

Mercredi 12 et jeudi 13 juin 2019

Université de Toulon • Campus de La Garde • Bâtiment M • SeaTech

MétaSUD

Journées de Métabolomique en Région Sud-Provence-Alpes-Côte d'Azur



<http://metasud.univ-tln.fr>

EN PARTENARIAT AVEC



AVEC LE SOUTIEN DE



Sponsors & Partenaires

Sponsors GOLD



Sponsors BRONZE



Subventions



Soutiens



Comités

Comité scientifique

- Gérald CULIOLI, Université de Toulon, MAPIEM
- Stéphane GREFF, Aix-Marseille Université, IMBE
- Raphaël LUGAN, Avignon Université, Qualisud
- Jean-Charles MARTIN, Aix-Marseille Université, C2VN
- Thomas MICHEL, Université Nice Sophia Antipolis, ICN
- Thierry PEREZ, CNRS, IMBE
- Thierry POURCHER, Université Nice Sophia Antipolis, TIRO
- Laetitia SHINTU, Aix-Marseille Université, ISM2

Comité local d'organisation

- Nathan CARRIOT
- Gérald CULIOLI
- Anne DELARUE
- Annick ORTALO-MAGNÉ
- Benoît PAIX
- Bruno VIGUIER

Avec l'aide active d'Eric CHAUZU, Magali SEILHES, Fabien GROUE, Aude BERTSCHY, François-Xavier RAMADOUR, Catherine DUPONT, Raphaëlle BARRY-MARTINET, Marlène LEJARS, Elisa CATAO et le soutien de Jean-François CHAILAN (Directeur MAPIEM), d'Eric MOREAU (Directeur SeaTech), de Frédéric GUINETON (Vice-président de la Commission Recherche, Université de Toulon) et de Xavier LEROUX (Président Université de Toulon).



Préambule

Les journées régionales de métabolomique MétaSUD 2019 visent à rassembler le plus grand nombre d'acteurs régionaux, aussi bien académiques qu'industriels, de cette discipline afin qu'ils puissent : (i) exposer leurs avancées et compétences dans les différents domaines de la métabolomique (développements méthodologiques et analytiques, traitement des données, analyses statistiques...), (ii) échanger leurs connaissances afin d'élever leurs niveaux théoriques et pratiques et (iii) faire remonter leurs besoins, notamment en ce qui concerne les partenaires socio-économiques.

MétaSUD est largement ouvert aux industriels directement impliqués dans la métabolomique (constructeurs, fournisseurs, développeurs...) ainsi qu'aux acteurs socio-économiques régionaux développant ou souhaitant développer des approches métabolomiques.

Ce colloque a également pour vocation de présenter un large panel d'études en métabolomique à un public de non spécialistes désireux de s'initier à cette discipline (personnels hospitaliers, chercheurs et enseignants-chercheurs issus de disciplines afférentes, ingénieurs, techniciens...).

Les journées MétaSUD 2019 portées par les quatre universités régionales (Avignon Université, Aix-Marseille Université, Université Nice Sophia-Antipolis, Université de Toulon) font suite à deux précédents événements régionaux : la journée « [Metabolomics & Lipidomics in biology and Health](#) » organisée à l'IPMC (Université Nice Sophia-Antipolis) le 1^{er} décembre 2015 sous l'égide de CoReBio PACA et un atelier pratique intitulé « [Pour comprendre et initier des analyses en métabolomique](#) » qui s'est tenu les 12 et 13 décembre 2016 à la Station Marine d'Endoume (Aix-Marseille université).



Programme de MétaSUD

Journée du 12 juin 2019

- 8h30-9h :** **Accueil des participants**
- 9h-9h30 :** **Ouverture du colloque & Etat des lieux de la métabolomique en Région Sud-PACA**
- 9h30-10h15 :** **Conférence plénière**
Pr Alain BOUCHEREAU (Université de Rennes 1, Responsable de la plateforme Corsaire)
Métabolomique fonctionnelle de la sénescence et de la réponse aux stress chez le colza
- 10h15-10h45 :** **Pause-café (Session posters / Stands industriels)**
- Session 1 - Modérateurs :** **Gérald CULIOLI & Jean-Charles MARTIN**
- 10h45-11h05 :** **Raphaël LUGAN (Qualisud, Avignon)**
Différentes approches métabolomiques appliquées à la génomique fonctionnelle chez les végétaux
- 11h05-11h25 :** **Bénédicte HERAL (ICN, Nice)**
Etude métabolomique des interactions chimiques dans le dépérissement de la lavande
- 11h25-11h45 :** **Stéphane GREFF (IMBE, Marseille)**
Leaf specialized metabolome of Quercus pubescens exposed to amplified drought
- 11h45-12h05 :** **Laëtitia FOUGERE (ICOA, Orléans)**
Analyse ciblée et non-ciblée de variétés de soie de maïs
- 12h05-12h15 :** **Christophe SIROIT (Waters)**
Bénéfices des solutions en chromatographie et spectrométrie de masse Waters dans les approches de métabolomique ciblées et non ciblées
- 12h15-12h25 :** **Thierry LEGOUPIL (Shimadzu)**
Innovations & nouveautés introduites par Shimadzu

12h25-13h45 : Pause déjeuner (Session posters / Stands industriels)

Session 2 - Modérateurs : Stéphane GREFF & Thierry POURCHER

13h45-14h05 : Charlotte SIMMLER (CENAPT, Chicago, USA)
Apport des analyses métabolomiques par RMN pour déterminer l'authenticité des plantes médicinales

14h05-14h25 : Doriane DUMONT-BANCEL (INRA, Avignon)
Caractérisation de la variabilité génétique de la qualité des baies de goji par profilages métaboliques multi-ciblés

14h25-14h45 : Jocelyn GAL (Centre Antoine Lacassagne, Nice)
Comparaison de 5 méthodes d'apprentissage non supervisées dans le cas de données de grandes dimensions : Application dans le cancer du sein

14h45-15h05 : Jean-Charles MARTIN (C2VN, Marseille)
Une approche combinée de lipidomique, d'imagerie MS et d'imagerie TEP-Scan révèle des différences de fonctionnement cérébral chez le raton selon le contenu lipidique de formules infantiles

15h05-15h20 : David CHARDIN (Centre Antoine Lacassagne, TIRO, CEA, Nice)
Métabolomique et Imagerie TEP-FDG des cancers du sein

15h20-15h25 : Benoît SARAZIN (Proteomic Solutions)
Technologie BIOCRATES en métabolomique ciblée

15h25-15h30 : Pascal TARTARIN (Thermo Fisher)
L'apport de la GCMS haute résolution Orbitrap à la métabolomique

15h30-15h55 : Pause-café (Session posters / Stands industriels)

Session 3 - Modérateurs : Raphaël LUGAN & Thomas MICHEL

15h55-16h10 : Imene BOUSAHBA (C2VN, Marseille)
Impact de la matière grasse laitière sur le métabolome de l'Homme et du porc et identification de biomarqueurs de l'athérosclérose

16h10-16h30 : Aurélie SEASSAU (INRA, Sophia-Antipolis)
LC-MS/MS identification and quantification of phytohormones involved in plant defense mechanisms

16h30-16h50 : Caroline LECAREUX (IMBE, Marseille)
Le contenu en composés organiques volatiles varie-t-il en réponse à l'adaptation des espèces au changement de régime de feu ?

- 16h50-17h10 :** Slimane CHAÏB (CRIOBE, Perpignan)
Processus allélopathique et bio-herbicide : étude métabolomique de la diversité micro-algale et caractérisation de substances allélochimiques assistée par les réseaux de similarités
- 17h10-17h30 :** Benoît PAIX & Nathan CARRIOT (MAPIEM, Toulon)
Variabilité zonale du métabolome de la macroalgue brune Taonia atomaria : annotation par l'approche des réseaux moléculaires et liens avec le microbiote associé
- 17h30-18h :** Bilan de la journée
- 18h-20h :** Cocktail dinatoire & Dégustation de vins rosés (par le Centre de recherche et d'expérimentation sur le vin rosé de Vidauban, Var)

Journée du 13 juin 2019

- 8h30-9h :** Accueil des participants
- 9h-10h30 :** Session 1
- Emilie STIERLIN & Thomas MICHEL (ICN, Nice)
Métabolomique & méthodes d'extraction en écologie chimique (45 min)
 - Jean-Marie GUIGONIS (Plateforme Rossi, Nice)
Le couplage LC/MS/MS en métabolomique clinique (15 min)
 - Thierry LEGOUPIL (Shimadzu)
Améliorer la détection et la qualité de vos données avec l'Ultra-Fast QTOF LCMS-9030 (10 min)
 - Olivier HUTINEL (Sciex)
The power of SWATH applied to Metabolomic (10 min)
- 10h30-11h :** Pause-café (Session posters / Stands industriels)

11h-12h30 : Session 2

- **Thierry BERTON (C2VN, Marseille)**
Présentation du workflow de retraitement des données pour une étude métabolomique par LC-HRMS (30 min)
- **Christophe SIROIT (Waters)**
MetaboQuan et LipidQuan – Méthodes clés en main pour l'analyse ciblée des lipides et des métabolites (10 min)
- **Stéphane GREFF (IMBE, Marseille)**
Traitement métabolomique de données GC-MS avec le script Erah (30 min)
- **Sébastien FOLZ (Thermo Fisher)**
La nouvelle génération de LCMS haute résolution Orbitrap : l'Exploris 480 (10 min)

12h30-13h45 : Pause déjeuner (Session posters / Stands industriels)

13h45-15h15 : Session 3

- **Catherine TARDIVEL (C2VN, Marseille)**
Annotations sous Galaxy (W4M) (30 min)
- **Nathan CARRIOT (MAPIEM, Toulon)**
Initiation à l'annotation via l'approche par réseaux moléculaires (GNPS) (30 min)
- **Benoît SARAZIN (Proteomic Solutions)**
Analyse de la relation hôte-microbiote intestinal par métabolomique : Développement d'un dosage ciblé normalisé et quantitatif (10 min)

15h30-17h : Session 4

- **Benoît PAIX (MAPIEM, Toulon)**
Traitement statistique de jeux de données multi-omiques (Mixomics) (30 min)
- **Jean-Charles MARTIN (C2VN, Marseille)**
Fabrication et validation de biomarqueurs multiplexes (30 min)
- **Baninia HABCHI (C2VN, Marseille)**
PREDRET, un outil en ligne de prédiction des temps de rétention entre différents systèmes chromatographiques (30 min)

17h : Bilan de la journée & Perspectives

**Résumés des
communications
du 12 juin 2019**

Différentes approches métabolomiques appliquées à la génomique fonctionnelle chez les végétaux

Raphaël LUGAN

UMR Qualisud, Avignon université
Raphael.lugan@univ-avignon.fr

La métabolomique est une approche de chimie analytique apparue il y a une quinzaine d'année, consistant à quantifier de façon simultanée, exhaustive et non biaisée le contenu en métabolites d'un échantillon [1]. L'intérêt heuristique fondamental du métabolome est de constituer le phénotype quasi "terminal" d'un biosystème, c'est-à-dire d'intégrer les multiples influences internes et externes (génotypiques et environnementales) auxquelles il a été soumis avant échantillonnage ; c'est donc sans surprise dans les domaines du diagnostic, en particulier médical, mais aussi de la génomique fonctionnelle que la métabolomique semble présenter le plus d'intérêt aujourd'hui.

Je présenterai des travaux ayant permis de caractériser fonctionnellement des gènes du métabolisme végétal, impliqués dans la défense ou la reproduction : Cytochromes P450 de voies biosynthèse hormonales [2] ou de composés structuraux de la paroi du pollen [3], ainsi qu'une étude en cours de la production de biopesticide chez le pêcher. Ces exemples illustrent l'intérêt de combiner le phénotypage métabolique et la génétique moléculaire pour l'élucidation de novo de fonctions biologiques.

Références :

- [1] Hall R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist* (2006)169, 453-468
- [2] Widemann E. *et al.* Identification of the 12-oxo jasmonoyl-isoleucine, a new intermediate of jasmonate metabolism in *Arabidopsis*, by combining chemical derivatization and LC-MS/MS analysis. *Metabolomics* (2014) 11, 991-997
- [3] Liu Z. *et al.* Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism. *Nature Communications* (2016) 7, 13026

Mots-clés : Plant metabolism, CYP450, Phenolamides, phytohormons, hydroxycinnamic acid derivatives.

Etude métabolomique des interactions chimiques dans le dépérissement de la lavande

Bénédicte HERAL¹, Florence NICOLE², Xavier FERNANDEZ¹, Thomas MICHEL¹

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France

²Université de St Etienne, Laboratoire BVpam, UMR 7272, 23 rue du Dr Michelon 42023 Saint- Etienne Cedex 2, France

benedicte.herat@univ-cotedazur.fr

Les cultures de lavande (*Lavandula angustifolia*) et de lavandin (*Lavandula x intermedia*) sont, depuis une dizaine d'années, affectées par le phytoplasme du Stolbur (*Candidatus phytoplasma solani*), agent pathogène transmis par la cicadelle (*Hyalesthes obsoletus*) [1]. Cet insecte se nourrit de la sève de la lavande transmettant la bactérie de plant infecté en plant sain [2]. Le dépérissement de la lavande a des conséquences économiques importantes sur la filière lavandicole et les moyens de lutte sont actuellement inexistantes ou restreints. Par ailleurs, les connaissances autour des interactions chimiques entre la cicadelle, le phytoplasme et la lavande sont encore limitées, c'est pourquoi il est important d'étudier les composés organiques non volatiles qui pourraient avoir une influence dans cette interaction tripartite.

Pour étudier les interactions chimiques qui pourraient avoir une importance dans le dépérissement de la lavande, une approche métabolomique non-ciblée a été mise en place afin de déterminer les biomarqueurs spécifiques :

- des variétés (Maillette et 7713 pour la lavande, et Grosso et Abrial pour le lavandin)
- de l'état symptomatique des plants (sain ou infecté).

Une campagne d'échantillonnage en champ a été menée sur le plateau de Sault (Vaucluse, France) en 2017, et a conduit à la collecte de 480 échantillons. Des échantillons de feuille et d'inflorescence ont été récoltés. Les extraits eau-éthanol (50:50, v/v), obtenus par extraction assistée par ultra-sons, ont été analysés par UPLC-HRMS (XevoG2 QTOF, Waters). Les données ont par la suite été retraitées sur la plateforme Workflow4Metabolomics 3.0, puis sur MetaboAnalyst et R. Le retraitement a nécessité un prétraitement comprenant la détection des ions (CentWave), l'alignement (PeakDensity), la correction des biais expérimentaux, tels que les dérives analytiques intra et inter séquence (loess). La qualité du jeu de données a ensuite été évaluée grâce à des statistiques descriptives (ACP, Varpart), puis celui-ci a été réduit pour obtenir les analyses discriminantes (PLS-DA). Les premiers résultats obtenus montrent une distinction entre les différentes variétés étudiées ainsi que l'état symptomatique des plants. Des étapes de validation des tests discriminants et l'élucidation structurales des biomarqueurs sont encore nécessaires. La finalité de l'étude étant d'isoler les biomarqueurs pour des tests comportementaux sur la cicadelle (adulte et larve) et des tests d'inhibition sur le phytoplasme.

Références :

- [1] Séméty *et al.* Lavender Decline in France is associated with chronic infection by lavender-specific strains of « *Candidatus Phytoplasma solani* ». *Applied and Environmental Microbiology* (2018) 84: e01507-18
- [2] Gasparich, G. E. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals* (2010) 38, 193-203

Mots-clés : *Lavandula*, dépérissement, métabolomique, UHPLC-HRMS.

Leaf specialized metabolome of *Quercus pubescens* exposed to amplified drought

Amélie SAUNIER^{1,2}, Stéphane GREFF², Elena ORMENO², Catherine FERNANDEZ²

¹Department of Environmental and Biological Sciences, Finland

²IMBE – Aix Marseille Univ, Univ Avignon, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France

stephane.greff@imbe.fr

The intensification of summer drought expected with climate change in the Mediterranean region can induce metabolism modifications in plants to help them cope with such conditions.

In this experiment, we studied the specialized metabolome of *Quercus pubescens* leaves under natural (ND) and amplified drought (AD). An *in situ* experimental site, equipped with a rainfall exclusion device, allowed reduction of natural rainfall by 30% over the tree canopy. Leaves of ND and AD plots were collected in spring, summer and fall during 3 years, corresponding to the 2nd, 3rd and 4th years of drought application. We used a targeted approach to focus on phenolic metabolites and an untargeted approach to study a broader metabolome variation according to drought.

Metabolic profiles (targeted approach) showed that the concentrations of quercetins, catechins and myricetins were mostly decreased with drought stress, opposite to the concentrations of kaempferols that increased. Multivariate analysis of *Quercus pubescens* fingerprints (untargeted approach) demonstrated that metabolic contents were almost unchanged under AD. Nevertheless, seven metabolites were highlighted as drought biomarkers using a univariate analysis (Venn diagrams). These biomarkers, still under study, likely belong to the phenylpropanoid pathway with one corresponding to kaempferol pentoside.

Targeted and untargeted approaches permitted to demonstrate a time lag in leaf phenology when trees were exposed to drought with a modification of the phenylpropanoid pathway. Quercetins, catechins and myricetins, specific to summer leaves were down-regulated to favor the biosynthesis of kaempferol, specific to fall leaves. Further studies would be necessary to understand how this time lag phenology may impact ecosystem functioning.

Mots-clés : *Quercus pubescens*, amplified drought, Mediterranean forest, flavonoids, time lag phenology.

Analyse ciblée et non ciblée de variétés de soie de maïs

Laëtitia FOUGERE¹, Béatrice RHINO^{2,3}, Emilie DESTANDAU¹, Claire ELFAKIR¹

¹Univ Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

²CIRAD, UPR HortSys, F-97285 Le Lamentin, Martinique, France

³CAEC, Lamentin, Martinique, France

laetitia.fougere@univ-orleans.fr

Le centre de recherche CIRAD étudie la possibilité d'utiliser le maïs en tant que plante piège des ravageurs *Helicoverpa Zea* des plants de tomate de Martinique. En effet, cette noctuelle pond dans le maïs et il a été montré que lorsque les larves se nourrissent des soies de maïs des flavonoïdes C-glycosylés, et plus particulièrement la molécule maysine, permettaient de diminuer leur croissance. Cet effet permet de diminuer la prolifération du ravageur. Mais quelle variété de maïs est-elle la plus efficace pour réduire la croissance des larves ?

Pour cela, une étude non ciblée a été menée en UHPLC/HRMS MS sur l'ensemble des composés de l'extrait de soie de maïs, afin de pouvoir le caractériser. Ainsi l'extrait a été cartographié par une combinaison du réseau moléculaire et du diagramme de Van Krevelen. Ces analyses ont permis d'obtenir les principales familles moléculaires constituant l'extrait et d'identifier une trentaine de composés flavonoïdes glycosylés.

Puis une méthode métabolomique ciblée a été mis en place en UHPLC/MRM MS, afin de suivre et de doser spécifiquement une soixantaine de composés phénoliques. Cette étude a été menée sur cinq variétés de maïs doux (Java, Garrison, Sugar Jean, Nova et Golden Bantam). Le couplage UHPLC/MRM MS a montré que les molécules se retrouvaient dans toutes les variétés maïs à des niveaux variables. Les traitements statistiques non supervisés et supervisés de l'ensemble des données ont montré une surexpression de certains flavones C-glycosylés, dont la maysine, dans la variété Java. Cette même variété a montré sur le terrain une efficacité supérieure aux autres variétés sur l'inhibition de la croissance des larves. Ces résultats confirment donc la validité de notre modèle d'analyse et est un guide dans la sélection de variétés de maïs en tant que plante piège.

Mots-clés : UHPLC/HRMS, réseau moléculaire, UHPLC/MRM MS, sPLS-DA.

Communications *Flash* - Industriels

Bénéfices des solutions en chromatographie et spectrométrie de masse Waters dans les approches de métabolomique ciblées et non ciblées

Christophe SIROIT

Waters - BP 608, Saint-Quentin-en-Yvelines cedex
christophe.siroit@waters.com

Au cours de cette session flash, nous reviendrons sur le positionnement des solutions technologiques de type triple quadripôle et haute résolution MS de type QTOF pour l'analyse du métabolome en mettant en lien les spécifications des instruments, les stratégies d'acquisition DIA et l'apport de la mobilité ionique.

Innovations & nouveautés introduites par Shimadzu

Thierry LEGOUPIL

Shimadzu, 77448 Marne-la-Vallée, France
tl@shimadzu.fr

Présentation des nouveautés Shimadzu et des nouvelles innovations qui vont être apportés aux utilisateurs de spectrométrie de masse.

Apport des analyses métabolomiques par RMN pour déterminer l'authenticité des plantes médicinales

Charlotte SIMMLER¹, Jonathan BISSON¹, James G. GRAHAM¹, Laura L. TYLER², Shao-Nong CHEN^{1,2}, Guido F. PAULI^{1,2}

¹Center for Natural Product Technologies (CENAPT : <https://cenapt.pharm.uic.edu>)

²Center for Botanical Dietary Supplement Research, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, 60612 Chicago, USA
simmler@uic.edu

Les efforts d'authentification et de standardisation d'extraits de plantes médicinales peuvent être remis en question par la variabilité phytochimique inhérente aux végétaux génétiquement identiques cultivés et/ou récoltés sous différentes conditions. Par ailleurs, la distinction de la variation "naturelle" d'une matière végétale authentique par rapport à une matière potentiellement falsifiée est un défi supplémentaire impactant le choix des techniques analytiques [1].

Les analyses métabolomiques non ciblées (ex : RMN, IR) et combinées à la chimiométrie (ex : PCA, SIMCA), peuvent guider les efforts d'authentification chimique des plantes médicinales et de comparaison de leurs propriétés biologiques. Dans ce contexte, cette présentation illustrera la contribution des analyses métabolomiques, notamment par RMN, pour déterminer l'authenticité des trois principales espèces de réglisse médicinale : *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* et *G. inflata* [2].

Brièvement, des spectres RMN ¹H ont été acquis sur des extraits de plus de 50 échantillons de réglisse préalablement identifiés par ADN code barre. Des analyses de variables multiples de type PCA ont ensuite permis de construire un modèle SIMCA de classification qui intègre l'ensemble des variations chimiques (déplacements chimiques, intensité) naturelles des différents échantillons de réglisses. La comparaison de spectres RMN de nouveaux échantillons aux données du modèle SIMCA a permis la détection de poudres de réglisse authentiques mais aussi altérées [1-2].

Une attention particulière sera portée sur la nécessité (1) d'une identification précise des plantes médicinales entrant dans la construction de modèle statistique (2) du partage des données notamment des spectres RMN bruts [3-4] d'extraits totaux de plantes médicinales afin d'améliorer les analyses d'authenticité tout en favorisant la détection de profils chimiques uniques, altérés ou frauduleux [1].

Références :

- [1] Simmler C, Graham JG, Chen SN, Pauli GF *Fitoterapia*. (2017) 121, 6-15.
- [2] Simmler C, Anderson JR, Gauthier L, Lankin DC, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF *Journal of Natural Products* (2015) 78:2007-2022.
- [3] Bisson J,* Simmler C,* Chen SN, Friesen JB, Lankin DC, McAlpine JB, Pauli GF *Natural Product Reports* (2016) 33, 1028-1033.
- [4] McAlpine JB, Chen SN, + 67 authors, Simmler C, Lankin DC, Bisson J, Pauli GF. *Natural Product Reports* (2019) 36, 35-107.

Mots-clés : RMN, partage de données, chimiométrie, identité botanique, authenticité.

Caractérisation de la variabilité génétique de la qualité des baies de goji par profilages métaboliques multi-ciblés

Doriane DUMONT-BANCEL¹, Raphaël LUGAN², Anne-Laure FANCIULLINO¹

¹INRA PSH PACA, 228 Route de l'Aérodrome 84 914 Avignon Cédex 9

²Université d'Avignon Qualisud Métaboscope, Campus Jean-Henri Fabre, 301 Rue Baruch de Spinoza 84 140 Avignon

doriane.bancel@inra.fr

Les espèces du genre *Lycium* produisent un petit fruit appelé baie de goji. Ce fruit auquel on prête des vertus médicinales, grâce notamment à la présence de polysaccharides, de caroténoïdes et de composés phénoliques, est consommé essentiellement en sec et importé de Chine. Une production locale sous forme de fruit frais est en plein essor en France et en Europe. Si la composition des baies est bien connue, il existe peu de données sur l'effet du génotype, de l'environnement et des pratiques sur la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits. L'acquisition de connaissances sur la biologie du fruit contribuera à promouvoir le développement d'une nouvelle production en France.

Cette étude a pour objectif de développer des méthodes d'analyses haut débit, permettant de caractériser la composition des fruits et de rendre compte de l'effet des différents facteurs de variation. Pour cela, nous avons développé des méthodes d'analyse des composés secondaires : (1) des caroténoïdes par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur barrette de diode et un spectromètre de masse triple-quadrupolaire à ionisation par électrospray (UPLC DAD ESI TQ MS), (2) des composés phénoliques par UPLC DAD ESI TQ MS et des métabolites primaires par chromatographie gazeuse associée à un spectromètre de masse (GC MS). Ces analyses ciblées et non-ciblées ont permis de décrire l'évolution de la composition d'un fruit au cours de son développement pour un cultivar de *Lycium barbarum*, 'FPW07', et de mettre en évidence les différences entre trois génotypes ('Crimson Star', sélection : 'FPW07' et hybride : tomate x goji '1708/3'). Cette comparaison montre que le génotype 'Crimson Star' présente un profil métabolique très différent des deux autres variétés.

Mots-clés : *Lycium*, caroténoïdes, composés phénoliques, métabolites primaires, profilage métabolique.

Comparaison de 5 méthodes d'apprentissage non supervisées dans le cas de données de grandes dimensions : Application dans le cancer du sein

Jocelyn GAL¹, David CHARDIN², Caroline BAILLEU³, Thierry POURCHER⁴, Lun JING⁴, Jean-Marie GUIGONIS⁴, Jean-Marc FERRERO³, Yann CHATEAU¹, Renaud SCHIAPPA¹, Julia GILHODES⁵, Olivier HUMBERT², Emmanuel CHAMOREY¹

¹Unité d'Epidémiologie et de Biostatistiques, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

²Département de médecine nucléaire, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

³Département d'oncologie médicale, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

⁴Transporteurs, Imagerie et Radiothérapie en Oncologie UMR E-4320, Faculté de médecine, laboratoire de biophysique, Université Cote d'azur, Nice, France

⁵Département de biostatistiques, Institut Claudius-Regaud, Toulouse, France

jocelyn.gal@nice.unicancer.fr

Introduction : Le traitement des cancers du sein est guidé par deux classifications : la classification clinico-pathologique et la classification moléculaire issue de la transcriptomique qui introduit la notion de cancer du sein luminal A/B, HER2 et basal-like. Cette dernière a été obtenue à l'aide d'analyses non supervisées. L'objectif de ce travail était de comparer la performance de 5 méthodes non-supervisées afin d'identifier de nouveaux groupes biologiques du cancer du sein à l'aide de données de métabolomiques.

Méthodes : Rétrospectivement, 52 patientes atteintes d'un cancer du sein et traitées par chimiothérapie adjuvante entre 2013 et 2016 ont été incluses. Les échantillons tumoraux ont été analysés par chromatographie liquide haute pression et spectromètre de masse permettant d'identifier 1271 métabolites. Cinq méthodes d'apprentissage non supervisées ont été comparées : PCA-Kmeans, Sparcl, SIMLR, Spectral clustering et K-sparse. Le nombre de cluster optimal a été évalué par la méthode gap statistic et l'algorithme t-sne a permis leur représentation visuelle. La séparabilité et l'homogénéité des clusters ont été évaluées à l'aide de l'indice de silhouette (IS). Nous avons analysé les différences clinico-biologiques retrouvées entre les clusters identifiés par chaque méthode.

Résultats : Pour chacune des 5 méthodes, 3 clusters ont été identifiés. Les méthodes K-sparse et SIMLR sont les plus discriminantes avec des IS de 0,85 et 0,91 respectivement. Pour ces 2 méthodes, des différences significatives inter-cluster ont été retrouvées pour les variables clinico-biologiques suivantes : stade et phénotype tumoral, grade histologique et ki-67. Pour les 2 méthodes, les patientes associées au cluster avec les facteurs histopronostiques les plus défavorables présentaient une variation de concentration significative des acides aminés fondamentaux : *L*-méthionine, *L*-phénylalanine, *L*-histidine, *L*-glutamate et *L*-glutamine.

Conclusion : Nos résultats ont montré qu'il était possible d'utiliser les méthodes d'apprentissage non supervisées sur des données de métabolomique et de mettre en évidence des clusters de patientes identifiés sur des acides aminés protéinogènes. K-sparse et SIMLR semblent être les méthodes les plus discriminantes, elles mettent en évidence 3 populations dont les caractéristiques clinico-biologiques standards sont distinctes.

Mots-clés : Métabolomique, méthode non supervisée, cancer du sein.

Une approche combinée de lipidomique, d'imagerie MS et d'imagerie TEP-Scan révèle des différences de fonctionnement cérébral chez le raton selon le contenu lipidique de formules infantiles

N. AIDOU¹, B. DELPLANQUE², N. MASOTTI¹, B. NICOLINI¹, L. ARNOUX^{1,6}, C. GARCIA¹, D. DARMAUN³, A. MOYON⁴, S. FERNANDEZ⁴, B. GUILLET⁴, C. ANTONA¹, F. BOUBRED^{1,6}, C. BAUDRY⁵, P. LE RUYET⁵, J.-C. MARTIN¹

¹NORT, Marseille;

²NMPA Paris-Sud, Orsay

³UMR PhAN, Nantes

⁴CERIMED Marseille

⁵LACTALIS, R&D, Retiers ; Médecine Néonatale, Hôpital La Conception, Marseille

Nous avons évalué l'impact de la qualité lipidique de formules infantiles sur la composition et le fonctionnement du cerveau dans un modèle de ratons allaités artificiellement avec des formules de sources lipidiques différentes : matière grasse végétale seule (MGV) ou en mélange avec des graisses laitières (MGLmix), supplémentées ou non en acide arachidonique (ARA) et DHA (ratio 2:1). Les résultats ont été comparés à un groupe allaité (opérés Sham).

Au sevrage ont été évaluées (i) l'activité fonctionnelle cérébrale en imagerie TEP- scan, (ii) la composition en acides gras et en espèces lipides du cerveau par lipidomique, (iii) la richesse en DHA des différentes régions cérébrales par imagerie en spectrométrie de masse.

Résultats : L'activité fonctionnelle cérébrale devient comparable aux allaités avec les formules DHA+ARA. La formule MGLmix induit des teneurs en DHA supérieures à la base végétale, mais inférieures aux témoins allaités. L'ajout de DHA+ARA dans les formules permet de normaliser le contenu cérébral en DHA, mais sa distribution dans les différentes zones du cerveau, déterminée par imagerie MS, reste différente des rats allaités : seule la formule MGLmix se rapproche au mieux des contrôles allaités. L'analyse lipidomique a permis d'identifier plus de 700 espèces lipidiques réparties dans 27 classes de lipides. La PC(18:0/22:6n-3) est la plus modifiée en présence de DHA+ARA et la mieux corrélée positivement avec l'activité cérébrale ($r^2=0,25$; $P<0.05$). Au-delà de la composition en acides gras, les teneurs de certains lipides structuraux (LPC, céramides, sphingosine et cholestérol) sont modifiées par le type de formules administrées.

Conclusions : les matières grasses laitières, le DHA+ARA des formules modulent l'activité cérébrale post-natale. Le contenu en DHA cérébral peut être normalisé par l'ajout de DHA+ARA, mais non sa distribution dans les zones cérébrales. La qualité lipidique des formules est capable de moduler le contenu en certains lipides structuraux et fonctionnels du cerveau.

Mots-clés : Nutrition lipidique, lipidomique, imagerie MS, imagerie *in vivo*, nouveau-né.

Métabolomique et imagerie TEP-FDG des cancers du sein

David CHARDIN^{1,2,3}, Jean Marie GUIGONIS^{1,2,3}, Michel BARLAUD⁴, Thierry POURCHER^{1,2,3}, Olivier HUMBERT^{1,2,3}

¹Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue de Valombrose, 06189 Nice

²Université Côte d'Azur, UMR TIRO-MATOS, Réseau Metabo-UCA, faculté de médecine, 28 Avenue Valombrose 06100 Nice

³Commissariat à l'Energie Atomique, UMR TIRO-MATOS, faculté de médecine, 28 Avenue Valombrose 0600 Nice

⁴Laboratoire d'Informatique, Signaux et Systèmes de Sophia-Antipolis I3S, UMR7271 - UNS CNRS, 2000 route des lucioles, Les Algorithmes - bât. Euclide B 06900 Sophia Antipolis

Chardindj@gmail.com

Cancer metabolism is an essential aspect of tumorigenesis, as cancer cells have increased energy requirements in comparison to normal cells. Metabolomic techniques can provide quantitative data for a large number of small molecules in tissues and enable the analysis of multiple intricate metabolic pathways. Positron emission tomography (PET) using 18 F-Fluorodeoxyglucose (FDG) enables in vivo analysis of glycolysis and is widely used in oncology. High FDG uptake is a prognostic factor in breast cancer and has been associated with tumor aggressiveness.

70 breast cancer samples obtained from untreated patients who had undergone FDG-PET imaging were analyzed through an untargeted metabolomic approach using liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS) to evaluate how metabolomic data could predict FDG uptake. Tumors were split into two groups depending on avidity for FDG as measured with PET. The Compound Discoverer 4.0 software enabled identification of 854 metabolites and MZMine 2.38 software enabled identification of 628 metabolites.

PLSDA based models predicted FDG uptake with an accuracy ranging from 0,73 to 0,77 for data obtained from both software. Selected metabolites varied depending on the LC-MS treatment software and the use of scaling or log transformation. Important metabolites were, among others, glutathione, amino-acids such as glutamate, proline or tyrosine, L-acetylcarnitine, metabolites from the kynurenine pathway such as L-kynurenine or formyl-kynurenine and polyamines such as *N*₁,*N*₂-diacetylspermine or *N*₁-acetylspermine. Correlations between these metabolites and cancer aggressiveness have already been reported. Studying new metabolites identified through this process could enable a better understanding of tumor metabolism and identification of new biomarkers.

Mots-clés : UHPLC-MS, Cancer du Sein, FDG, TEP-TDM.

Communications *Flash* - Industriels

Technologie BIOCRATES en métabolomique ciblée Dosages normalisés et quantitatifs

Benoît SARAZIN

Proteomic Solutions, Proteigene, 7 rue Léo Lagrange 27950 St Marcel, France ; distributeur en France de Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Autriche
sarazin@proteomicsolutions.fr

Nos sociétés Proteigene et Proteomic Solutions proposent en France les solutions Biocrates pour la réalisation de phénotypage métabolomique.

L'analyse de plusieurs milliers de métabolites est possible en prestation de service ou par l'utilisation de kits prêts à l'emploi. (LC MS/MS avec un logiciel d'analyse dédié).

Il y a 5 kits disponibles (P180, P400HR, Stéroïdes, Acides biliaires, MxP Quant 500) et 23 services d'analyses ce qui permet d'étudier différentes classes de métabolites de façon quantitative.

Biocrates propose aussi la plateforme d'analyse globale non-ciblée développée par Metanomics Health : elle permet de reporter sans a priori tous les métabolites stables, ionisables et présents (en quantité au-dessus du niveau de détection) dans une grande variété de matrices. Pour des échantillons de plasma, des données quantitatives sont produites pour 400 métabolites.

Mots-clés : Kits, services, métabolomique ciblée et quantitative, global profiling.

L'apport de la GCMS haute résolution Orbitrap à la métabolomique

Pascal TARTARIN

Thermo Fisher, 16 avenue du Québec 91140 Villebon-sur-Yvette, France
sebastien.folz@thermofisher.com

L'Orbitrap GC et ses déclinaisons instrumentales



Exactive GC
RP 60,000 (FWHM @ m/z 200)
E/CI; Full-scan; Timed-SIM

Q Exactive GC
RP 120,000 (FWHM @ m/z 200)
E/CI; Full-scan, Timed-SIM
MS/MS

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Mots-clés : GCMS haute résolution, Orbitrap, métabolomique, sélectivité, résolution.

Impact de la matière grasse laitière sur le métabolome de l'Homme et du porc et identification de biomarqueurs de l'athérosclérose

Imene BOUSAHBA, Catherine TARDIVEL, Beninia HABCHI, Marion PRADEAU, Jean-Charles MARTIN

Aix Marseille University, INSERM, INRA, C2VN, BioMeT, Marseille, France
bousahba.imene@gmail.com et jean-charles.martin@univ-amu.fr

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde dont l'étiologie principale est l'athérosclérose qui est une pathologie chronique et silencieuse causée par l'accumulation de lipides dans les vaisseaux. La consommation de matière grasse notamment d'origine laitière est accusée de jouer un rôle clé dans le développement de l'athérosclérose.

Notre objectif principal est de comparer l'effet de différents types de matières grasses laitières consommés par des volontaires légèrement à risque cardiovasculaire et par des porcs nains génétiquement susceptibles à l'athérosclérose, sur le métabolome et le lipidome et d'identifier des biomarqueurs de la pathologie. L'expérimentation a été conduite sur 34 porcs et 169 sujets ayant suivis un régime contrôle (matière grasse végétale), un régime riche en matière grasse laitière d'été (riche en acides gras poly-insaturés), d'hiver (riche en acides gras saturés) ou d'hiver supplémentée en calcium. Les métabolites plasmatiques ont été extraits et analysés par LC-MS.

Nos résultats ont démontré que la matière grasse laitière, indépendamment du type d'acides gras qu'elle contient, est capable de provoquer un désordre métabolique et une inflammation chez l'Homme, qui pourrait être associés au développement de maladies myocardiques. Toutefois, ces modifications au niveau métabolomique restent asymptomatiques au niveau clinique. Chez le modèle porcin, Nous avons identifié quatre lipides : céramide, phosphatidylcholine, triglycéride et le zymostérol comme de potentiels biomarqueurs précoces de l'athérosclérose et qui sont susceptibles d'être également prédicteurs dans notre étude clinique. Cependant ces biomarqueurs ne sont pas sensibles aux régimes laitiers. En conclusion, à ce stade, nos résultats ne démontrent pas formellement que la matière grasse laitière est pro-athérogène. Il existe des différences de réponses biologiques à la consommation des différents types de matières grasses mais qui ne sont pas reliées à l'athérosclérose. Nous avons pu assembler plusieurs espèces lipidiques du plasma en un biomarqueur composite précoce de l'athérosclérose chez le porc, et qui est potentiellement applicable à l'homme.

Mots-clés : Athérosclérose, biomarqueurs, matière grasse laitière, métabolomique.

LC-MS/MS identification and quantification of phytohormones involved in plant defense mechanisms

Valérie ALLASIA, Marc MAGLIANO, Harald KELLER, Michel PONCHET, **Aurélie SEASSAU**

Institut Sophia Agrobiotech ISA-INRA PACA (UMR INRA1355-CNRS7254-Université Côte d'Azur), 400 route des chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France
aurelie.seassau@inra.fr

The Analytical Biochemistry platform of the Sophia Agrobiotech Institute (*MétaboUCA* network) is solicited to resolve scientific questions involving metabolomics for the identification and the quantification of secondary metabolites on various different organisms linked with plant health.

One exemplary case is the topic I will describe here about the quantification of a phytohormone involved in plant defense mechanisms.

Plants are sensitive to different bioagressors and have to adapt their defense mechanisms accordingly. At ISA we use different plant models like *Arabidopsis thaliana*, tomato and tobacco to study the interaction between plant and bioagressors and to understand defenses underlying resistance mechanisms.

In this study, we use the model plant *Arabidopsis thaliana* to study the interaction with the downy mildew oomycete pathogen, *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa). Defense responses against this pathogen are governed by cellular signaling pathways that are coordinated by the phytohormone salicylic acid (SA). In its unconjugated form, SA is the active defense molecule, but it becomes cytotoxic when it accumulates to high levels. UDP-glucosyltransferases (UGTs) catalyze the transfer of a glucose residue to SA thus forming SA-glucoside (SAG) or SA-glucose ester (SGE), which both are inactive forms destined for vacuolar storage. *Arabidopsis* mutants for the glucosyltransferase UGT76B1 are more resistant to Hpa infection, whereas plants that overexpress the enzyme are more susceptible. Ugt76b1 mutants accelerate and enhance the onset of SA-dependant defenses, when compared to wild-type plants. A comparative transcriptome analysis between the ugt76b1 mutant and wild-type plants revealed EXTRACELLULAR LIPASE 4 (EXL4) as a potential regulatory protein in UGT76B1-mediated defense responses.

In order to validate and explain the functions of both UGT76B1 and EXL4 in the SA-dependent defense pathway, the Analytical Biochemistry Platform (Sophia Agrobiotech Institute) set up a metabolomics approach to quantify free and storage forms of SA in mutant and wild-type *Arabidopsis* by LC-MS (microTOFQII, Bruker – PlantBIOs facilities <https://www6.paca.inra.fr/institut-sophia-agrobiotech/Infrastructure-PlantBIOs>). Our results partially validate a hypothetical model and lead us to propose other potential hypotheses about the function of both enzymes.

Mots-clés : UHPLC-MS, phytohormone, plant-health, identification, quantification.

Le contenu en composés organiques volatils varie-t-il en réponse à l'adaptation des espèces au changement de régime de feu ?

Pauline LONGEARD¹, Caroline LECAREUX², Bastien ROMERO¹, Catherine FERNANDEZ²,
Anne GATEAUME¹

¹Irstea Aix-en-Provence, Unité de Recherche RECOVER, Equipe de recherche « Ecosystèmes Méditerranéens et Risques », 3275 route de Cézanne, CS 40061, 13182 Aix-en-Provence Cedex 5, France

²Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, Equipe "Diversité et Fonctionnement : des molécules aux écosystèmes », Campus St Charles Case 4, 3 place Victor Hugo 13331 Marseille cedex 3
pauline.longeard@irstea.fr

Depuis très longtemps les incendies impactent les écosystèmes méditerranéens et représentent une pression de sélection forte pour les espèces végétales présentes. Ces espèces se sont adaptées au feu ou plus particulièrement à un régime de feu bien spécifique, dépendant de la fréquence mais aussi de l'intensité des incendies. En fonction de ces régimes de feu, les espèces végétales ont développé des stratégies d'adaptation associées avec des traits liés au feu différents (structurels, fonctionnels ou chimiques). Les espèces résistantes supportent le passage du feu et sont adaptées à des feux de faible intensité mais assez fréquents. Au contraire, les espèces dites résilientes sont plus adaptées à des feux de fortes intensités et peu fréquents. Ces dernières possèdent des traits liés au feu augmentant l'inflammabilité dans le but de créer une niche écologique favorisant la dynamique végétale post feu.

Le présent travail s'est intéressé aux traits chimiques liés au feu par le biais de l'analyse des terpènes. L'objectif a été d'identifier et de quantifier les différents terpènes contenus dans les feuilles d'arbres des deux espèces soumises à différents régimes de feu au nord de la Provence. Cette étude est fondée sur l'hypothèse d'un possible ajustement de ces métabolites secondaires, conférant aux espèces résilientes telles que *Pinus halepensis* une meilleure inflammabilité quand la récurrence des feux augmente.

L'analyse des terpènes, contenus dans les aiguilles fraîches, a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, après une extraction liquide. Les données obtenues ont ensuite été traitées *via* R en utilisant le package eRah qui génère une matrice contenant les aires de chaque molécule présente dans nos échantillons. A partir de cette matrice, l'outil MetaboAnalyst a permis l'analyse statistique de ces données métabolomiques.

Chez *Pinus halepensis*, et chez *Pinus sylvestris*, aucune différence significative sur le contenu en terpènes total n'a été identifiée entre les deux modalités étudiées. En comparant le contenu en terpènes par famille chez les deux espèces, *Pinus halepensis* présenterait quantitativement plus de sesquiterpènes et de diterpènes que *Pinus sylvestris*. Les sesquiterpènes sont connus pour jouer un rôle important dans l'inflammabilité, ce qui confirmerait que *Pinus halepensis* possède des caractères chimiques favorisant l'inflammabilité.

Mots-clés : *Pinus*, feu, terpènes, Erah, MetaboAnalyst.

Processus allélopathique et bio-herbicide : étude métabolomique de la diversité micro-algale et caractérisation de substances allélochimiques assistée par les réseaux de similarités

Slimane CHAÏB¹, Delphine RAVIGLIONE¹, Carole VIALLEIX³, Annabel LEVERT², Jean-Paul CADORET³, Cédric BERTRAND¹, Isabelle BONNARD¹

¹PSL Research University EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, LabEx-CORAIL, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

²AKINAO, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

³GREENSEA, Promenade du Sergent Navarro, 34140 Mèze, France

Slimane.chaib@univ-perp.fr

Le glyphosate est la molécule active d'un des herbicides les plus connus au monde : le Roundup de Monsanto homologué en 1974. En mars 2015, l'évaluation du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), une agence de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), classait le glyphosate dans la catégorie des produits à fort impact sur la biodiversité.

Dans ce contexte, la biomasse issue de la production de micro-organismes photosynthétiques est une alternative à mettre en avant. En effet, les micro-algues constituent, au sein du milieu marin, une source variée de molécules bioactives. Il est mentionné dans la littérature la présence de substances allélopathiques connues comme ayant divers effets inhibiteurs et/ou toxiques tel que la fischerelline A qui est fortement algicide et antifongique.

Le projet « ALL DREAM » a pour but de développer un outil innovant adapté à l'analyse de la diversité chimique des micro-algues et à l'évaluation de leur potentiel comme biocide. Dans ce cadre, 150 extraits de micro-algues issues de diverses familles ont été soumises à un test d'inhibition de la photosynthèse ainsi qu'à un test antioxydant. Les résultats sont couplés à une approche métabolomique et aux réseaux de similarités afin de faciliter l'annotation et la caractérisation de composés bioactifs.

Les données sont tout d'abord traitées via la plateforme W4M et le logiciel R. Elles font ensuite l'objet d'une analyse comparative entre la plateforme GNPS et MzMine/MetGem avant d'être traitées sous Cytoscape pour l'annotation. Puis, les extraits actifs sont soumis à un fractionnement bio-guidé via un couplage LC-PDA-ELSD avec collecteur de fractions et LC-HRMS pour obtenir une caractérisation du/des métabolites actifs. Les extraits actifs sont ensuite testés sur des jeunes plantules afin d'analyser leur effet herbicide.

Cette conférence orale présente l'ensemble des résultats mettant en avant le potentiel de cette ressource « bleue » que sont les micro-algues ainsi que l'alternative « verte » qu'elles représentent pour l'agriculture du futur.

Mots-clés : Métabolomique, diversité micro-algale, réseaux de similarité, composés bioactifs, herbicide.

Variabilité zonale du métabolome de la macroalgue brune *Taonia atomaria* : annotation par l'approche des réseaux moléculaires et liens avec le microbiote associé

Nathan CARRIOT¹, Benoit PAIX¹, Stéphane GREFF², Jean-François BRIAND¹, Gérald CULIOLI¹

¹Université de Toulon, MAPIEM (EA 4323), Toulon, France

²Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (UMR CNRS 7263, IRD 237), Aix-Marseille Université, Avignon Université, Marseille, France
nathan-carriot@etud.univ-tln.fr et benoit.paix@univ-tln.fr

Au sein des écosystèmes marins, les macroalgues sont sujettes à une colonisation microbienne à leur surface. Plusieurs modèles de macroalgues ont montré une grande diversité d'interactions chimiques positive ou négatives avec leur microbiote associé, montrant alors l'influence respective de l'hôte et du microbiote. L'algue brune cosmopolite *Taonia atomaria* (Dictyotaceae) a précédemment montré une production de certains métabolites de surface ayant des activités anti-adhésions contre certaines souches bactériennes [1]. L'objectif de notre étude est de comprendre quel est la variabilité du métabolome de surface de l'algue à l'échelle d'un individu et quel est son impact sur les communautés bactériennes associées. Une approche métabolomique par LC-(+)-ESI-MS a été entreprise pour répondre à la première question. Pour cela, une annotation exhaustive de la production métabolique est essentielle afin de comprendre les rôles physiologiques associés. L'annotation par réseaux moléculaires constitue un outil puissant qui permet l'identification potentielle d'un grand nombre de métabolites et ce, même dans le cas d'organismes peu étudiés. Les données de spectrométrie de masse obtenues par LC-(+)-ESI-MS/MS sont la base de la construction d'un réseau moléculaire : le degré de similarité entre deux spectres de masse va permettre de définir si les deux métabolites correspondants témoignent de structures chimiques similaires [2]. Dans le cas de *T. atomaria*, la construction initiale d'un premier réseau a conduit à l'identification de plusieurs dizaines de métabolites répertoriés en 14 familles chimiques, dont certaines constituées de lipides originaux. Dans le cadre de l'étude par métabolomique associée à la variabilité zonale, l'annotation par réseaux moléculaires a permis d'identifier les métabolites les plus impliqués dans les différences entre la base et le sommet de l'algue (VIPs). Deux familles de lipides (les phosphatidylcholines et les diacylglycérylhydroxyméthyltriméthyl- β -alanines) sont ainsi exprimés avec des concentrations significativement plus importantes au niveau des zones apicales qu'à la base de l'algue. Ces lipides membranaires sont notamment connus pour être impliqués dans la phase de croissance de certaines algues, ce qui expliquerait les différences d'expressions observées à l'échelle du thalle [3]. Enfin, ces différences de composition métabolique à la surface de l'algue ont été reliées à celles mises en évidence pour les communautés épi-bactériennes : elles semblent être corrélées à des différences de diversité bactérienne qui s'observent également entre la base et le sommet.

Références :

- [1] Othmani A *et al.*, *Biofouling* (2016) 32, 801-813
- [2] Wang, M. *et al.* *Nat. Biotechnol.* (2016) 34, 828-837
- [3] da Costa E *et al.* *Molecules* (2018) 23, 187

Mots-clés : Réseaux moléculaires, lipidomique, Algues brunes, microbiote.

**Résumés des ateliers et des
communications
du 13 juin 201**

Session 1

Métabolomique et méthodes d'extraction en écologie chimique

Emilie STIERLIN et Thomas MICHEL

Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France

L'écologie chimique est une approche pluridisciplinaire qui consiste en l'étude des médiations chimiques entre les organismes vivants, et avec leur environnement (1). Les communications plantes/insectes sont régies par des signaux chimiques complexes et actifs à de faible concentration tout en faisant intervenir une diversité de molécules non volatiles ou volatiles. Les plantes produisent ainsi une grande variété de métabolites secondaires (alcaloïdes, terpénoïdes, composés phénoliques, etc.) qui jouent un rôle essentiel dans les processus d'attraction ou de défense de ces dernières (2). Quelle que soit la nature de ces métabolites, leur caractérisation par une stratégie métabolomique implique trois grandes étapes : l'extraction, l'analyse et le traitement des données. La réussite d'une telle étude dépend grandement de l'étape d'extraction qui doit permettre l'extraction des métabolites d'intérêt, et qui se révèle être très délicate du fait de nombreuses contraintes (diversité moléculaire, faible concentration des métabolites, extraction *in-vivo*...) (3-4). Il est nécessaire de déterminer avant toute étude la ou les méthodes d'extraction les mieux adaptées pour obtenir des résultats répétables et représentatifs de la question biologique.

L'objectif de l'atelier sera de mettre en avant les contraintes liées au développement d'une stratégie extraction dans un contexte d'écologie chimie et de présenter des méthodes modernes d'extraction telles que l'extraction assistée par ultra-sons, l'extraction assistée par fluide pressurisé ainsi que l'extraction en espace de tête.

Références:

- (1) Bagnères A.-G., Hossaert-McKey M. *Chemical ecology* ISTE Ltd, London (2016)
- (2) Becker C., Desneux N., Monticelli L., Fernandez X., Michel T., Lavoie A.-V. *BioMed Research International* (2015) 1-18
- (3) Mushtaq M.Y., Choi Y.H., Verpoorte R., Wilson E.G. *Phytochemical analysis* (2014) 25, 291-306
- (4) Stierlin E., Michel T., Fernandez X. *Spectra Analyse* (2017) 43-52

Le couplage LC/MS/MS en métabolomique clinique

Jean-Marie GUIGONIS

Transporteurs, Imagerie et Radiothérapie en Oncologie UMR E-4320, Faculté de médecine, laboratoire de biophysique, Université Cote d'azur, Nice, France

Choix de la colonne de chromatographie liquide : phase inverse ou HILIC.

Importance d'une calibration spécifique pour augmenter la précision de mesure en basses masses.

Optimisation des paramètres du spectromètre de masse.

Opportunité d'une étude en micro ESI ou capillaire ESI.

Réflexion sur les éventuels contaminants.

Améliorer la détection et la qualité de vos données avec l'Ultra-Fast QTOF LCMS-9030

Thierry LEGOUPIL

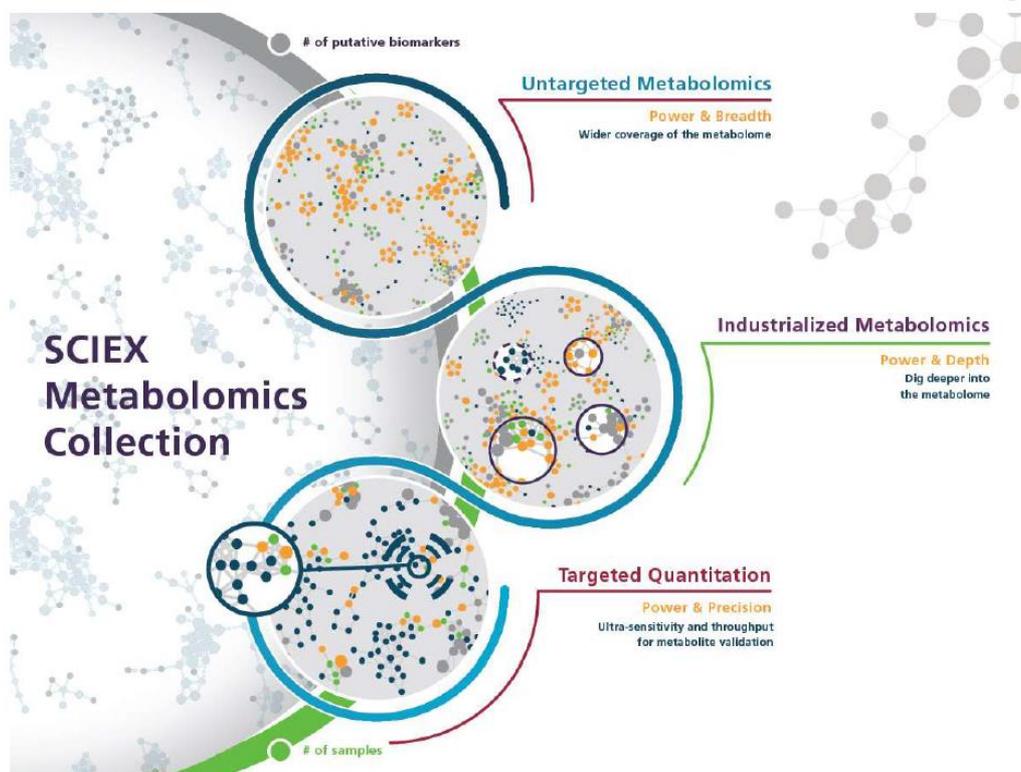
Shimadzu, 77448 Marne-la-Vallée, France
tl@shimadzu.fr

L'introduction du nouvel Ultra-Fast QTOF LCMS-9030 par Shimadzu est une bonne solution pour améliorer les approches en métabolomique grâce à une alliance entre sensibilité et une grande vitesse de balayage en MS et MS/MS (100Hz). Sa stabilité de sa calibration externe et la robustesse de ce nouvel instrument permettent de conserver sur le long terme la qualité et la reproductibilité de vos recherches. Il est possible de décupler ces performances en combinaison avec la chromatographie supercritique SFE/SFC Nexera UC ou avec le micro débit avec la chaîne Mikros.

The power of SWATH applied to Metabolomic

Olivier HUTINEL

Sciex, 15 avenue de la Norvège, 91140 Villebon-sur-Yvette, France
olivier.hutinel@sciex.com



Session 2

Présentation du workflow de retraitement des données pour une étude métabolomique par LC-HRMS

Thierry BERTON

Aix Marseille Université (AMU), C2VN, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France
thierry.berton@univ-amu.fr

Lors d'une étude métabolomique par LC-HRMS, à partir des données brutes, plusieurs étapes de retraitement sont nécessaires avant d'obtenir une matrice nettoyée et de pouvoir effectuer des analyses statistiques. Dans un premier temps, les données brutes générées lors du traitement des échantillons par LC-MS sont extraites via XCMS. Plusieurs paramètres du script XCMS doivent être adaptés en fonction de la technologie utilisée (HPLC ou UPLC, QTOF ou Orbitrap...), de la matrice et de la qualité des données (bruit de fond...). Les EICs (*Extracted Ion Chromatogram*) ainsi obtenus sont ensuite triés visuellement afin de nettoyer la matrice générée via XCMS. Une étape de normalisation des données est également nécessaire afin de corriger la dérive analytique de l'appareil au cours de la séquence d'injection. Des ACP sont réalisées entre chaque étape du retraitement pour évaluer l'impact des traitements sur la qualité des données obtenues. Une matrice regroupant l'ensemble des variables extraites est alors obtenue, indiquant pour chaque variable l'intensité détectée dans chaque échantillon analysé.

Traitement métabolomique de données GC-MS avec le script *Erah*

Stéphane GREFF

IMBE – Aix Marseille Univ, Univ Avignon, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France
stephane.greff@imbe.fr

Le script XCMS est devenu la référence en accès libre au sein de la communauté scientifique pour le traitement des données acquises en LC/MS, que ce soit directement sous R, via une interface graphique (MZmine) ou la plateforme Galaxy (W4m). Les analyses acquises en GC/MS ne permettent pas le traitement métabolomique de ces données en raison du grand nombre de fragmentation générée par la source d'ionisation par impact électronique. Dans cet atelier, les différentes étapes du script eRah, conçu pour le traitement des données acquises en GC/MS sous R, vous sera détaillé.

MetaboQuan et LipidQuan - Méthodes clés en main pour l'analyse ciblée des lipides et des métabolites

Christophe SIROIT

Waters, BP 608, Saint-Quentin-en-Yvelines cedex, France
christophe.siroit@waters.com

L'étude du métabolome requiert une approche analytique la plus globale possible. La spectrométrie de masse et les solutions informatiques associées sont des outils indispensables au laboratoire souhaitant cibler des molécules d'intérêt biologique ou identifier de potentiels biomarqueurs.

Waters développe un panel de méthodes clés en main dont le but est de fournir aux laboratoires des protocoles rapides et validés afin qu'ils étendent leur capacité analytique de prestation. Pour ces approches ciblées du métabolome, nous nous attacherons à détailler l'utilisation de spectromètres de masse de type triple quadripôle au travers d'exemples choisis parmi nos applications les plus récentes.

Les dernières technologies instrumentales ainsi que les gains analytiques apportés par des approches chromatographiques complémentaires seront détaillés en même temps que le panel de métabolites et de lipides sera présenté.

Mots-clés : Métabolomique, lipidomique, ciblée, triple quadripôle.

La nouvelle génération de LCMS haute résolution Orbitrap : l'Exploris 480

Sébastien FOLZ

Thermo Fisher, 16 avenue du Québec 91140 Villebon sur Yvette
sebastien.folz@thermofisher.com

La nouvelle génération de LCMS haute résolution Orbitrap : l'Exploris 480



Mots-clés : LCMS Haute résolution, Orbitrap, métabolomique, sélectivité, sensibilité.

Session 3

Annotations sous Galaxy (W4M)

Catherine TARDIVEL

Aix Marseille Université (AMU), C2VN, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France
c.tardivel@univ-amu.fr

Cet atelier présentera les différentes étapes qui permettent, suite au prétraitement des données effectué avec XCMS, d'annoter les pics qui ont été sélectionnés.

Cette étape passe par l'utilisation de Galaxy/Workflow4Metabolomics : <https://galaxy.workflow4metabolomics.org/>.

Exemple d'annotation à partir d'une base de données interne permettant d'avoir des temps de rétention connus à partir de standards. Puis, sélection des annotations et critères de décision pour l'élimination des doublons dans la matrice issue de Galaxy.

Initiation à l'annotation via l'approche par réseaux moléculaires (GNPS, Cytoscape)

Nathan CARRIOT

Université de Toulon, MAPIEM (EA 4323), Toulon, France
nathan-carriot@etud.univ-tln.fr

L'interprétation spectres de masse (MS2) d'un mélange complexe d'origine naturelle est une tâche ardue, généralement effectuée de manière manuelle par un spécialiste. Récemment, une approche bio-informatique innovante et puissante, nommée « réseaux moléculaires » (*molecular networking*) a été mise en place par un laboratoire américain de l'Université de Californie afin d'annoter le métabolome d'un mélange complexe. Le but de cet atelier est de se familiariser avec l'utilisation des réseaux moléculaires (par le biais de la plateforme GNPS et de Cytoscape) avec notamment la description et l'optimisation des paramètres. En corrélation avec cette approche, l'atelier portera également sur l'identification des métabolites grâce à l'analyse des spectres de masse et à la recherche dans les banques de données à disposition.

Analyse de la relation hôte-microbiote intestinal par métabolomique : Développement d'un dosage ciblé normalisé et quantitatif

Tuan Hai PHAM, Ulf SOMMER, Svenja HEISCHMANN, Doreen KIRCHBERG, Xenia IWANOWA, Barbara WOLF, Martin BURATTI, Cornelia ROEHRING, Therese KOAL

BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Austria
barbara.wolf@biocrates.com

Présentation par **Benoît SARAZIN**

Proteomic Solutions, Proteigene, 7 rue Léo Lagrange 27950 St Marcel, France ; distributeur en France de Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Autriche
sarazin@proteomicsolutions.fr

Introduction : La métabolomique ciblée fournit une image instantanée du phénotype métabolique d'un système biologique. Biocrates a développé un test, en spectrométrie de masse, quantitatif ciblé et normalisé pour l'analyse multiplexée des métabolites de micro-organismes qui peuplent l'intestin de l'hôte.

Matériel et méthodes : 10 µl d'échantillons de plasma et de fécès sont déposés sur une plaque à 96 puits contenant des étalons internes. Après dérivatisation et extraction, des analyses LC-MS et FIA-MS sont effectuées (UHPLC Agilent 1290 Infinity - SCIEX QTRAP® 5500). Le logiciel MetIDQ™ est utilisé pour la totalité de l'analyse automatique, de l'enregistrement des échantillons aux résultats.

Résultats : Au total, plus de 500 métabolites issus de 14 classes de petites molécules et de 11 classes de lipides sont analysés par ce nouveau test quantitatif ciblé et normalisé. L'analyse par LC-MS fournit des résultats quantitatifs de petites molécules couvrant les acides biliaires, les dérivés d'indole, les acides aminés et composés apparentés. Les acyl-carnitines, lipides et monosaccharides sont analysés par FIA-MS. Le kit est au format de plaque de 96 puits. 80 échantillons, plus des échantillons servant aux contrôles qualité et calibrateurs, peuvent être analysés en moins de 35 heures.

Conclusion : Ce nouveau test ciblé quantitatif normalisé permet l'analyse multiplexée de plus de 500 métabolites du microbiote de l'intestin de l'hôte. Une première note d'application démontre le pouvoir de cette solution pour le phénotypage métabolique d'échantillons de plasma et fèces, permettant d'évaluer la relation entre l'hôte et le microbiote intestinal.

Mots-clés : Microbiote, LC-MS, métabolomique ciblée, quantification.

Session 4

Traitement statistique de jeux de données multi-omiques (Mixomics)

Benoît PAIX

Université de Toulon, MAPIEM (EA 4323), Toulon, France
benoit.paix@univ-tln.fr

L'atelier portera sur les analyses multi-omiques en intégrant différents jeux de données issus d'approches -omiques complémentaires. A partir de deux jeux de données obtenus par métagénomique ciblée [séquençage de l'ADNr 16S] et par métabolomique non ciblée [LC-(+)-ESI-MS], l'objectif de l'atelier sera de montrer les différentes approches permettant d'analyser les corrélations qui existent entre les différentes variables de chacun des jeux de données. Parmi les outils proposés, le package MixOmics sous R sera mis en avant, notamment pour permettre la construction d'un réseau de corrélation entre les différentes variables des deux jeux de données.

Fabrication et validation de biomarqueurs multiplexes

Jean-Charles MARTIN, Baninia HABCHI

Aix Marseille Université (AMU), C2VN, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France
jean-charles.martin@univ-amu.fr et beninia_habchi@hotmail.com

La classification d'individus ou d'observations à partir de données de métabolomiques revêt une importance considérable dans différents domaines : clinique (pronostique), environnement, agronomie etc... Il est rare qu'un seul biomarqueur (métabolite) suffise, et il faut alors utiliser un ensemble de bio-indicateurs ; leur performance peut être testée avec différentes méthodes discriminantes. Néanmoins il peut être avantageux d'assembler ces bio-indicateurs en un score composite à l'aide d'une équation et dont la valeur indiquera le statut de l'observation. Ces biomarqueurs composites présentent l'avantage d'être plus robustes et moins soumis aux aléas incontrôlés pouvant affecter la performance de biomarqueurs isolés.

Nous présenterons comment réaliser le calcul d'un tel score à partir de l'algorithme SIMCA, et sa validation par courbe ROC en utilisant MetaboAnalyst.

PREDRET, un outil en ligne de prédiction des temps de rétention entre différents systèmes chromatographiques

Baninia HABCHI

Aix Marseille Université (AMU), C2VN, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France
beninia_habchi@hotmail.com

L'analyse métabolomique basée sur la spectrométrie de masse utilise couramment des méthodes de séparation, telles que la chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS ou GC/MS). Bien que ces approches améliorent la séparation des composés isobares et de certains composés isomères, l'identification des composés reste l'un des principales limites de l'approche métabolomique non ciblée. Cela peut être lié au fait que le paramètre temps de rétention (TR) est souvent négligé, particulièrement pour les systèmes LC où le RT est spécifique à un système chromatographique spécifique (CS) et il n'y a pas une référence de RT. Alors, pour tenir compte des RT afin d'améliorer la procédure d'identification des métabolites il faut avoir une base de données interne pour chaque CS et pour chaque laboratoire. Cela n'est pas évident car il faut acheter les standards et les passer sur les différents CSs.

Donc l'objectif de cet atelier est de présenter PredRet, un outil relativement récent développé par Stanstrup et al (Anal. Chem., 2015, <http://predret.org>) permettant de partager les RT entre les laboratoires et les différents systèmes chromatographiques grâce à une base de données de RT de différents CS qui est disponible sur ce site. Les utilisateurs peuvent télécharger leurs propres RT expérimentaux et les RT prédits pour des composés qu'ils n'ont pas déterminés expérimentalement dans leurs propres expériences, ce qui permet une identification putative d'un nombre plus grand de métabolites.

Résumés des posters

Mise en place du système de management de la qualité sur la plateforme BIOMET

Claudine ANTONA, Marion NOWICKI, Jean-Charles MARTIN

Aix Marseille Université (AMU), C2VN, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France

Claudine.antona@univ-amu.fr

Cette présentation vise à mettre en avant l'importance de la mise en place d'un système de management de la qualité (SMQ) au sein de la plateforme analytique de métabolomique BIOMET, en ayant pour objectif d'obtenir d'ici deux ans la certification iso 9001.

A travers l'expérience menée à BIOMET et grâce à l'implication de la direction, la mise en place du SMQ s'avère un outil intéressant pour améliorer l'organisation et le fonctionnement de la plateforme. La qualité est donc un enjeu stratégique pour la plateforme BIOMET.

Comme de nombreuses plateformes, nous rencontrons des difficultés récurrentes, telles que :

- départs de personnels
- transmission orale du savoir
- maintenance d'équipements de plus en plus sophistiqués et performants
- besoin d'optimiser le fonctionnement

Pour acquérir de meilleures pratiques dans l'organisation générale de nos activités, nous nous sommes appuyés sur le référentiel iso 9001.

Le SMQ nous accompagne afin de contribuer à la satisfaction de nos utilisateurs, par une meilleure organisation de notre travail en améliorant la qualité des prestations que nous réalisons, soit pour des travaux en internes, soit pour des travaux en collaboration.

Initier la démarche qualité, nous permet de traiter les problèmes comme par exemple la gestion des données au départ des stagiaires et/ou du personnel, d'améliorer la gestion de nos échantillons, d'assurer la traçabilité des performances des appareils, de mieux gérer les relations avec nos utilisateurs par une meilleure organisation de notre travail. Tout ceci nous permet d'implanter plus solidement un système fiable et performant grâce à une meilleure traçabilité de nos travaux de recherche. Lorsque les fondations sont bien en place nous observons un gain de temps (fini les recherches interminables d'échantillons dans les congélateurs !). Par dessus tout, cela va nous permettre d'accroître la visibilité et l'attractivité de la plateforme par rapport aux partenaires privés.

Malgré tout cela, il est important de noter que certains aspects de cette démarche sont chronophages :

- rédaction de protocoles expérimentaux, de modes opératoires...
- mise en place de nouvelles procédures touchant à l'organisation générale du travail...

Les bénéfices du SMQ s'observant essentiellement à moyen terme, il est nécessaire d'être rigoureux et persévérant dans la mise en œuvre du SMQ.

La démarche qualité est un travail d'équipe, nous sommes tous concernés et l'appui de la direction est un atout nécessaire et primordial.

L'investissement en temps pour la mise en place du SMQ améliore *in fine* l'organisation et la gestion de la plateforme.

Mots-clés : Qualité, traçabilité, fiabilité, amélioration.

Analyse ciblée de terpènes acycliques et de leurs dérivés glycosylés par GC-FID/MS et UHPLC-HRMS pour l'étude de voies de biosynthèse de composés odorants chez la rose (*Rosa sp*)

Florence AUBERON¹, Cyril COLAS², Sylvie BAUDINO³, Jean-Claude CAISSARD³, Xavier FERNANDEZ¹, Thomas MICHEL¹

¹Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France

²Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans-CNRS, UMR 7311 BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France

³Université de St Etienne, Laboratoire BVpam, FRE 7272, 23 rue du Dr Michelon 42023 Saint Etienne Cedex 2, France

florence.auberon@univ-cotedazur.fr

Par son intérêt ornemental et olfactif, la rose (*Rosa sp.*) occupe une place hautement symbolique dans nos sociétés. Adulée, parfois sanctifiée, la « Reine des Fleurs » est aujourd'hui la fleur la plus vendue au monde. Sa domestication intensive en vue d'accroître robustesse et esthétisme semble avoir neutralisé sa richesse olfactive : les roses vendues pour leurs fleurs coupées ne sont plus odorantes. Leur parfum est-il définitivement perdu ? Ces roses modernes auraient-elles un potentiel odorant latent associé à une incapacité d'émettre des composés odorants alors séquestrés sous une forme non volatile ? Magnard *et al.* ont récemment découvert que la biosynthèse du géraniol, un monoterpène acyclique en partie responsable de l'odeur de la rose, ne se faisait pas grâce à des terpènes synthèses, comme chez les autres plantes, mais grâce à une enzyme appelée RhNUDX1 [1]. L'objectif du projet **ROSASCENT** est d'utiliser une approche interdisciplinaire combinant des analyses chimiques, biochimiques et génétiques afin de caractériser toutes les protéines jouant un rôle dans cette nouvelle voie métabolique, de la biosynthèse du géranyldiphosphate aux dérivés du géraniol.

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces hypothèses biosynthétiques, nous nous sommes focalisés sur la détection et la quantification des Monoterpènes et Sesquiterpènes Acycliques volatiles (**MSA**) d'une part, ainsi qu'à leur dérivés glycosylés (**MSAG**) non volatiles d'autre part, dans les pétales de roses odorantes et non odorantes. Le suivi cinétique de ces composés d'intérêt a été réalisé en fonction du stade phénologique de la fleur (du bouton fermé à la fleur sénescence). Les informations obtenues nous permettront d'établir leur ratio de concentration et de proposer une relation biosynthétique entre ces deux sous-familles chimiques.

Ainsi, une méthode extractive originale par ASE a été développée pour l'enrichissement respectif de MSA et de MSAG sur un panel de 20 variétés de roses. Les MSA (géraniol, nérol, citronellol...) ont été analysés et quantifiés par GC-FID. Les MSAG (géraniol- glucoside, nérol- glucoside...) ont été quantifiés par UHPLC-HMRS.

Références :

[1] Magnard *et al.*, *Science* (2015) 349, 81-83

Mots- clés : *Rosa sp.*, analyse ciblée, quantification, terpènes acycliques, terpènes acycliques glycosylés.

Increased content of lysophospholipids, diacylglycerol and sphingomyelin species in isolated triglycerides-rich lipoproteins and HDL from patients with coronary artery disease

Magali BARCHUK¹, Ljubica SVILAR^{2,3}, **Patricia ANCEL**², Veronica MIKSZTOWICZ^{1,4}, Graciela LOPEZ¹, Miguel RUBIO⁵, Laura SCHREIER¹, Anne DUTOUR², Benedicte GABORIT², Jean-Charles MARTIN², Gabriela BERG^{1,4}

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC). Departamento de Bioquímica Clínica. Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Buenos Aires, Argentina

²Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France

³CRIBIOM, Criblage Biologique Marseille, Faculté de Médecine de la Timone, Marseille, France

⁴Universidad de Buenos Aires. CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina

⁵Universidad de Buenos Aires. Hospital de Clínicas "José de San Martín". División de Cirugía Cardiovascular. Buenos Aires, Argentina

patricia.ancel@univ-amu.fr

Introduction: android obesity and the atherogenic dyslipidemia, with increased TG-rich lipoproteins remnants (TRL) and decreased HDL levels, are associated with higher risk of coronary artery disease (CAD). Plasma lipidomics studies have revealed that particular molecular lipid species are involved in the development of atherosclerosis and CAD. However, the lipidomic analysis of isolated lipoproteins (TRL and HDL) has been scarcely studied so far. This qualitative analysis is of interest as it would allow differentiating specific lipid species contribution to the development of CAD.

Materials and Methods: lipidomic analysis was performed in 15 patients undergoing coronary artery bypass graft (CAD) and 12 patients with valve replacement (No CAD). Serum samples were obtained before surgery and TRL and HDL were isolated by ultracentrifugation. For lipidomics, lipids were extracted from each fraction with MTBE. Lipidomics was carried out on a LC C18 column hyphenated to a Q-Exactive plus mass spectrometer, using both positive and negative ionization mode, and acquired in full MS and data dependent MSMS mode. Lipid annotation was performed using a combination of the open source XCMS and ThermoFischer LipidSearch software.

Results: a total of 242 lipid species were identified in both lipoproteins fractions. In CAD patients, higher content of total LPC ($p < 0.002$) and LPE ($p < 0.02$) in TRL were found. In this lipoprotein higher levels of LPC(20:4), LPC(38:5) and LPC(16:0) as well as LPE(18:1) and LPE(16:0) were observed in CAD, while lower content of MG(18:2p) was detected compared to no CAD patients ($p < 0.04$). No differences in the total content of each lipid in HDL were observed between groups, although CAD patients presented higher levels of DG(18:1/20:4) and SM(22:0/20:2) ($p < 0.04$).

Conclusion: The distribution of lipid species, especially bioactive lipids, in TRL and HDL could differentially contribute to atherosclerosis progression and CAD development. Assessment of molecular lipids from lipoproteins may allow a better understanding of the role of these species in the development of atherosclerosis and the risk of CAD.

Keywords: Lipidomics, coronary artery disease, trygliceride-rich lipoproteins, HDL.

Un nouveau dérivé de la 8',9'-déhydroascochlorine, isolé du champignon marin *Acremonium* sp. Ex7 (UBOC-A-108044), associé à la crevette hydrothermale *Rimicularis exoculata*

Dominique BONHOMME¹, Laure MARTINELLI², Amélie WEILL², Laurence MESLET-CLADIERE², Georges BARBIER², Gaëtan BURGAUD², Mohamed MEHIRI¹

¹Institut de Chimie de Nice. UMR 7272 CNRS, Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, 28 avenue Valrose, 06103 Nice, France

²Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM). EA3882, ESIB, Technopôle Brest-Iroise, Parvis Blaise Pascal, 29280 Plouzané, France
dominique.bonhomme@unice.fr

La métabolomique est littéralement l'analyse des molécules issues des activités métaboliques d'organismes vivants, *i.e* les métabolites. Le métabolome, encore peu exploré chez les champignons marins pélagiques et profonds, comprend d'une part les métabolites primaires et d'autre part toutes les petites molécules appartenant aux métabolites secondaires (également désignés par métabolites spécialisés), produits en réponse adaptative ou de défense aux modifications de conditions de vie. L'étude d'un métabolome, en ciblant les métabolites, peut permettre de découvrir de nouvelles molécules valorisables dans le domaine de la santé (le nombre de molécules marines d'origine fongique biologiquement actives découvertes est en augmentation et a plus que doublé entre les années 2010 et 2016, d'après Edgcomb & Burgaud).

Les champignons marins issus des grandes profondeurs peuvent être considérés comme une source très prometteuse de métabolites secondaires pharmacologiquement actifs, comme des antibiotiques ou des antifongiques. Dans cette optique, une collection d'isolats fongiques a été précédemment constituée à partir d'échantillons hydrothermaux (Burgaud et al. 2009, Burgaud et al. 2010). Parmi ces isolats, la souche d'*Acremonium* sp. Ex7, isolée de crevettes hydrothermales affiliées à l'espèce *Rimicularis exoculata* au niveau du site hydrothermal « TAG », situé au niveau de la ride médio-atlantique à 3650 mètres de profondeur, a été choisie comme modèle d'étude. Des cultures de cet isolat ont été générées à partir de deux milieux nutritifs distincts, à savoir le MEA (Malt Extract Agar) et le GYPS (Glucose-Yeast extract-Peptone-Starch).

L'analyse par LC-MS à partir des deux milieux de culture, des métabolites constitutifs du métabolome d'*Acremonium* sp. EX7, a révélé plusieurs métabolites spécialisés, notamment des dérivés de l'ascochlorine. Des analyses structurales approfondies ont été menées sur ces métabolites après extraction avec des solvants et mélanges de solvants organiques appropriés et isolement par RPC18-HPLC-UV. Ainsi, la RMN (1D et 2D) et la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS-Orbitrap) ont permis d'identifier plusieurs molécules du métabolome, dont un dérivé de la 8',9'-déhydroascochlorine. Des tests d'activité biologique effectués sur cette dernière ont montré des activités antibactériennes, notamment sur *Staphylococcus aureus* avec une Concentration Minimale Inhibitrice de 40 µg/ml et des activités antifongiques intéressantes.

Mots-clés : *Acremonium* sp., *Rimicularis exoculata*, site TAG, métabolites spécialisés, dérivé de la 8',9'-déhydroascochlorine.

Utilisation de l'approche des réseaux moléculaires pour l'annotation de nouvelles classes de glycérolipides au sein du métabolome de la macroalgue brune *Taonia atomaria*

Nathan CARRIOT¹, Benoit PAIX¹, Stéphane GREFF², Jean-François BRIAND¹, Gérald CULIOLI¹

¹Université de Toulon, MAPIEM (EA 4323), Toulon, France

²Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (UMR CNRS 7263, IRD 237), Aix-Marseille Université, Avignon Université, Marseille, France

nathan-carriot@etud.univ-tln.fr

Dans le milieu marin, toute surface immergée est rapidement colonisée par des bactéries, ainsi que par d'autres micro-organismes, qui forment des structures tridimensionnelles appelées biofilms. L'algue cosmopolite *Taonia atomaria* est un modèle biologique peu colonisé et dont certains métabolites de surfaces présentent une activité anti-adhésion vis-à-vis de bactéries marines (Othmani *et al* 2016). Dans le but de réaliser des études en écologie chimique visant à mieux comprendre les mécanismes de défense chimique de cette algue, une annotation exhaustive de sa production métabolique est donc essentielle. Lorsqu'elle est couplée à une approche phytochimique « classique », l'annotation par réseaux moléculaires (via des données obtenues par LC-HRMS/MS) constitue un outil puissant qui peut conduire à l'identification potentielle d'un grand nombre de métabolites et ce, même dans le cas d'organismes peu étudiés. Dans leur globalité, les réseaux moléculaires obtenus via le serveur GNPS s'articulent en *clusters* (groupements de métabolites) représentant des familles de molécules formées du fait de la similarité de leurs spectres de masse. L'identification d'un métabolite décrit lors de l'analyse phytochimique permet ensuite d'annoter les autres métabolites au sein d'un même *cluster*. Dans le cas de *T. atomaria*, la construction initiale d'un réseau simplifié a conduit à l'identification de plusieurs dizaines de métabolites répertoriés en 14 familles chimiques, dont certaines se sont avérées constituées de lipides originaux tels que des glycérolipides portant un groupement de type géranylgeraniol, farnésol ou acide méthacrylique. La construction de réseaux de plus en plus complexes a permis finalement de caractériser plus de 200 métabolites. Cette première annotation détaillée du métabolome de *T. atomaria* permettra par la suite de mieux appréhender, lors d'études menées par métabolomique, les mécanismes de défense chimique et d'adaptation métabolique de cette algue vis-à-vis de microorganismes colonisateurs.

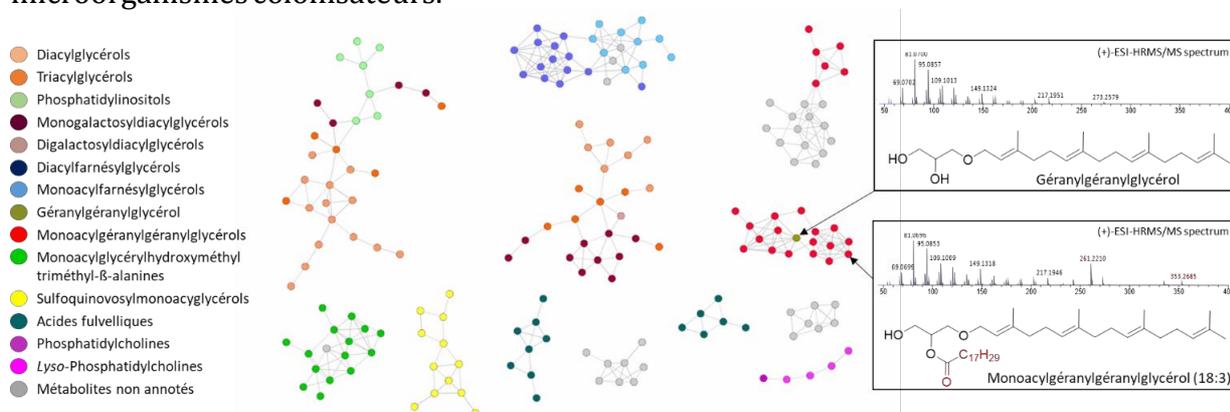


Figure 1 : Principaux clusters annotés du réseau moléculaire du métabolome de *Taonia atomaria*

Mots-clés : Réseaux moléculaires, lipidomique, glycérolipides, algues brunes, biofilms marins.

Processus allélopathique et bio-herbicide : étude métabolomique de la diversité micro-algale et caractérisation de substances allélochimiques assistée par les réseaux de similarités

Slimane CHAÏB¹, Delphine RAVIGLIONE¹, Carole VIALLEIX³, Annabel LEVERT², Jean-Paul CADORET³, Cédric BERTRAND¹, Isabelle BONNARD¹

¹PSL Research University EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, LabEx-CORAIL, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

²AKINAO, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

³GREENSEA, Promenade du Sergent Navarro, 34140 Mèze, France

Slimane.chaib@univ-perp.fr

Le glyphosate est la molécule active d'un des herbicides les plus connus au monde : le Roundup de Monsanto homologué en 1974. En mars 2015, l'évaluation du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), une agence de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), classait le glyphosate dans la catégorie des produits à fort impact sur la biodiversité.

Dans ce contexte, la biomasse issue de la production de micro-organismes photosynthétiques est une alternative à mettre en avant. En effet, les micro-algues constituent, au sein du milieu marin, une source variée de molécules bioactives. Il est mentionné dans la littérature la présence de substances allélopathiques connues comme ayant divers effets inhibiteurs et/ou toxiques tel que la fischerelline A qui est fortement algicide et antifongique.

Le projet « ALL DREAM » a pour but de développer un outil innovant adapté à l'analyse de la diversité chimique des micro-algues et à l'évaluation de leur potentiel comme biocide. Dans ce cadre, 150 extraits de micro-algues issues de diverses familles ont été soumises à un test d'inhibition de la photosynthèse ainsi qu'à un test antioxydant. Les résultats sont couplés à une approche métabolomique et aux réseaux de similarités afin de faciliter l'annotation et la caractérisation de composés bioactifs.

Les données sont tout d'abord traitées via la plateforme W4M et le logiciel R. Elles font ensuite l'objet d'une analyse comparative entre la plateforme GNPS et MzMine/MetGem avant d'être traitées sous Cytoscape pour l'annotation. Puis, les extraits actifs sont soumis à un fractionnement bio-guidé via un couplage LC-PDA-ELSD avec collecteur de fractions et LC-HRMS pour obtenir une caractérisation du/des métabolites actifs. Les extraits actifs sont ensuite testés sur des jeunes plantules afin d'analyser leur effet herbicide.

Cette conférence orale présente l'ensemble des résultats mettant en avant le potentiel de cette ressource « bleue » que sont les micro-algues ainsi que l'alternative « verte » qu'elles représentent pour l'agriculture du futur.

Mots-clés : Métabolomique, diversité micro-algale, réseaux de similarité, composés bioactifs, herbicide.

La métabolomique en région SUD PACA : principaux acteurs et secteurs d'activité

Gérald CULIOLI, Thierry PEREZ, Stéphane GREFF, Laetitia SHINTU, **Jean-Charles MARTIN**, Raphaël LUGAN, Claire DUFOUR, Thomas MICHEL Jean-Marie GUIGONIS, Thierry POURCHER, Sylvain ANTONIOTTI

jean-charles.martin@univ-amu.fr

L'activité de métabolomique en Sud-PACA est répartie sur 4 sites principaux : Avignon, Aix Marseille, Nice, Toulon; elle dépend d'une dizaine de tutelles, dispose d'un parc d'équipements d'environ 13 M€; elle bénéficie de ressources humaines comptant environ une 50ème de statutaires, d'une 10ème de contractuels; elle est enseignée dans une dizaine de masters, et a permis l'émergence depuis 5 ans d'une valorisation conséquente (plus de 100 publications, environ 70 projets de recherches).

Mots-clés : Métabolomique, lipidomique, région, multi-sites.

Discrimination de vins rosés par métabolomique non-ciblée et annotation de biomarqueurs par réseaux moléculaires

Gérald CULIOLI¹, Nathalie POUZALGUES^{2,3}, Vincent WILHELM^{2,3}, Aurélie CAMPONOVO^{2,3}, Laure CAYLA^{2,3}, Gilles MASSON^{2,3}

¹Université de Toulon, MAPIEM (EA 4323), Toulon, France

²Centre de recherche et d'expérimentation sur le vin rosé, Vidauban, France

³Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle national Rosé, Vidauban, France
culioli@univ-tln.fr et Gilles.MASSON@vignevin.com

Le rosé représente un type de vins produits et consommés dans le monde entier. Depuis 10 ans, la production et la consommation des vins rosés ne cessent d'augmenter et ce phénomène ne tend pas à s'inverser dans les prochaines années [1]. La France est non seulement le premier pays-producteur mais également le marché où sont écoulées le plus de bouteilles de rosé. Dans ce contexte, les producteurs sont très attentifs à l'amélioration de la qualité de leur production et cherchent également à mieux comprendre la typicité de leurs vins rosés. Ceci est d'autant plus vrai en Provence où près de 90% de la production viticole est consacrée à ce type de vins.

Pour la comparaison d'échantillons biologiques, la métabolomique constitue un outil de choix. En effet, cette discipline nouvelle vise à étudier de façon globale l'ensemble des métabolites, c'est-à-dire des molécules de faibles masses moléculaires (< 2000 Da), d'un échantillon. L'interprétation des données résultantes, souvent complexes, permet de connaître la réponse adaptative des systèmes biologiques étudiés à leur environnement, à une pathologie, à un stress et peut ainsi conduire à la mise en évidence de biomarqueurs spécifiques d'une classe particulière d'échantillons.

Lors de cette étude, 31 vins rosés de diverses origines géographiques (Provence, Val de Loire, Italie,...) ont été analysés via une approche métabolomique par LC-HRMS/MS. Les résultats obtenus montrent une nette discrimination, d'une part entre les vins commerciaux et ceux élaborés au Centre de recherche et d'expérimentation sur le vin rosé (Vidauban, France), mais également entre des vins d'origines géographiques différentes. L'annotation en cours des biomarqueurs ainsi mis en évidence est réalisée par : (i) l'interrogation de banques de données (Metlin, Kegg, Lipidmaps...), (ii) la construction de réseaux moléculaires (GNPS) et (iii) l'interprétation des données HRMS et HRMS/MS. Plusieurs de ces biomarqueurs ont été identifiés comme appartenant à la famille des polyphénols. La présence de polyphénols dans les vins est liée à des paramètres tels que le cépage, le procédé de vinification, le vieillissement ou encore l'origine géographique, pour ne citer que certains d'entre-eux. Ces molécules peuvent constituer de fait d'excellents marqueurs de typicité des vins rosés [2].

Références :

- [1] Pouzalgues N., Dagan L., Schneider R. and Masson G. L'arôme des vins rosés, approche combinatoire. *Revue des Oenologues* (2013) 149, 45-48
- [2] Lambert M., Meudec E., Verbaere A., Mazerolles G., Wirth J., Masson G., Cheynier V. and Sommerer N. A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. *Molecules* (2015) 20, 7890-7914

Mots-clés : Vins rosés, LC-MS, métabolomique, réseaux moléculaires, biomarqueurs, typicité.

Penicillium olsonii UBOCC-A-118169: exploring the unknown through a molecular networking based-metabolomic approach

Marie DAYRAS¹, Maxence QUEMENER², Nicolas FROTTE², Thierry LACOUR³, Elisabeth TAFFIN DE GIVENCHY¹, Virginia EDGCOMB⁴, Gaetan BURGAUD², Mohamed MEHIRI¹

University Nice Côte d'Azur, CNRS, Nice Institute of Chemistry, UMR 7272, Marine Natural Products Team, Parc Valrose, 28 avenue de Valrose, 06103 Nice, France

University of Bretagne Occidentale, 3 rue des Archives, 29238 Brest, France; University Laboratory of Biodiversity and Microbial Ecology, EA 3882, 970 avenue du Technopôle, 29280 Plouzané, France; UBOCC – ESIAB Technopôle Brest-Iroise, Parvis Blaise Pascal, 29280 Plouzané, France

Parc d'activités ArômeGrasse/Immeuble GrasseBiotech, 45 boulevard Marcel Pagnol, 06103 Grasse, France

Department of Geology and Geophysics, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, USA

Mohamed.Mehiri@univ-cotedazur.fr

Deep-sea-derived microorganisms have proven to be a prolific source of secondary metabolites with a wide variety of captivating chemical structures and diverse pharmacological properties [1]. In our recent search for bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi, a strain of *Penicillium olsonii* (Bainier & Sartory, 1912), has been isolated from an oceanic crust sample (depth 1508 meters below sea floor) collected during the International Ocean Discovery Program Expedition 360, at Atlantis Bank, Indian Ocean. The strain was selected for its rich metabolomic profile and significant crude organic extract antimicrobial activities (Minimal Inhibitory Concentration of 16 and 8 µg/mL on *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and on the Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus* MecAIII, respectively). Since the 90's, only few metabolites were isolated from *Penicillium olsonii*: DEHP (diethylhexyl phthalate), used in mitochondrial oxidative phosphorylation studies as nongenotoxic carcinogen derivative [2]; PHBA (2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxoacetaldehyde oxime), which exhibits a good antiproliferative activity against six strains of carcinoma cells [2]; and asperphenamate, an anticancer compound [3], reinforcing the interest to delve deeper on *Penicillium olsonii* UBOCC-A-119169. Metabolites isolation work flow, currently ongoing, is guided by LC-HRMS/MS data and a molecular networking-based dereplication strategy, using in-house and public databases available in GNPS. From the network analyses, about sixty metabolites were assigned with various levels of identification confidence (Figure 1).

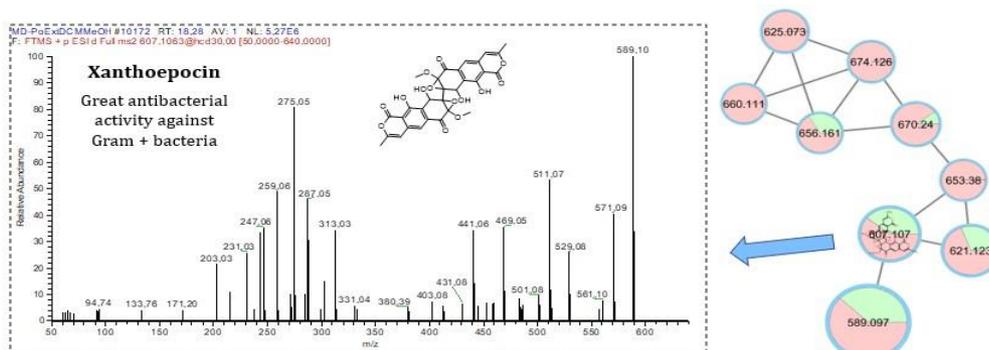


Figure 1: LC-HRMS/MS and a cluster from molecular network of a *Penicillium olsonii* extract

References:

- [1] Daletos G., Ebrahim W., Ancheeva E., El-Neketi M., Song W., Lin W., Proksch P. *Current medicinal chemistry* (2018) 25, 186-207
- [2] Amade P., Mallea M., Bouaïcha N. *J. Antibiot. (Tokyo)* (1994) 47, 201–208
- [3] Frisvad J. C.; Frisvad J. C.; Smedsgaard J., Larsen T., Samson R.A., Frisvad J. C., Larsen T. O., Samson R. A. *Studies in Mycology* (2004) 49, 201-241

Keywords: Marine fungus, oceanic crust, natural products, molecular networking.

Lipidomic application on the Biomolecule Analysis Platform of IPMC

Lucile FLEURIOT, Meng-Chen TSAI, Delphine DEBAYLE, H el ene BARELLI

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC, CNRS-UCA, UMR7275) Sophia Antipolis, 06650 Valbonne, France.

fleuriot@ipmc.cnrs.fr, barelli@ipmc.cnrs.fr

The Biomolecule Analysis Platform of the Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC) is specialized in the physicochemical characterization of biomolecules by mass spectrometry. The platform is accessible to internal teams at IPMC as well as external public laboratories and private companies. Following growing issues in the study of lipids in the OMIC family, the platform began in 2016 to develop expertise in the characterization of lipids by mass spectrometry. Today, the platform's skills apply to the identification of lipids and lipid classes from complex mixtures and to their relative quantification according to the experimental conditions.

The platform is involved in a large number of research projects, particularly in the field of fine lipid characterization. The analyses carried out on the platform relate to samples of very varied nature ranging from samples of biological origin (serum, tissue, cell types etc.), medicated (food supplements) but also archaeological (e.g. ceramics). The lipidomics projects carried out on the platform deal, for example, with: i) the nutritional influence on lipid expression in mice; ii) the study of lipid transport pathways in *in vitro* models of liposomes, iii) the complete study of lipidoma expressed in healthy or cancerous cells and treated-cells under different conditions (i.e. with and without fatty acids diets, with and without deletion of a protein of interest (siRNA), young or senescent cells); iv) the study of the lipidome in order to determine the use of different archaeological ceramics and situate them in the historical timeline.

The different experimental steps: extraction, UPLC-HRMS analyses and data reprocessing, were developed according to the nature of the samples and the biological question asked.

Lipidomic analyses are then used as a support for research. As an exemple, we study the effect of dietary fatty acids on bacterial invasion through the endothelial barrier. We are able to change the lipid profiles of HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) primary cells using different fatty acid diets (e.g. 16:0, 18:1, α -18:3, γ -18:3, 20:5, 22:4 or 22:6). Using lipidomic analyses, we have shown that the HUVEC cell type is very adaptative to all lipid diets. The fatty acids are incorporated into triacylglycerols during the first hour of diet; they are found incorporated into the phospholipids thereafter. To test the correlation of lipids and bacterial infection, we chose oleic acid (OA, 18:1) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6), the two extreme unsaturated fatty acids of the omega 3 family. We have shown that the incorporation of DHA into the cellular membranes imposed by diet with DHA has a consequence on the invasion of uropathogenic *E. coli*. Altogether, our data show that we can strengthen the endothelium against bacterial invasion by shifting the lipid profile of HUVEC membranes towards an increased amount of polyunsaturated-phospholipids.

Neuroprotective activity of NSP06: an eco-friendly plant extract from *Verbena officinalis*

Elnur GARAYEV, Patricia FRANCON, Laurent BOYER, Philippe POINDRON, Maud COMBES, Noëlle CALLIZOT

Neuro-Sys SAS, R&D Department, 410 CD60 Parc de l'Oratoire de Bouc, 13120 Gardanne; France
elnur.garayev@neuro-sys.com

Alzheimer disease affects mainly people over 65 years old, suffering from different clinical symptoms such as progressive decline in memory, thinking, language, and learning capacity. In addition, sleep disorders are commonly found in cerebral degenerative disorders. Plants have formed the basis of sophisticated traditional medicine systems among which are Ayurvedic, Unani, Chinese... in these traditional medicines, numerous plants are used in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or dementia. From these medicine systems, many drugs were identified and are still in use today.

Based on this approach, we studied the potential neuroprotective effect of an "eco-friendly" plant extract called NSP06 obtained from 2 plants including *Verbena officinalis*. This eco-extract was generated using an ultrasound-assisted extraction method. NSP06 efficacy was evaluated *in vitro* on cellular models of Alzheimer's disease. A large and significant protective effect (neurons and connections) was observed. A deep analytical profile analysis was performed by the UHPLC-DAD-ESI-MS/MS method in order to better understand NSP06 neuroprotective activity. A series of active compounds were identified, and 3 active compounds seemed to support the neuroprotective activity: ursolic acid, chlorogenic acid and apigenin. Interestingly, a synergistic effect was observed between the 3 active components and was optimal under a specific ratio between the 3 molecules. NSP06 (containing this optimal synergistic ratio) is under development as a food supplement and will be on the market at the end of the year for memory deficits, associated with sleep disorders.

Keywords: NSP06, Alzheimer's disease, *Verbena officinalis*, synergistic activity.

Study of *Heliotropum suaveolens* seeds alkaloids

E. A. GARAYEV, R. H. HASANOVA, N. S. RASULOV, Sh. Y. ISMAILOVA, Sh. I. GULIYEVA, E. L. AHMADOV, N. S. HUSEYNOVA, I. S. MOVSUMOV

Department of General and Toxicological Chemistry, Azerbaijan Medical University
eldargar@mail.ru

Heliotropium suaveolens M.Bieb (*Boraginaceae*) is a plant rich in alkaloids. Seeds of *H. suaveolens* contain hepatotoxic alkaloids, such as echinatine, europine, heliotrine, lasiocarpine. This species is distributed on the territory of Caucasus (excepting Western Caucasus), Central Dnepr, Crimea, Balkan and on the territory of Azerbaijan. In the traditional medicine of Azerbaijan aqueous extracts are used as anthelmintic and in the treatment of kidney stones.

Raw material of *H. suaveolens*, seeds, were collected in September 2018 on the territory of Azerbaijan Republic in Shamakhi. It was dried at the ambient temperature.

Alkaloids extraction was realized in several steps. First the grinded raw material was extracted by petroleum ether, in order to eliminate fats. After decantation, the marc was extracted by maceration in 95% ethanol for 24 hours 3 times, using each time fresh solvent. Ethanol was evaporated, the extract was suspended in 50 mL of water and aqueous solution was partitioned 2 times with 50 mL of chloroform. Chloroform extracts were mixed, filtered through filter paper and concentrated on water bath.

Obtained extract was analyzed by Thin-Layer Chromatography in the solvent system chloroform/methanol/25% ammonia solution (7.5/2.4/0.1, v/v/v). Three spots belonging to alkaloids ($R_f = 0.06, 0.25$ and 0.53) were detected on plates.

Each of three identified compounds were isolated using preparative TLC method. Structure identification is ongoing. It will be realized using spectroscopic methods, such as UV, IR and NMR spectroscopies.

Keywords: *Heliotropium suaveolens*, hepatotoxic alkaloids, extraction.

Etude longitudinale d'une exposition aiguë à uranium par approche métabolomique

Baninia HABCHI^{#1}, Stéphane GRISON^{#2}, Dimitri KERESSELIDZE², Celine GLOAGUEN²,
Christelle ELIE², Victor MAGNERON², Jean-Charles MARTIN¹, Maâmar SOUIDI²

¹Aix Marseille Université (AMU), NORT, UMR INSERM 1062, INRA 1260, 13005 Marseille, France

²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PSE-SANTE, SESANE, LRTOX, Fontenay-aux-Roses, 92260 France

associés à cette présentation.

baninia.habchi@univ-amu.fr, stephane.grison@irsn.fr

Ce travail cherche à mettre en évidence des signatures métabolomiques associées à une contamination aiguë à l'uranium chez le rat dans le cadre d'une étude basée sur les effets des expositions environnementales ou accidentelles aux faibles doses de radionucléides.

Des prélèvements de plasma et urines ont été réalisés périodiquement pendant 9 mois tout au long du protocole expérimental à partir d'animaux issus de quatre groupes de doses d'expositions croissantes (2 non toxiques et 2 toxiques) et d'un groupe témoin. 900 échantillons d'urine et 600 échantillons de plasma ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (Q-Exacte Plus) en mode switch positif-négatif sur deux colonnes C18 et HILIC. Un échantillon de contrôle qualité a permis de contrôler la qualité des analyses et corriger les dérives analytiques entre les différents batchs d'analyse. Plusieurs étapes de prétraitements et différents outils d'analyses multivariées ont été appliqués et utilisés.

Dans l'urine, une ACP (Analyse en composante principale) a permis de montrer l'existence d'un effet temporel. L'analyse discriminante PLS-DA (Partial Least Square - Discriminant Analysis) a révélé l'existence d'un effet dose entre les témoins et les doses toxiques mais aussi entre les témoins et les doses non toxiques. Des sous modèles PLS-DA, ont aussi été réalisés entre les témoins et les doses non toxiques pour rechercher des marqueurs discriminants selon les périodes temporelles. A partir de ces marqueurs, des scores composites ont pu être calculés et validés par courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). Ces scores pourraient être utilisés pour élaborer des tests de diagnostic d'exposition. Des étapes de validations des biomarqueurs discriminants sont encore nécessaires, tout comme l'exploitation des données plasmatiques qui pourraient être complémentaires aux résultats obtenus dans l'urine.

Mots-clés : Métabolomique, uranium, exposition aiguë, LC/ HRMS, PLS-DA.

¹H NMR based metabolomic study for the comparison of *Harpagophytum procumbens* extraction methods

Gaëtan HERBETTE¹, Béatrice BAGHDIKIAN², Fathi MABROUKI², Laëtitia SHINTU³, Évelyne OLLIVIER²

¹Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, FSCM, Spectropole, Service 511, Campus Saint-Jérôme, 13397 Marseille

²Aix Marseille Univ, Avignon Université, CNRS, IRD, IMBE, Faculté Pharmacie, 13385 Marseille

³Aix Marseille Univ, Centrale Marseille, CNRS, iSm2 UMR 7313, Service 512, Campus Saint-Jérôme 13397 Marseille

gaetan.herbette@univ-amu.fr

A proton NMR-based metabolomic analysis was used to compare conventional and green extraction methods of *Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae). Secondary root of *H. procumbens* is used for the treatment of inflammatory diseases in particular for minor articular pains in Phytotherapy. The major chemical compounds of *H. procumbens* are polysaccharides, iridoid glycosides, phenylpropanoid glycosides, triterpenoids, phytosterols, aromatic acids and flavonoids. The most representative bioactive component and analytical marker of *H. procumbens* is harpagoside [1]. We first studied the effect of solvents (MeOH, EtOH) on the percolation technique. To improve the extraction efficiency of the conventional method (percolation), which is time consuming and uses large solvent amount, we used innovative extraction methods. Microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) techniques were proposed with EtOH, the most effective solvent for extracting harpagoside, leading to extraction times being lowered to 5 and 10 min respectively, and a four-fold reduction in the volume of solvent [2]. The extracted supernatants were filtered and dried under vacuum. The dried extracts were dissolved with DMSO-d₆ for proton NMR analysis. The use of multivariate statistical analyses (PCA) showed solvent distribution of *H. procumbens* metabolites and indicated that these extracts were rich in iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in EtOH solvent, and polysaccharides in MeOH solvent. No discrimination was observed between Percolation and MAE/UAE techniques. NMR identification and quantification of metabolites were done and the results were compared to HPLC-UV method.

Références :

- [1] Mncwangi N., W. Chen, I. Vermaak, A.M. Viljoen, and N. Gericke, Devil's Claw - A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology* (2012) 143, 755-771
- [2] Baghdikian B., A. Filly, A.-S. Fabiano-Tixier, E. Petitcolas, F. Mabrouki, F. Chemat, É. Ollivier, Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and comparison with conventional solvent extraction methods. *Comptes Rendus Chimie* (2016) 19, 692-698

Keywords: *Harpagophytum procumbens*, extraction methods, NMR, metabolomics, quantification.

Approche métabolomique et réseaux moléculaires pour l'étude de la diversité moléculaire de racines de tomate (*Solanum lycopersicum*) à différents stades de développement

Souhila MESSAILI¹, Cyril COLAS^{1,2}, Laëtitia FOUGERE¹, Yanyan QU³, Nicolas DESNEUX³, Anne-Violette LAVOIR^{3,4}, Emilie DESTANDAU¹, **Thomas MICHEL**⁴

¹Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans-CNRS, UMR 7311 BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France

²Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS-Université d'Orléans, UPR 4311, 45071 Orléans Cedex 2, France

³INRA, Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 1355-7254, Institut Sophia Agrobiotech, Sophia Antipolis, France

⁴Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Nice, France

thomas.michel@univ-cotedazur.fr

De nombreux métabolites secondaires sont impliqués dans les interactions entre les plantes et les ravageurs (insecte, micro-organisme, nématode...) [1]. Ces molécules, répulsives, antiappétantes ou toxiques, de façon plus ou moins spécifique vis-à-vis des bioagresseurs, peuvent être constitutives ou induites par l'action de l'organisme parasite ou ravageur sur la plante. Chez les solanacées cultivées, et notamment la tomate (*Solanum lycopersicum*), on retrouve des composés phénoliques, des phénolamides ou encore des glycoalcaloïdes [2] qui peuvent agir comme médiateur chimique. Afin de suivre la mise en place des défenses dans les premiers stades de développement des racines de tomate, une approche métabolomique couplée à des réseaux moléculaires a été mise en place. Les analyses phytochimiques ont été réalisées par UHPLC-HRMS, puis le traitement des données a été effectué à l'aide de plateforme *online* telle que W4M, MetaboAnalyst et GNPS.

Références :

- [1] Leiss K. A., Choi Y. H., Verpoorte R., Klinkhamer P. G. L. An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochemistry Reviews* (2011) 10, 205-216
- [2] Larbat R., Paris C., Le Bot J., Adamowicz S. Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science* (2014) 224, 62-73

Mots-clés : Racine, tomate, UHPLC-HRMS, glycoalcaloïdes.

Couplage des analyses du métabolome et du microbiome pour comprendre les interactions chimiques saisonnières entre l'algue brune *Taonia atomaria* et ses communautés bactériennes épiphytes

Benoît PAIX¹, Ahlem OTHMANI¹, Nathan CARRIOT¹, Didier DEBROAS², Stéphane GREFF³, Jean-François BRIAND¹, Gérald CULIOLI¹

¹Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM, EA 4323, Toulon, France

²Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, UMR 6023, Clermont-Ferrand, France

³Aix Marseille Université, CNRS, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale. Station marine d'Endoume, Marseille, France

benoit.paix@univ-tln.fr

Dans les écosystèmes marins, les surfaces de macroalgues ont tendance à être colonisées par des communautés complexes de micro-organismes, notamment des bactéries, des archées, des microalgues, des protozoaires et des champignons. Les macroalgues et les microorganismes marins ont développé un grand nombre d'associations, telles que le parasitisme, le mutualisme ou le commensalisme, et la surface des macroalgues constitue finalement une zone privilégiée d'interactions chimiques entre l'hôte algal et son microbiome associé (l'ensemble formant un système biologique appelé « holobionte ») [1]. L'intégration des données en métagénomique ciblée et en métabolomique d'un tel système permettrait de mieux comprendre : (i) l'impact sur les communautés épiphytes de composés libérés à la surface par l'hôte, et (ii) l'influence microbienne sur l'hôte par le biais de la production et/ou de la dégradation de molécules biologiquement actives.

Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié avec une approche multi-optique les co-variations saisonnières entre le métabolome de surface et les communautés épibactériennes de la macroalgue brune méditerranéenne *Taonia atomaria*. L'approche par métabolomique [LC-(+)-ESI-MS] et les études par métabarcoding de l'ADNr 16S ont montré des tendances saisonnières similaires [2]. De plus, une attention particulière a été accordée à certains métabolites connus pour réguler l'épibiose en inhibant l'adhésion de certaines bactéries spécifiques [3], mais également à des composés impliqués dans la discrimination saisonnière entre les extraits de surface. Parmi ces derniers métabolites, plusieurs bêtaïnes ainsi que des diacylglycéril-hydroxyméthyl-*N,N,N*-triméthyl- β -alanine (DGTAs) et des dipeptides, identifiés à partir d'un réseau moléculaire, ont été observés comme étant les plus discriminants. Ces données ont ensuite été connectées à l'ensemble des données de métabarcoding à l'aide d'une PLS-DA multi-blocks (analyse DIABLO, package mixOmics) afin d'identifier des composés potentiellement impliqués dans le contrôle des variations saisonnières des communautés épiphytes.

Références :

[1] Egan S. *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.* (2013) 37, 462-476

[2] Paix B. *et al.*, *Environ. Microbiol.* sous presse

[3] Othmani A. *et al.*, *Biofouling* (2016) 32, 801-813

Mots-clés : Métabolome, microbiome, multi-omique, macro-algue, holobionte.

Recherche de nouveaux biomarqueurs lipidiques de l'athérosclérose dans un modèle porcin athéro-sensible par une approche lipidomique

Marion PRADEAU, Catherine TARDIVEL, Baninia HABCHI, Ljubica SVILAR, Imène BOUSAHBA, Jean-Charles MARTIN

Aix Marseille Université (AMU), NORT, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France
marion.pradeau@wanadoo.fr et jean-charles.martin@univ-amu.fr

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, et la seconde cause de mortalité chez les français. Parmi ces maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose est une pathologie causée par l'accumulation de lipides dans les vaisseaux sanguins, entraînant 80 % des décès soudains, en engendrant des infarctus du myocarde ou des accidents vasculaires cérébraux.

L'objectif principal de cette étude été de déterminer l'impact de la consommation de matière grasse laitière sur l'athérosclérose ainsi que de détecter des biomarqueurs spécifiques à cette pathologie. L'objectif secondaire été de créer un modèle de prédiction de l'athérosclérose précoce et intermédiaire chez le porc, et de vérifier son efficacité chez l'homme.

Dans cet objectif deux modèles ont été établies, un chez l'humain et un deuxième chez le porc. Les sujets humains et porcins ont été répartis en 4 groupes suivant 4 types de régime, à base de matière grasse végétale (régime témoins), de matière grasse laitière d'été (riche en acide gras polyinsaturés), de matière grasse laitière d'hiver (riche en acide gras saturé) et de matière grasse laitière d'hiver supplémentée en calcium. Des prélèvements plasmatiques ont été effectués à 0, 6, 12, 18 et 24 mois chez le porc et à 2 mois chez l'homme.

Une extraction lipidomiques des 169 et 159 échantillons plasmatiques humaines et porcs, respectivement, a été réalisée. Ces échantillons ont ensuite été étudiés par spectrométrie de masse à haute résolution par approche lipidomique.

Des comparaisons des régimes entre eux ont permis de connaître l'impact des différentes matières grasses (végétale ou laitière) sur le lipidome porcin et humain.

Une identification de quatre lipides précurseurs de l'athérosclérose a été réalisée et a ainsi permis le calcul d'un modèle de prédiction de l'athérosclérose précoce et intermédiaire.

Le modèle de prédiction de l'athérosclérose a été appliquée à la cohorte humaine afin d'en vérifier sa robustesse.

Mots-clés : Lipidomique, athérosclérose, matière grasse laitière, biomarqueurs.

Leaf specialized metabolome of *Quercus pubescens* exposed to amplified drought

Amélie SAUNIER^{1,2}, Stéphane GREFF², Elena ORMENO², Catherine FERNANDEZ²

¹Department of Environmental and Biological Sciences, Finland

²IMBE – Aix Marseille Univ, Univ Avignon, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France

stephane.greff@imbe.fr

The intensification of summer drought expected with climate change in the Mediterranean region can induce metabolism modifications in plants to help them cope with such conditions.

In this experiment, we studied the specialized metabolome of *Quercus pubescens* leaves under natural (ND) and amplified drought (AD). An *in situ* experimental site, equipped with a rainfall exclusion device, allowed reduction of natural rainfall by 30% over the tree canopy. Leaves of ND and AD plots were collected in spring, summer and fall during 3 years, corresponding to the 2nd, 3rd and 4th years of drought application. We used a targeted approach to focus on phenolic metabolites and an untargeted approach to study a broader metabolome variation according to drought.

Metabolic profiles (targeted approach) showed that the concentrations of quercetins, catechins and myricetins were mostly decreased with drought stress, opposite to the concentrations of kaempferols that increased. Multivariate analysis of *Quercus pubescens* fingerprints (untargeted approach) demonstrated that metabolic contents were almost unchanged under AD. Nevertheless, seven metabolites were highlighted as drought biomarkers using an univariate analysis (Venn diagrams). These biomarkers, still under study, likely belong to the phenylpropanoid pathway with one corresponding to kaempferol pentoside.

Targeted and untargeted approaches permitted to demonstrate a time lag in leaf phenology when trees were exposed to drought with a modification of the phenylpropanoid pathway. Quercetins, catechins and myricetins, specific to summer leaves were down-regulated to favor the biosynthesis of kaempferol, specific to fall leaves. Further studies would be necessary to understand how this time lag phenology may impact ecosystem functioning.

Mots-clés : *Quercus pubescens*, amplified drought, Mediterranean forest, flavonoids, time lag phenology.

Evaluation d'une approche métabolomique pour étudier les composés organiques volatils (COVs) racinaires

Émilie STIERLIN¹, Florence NICOLE², Xavier FERNANDEZ¹, Thomas MICHEL¹

¹Université Côte d'Azur, Institut de chimie de Nice, UMR 7272, 28 avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

²Université de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVPAM, EA2061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Étienne, France
emilie.stierlin@univ-cotedazur.fr

Lavande fine (*Lavandula angustifolia* Miller) et lavandin (*Lavandula x intermedia*) sont des plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM) emblématiques de la Provence et largement exploitées pour leurs huiles essentielles en parfumerie, cosmétique et aromathérapie (1). Les composés organiques volatils (COVs) produits et émis par les parties aériennes ainsi que par les racines des plantes sont connus pour jouer un rôle dans l'attraction ou la répulsion contre les prédateurs et les agents pathogènes (2). Une méthode de microextraction sur phase solide (SPME) combinée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été développée et optimisée pour extraire et analyser les COVs de racines lavande fine et de lavandin. Les paramètres optimaux pour caractériser ces COVs sont les suivants : fibre de divinylbenzène-carboxène-polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) et 60 minutes d'extraction à 70°C. Un total de 99 COVs, dont 40 monoterpénoïdes, 15 sesquiterpénoïdes, 1 diterpénoïde et 2 coumarines ont été détectés. Le fenchol, le bornéol et la coumarine sont les principaux composés détectés dans les racines de lavandin. La méthode optimisée a été utilisée pour comparer des émissions de COVs des racines entre différentes variétés de lavande fine (7713 et maillette) et de lavandin (abrial et grosso). Afin de mettre en évidence des différences d'émissions entre ces variétés, le traitement des données a été réalisé à l'aide de logiciels tels que W4M pour l'alignement des données chromatographiques et le logiciel R (package mixOmics) pour les analyses discriminantes (PLS-DA) (3). 15 composés discriminants potentiels ont pu ainsi être mis en évidence. Parmi ceux-ci, l' α -farnésène et l' α -terpinéol différencient les variétés, tandis que le β -phellandrène permet une discrimination entre les espèces de lavande et de lavandin.

Références :

- [1] Lis-Balchin M., Lavender: The Genus *Lavandula*, Taylor & Francis (2002)
- [2] Rasmann S., Köllner T. G., Degenhardt J., Hiltbold I., Toepfer S., Kuhlmann U. *et al.* Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots *Nature* (2005) 434, 732-737
- [3] Hervé M.R., Nicolè F., Lê Cao K.-A. Multivariate Analysis of Multiple Datasets: a Practical Guide for Chemical Ecology *Journal of Chemical Ecology* (2018) 44, 215-234

Mots-clés : Racines de lavande, HS-SPME, COVs, GC-MS.

Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in human plasma using ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole-orbitrap mass spectrometry

Ljubica SVILAR^{1,2}, Jean-Charles MARTIN^{1,2}, Catherine DEFOORT^{1,2}, Franck TOURNIAIRE^{1,2}, Amandine BROCHOT³

¹CRIBIOM, Criblage Biologique Marseille, Faculté de Médecine de la Timone, Marseille, France

²C2VN, Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, Marseille, France

³PiLeJe, Paris, France

ljubica.svilar@univ-amu.fr

In this study a quadrupole-orbitrap tandem mass spectrometer coupled to a reverse phase ultra-high performance liquid chromatography is applied to a quantitation of trans-resveratrol and its metabolites trans-resveratrol-3-*O*- β -D-glucuronide, trans-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucuronide, trans-resveratrol-3-sulfate, a,b-dihydro-resveratrol, a,b-dihydroresveratrol-glucuronide, a,b-dihydroresveratrol-glucuronide-sulfate, a,b-dihydroresveratrol-sulfate, trans-resveratrol-3-*o*- β -d-diglucuronide, trans-resveratrol-4'-*o*- β -d-diglucuronide, trans-resveratrol-3-*o*- β -d-glucuronide-sulfate and trans-resveratrol-4'-*o*- β -d-glucuronide-sulfate in human plasma. MS/MS experiments coupled to a high resolving power and accurate mass measurements as well as the use of the labeled internal standards enabled the achievement of linear calibration curves across the four orders of magnitude concentration ranges. The method was validated in terms of specificity and selectivity, accuracy and precision, sensitivity and matrix effect and can be now applied to pharmacokinetic studies or routine analysis. In conclusion, the application of quadrupole-orbitrap mass spectrometer on a quantitation of trans-resveratrol and its metabolites provides complementary acquisition of full collision induced dissociation spectra of analyzed compounds giving place to the structural characterization and sensitivity and linear concentration ranges respecting the accuracy and precision, specificity and selectivity requirements.

Mots-clés : Trans-resveratrol, metabolites, quantification, quadrupole-orbitrap tandem mass spectrometry, parallel reaction monitoring.