative high-resolution mass spectrometry for the evaluation of endocrine disrupting chemicals in H295R cells. *Chemical Research in Toxicology* 28 (2015), 955–966.

Mots-Clés : high resolution mass spectrometry, steroidomics, H295R, endocrine disrupting chemical, triclocarban

P26

Développement d'une méthode de préconcentration SPE permettant l'identification de métabolites inconnus dans le plasma par UHPLC-HRMS

Laura Prouteau, Bernard Lyan, Stéphanie Durand, Estelle Pujos Guillot

Plateforme d'Exploration du Métabolisme (PFEM UNH) – INRA : UMR1019 – Unité de Nutrition Humaine UMR 1019 - Centre de Recherche Inra de Theix 63122 St Genès Champanelle, France

La métabolomique est un outil de phénotypage puissant en nutrition permettant de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans les processus physiopathologiques et d'identifier des biomarqueurs de déviations métaboliques. Cependant cette étape d'identification est devenue un challenge important en métabolomique et constitue un verrou analytique majeur, de par leurs diversités chimiques des métabolites présents dans les biofluides et leurs faibles concentrations. Dans ce contexte, le développement de méthodes de préconcentration est une nécessité pour pouvoir donner une signification physiologique aux profils différenciés que fournit l'analyse des données métabolomiques. Une étude préliminaire avait permis de montrer que parmi plusieurs techniques de préparation testées (SPME, SBSE et SLE), l'extraction SLE donnait les meilleurs résultats. Ce travail, qui constitue la suite du projet, a été consacré au développement de l'extraction SPE et sera par la suite comparé avec la méthode SLE préalablement testée.

Pour pouvoir répondre à ces objectifs, 19 molécules de propriétés physico-chimiques diverses (pKa, logP, ...) et mimant un échantillon biologique ont été sélectionnées parmi des acides aminés, des acides organiques, des hormones... Une injection de ce mélange en chromatographie semi-préparative a été réalisée afin de séparer et de collecter nos composés en plusieurs fractions. Ensuite, une extraction sur phase solide SPE a été développée pour pré concentrer ces fractions à l'aide d'un robot Freedom Evo 200 (Técan). Enfin, une analyse en mode scan sur une chaîne UHPLC Ultimate 3000 couplée à un spectromètre de masse haute résolution LTQ Orbitrap Vélos (Thermo Scientific) est réalisée afin d'évaluer les performances de la pré concentration mise en jeu.

Lors de l'étape d'optimisation, la colonne semi-préparative, les cartouches SPE ainsi que les différents paramètres d'extraction (volume d'échantillon, volume et solvants de lavage, volume et solvants d'élution et le temps de séchage) ont été optimisés de sorte à obtenir les intensités les plus importantes pour un maximum de composés. Les premiers résultats obtenus montrent clairement que la cartouche SPE Oasis MCX 30mg 1 mL (Waters) est la plus performante. En effet, elle permet d'extraire, à partir de fractions chromatographiques collectées, à la fois les composés polaires et basiques mais également les composés neutres. Celle-ci est donc la cartouche de choix pour la suite de l'optimisation.

Pour conclure, cette technique sera ensuite utilisée sur ces extraits concentrés en vue de réaliser des analyses structurales de potentiels biomarqueurs, pour aider à la caractérisation et à l'identification de nouveaux métabolites dans des échantillons biologiques.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : préconcentration, plasma, métabolites, LC-MS

A galaxy workflow for metabolomic NMR data pre-processing

Marie Tremblay-Franco¹, Marion Landi², Mishari Monsoor³, Franck Giacomoni², Rémi Servien⁴, Patrick Tardivel⁴, Christophe Duperier², Gildas Le Corguille³, Christophe Caron⁵, Etienne A. Thévenot⁶, Cécile Canlet¹

¹ INRA ToxAlim AXIOM Metatoul Metabohub – INRA : UMR1331 – 180 chemin de tournefeuille, 31027 Toulouse, France

² INRA PFEM MetaboHUB – INRA : UMR1019 – Saint Genes Champagnelle, France

³ CNRS-UPMC ABiMS – CNRS : UMR2424 – Roscoff, France

⁴ INRA ToxAlim PPM – INRA : UMR1331 – Toulouse, France

⁵ INRA INGENUM – INRA – Rennes, France

⁶ CEA, LIST, Laboratoire Analyse de Données et Intelligence des Systèmes, MetaboHUB, Digiteo Saclay F-91191 Gif-sur-Yvette, Cedex, France

High-throughput technologies such as Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS) or Nuclear Magnetic Resonance (NMR) generate huge amounts of data. These call for high-performance and user-friendly analysis tools for experimenters. We have recently developed Workflow4Metabolomics (W4M) (Giacomoni et al, 2015; Monsoor et al, 2014), a virtual research environment (VRE) built upon the Galaxy web-based platform technology. W4M (<http://workflow4metabolomics.org/>) currently contains pre-processing tools for LC-MS metabolomics data. In this work, we describe new modules for NMR data pre-processing (bucketing and normalization steps) and annotation.

First, we developed scripts written in R language for each pre-processing step. The first module performs fixed-size bucketing and peak integration. The trapezoid method was used to compute the area under the curve in each bucket. The second module offers several methods for the normalization of profiles, including Probabilistic Quotient Normalization (Dieterle et al, 2006) and normalization by the total intensity, or by a quantitative variable provided by the user (eg, weight, osmolality). Second, we validated these functions on a dataset consisting of 44 samples from a study addressing the toxicity of bisphenol A in the mouse (Cabaton et al, 2013). The samples were analyzed on a Bruker DRX-600 Avance NMR spectrometer operating at 600.13 MHz for 1H resonance frequency. The raw spectra were Fourier transformed, phase and baseline corrected, and calibrated using the manufacturer software. The spectra were then binned and normalized using our tools, and the results were compared with the commercial software AMIX V3.9.11 (Bruker, Rheinstetten, Germany). Third, we integrated the two modules into W4M. A web interface with a whole of parameters was designed for each R function. In addition, the dataset is publicly shared on W4M and can be used for training.

An annotation algorithm is currently being developed: this algorithm is being validated using mix of known standards (e.g. synthesis urine, NIST plasma).

Our modules thus provide new pre-processing functionalities for NMR spectra on W4M, which can be further combined with the existing statistical modules. Discriminant metabolites can finally be annotated with the annotation module.

References

Giacomoni et al, 2015. *Bioinformatics*

Mansoor et al, 2014. *Galaxy Community Conference*, Baltimore, MD, USA

Dieterle et al, 2006. *Analytical Chemistry*, 78(13): 4281-4290.

Cabaton et al, 2013. *Environ Health Perspect* 121: 586-593.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : NMR preprocessing, Galaxy

P28

Design of non-conventional specialty yeast naturally enriched in sulfur neutraceutical for health benefits

Dominique Swennen¹, Pascale Lieben¹, Brigitte Pollet¹, Pascal Bonnarne¹,
Jean-Marie Beckerich¹, Sophie Landaud²

¹ INRA – 78850 Thiverval Grignon, France

² AgroParisTech (AgroParisTech) –UP1102, INRA – 78850 Thiverval-Grignon, France

Yeasts are considered as potential therapeutic supplements for the production of specific molecules with a better bioavailability. Consequently, a major concern is to study target molecules naturally produced by yeast and recognized for their preventive role in health disorders. Because of its preventive role against retinal neurodegeneration, as found in age-related eye diseases, and owing to our expertise in sulfur metabolism in yeast, we believe that taurine is the key target molecule. In this context, we have studied the capacity of a non-conventional yeast, *Yarrowia lipolytica*, to be used as food ingredient, using its fitness to bio-generate taurine. Indeed, unlike *S. cerevisiae*, this yeast has taurine metabolic pathways, being more similar to mammals in some aspects. Consequently, different culture conditions, such as substrate feeding, oxidative stress, were evaluated for their effects on taurine and its precursor's accumulation (cysteine, hypotaurine, cystathionine). Targeted metabolomics were realized by LC-HRMS analysis, to study taurine metabolism and to drive metabolic flux. The final objective will be to formulate foods with these ingredients for target populations.

Mots-Clés : non-conventional yeast, neutraceutical, sulfur compound, taurine, LC-HRMS, bio-process, ophthalmology

In depth metabolome investigation of a multi-herb formula used in Traditional Chinese Medicine

Joëlle Houriet¹, Emerson Ferreira Queiroz¹, Pierre-Marie Allard¹, Lennie Vallin¹, Songhua Li², Ruwei Wang³, Laurence Marcourt¹, Kenny Kuchta⁴, Jean-Luc Wolfender¹

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, Quai Ernest-Ansermet 30, 1211 Geneva 4, Switzerland

² Medical Corporation Soujikai, Chuo-ku, Hirano 2-2-2, 541-0046 Osaka, Japan

³ Zhejiang CONBA Pharmaceutical & Drug Research Development Corporation, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

⁴ National Institute of Health Sciences, Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, Setagaya-ku, Kamiyoga 1-18-1, 158-8501 Tokyo, Japan

In Traditional Chinese Medicine (TCM), the preparations consist generally in a mixture of several herbs. The quality control for such a multi-herb mixture is challenging because every single herb already contains hundreds of constituents. The aim of this work was to design an innovative strategy for a comprehensive and rational standardisation. It is based on an in depth high resolution metabolite profiling of the TCM formula, localisation of chemical markers by data mining and targeted preparative isolation of standards directly from the complex TCM mixture. The TCM selected for this study is used to treat atopic dermatitis (atopic eczema), a common inflammatory skin disorder, treated in Western medicine by topical corticosteroids and emollients (Dempster et al, 2011). Recently, an open label clinical study showed the efficacy of this new TCM formula based on a mixture of ten herbs (Li et al, 2013).

For this investigation, the TCM formula and all single plant extracts were analysed by UHPLC-PDA-ELSD-HRMS. Since the UHPLC-HRMS metabolite fingerprints of all crude extracts allow the detection of several thousand m/z features, a strategy was elaborated to filter all this information and select key biomarkers for further quality control studies. Peak picking was performed on all single plants and on the TCM formula extracts. A differential analysis of the highlighted features provided an efficient way to correlate them to each herb in the mixture. ELSD detection was used as a filter for a selection of the more abundant markers of each plant. The marker were dereplicated using a combination of HRMS molecular formula assignment and of data dependant MS/MS interpretation based on molecular network and in silico fragmentation (Allard et al, 2016). These different steps allowed an in depth metabolome characterisation of the TCM and provided all the necessary data for a selected isolation of specific markers for standardisation.

For a rational and rapid isolation, the TCM formula was fractionated after an enrichment procedure at large scale by MPLC. For this, the analytical HPLC-PDA-ELSD conditions were transferred geometrically to the preparative MPLC-UV-ELSD using chromatographic calculations, ensuring the same selectivity at both scales (Challal et al, 2015). At-line high throughput UHPLC fingerprint of all fractions merged in a MPLCxUHPLC plot enabled the localisation and further purification of the target markers. This provided all the necessary information for the development of the quality control method that could thus efficiently take into consideration the complexity of the multi-herb preparation and give a rational for standardisation.

References:

Dempster J, Jani B, Daly T (2011) Managing eczema in children--a treatment update. *J Fam Pract* 60: 660-668.

Li S, Kuchta K, Tamaru N, Lin Y, Iwasaki S, et al. (2013) Efficacy of a novel herbal multicomponent traditional Chinese medicine therapy approach in patients with atopic dermatitis. *Forsch Komplementmed* 20: 189-196.

Allard P-M, Peresse T, Bisson J, Gindro K, Marcourt L, et al. (2016) Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Anal Chem* 88: 3317-3323.

Challal S, Queiroz EF, Debrus B, Kloeti W, Guillarme D, et al. (2015) Rational and Efficient Preparative Isolation of Natural Products by MPLC-UV-ELSD based on HPLC to MPLC Gradient Transfer. *Planta Med*: Ahead of Print.

Mots-Clés : UHPLC-PDA-ELSD-HRMS, multi-herb quality control, standardisation, Traditional Chinese Medicine, dereplication, molecular network

P30

Synthèse d'un aluminosilicate et élimination des polluants

Mohamed Amin Khedim

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem – BP 188/227 Mostaganem 27000 Algérie

L'utilisation de métaux lourds est indispensable dans de nombreuses branches et applications de l'industrie. Cette pratique pose un problème car en raison de leur toxicité parfois élevée pour l'être humain et les animaux, des limites extrêmement strictes doivent être observées pour la concentration de métaux lourds dans les eaux polluées, une étude expérimentale a été entreprise pour l'élimination des métaux lourds Cadmium et Zinc prisent séparément et en mélange pour des solutions synthétiques par un aluminosilicate cristallin (zéolithe NaX synthétisée au laboratoire à partir des produits pur par la méthode de synthèse directe et qui présente un taux de cristallisation 92,64 %).

L'expérience est réalisée en système discontinu et continu pour différentes masses de zéolithe, une température de 25°C et 30°C, un suivi de l'évolution de pH avant et après élimination.

Mots-Clés : zéolithe, élimination, métaux, eaux usées

P31

Recherche de marqueurs biochimiques de l'adaptabilité des caféiers Arabica aux modifications environnementales

Ialy Rojo Vestalys

*Institut de Recherche pour le Développement (IRD) – Institut de Recherche pour le Développement,
Le Sextant 44, bd de Dunkerque, CS 90009 13572 Marseille cedex 02, France*

Sur le continent américain, dans les zones traditionnelles de culture du café Arabica (*Coffea arabica*), le changement climatique se traduit plus particulièrement par une hausse des températures moyennes. Cette modification climatologique impacte les cultures de basse et moyenne altitude en favorisant le développement de maladies telles que la rouille orangée, ce qui provoque des perturbations dans la physiologie et la phénologie des caféiers. Les rendements des plantations, pour la plupart établies avec des variétés sélectionnées sur des critères de productivité et de qualité organoleptique du café mais non de résistance, sont alors fortement diminués. Pour garantir le maintien à moyen terme de la culture de l'Arabica en Amérique, il devient donc urgent de sélectionner des variétés qui présenteraient une bonne adaptabilité aux changements de conditions environnementales tout en conservant d'excellents critères de production et de qualité. Connaissant le rôle important joué par les métabolites secondaires, et tout particulièrement les composés phénoliques, dans les processus d'adaptation des plantes à leur environnement, ces composés ont été ciblés dans cette étude comme marqueurs biochimiques potentiels de l'adaptabilité d'Arabica.

Les feuilles constituant la partie de la plante en relation directe et constante avec la source énergétique, la radiation solaire, et les variations environnementales, nous nous sommes intéressés à l'analyse du contenu phénolique de feuilles d'une même variété, *C. arabica* var. *Marsellesa*, cultivée au Mexique sur des parcelles proches mais à trois altitudes contrastées (700, 1050, 1250m), dans des conditions d'ombrage (50%) ou de plein soleil. Ce dispositif permet d'obtenir un gradient de température tout en apportant d'autres modifications climatiques (sécheresse, quantité et qualité de lumière).

Pour chaque condition, le profil des composés phénoliques accumulés dans des feuilles matures a été établi sur la base d'évaluations par HPLC (phase inverse) associées à des analyses en LC-MS (flavonoïdes, acides chlorogéniques, xanthones). Il est mis en relation avec des données phénotypiques et sera complété par l'étude de l'accumulation des produits de la photosynthèse (sucres et amidon) pour mieux caractériser la fitness.

Les premiers résultats montrent que le profil phénotypique varie plus en fonction de l'altitude que de la quantité de lumière reçue. Il en est de même pour les caractéristiques biochimiques. Les différences les plus marquées sont observées pour les plantes cultivées dans la zone chaude et sèche de basse altitude. Alors que certains flavonoïdes tels que la rutine sont plus fortement accumulés à l'altitude la plus élevée (températures plus basses et forte humidité, plus d'UVB mais plus faible ensoleillement), la majorité des composés phénoliques (xanthones, catéchines, acides chlorogéniques) est plus fortement concentrée dans les feuilles de caféiers cultivés à basse altitude.

Cette première analyse semble montrer que les composés phénoliques pourraient constituer de bons indicateurs de la réponse des caféiers aux conditions climatiques. Associés aux données climatiques, phénotypiques et photosynthétiques, ces résultats devraient permettre de caractériser l'état physiologique des plantes sous les différents climats et d'identifier les marqueurs d'adaptabilité les plus pertinents.

Mots-Clés : changement climatique, caféier, composés phénoliques, marqueurs, adaptation

EMERODE: nuclEar MagnEtic Resonance prOfiles DatabasE

**Marie Lefebvre^{1,2}, Mickaël Maucourt^{3,4}, Annick Moing^{1,2}, Dominique Rolin^{3,4},
Daniel Jacob^{1,2}, Catherine Deborde^{1,2}**

¹ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – INRA : UMR1332 – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

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

³ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – Université de Bordeaux – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

⁴ Université de Bordeaux, UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie – 71 av Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

NMR metabolomics has found a growing interest over the last 17-years with applications in a broad range of domains, from human health to environmental sciences. Rapidly, a need to get a collection of chemical shifts of metabolites of interest at biological pH was emerging. An initiative started in early 2000, the NMR metabolomics database of Linköping in Sweden, which developed a database containing such lists of chemical shifts along with biological sources and NMR acquisition details, extracted from 25 published works (MDL). In sync with the needs of the metabolomics community, several metabolomics databases have been developed and now provide experimental NMR spectral data of reference compounds (HMDB, BMRB, MMCD, PRIME, MeRyB, and recently PeakForest) specialized or species targeted, e.g. human for HMDB; MeRy-B for plant metabolomics. None of them shows experimental NMR spectra of biological matrices, except MeRyB. The NIST website provides one HSQC NMR profile of the standardized human plasma (SRM1950).

Bordeaux Metabolome Facility is used for the acquisition and interpretation of metabolic profiles of plant, animal, microbe or fungi matrices, depending on the factors under study. So far, it gathered about 90 different profiles (NMR spectra and annotations of known and unknown compounds) archived on paper. Their exploitation for new annotations remains challenging and arduous for analysts. Therefore it is necessary to visualize, organize and capitalise on these knowledge that is why EMERODE (nuclEar MagnEtic Resonance prOfiles DatabasE), a database and its dedicated web interface, was initiated in order to meet this in-house need. This database will store the profiles described with a minimum of essential information to characterize them. The dedicated interface will allow (i) loading easily NMR spectra and their annotations, (ii) browsing for matrix profiles according to different filters, (iii) viewing and interacting with NMR spectrum, (iv) annotating/modifying 1D-NMR profiles. The interactive visualization of the spectrum is realized with a new tool, the Spectra Browser based on the SpeckTackle library (Beisken et al, 2015). Annotation will be projected in the form of symbols on a display panel across the spectrum, and positioned beneath it. The identified metabolites will be linked to corresponding compounds in other databases (HMDB, ChEBI), and PeakForest, developed under MetaboHUB project, where a part of the compound spectra was acquired under the same preparation and acquisition conditions. Thus, each new annotation will enhance the database itself for further annotations. The perspective of EMERODE is to grow and to be one of the largest experimental biological 1D-NMR profiles database with the contribution of MetaboHUB and beyond.

References

MDL, The Magnetic Resonance Metabolomics Database, ESMRMB, Basel, Switzerland 2005.
<http://www.liu.se/hu/mdl/main/>

HMDB, *Nucleic Acids Res.* 35:D521-6, 2007. <http://www.hmdb.ca>

BMRB, *Nucleic Acids Res.* 36:D402-D408, 2008. <http://www.bmrwisc.edu/>

MMCD, *Nat Biotech.* 26:162, 2008. <http://mmcd.nmrfam.wisc.edu/>

PRIME, *In Silico Biol.* 8, 2008. http://prime.psc.riken.jp/?action=nmr_search

MeRyB, *BMC Plant Biology*, 11:104, 2011. <http://www.bit.ly/meryb>

PeakForest, 9 JS RFMF, Lille, France 2015. <http://www.peakforest.org>

NIST, 4 zooms of HSQC spectrum. http://srm1950.nist.gov/nmr.php_2013

Beisken et al, *J Cheminform.* 7:17 2015

ChEBI, *Nucleic Acids Res.*, 2006. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : metabolomic, NMR, database, annotation, visualization

**Analyse métabolomique LC-HRMS de foies de rats
exposés in-utero au Bisphénol A**

**Emilien Jamin^{1,2}, Jean-François Martin^{1,2}, Aurélien Amiel^{1,2}, Djawed Bennouna^{1,2},
Laurent Debrauwer^{1,2}, Nicolas Cabaton¹, Sergio Polakof³, Daniel Zalko¹**

¹ Toxalim, Université de Toulouse, INRA – UMR1331 – 180 Chemin de tournefeuille 31300 Toulouse, France

² Plateforme MetaToul-AXIOM-MetaboHUB – INRA – 180 Chemin de Tournefeuille 31300 Toulouse, France

³ INRA UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, UNH, CRNH Auvergne – 63122 St Genès Champanelle, France

La période périnatale est une étape clef du développement, pendant laquelle l'exposition à des facteurs environnementaux et/ou alimentaires peut avoir des conséquences à long terme sur la santé. Parmi les xénobiotiques pour lesquels de tels effets sont suspectés, on retrouve le bisphénol A (BPA) utilisé entre autres pour la synthèse de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. Le BPA est un xéno-œstrogène avéré, suspecté comme d'autres contaminants oestrogéniques, de jouer un rôle dans le développement du syndrome métabolique, une pathologie aux origines multi-factorielles. Le projet EXAMET explore chez le rat Sprague-Dawley les effets combinés de l'alimentation : régime Normal Fat (NF) versus régime High Fat (HF), et du BPA (exposition maternelle à de faibles doses de BPA : 0 ; 0,05 et 5 µg/kg pc/j) sur la survenue du syndrome métabolique en génération F1. L'exposition des mères au BPA durant la période périnatale a été prolongée pour la génération F1, après sevrage, par le suivi métabolique à nouveau sous conditions de régime NF versus HF. Parmi les partenaires de ce projet, la plateforme MetaToul-AXIOM-MetaboHUB de l'unité de toxicologie alimentaire de l'INRA est notamment en charge de l'analyse d'échantillons de foies de rat par une approche de métabolomique globale par spectrométrie de masse haute résolution. Les échantillons sont issus de rats mâles sacrifiés 142 jours après la naissance et nourris après sevrage avec un régime HF ou NF. Ces rats proviennent de mères exposées ou pas au BPA (0 ; 0,05 et 5 µg/kg pc/j), elles-mêmes nourries avec un régime NF ou HF pendant la gestation et la lactation, soit 6 scénarios différents, et 12 groupes au total en tenant compte des 2 modalités d'alimentation post-sevrage. Des extraits aqueux des foies ont été analysés par chromatographie ultra haute performance en phase inverse couplée par une source d'ionisation Electrospray à un spectromètre de masse haute résolution Orbitrap. Les données brutes obtenues en mode positif et négatif ont été pré-traitées à l'aide de XCMS. Parmi les scénarios expérimentaux étudiés, 4 modèles statistiques robustes ont été obtenus par OSC-PLS-DA, permettant une discrimination selon le régime maternel et en fonction de la dose de BPA, ainsi que selon le régime post-sevrage des rats, également en fonction de la dose d'exposition des mères au BPA. Ces 4 modèles sont expliqués par environ 1500 variables, qui ont été annotées à l'aide de CAMERA sous R dans un premier temps, puis manuellement dans un second temps. L'identification des métabolites correspondant à ces 1500 variables discriminantes a enfin été menée par MS/MS à l'aide de notre base de données interne, construite dans le cadre du projet MetaboHub (MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010). A ce jour, 47 métabolites ont été identifiés en mode positif et 34 en mode négatif. Les autres métabolites discriminants correspondent à des peptides ou des composés non identifiés à ce stade de l'étude.

Mots-Clés : bisphenol A, toxicologie, nutrition, HRMS

**Characterization of a plant cell suspension culture of *Vitis vinifera*:
biomass composition assessment before C13-metabolic flux analysis**

Angela Machado-Vieira¹, Stéphanie Cluzet², Catherine Deborde^{1,3}, Ghislaine Hilbert⁴, Annick Moing^{1,3}, Sophie Colombie¹, Bertrand Beauvoit¹, Daniel Jacob^{1,3}, Yves Gibon^{1,3}, Serge Delrot⁴, Tristan Richard², Eric Gomès⁴, Martine Dieuaide-Nouhban¹

¹ BFP, INRA, Université de Bordeaux (Biologie du Fruit et Pathologie),
71 av Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

² Oenologie, Bordeaux Sciences Agro, INRA, Université de Bordeaux – ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France

³ Plateforme Métabolome Bordeaux (PMB-MetaboHUB) – Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine,
IBVM, CS 20032, 33 140 Villenave d'Ornon, France

⁴ EGFV, Bordeaux Sciences Agro, INRA, Université de Bordeaux (Ecologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne),
INRA : UMR1287 – ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France

In plant organs, anthocyanin accumulation is influenced by the genotype, environmental factors and nutrient supply (Keller, 2010). High sugar and/or low nitrogen supply stimulate anthocyanin production in berry skin cells of red grape varieties (Hilbert and Gaudillère, 2003) through the activation of the structural and regulatory genes involved in anthocyanin biosynthesis (Soubeyrand et al, 2014). The present work aims at determining metabolic fluxes involved in the response of anthocyanin accumulation to changes in nitrogen supply, using a cell suspension model.

Cell suspension cultures of *V. vinifera* L. cv. Gamay Fréaux var. Teinturier (GT3) were grown and maintained on a modified Gamborg B5 medium (Decendit and Mérillon, 1996), with two levels of nitrogen supply (5 or 25 mM) and either sucrose or glucose as sugar source. A minimum of 3 biological growth replicates (50 mL) were performed for each medium in 250 mL Erlenmeyer flasks. Cell growth (fresh weight and dry weight) and respiration rates were measured throughout the culture. Medium culture and cell biomass were analyzed by coupling enzymatic and colorimetric assays and 1H-NMR profiling for metabolite determination and quantification. NMR quantification results were obtained by means of ERETIC2 module of TopSpin (Bruker) and NMRProcFlow web tool (www.nmrprocflow.org).

The first results of this *V. vinifera* cell suspension growth characterization show us that after a one-day lag, the cells grow exponentially until day 6 with a constant respiration, which indicates their metabolic steady state. Independently of the carbon source, the decrease in nitrogen supply increased anthocyanin content by 5 and led to the accumulation of carbon as starch, glucose and sucrose; meanwhile, the protein content was not affected.

The ultimate goal of this project is to determine metabolic fluxes by carbon-13 labelling experiments. The data obtained in this project will allow gaining insight into the interactions between primary and specialized metabolism of a cell suspension culture of *Vitis vinifera*.

References

Decendit A, Mérillon J-M (1996) Condensed tannin and anthocyanin in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 15:762-765

Hilbert G, et al. (2003) Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. *Merlot*. *Vitis* 42: 69-76.

Soubeyrand E, et al. (2014) Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry* 103: 38-49

Acknowledgments: FR BIE 2016, MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010), PHENOME (ANR-11-INBS-0012)

Mots-Clés : carbon allocation, central metabolism, secondary metabolism, nitrogen starvation, metabolic flux modelling, grape berry

Développement d'une méthode d'extraction pour l'analyse métabolomique non ciblée par RMN du lait de vache

Bénédict Yanibada¹, Hamid Boudra¹, Diego Morgavi¹, Laurent Debrauwer², Roselyne Gautier², Marie Tremblay-Franco², Cécile Canlet²

¹ *Unité de Recherches sur les Herbivores (HERBIVORES) – INRA : UR1213 – Site de Theix F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

² *INRA Toxalim Axiom platform Metatoul Metabohub – INRA : UMR1331 – Toulouse, France*

Le méthane est un puissant gaz à effet de serre produit par les ruminants, qui constitue une perte en énergie pour l'animal de 6 à 8%. Actuellement, les mesures de méthane sont réalisées en chambre respiratoire ou par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un gaz traceur (SF₆). Ces méthodes sont efficaces, mais ne sont pas applicables à grande échelle. La recherche de marqueurs de la production de méthane dans des matrices non invasives telles que le lait pourrait représenter une alternative intéressante. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de développer une méthode d'analyse métabolomique par RMN non ciblée pour la recherche de marqueurs polaires de production de méthane à partir du lait de vache.

Dans un premier temps, 8 méthodes de préparation d'échantillons ont été testées pour leur capacité à fournir une empreinte métabolique riche et reproductible : une analyse directe des échantillons de lait, 4 méthodes d'extraction "mécaniques" (physiques) : l'écémage, l'ultrafiltration, la combinaison de ces deux opérations et enfin l'ultracentrifugation ; et 3 méthodes d'extraction liquide-liquide (chimiques) utilisant le méthanol, le dichlorométhane et l'extraction de type Folch (Méthanol/eau/dichlorométhane). Les différents extraits ont été analysés sur un spectromètre opérant à une fréquence de 600.13 MHz. L'acquisition des spectres proton 1D a été réalisée grâce à une séquence d'impulsion Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), permettant d'éliminer le signal des macromolécules. Les spectres RMN ont été traités et découpés en buckets. Les différentes méthodes d'extraction du lait ont été évaluées selon les critères suivants : (1) la qualité visuelle des spectres focalisée sur la présence ou l'absence de signaux larges de macromolécules qui pourraient masquer les pics fins et résolus de petites molécules ; (2) La reproductibilité, basée sur la proximité des répliqués d'une méthode donnée sur la base d'une analyse en composante principale (ACP) ; (3) L'efficacité, définie par la capacité d'une méthode à extraire un métabolite donné ; et (4) le rendement d'extraction déterminé sur 6 métabolites qui couvrent la gamme spectrale et donnent des signaux spécifiques (acide hippurique, glycerophosphocholine, créatine, acide citrique, acide glutamique et acide lactique) présents dans le lait à des concentrations connues.

Une première analyse basée sur la qualité des spectres a permis d'écarter l'analyse directe, l'ultracentrifugation et l'écémage. Le calcul de la reproductibilité des 5 méthodes restantes a permis de montrer que l'écémage associé à l'ultrafiltration et l'extraction au méthanol donnaient les meilleurs résultats pour ce critère. Le calcul de l'efficacité d'extraction a montré que l'extraction de type Folch et secondairement l'extraction au méthanol présentaient les meilleures capacités d'extraction. Au vu de l'ensemble de ces résultats et en tenant compte de la simplicité de la préparation des échantillons, l'écémage associé à l'ultrafiltration et l'extraction au méthanol ont été retenus pour le calcul du rendement d'extraction des 6 métabolites ajoutés dans le lait. L'extraction au méthanol a montré le meilleur taux de récupération de ces métabolites. En conclusion, l'extraction au méthanol a été retenue pour l'analyse des métabolites polaires du lait.

Mots-Clés : ruminants, méthane, biomarqueurs, lait, RMN, métabolomique

Développement d'une approche pharmacométabolomique pour l'étude de la polarisation des macrophages pulmonaires humains

Nicolas Fabresse^{1,2}, Marion Brollo³, Isabelle Etting^{1,2}, Emmanuel Naline^{3,4},
Jean-Claude Alvarez^{1,2}, Philippe Devillier^{3,4}, Stanislas Grassin Delyle^{1,4}

¹ Plateforme de spectrométrie de masse MasSpecLab, INSERM U1173, UFR Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles - Saint Quentin en Yvelines – 2, avenue de la source de la Bièvre, 78180, Montigny le Bretonneux, France

² Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Hôpital Raymond Poincaré, Assistance publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP) – 104 boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

³ UPRES EA220, Hôpital Foch – Hôpital Foch – 11 rue Guillaume Lenoir, 92150 Suresnes, France

⁴ Pôle des maladies respiratoires, Hôpital Foch – 40 rue Worth, 92150 Suresnes, France

Rationnel : Dans le compartiment pulmonaire, les macrophages sont la plus abondante population de cellules immunitaires et sont retrouvés au niveau alvéolaire, interstitiel ou intravasculaire. Ils y jouent des rôles dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, particulièrement un rôle protecteur et de défense contre les pathogènes et particules inhalés, mais sont aussi impliqués dans le développement des maladies inflammatoires des voies aériennes comme l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive. Comme d'autres types de macrophages, ils sont susceptibles de subir une différenciation phénotypique et d'acquérir un phénotype M1 proinflammatoire ou M2 immunomodulateur, caractérisés par des profils distincts de production de cytokines ou d'expression de protéines membranaires. Le but de cette étude était de réaliser une caractérisation des altérations du métabolome au décours de la polarisation M1/M2 des macrophages pulmonaires humains.

Méthodes : Les tissus pulmonaires humains ont été obtenus sur des parties macroscopiquement saines de pièces opératoires de poumons de patients opérés pour cancer bronchopulmonaire. Les macrophages pulmonaires ont été isolés et cultivés selon une technique préalablement décrite et stimulés par du LPS (10 ng.mL⁻¹) ou de l'IL-4 (10 ng.mL⁻¹) pendant 24h pour induire la différenciation vers un phénotype M1 (LPS) ou M2 (IL-4). Après extraction liquide/liquide des surnageants de culture par un mélange méthanol/eau/chloroforme (25/25/50), l'analyse métabolomique a été conduite par chromatographie liquide par interactions hydrophiles couplée à un spectromètre de masse haute résolution (Q-Exactive) en mode positif. L'analyse des données a été conduite avec Worflow4metabolomics.

Résultats : 16724 ions ont été identifiés lors de l'analyse préliminaire. Après groupement des pics des isotopes et des adduits, normalisation de la quantité de cellules et application des filtres, 3942 ions ont été conservés. L'analyse par composantes principales n'a pas permis de discriminer les conditions expérimentales et les outils de découverte de signature moléculaire n'ont pas permis d'identifier d'ion d'intérêt. En revanche, l'analyse ANOVA appariée a permis de mettre en évidence 42 métabolites différentiellement exprimés entre les macrophages traités par le LPS ou l'IL-4 et les témoins. Après analyse des spectres MS2, l'annotation de ces 42 métabolites suggère une modulation de l'expression des métabolites de la voie de synthèse de la tyrosine (enol-phenylpyruvate, indole-5,6-quinone), des acides aminés (leucine et tyrosine), des acides organiques (acide benzóiques) et des dérivés de vitamines (pyridoxal) au cours de la polarisation M1/M2 des macrophages pulmonaires humains.

Conclusion : Nous avons développé une méthode LC-HRMS adaptée pour l'étude de la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Les résultats de cette étude pharmacométabolomique suggèrent des différences dans la composition du métabolome des surnageants de macrophages cultivés en présence de LPS ou d'IL-4.

Mots-Clés : pharmacométabolomique, macrophages pulmonaires, polarisation, LC-HRMS

Metabolite profiling of the three areas of *Pseudotsuga menziesii* wood

**Henri Mbakidi-Ngouaby, Marion Millot, Emilie Pinault, Vincent Gloagen,
Guy Costa, Vincent Sol, Lengo Mambu**

*Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) – Université de Limoges : EA1069,
Faculté des Sciences et Techniques, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France*

Pseudotsuga menziesii (Mirb) Franco, called Douglas fir or Oregon pine, is a species of Pinaceae family, native to North America. It was introduced in Europe in the nineteenth century from poorly documented genotypes. In France, this species was introduced before 1850, but its plantations have really developed after World War II as part of reforestation programs¹. Its heartwood has the ability to resist to attacks caused by pathogens due to the presence of metabolites which display antioxidant, antifungal and insecticide activities^{2,3}. Chemical markers present in the three areas of its wood, namely sapwood, transition zone and heartwood were identified. In the meantime, their metabolic profiles were compared in order to establish a correlation between the presence of metabolites and genotype of trees. Wood sample was ground to a fine powder. The extraction was carried out by solvents of increasing polarity and the mixture acetone/H₂O (70/30) provides the best yield. Optimal conditions for liquid solid extraction with the same solvent were found using Accelerated system extractor (ASE) at 100° C. The composition of each extract was determined by LC-UV. Qualitative analysis of the metabolite profile of extracts obtained from the three areas of wood was performed using tandem mass spectrometry (LC/MS and LC/MS/MS). Mass spectra data were recorded using electrospray ionization in the negative mode. Compounds were identified using the m/z ratio and their fragmentation patterns. Phenolic compounds were predominant with flavonoids followed by terpenes. Taxifolin and quercetin were found to be the most abundant metabolites present in the three areas along with pinobanskin, myricetin and dihydrokaempferol. Specific compounds present in each zone were defined. More than sixty-four compounds were identified in heartwood, forty in transition zone and sixty in sapwood. The developed method in LC/MS/MS allowed the separation of isomers for taxifolin and its derivatives which are aglycons or O-glycosylated. They showed the same fragmentations and m/z at different retention times. The quantification of these metabolites has been performed by MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Mots-Clés : sapwood, heartwood, transition zone, polyphenols, *Pseudotsuga menziesii*

A workflow for the assessment of the quality of isotopologue distribution measurements by mass spectrometry

Maud Heuillet^{1,2}, Floriant Bellvert^{1,2}, Edern Cahoreau^{1,2}, Fabien Letisse¹, Pierre Millard¹, Jean-Charles Portais^{1,2}

¹ Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) – INSA, INRA, CNRS : UMR5504, 135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04, France

² Metatoul - Metabohub – INRA : UMR792, CNRS : UMR5504, INSA, France

Fluxomics is the measurement of actual metabolic reaction rates within biological systems (intracellular or intratissular fluxes), and has become a powerful tool for quantifying cell physiology for various applications as metabolic engineering, biotechnology or biomedical research. The most relevant approach to measure fluxes in living cells or tissues is based on isotope labeling strategies (¹³C) coupled to the detailed analysis of isotope incorporation into metabolites, measured by mass spectrometry or NMR spectroscopy. The quality of the biological insights provided by these approaches strongly depends on the quality of the isotopic measurements. However, despite decades of isotopic studies of metabolism based on mass spectrometry, there is still no method to evaluate the reliability of MS-based isotopic measurements. Here, we present a method to address this issue. In this method a biologically-produced sample containing metabolites with fully predictable isotopologue distributions (Millard et al, 2014) is produced and used as reference material for evaluation of analytical methods. The reference sample was produced by growing *E. coli* cells with an equimolar mix of all isotopic forms of ¹³C-labeled acetate as sole carbon source. With such label input, all metabolites have an isotopologue distribution that follows the binomial coefficients of Pascal's triangle (Millard et al, 2014). As test case, the method was used to validate LC-MS methods implemented in our laboratory for the isotopic analysis of underivatized amino acids. The two most prominent approaches in MS-based isotopic profiling i.e. targeted analysis based on Multiple Reaction Monitoring mode (MRM) on a triple-quadrupole analyzer, and non-targeted analysis in full scan mode with a high resolution mass spectrometer, were tested. The reliability of the MS data obtained by the two methods was evaluated against evaluation criteria that were specifically defined for measurement of isotopologue distributions, from the closeness of the measured isotopologue distributions to the theoretical values. The results showed excellent agreement between measured and expected isotopologue distributions with both MS approaches, while enabling potential analytical issues to be identified. In addition, these results have highlight a new method to determine the working range adapted to these measurements and based on the impact of total isotopologue area on the bias. This work provides a general framework for assessing the quality of MS-based isotopic measurements, as well as for instrument qualification. It can be extended to various MS instruments, to various methods, and to various classes of metabolites. This approach is currently applied to qualify the MS instruments of the French infrastructure MetaboHUB for isotopic studies.

References

Millard et al *Anal. Chem.* 2014, 86, 10288-95

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : profilage isotopique, validation de methode, spectrométrie de masse

Etude préliminaire sur l'identification de biomarqueurs prédictifs du risque du cancer du sein et de biomarqueurs prédictifs du comportement alimentaire sur une large cohorte de femmes

Agnès Victor Bala¹, Mélanie Deschasaux², Nadia Bouchemal¹, Mohamed Triba¹, Pilar Galan², Serge Hercsberg², Philippe Savarin¹, Mathilde Touvier²

¹ Chimie, Structures et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT),
Université Sorbonne Paris Cité (USPC), CNRS : UMR7244
Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin 93017 Bobigny, France

² Equipe de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle (EREN) – Université Sorbonne Paris Cité (USPC),
Université Paris XIII - Paris Nord – Equipe 3 de l'UMR U1153 INSERM/ U1125 INRA/ CNAM/ Paris 13
UFR SMBH, PARIS 13, 74, rue Marcel Cachin 93017 Bobigny cedex, France

Contexte : Le cancer du sein est le cancer le plus mortel chez les femmes âgées de 20 à 60 ans. Dans le cadre d'une étude épidémiologique sur la prédiction du risque du cancer du sein par la RMN métabolomique sur une large cohorte bien phénotypée, une étude préliminaire a été réalisée afin d'évaluer l'impact de la nutrition sur cette maladie. Celle-ci se divise en deux objectifs. Premièrement, il s'agit d'identifier des biomarqueurs caractéristiques d'un comportement alimentaire à l'aide de score basé sur les recommandations nutritionnelles qualitatives et quantitatives appelés score PNNS-GS. Le deuxième objectif consiste à identifier de manière précoce les biomarqueurs qui sont associés au risque de cancer du sein.

Matériels et Méthodes : Les échantillons de plasmas proviennent de la cohorte SU.VI.MAX qui est une étude menée sur 13 ans sur le comportement alimentaire et l'état de santé des français à partir de questionnaires. Pour le premier objectif, 160 échantillons ont été sélectionnés parmi des femmes appartenant au premier décile (mauvais régime alimentaire) et dixième décile (bon régime alimentaire) des scores PNNS-GS pour lesquelles il y a au moins dix enregistrements alimentaires de 24h au cours des deux premières années de suivi.

Pour le deuxième objectif, 684 échantillons de plasmas de femmes ont été sélectionnés, ils correspondent aux plasmas de 228 femmes diagnostiquées d'un cancer du sein invasifs au cours de l'étude et chaque cas a été apparié avec deux échantillons de plasmas de femmes, témoins à la date du diagnostic. Les facteurs d'appariements sont l'âge, l'IMC, le statut ménopausique, la période de prélèvement sanguin. L'ensemble de ces échantillons ont été passés à l'aide d'un spectromètre RMN Bruker Avance III 500 MHz. Les profils des plasmas ont été obtenus en utilisant les séquences NOESY 1D et CPMG. Des analyses statistiques multivariées (ACP et OPLS) ont été réalisées à partir de ces profils.

Résultats : Dans un premier temps, par ACP, nous avons constaté que la variabilité était essentiellement portée par les pics RMN correspondant aux lipides. Pour l'objectif 1 une discrimination en fonction du statut décile a été possible au sein de la 3ème classe d'IMC ($25\text{kg/m}^2 < \text{IMC} < 35\text{kg/m}^2$) par OPLS. Cependant la projection des individus de l'objectif 2 sur ce modèle n'a pas permis de valider ce résultat.

Pour l'objectif 2, une OPLS a été calculée et a montré que la simple prise en compte du prélèvement ne semble pas permettre la prédiction du cancer du sein. Ces résultats devront être confirmés.

Conclusion : Cette étude porte sur une large cohorte d'étude bien phénotypée, malgré cela la variabilité interindividuelle reste importante. Cette étude préliminaire s'inscrit dans le cadre d'un projet dont l'objectif final serait de relier les deux séries de biomarqueurs du comportement alimentaire et du risque de développement du cancer de sein afin d'évaluer l'impact de la nutrition sur le cancer du sein.

Mots-Clés : RMN 1H, nutrition, PNNS, GS, cancer du sein

Supercritical fluid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for dereplication and quantification of natural products

David Touboul¹, Laurent Laboureur¹, Louis-Félix Nothias-Scaglia², Marie Méjean¹, Pierre Champy³, Fanny Roussi¹, Marc Litaudon¹, Alain Brunelle¹

¹ Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris-Saclay – CNRS : UPR2301, 1 Avenue de la terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France

² University of California - San Diego (UCSD) – San Diego Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, PSB 4231, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0751, USA, États-Unis

³ CNRS UMR 8076 BioCIS - BIOMolécules : Conception, Isolement et Synthèse – Bureau D5 309 - Bâtiment D5, 5 rue J.B. Clément 92296 Châtenay-Malabry, France, France

The development of the most valuable analytical strategies need to include optimization of analytical parameters such as accuracy, sensitivity, reproducibility, speed, while operator safety and environmental impacts are never considered at the same level. An absurd situation has emerged, due to the side effects of analytical methods, especially those developed to investigate hydrophobic compounds: a large amount of chemical waste is generated, leading to a strong negative environmental impact. Somehow, the chemicals used for such analyses are much more toxic than the analyzed species themselves. Taking into account growing public concerns on environmental questions, analytical studies and the consequent use of toxic solvents have increased to such a level that it becomes untenable to continue without changing towards environmentally friendly methods. One very interesting way to overcome this problem is to replace organic solvents by green Supercritical Fluids (SF), such as SF-CO₂. SF-CO₂ can be considered as a green solvent because it is a non-toxic by-product of different industries and it exhibits solvation properties closed to those of hexane. In order to elute analytes, modifiers such as alcohols are routinely used. Moreover Supercritical Fluid Chromatography (SFC) can be hyphenated with mass spectrometry (MS).

Three examples will be introduced in order to demonstrate the benefit of SFC-MS compared to traditional LC-MS.

First, quantification of tocopherols and tocotrienols, i.e. the vitamin E family, is usually achieved by normal-phase liquid chromatography using large volumes of toxic organic solvents, or reversed-phase liquid chromatography using a high percentage of methanol for elution. We propose here a greener analytical strategy, including SFC-MS, using ethanol as a modifier, for the detection and quantification of vitamin E congeners in soybean oil. An atmospheric-pressure photoionization (APPI) source appeared more sensitive and robust than electrospray (ESI) or atmospheric-pressure chemical ionization (APCI). This method led to shortened analysis time (< 5 min) with limits of detection and quantification in the tens of µg L⁻¹.

Secondly SFC-MS/MS was used for the dereplication of diterpene esters from Euphorbia extracts. Tandem MS spectra were classified using the molecular network approach developed by P. Dorrestein. Unknown jatrophone esters and phorboids, bearing inhibition of chikungunya virus replication, were thus put in light, isolated and structurally characterized.

In order to demonstrate the versatility of SFC-MS, a set-up for post-column cationization by lithium salts has been optimized. Due to the CO₂ depressurization before the entrance of the mass spectrometer, the lithium salt was directly added in the make-up solvent, leading an efficient exchange of sodium or proton with lithium for the cationization under ESI. This unique set-up allowed us to study dereplication of Annonaceous acetogenins from *Annona muricata* L. with similar sensitivity but a better chromatographic resolution and a significant reduced analysis time compared to LC-MS/MS.

Mots-Clés : chromatographie en phase supercritique, chimie structurale, quantification, déréplication, produits naturels, réseau moléculaire

Etude métabolomique des effets d'un exercice en endurance en plaine et en altitude sur les plasmas humains

**Florian Messier¹, Mohamed Triba², Nadia Bouchemal²,
Fabienne Durand³, Laurence Le Moyec⁴**

¹ Laboratoire Européen Performance Santé Altitude – Université Perpignan Via Domitia – LEPSA,
7 avenue Pierre de Coubertin 66 120 FONT-ROMEUE, France

² Chimie, Structures et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT),
Université Sorbonne Paris Cité (USPC), Institut Galilée, université Paris 13, CNRS : UMR7244,
Institut Galilée, Université Paris 13, 99 avenue Jean-Baptiste Clément, F-93430 Villetaneuse, France

³ Laboratoire Européen Performance Santé Altitude – Université Perpignan Via Domitia,
7 avenue Pierre de Coubertin, 66120 Font-Romeu, France

⁴ Unité de biologie intégrative des adaptations à l'exercice (UBIAE) – Université d'Evry-Val d'Essonne : EA3872,
Bât Maupertuis Université Evry-Val d'Essonne Bd F Mitterrand, 91 025 Evry Cedex, France

Plusieurs études ont montré des modifications d'utilisation des substrats énergétiques lors d'un exercice réalisé en altitude par rapport à la plaine. En effet il y aurait une augmentation de l'utilisation des glucides lors d'un exercice en altitude mais les intensités d'exercice utilisées ne sont pas comparables. Ainsi, l'utilisation accrue des glucides pourrait être due aux intensités d'exercice discordantes et non à l'altitude. Ces études ont utilisé des méthodes d'analyse biochimique qui permettent de doser seulement un petit nombre de biomolécules. Il est donc difficile d'avoir une vue d'ensemble des changements de métabolome lors d'un exercice en altitude. De plus, ces résultats ont été obtenus pour des altitudes supérieures à 3000m. Or dans les disciplines d'endurance, la majorité des compétitions ou des centres d'entraînement se situent en moyenne altitude (2000m).

Le but de cette étude est de comparer les modifications de métabolome plasmatique lors d'un exercice d'endurance en plaine et en altitude (2100m) grâce à la métabolomique par RMN.

20 sujets non acclimatés à l'altitude ont été recrutés. Afin de déterminer l'intensité d'exercice pour le test en endurance, les sujets ont réalisé un test d'effort maximal sur cycloergomètre en plaine et à 2100m. Lors des tests d'endurance, les sujets ont pédalé pendant 60 minutes à une intensité correspondant à leur premier seuil ventilatoire (SV1) puis l'intensité était incrémentée de 15W/min jusqu'à épuisement. Des prélèvements sanguins ont été effectués avant le test, après 60 minutes d'effort à SV1 et après la phase d'incrémentement. Les échanges gazeux et les données cardio-respiratoires ont été enregistrés à l'aide d'un analyseur (K4b2, Cosmed). Les spectres RMN proton ont été obtenus sur un spectromètre Bruker (500 MHz). Les analyses statistiques ont été réalisées dans Matlab à l'aide d'un script qui nous a permis de calculer des modèles PCA et OPLS.

Lors de l'exercice d'endurance nos résultats montrent en comparant les échantillons plasmatisques avant effort et après 60 min d'effort une diminution des lipides et une augmentation du glycérol en plaine et en altitude. Lorsque que le métabolome est comparé entre la plaine et l'altitude, aucune différence d'utilisation des lipides ou des glucides n'a été observée. En revanche, en altitude, nos résultats montrent une diminution des acides aminés branchés, de l'alanine et des glucides dans le plasma par comparaison au métabolome observé en plaine.

Les données obtenues sur l'ensemble de l'exercice d'endurance jusqu'à épuisement en plaine et en altitude, montrent si l'on compare les échantillons avant et après effort, une augmentation des glucides, du lactate et du pyruvate. L'augmentation de l'intensité d'exercice induit donc une modification du métabolome plasmatique. De plus, en altitude, nos résultats indiquent une diminution de la tyrosine et une augmentation de l'urée entre les spectres obtenus avant et après l'exercice, ce qui n'est pas observé en plaine.

Notre étude montre que pour des sollicitations physiologiques identiques entre la plaine et l'altitude, l'utilisation des glucides et des lipides est la même. En revanche, en altitude, il y aurait une utilisation plus importante des acides aminés branchés témoignant d'une dégradation protéique accrue.

Mots-Clés : altitude modérée, RMN, exercice, sang, épuisement, endurance

P42

Mise en place d'une méthode de dosage des acides biliaires par LC-HRMS. Exemple de l'implication des acides biliaires sur l'absorption des lipides alimentaires suite à l'inactivation d'une protéine intestinale X

Fabien Riols¹, Sami Trabelsi², Xavier Collet², Pauline Le Faouder¹, Justine Bertrand-Michel¹

¹ Plateau MetaToul-Lipidomique, INSERM U1048 – 1 av. Jean Poulhès, 31400 Toulouse, France

² I2MC, U1048 – INSERM – 1 av. Jean Poulhès, 31400 Toulouse, France

Une méthode de quantification absolue des acides biliaires libres et conjugués par LC-HRMS a été mise en place sur le plateau Metatoul-Lipidomique. Développée dans un premier temps sur fèces de souris, la méthode a ensuite été adaptée sur différents tissus et fluides tels que l'intestin, le foie, le plasma ou la bile. La préparation des échantillons a été optimisée afin d'obtenir une méthode robuste, efficace et sensible. L'extraction des acides biliaires de fèces débute par une incubation à la soude sur des fèces préalablement broyées. S'en suit une sonication suivie d'une centrifugation au cours de laquelle le surnageant est récupéré. Une extraction de type SPE sur plaque HLB 96 puits (Waters) est ensuite réalisée avant injection dans le MeOH sur un système LC-HRMS Exactive (Termo) équipé d'une colonne Zorbax SB-C18 2.1x50mm 1.8µM (Agilent). Après validation, la méthode a été appliquée à un projet biologique. Une étude au sein d'un laboratoire de l'I2MC (Inserm, Toulouse) a montré chez la souris que la déficience en une protéine intestinale X augmentait l'absorption intestinale des triglycérides après gavage à l'huile. Pour comprendre la voie métabolique impliquée dans cette hypertriglycéridémie postprandiale, les souris WT et KO ont été nourries pendant deux semaines avec un régime séquestrant des acides biliaires. Le résultat montre que la séquestration intestinale des acides biliaires par ce régime conduit à une hypertriglycéridémie chez les WT. Comme attendu, la quantification a montré une accumulation d'acides biliaires dans les fèces et un déficit dans l'intestin après ce régime. Nous avons pu ainsi montrer l'implication des acides biliaires dans le contrôle de l'absorption des triglycérides médiée par la protéine X. D'autres études sont actuellement en cours pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.

Mots-Clés : LC-HRMS, acides biliaires

Comparaison de l'impact d'un bio-insecticide et d'un insecticide chimique sur le sédiment par métabolomique

Marie-Virginie Salvia, Amani Ben Jrad, Delphine Raviglione, Cédric Bertrand

*CRIOBE USR3278, Université de Perpignan Via Domitia – Univ de Perpignan Via Domitia,
58 Avenue Paul Alduy 66860 Perpignan Cedex, France*

Les moustiques envahissent de plus en plus de nouveaux milieux ce qui pose problème puisque ces derniers peuvent transmettre des maladies. En effet, la présence de vecteurs crée un risque d'épidémies telles que le chikungunya, la dengue ou encore plus récemment le virus zika. Aujourd'hui, la lutte antivectorielle (LAV) contre ces vecteurs potentiels est un enjeu majeur de santé publique.

Le moyen le plus efficace pour lutter contre les moustiques est l'utilisation d'insecticides. De nombreux traitements insecticides ont été développés, cependant, depuis peu, l'utilisation de l'ensemble des insecticides de synthèse a été remise en cause. Par conséquent, les insecticides biologiques sont de plus en plus employés tel que le *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), une bactérie sporulante. Aujourd'hui, l'EID (Entente Interdépartementale de la Démoustication) n'a en effet recours pratiquement uniquement qu'au Bti.

Puisque le Bti est un bio-insecticide, il laisserait à penser que c'est un insecticide " propre " qui n'a pas ou peu de conséquences néfastes sur l'environnement. Mais le Bti est-il si parfait ? L'impact du Bti sur l'environnement n'a, à notre connaissance, été que très peu évalué à l'heure actuelle et c'est donc l'objectif de notre projet. Nous étudierons également en parallèle l'impact d'un insecticide chimique sur l'environnement, l'alpha-cyperméthrine encore très utilisée pour le traitement des rizières pour comparaison.

Pour cela, une approche par métabolomique est utilisée. Une étude préliminaire sur 8 jours a été réalisée et des points à t=0 et t=8 jours ont été effectués. Des microcosmes de sédiment ont été traités soit avec du Bti soit avec de l'alpha-cyperméthrine. Des « contrôles », c'est-à-dire des sédiments non traités ont également été inclus dans le protocole pour comparaison avec les échantillons dopés.

Une procédure d'extraction basée sur la méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) a été mise en place dans l'objectif d'extraire une grande partie du métabolome du sédiment. Les extraits ainsi obtenus ont par la suite été analysés par LC-MS.

Les résultats acquis en LC-MS ont ensuite été analysés en utilisant un outil développé récemment au laboratoire CRIOBE. Cette méthode est basée sur des outils statistiques (ACP, MANOVA). Nous remarquons un impact des deux insecticides sur le sédiment : en effet, des différences significatives ont été observées entre les contrôles et les échantillons exposés aux composés pour les deux temps étudiés. Pour poursuivre cette étude exploratoire, un protocole sera mené sur une longue durée (150 jours) pour évaluer, en outre, le temps de résilience du sédiment exposé à ces insecticides. Ceci nous permettra de faire une comparaison entre l'exposition à un insecticide chimique et à un insecticide biologique.

Ce travail est très novateur car c'est la première fois qu'une telle approche est employée pour étudier une espèce biologique qui est en fait un mélange très complexe contenant une bactérie, le Bti mais également tout un cocktail de molécules telles que des résidus de cultures ou encore des métabolites du bacillus qui peuvent avoir un effet non négligeable sur l'environnement.

Mots-Clés : métabolomique, LC/MS, insecticides, impact, environnement, sédiment

P44

Metabolomics approach to evaluate the effects of a selective COX-2 inhibition on allergen-induced bronchoconstriction and airway inflammation in asthma

Caroline Mathon, Hector Gallart-Ayala, Shama Naz, Stacey Reinke, Kameran Daham, Sven-Erik Dahlen, Barbro Dahlén, Craig Wheelock

Karolinska Institut – Stockholm, Suède

Asthma is a chronic respiratory disorder, affecting 300 million individuals worldwide. Symptoms include episodic airway inflammation coupled with reversible obstruction. Prostaglandins are lipid mediators of inflammation that impact the airways, affecting constriction and relaxation. The prostaglandins are generated enzymatically by COX-1 or COX-2 (cyclooxygenase) from arachidonic acid. We evaluated effects of the selective COX-2 inhibitor etoricoxib on: 1) prostaglandin levels in urine, 2) physiological parameters (e.g. lung function), 3) safety in asthmatic subjects, and 4) urine metabolic profiling. Herein, we report the metabolic changes observed in urine.

In this study, 16 nonsmoking subjects with mild atopic asthma, underwent treatment with rising dose inhalation of allergen or methacholine during a control study period, or after 10 to 13 days of treatment with etoricoxib (90 mg/day). Urine samples were collected before the start of allergen bronchoprovocation, and at 1 and 2 hours after the maximum fall in lung function.

Urine samples were diluted based upon the specific gravity, proteins precipitated, and analyzed on four complementary UHPLC-QToF methods combining positive and negative ESI with reversed phase and HILIC chromatography on an Agilent 6550 QToF. The acquisition method was based on three parallel experiments: full scan, all ions fragmentation at 10eV and at 30eV. This approach enables simultaneous untargeted analysis and MS/MS information of all ions (All Ions Fragmentation). HRMS data were processed using a custom database containing retention times and fragmentation information for > 700 metabolites.

Data for the HILIC separation in positive ionization identified 75 metabolites. Of these compounds, 14 were significantly altered over time ($p < 0.05$), amongst which, hypoxanthine, tyramine and xanthosine showed a $p < 0.001$. These results highlight increased oxidative stress in the urine of asthmatics following challenge. Data analysis of the remaining methods is undergoing and expected to provide increased insight into the metabolic responses associated with COX-2 inhibition in asthma.

Mots-Clés : metabolomics, asthma, COX2 inhibitor, urine

P45

Impact of atmospheric stresses on clouds microorganism's metabolome: the case study of H₂O₂

**Nolwenn Wirgot¹, Marie Lagrée^{1,2}, Martine Sancelme¹, Mounir Traïkia^{1,2}, Cyril Jousse^{1,2},
Isabelle Canet¹, Anne-Marie Delort^{1,2}**

¹ Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) – CNRS : UMR6296, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II,
24 Avenue Blaise Pascal 63178 Aubière, France

² Plateforme d'Exploration du Métabolisme – Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II,
24 avenue Blaise Pascal 63178 Aubière, France

In cloud water collected at the puy de Dôme mountain (France), microorganisms are metabolically active and are exposed to very strong stress, especially due to the presence of reactive oxygenated species, including H₂O₂ and radicals. Indeed, cloud water is a very oxidized environment with a redox potential of up to 200 mV (Deguillaume et al., 2014). However cloud microorganisms can survive to oxidative stress (Joly et al., 2015) and are able to degrade H₂O₂ (Vaitilingom et al., 2013). In a recent work, we highlighted that H₂O₂ modulates the global metabolism of cloud microorganisms as shown by strong correlation between ATP concentration (adenosine triphosphate) and the presence of H₂O₂ (Wirgot et al., in prep). We have seen an impact of H₂O₂ in the degradation of carbon compounds present in cloud water samples. The question remains: how do microorganisms resist to these atmospheric stresses, and particularly to the exposure to H₂O₂? How do their metabolome respond to this stress?

To answer to this question, we thought it was appropriate to deepen our knowledge of the interactions between bacteria and H₂O₂ in cloud water by a metabolomic approach. For this purpose we have investigated the response of a *Pseudomonas* strain (a genus frequently found active in cloud water samples) to hydrogen peroxide exposure. Experiments were performed in three biological replicates.

24 erlenmeyers flasks were incubated at 17°C and 110 r.p.m containing 150 mL of cloudwater solution and inoculated with bacterial cells close to 10⁷ cells.mL⁻¹. 200 µM of hydrogen peroxide were added in half of them. The experiment was stopped at 50 minutes and 24 hours of incubation because these two different time points are important regarding the evolution of ATP cellular content and H₂O₂ degradation. Bacterial pellets were obtained by centrifugation (5 min, 12000 g) and rinsed twice in a 0.8% solution of sodium chloride. Then, they were extracted by a cold water/methanol/acetonitrile mix. 12 samples were obtained for each time point (half submitted to H₂O₂).

Finally, we analysed samples via LC/MS and 1H-NMR using the Metabolic Profiler® facility (Bruker). Metabolic profiles were converted into matrices using Galaxy platform and Amix. Statistical analyses (PCA, PLS-DA) were performed with SIMCA-P software. Assignments of biomarkers are in progress.

References

Deguillaume et al. Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10-year monitoring: Mean features of their physico-chemical properties. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2014, 14, 1485-1506.

Joly et al. Survival of microbial isolates from clouds toward simulated atmospheric stress factors. *Atmospheric Environment*, 2015, 10.1016/j.atmosenv.2015.07.009.

Vaitilingom et al. Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2013, 110, 559-564.

Mots-Clés : hydrogen peroxide, stress, cloud, microorganism, metabolomic, biomarkers

P46

The Polyomics Metabolomics Pipeline: a user friendly metabolomics web resource

**Karl Burgess¹, Yoann Gloaguen¹, Ronan Daly¹, Mike Barrett¹, Fraser Morton¹,
Unni Chokkathukalam², David Wilson¹**

¹ University of Glasgow – Glasgow G12 8QQ Scotland, Royaume-Uni

² Invista – The Wilton Centre, Redcar, Royaume-Uni

Metabolomics is the study of all input, output and metabolic intermediates of a cell's chemical reactions. Rapid advances in chromatography - mass spectrometry technologies create new challenges in the analysis and interpretation of the increasingly large and complex datasets being generated. Currently, complete analysis of such data from feature detection to biological context can only be achieved by combining programming libraries into analysis pipelines. No current software can support biological specialists analysing and interpreting metabolomics data without prior programming knowledge, resulting in a major limitation for research findings and outcomes.

We present the Polyomics Metabolomics Pipeline (PiMP), a web-based application that facilitates interactive analysis of liquid chromatography - mass spectrometry metabolomics data from planning to analysis to reporting biological impact. We focus on the concept of multiple pieces of 'evidence' for a metabolite's existence and its presence in a pathway to enable interpretation of a dataset's context. The idea is to produce an interpretation 'beyond reasonable doubt', guiding users through data analysis while also enabling world-wide collaboration by sharing both experimental designs and results online. State-of-the-art, multi-viewpoint visualisation allows scientists to easily navigate and extract relevant information and examine it in a biological context. The capacity of non-metabolomics specialists to use this tool for end to end analysis demonstrate that non-experts can now fully exploit their metabolomics data without any third party interaction. We anticipate that this tool will have a transformative effect on the way the research community approaches and understands metabolomics data, enabling a wider range of scientists to analyse and interpret their own data, resulting in a major, positive impact on research outcomes.

The software is modular and the front-end is written predominantly in Django, so that additional functionality can be readily incorporated. We have already done this with fragmentation analysis and the MetExplore environment, and we welcome modules written by other interested parties. The software uses a GitHub environment for bug-tracking and collaborative development, and we aim to build the software as a community resource.

Mots-Clés : metabolomics, Staphylococcus aureus, bioinformatics, mass spectrometry

P47

Elucidation of anaerobic digestion inhibition by ammonia mechanism deciphered by microbial dynamic and metabolomic analysis

**Lénaïck Rouillac, Olivier Chapleur, Simon Poirier, Laurent Mazeas,
Celine Madigou, Angeline Guenne**

Hydrosystèmes et bioprocédés (UR HBAN) – IRSTEA – 1 rue Pierre-Gilles de Gennes 92761 Antony Cedex, France

Anaerobic digestion (AD) is a bioprocess widely implemented to stabilize organic waste and simultaneously produce methane-rich biogas which can be used to generate energy and heat. However, anaerobic microorganisms responsible for biological conversion of organic material into methane (CH₄) are vulnerable to a wide variety of inhibitory substances or factors which result in decreased production yields and potentially in process failure. Among them, ammonia is regularly mentioned as the primary cause of digester failure.

In order to get more insights into AD microbiota inhibition by ammonia, anaerobic batch reactors performances were investigated in triplicates under ten concentrations of Total Ammonia Nitrogen (TAN) concentrations (from 0 up to 50.0 g/L) at 35 °C. Biogas production and composition as well as volatile fatty acids and ammonia concentrations were followed throughout the experiment in all the incubations. Liquid samples were collected regularly. Among them, 48 were selected to be further analyzed with different techniques: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analyses (ARISA) fingerprinting enabled a qualitative evaluation of the microbial dynamics; 16S rRNA gene sequencing was used to identify the key members of the microbiota, and metabolome analyses were performed by GC-MS to compare the degradation pathways in presence of various levels of inhibitor. In a first approach, principal component analyses (PCA) were computed to put forward the differences between the samples according to the ammonia concentration, and to identify the parameters explaining the differences for each methodology.

Microbial community dynamics revealed that above a TAN concentration of 10.0 g/L, remarkable modifications within archaeal and bacterial communities occurred. A gradual methanogenic shift between two OTUs from genus *Methanosarcina* was observed when TAN concentration increased up to 25.0 g/L. Proportion of potential syntrophic microorganisms such as *Methanoculleus* and *Treponema* progressively raised with increasing TAN up to 10.0 and 25.0 g/L respectively, while *Syntrophomonas* and *Ruminococcus* groups declined. In 25.0 g/L assays, *Caldicoprobacter* were dominant. This study highlights the emergence of AD key phylotypes at extreme ammonia concentrations. Similar thresholds of inhibition were highlighted based on the analysis of metabolomics data. Some molecules seem to be very specific to incubation with a high ammonia level, as benzoic acid. On the contrary, amount of hydro phenylcinnamic acid is more important in incubation with low ammonia level.

As the results of individual analysis seemed highly correlated, further analyses are currently performed to integrate together the results obtained by the analytical methods so as to bring out their complementarities and communalities (Common Components and Specific Weights Analysis; CCSWA).

Mots-Clés : anaerobic digestion, methanisation, ammonia inhibition

Data processing and multi-block analysis for urine metabolomics: application to kidney failure

Yoric Gagnebin¹, Giuseppe Marco Randazzo¹, David Tonoli^{1,2}, Pierre Lescuyer³, Belen Ponte⁴, Sophie De Seigneux⁴, Pierre-Yves Martin⁴, Julie Schappler¹, Julien Boccard¹, Serge Rudaz¹

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne,
Boulevard d'Yvoy 20, 1211 Genève 4, Suisse

² Swiss Centre for Applied Human Toxicology (SCAHT) – Boulevard d'Yvoy 20, 1211 Genève 4, Suisse

³ Department of Genetic and Laboratory Medicine, Geneva University Hospitals,
Rue Gabrielle-Perret-Gentil 4 1205 Genève, Suisse

⁴ Service of Nephrology, Geneva University Hospitals – Rue Gabrielle Perret-Gentil 4, 1205 Genève, Suisse

Metabolomics constitutes a potent approach for assessing biochemical alterations caused by diseases or environmental influences. In the case of urine metabolomics, data normalization is required for proper sample comparison and has two distinct roles: correct for analytical drift and remove differences due to urine concentration. These two aspects are mandatory to evaluate metabolic profiles in an unbiased manner. For that purpose, two widely-used data pre-processing methods, namely Quality control–based robust LOESS signal correction (QC-RLSC; Dunn et al, 2011) and MS Total Useful Signal (MSTUS; Warrack et al, 2009) combined with individual dilution factors estimated from osmolality provided a potent normalization strategy. Fixing a range of concentrations during sample preparation improved analytical conditions and data acquisition prior to normalization. QC-RLSC and MSTUS efficiently corrected for residual analytical drift and concentration variabilities, respectively. This sequential normalization was then applied to urine samples collected from a clinical study, to evaluate its impact on the comparison between urinary metabolic profiles from healthy volunteers and patients suffering from kidney failure using supervised analysis. The cohort was composed of 41 cases and 40 controls samples. Each sample and quality control (QC) was analysed by UHPLC-QTOF-MS in negative and positive ESI mode. Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, Waters, Newcastle upon Tyne, UK) was used for data pre-processing, SIMCA 14 (Umetrics) for PCA, and Matlab v8.0 for consensus OPLS-DA. Pareto scaling was applied before multivariate analysis. In addition to improved data acquisition, the sequential normalization strategy enhanced the prediction performance while reducing the complexity of OPLS-DA models.

Consensus OPLS-DA (Boccard and Rutledge, 2013) was then applied for the fusion of data blocks obtained from automatic metabolite annotation using different chemical classes/pathways. The investigation of consensus OPLS-DA on data blocks related to phase II metabolism annotated from neutral mass loss in MS spectra, namely glucuronides and sulphates, were compared with block generated from random features selection to define empirical limits of significance. The results showed that glucuronides had a marked impact on the model prediction and kidney failure patient stratification, supporting the hypothesis of altered phase II metabolism due to kidney deficiency.

Data processing including data normalization, metabolite annotation and multi-block analysis developed in this study provided a potent way to generate biological hypotheses, for a better understanding of the pathology. Further study are needed to improve quantity and quality of annotation blocks to have a complete overview of chemical classes or pathways that may have a significant impact on the patient stratification.

References

Dunn et al, *Nature Protocols*, Vol. 6, pp. 1060–1083, 2011.

Warrack et al, *J. of Chromatography B*, Vol. 877, pp. 547–552, 2009.

Boccard and Rutledge, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 769, pp. 30–39, 2013.

Mots-Clés : metabolomics, urine, kidney failure, normalization, multiblock analysis

Enrichissement de la base de données spectrales PeakForest en LC-MS

**Sylvain Emery¹, Bernard Lyan¹, Charlotte Joly¹, Nils Paulhe¹, Franck Giacomoni¹,
Etienne Thévenot², Christophe Junot³, Estelle Pujos-Guillot¹**

¹ Unité de Nutrition Humaine UMR 1019 INRA / Université Clermont 1 Plate-forme d'Exploration du métabolisme PFEM, INRA – Centre de Clermont - Ferrand -Theix 63122 Saint Genès Champanelle, France

² CEA, LIST, Laboratory for Data Analysis and Smart Systems (LADIS), MetaboHUB, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

³ Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments – CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

L'analyse métabolomique non ciblée est une approche puissante permettant la caractérisation du phénotype métabolique lié aux développements de maladies chroniques. L'identification des biomarqueurs qui y sont associés est devenue un enjeu majeur pour ce type d'approche. Il existe aujourd'hui un très large panel de banques de données en métabolomique, pouvant aider lors de cette étape d'identification, telles que MassBank, HMDB ou Lipidmaps, mais ces bases n'intègrent pas de données chromatographiques alors que le temps de rétention peut être un paramètre contribuant largement dans l'identification de molécules (Sumner et al, 2014).

La base de données PeakForest est une banque de données de spectres de référence dédiée à l'annotation des données métabolomiques. Plus de 1000 composés standards (métabolites endogènes déjà décrits dans les biofluides) ont été analysés en LC-HRMS (Orbitrap, QToF) et selon des méthodes chromatographiques complémentaires au sein des quatre plateformes du consortium MetaboHUB. L'implémentation de PeakForest est réalisée via des fichiers 'template' qui intègrent les metadata et les peaklists annotées. L'originalité de cette base est qu'elle intègre également les conditions chromatographiques ainsi que les temps de rétention de chaque molécule, ce qui permet d'intégrer ce paramètre dans les requêtes.

L'objectif sera de pouvoir utiliser cette ressource pour une annotation automatique des jeux de données. C'est pourquoi la base de données PeakForest est utilisable via des outils Galaxy, bientôt intégrés au sein de la plate-forme web Galaxy W4M ([Workflow4Metabolomics](#) ; Giacomoni et al, 2015).

Une preuve de concept de l'utilisation de cet outil a été réalisée pour l'annotation d'un échantillon de plasma de référence du NIST. Au total plus de 70 métabolites ont été confirmés avec un score égal à 5 (Sumner et al, 2014). Ces résultats pourront à terme être intégrés au sein de PeakForest après curation effectuée par des experts dans le but de valider les résultats. Des données MS/MS viendront également compléter la base.

Cet outil dédié à l'annotation de métabolites en haut débit contribuera donc à terme à enrichir la caractérisation des métabolomes de différents systèmes biologiques.

References

Sumner et al. (2014) Proposed quantitative and alphanumeric metabolite identification metrics. *Metabolomics*, 10:1047-1049

Giacomoni et al. (2015) Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31:1493-1495

Mots-Clés : PeakForest, LC MSMS, Identification metabolites, base de données spectrales

Apport de la métabolomique à l'étude de la phase postprandiale

Marion Brandolini-Bunlon¹, Estelle Pujos-Guillot¹, Charlotte Joly¹, Jean-François Lesgards¹, Jean-François Martin¹, Jean-François Huneau², Dominique Dardevet¹, François Mariotti²

¹ INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne (INRA UNH),
Centre de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

² UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, AgroParisTech, INRA,
Université Paris-Saclay, 75005, Paris, France

La métabolomique a ouvert de nouvelles perspectives dans les études des relations nutrition/santé : elle permet actuellement d'avoir une idée des changements métaboliques à l'échelle de l'organisme entier, et ainsi d'intégrer la complexité des effets métaboliques de l'alimentation. L'objectif du présent projet était d'explorer l'effet de différentes matières premières protéiques laitières sur la réponse postprandiale induite par un repas riche en graisse.

L'intervention a consisté en 3 journées d'exploration postprandiale sur 6 heures, selon un dispositif croisé, en ordre randomisé, chez 11 hommes volontaires sains en surpoids. Les volontaires ont consommé à jeun un des trois repas-tests apportant 1200 kcal, composé de 70% de lipides, 15% de glucides et 15% de protéines laitières (caséines, protéines solubles du lactosérum, ou protéines solubles enrichies en α -lactalbumine). Des prélèvements de sang ont été réalisés avant le repas-test, puis en cinétique à 30 min, 60 min, 90 min, 2h, 3h, 4h et 6h après pour le dosage des triglycérides et des apolipoprotéines B-48 plasmatiques. Des prélèvements d'urines ont été réalisés avant le repas-test, puis toutes les deux heures. Ces échantillons d'urines ont été randomisés puis analysés par une approche métabolomique non ciblée: les urines diluées ont été injectées sur un couplage UPLC/QToF, équipé d'une source électrospray. Les données brutes ont tout d'abord été extraites par XCMS avant analyses statistiques. Toutes les données collectées ont été traitées avec des modèles mixtes, avec ajustement de Bonferroni-Hochberg pour les données de métabolomique, et des tests a posteriori de Bonferroni. De plus, pour les données métabolomiques, des analyses multivariées sur tous les ions et sur des sous-groupes d'ions ont ensuite été effectuées tous temps confondus ou par temps de cinétique. Enfin, des corrélations entre données cliniques et données métabolomiques ont été réalisées.

Au niveau clinique, les aires sous courbes des cinétiques plasmatiques des triglycérides ou des apolipoprotéines B-48 sont diminuées après consommation du repas hyperlipidique avec des caséines, par rapport aux deux autres repas-tests, ce qui suggère une modification de l'absorption des lipides. Au niveau métabolomique, 139 ions sont significativement modulés en fonction des protéines testées, avec une capacité équivalente à discriminer les 3 types de repas-tests, mais notablement plus d'ions discriminant le repas riche en protéines du lactosérum des deux autres. 36 de ces 139 ions sont caractéristiques de l'interaction temps-type de protéine, dont 20 ions davantage discriminants dans les modèles multivariés ($VIP > 1$). Par ailleurs, tous repas-tests confondus, les corrélations entre les données métabolomiques et cliniques sont significatives pour la moitié de ces ions caractéristiques de l'interaction temps-protéine, dont 8 ions avec $VIP > 1$. Le nombre d'ions corrélés aux données cliniques est différent entre les repas-tests si nous les considérons séparément.

En conclusion, les 3 types de protéines consommées dans des repas-tests hyperlipidiques induisent des réponses postprandiales cliniques et métaboliques différentes. La métabolomique non ciblée effectuée sur des prélèvements urinaires a permis d'apporter des informations complémentaires aux mesures cliniques : l'identification des métabolites caractéristiques de l'interaction temps-protéines permettra de confirmer que ces protéines ont, entre autres, un effet différent en lien avec le métabolisme postprandial des lipides.

Mots-Clés : protéines laitières, cinétique postprandiale, LCMS non ciblée, intégration de données

**Identification of phenolic compounds in two phase olive pomace
by UHPLC-DAD-ESI-MS**

Aurélia Malapert¹, Michèle Loonis², Emanuelle Reboul³, Olivier Dangles¹, Valérie Tomao¹

¹ *Safety and Quality of Plant Products (SQPOV) – UMR408 INRA - Université d'Avignon Campus Jean-Henri Fabre, 301 rue de Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916 Avignon Cedex 9, France*

² *Safety and Quality of Plant Products (SQPOV) – UMR408 INRA-Université – Agroparc, F-84914 Avignon, France*

³ *Nutrition Obésité et Risque Thrombotique (NORT) – UMR 1062 INSERM – Faculté de médecine Timone, 27 boulevard Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 5, France*

The use of a two-phase processing techniques for olive oil production generates a specific by-product known as two-phase olive pomace or called alperujo. This residue is the combination of liquid and solid wastes, commonly obtained by three-phase mills. A simple filtration of this pomace led to an aqueous phase rich in phenolic compounds. The widely used method to analyze these target compounds in alperujo was HPLC-MS. Obied et al. (2007) undertook the phytochemical screening of alperujo extracts with the identification of 52 compounds in 60 min. In the same topic, Rubio-Senent et al. (2013) also analyzed alperujo with HPLC-ESI-MS and identified 26 phenolic compounds in 48 minutes after a steam treatment of olive waste and extraction with ethyl acetate of the liquid phase.

The aim of the present study reports a rapid, reliable and efficient analytical method to characterize this wet olive pomace (variety: Aglandau) in terms of phenolic compounds by UHPLC-DAD coupled with ESI-MS/MS without extraction procedure to preserve both the maximum content and integrity of phenolic compounds.

Results revealed a total of 35 phenolic compounds belonging to phenyl alcohols, secoiridoids, flavonoids and iridoids identified as the main biophenols of this regional alperujo in 12 min. Six of quantitatively significant metabolites were determined at a concentration ranging from $17,7 \pm 0,41$ for coumaric acid to $370,7 \pm 5,1$ mg.L⁻¹ for hydroxytyrosol.

References

Obied et al, chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography, *Analytica chimica acta*, 603, 2007, 176-189

Rubio-Senent et al, Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste, characterization and antioxidant activity, *FST*, 54, 2013, 114-124

Mots-Clés : two-phase olive pomace, alperujo, biophenols, UHPLC, DAD, ESI, MS

Etude de la fertilité chez le bouc : analyse métabolomique par RMN

**Marylène Bertrand¹, Hervé Meudal¹, Florence Borderes², Vincent Furstoss², Louis Wozniak²,
Alice Fatet^{2,3} et Céline Landon¹**

¹ Centre de biophysique moléculaire (CBM) – CNRS : UPR4301 – rue Charles Sadron CS 80054,
45071 Orléans cedex 2, France

² FERLUS – INRA : UE1373 – Les Verrines, BP 80006, 86600 Lusignan, France

³ PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

Le but de cette étude est l'identification de métabolites importants pour la fertilité des caprins de races « Alpine » et « Saanen ». En effet, les taux de fertilité de ces boucs après insémination étant assez variables, il paraît important d'étudier les conditions qui pourraient conduire à l'amélioration de ceux-ci. Pour ce faire, les analyses de 204 échantillons congelés de plasmas séminaux de 35 boucs, prélevés durant les années 2009 à 2012 et présentant des résultats de fertilité contrastés, ont été réalisées par RMN-1D. Ces 204 échantillons sont constitués de 104 échantillons provenant de 18 boucs de race « Alpine » et de 100 échantillons de 17 boucs de race « Saanen ». 96 échantillons possèdent un taux de fertilité de 47% à 59 %, 108 échantillons, un taux de fertilité de 60 à 74 %. La préparation d'échantillons, l'acquisition des spectres RMN à l'aide d'un spectromètre 700 MHz avec cryosonde, le traitement des données et les analyses statistiques réalisées sont présentées.

Les analyses statistiques permettent de révéler, après identification, les métabolites les plus importants liés à la fertilité des boucs.

Remerciements : Les auteurs remercient l'équipe technique Ferticap de l'INRA FERLus pour leur aide à la collecte des échantillons et Capgènes pour l'identification et la mise à disposition des boucs candidats.

Cette étude a été réalisée avec le concours financier du CNRS, de la région Centre-Val de Loire et de Capgènes dans le cadre de la convention de recherche INRA-Capgènes-Génoé n°44000276.

Mots-Clés : fertilité, bouc, caprin, analyse RMN, statistique, métabolite

Recherche par LC-HRMS de biomarqueur(s) d'exposition des volailles à un antibiotique appartenant à la famille des céphalosporines : le ceftiofur

Sophie Mompelat, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel, Eric Verdon

Laboratoire de Fougères, Laboratoire National et Européen de Référence pour les Résidus de Médicaments Vétérinaires dans les Denrées Alimentaires d'Origine Animale (ANSES) – 10B rue Claude Bourgelat, 35306 FOUGERES, France

Le ceftiofur est une céphalosporine de 3ème génération dont l'usage est non autorisé dans la filière avicole. Le contrôle sanitaire de cette molécule est actuellement basé sur des méthodes « ciblées » d'identification et de quantification par CL-SM/SM et ne permettent pas de détecter le ceftiofur et ses métabolites en raison de leur cinétique de déplétion très rapide dans les tissus et le plasma chez la volaille (Mompelat et al, 2015). Afin répondre au besoin de dépistage d'usages non autorisés du ceftiofur chez la volaille, une nouvelle approche cette fois « non ciblée » de type « métabolomique » et employant la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse à Haut pouvoir Résolutif (CL-SMHR) a été élaborée et expérimentée afin de trouver de potentiel(s) biomarqueur(s) permettant de discriminer entre un groupe d'animaux témoins et un groupe d'animaux traités au ceftiofur. Lors d'une expérimentation animale, le plasma, le muscle et le foie de poulets traités au ceftiofur et de poulets témoins ont été prélevés. Une méthode de préparation d'échantillons de ces trois matrices aussi « générique » que possible a été mise au point et appliquée afin de recueillir le maximum d'information sur ces échantillons lors de l'analyse. La prise d'empreinte chimique de ces échantillons a été effectuée en mode full scan sur un instrument LC-LTQ-Orbitrap XL. Les empreintes chimiques « brutes » des différents échantillons ont été traitées puis comparées entre elles par des analyses multidimensionnelles supervisées et non supervisées à partir des outils de la plateforme Galaxy Workflow4metabolomics (<http://galaxy.workflow4metabolomics.org>; Giacomoni et al, 2015). Les signaux discriminants détectés entre les deux groupes seront présentés et discutés au regard des critères de robustesse des modèles statistiques construits.

References

Mompelat et al, Validation of a liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix, *Journal of Chromatography A*, 1407 (2015) 119-129.

Giacomoni et al, Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics, *Bioinformatics*, 31 (2015) 1493-1495.

Mots-Clés : médicaments vétérinaires, contrôle sanitaire, métabolomique, biomarqueurs, CL, HRMS

Profiling of soluble and insoluble phenolic compounds of maize roots (*Zea mays* L.) after inoculation with the Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) *Azospirillum lipoferum* CRT1

**Jihane Hamzaoui¹, Benjamin Fèl², Lenaic Leroux³, Olivier Cala⁴,
Sonia Czarnes⁵, Laurent Legendre⁵**

¹ Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) – CNRS : UMR5557, Université Claude Bernard-Lyon I - UCBL (FRANCE),
INRA : UMR1418, Université de Lyon – 6 rue Raphael Dubois 69622 Villeurbanne cedex, France

² Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) – CNRS : UMR5557, Université Claude Bernard-Lyon I - UCBL (FRANCE),
INRA : UMR1418, Université de Lyon – 6 rue Raphael Dubois, bât Forel, étage 4, France

³ Institut des Sciences Analytiques (ISA) – CNRS : UMR5280, PRES Université de Lyon, ENS - Lyon,
Université Claude Bernard - Lyon I (UCBL) – 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

⁴ Institut des Sciences Analytiques (ISA) – CNRS : UMR5280, Université de Lyon, ENS - Lyon,
Université Claude Bernard - Lyon I – 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

⁵ UMR 5557-CNRS Ecologie microbienne – CNRS : UMR5557 – 6 rue Raphael Dubois 69622 Villeurbanne, France

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) are a diverse group of microorganisms that develop complex and intricate, though non-obligate, relationships with their host plants. These bring growth, and stress-protection, benefits to both partners. Among PGPRs, *Azospirillum lipoferum* CRT1 has attracted interest because of its capacity to improve maize (*Zea mays* L.) root system architecture and forage, and grain, yields (El Zembrany et al, 2006). Its impact on maize physiology has nevertheless received little attention. Phenolic compounds, whether soluble or insoluble such as lignin polymers are key elements of the defense arsenal of plants towards biotic and abiotic stresses. A recent greenhouse-based trial has revealed that *A. lipoferum* CRT1 inoculation modifies the profile of small sized phenolic compounds of roots (Walker et al, 2011). Through field trials conducted on two consecutive years in three commercial fields differing by their soil characteristics (Isère, France), this study further explored the impact of bacterial inoculation on the accumulation of phenolic compounds in maize roots.

UHPLC/DAD/QTOF analyses of ethanol-extractable substances of the roots of third leaf stage maize plantlets revealed that soil and/or climatic conditions have a major influence on *A. lipoferum* CRT1-induced modifications of small sized phenolic compounds contents. Additionally, high field 2D-NMR (800 MHz) analyses of DMSO/pyridine-solubilised crude root cell walls (adapted from Kim and Ralph, 2010) unveiled parallel subtle changes in lignin and carbohydrate polymers composition.

All in all, these results demonstrate that the PGPR *A. lipoferum* CRT1 affects both soluble and insoluble phenolic compounds in its host plant under field cultivation. Because these responses are modulated by the environment, it is hypothesized that *A. lipoferum* CRT1-mediated improvement of host yield is, at least in part, linked to improved stress tolerance at early seedling stage.

References

El zemrani et al. *Plant Soil* (2007). 291:109-118.

Kim and Ralph. *Org. Biomol. Chem.* (2010). 8(3):576-591.

Walker et al., *New phytol.* (2011), 189: 494-506.

Mots-Clés : *Azospirillum*, lignin, maize, metabolomic profiling, PGPR, phenolic compounds

A metabolomics approach to decipher the metabolic response of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* to biotic pressures

**Thomas Leprêtre¹, Louis Bornancin¹, Oscar Merini², Isabelle Bonnard¹,
Suzanne Mills^{2,3}, Bernard Banaigs^{1,3}**

¹ Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) – Univ de Perpignan Via Domitia, École Pratique des Hautes Études [EPHE], CNRS : USR3278 – 58 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

² Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) – Univ de Perpignan Via Domitia, École Pratique des Hautes Études [EPHE], CNRS : USR3278 – BP 1013 Papetoai, Moorea, French Polynesia, France

³ Laboratoire d'Excellence « Corail » – Univ de Perpignan Via Domitia – 58 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

In the lagoon of Moorea, *Lyngbya majuscula* blooms ephemerally scudding across wide area. It is an occasionally toxic filamentous cyanobacterium, present in worldwide tropical and subtropical warm waters. *L. majuscula* is responsible of severe human injuries like dermatoses. This cyanobacterium is a rich source of bioactive compounds¹ like tiahuramides and trungapeptins, both taking part of the kulolid's family which are cyclic lipophilic depsipeptides. Tiahuramides have a weak apoptosis effect on sea urchin eggs and trungapeptin A exhibits ichthyotoxicity and toxicity against brine shrimp². *L. majuscula* also produces serinols, malyngamides derivatives with anti HIV activity³. Despite its metabolome has been quite well described, little is known about the ecological role of these secondary metabolites.

In its natural environment, *L. majuscula* is exposed to the herbivore pressure of a specific sea hare, *Stylocheilus striatus*⁴. In this context, what is the chemical response to this biotic stress?

To explore if sea hare grazing impacts the cyanobacterium inducing a phenotypic response, ecological bioassays have been conducted in the lagoon of Moorea combined with a metabolomic approach.

LC-ESI-MS analyses of the organic extracts of *L. majuscula* have been recorded. The LC-MS chromatograms have been carried out with a non targeted way and compared with R tools, XCMS followed by a post treatment with MZmine and statistical analyses using mixOmics and non parametric statistics. We noticed a *Lyngbya majuscula* response to *Stylocheilus striatus* presence through modification of its metabolome and highlighted some significant secondary metabolites modulated during herbivory.

Mots-Clés : *lyngbya majuscula*, metabolomic, chemical ecology, herbivore pressure, LC, ESI, MS, XCMS

Preliminary results of the first NMR ring test inside MetaboHUB IA project on NMR acquisition and annotation of the NIST standard reference material of human plasma (SRM1950)

Catherine Deborde, Mickaël Maucourt, Simon Roques, Dominique Rolin, Annick Moing, Claire Lopez, Marie Lagrée, Cyril Jousse, Mounir Traïkia, Tony Palama, Edern Cahoreau Lindsay Peyriga, Jean-Charles Portais, Alyssa Bouville, Cécile Canlet

MetaboHUB – INRA, Université de Bordeaux, Université de Clermont-Ferrand, CNRS, INSA, Université de Toulouse, Centre INRA de Bordeaux-Aquitaine, IBVM, CS 20032, 33140 Villenave d'Ornon, France

MetaboHUB is the French national infrastructure of metabolomics and fluxomics that provides tools and services to academic research teams and industrial partners in the fields of health, nutrition, agriculture, environment and biotechnology.

The standard reference material of human plasma (SRM1950) of the National Institute of Standards and Technology (NIST) was chosen to evaluate the 4 NMR sites of MetaboHUB (Bordeaux Metabolome Facility, Clermont-Ferrand PFEM, Toulouse MetaToul- Réseaux Métaboliques and MetaToul-AXIOM) in their way to (i) acquire 1D 1H-NMR and 2D 1H-13C-NMR spectra and annotate them using in-house NMR databases, PeakForest, HMDB or MMCD databases, and (ii) share know-how between sites.

Two of MetaboHUB sites were not familiarized with this kind of matrix, namely Bordeaux Metabolome Facility specialized in plant metabolomics and Toulouse MetaTOUL- Réseaux Métaboliques specialized in microbial metabolomics. The spectrometers used were a 500 MHz with a BBI RT-probe (5 mm NMR tube), a 500 MHz with a flow-cell probe (MetabolicProfiler), a 600 MHz with a cryo-probe (5 mm NMR tube), and a 800 MHz with a cryo-probe (3mm NMR tube), all with Bruker Avance III working unit.

One site was in charge of the preparation and distribution of the plasma NIST samples, ie MetaToul-AXIOM. Five hundred μL of plasma NIST sample was treated as follow, proteins were precipitated with methanol, the sample was centrifuged and the supernatant was evaporated under a nitrogen flux. The resulting deproteinized plasma was diluted with a solution of phosphate buffer (200 mM, pH 7) to a final volume of 600 μL for NMR tubes of diameter 5 mm and 200 μL for NMR tubes of diameter 3 mm and sent to other sites on dry ice.

In this poster, we will provide an overview of the metabolites detected in common and discuss the comparison with the results previously published on "native" plasma (Simón-Manso et al, 2013 and NIST website).

References

Simón-Manso et al., Metabolite profiling of a NIST Standard Reference Material for human plasma (SRM 1950): GC-MS, LC-MS, NMR, and clinical laboratory analyses, libraries, and web-based resources. *Anal Chem.* 2013 85:11725-11731.

NIST, 4 zooms of HSQC spectrum. <http://srm1950.nist.gov/nmr.php> 2013

HMDB: The Human Metabolome Database. Wishart et al, *Nucleic Acids Res.* 2007 <http://www.hmdb.ca>

MMCD: The Madison Metabolomics Consortium Database. Cui et al, *Nat Biotech.* 2008 <http://mmcd.nrmfam.wisc.edu/>

PeakForest: The MetaboHUB spectral database. Paulhe et al., A spectral reference database made from metabolomic experts for metabolomic analyses. 9 JS RFMF, Lille, France 2015. <http://www.peakforest.org>

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : NMR, plasma, NIST, metabolite, identification

LC-MS Separation and absolute quantification of new synthetic branched fatty acyl esters of hydroxyl-fatty acids in plasma

Fanny Viars¹, Laurence Balas², Alexis Pinet², Corinne Lefort³, Sylvie Caspar-Bauguy³, Dominique Langin³, Thierry Durand², Justine Bertrand¹

¹ MetaToul-Lipidomique (I2MC, MetaboHUB) – UMR1048 – INSERM et Université Paul Sabatier, Toulouse., France

² IBBM – CNRS : UMR5247 – UMR 5247, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

³ Obesity Research Laboratory, (I2MC U1048) – UMR1048 INSERM et Université Paul Sabatier, Toulouse., France

A new class of bioactive lipids has recently been reported (Yore et al, *Cell*, 2014). This family of branched fatty acyl esters of hydroxyl-fatty acids, named FAHFAs, consists of a large number of regioisomers formed by numerous combinations of fatty acids (FA) and hydroxyl-fatty acids (HFA). These FAHFA were detected in mammalian adipose tissue, in blood plasma but also in rodent and human foods.

While saturated fatty acids are usually associated with negative impacts on human health, the regioisomers 5-PAHSA and 9-PAHSA, two branched FAHFAs comprised of palmitic acid (PA) and hydroxystearic acid (HSA) with the ester bond located at position 5 and 9 respectively, exert a positive systemic effect on glucose metabolism. The synthetic 9-PAHSA also showed anti-inflammatory effects (Yore et al, *Cell*, 2014). The function of these molecules are not known yet but it seems already very important to be able to quantify them in biological matrix.

The aim of this work is to develop a LC-MS method to quantify this new family of lipid in human plasma. To develop such a method we need some pure standards, few of them are already commercial but some family were unavailable so chemists developed new strategies to obtain them (Balas et al, *submitted*). We improved the extraction and the SPE pre-concentration of FAHFA to optimized yield of extraction and matrix effect. The main effort was done to find new chromatographic conditions to accelerate the separation which was very long in published method (Zhang et al, *Nature protocols*, 2016) with the same efficacy. This optimization will be present with the first result obtained with plasma.

Mots-Clés : lipidomique, FAHFA, diabète, LC, MS

Endometriosis: clinical study of human serum and urine using metabolomics

**Justine Leenders¹, Bernadette Govaerts², Manon Martin², Michèle Nisolle³,
Carine Munaut⁴, Pascal De Tullio¹**

¹ Centre Interdisciplinaire de Recherche sur le Médicament (CIRM) – Institut de Pharmacie Quartier HOPITAL,
Av. Hippocrate, 15 (Bât. B36) Sart-Tilman B-4000 Liège, Belgique

² Institut de Statistique, Biostatistique et Sciences Actuarielles (ISBA),
Voie du Roman Pays 20, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgique

³ CHR de la citadelle - Gynécologie-obstétrique – Boulevard du Douzième de Ligne 1, 4000 Liège, Belgique

⁴ Laboratory of Tumor and Development Biology (GIGA-Cancer) – Université de Liège (ULg), Belgique

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity (Vercellini et al, 2013). It is a common gynecologic disease, affecting approximately 10% of women in reproductive age, and it is associated with infertility and pelvic pain (Guo et al, 2015). The current lack of blood tests or imaging techniques complicates the diagnosis (Vercellini et al, 2013). Nowadays, only laparoscopic surgery can confirm the presence of endometriosis, which delays the diagnosis up to 4 to 7 years (Guo et al, 2015). Therefore, a biomarker or a combination of biomarkers measurable in biofluids may lead to a starting point for the noninvasive diagnosis of endometriosis.

We performed a 1H Nuclear Magnetic Resonance (1H-NMR) metabolomics analysis on urine and serum samples from 90 patients with endometriosis, from 98 patients who underwent gynecological surgery such as tubal sterilization or salpingectomy ("operated controls") and from 24 young patients without gynecological intervention ("non-operated controls"). After classical metabolomics post-treatment and a statistical analysis (Principal Component Analysis) of serum spectra, no clear distinctions between the metabolic profiles of endometriotic and operated-control patients were observable. However a clear separation between endometriotic and non-operated controls groups was observed, leading to the identification of relevant changes in some metabolites levels. As for the lack of separation between endometriotic and operated-controls patients, 2 causes were identified. First, the age was significantly different between endometriotic and control patients. Second, most of control patients recruited for this study consulted initially for a gynecological issue, such as salpingectomy or ovarian cyst. These patients may thus be considered as "fake control patients", as they are indeed suffering from a gynecological issue. Consequently, we decided to collect a whole new set of serum and urine samples from younger patients without gynecological problem. Concerning urine samples, statistical analysis revealed a separation into 3 groups, mostly based on the difference of urine pH. These differences clearly complicate the analysis of the results.

This study demonstrates the complexity of this pathology and the difficulties to clearly identify relevant metabolic changes in serum that could lead to a possible identification of biomarkers. It highlights also the importance of the selected groups of patients that are included in the study.

References

Vercellini et al, Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 261–275 (2013).

Guo, Endometriosis and ovarian cancer: Potential benefits and harms of screening and risk-reducing surgery. *Fertil. Steril.* 104, 813–830 (2015).

Mots-Clés : endometriosis, NMR, blood, urine, clinical study

**Integrated metabolomic, lipidomic and steroidomic profiling
for revealing signatures and markers of effect
induced by bisphenols exposure on human testicular function**

**Anne-Lise Royer¹, Yann Guittou¹, Christelle Destoits-Lethimonier^{2,3},
Séverine Mazaud-Guittot^{2,3}, Bernard Jégou^{2,3}, Bruno Le Bizec¹, Jean-Philippe Antignac¹**

¹ LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA),
USC INRA 1329 (ONIRIS-Laberca) – Ministère de l'alimentation de l'agriculture et de la pêche – Nantes, France

² Université de Rennes I – Ministère chargé de l'enseignement supérieur et de la recherche,
Campus Beaulieu, Rennes, France

³ INSERM U1085 IRSET, SFR Biosit – Ministère chargé de l'enseignement supérieur et de la recherche,
Campus Beaulieu, Rennes, France

The Newplast research project (ANR-13-CESA-0012-01) focuses on substitutes and derivatives of bisphenol A (BPA) which are used in the manufacture of polycarbonate and epoxy resins, including food contact materials. Its global objective is to generate data and knowledge as regards (i) their biotransformation and biological impact on the human hepatic and reproductive functions, (ii) their modes of actions at molecular level through ligand-receptor binding / transactivation mechanisms and (iii) human external and internal exposure assessment. The effect of BPA and related substitutes (BPS and BPF) on testicular function was assessed on fetal (FEGA) and adult (TEXAS) models using an integrated metabolomic, lipidomic and steroidomic profiling approach. Three complementary workflows were then combined to generate a unique set of biological signatures as a support for markers of effect discovery. A rationalized sample preparation permitted to fractionate each characterized sample into one polar fraction for RPLC-ESI(+/-)-HRMS metabolomic profiling, and one apolar phase for RPLC-ESI(+/-)-HRMS lipidomic and GC-EI-MS/MS steroidomic profiling. Moreover a comprehensive characterization from both culture medium (exo-metabolome) and testicular tissue (endo-metabolome) was achieved. All together, obtained results give an extended picture of biological disruptions induced by BPA and two main substitutes (BPS and BPF) on human testicular target, including dose-responses and mixture effects. A set of annotated and particularly affected metabolites was revealed from each investigated metabolome sub-component.

Mots-Clés : data integration, bisphenols, human exposure

P60

Hippocampal metabolism in drug-resistant mesio-temporal lobe epilepsy: a HRMAS NMR study in a mouse model and on human resected tissue

Florence Fauvelle

Grenoble Institut des Neurosciences (GIN) – Inserm : U1216, Université Grenoble Alpes – Chemin Fortuné Ferrini, Bâtiment Edmond J Safra F-38700 La Tronche, France

Context: Mesio-temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most frequent focal epilepsy in adult and mostly does not respond to antiepileptic drugs. Most patients have experienced an initial traumatic event before the age of 4, that triggers a cascade of molecular mechanisms over a period of several years without clinical symptoms. During this "silent period", epileptogenesis takes place, leading ultimately to recurrent focal seizures. Drug-resistant patients may undergo surgery to remove the epileptic focus including the hippocampus.

The mouse model of MTLE induced by intrahippocampal injection of kainate (KA) recapitulates most of features of human MTLE. In this model, as well as in human pathology, the role of g-aminobutyric acid (GABA) seems to be quite controversial: a loss of GABAergic neurons has been described (Houser et al, 1996; Bouillere et al, 2000) suggesting a reduction of this neurotransmitter, whereas our recent data suggest a pivotal role of GABA in the triggering of seizures (Stamboulia et al, 2016).

Objectives: In this study, we analyzed the hippocampal metabolism 30 days after intrahippocampal injection of kainate, when seizures are established, to better understand the molecular mechanisms underlying MTLE. These data will be compared with those obtained with the same method in resected hippocampi from patients.

Methods: Animals: 50 nL of KA was injected in the dorsal right hippocampus (Heinrich et al, 2011; Riban et al, 2002). 30 days later brains were removed after decapitation and left and right hippocampi dissected and snap frozen in liquid nitrogen. Human tissues: biopsies were sampled in resected tissue, inserted in disposable inserts and stored at -80°C. Hippocampal sclerosis, the hallmark of MTLE, was verified by MRI and histology. HRMAS NMR: Proton HRMAS NMR spectra of biopsies were acquired at 11.7 T using a CPMG pulse sequence at 4 KHz spinning rate. Data analysis: 19 metabolites were quantified using jMRUI (<http://www.mrui.uab.es/mrui/>). PCA and OPLS-DA were performed for multivariate statistical analysis, and Mann-Whitney tests for univariate statistical analysis.

Results: 14 metabolites were modified in the dorsal right hippocampus with mainly a large increase of GABA and a decrease of N-acetylaspartate, glutamine, glutamate, compared to saline controls. These variations were gradually decreased in the ventral injected hippocampus and in the contralateral non-injected one. 14 humans epileptic hippocampi were also collected and analysed (5 patients without hippocampal sclerosis, 9 with sclerosis). Spectra have been acquired and are under analysis.

Discussion: The very large increase of GABA observed is in line with the role of this neurotransmitter in seizure initiation and will be discussed in light of human tissue data.

References

- Houser and Esclapez, 1996. *Epilepsy Research* 26, 207–218.
Bouillere et al, 2000. *Hippocampus* 10, 305–324.
Stamboulia et al, 2016. *Experimental Neurology*, In revision.
Heinrich et al, 2011. *Neurobiology of Disease* 42, 35–47. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.001
Riban et al, *Neuroscience* 112, 101–111.

Mots-Clés : HRMAS, epilepsy, mouse model, kainate, MTLE

P61

The HepaRG cell line: towards metabonomics-based phenotypic biomarkers of food contaminants exposure?

**Nicolas Cabaton¹, Maria-Hélène Meireles-Noguer², Cécile Canlet²,
Marie Tremblay-Franco², Daniel Zalko¹**

¹ *Toxalim, Université de Toulouse, INRA –UMR1331 – 180 chemin de tournefeuille 31300 Toulouse, France*

² *INRA Toxalim Axiom platform Metatoul Metabohub – UMR1331 – Toulouse, France*

Humans are daily exposed to a variety of man-made chemicals entering the food-web and/or present in the environment. Many are now known to behave as endocrine disruptors, and currently raise new challenges in the field of toxicology. Exposure can occur not only to parent molecules, but also to their metabolites, formed through biotic pathways. Some of these are sometimes involved in toxic mechanisms, either through the formation of reactive intermediates or that of biologically active metabolites.

Modern toxicology paradigms (low doses issues), the entering in force of specific regulations such as the REACH directive, but also the need to reduce the number of animals used for toxicity studies, now require the use of reliable in vitro tools, enabling to examine the potential effects of a variety of chemicals. Such tools should be as close as possible to human in vivo models. Ideally, hepatic in vitro models should express the largest as possible metabolic capabilities, both regarding general metabolism (main regulatory, anabolic and catabolic hepatic functions, among others) and xenobiotics metabolism, when attempting to accurately decipher the effects of the tested molecules.

Novel approaches in the field of metabolomics are being developed to highlight metabolic changes in organisms or biological systems exposed to nutritional, pharmacological, or toxic stimuli. The use of metabonomics to examine metabolic shifts induced in vitro by food contaminants including endocrine disruptors is expected to contribute to a better understanding of their capability to disrupt metabolic pathways, with possible extrapolation to human. In this context, the HepaRG cell line is a valuable model to perform both biotransformation and metabonomic studies. This particular cell line expresses high metabolic capabilities, like human primary hepatocytes, but with the advantage of having the indefinite growth capacity of hepatic cell lines. Metabonomic approaches were investigated on HepaRG cell extracts, after a 24-h exposure to low concentrations of food contaminants: bisphenol A (BPA), a model endocrine disruptor chemical, and Aflatoxin B1 (AFB1), a genotoxic food contaminant. Sample extracts were submitted to 1H NMR spectroscopy and NMR data were analyzed by multivariate statistical methods. We were able to discriminate between the control group and all BPA- or AFB1-exposed groups. Discriminant metabolites were then identified, showing a clear modulation of the HepaRG metabolome, which can be considered as a valuable model for toxicological studies, taking into account the biotransformation of xenobiotics, but also highly suitable for the study of subtle metabolic shifts, highlighted by metabolomic approaches.

Mots-Clés : metabolomics, food contaminants, in vitro model, toxicology, bisphenol A, aflatoxin B1

Études métabolomique et transcriptomique de la tolérance du Lin, *Linum usitatissimum*, à l'agent pathogène *Verticillium dahlia*

**Sylvain Lecomte¹, Mehdi Cherkaoui², Ophélie Fliniaux², Roland Molinié²,
Jean Xavier Fontaine², Christine Rusterucci², Dominique Cailleu³, Stéphanie Guenin⁴,
Gaëlle Mongelard⁴, Herve Demailly⁴, Luciane Zabijak⁵, Paulo Marcelo⁵,
Olivier Van Wuytwinkel², Reynald Tavernier⁶, Laurent Gutierrez⁴,
Christophe Pineau⁷, François Mesnard²**

¹ Laboratoire Biologie des Plantes et Innovation (BIOPI) - Linéa – Semences de Lin – Université de Picardie Jules Verne, EA3900 – Rue Dallery/Rue de Mai, Amiens, France

² Laboratoire de BIOlogie des Plantes et Innovation (BIOPI) – Université de Picardie Jules Verne : EA3900, 33 Rue Saint Leu, 80000 Amiens, France

³ Plateforme Analytique d'Amiens (PFA) – Université de Picardie Jules Verne – Rue Dallery/Rue de Mai Amiens, France

⁴ Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire (CRRBM) – Université de Picardie Jules Verne, Rue Dallery/Rue de Mai Amiens, France

⁵ Plateforme Imagerie Cellulaire et Analyses des Protéines (ICAP) – Université de Picardie Jules Verne, CURS CHU Amiens, France

⁶ Linéa - Semences de Lin – 20 Avenue Saget 60210 Grandvilliers, France

⁷ Linéa - Semences de Lin – Rue Dallery/Rue de Mai, Amiens, France

La verticilliose du lin est une pathologie vasculaire sévère causée par le champignon ascomycète tellurique *Verticillium dahliae*. Cette maladie, en recrudescence chez le lin, peut compromettre la récolte et provoquer une perte totale du rendement en fibres. Bien que *V. dahliae* infecte précocement les plantes, les conséquences les plus marquantes de la maladie n'apparaissent qu'après arrachage, lorsque les plantes de lin sont couchées au sol pour le rouissage. Cette maladie est encore peu connue chez le lin et son contrôle est complexe. D'une part, *V. dahliae* est capable de survivre dans le sol plusieurs années sous forme de microsclérotés. D'autre part, aucun traitement chimique n'est efficace et seules quelques variétés sont un peu moins sensibles. L'objectif est de définir les déterminants transcriptomiques et métabolomiques liés à la variabilité de la réponse de la plante au champignon afin d'identifier des marqueurs de résistance.

Pour réaliser les études transcriptomique et métabolomique, nous avons comparé le comportement de variétés contrastées (une sensible et une plus tolérante à la verticilliose) à l'aide d'un protocole d'infection artificielle en conditions contrôlées.

Des microarrays ont été réalisés sur les échantillons récoltés 7 jours après infection. Les gènes dont l'expression est significativement différente entre les plantes saines et infectées ont été sélectionnés. Les différences observées entre les deux lignées semblent indiquer la mise en place de stratégies de défense différentes. L'expression de ces gènes est suivie à 10, 15 et 20 jours après infection pour étudier leur rôle lors de l'infection.

Des analyses par spectroscopie RMN (extraction hydroalcoolique) ont été réalisées selon la même cinétique que pour les analyses transcriptomiques sur trois organes (racines, tiges, feuilles) des deux variétés dans les conditions saine et infectée. Les premières analyses montrent une atteinte différentielle du métabolisme dans les trois organes chez les deux variétés au cours du temps. L'identification des métabolites impliqués dans la réponse au stress est en cours de traitement. L'analyse sera ciblée sur les composants de la paroi végétale et sur le métabolisme secondaire.

D'autres analyses par spectroscopie RMN ont permis d'introduire l'annotation du spectre proton du *V. dahliae*.

La progression du champignon dans la plante est caractérisée au cours des trois premières semaines post-infection par quantification moléculaire en qPCR et par observation microscopique. Pour les observations microscopiques, la souche de *V. dahliae* isolée du champ d'essais a été transformée de façon à exprimer la GFP. Nous espérons compléter les données quantitatives, indiquant la présence du champignon dans l'ensemble de la plante, par des informations spatio-temporelles permettant de cartographier sa progression.

Les premiers résultats tendent à montrer que les plantes les plus tolérantes parviennent à maintenir une quantité plus faible de champignon que les plantes les plus sensibles lors de la croissance.

Mots-Clés : Lin, *verticillium*, stress biotique, défense des plantes, métabolomique, transcriptomique

P63

Increased metabolome identification coverage using optimized LC-MS-MS conditions on a Tribrid Orbitrap mass spectrometer

Reiko Kiyonami, Ralf Tautenhahn, David Peake, Ken Miller

Thermo Fisher Scientific – San Jose, États-Unis

Metabolomics has become essential for understanding cell biology, physiology and medicine by providing a direct functional readout of cellular biochemical state. Recent advances in UHPLC separation, high resolution accurate mass spectrometers and metabolite database annotations have allowed the rapid and sensitive detection of a variety of metabolites from biological samples with minimal sample preparation. However, metabolite identification from LC-MS based data sets remains challenging due to the presence of many isomeric and isobaric metabolites. In order to confidently identify metabolites high quality MS/MS or MSⁿ data are required for many of the m/z features captured during a metabolomics profiling experiment.

The new Thermo Scientific™ Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ mass spectrometer offers high sensitivity and fast scan speed (up to 20 Hz), enabling comprehensive coverage of MS/MS spectra of detected m/z features in a LC-MS-MS run. It also enables multiple dissociation techniques, including HCD and CID, to be performed in parallel during a single LC-MS-MS run, providing comprehensive fragment information per m/z feature for confident metabolite identification. Here we present that more than 200 metabolites can be simultaneously identified and quantified from human urine samples using optimized LC-MS-MS conditions on the Orbitrap Fusion Lumos MS. The dedicated untargeted metabolomics software (Thermo Scientific™ Compound Discoverer™ 2.0) is used for confident metabolite identification as well as differential and statistical analysis of the urine sample profiles.

Mots-Clés : Orbitrap, Tribrid, Compound Discoverer

P64

Zebiriosides A-P, oleanane saponins isolated by LC-SPE-NMR hyphenation from the roots of *Dendrobangia boliviana*

Ilhem Zebiri¹, Audrey Gratia¹, Mohamed Haddad², Laurent Duca³, Billy Cabanillas⁴, Lucie Paloque⁵, Michel Sauvain⁶, Elsa Rengifo⁴, Laurence Voutquenne-Nazabadioko¹

¹ Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) – Université de Reims - Champagne Ardenne, CNRS : UMR7312, UFR Sciences, BP1039, 51687 Reims Cedex 2, France

² UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France. (PHARMA-DEV), Université Paul - Sabatier Toulouse III, Institut de recherche pour le développement (IRD), 35 Chemin des Maraîchers 31400 Toulouse, France

³ UMR CNRS / URCA 7369 (MEDyC) – CNRS : UMR7369, Université de Reims - Champagne Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles Campus Moulin de la Housse 51687 Reims Cedex 2, France

⁴ Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana - IIAP (IIAP) – Av. Abelardo Quiñonez Km. 2.5, San Juan Bautista - Iquitos, Pérou

⁵ LCC CNRS, Groupe V « Nouvelles molécules antipaludiques et approches pharmacologiques » – CNRS : UPR8241, 205 route de Narbonne 31077 Toulouse cedex 4, France

⁶ Pharmacochimie et Pharmacologie Pour le Développement (PHARMA-DEV) – Université Paul Sabatier - Toulouse III, Institut de recherche pour le développement (IRD) – IRD, UMR 152 Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraîchers 31400 Toulouse, France

A phytochemical study of the roots of *Dendrobangia boliviana* allowed the identification of twenty saponins from which sixteen are new structures (Zebiriosides A-P). Fourteen saponins were isolated by using classical chromatographies technics (on silica gel and RP-18) and six minority saponins (four new and two known) were isolated and identified only by using hyphenated LC-SPE-NMR system. These saponins are glycosides of serjanic or phytolaccinic acid whose structures were established on the basis of their spectral data, mainly HR-TOFESIMS, 1D-NMR (1H, 13C, DEPT) and 2D-NMR (1H-1H COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, and ROESY), and by comparison with literature data. These compounds were evaluated for their cytotoxic, antileishmanial and hemolytic activities. No antileishmanial or hemolytic activities were revealed but zebirioside C and zebirioside I showed cytotoxicity against fibroblasts with IC50 of 6.4 and 5.6 µM, respectively.

Acknowledgements: Financial support by CNRS, Conseil Regional Champagne Ardenne, Conseil General de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) and EU-programme FEDER to the PIAnET CPER project is gratefully acknowledged.

Mots-Clés : *Dendrobangia boliviana*, Triterpenoid saponins, LC-NMR

P65

NMR-based strategies for high-throughput fluxomics

Edern Cahoreau^{1,2}, **Lindsay Peyriga**^{1,2}, **Cécilia Bergès**^{1,2},
Stephanie Heux¹, **Jean-Charles Portais**^{1,2,3}

¹ *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) – INSA,
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04, France*

² *Metatoul - Metabohub – INRA : UMR792, CNRS : UMR5504, INSA, France*

³ *Université Paul Sabatier-Toulouse III (UPS) – 118 Route de Narbonne 31062 Toulouse, France*

Fluxomics (i.e. measurement of intracellular metabolic fluxes from ¹³C-labelling experiments) is an unvaluable tool for the comprehensive investigation of metabolism and is growingly applied to a broad range of research fields, ranging from biotechnology to health. Fluxomics is originally a low throughput method, which limits the number of organisms (strains) and conditions which can be investigated. We have developed a fully integrated solution for high-throughput fluxome analysis which combines a robotic cultivation, a sampling workstation and a set of 1D and 2D NMR analyses (zqf-TOCSY, HSQC and Heteo-Jres2). This platform was applied to a set of bacterial strains and allowed 48 fluxomes to be profiled per run.

Remerciements : MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010)

Mots-Clés : NMR, ¹³C fluxomics, high throughput flux profiling

P66

Computers still need to master small molecules identification

Olivier Thomas¹, Grégory Genta-Jouve²

¹ National University of Ireland Galway (Marine Biodiscovery) – School of chemistry, College of science
University road, Galway Ireland, Irlande

² Université Paris Descartes (UMR CNRS 8638 COMETE) – 4 avenue de l'observatoire 75006 Paris, France

Earlier this year, a computer has beaten for the first time a human professional at Go. This ancient board game has long been viewed as one of the greatest challenges for artificial intelligence but another huge challenge for machine learning has to be considered: computer assisted structure elucidation (CASE). Despite the great progress in the field of computational mass spectrometry (MS), the results of the last critical assessment of small molecules identification (CASMI) contest in the natural products identification category has been won by a manual submission. Here we present an overview of the submissions received for the CASMI 2016 edition. A critical analysis of the main challenges for machine learning in MS to succeed in the near future will also be discussed.

Mots-Clés : CASMI, identification, machine learning, metabolites

P67

Systematic integration of “Omics” data to improve innovation in beer crafting

Barbara Dunn¹, Gina Tan², Andreas Huhmer², Daniel Lopez-Ferrer²

¹ Dept. of Genetics, Stanford University, Palo Alto, CA

² Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA

Innovation is having a large impact on the beer industry, especially in the microbrewery sector. Systems biology offers the possibility to better understand the different biological interactions in yeast strains allowing the production of genetically modified strains that bring uniqueness to the final product. We are presenting our efforts for explaining the differences between two popular beer strains, California Ale and Hefeweizen, using proteomic and metabolomics analyses. Generally, the fermentation process is divided into four phases known as lag, growth, fermentation and sedimentation. Ontology enrichment from the proteomic data using ProteinCenter showed, for the first time, stages in the fermentation process of both strains where cell wall synthesis is induced.

Proteomics analyses using ProteinCenter has shown, for the first time, cell wall synthesis induction in the different stages of the fermentation process. This was followed by initiation of glycolysis that leads to energy production and cell growth.

Metabolomics analyses revealed the absence of static metabolic phases. Instead, phases overlap allowing for the simultaneous growth and fermentation activity. The overlapping phases are a result of the high cell heterogeneity that makes individual cell to progress through fermentation at different rates which can be observed in the time-course progression of the individual metabolites. The coefficients of variation for those individual metabolites increase dramatically when overlap occurs.

Metabolomics data has also revealed that the two strains have different growth rates. This was further validated by proteomics analyses where a cluster of ribosomal proteins involved in growth showed significant differential expression rates.

It is well known that California Ale has a higher attenuation compared to the Hefeweizen strain which is due to the different expression of alcohol dehydrogenase enzymes. We also found that at the end of the fermentation process over 300 compounds were responsible for making these beers significantly different. Overall, the combination of the two omics-based high-throughput technologies with bioinformatic tools in a systems biology framework represents a valuable approach to exploring new products in the beer industry.

P68

Identification of phospholipid species implicated in dementia by untargeted high resolution LC/MS and data dependent MS/MS

D. A. Peake², M. Bowman², R. Kiyonami² and D. Li¹

¹University of Minnesota, Minneapolis, MN

²Thermo, San Jose, CA,

Background

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia in the elderly. Recently, Mapstone et al. reported a panel of plasma phospholipids that predicted cognitively normal adults who later progressed to either mild cognitive impairment or dementia due to AD (Mapstone 2014). This study used a targeted metabolomics p180 kit (Biocrates, Life Science AG, Austria) that measures phospholipids by infusion and selected reaction monitoring (SRM) with a triple quadrupole mass spectrometer. Since phospholipids have many isomers and isobars comprised of different combinations of fatty acids and alkyl/alkenyl ethers, it is not possible to assign unequivocally the phospholipid species using this low resolution approach. Identification of the fatty acid molecular identity of the phospholipids implicated in AD is critical for two reasons: (a) one needs to determine the functions of these phospholipids and their contributions to pathophysiology of the disease; and (b) one needs to determine the molecular identity before one can develop quantitative assays to measure these phospholipids in human plasma.

The objective of this study is to determine fatty acid constituents of 7 phosphatidylcholine (PC) lipids: PC 36:6, PC 38:0, PC 38:6, PC 40:1, PC 40:2, PC 40:6, and PC 40:6e (ether) in plasma by using liquid chromatography and high-resolution accurate mass and tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

Methods

A pool was made using plasma from 15 participants with normal cognition (n=5), mild cognitive impairment (n=5), and dementia (n=5). Twenty microliter of the pooled plasma was extracted using Chloroform, Methanol and Water containing internal standards lyso-phosphatidylcholine (LPC) 17:1 and PC 17:0/14:1 (Avanti Polar Lipids, Alabama). Plasma lipid extracts (2 μ L) were separated by ultra high-pressure liquid chromatography (Dionex 3000-RSLC HPG) using a C30 Acclaim column (2.1 X 150 mm, 3.0 μ m) and analyzed with a Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos mass spectrometer. LC/MS and MS/MS data were obtained at 120,000 and 30,000 mass resolving power, respectively. Samples were run in duplicate in positive and negative mode. The HPLC gradient was 60:40 ACN/water to 90:10 IPA/ACN (0.1% formic acid and 10mM ammonium formate) in 30 minutes. Thermo Scientific LipidSearch 4.1 SP1 software was used for molecular lipid identification.

Results

LipidSearch software identified that the plasma PC 36:6 is primarily PC 14:0_22:6; PC 40:2 is PC 22:0_18:2; and PC 40:6 is PC 18:0_22:6. The PC ae 40:6 is a mixture of 18:1e_22:5 and 20:2e_20:4; and PC aa C38:6 is a mixture of 16:0_22:6, 18:1_20:5 and 18:2_20:4 PC species. However, we could not confirm the fatty acid molecular identity for PC 38:0 or PC 40:1. The PC 38:0 species was in fact identified as PC 18.1e_22:6 (m/z 818.6058, M+H) instead of PC 38:0 (m/z 818.6633, M+H). This was confirmed by MS/MS of the negatively-charged formate adduct of 40:7e (m/z 862.5967, M+HCOO).

Conclusions

Identification of the fatty acid composition of these phospholipids will enable us to develop quantitative methods in order to understand their potential roles in AD.

References

Mapstone et al. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature Medicine*. 2014, 20(4):415-8.

Caractérisations chimique et biologique de composés discriminants au sein du métabolome symbiotique *Alnus viridis*-*Frankia*

**Rémy Marcellin-Gros¹, Aude Herrera-Belaroussi², Marjolaine Rey¹, Thi Van Anh Huynh¹,
Amélie Degunst¹, Hasna Boubakri² et Anne-Emmanuelle Hay*,¹**

¹CESN, CNRS-UMR 5557, Écologie Microbienne, INRA-UMR 1418, Villeurbanne, France

²CNRS-UMR 5557, Écologie Microbienne, INRA-UMR 1418, Villeurbanne, France

*hay.de-bettignies@univ-lyon1.fr

L'association entre *Alnus spp* et l'actinobactérie *Frankia* s'inscrit dans le cadre des symbioses actinorhiziennes. Au cours de cette interaction, *Frankia* induit chez sa plante-hôte, la formation d'un nouvel organe au niveau racinaire, le nodule, au sein duquel ont lieu des échanges trophiques entre les deux partenaires. La bactérie fournit à l'hôte de l'azote réduit, grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et bénéficie en retour des composés carbonés issu de la photosynthèse de la plante. Ces échanges trophiques à bénéfices réciproques entre les plantes actinorhiziennes et leur symbiote expliquent leur caractère de plantes pionnières, capables de coloniser des milieux instables. Cependant, les molécules et voies métaboliques impliquées dans cette symbiose restent à ce jour très peu décrites (Lundberg & Lundquist, 2004 ; Berry *et al.*, 2011). Récemment, une étude exploratoire globale des métabolites présents dans des nodules d'*Alnus viridis* et des racines associées a été réalisée au laboratoire (43 échantillons de nodules et racines prélevés sur 6 aulnaies géographiquement distinctes ont été analysés). L'objectif est de **mettre en évidence et caractériser les métabolites spécifiquement exprimés dans chaque organe végétal associé (nodule ou non (racine) à la bactérie**. Les profils métaboliques des extraits polaires (Méthanol/Eau) de nodules et racines obtenus par UHPLC/UV/ESI-MS, CPG/MS ou HPLC/UV-DAD ont permis de comparer la composition en métabolites primaires (acides aminés, acides organiques et sucres) et secondaires. Les tests de comparaison de moyenne (Wilcoxon) ont conduit à lister 17 acides organiques/sucres, 20 acides aminés et 48 métabolites secondaires significativement différents entre les nodules et les racines. Parmi les 48 métabolites secondaires, 7 ont pu être purifiés et leur identification par RMN est en cours. Les métabolites primaires ont pour leur part pu être caractérisé par comparaison avec une base de données ou à l'aide de standards. L'effet stimulateur ou inhibiteur sur la croissance des bactéries et leur capacité à fixer l'azote sera évalué pour chacun des composés discriminant.

Références bibliographiques :

Berry Alison, A. Mendoza-Herrera, Y-Y. Guo, J. Hayashi, T. Persson, R. Barabote, K. Demchenko, S. Zhang, K. Pawlowski, 2011. New perspectives on nodule nitrogen assimilation in actinorhizal symbioses. *Functional Plant biology*, 38: 645-652.

Lundberg Peter, P-O. Lundquist, 2004. Primary metabolism in N₂-fixing *Alnus incana*-*Frankia* symbiotic root nodules studied with ¹⁵N and ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, 219: 661-672.

Mots clés : Métabolome symbiotique, *Alnus*, *Frankia*, tests in-vitro (ARA, IRA), UHPLC, GC, MS, acides aminés, sucres, métabolites secondaires.

Liste des participants

LASTNAME	Firstname	Affiliation	city	country	mail
ALALI	Mellis	HSM Faculté de pharmacie	Montpellier	FR	mellis.alali@gmail.com
ALEXANDRE-GOUABAU	Marie-Cécile	INRA-UMR PhAN	Nantes	FR	marie-cecile.alexandre-gouabau@univ-nantes.fr
ALLARD	Pierre-Marie	Université de Genève	Genève	CH	pierre-marie.allard@unige.ch
AMIEL	Aurélien	METABOHUB METATOUL AXIOM	Toulouse	FR	aurelien.amiel@toulouse.inra.fr
AROS-CALT	Sandrine	MedDay Pharmaceuticals	Gif-Sur-Yvette	FR	saros.calt@gmail.com
ASSEMAT	Olivier	Bruker BioSpin	Wissembourg	FR	olivier.assemat@bruker.com
BAGHDIKIAN	Béatrice	Faculté de PHARMACIE Aix Marseille Université	Marseille	FR	beatrice.baghdikian@univ-amu.fr
BALTENWECK	Raymonde	UDS-INRA Colmar équipe MSV	Colmar	FR	raymonde.baltenweck@colmar.inra.fr
BANAIGS	Bernard	USR 3278 - CRIOBE - UPVD	Perpignan	FR	banaigs@univ-perp.fr
BARBIER SAINT HILAIRE	Pierre	Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	pierre.barbiersainthilaire@cea.fr
BATUT	Aurélien	Métatoul_Plateau lipidomique	Toulouse	FR	aurelie.batut@inserm.fr
BAYLE	Marie-Laure	ROVALTAIN RESEARCH COMPANY (RRCo)	Valence	FR	mlbayle@rovaltainresearch.com
BELLVERT	Floriant	LISBP - INSA de Toulouse INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792	Toulouse	FR	floriant.bellvert@insa-toulouse.fr
BEN JRAD	Amani	CRIOBE USR 3278 - EHPE - CNRS-UPVD	Perpignan	FR	amani.benjrads@etudiant.univ-perp.fr
BENNOUNA	Djawed	UMR N.O.R.T. (INSERM 1062 / INRA 1260 / AMU) Marseille	Marseille	FR	djawed.bennouna@univ-amu.fr
BERDI	Mikail	Laboratoire d'étude du métabolisme des médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	mikail.berdi@cea.fr
BERGE	Odile	INRA PACA	Avignon	FR	odile.berge@avignon.inra.fr
BERGES	Cécilia	Plateforme Metatoul	Toulouse	FR	berges@insa-toulouse.fr
BERNILLON	Stéphane	INRA UMR1332 BFP - PMB	Villeneuve d'Ornon	FR	stephane.bernillon@bordeaux.inra.fr
BERTHO	Gildas	Université Paris Descartes	Paris	FR	gildas.bertho@parisdescartes.fr
BERTRAND	Samuel	Mer, Molécules, Santé - EA2160 - Université de Nantes	Nantes	FR	samuel.bertrand@univ-nantes.fr
BERTRAND	Marylène	CNRS Orléans	Orléans	FR	marylene.bertrand@cnrs-orleans.fr

BERTRAND	Cédric	USR 3278 - CRIOBE - UPVD	Perpignan	FR	cedric.bertrand@univ-perp.fr
BERTRAND-MICHEL	Justine	MetaToul-Lipidomique	Toulouse	FR	justine.bertrand-michel@inserm.fr
BILIAUT	Emeline	Unité métabolomique et protéomique	Lyon	FR	emeline.biliaut@bioaster.org
BLOEM	Audrey	UMR SPO	Montpellier	FR	audrey.bloem@univ-montp1.fr
BOCCARD	Julien	Ecole des Sciences Pharmaceutiques Genève-Lausanne	Genève	CH	julien.boccard@unige.ch
BONNARD-CUSSAC	Isabelle	USR 3278 - CRIOBE - UPVD	Perpignan	FR	isabelle.bonnard@univ-perp.fr
BONNEFILLE	Bénilde	Hydrosiences Montpellier	Montpellier	FR	bonnefille.beniilde@gmail.com
BORNET	Aurélien	EPFL - LRMB	Lausanne	CH	aurelien.bornet@epfl.ch
BORNET	Olivier	IMM CNRS Marseille	Marseille	FR	bornet@imm.cnrs.fr
BOUCHEMAL	Nadia	CSPBAT - UMR CNRS 7244 Université Paris 13	Bobigny	FR	nadia.bouchemal@univ-paris13.fr
BOUCHEREAU	Alain	IGEPP, UMR 149 INRA-AGROCAMPUS OUEST-UNIVERSITE DE RENNES 1	Le Rheu	FR	alain.bouchereau@univ-rennes1.fr
BOUCHET	Sandrine	Paris Sud	Paris	FR	-
BOUDRA	Hamid	INRA	Saint-Genès- Champanelle	FR	abdelhamid.boudra@clermont.inra.fr
BRANDOLINI-BUNLON	Marion	INRA Theix - UNH (UMR 1019) - PFEM	Saint-Genès- Champanelle	FR	marion.brandolini@clermont.inra.fr
BROUDIN	Simon	PROFILOMIC	Boulogne Billancourt	FR	simon.broudin@profilomic.com
BRUNCHAULT	Valérie	Inserm 1048 / I2MC	Toulouse	FR	valerie.brunchault@inserm.fr
BUFFIN-MEYER	Bénédicte	Inserm 1048 / I2MC	Toulouse	FR	benedicte.buffin-meyer@inserm.fr
BUN	Sok-Siya	Faculté de Pharmacie Aix Marseille Université	Marseille	FR	sok-siya.bun@univ-amu.fr
BUNESCU	Andrei	Bioaster unité métabolomique et protéomique	Lyon	FR	andrei.bunescu@bioaster.org
BUONOMO	Antoine	ROVALTAIN RESEARCH COMPANY (RRCo)	Valence	FR	abuonomo@rovaltainresearch.com
BURGESS	Karl	University of Glasgow	Glasgow	GB	karl.burgess@glasgow.ac.uk
BUTIN	Noémie	Laboratoire d'étude du métabolisme des médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	noemie.butin@cea.fr
CABATON	Nicolas	INRA TOXALIM	Toulouse	FR	nicolas.cabaton@toulouse.inra.fr

CAHOREAU	Edern	MetaToul Plaform - LISBP - INSA de Toulouse - INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792	Toulouse	FR	cahoreau@insa-toulouse.fr
CALDERARI	Sophie	INRA UMR 1198 BDR	Jouy-en-Josas	FR	sophie.calderari@jouy.inra.fr
CAMPA	Claudine	IRD, UMR IPME	Montpellier	FR	claudine.campa@ird.fr
CANLET	Cecile	MetaboHUB-MetaToul-AXIOM	Toulouse	FR	cecile.canlet@toulouse.inra.fr
CANNET	Claire	Bruker BioSpin	Rheinstetten	GE	claire.cannet@bruker.com
CARADEUC	Cédric	Université Paris Descartes	Paris	FR	cedric.caradeuc@parisdescartes.fr
CASTELLI	Florence	Laboratoire d'étude du métabolisme des médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	florence.castelli@cea.fr
CERVEAU	Laurent	R.I.C.	Saint-Priest	FR	laurent.cerveau@ric.eu
CHATTOU	Houria	Université Paris 13/CNRS UMR 7244	Bobigny	FR	houriachattou@hotmail.fr
CHEYNIER	Véronique	INRA	Montpellier	FR	chevnier@supagro.inra.fr
CISSE	Madi	Inserm U1194 - Université Montpellier - ICM	Montpellier	FR	madi.cisse@inserm.fr
CLAVEL	Thierry	Université d'Avignon	Avignon	FR	thierry.clavel@univ-avignon.fr
COLOMBIE	Sophie	INRA UMR1332 BFP	Villeneuve d'Ornon	FR	sophie.colombie@bordeaux.inra.fr
COLSCH	Benoit	Laboratoire d'étude du métabolisme des médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	benoit.colsch@cea.fr
COMBELLES	Catherine	INRA & Middlebury College	Toulouse	USA	ccombelle@middlebury.edu
COMTE	Blandine	INRA UNH-MAPPING	Saint-Genès-Champanelle	FR	blandine.comte@clermont.inra.fr
CORBIN	Agnès	WATERS	Saint-quentin en Yvelines	FR	agnes_corbin@waters.com
CORCOS	Laurent	INSERM DR Grand Ouest	Brest	FR	Laurent.corcos@inserm.fr
COURANT	Frédérique	UMR 5569 Hydrosociences	Montpellier	FR	frederique.courant@umontpellier.fr
DALLE	Céline	INRA Theix - UNH (UMR1019) - PFEM	Saint-Genès-Champanelle	FR	celine.dalle@hotmail.fr
DAMONT	Annelaure	Laboratoire d'étude du métabolisme des médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	annelaure.damont@cea.fr
DE TULLIO	Pascal	Centre Interdisciplinaire de Recherche du médicament	Liège	BEL	p.detullio@ulg.ac.be
DEBORDE	Catherine	UMR1332 BFP & PF Métabolome Bordeaux	Villeneuve d'Ornon	FR	cdeborde@bordeaux.inra.fr

DECHAUMET	Sylvain	IGEPP	Le Rheu	FR	sylvain.dechaumet@rennes.inra.fr
DECOURTIL	Cédric	BIOPI EA 3900, UPJV	Amiens	FR	cedric.decourtil@u-picardie.fr
DEFOORT	Catherine	AMU Faculté de Médecine	Marseille	FR	catherine.defoort@univ-amu.fr
DELABRIERE	Alexis	Laboratoire d'Analyse des Données et d'Analys des Systèmes, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	alexis.delabriere@cea.fr
DELCAMBRE	Adéline	METABOHUB METATOUL AXIOM	Toulouse	FR	adeline.delcambre@toulouse.inra.fr
DESOUBZDANNE	Denis	IRBA	Brétigny-Sur-Orge	FR	denis.desoubzdanne@irba.fr
DEVALCKENEER	Aude	Laboratoire de Biologie humaine et Toxicologie Umons	Mons	BEL	aude.devalckeneer@umons.ac.be
DIEME	Binta	université Aix-Marseille - Plateforme BIOMET	Marseille	FR	bintdiem88@yahoo.fr
DREHER	Leslie	Sigma-Aldrich groupe Merck	Saint Quentin Fallavier	FR	leslie.dreher@sial.com
DUPORT	Catherine	UMR408SQPOV	Avignon	FR	catherine.duport@univ-avignon.fr
EDISON	Art	University of Georgia		USA	aedison@uga.edu
EDISON	Katherine	University of Georgia		USA	-
EMERY	Sylvain	INRA PFEM	Saint-Genès-Champanelle	FR	sylvain.emery@clermont.inra.fr
EMOND	Patrick	INSERM 930	Tours	FR	emond@univ-tours.fr
ESCANDE	Aurélié	Hydrosciences Montpellier	Montpellier	FR	aurelie.escande@umontpellier.fr
ESPOSITO	Melissa	Université de Corse / ICSN-CNRS	Gif-Sur-Yvette		melissa.esposito@cnsr.fr
EVRRARD	Nathalie	Université Paris Descartes	Paris	FR	nathalie.evrard@parisdescartes.fr
FALCAO	Leila	R&D Nutrition and Health Naturex	Avignon	FR	l.falcao@naturex.com
FALL	Fanta	CRNH Nantes	Nantes	FR	falfanta92@hotmail.com
FARJON	Jonathan	Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO)	Orsay	FR	jonathan.farjon@u-psud.fr
FAUVELLE	Florence	Grenoble Institut des Neurosciences - IRMaGe	La Tronche	FR	fauvellf@ujf-grenoble.fr
FAVE	Gaëlle	NORT (Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique), UMR INSERM 1062 / INRA 1260	Marseille	FR	gaelle.fave@univ-amu.fr
FENAILLE	François	Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	francois.fenaille@cea.fr

FENET	Hélène	Hydrosiences Montpellier	Montpellier	FR	helene.fenet@umontpellier.fr
FERAUD	Baptiste	ISBA - Université Catholique de Louvain	Louvain-La-Neuve	BEL	baptiste.feraud@uclouvain.be
FIORINI	Christel	INSTITUT DE RECHERCHE PIERRE FABRE - laboratoire des Produits Végétaux	Toulouse	FR	christel.fiorini.puybaret@pierre-fabre.com
FLINIAUX	Ophélie	BIOPI - UPJV	Amiens	FR	ophelie.fliniaux@u-picardie.fr
FOLZ	Sébastien	Thermo Fisher Scientific	Villebon Courtaboeuf		sebastien.folz@thermofisher.com
FRAINAY	Clément	INRA TOXALIM	Toulouse	FR	clement.frainay@toulouse.inra.fr
FRASER	Karl	UMR N.O.R.T. (INSERM 1062 / INRA 1260 / AMU)	Palmerston North	NZ	karl.fraser@univ-amu.fr
GALLART-AYALA	Hector	University of Barcelona	Barcelona	ESP	hector.gallart@gmail.com
GARCIA	Arnaud	IFR	Norwich	GB	arnaud-garcia@orange.fr
GATIEN	Julie	ALLICE	Paris	FR	
GEMONET	Jonathan	Proteigene	Saint Marce	FR	gemonet@proteigene.com
GENTA-JOUEV	Grégory	UMR CNRS 8638 COMETE	Paris	FR	gregory.genta-jouve@parisdescartes.fr
GIL	Mélie	Université Montpellier	Montpellier	FR	melodie.gil@univ-montp1.fr
GIRAUDEAU	Patrick	CEISAM-Université de Nantes	Nantes	FR	patrick.giraudeau@univ-nantes.fr
GOMEZ	Elena	Hydrosiences Montpellier	Montpellier	FR	egomez@univ-montp2.fr
GONCALVES	Olivier	Université de Nantes - GEPEA	Saint-Nazaire	FR	olivier.goncalves@univ-nantes.fr
GONCALVES-MARTINS	Max	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Lyon	FR	maximilien.goncalves-martins@univ-lyon1.fr
GONTIER	Eric	Université de Picardie Jules Verne	Amiens	FR	eric.gontier@u-picardie.fr
GOOSSENS	Corentine	CSPBAT, Bobigny	Brunoy	FR	corentine.goosens@gmail.com
GRABER	Marianne	UMR CNRS 7266 LIENSs	La Rochelle	FR	mgrabert@univ-lr.fr
GRASSIN DELYLE	Stanislas	Plateforme de spectrométrie de masse, Université Versailles Saint Quentin	Montigny Le Bretonneux	FR	stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr
GROLET	Florine	INRA	Montpellier	FR	florine.grolet@supagro.inra.fr
GUERIN	Fabien	Thermo Fisher Scientific	Villebon Courtaboeuf	FR	fabien.guerin@thermofisher.com

GUIGONIS	Jean-Marie	Plateforme Bernard ROSSI	Nice	FR	guigonis@unice.fr
GUITTON	Yann	LABERCA - Oniris	Nantes	FR	yann.guitton@oniris-nantes.fr
HABCHI	Baninia	INRA, Agroparistech	Paris	FR	baninia.habchi@agroparistech.fr
HADDAD	Mohamed	IRD - UMR 152 Pharma-DEV	Toulouse	FR	mohamed.haddad@ird.fr
HALTER	David	INRA Colmar équipe MSV	Colmar	FR	david.halter@colmar.inra.fr
HAMZAOUI	Jihane	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Villeurbanne	FR	jihane.hamzaoui@univ-lyon1.fr
HANSEN	Sylvain	University of Liège	Liège	BEL	sylvain.hansen@ulg.ac.be
HAY	Anne-Emmanuelle	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Lyon	FR	hay.de-bettignies@univ-lyon1.fr
HERBETTE	Gaetan	Aix-Marseille Université	Marseille	FR	gaetan.herbette@univ-amu.fr
HILL	Elizabeth	University of Sussex	Brighton	UK	e.m.Hill@sussex.ac.uk
HOURIET	Joëlle	Université de Genève	Genève	CH	joelle.houriet@unige.ch
HUTINEL	Olivier	SCIEX	Villebon sur Yvette	FR	Olivier.Hutinel@sciex.com
HYBOIS	Mickael	WATERS	Saint-quentin en Yvelines	FR	mickael_hybois@waters.com
IVANISEVIC	Julijana	Metabolomics Research Platform, University of Lausanne	Lausanne	CH	julijana.ivanisevic@unil.ch
JACOB	Daniel	INRA UMR1332 BFP & PF Métabolome Bordeaux	Villeneuve d'Ornon	FR	djacob@bordeaux.inra.fr
JAMIN	Emilien	MetaToul-AXIOM-MetaboHub	Toulouse	FR	jamin@toulouse.inra.fr
JOBARD	Elodie	ISA-CRMN / Centre Léon Bérard, Lyon	Villeurbanne	FR	elodie.jobard@ens-lyon.fr
JONARD	Catherine	INRA - P2M2	Le Rheu	FR	catherine.jonard@rennes.inra.fr
JORGE	Lucie	R.IC.	Coutraï	BEL	lucie.jorge@richrom.com
JOURDAIN	Sabine	BRUKER	Champs Sur Marnes	FR	sabine.jourdain@bruker.com
JOURDAN	Fabien	UMR1331 TOXALIM	Toulouse	FR	fabien.jourdan@toulouse.inra.fr
JOUSSE	Cyril	ICCF-UMR6296 / PFEM	Aubière	FR	cyril.jousse@univ-bpclermont.fr
JUNOT	Christophe	Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, CEA	Gif-Sur-Yvette	FR	christophe.iunot@cea.fr

KATEB	Fatiha	UMR8601 CNRS	Paris	FR	fatiha.kateb@parisdescartes.fr
KERZAON	Isabelle	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Lyon	FR	isabelle.kerzaon@univ-lyon1.fr
KHOURY	Spiro	UNH - INRA (Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme PFEM)	Saint-Genès-Champanelle	FR	spiro.khoury@clermont.inra.fr
KIEFER	Patrick	ETH Zurich	Zurich	CH	patrick.kiefer@micro.biol.ethz.ch
LACROIX	Matthieu	INSERM U1194	Montpellier	FR	matthieu.lacroix@inserm.fr
LAGREE	Marie	PFEM	Aubière	FR	marie.lagree@univ-bpclermont.fr
LALANDE	Julie	EVEAR EXTRACTION	Coutures	FR	j.lalande-martin@evear-extraction.com
LE CAM	Laurent	INSERM U1194	Montpellier	FR	laurent.lecam@inserm.fr
LE FAOUDER	Pauline	MétaToul-Lipidomique	Toulouse	FR	pauline.le-faouder@inserm.fr
LE GALL	Hyacinthe	Laboratoire BIOPI EA 3900 - UPJV - Amiens	Amiens	FR	hyacinthe.le.gall@u-picardie.fr
LE GOUELLEC	Audrey	Université Grenoble Alpes	La Tronche	FR	alegouellec@chu-grenoble.fr
LE GUEDARD	Marina	LEB AQUITAINE TRANSFERT - ADERA	Villeneuve d'Ornon	FR	marina.le-guedard@u-bordeaux.fr
LE MOYEC	Laurence	UBIAE- Université d'Evry Val d'Essonne	Evry	FR	laurence.lemoyec@univ-evry.fr
LECOMTE	Sylvain	Biologie des Plantes et Innovation - Linéa, Semences de Lin	Amiens	FR	slecomte@linea-semences.com
LEENDERS	Justine	CURM	Liège	BEL	jleenders@ulg.ac.be
LEFEBVRE	Marie	INRA UMR1332 BFP & PMB-MetaboHUB	Villeneuve d'Ornon	FR	marie.lefebvre@bordeaux.inra.fr
LEGENDRE	Laurent	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Villeurbanne	FR	laurent.legendre@univ-lyon1.fr
LEGOUPIL	Thierry	Shimadzu France	Marne La Vallée	FR	tl@shimadzu.fr
LEMAIRE	Virginie	Sigma-Aldrich groupe Merck	Saint Quentin Fallavier	FR	virginie.lemaire@sial.com
LEPRETRE	Thomas	UPVD	Perpignan	FR	lcbe@univ-perp.fr
LIEBEN	Pascale	INRA - Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires	Versailles	FR	pascale.lieben@grignon.inra.fr
LINARES	Laetitia	IRCM, INSERM U1194	Montpellier	FR	laetitia.linares@inserm.fr
LIU	Zhicheng	Laboratoire de Chimie, Structures et Propriétés de Biomateriaux et d'Agents Therapeutiques	Bobigny	FR	zhicheng.liu1988@gmail.com

LOMBARD	Marie-Lou	UMR1332 BFP & PF Métabolome Bordeaux	Villeneuve d'Ornon	FR	lombard@bordeaux.inra.fr
LUGAN	Raphael	UMR Qualisud	Avignon	FR	raphael.lugan@univ-avignon.fr
MADJI HOUNOUM	Blandine	INSERM U930	Tours	FR	madjihounoum@yahoo.fr
MAOUT	Etienne	Shimadzu France	Marne La Vallée	FR	em@shimadzu.fr
MARCELLIN-GROS	Rémy	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Lyon	FR	remymg@outlook.com
MARFISI	Claude	LEA/BRUKER	Aix en Provence	FR	claudemarfisi@lea-instruments.fr
MARNET	Nathalie	INRA	Le Rheu	FR	nathalie.marnet@rennes.inra.fr
MARTIN	Jean-Charles	BIOMET	Marseille	FR	jean-charles.martin@univ-amu.fr
MARTIN	Jean-François	INRA AXIOM METATOUL	Toulouse	FR	jfmartin@toulouse.inra.fr
MASSON	Perrine	Technologie Servier	Orléans	FR	perrine.masson@servier.com
MATHON	Caroline	Karolinska Institutet	Lidingo	SWE	carolinemathon@hotmail.fr
MAUCOURT	Mickaël	UMR1332 BFP & PMB-MetaboHUB	Villeneuve d'Ornon	FR	maucourt@bordeaux.inra.fr
MAVEL	Sylvie	INSERM U930, TOURS	Tours	FR	mavel@univ-tours.fr
MBAKIDI-NGOUABY	Henri	Université de Limoges	Limoges	FR	pmbakidi@yahoo.fr
MEHL	Florence	Université de Lausanne	Lausanne	CH	florence.mehl@unil.ch
MEIFFREN	Guillaume	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Lyon	FR	guillaume.meiffren@univ-lyon1.fr
MERCIER	Pascal	Chenomx Inc	Edmonton	CAN	PMercier@chenomx.com
MESNARD	Francois	BIOPI - UPJV	Amiens	FR	francois.mesnard@u-picardie.fr
MEUDEC	Emmanuelle	INRA	Montpellier	FR	meudec@supagro.inra.fr
MICHALET	Serge	Centre d'Etude des Substances Naturelles	Villeurbanne	FR	serge.michalet@univ-lyon1.fr
MICHEL	Alain	UMR QualiSud	Montpellier	FR	amichel@univ-montp1.fr
MOMPELAT	Sophie	ANSES- Laboratoire de Fougères	Fougeres	FR	sophie.mompelat@anses.fr
MONDEGUER	Florence	Laboratoire Phycotoxines IFREMER	Nantes	FR	fmondeg@ifremer.fr
MORREEL	Kris	VIB department of Plant	Gent	BEL	kris.morreel@psb.vib-ugent.be

MOTTELET	Stéphane	Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable EA 4297	Compiègne	FR	stephane.mottelet@utc.fr
NADAL-DESBARATS	Lydie	INSERM U930	Tours	FR	nadal@med.univ-tours.fr
NICOLE	Florence	LBVpam, Univ Lyon, UJM-Saint-Etienne	Saint Etienne	FR	florence.nicole@univ-st-etienne.fr
NIDELET	Thibault	INRA	Montpellier	FR	thibault.nidelet@supagro.inra.fr
NOTHIAS	Louis-Félix	Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center	San Diego	USA	nothias@ucsd.edu
PAVAGEAU	Marie-Pierre	Thermo Fisher Scientific	Villebon-sur-Yvette	FR	marie-pierre.pavageau@thermofisher.com
PEYRIGA	Lindsay	LISBP/INRA - MetaToul	Toulouse	FR	peyriga@insa-toulouse.fr
PICOT-GROZ	Marina	Hydrosiences Montpellier	Montpellier	FR	marina.picot-groz@umontpellier.fr
PINASSEAU	Lucie	INRA	Montpellier	FR	lucie.pinasseau@supagro.inra.fr
POLLET	Brigitte	INRA Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires	Versailles	FR	brigitte.pollet@grignon.inra.fr
PONTARIN	Nicole	BIOPI (UPJV)	Amiens	FR	nicole.pontarin@u-picardie.fr
PORTAIS	Jean-Charles	MetaTOUL- MetaboHUB	Toulouse	FR	portais@insa-toulouse.fr
POUYET	Corinne	Inra Theix	Ceyrat	FR	corinne.pouyet@clermont.inra.fr
PROUTEAU	Laura	INRA PFEM	Saint-Genès- Champanelle	FR	laura.prouteau@clermont.inra.fr
PUJOS-GUILLOT	Estelle	INRA, UNH, PFEM	Theix	FR	estelle.pujos@clermont.inra.fr
RATHAHAO-PARIS	Estelle	UMR GENIAL, laboratoire de Chimie Analytique	Paris	FR	rathahao@agroparistech.fr
RENAUD	David	IGEPP - Equipe EGI	Le Rheu	FR	david.renaud@rennes.inra.fr
REVERSAT	Guillaume	IBMM MONTPELLIER	Montpellier	FR	guillaume.reversat@umontpellier.fr
REY	Marjolaine	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Lyon	FR	marjolaine.rey@univ-lyon1.fr
REYNES	Christelle	Université de Montpellier - IGF	Montpellier	FR	christelle.reynes@umontpellier.fr
REZIG	Lamya		Marseille	FR	lamya.rezig@gmail.com
RIMASSON	Dominique	Sigma-Aldrich groupe Merck	Saint Quentin Fallavier	FR	Dominique.rimasson@sial.com
RIOLS	Fabien	Plateau Métatoul-Lipidomique	Toulouse	FR	fabien.riols@inserm.fr

RISCAL	Romain	IRCM	Montpellier	FR	romain.riscal@inserm.fr
RIVET	Laurent	CORSAIRE Biogenouest	Le Rheu	FR	laurent.rivet@rennes.inra.fr
ROCHER	Amandine	IBMM MONTPELLIER	Montpellier	FR	amandine.rocher44@gmail.com
ROLIN	Dominique	UMR1332 BFP & PMB-MetaboHUB	Villenave d'Ornon	FR	rolin@bordeaux.inra.fr
ROSAIN	David	Hydrosiences Montpellier	Montpellier	FR	david.rosain@umontpellier.fr
ROSIQUE	Clément	UMR N.O.R.T. (INSERM 1062 / INRA 1260 / AMU)	Marseille	FR	clement.rosique@univ-amu.fr
ROUILLAC	Lénaïck	Unité HBAN	Antony	FR	lenaick.rouillac@irstea.fr
ROYER	Anne-Lise	LABERCA - ONIRIS	Nantes	FR	anne-lise.royer@oniris-nantes.fr
ROZIER	Camille	UMR 5557 LEM - CESN - Lyon 1	Villeurbanne	FR	rozier.camille@hotmail.com
SALVIA	Marie-Virginie	USR 3278 CRIOBE	Perpignan	FR	
SARAZIN	Benoît	Proteomic solutions	Saint Marce	FR	sarazin@proteomicsolutions.fr
SARRY	Jean-Emmanuel	INSERM - CRCT - Toulouse	Toulouse	FR	jean-emmanuel.sarry@inserm.fr
SAUCIER	Cédric	Université de Montpellier	Montpellier	FR	cedric.saucier@umontpellier.fr
SAVARIN	Philippe	Université Paris 13/ CNRS	Bobigny	FR	philippe.savarin@univ-paris13.fr
SCALABRE	Aurélien	Institut des Sciences Analytiques	Villeurbanne	FR	aurelien.scalabre@gmail.com
SCHOUMACHER	Matthieu	CIRM	Liège	BEL	m.schoumacher@ulg.ac.be
SEEBURN	Gaetan	EURISOTOP	Saint-Aubin	FR	gseeburn@eurisotop.com
SEYER	Alexandre	Profilomic	Boulogne-Billancourt	FR	alexandre.sever@profilomic.com
SHINTU	Laetitia	iSm2 UMR CNRS 7313	Marseille	FR	laetitia.shintu@univ-amu.fr
SIMON	Yann	Thermo Fisher Scientific	Villebon Courtaboeuf	FR	yann.simon@thermofisher.com
SIROIT	Christophe	Waters	Saint-quentin en Yvelines	FR	christophe_siroit@waters.com
SOMMERER	Nicolas	INRA	Montpellier	FR	sommerer@supagro.inra.fr
SOTTON	Benoit	Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN)	Paris	FR	bsotton@mnhn.fr

SOUARD	Florence	UGA, DPM, GRENOBLE	St Martin D'heres	BEL	florence.souard@univ-grenoble-alpes.fr
STUANI	Lucille	INSERM - CRCT - Toulouse	Toulouse	FR	lucille.stuani@inserm.fr
SVILAR	Ljubica	Ingénieur en spectrométrie de masse	Marseille	FR	ljubica.svilar@univ-amu.fr
TAPISSIER	Nathalie	USR 3278 CRIOBE - UPVD	Perpignan	FR	
TAUDON	Nicolas	IRBA	Bretigny Sur Orge	FR	nicolas.taudon@irba.fr
TAYLOR	Neil	Chenomx Inc	Edmonton	CAN	ntaylor@chenomx.com
TAYLOR	Merle	Chenomx Inc	Edmonton	CAN	-
THEVENOT	Etienne	CEA, LIST, Laboratoire Analyse de Données et Intelligence des Systèmes, MetaboHUB	Gif-Sur-Yvette	FR	etienne.thevenot@cea.fr
TOMAO	Valerie	Equipe Chimie des Antioxydants, Université d'AVIGNON	Avignon	FR	valerie.tomao@univ-avignon.fr
TOUBOUL	David	ICSN CNRS	Gif-Sur-Yvette	FR	david.touboul@cnrs.fr
TOUSSAINT	Bertrand	Université Grenoble Alpes- CHU Grenoble	Grenoble	FR	btoussaint@chu-grenoble.fr
TRAIKIA	Mounir	PlateForme d'Exploration du Métabolisme (PFEM)	Aubière	FR	mounir.traikia@univ-bpclermont.fr
TREMBLAY-FRANCO	Marie	METABOHUB METATOUL AXIOM	Toulouse	FR	marie.tremblay-franco@toulouse.inra.fr
TRIBA	Mohamed	Université Paris 13	Bobigny	FR	mohamed.triba@univ-paris13.fr
VALLVERDU-QUERALT	Anna	INRA	Montpellier	FR	vallverd@supagro.inra.fr
VERDU	Alexandre	Bruker Daltonique	Marne La Vallée	FR	alexandre.verdu@bruker.com
VESTALYS	Ialy Rojo	IRD UMR IPME	Montpellier	FR	ialy-rojo.vestalys@ird.fr
VIARS	Fanny	Métatoul Lipidomique	Toulouse	FR	viars.fanny1@gmail.com
VICTOR BALA	Agnès	Université Paris 13/CNRS UMR 7244	Bobigny	FR	agnes.victorbala@gmail.com
VIDAL	Véronique	Laboratoire Physiologie des fruits et légumes - UMR Qualisud	Avignon	FR	veronique.vidal@univ-avignon.fr
VIGOR	Claire	IBMM-Montpellier	Montpellier	FR	claire.vigor@umontpellier.fr
VRANIC	Monika	BIOPI EA 3900, UPJV	Amiens	FR	monika.vranic1@gmail.com
WIRGOT	Nolwenn	Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand	Aubière	FR	nolwenn.wirgot@univ-bpclermont.fr

YANIBADA	Bénédict	INRA	Saint-Genès- Champanelle	FR	benedict.yanibada@clermont.inra.fr
YEMLOUL	Mehdi	iSm2 UMR CNRS 7313	Marseille	FR	mehdi.yemloul@univ-amu.fr



RÉSEAU FRANCOPHONE DE MÉTABOLOMIQUE ET FLUXOMIQUE

10^{ES} JOURNÉES SCIENTIFIQUES

MONTPELLIER
31 MAI - 2 JUIN 2016

