

**Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique**

**Programme**

**Premières Journées Scientifiques :**

**1 & 2 Décembre 2005**

**Toulouse**

# Programme

Jeudi 1 décembre 2005

8h30 - 9h00 Accueil des participants (Amphithéâtre Joseph Fourier, Insa)  
Installation des Posters (Hall de la bibliothèque, Bâtiment 3)

9h00 - 9h15 Introduction aux Journées

## 9h15 - 10h40 Session métabolomique / Analyse des métabolites Animateur : D. Rolin, Bordeaux

9h20 - 9h40 **Utilisation de la métabonomique pour l'analyse des perturbations du réseau métabolique.** A. Paris, Toulouse.

9h40 - 10h00 **Profils quantitatifs et empreintes métaboliques par RMN pour étudier la qualité des fruits.** A. Moing, Bordeaux.

10h00 - 10h20 **Les Biomarqueurs dans le développement d'un médicament : utilisation de l'approche métabolomique.** C. Boursier, Orléans.

10h20 - 10h40 **La RMN quantitative précise : problèmes posés et exemples de solutions.** E. Caytan, Nantes.

10h40 - 11h00 PAUSE (Amphithéâtre Joseph Fourier)

## 11h00 - 12h30 Session métabolomique / Analyse des métabolites (suite) Animateur : A. Paris

11h00 - 11h20 **Approche métabolomique des flavonoïdes des graines d'*Arabidopsis thaliana* par LC-ESI-MS et LC-ESI-MS-MS.** J. Einhorn, Versailles.

11h20 - 11h40 **Combined proteome and metabolome analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism.** J. Labarre, Gif-sur-Yvette.

11h40 - 12h00 **Métabolomique quantitative chez *E. coli* par LC-MS/MS.** P. Kiefer, Toulouse.

## 12h00 - 12h30 Session Flash 1

Présentations de 5 minutes (2-3 transparents) faites par les chercheurs sur la base de leur poster

12h05 **A functional genomics analysis of the flavonoid pathway in *Arabidopsis* seed.** J.-M. Routaboul, Versailles.

12h10 **Effets de l'infestation sur le profil métabolique d'apex de variétés de pêcher sensibles et résistantes au puceron vert.** J.-L. Poëssel, Avignon.

12h15 **Analyses de métabolites en vue d'une approche globale type Métabolome.** S. Boutet, Versailles.

12h20 **Flow injection atmospheric ionisation mass spectrometry of wines for characterisation of their polyphenolic fraction.** G. Mazerolles, Montpellier.

12h30 - 14h00 *Repas*

**14h00 - 15h40 Session Analyse des flux / fluxomique**  
**Animateur : J.-C. Portais, Toulouse**

14h00 - 14h20 **Analyse de la complexité du métabolisme de la glutamine dans des tubules rénaux de rats nourris et à jeun par métabolomique cellulaire à l'aide de la SRM du carbone 13.** G. Baverel, Lyon.

14h20 - 14h40 **Hexose-P / hexoses : un nouveau cycle de substrat chez les plantes.** M. Dieuaide-Noubhani, Bordeaux.

14h40 - 15h00 **Fluxomique et analyse de la relation structure / fonction / adaptation dans les réseaux métaboliques.** J.-C. Portais, Toulouse.

15h00 - 15h20 **Metabolic cross-talk and flux rates in plant isoprenoid biosynthesis.** A. Hemmerlin, Strasbourg.

**15h20 - 15h40 Session Flash 2**

Présentations de 5 minutes (2-3 transparents) faites par les chercheurs sur la base de leur poster

15h25 **Analyse métabonomique des perturbations d'origine toxico-nutritionnelle du métabolisme chez l'animal.** C. Canlet, Toulouse.

15h30 **Un outil bioinformatique générique pour le stockage et le data-mining de données de métabolome de plantes.** H. Ferry-Dumazet, Bordeaux.

15h35 **Genetic diversity of enzyme concentrations and glycolytic flux in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains.** D. Sicard, Gif-sur-Yvette.

15h40 - 16h00 *PAUSE (Hall de la bibliothèque, Bâtiment 3)*

**16h00 - 17h30 Session Posters et Echanges informels (Hall de la bibliothèque, Bâtiment 3)**

17h30 **Table ronde : Quelle structure pour le réseau : vers un projet de GDR ?** (Amphithéâtre Joseph Fourier)

19h Départ navette vers centre ville (place du Capitole)

## Vendredi 2 décembre

8h15 Départ navette Allée Jean-Jaurès (devant M6)

### 9h00 - 10h30 **Session Analyse *in situ* du métabolisme** **Animatrice : A.-M. Delort, Clermont-Ferrand**

- 9h10 - 9h30 **Métabolomique et analyse *in situ* du métabolisme utilisant la RMN.**  
R. Bligny, Grenoble.
- 9h30 - 9h50 **Rôle du lactate dans le couplage entre métabolisme énergétique et activation cérébrale : étude par RMN *ex vivo* chez le rat.** M. Merle, Bordeaux.
- 9h50 - 10h10 **Etude du métabolisme du glucose et de la proline des trypanosomes par RMN.** L. Rivière, Bordeaux.
- 10h10 - 10h30 ***In situ* NMR study of benzothiazole degradation by *Rhodococcus* isolates.** A.-M. Delort, Clermont-Ferrand.

10h30 - 10h50 PAUSE (Amphithéâtre Joseph Fourier)

### 10h50 - 12h30 **Session *in situ* du métabolisme (suite)** **Animatrice : A.-M. Delort, Clermont-Ferrand**

- 10h50 - 11h10 **Métabolisme cérébral du Glutamate chez un modèle rat de la maladie de Parkinson: étude dynamique menée *in vivo* en SRM C-13.** A. Traoré, Clermont-Ferrand.
- 11h10 - 11h30 **Origine métabolique du carbone respiré par les feuilles étudiée *in situ* à l'aide de l'abondance naturelle des isotopes stables du carbone (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) dans le CO<sub>2</sub> respiré.** J. Ghashghaie, Orsay.
- 11h30 - 11h50 **Exploration du métabolisme primaire azoté chez le colza. Détection par RMN du <sup>15</sup>N et par CPG-SM.** C. Pau-Roblot, Amiens.
- 11h50 - 12h10 **Apport du Métabolome en toxicologie environnementale et nucléaire.** E. Ezan, Gif-sur-Yvette.

12h20 - 14h00 Repas

### 14h00 - 14h40 **Session *in situ* du métabolisme (suite)** **Animatrice : A.-M. Delort, Clermont-Ferrand**

- 14h00 - 14h20 **Etude par profilage métabolique des réponses au stress salin chez *Arabidopsis thaliana*.** R. Llugan, Rennes.
- 14h20 - 14h40 **Identification of new biomarkers of wholegrain cereal consumption by a metabolomic approach.** R. Llorach, Clermont-Ferrand.

**14h40 - 15h30 Modélisation des systèmes métaboliques**  
**Animateur : J.-P. Mazat, Bordeaux**

*14h50 - 15h10* **Projet BRUME : Base de données et calcul de flux métaboliques.**  
C.-G. Dussap, Clermont-Ferrand.

*15h10 - 15h30* **The structure of energetic metabolism in mitochondria.** J.-P. Mazat,  
Bordeaux.

*15h30 - 15h50* **Descripteur métabolique : modèle stœchiométrique pour la prédiction  
et le contrôle en ligne des bioprocédés.** S. Guillouet, Toulouse

*16h00 - 16h30* Clôture des Journées

## **Résumés**

## *Session 1- 01*

### **UTILISATION DE LA METABONOMIQUE POUR L'ANALYSE DES PERTURBATIONS DU RESEAU METABOLIQUE**

**A. Paris<sup>1</sup>, C. Canlet<sup>1</sup>, G. Gottardi<sup>1</sup>, M. Dumas<sup>2</sup>, J. Molina<sup>1</sup>, A. Baranov<sup>3</sup>, E. Rathahao<sup>1</sup>, L. Debrauwer<sup>1</sup>, N. Martins<sup>1</sup>, N. Priymenko<sup>1</sup>, J.-E. Chauvin<sup>4</sup>**

*<sup>1</sup>UMR 1089 – Xénobiotiques, INRA/ENVT, 180, chemin de Tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse Cedex 9, <sup>2</sup>Biological Chemistry Section, Imperial College London, Sir Alexander Fleming Building, Exhibition Road, South Kensington, Londres SW7 2AZ, Grande-Bretagne, <sup>3</sup>The Laboratory of Computational Analysis of Biopolymers, NIIGRAFIT, Engelgardt Institute of Molecular Biology, Moscou, Russie, <sup>4</sup>UMR APBV – INRA, Centre de Rennes, Domaine de Kéraïber, 29260 Ploudaniel*

Des travaux extrêmement novateurs ont été réalisés ces toute dernières années pour étudier la topologie des réseaux métaboliques qui partagent cette propriété au sein des organismes vivants d'être invariants d'échelle. Cette propriété replacée dans le domaine de l'analyse des systèmes biologiques fonctionnant à l'état stationnaire en tant que systèmes critiques auto-organisés est illustrée par le suivi métabonomique de la réponse graduée d'un état donné d'intoxication chimique. D'autres exemples pris tant dans le domaine de l'hormonologie que dans celui de la nutrition militent en faveur d'une ré-analyse des ajustements homéostatiques mettant en avant la notion de plasticité de réseau.

## Session 1 – O2

### PROFILS QUANTITATIFS ET EMPREINTES METABOLIQUES PAR RMN POUR ETUDIER LA QUALITE DES FRUITS

**A. Moing<sup>1</sup>, C. Deborde<sup>1</sup>, F. Mounet<sup>1</sup>, M. Lemaire-Chamley<sup>1</sup>, C. Cabasson<sup>1</sup>, M. Maucourt<sup>1</sup>, C. Renaud<sup>1</sup>, J.P. Gaudillère<sup>2</sup>, G. Pereira<sup>2,3</sup> and D. Rolin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UMR Physiologie et Biotechnologie Végétales, INRA - Universités Bordeaux 1 - Victor Ségalen Bordeaux 2, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex <sup>2</sup>UMR Œnologie-Ampélogie, INRA – ENITA de Bordeaux - Université Victor Ségalen Bordeaux 2, Villenave d'Ornon <sup>3</sup>Adresse actuelle: Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 152, CP 23, CEP 56302-970, Petrolina, PE - Brasil

Dans le cadre d'études de génomique fonctionnelle, de génétique, ou d'écophysiologie de la qualité du fruit, la spectroscopie de RMN du proton est utilisée pour l'obtention de profils métaboliques quantitatifs ou d'empreintes métaboliques semi-quantitatives.

Les profils métaboliques quantitatifs [1] ont été utilisés notamment pour caractériser les fruits de différentes ressources génétiques, de mutants ou de transformants de tomate dans le cadre d'études des relations taille/composition du fruit. Ils permettent de quantifier individuellement 30 à 35 métabolites majeurs. Une étude détaillée des différents tissus du fruit de tomate au cours de son développement a été réalisée. Elle a permis de mettre en évidence les tissus qui suivent des trajectoires métaboliques parallèles au cours du développement et a révélé des métabolites marqueurs de stade(s) ou de tissu(s). Ces données seront prochainement analysées de manière conjointe avec des données de transcriptome.

Les empreintes métaboliques ont été utilisées pour caractériser l'effet de l'environnement sur la qualité de la baie de raisin. L'utilisation de la chimiométrie sur l'ensemble de la signature spectrale, avec réduction des données puis analyses multivariées, a permis de caractériser l'effet du microclimat des grappes, du terroir et du millésime sur la composition des pulpes ou des pellicules [2,3]. Ceci a permis de mettre en évidence les régions spectrales à l'origine de la discrimination entre groupes d'échantillons.

#### Références

- [1] Moing A. et al. *Funct. Plant Biol.* 2004, 31: 889-902.
- [2] Pereira G.E. et al. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53: 6382-6389.
- [3] Pereira G.E. et al. *Anal. Chim. Acta* 2006, (accepté)

**LES BIOMARQUEURS DANS LE DEVELOPPEMENT D'UN MEDICAMENT : UTILISATION DE  
L'APPROCHE METABOLOMIQUE**

**C. Boursier and T. Umbdenstock**

*TECHNOLOGIE SERVIER*

*Centre de Pharmacocinétique et de Métabolisme*

*25/27 rue Eugène Vignat - 45000 ORLEANS*

L'évolution récente des techniques d'analyse structurale (RMN, MS-MS) associée à l'utilisation d'outils statistiques adaptés, a permis le développement des techniques de métabolome dans le domaine pharmaceutique.

Cette approche permet d'étudier les variations des biomarqueurs endogènes, et par ce biais les mécanismes mis en jeu dans les processus biologiques en relation avec l'activité pharmacologique d'un médicament ou pour une pathologie donnée. Par exemple, l'identification de biomarqueurs spécifiques d'une pathologie peut permettre de mieux définir un diagnostic précoce pour cette pathologie. De même, la connaissance des variations des biomarqueurs associés à un traitement par un médicament permet de mieux appréhender les mécanismes d'action impliqués et ainsi d'adapter au mieux le traitement.

Ces biomarqueurs sont de type phénotypiques, en opposition avec les marqueurs génétiques et protéiques qui ne peuvent être qu'imparfaitement corrélés à l'activité finale. A ce titre, ils représentent des outils particulièrement adaptés et maniables pour les métiers de la pharmacie comme la pharmacologie (non clinique et clinique) et la toxicologie.

Par ailleurs, l'approche métabolomique peut également être utilisée pour identifier les principales voies de transformation d'un médicament, en déterminant les principaux métabolites formés après traitement avec un principe actif.

Des exemples d'application de l'utilisation de l'approche métabolomique en pharmacologie et en métabolisme seront présentés.

## Session 1 – 04

### LA RMN QUANTITATIVE PRECISE : PROBLEMES POSES ET EXEMPLES DE SOLUTIONS

**Elsa Caytan, Eve Tenailleau, Gérald Remaud, Richard Robins et Serge Akoka**  
*LAIEM, Université de Nantes. Serge.akoka@univ-nantes.fr*

La précision des mesures de RMN quantitative est capitale pour la qualité des études de métabolismes. Or, des difficultés techniques sont rencontrées si l'on souhaite atteindre une précision inférieure à 1% :

- nécessité de l'utilisation d'une référence fiable,
- importance des conditions de découplage en RMN  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ,
- durée importante des mesures.

Ces difficultés techniques doivent être considérées avec attention afin d'obtenir des mesures de qualité en RMN quantitative.

La quantification absolue en RMN haute résolution suppose l'utilisation d'un signal de référence. Ce signal est généralement obtenu à partir d'un composé "étalon" dont la présence peut gêner la mesure (interactions référence-échantillon) ou augmenter considérablement le temps d'acquisition. La méthode ERETIC (Electronic Reference To Access *In vivo* Concentrations), permet de disposer d'un signal de référence généré électroniquement qui évite l'addition d'une substance de référence dans l'échantillon. L'utilisation de la méthode ERETIC pour des dosages par RMN du proton des métabolites lors de fermentations de bactéries lactiques s'avère particulièrement utile. Les résultats obtenus montrent une incertitude inférieure à 1% pour tous les composés. [1]

La RMN du  $^{13}\text{C}$  présente des difficultés spécifiques : longueur des analyses, effets Overhauser ... De plus, la précision et la justesse des mesures sur le spectre  $^{13}\text{C}$  sont très dépendantes de l'efficacité du découplage large bande proton. Nos résultats démontrent que les méthodes utilisant des impulsions composites, comme WALTZ-16, ne permettent pas une quantification avec une précision inférieure à 1%. Seul le découplage adiabatique a des performances suffisantes pour atteindre cet objectif. [2] [3]

La longueur des analyses en RMN quantitative est due à l'utilisation d'angles de  $90^\circ$  et à la longueur du délai de relaxation qui en découle (meilleur rapport signal sur bruit dans des conditions quantitatives). L'utilisation de séquences de transfert d'aimantation, DEPT ou INEPT, va rendre possible une réduction considérable du temps de répétition. Couplées à la méthode ERETIC, ces méthodes permettront des acquisitions quantitatives en situation de saturation partielle d'où un temps de répétition de l'ordre des  $T_1$  proton. Des travaux sont actuellement en cours pour l'optimisation des séquences à transfert d'aimantation pour les applications quantitatives (améliorations du cycle de phase, introduction d'impulsions adiabatiques).

[1] Silvestre V. et al. Determination of Substrate and Product Concentrations in Lactic Acid Bacterial Fermentations by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1862-1868.

[2] Tenailleau E. et al. Quantification of the  $^1\text{H}$ -decoupling effects on the accuracy of  $^{13}\text{C}$ -NMR measurements. *Instrumentation Science & Technology*, 2005, 33, 391-399.

[3] Tenailleau E., Développement de la RMN quantitative du carbone 13 en abondance naturelle, *Thèse de doctorat de chimie, LAIEM, Université de Nantes*, 2005.

**APPROCHE METABOLOMIQUE DES FLAVONOÏDES DES GRAINES D'ARABIDOPSIS THALIANA PAR LC-ESI-MS ET LC-ESI-MS-MS**

**Lucien Kerhoas<sup>1</sup>, Denya Aouak<sup>1</sup>, Annabelle Cingöz<sup>1</sup>, Jean-Marc Routaboul<sup>2</sup>, Loïc Lepiniec<sup>2</sup> et Jacques Einhorn<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA, Versailles, 78026 Versailles Cedex,*

<sup>2</sup>*Laboratoire de Biologie des Semences, INRA, Versailles, 78026 Versailles Cedex*

Notre objectif est de développer un nouvel outil de génomique fonctionnelle permettant la comparaison de variétés culturales ou de mutants obtenus en laboratoire. Pour déterminer la fonction d'un gène, on évaluera les conséquences de son inactivation en particulier via les altérations de son profil métabolique. Les profils métaboliques faisant l'objet de cette étude concernent les flavonoïdes des graines de la plante-modèle *Arabidopsis thaliana*. Ces métabolites secondaires jouent un rôle important dans la physiologie de la graine en contrôlant différentes fonctions comme la dormance, l'aptitude à la germination et à la reproduction. Les bases de notre approche reposent sur une contribution essentielle des techniques couplées LC-MS et LC-MS-MS [1,2] dans la mise en place des procédures et leur validation tant au niveau de la préparation des échantillons que des stratégies d'analyse et de traitement des données. De l'étude des profils de courants d'ions spécifiques établis en LC-MS, il ressort que la variété sauvage WS-2 contient majoritairement des composés glycosidiques dérivés de la quercétine et des composés minoritaires à base de kaempférol. Les profils « flavonoïdes » des mutants présentant une déficience connue diffèrent bien de la souche sauvage conformément à la prédiction du schéma de biosynthèse. Les informations acquises en LC-MS-MS ont permis d'identifier les aglycones, de déterminer la taille des sous-unités sucre ainsi que les modes de liaisons entre sucre et aglycone (O-glycosylation) et la répartition des sucres sur l'aglycone en deux positions différentes pour les composés diglycosylés et triglycosylés.

[1]- Cuyckens F., Claeys M. *J. Mass Spectrom.*, 2004, 39, 1-15

[2]- Hvattum E., Ekeberg D. *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38, 43-49.

**COMBINED PROTEOME AND METABOLOME ANALYSES REVEAL SURPRISING INSIGHTS INTO YEAST SULFUR METABOLISM**

**A. Lafaye, G. Lagniel, K. Vido, C. Junot, and J. Labarre**

*Laboratoire de PhysioGénomique, Département de Biologie Joliot-Curie and Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Département de Recherche Médicale CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.*

Metabolomics is an essential tool in the post-genomic context, particularly for the identification of new gene function and in projects aiming at modeling the whole cell metabolism. Metabolite levels are regulated by changes in protein expression, accumulation and activity. In turn, these processes are regulated by metabolite levels and these reciprocal regulations feed complicated networks for maintenance of cell metabolic balance. In this context, the combination of metabolome and proteome approaches appears essential to get an integrated view of cell physiology.

The proteome analysis of the cadmium response in yeast [1, 2] showed a strong induction of enzymes of the sulfur metabolic pathway consistent with a strong increase of glutathione (GSH) synthesis, essential for detoxication of the metal. A metabolome analysis of the sulfur pathway based on LC/MS confirmed the overproduction of GSH, and showed a dramatic increase in sulfur metabolite pools and flux in the GSH pathway. This metabolic response was concomitant with a marked decrease in sulfur incorporation in proteins due to both a global decrease of protein synthesis and a reduced utilization of sulfur amino acid in the proteome expressed under cadmium conditions. A kinetic analysis showed sequential and dramatic changes in intermediate sulfur metabolite pools within the first hours of the treatment [3].

Strikingly, whereas proteome and metabolome data were highly correlated under cadmium conditions, proteome and metabolome data were negatively correlated upon other growth conditions, i. e. methionine supplementation or sulfate starvation [3]. These differences can be explained by alternate mechanisms in the regulation of Met4, the activator of the sulfur pathway. Whereas Met4 activity is controlled by the cellular cysteine content in response to sulfur source and availability, the present study suggests that Met4 activation under cadmium conditions is cysteine-independent. The results clearly indicate that the metabolic state of a cell cannot be safely predicted based on solely proteomic and/or gene expression data. The results highlight the importance of metabolome studies combined to proteome studies for the comprehensive description of cellular metabolism.

[1] Vido K. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 8469-8474.

[2] Fauchon M. *et al.* (2002) *Mol. Cell.* 9, 713-723.

[3] Lafaye A. *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 24723-24730.

**METABOLOMIQUE QUANTITATIVE CHEZ *E. COLI* PAR LC-MS/MS**

**P. Kiefer, F. Letisse, H. Monfeuillard, C. Nicolas & J.-C. Portais.**

*MetaSys, Laboratoire Biotechnologie – Bioprocédés UMR INSA CNRS 5504 UMR INRA 792  
LBB/INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 TOULOUSE Cedex 4*

L'étude des états stationnaires permet de ne rendre compte qu'insuffisamment du comportement des systèmes métaboliques soumis à des perturbations endogènes (modifications génétiques) ou exogènes (modifications de l'environnement physico-chimique). Il convient de caractériser ces systèmes dans un cadre dynamique pour pouvoir appréhender pleinement leur comportement face à ces perturbations. Dans la mesure où ces perturbations conduisent à des variations de concentrations en métabolites intracellulaires et à des modifications des flux métaboliques, des méthodes adaptées doivent donc être développées pour l'analyse quantitative des pools métaboliques (métabolomique quantitative) et des flux métaboliques (fluxomique).

La méthode présentée ici couple la chromatographie ionique à un spectromètre de masse de haute sensibilité (IC-MS/MS) et vise à satisfaire ce double objectif pour les intermédiaires du métabolisme central. Pour cela, une approche basée sur l'analyse des massifs isotopiques des ions fils (mass isotopomer ratio analysis) a été développée. Cette analyse des massifs isotopiques permet de quantifier à la fois la concentration des métabolites et les flux métaboliques qui ont conduit à leur production. Au stade d'avancement des travaux, cette approche a été validée par l'analyse des métabolites phosphorylés du métabolisme central. La méthode proposée se caractérise par une grande sensibilité - la limite de détection des métabolites est dans la gamme des fmol - ainsi que par une très grande précision : la rapport isotopique M+1/M liée à l'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  a pu être déterminée pour des concentrations de 1.5 pmol avec une précision de l'ordre de 0.5%. Au vue de ces résultats, une très faible quantité de biomasse (< 1 µg) est nécessaire pour une analyse quantitative des métabolites et des flux, ce qui permet d'envisager la miniaturisation non seulement des prises d'échantillons mais aussi des cultures avec l'avantage de pouvoir mener un grand nombre d'expériences en parallèle et de réduire les coûts des expérimentations.

## *Session 2 -08*

### **ANALYSE DE LA COMPLEXITE DU METABOLISME DE LA GLUTAMINE DANS DES TUBULES RENAUX DE RATS NOURRIS ET A JEUN PAR METABOLOMIQUE CELLULAIRE A L'AIDE DE LA SRM DU CARBONE 13.**

**Gabriel Baverel, Barbara Vercoutere, Daniel Durozard, Guy Martin**

*Laboratoire de Physiopathologie Métabolique et Rénale, INSERM U499, Faculté de Médecine RTH Laennec, rue G. Paradin, 69372 Lyon Cedex 08.*

Afin d'identifier précisément les voies impliquées dans la synthèse de glucose et la fourniture d'énergie à partir de la glutamine dans le rein, nous avons étudié le métabolisme de glutamines marquées au carbone 13 et au carbone 14 dans des tubules rénaux proximaux de rats nourris et à jeun depuis 48 heures. Les flux au niveau des enzymes impliquées, comprenant les enzymes de 4 cycles fonctionnant de façon concomitante, ont été mesurés en combinant les données expérimentales, obtenues principalement avec la RMN du carbone 13, avec un modèle approprié du métabolisme de la glutamine. Dans les 2 états nutritionnels, le flux unidirectionnel d'utilisation de glutamine par la glutaminase est partiellement masqué par un fonctionnement concomitant de la glutamine synthétase; le jeûne conduit à une stimulation de l'utilisation de glutamine seulement en augmentant le flux au niveau de la glutaminase sans changer celui au niveau de la glutamine synthétase. Le jeûne stimule le flux net d'utilisation de glutamate seulement en diminuant l'amination réductive de l' $\alpha$ -cétoglutarate, mais ne modifie pas l'oxydation complète de la glutamine. Enfin, la synthèse de glucose implique non seulement la voie directe classique, mais aussi deux voies indirectes : un recyclage substantiel de carbones dans le cycle de Krebs ainsi qu'un flux anaplérotique au niveau de la pyruvate carboxylase fortement stimulé par le jeûne.

## Session 2 - 09

### HEXOSE-P / HEXOSES: UN NOUVEAU CYCLE DE SUBSTRAT CHEZ LES PLANTES.

**Ana Paula Alonso, Hélène Vigeolas, Philippe Raymond, Dominique Rolin, Martine Dieuaide-Noubhani**

*UMR PBV – INRA, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Université Bordeaux I, 33883 Villenave d'Ornon cedex*

Le développement des tissus non photosynthétiques dépend fortement de l'importation du saccharose et son métabolisme. En effet, sa dégradation fournit de l'UDP-Glc ou des hexoses-P pour la synthèse de composés structuraux ou de stockage et pour la production d'ATP indispensable à ces biosynthèses. En 1988, Hargreaves et ap Rees (1) mirent en évidence un cycle de synthèse et de dégradation du saccharose dans des racines de pois. Depuis, le cycle du saccharose a été retrouvé dans de nombreux tissus (2-4). Dans ce travail, nous avons couplé deux approches de marquage, sur temps courts et à l'état stationnaire afin de d'étudier le métabolisme du glucose dans des pointes de racines de maïs.

Des marquages à l'état stationnaire, avec du [1-<sup>13</sup>C]glucose et du [U-<sup>13</sup>C]glucose, ont montré que la redistribution du marquage entre les carbones C-1 et C-6 du glucose est proche de celle observée dans les hexose-phosphates cytosoliques. Les données obtenues ont permis d'estimer que le flux de resynthèse du glucose à partir des hexoses-P est égal à 7 fois le flux entrant de glucose. Les vitesses de synthèse des composés de stockage (amidon, saccharose et paroi) ont été quantifiées par des marquages sur temps courts, puis ont été comparées avec les flux de synthèse nette : la différence a permis d'estimer des vitesses de production du glucose à partir de ces composés. La comparaison de ces flux avec le flux de recyclage des hexoses-P montre qu'ils ne peuvent, à eux seuls, expliquer la vitesse de production de glucose dans les cellules, ce qui suggère l'existence d'une voie de recyclage directe des hexoses-P vers le glucose, via une hexose phosphatase. Un essai enzymatique a permis de confirmer la présence d'activité glucose-6-phosphatase dans les pointes de racines de maïs. Le rôle de ce cycle de substrat, qui consomme à lui seul 40% de l'ATP produit par la cellule, reste à définir.

#### Références.

- (1) J.A. Hargreaves, T. ap Rees (1988) *Phytochem.* 27: 1627-1629
- (2) M. Dieuaide-Noubhani *et al. J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 13147-13159
- (3) P. Geigenberger *et al. Planta*, 1997, 201, 502-518
- (4) Rontein D *et al., J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 43948 – 43960

## Session 2 - O10

### FLUXOMIQUE ET ANALYSE DE LA RELATION STRUCTURE / FONCTION / ADAPTATION DANS LES RESEAUX METABOLIQUES

C. Nicolas<sup>1</sup>, F. Létisse<sup>1</sup>, P. Kiefer<sup>1</sup>, P. Soucaille<sup>1</sup>, S. Massou<sup>2</sup> & J.-C. Portais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Biotechnologie – Bioprocédés UMR CNRS 5504 UMR INRA 792. LBB/INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 TOULOUSE Cedex 4, <sup>2</sup>Service de RMN, SFTCM 2599, Université Paul Sabatier, Toulouse.

A l'ère post-génomique, les méthodes d'analyse des flux par RMN (et MS) du <sup>13</sup>C sont devenues des outils précieux pour intégrer l'exploration fonctionnelle du métabolisme (fluxomique) dans un cadre plus général de biologie intégrative. Nous avons utilisé ces approches pour analyser les réponses adaptatives globales du métabolisme central d'*E. coli* à des perturbations génétiques. L'ambition est, à terme, de mettre en place une véritable étude quantitative de la relation structure/fonction/adaptation au sein de réseaux métaboliques complexes. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une modification ponctuelle du génome d'*E. coli*, en analysant la redistribution des flux métaboliques après délétion du gène *zwf* codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), une enzyme clé du métabolisme central. Pour cela, une analyse isotopomérique des acides aminés protéinogéniques a été réalisée à la fois par RMN et par MS après culture des cellules sur un mélange de [1-<sup>13</sup>C]glucose (80%) et de [U-<sup>13</sup>C]glucose (20%). Ensuite, différents mutants d'expression ont été générés, présentant chacun un niveau fixe d'activité G6PDH. Cette stratégie permet de mimer des effets de régulation sur le gène *zwf*. Les distributions des flux métaboliques ont été déterminées par <sup>13</sup>C-MFAt. La comparaison des cartes de flux obtenues pour chaque souche permet de déterminer non seulement la nature des réorganisations métaboliques qui permettent aux cellules de compenser l'absence de G6PDH (mutant de délétion), mais également d'étudier comment la modulation du niveau d'activité G6PDH se répercute sur l'ensemble du métabolisme.

## Session 2 - O11

### METABOLIC CROSS-TALK AND FLUX RATES IN PLANT ISOPRENOID BIOSYNTHESIS

A. Hemmerlin<sup>1</sup>, E. Gerber<sup>1</sup>, J.-F. Hoeffler<sup>2</sup>, D. Tritsch<sup>2</sup>, M. Rohmer<sup>2</sup> and T.J. Bach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IBMP-CNRS, Département "Isoprénoides", 28 rue Goethe, 67083 Strasbourg <sup>2</sup>ULP-CNRS, Institut Le Bel, 4 rue Blaise Pascal, 67070 Strasbourg. [Andrea.Hemmerlin@ibmp-ulp.u-strasbg.fr](mailto:Andrea.Hemmerlin@ibmp-ulp.u-strasbg.fr)

Isoprenoids represent the largest family of natural compounds with over 35000 characterized molecules. Plants show a particularity in the biosynthesis of the universal precursor, isopentenyl diphosphate (IPP, C<sub>5</sub>), because they utilize two distinct pathways. The first one, the well-known mevalonate (MVA) pathway occurs in the cytosol/RE, whereas the second one, the more recently discovered methylerythritol phosphate (MEP) pathway is present in the plastidial compartment<sup>2</sup>. The key enzyme of the MVA pathway is 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR). Treatment of tobacco BY-2 cells by the HMGR-specific inhibitor mevinolin led to growth reduction and induction of apparent HMGR activity, in parallel to an increase in protein representing two HMGR isozymes. In previous studies, we had identified mevinolin as a cell cycle inhibitor in TBY-2 cells, which can be reversed by adding MVA to the culture medium<sup>1,3</sup>. In a follow-up study, we showed that 1-deoxy-D-xylulose (DX), the dephosphorylated first precursor of the MEP pathway, complemented growth inhibition in the same low mM concentration range as did MVA<sup>5</sup>. Further, DX partially re-established feedback repression of mevinolin-induced HMGR activity. Incorporation studies with [1,1,1,4-<sup>2</sup>H]DX demonstrate that in the presence of mevinolin, sterols, normally derived from MVA, are synthesized using the MEP pathway. Inhibition by fosmidomycin, which blocks MEP synthase, could also be overcome by addition of MVA, and chemical complementation was further substantiated by incorporation of [2-<sup>13</sup>C]MVA into plastoquinone, representative of plastidial isoprenoids. Best rates of incorporation of exogenous stably labeled precursors were observed in the presence of both inhibitors, thereby avoiding internal isotope dilution. We showed that an exchange of isoprenic precursors between the cytosol and the plastids, is possible.

Mevinolin inhibits the biosynthesis of phytosterols, but also that of prenylated proteins being implicated in fundamental cellular processes<sup>4</sup>. We have undertaken an attempt to visualize by confocal microscopy, in transformed TBY-2 cells, the prenylation (farnesylation or geranylgeranylation) of GFP, fused with domains of a calmodulin bearing a C-terminal extension including a CaaX prenylation motif. This system is very useful for measuring and visualizing metabolic flux rates implicating isoprenic precursors such as farnesyl diphosphate (FPP) or geranylgeranyl diphosphate (GGPP). Indeed, absence of isoprenylation leads to migration of the modified GFP into the nucleus instead of major targeting into the plasma membrane. We have developed this system further and can for instance demonstrate the differential contribution of the cytosolic MVA pathway and the plastidial MEP pathway. Such observations can be interpreted to mean that both compartmentalized pathways conspire to some extent and that under specific conditions intracellular complementation occurs.

#### References related to our work:

1. Hemmerlin, A. and Bach, T.J. Effects of mevinolin on cell cycle progression and viability of tobacco BY-2 cells. *Plant J.*, 1998, 14: 65-74
2. Disch, A. et al. Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side-chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem. J.*, 1998, 331: 615-621
3. Hemmerlin, A., et al. Function of mevalonate and derivatives in tobacco BY-2 cell proliferation. *Acta Bot. Gall.*, 1999, 146: 85-100
4. Hemmerlin, A. et al. Differential interaction of branch-specific inhibitors of isoprenoid biosynthesis with cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Physiol. Plant.*, 2000, 110: 343-350
5. Hemmerlin, A., et al. Crosstalk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco Bright Yellow 2 cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 26666-26676

## Session 3-O12

### METABOLOMIQUE ET ANALYSE *IN SITU* DU METABOLISME UTILISANT LA RMN

**R. Bligny, A.-M. Boisson, E. Gout, F. Rébeillé et C. Rivasseau**

*Physiologie Cellulaire Végétale, UMR 5168 (CEA/CNRS/INRA/Univ. J. Fourier), Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9*

Au cours de cet exposé nous donnerons des exemples d'utilisation de la RMN du  $^{31}\text{P}$  et du  $^{13}\text{C}$  pour dresser le profil métabolique de cellules et de tissus végétaux et pour déterminer leur répartition intracellulaire. Une cellule végétale renferme en effet deux principaux compartiments bien distincts: le cytoplasme et la vacuole. Le cytoplasme contient en outre des organites isolés par une double membrane, les plastes et les mitochondries. Le pH du cytoplasme est légèrement alcalin, autour de 7.5, celui de la vacuole est variable, mais toujours acide et celui du contenu des organites est de 7,6-7,7. La plus grande partie de l'activité métabolique des cellules végétales se déroule dans le cytoplasme et les organites, alors que la vacuole est surtout une réserve de métabolites comme le phosphate inorganique, des sucres, des polyols et des acides organiques. Les systèmes membranaires isolant les différents compartiments d'une cellule végétale sont le siège d'échanges incessants impliquant de très nombreux transporteurs. La RMN permet d'analyser ces échanges sans perturber le fonctionnement des cellules.

Les exemples présentés illustreront :

- les effets métaboliques de contraintes abiotiques et biotiques et de transformations génétiques [1];
- le catabolisme de la glycine et de la sérine et son rôle dans le métabolisme en C-1 [2];
- la clarification, à l'échelle moléculaire, d'un processus vital concernant les échanges d'eau [3].

1. Bligny R., Douce R. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2001) 4,191-196
2. Mouillon J.-M. et al. *Plant J.* (1999) 20, 197-205
3. Tournaire-Roux C. et al. *Nature* (2003) 425, 393-397

### *Session 3-O13*

## **ROLE DU LACTATE DANS LE COUPLAGE ENTRE METABOLISME ENERGETIQUE ET ACTIVATION CEREBRALE : ETUDE PAR RMN *EX VIVO* CHEZ LE RAT**

**Sébastien Serres, Eric Bezançon, Jean-Michel Franconi et Michel Merle**

*RMSB-UMR 5536, CNRS-Université Victor Segalen, case 93, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux. [michel.merle@rmsb.u-bordeaux2.fr](mailto:michel.merle@rmsb.u-bordeaux2.fr)*

Dans le système nerveux central, les astrocytes occupent une position intermédiaire entre les capillaires sanguins et les neurones. De cette organisation résulte une compartimentation métabolique entre les deux types de cellules, en particulier pour le recyclage des acides aminés neurotransmetteurs. Mais au plan de l'énergétique cellulaire, qu'en est-il de cette compartimentation dans le couplage entre activation cérébrale et métabolisme énergétique?

Chez l'adulte dans les conditions normales, le glucose est le substrat majeur du cerveau où il est complètement oxydé. Cependant, lors d'une activation cérébrale, les techniques d'imagerie ont révélé un découplage entre la consommation de glucose et la consommation d'oxygène, indiquant une phase transitoire de métabolisme non-oxydatif. Un modèle de couplage entre activation cérébrale et métabolisme énergétique a donc été proposé pour expliquer ce phénomène [1]. Dans ce modèle, le lactate issu de la glycolyse astrocytaire joue un rôle essentiel car il est le substrat oxydatif neuronal.

Nous avons analysé la validité de ce modèle par une étude *ex vivo* chez le rat du métabolisme du lactate et du glucose en fonction de l'activation cérébrale en répondant à trois questions : (1) Y-a-t-il production de lactate dans le cerveau en liaison avec l'activité cérébrale, (2) où ce lactate est-il produit et (3) ce lactate est-il oxydé dans les neurones. Les réponses que nous apportons confortent la validité du modèle proposé [2-4].

- 1-Pellerin L. et Magistretti P. J., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1994, 91 : 10625-10629
- 2-Serres S. et al. NMR Biomed., 2003, 16: 430-439.
- 3-Serres S. et al. J. Biol. Chem., 2004, 279: 47881-47889.
- 4-Serres S. et al., J Neurosci. Res. 2005, 79: 19-25.

ETUDE DU METABOLISME DU GLUCOSE ET DE LA PROLINE DES TRYPANOSOMES PAR RMN

Loïc Rivière<sup>1</sup>, Virginie Coustou<sup>1</sup>, Marc Biran<sup>2</sup>, Jean-Michel Franconi<sup>2</sup> et Frédéric Bringaud<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Génomique Fonctionnelle des Trypanosomatides UMR-5162 CNRS et <sup>2</sup>Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR-5536 CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex.

Les trypanosomes africains (*Trypanosoma brucei*) sont des parasites protozoaires responsables de la maladie du sommeil chez l'Homme, dont la transmission d'entre les individus se fait par un insecte vecteur (mouche tsé-tsé). Nous étudions le métabolisme énergétique des formes adaptatives de *T. brucei* vivant dans l'insecte vecteur (formes procycliques), dont la culture peut être effectuée *in vitro*. Les formes procycliques constituent un excellent modèle pour étudier les parasites apparentés aux trypanosomes car il est possible d'inactiver l'expression des gènes d'intérêt par interférence ARN (RNAi). Ces parasites utilisent essentiellement le glucose et la proline comme source de carbone, dont nous étudions le métabolisme par RMN [1-5]. L'analyse par RMN des produits finaux (enrichis en <sup>13</sup>C) excrétés par les parasites (sauvages ou mutants), incubés en présence de [1-<sup>13</sup>C]glucose, a permis de montrer que le succinate excrété en abondance est produit dans les glycosomes et la mitochondrie grâce à 2 isoformes d'une nouvelle enzyme (fumarate réductase) localisée dans ces 2 compartiments subcellulaires [1,5]. Actuellement nous poursuivons l'étude du métabolisme glucidique et utilisons une approche équivalente pour étudier le métabolisme de la proline chez ces parasites.

1. Besteiro S. et al., J. Biol. Chem., 2002, 277:38001-38012.
2. Coustou V. et al., J. Biol. Chem., 2003, 278:49625-49635.
3. Rivière L. et al., J. Biol. Chem., 2004, 279:45337-45346.
4. Lamour N. et al., J. Biol. Chem., 2005, 280:11902-11910
5. Coustou V. et al., J. Biol. Chem., 2005, 280:16559-16570.

**IN SITU NMR STUDY OF BENZOTHAZOLE DEGRADATION BY RHODOCOCCLUS ISOLATES**

**N. Haroune, B. Combourieu, P. Besse, M. Sancelme and A.-M. Delort**

*Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS- Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex.*

Benzothiazoles are a group of xenobiotics containing a benzene ring fused with a thiazole ring and are manufactured worldwide for a variety of applications depending on the substituent of the thiazole ring. Released from manufactured products or from benzothiazole production plants, they have been detected in industrial wastewater, but also in various environmental compartments. We used *in situ* NMR to study the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* isolates.

First, various *in situ* liquid state NMR techniques (1D  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ , 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) directly performed on culture media, were used to determine the structure of metabolites and propose a detailed biodegradative pathway. In this paper, the study case of the degradation of benzothiazole (BT) by *R. pyridinovorans* strain PA will be presented. In particular, the detection of a diacid structure resulting from the opening of the benzene ring, together with complementary experiments, demonstrated the involvement of a catechol 1,2-dioxygenase in this strain.

Second, we present a new approach to study the degradation of benzothiazole-2-sulfonate (BTSO<sub>3</sub>) by *Rhodococcus erythropolis* in the presence of anionic clays:  $^1\text{H}$  HR-MAS (high resolution magic angle spinning) NMR was used to monitor the degradation directly in the hydrated soil matrix.

P. GRIVET, A.-M. DELORT and J.-C. PORTAIS . NMR and Microbiology: From Physiology to Metabolomics. *Biochimie*, 2003, **85**, 823-840 (revue).

**METABOLISME CEREBRAL DU GLUTAMATE CHEZ UN MODELE RAT DE LA MALADIE DE PARKINSON: ETUDE DYNAMIQUE MENEES *IN VIVO* EN SRM C-13**

**C. Chassain, A. Traoré, G. Bielicki, J.-P. Donnat, J.-P. Renou, F. Durif**

*INRA, Unité QuaPA, Équipe "Structures Tissulaires et Interactions Moléculaires", Centre de recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 St Genès Champanelle*

**Introduction:** Le but de notre recherche est d'explorer le métabolisme des ganglions de la base (GB) chez des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson (le rat dont le faisceau médian du télencéphale droit a été lésé par injection stéréotaxique de 6-hydroxydopamine, 6-OHDA). La spectroscopie  $^{13}\text{C}$  RMN a été utilisée pour enregistrer *in vivo* la synthèse de glutamate/glutamine à partir d'acétate de sodium [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]. Le principal intérêt de ces techniques est de suivre, *in vivo*, les changements dans la neurotransmission glutamatergique au sein des GB. Nous avons ainsi apprécié *in vivo* les concentrations de glutamate dans le cerveau des rats selon leur état physiopathologique et le traitement antiparkinsonien.

**Matériels et méthodes:** L'étude est réalisée sur des rats contrôles ( $n = 6$ ) et sur des rats avec lésion unilatérale du faisceau médian du télencéphale par la 6-OHDA (toxine induisant la destruction spécifique des neurones utilisant la dopamine comme neurotransmetteur) ( $n = 5$ ). Les animaux sont évalués dans un état stable et après administration de levodopa (50mg/kg; i.v.). Les rats sont anesthésiés; l'acétate de sodium [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ] est perfusé dans la veine jugulaire pendant 2 heures. Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  sont enregistrés sur un spectromètre Biospec Bruker 47/40 à l'aide d'une bobine de surface  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (30mm de diamètre) réalisée dans notre laboratoire. Les spectres sont acquis dans l'hémisphère cérébral lésé grâce à une sélection de volume réalisée au moyen de 6 bandes de saturation. La séquence utilisée est une séquence d'acquisition  $^{13}\text{C}$  avec découplage  $^1\text{H}$  pendant l'acquisition. Elle dure 17 minutes et les acquisitions sont répétées pendant les 2 heures. Les aires des résonances du Glu marqué sur son carbone en position 4 de la chaîne carbonée (Glu C4) sont intégrées et exprimées en pourcentage de l'aire du pic des lipides pour chaque spectre, une cinétique d'évolution du marquage  $^{13}\text{C}$  du Glu C4 est ainsi obtenue.

**Résultats:** La production de Glu C4 est continue puis atteint un maximum 34 minutes après le début de la perfusion d'acétate. Après 34 minutes de perfusion d'acétate [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ], la proportion relative de Glu C4 formée est plus importante pour le groupe rats parkinsoniens recevant du sérum physiologique (45,1 %  $\pm$  12,8 %) que pour le groupe rats contrôles recevant du sérum physiologique (32,0 %  $\pm$  3,7 %;  $p < 0,05$ ). Il en est de même après 51 minutes de perfusion (49,0 %  $\pm$  5,6 % vs 29,8 %  $\pm$  4,0 %;  $p < 0,001$ ), ainsi qu'après 68 minutes (48,4 %  $\pm$  11,9 % vs 27,1 %  $\pm$  4,3 %;  $p < 0,01$ ) et 85 minutes (46,8 %  $\pm$  5,8 % vs 27,4 %  $\pm$  7,4 %;  $p < 0,05$ ). Chez les rats parkinsoniens, la proportion relative de Glu C4 est significativement plus faible après administration de levodopa qu'après administration de sérum physiologique ( $F = 4,17$ ;  $p < 0,05$ ). Après 51 minutes de perfusion d'acétate de sodium [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ], le taux de Glu C4 chez les rats parkinsoniens est égal à 49,0 %  $\pm$  5,6 % après injection de sérum physiologique, il est égal à 29,3 %  $\pm$  16,5 % après l'injection de levodopa ( $p < 0,05$ ). Après 68 minutes de perfusion d'acétate, il est égal à 48,4 %  $\pm$  11,9 % après injection de sérum physiologique, et à 32,3 %  $\pm$  18,6 % après l'injection de levodopa ( $p < 0,05$ ). De même, après 85 minutes de perfusion d'acétate, le taux de Glu C4 est égal à 46,8 %  $\pm$  5,8 % après injection de sérum physiologique, et à 31,5 %  $\pm$  12,5 % après levodopa ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** Nous avons mis en évidence des modifications significatives du métabolisme glutamatergique cérébral chez le modèle rat de la maladie de Parkinson en utilisant la SRM du carbone  $^{13}\text{C}$ . L'incorporation du marquage Glu C4 est plus importante dans le striatum des rats parkinsoniens que dans le striatum des rats contrôles recevant du sérum physiologique et de rats contrôles recevant une injection unique d'un agent antiparkinsonien. De plus, dans le striatum déficient en dopamine, la levodopa, rétablit des valeurs relatives de Glu C4 identiques à celles obtenues pour le groupe des animaux contrôles.

**ORIGINE METABOLIQUE DU CARBONE RESPIRE PAR LES FEUILLES ETUDIEE *IN SITU* A L'AIDE DE L'ABONDANCE NATURELLE DES ISOTOPES STABLES DU CARBONE ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) DANS LE  $\text{CO}_2$  RESPIRE.**

**Jaleh Ghashghaie, Guillaume Tcherkez, Franz-W. Badeck, Gabriel Cornic**

Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution (ESE), UMR 8079, Bâtiment 362, Université de Paris-Sud, 91405-Orsay. E-mail: jaleh.ghashghaie@ese.u-psud.fr

Pour étudier le flux métabolique accompagnant la respiration des plantes, nous avons mesuré l'abondance naturelle des isotopes stables du carbone ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) dans le  $\text{CO}_2$  dégagé par les feuilles « intactes » lors de la respiration à l'obscurité (mesure en ligne à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique couplé au système d'échanges gazeux foliaires) ainsi que dans les substrats potentiels de la respiration (sur extrait foliaire). En effet, le  $^{13}\text{C}$  (isotope rare: 1,1 % du carbone total) étant plus lourd que le  $^{12}\text{C}$  (isotope abondant: 98,9% du carbone total), des fractionnements (discriminations) isotopiques (en général contre isotope lourd) se produisent lors des réactions enzymatiques [1]. Il en résulte une différence de distribution de l'isotope lourd ( $^{13}\text{C}$ ) entre les métabolites issues des voies métaboliques différentes, de même qu'entre les positions d'atomes au sein d'une molécule donnée. Par exemple, les glucides sont plus riches en  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C} \cong -26 \text{‰}$ ) que les acides gras ( $\delta^{13}\text{C} \cong -33 \text{‰}$ ) et les positions C-3 et C-4 des hexoses sont plus enrichies en  $^{13}\text{C}$  que les autres positions [2].

Nos résultats montrent que le  $\text{CO}_2$  respiré par les feuilles de plantes en  $\text{C}_3$  est plus riche en  $^{13}\text{C}$  que le substrat putatif de la respiration qu'est le saccharose [3] et que cet enrichissement est variable selon les espèces et selon les conditions environnementales [4, 5]. Cependant, nous avons observé chez les feuilles du haricot une relation linéaire unique entre la signature isotopique du  $\text{CO}_2$  respiré et le quotient respiratoire (QR =  $\text{CO}_2$  dégagé/ $\text{O}_2$  consommé), quelque soit le facteur utilisé pour faire varier ces paramètres (température foliaire et durée de l'obscurité) [5].

Nous avons proposé qu'il y avait deux origines métaboliques pour le  $\text{CO}_2$  respiré [5]: une enrichi en  $^{13}\text{C}$  issue de la décarboxylation du pyruvate, et l'autre appauvri en  $^{13}\text{C}$  issue de la dégradation de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs. La contribution relative de ces deux sources pourrait expliquer la teneur en  $^{13}\text{C}$  dans le  $\text{CO}_2$  dégagé lors de la respiration. En effet, les C-3 et C-4 des molécules de glucose, décarboxylés lors de la réaction de pyruvate déshydrogénase, sont enrichis en  $^{13}\text{C}$  comparés aux autres carbones de ces molécules qui forment l'acétyl-CoA [2]. Lorsque les molécules oxygénées telles que les glucides sont dégradés (QR environ 1) et l'acétyl-CoA (carbones légers) est utilisé pour les voies anaboliques (ex. biosynthèse des lipides), le  $\text{CO}_2$  respiré devrait être enrichi en  $^{13}\text{C}$  (avec une signature proche de valeur moyenne des C-3 et C-4 de glucose; environ -21‰). Par contre, lorsque les molécules moins oxygénées telles que les lipides sont dégradés (QR aux alentours de 0.6), acétyl-CoA étant produit à partir de la dégradation des acides gras, le  $\text{CO}_2$  respiré devrait être appauvri en  $^{13}\text{C}$  (avec une signature proche de la valeur moyenne des positions C-1, C-2, C-5 et C-6 du glucose; environ 6‰ plus négative que la moyenne des positions C-3 et C-4). La gamme de variations observées de la signature isotopique du  $\text{CO}_2$  respiré (-20‰ à -30‰) correspond bien à l'intervalle prédite [5].

Ainsi, l'analyse *in situ* de la signature isotopique du  $\text{CO}_2$  respiré permet de déterminer la contribution relative de la décarboxylation du pyruvate et celle du cycle de Krebs à la respiration, ainsi que la nature du substrat utilisé. Pour une revue récente voir [6].

[1] Farquhar G.D. *et al. Aust. J. Plant Phys.* (1982) 9: 121-137  
[3] Duranceau M. *et al. Plant Cell & Env.* (1999) 22: 515-523  
[5] Tcherkez G. *et al. Plant Phys.* (2003) 131: 237-244

[2] Rossmann A. *et al. Plant Phys.* (1991) 96: 609-614.  
[4] Ghashghaie J. *et al. Plant Cell & Env.* (2001) 24: 505-515  
[6] Ghashghaie J. *et al. Phytochem. Rev.* (2003) 2: 145-161.

### *Session 3-O18*

## **EXPLORATION DU METABOLISME PRIMAIRE AZOTE CHEZ LE COLZA. DETECTION PAR RMN DU <sup>15</sup>N ET PAR CPG-SM.**

**Corinne Pau-Roblot, Nassima Houyou, Albrecht Roscher**

*Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR-CNRS 6022, Université de Picardie Jules-Verne, Faculté des Sciences, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex.*

Nous étudions le métabolisme azoté des plantes et plus précisément celui du colza. L'intérêt d'étudier l'assimilation de l'azote au niveau des parties aériennes de colza provient de l'observation d'une augmentation anormale du taux de transcription de la nitrate réductase (NR) ainsi que d'une augmentation parallèle de son activité enzymatique [1]. Ceci est observé seulement au niveau des parties aériennes de colza suite à une exposition des plantules à l'ammonium. Cette activation par l'ammonium est 2,5 fois plus élevée que la valeur obtenue avec le nitrate. Nous utilisons donc la RMN du <sup>15</sup>N afin de vérifier si les flux métaboliques azotés sont aussi modifiés par cette augmentation de l'activité enzymatique, afin de comprendre les régulations métaboliques à la base de l'effet observé. Pour mieux appréhender les relations entre l'incorporation, la distribution et les interactions de l'azote et le carbone dans le métabolisme de la plante, des sources azotées, ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), enrichis en <sup>15</sup>N (99%) ont été introduits dans le milieu nutritif lors de l'analyse par RMN. L'incorporation du <sup>15</sup>N dans les parties aériennes de colza (cotylédons et hypocotyle) isolées a été suivie en temps réel par RMN *in vivo*. Une extraction du tissu végétal a été effectuée ensuite afin d'analyser l'extrait par RMN *in vitro* puis par CPG-SM. Ces analyses par RMN *in vitro* complétées par la CPG-SM permettent d'évaluer l'incorporation globale et surtout de déterminer les pools d'acides aminés enrichis et non enrichis.

[1] : Leleu O., Vuylsteker C., J. Exp. Bot., 2004 , 55: 1-9.

### *Session 3-019*

#### **APPORT DU METABOLOME EN TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE ET NUCLEAIRE.**

**C. Junot, A. Lafaye et E. Ezan**

*CEA, Laboratoire d'Etudes Du Métabolisme des Médicaments, 91191 Gif-sur-Yvette*

Le Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments a initié des études du Métabolome en 2002 dans le cadre du programme de Toxicologie Nucléaire lancé par le CEA. Nos travaux ont eu pour objectif de mettre au point des stratégies d'analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse afin d'évaluer leur intérêt dans le cadre d'études de toxicologie mais également d'évaluer l'apport de l'analyse du métabolome dans les approches globales de biologie des systèmes. Pour cela, nous avons adopté deux démarches complémentaires : l'analyse globale du métabolome, dont le but ultime est de fournir des informations de nature chimiométrique susceptibles de permettre la classification d'échantillons biologiques en fonction de leur nature ou origine, et l'analyse ciblée de métabolites appartenant à des familles chimiques ou des voies métaboliques d'intérêt. Dans un premier temps, nous avons évalué l'apport de l'analyse du métabolome en toxicologie animale en recherchant des biomarqueurs de susceptibilité d'une exposition au cadmium ou à l'uranium. Une deuxième approche a consisté à étudier l'apport de l'analyse du métabolome dans la compréhension du fonctionnement cellulaire et dans la connaissance des mécanismes de régulation mis en place par la cellule lors d'une exposition à un toxique et plus particulièrement la voie métabolique de biosynthèse du glutathion a été étudiée chez la levure *S. cerevisiae* en utilisant un marquage métabolique uniforme de la levure à l'isotope <sup>15</sup>N.

### Session 3-O20

#### ETUDE PAR PROFILAGE METABOLIQUE DES REPONSES AU STRESS SALIN CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*.

R. Lukan<sup>1</sup>, M.F. Niogret<sup>1</sup>, J. Kopka<sup>2</sup>, R. Sulpice<sup>2</sup>, F.R. Larher<sup>1</sup> et A. Bouchereau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Equipe Osmoadaptation et Métabolismes de Stress, UMR CNRS 6026 ICM, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex. Tél. 02 99 23 23 69 97. Fax: 02 99 23 23 69 15. E-mail: [alain.bouchereau@univ-rennes1.fr](mailto:alain.bouchereau@univ-rennes1.fr)* <sup>2</sup>*Present address : Joachim Kopka, Max-Planck-Institut für Molekulare 14424 Potsdam, Germany*

Une étude des profils métaboliques associés à la réponse au stress salin a été conduite par LC-UV, GC-FID et GC-MS, à partir de lignées d'*Arabidopsis thaliana* choisies pour leur capacité contrastées à synthétiser des solutés compatibles, naturellement ou après mutation ou transfection. Les efforts ont porté plus particulièrement sur la caractérisation du phénotype métabolique du mutant Eskimo [1], tolérant au froid et accumulateur constitutif de proline ; du transgénique CodA [2] capable de synthétiser la glycine bétaine (osmoprotectant naturellement absent chez *Arabidopsis*) à partir de la choline et de l'espèce extrémophile *Thellungiella halophila* [3], apparentée à *Arabidopsis* et susceptible d'accumuler de la proline. Deux autres lignées d'*Arabidopsis*, transformées respectivement pour la synthèse de mannitol [4] et de tréhalose [5] ont également été étudiées.

Plusieurs dizaines de métabolites appartenant essentiellement aux familles des sucres solubles, polyols, acides aminés, acides organiques et amines ont été identifiés dans les extraits, tandis que de nombreux autres composés, non identifiés, ont pu également être détectés et pris en compte dans la recherche des ajustements métaboliques haloinduits.

Le traitement des données à l'aide d'outils d'analyse multivariée, telles que l'ACP et l'AFD, ainsi que par l'analyse des corrélations entre métabolites, a fait apparaître les marqueurs de stress et a mis à jour des reconfigurations du réseau métabolique induites par le sel et/ou l'accumulation artificielle de solutés compatibles.

1. Xin, Z. and J. Browse, *eskimo1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. 95(13): p. 7799-7804.
2. Hayashi, H., et al., *Transformation of Arabidopsis thaliana with the codA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress*. The Plant Journal, 1997. 12(1): p. 133-142.
3. Minorsky, P., *A halophyte relative of Arabidopsis*. Plant Physiology, 2004. 135: p. 1147-1148.
4. Zhifang, G. and W.H. Loescher, *Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in Arabidopsis thaliana enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer*. Plant, Cell and Environment, 2003. 26(2): p. 275-283.
5. Neslon, A., et al., *The Arabidopsis Trehalose-6-P AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscissic acid, and stress signaling*. Plant Physiol., 2004. 136: p. 3649-3659.

*Session 3-O21*

**IDENTIFICATION OF NEW BIOMARKERS OF WHOLEGRAIN CEREAL CONSUMPTION BY A METABONOMIC APPROACH**

**Rafael Llorach<sup>1</sup>, Anthony Fardet<sup>1</sup>, Jean-François Martin<sup>1</sup>, Estelle Pujos<sup>2</sup>, Augustin Scalbert<sup>1</sup>**

*Unité des Maladies Métaboliques et Micronutrients, INRA, 63122 Saint-Genès-Champagnelle*

Epidemiological studies suggest that wholegrain cereal foods have beneficial health effects, reducing the risk of heart disease, diabetes and some cancers. We undertook a metabonomic comparative study of wholegrain and refined wheat flour with two objectives: (i) identify some metabolic effects of wholegrain cereals; (ii) identify some biomarkers of wholegrain cereal intake. A randomized crossover study was carried out on rats ( $n = 10$ ) fed successively a diet containing the wholegrain or refined flour (65 % of the diet) during 2 weeks each. Urine samples were collected in metabolic cages at the beginning of the second period and at the end of each feeding periods. They were directly analysed on a LC-QToF mass spectrometer (Waters) operating in the positive mode ( $m/z$  range: 50-1000 amu). Data were processed using the Markerlynx software (Waters) and a normalised table of markers was exported to XLSTAT for chemometric analysis. 491 ions were found to discriminate wholegrain and refined flour diets (ANOVA,  $p < 0.05$ ). PCA multivariate analysis of these 491 ions showed a fully reversible metabolic trajectory whatever the order of the administration of the two diets. Three of the most discriminating metabolites could be identified as acetosyringone, syringylalcohol and *p*-coumaric acid. These three metabolites are all derived from lignins, the first two are likely formed by the gut microflora from the lignin polymer incrusting the cell wall in the grain outer tissues characterizing brans and wholegrain cereals. *p*-Coumaric acid is known to be esterified to lignins in Gramineae. The presence of these three compounds in the urine of rats fed wholegrain wheat flour strongly suggests that lignins are not as inert in the gut as very commonly thought. They could be good biomarkers of intake for wholegrain cereal foods, known to be the major sources of lignins in the diet, of potential great interest for epidemiological studies.

**PROJET BRUME : BASE DE DONNEES ET CALCUL DE FLUX METABOLIQUES**

**C. G Dussap., L. Poughon, A. Pons, C. Larroche, C. Creuly**

LGCB – Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, .CUST-Université Blaise Pascal, BP 206,  
63174 Aubière Cedex.

**Brume** est une interface (développée en HTML et PHP/mysql) permettant d'interroger et de gérer une base de donnée où sont stockées des informations sur des métabolites, des enzymes et des réactions métaboliques à partir desquels il est possible de construire des réseaux métaboliques. Brume est également associée à des programmes permettant le calcul de flux, moyennant une hypothèse de régime pseudo-permanent, dans ces réseaux.

**La base de donnée** a été construite à partir de la base LIGAND et plus particulièrement de ses tables concernant les métabolites (COMPOUND), les réactions (REACTION) et les enzymes (ENZYME).

**Les programmes** d'analyse et de calculs de flux métaboliques intégrés à Brume sont de 2 types :

Un ensemble d'algorithmes développés au laboratoire permettant :

- 1.d'analyser le réseau métabolique en y recherchant les cycles réactionnels (colinéarités entre les bilans e conservation et entre les réactions) qui s'appuie sur une méthode des graphes
- 2.de résoudre le réseau métabolique, à la condition que tous les degrés de libertés soient fixés. La résolution s'appuie sur une méthode de Lagrange. Elle peut s'effectuer sous contrainte et peut également permettre une réconciliation de données.

Un ensemble d'algorithmes adapté des travaux de S. Shuster et du logiciel METATOOL [1]. Ces algorithmes permettent en particulier l'analyse des «Elementary Mode» et de résoudre partiellement un système dont tous les degrés de liberté ne sont pas fixés.

[1] Pfeiffer, T., Sánchez-Valdenebro, I., Nuño, J. C., Montero, F. & Schuster, S. METATOOL:For studying metabolic networks, *Bioinformatics* 15 (1999) 251-257.

**THE STRUCTURE OF ENERGETIC METABOLISM IN MITOCHONDRIA.**

**P. Sabine, M. Beurton-Aimar and J.-P. Mazat.**

*Physiopathologie mitochondriale, INSERM U688, LaBri UMR-CNRS 5800 and  
Université Bordeaux 2, 146, rue Leo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex. [jpm@u-bordeaux2.fr](mailto:jpm@u-bordeaux2.fr)*

We describe a basic mitochondrial metabolism (Krebs cycle,  $\beta$ -oxidation of fatty-acids, oxidative phosphorylation, etc.) with 41 enzymatic reactions and carriers and 31 metabolites.

In order to understand the structure of this metabolic network and particularly the functional differences in different type of mitochondria in different tissues, we analyse this network in term of elementary flux modes. Elementary flux modes or efm are defined as minimal sets of reactions that can operate at steady-state with all irreversible reactions proceeding in the appropriate direction. They define a unique set of pathway, which represents a set of generating vectors of the solution space at steady-state. Using Fastool, FluxAnalyzer or Metatool, 7,250 elementary flux modes are derived from the stoichiometry matrix of the network.

This huge number of elementary flux modes is due to the great number of carriers and exchangers of intermediate metabolites between mitochondrial matrix and cytosol.

This decomposition in elementary flux modes demonstrates:

- the importance of some reactions in the mitochondrial metabolism (pyruvate carboxylase).
- the importance of carriers in selecting various metabolic pathways.
- the interest of this decomposition : some elementary flux mode could be predominantly expressed in particular tissues and give them their specificity.
- Test the robustness of a network confronted to gene mutations in mitochondrial diseases.

However it is difficult to tackle this huge number of elementary flux modes. In order to gain insight into their relevant physiological properties, we investigate several methods of clustering to define groups of elementary flux modes and to derive their physiological properties. We evidenced clustering methods giving an efm classification in subsets sharing the same reaction motifs attached to specific reaction pathways in mitochondrial metabolism.

**DESCRIPTEUR METABOLIQUE : MODELE STOECHIOMETRIQUE POUR LA PREDICTION ET LE  
CONTROLE EN LIGNE DES BIOPROCEDES**

**Carine Bideaux<sup>1</sup>, Sandrine Alfenore<sup>2</sup>, Carole Molina-Jouve<sup>1</sup>, Stéphane Guillouet<sup>1</sup> et Jean-Louis Uribe Larrea<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de Biotechnologies et Bioprocédés, UMR CNRS5504 - UMR INRA 792, <sup>2</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Procédés de l'Environnement, INSA Toulouse, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse

Nous présentons ici une approche de modélisation des systèmes métaboliques basée sur la méthode MFA et ses applications (1) pour le contrôle en ligne de bio-procédés et (2) en tant qu'outil mathématique pour la prédiction des conditions opératoires et/ou des cinétiques de réaction au cours des cultures en fonction de critère de production. Un modèle stœchiométrique basé sur la connaissance actuelle de la topologie du réseau métabolique de la levure a été construit. La variation de la composition macromoléculaire du microorganisme en fonction de son environnement peut également être prise en compte dans notre modèle par une représentation des coefficients stœchiométriques des réactions anaboliques sous forme symbolique. Nous obtenons alors un système symbolique linéaire dont la résolution donne l'expression algébrique de chaque flux métabolique en fonction des coefficients stœchiométriques anaboliques symboliques et de certaines vitesses de réaction mesurables au cours du procédé. Dans ce modèle, les équations obtenues sont alors valides pour un microorganisme considéré quelque soit l'environnement et ses conditions physiologiques.

Ce modèle a été, dans un premier temps, validé pour le contrôle en ligne d'un procédé de production de biomasse (*Kluyveromyces marxianus*). Ainsi, à partir de seulement 3 paramètres (oxygène consommé, CO<sub>2</sub> produit, liquide correcteur de pH) mesurés en ligne sur le bioréacteur, le modèle a permis de prédire l'évolution dynamique des cultures fed-batch de la levure *Kluyveromyces marxianus* (vitesses et concentrations).

Une seconde application concerne l'utilisation du descripteur métabolique pour prédire les conditions expérimentales optimales permettant de minimiser la production de glycérol au cours de la fermentation éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*. La résolution du système métabolique symbolique propose alors de contrôler le quotient respiratoire à une valeur critique au cours de la culture fed-batch. La validation a été réalisée en cultivant la levure *S. cerevisiae* en réacteur fed-batch et le contrôle du Quotient Respiratoire par l'apport de substrat carboné a permis de réduire significativement la production de glycérol.

# *Sessions Flash*

## *Session Flash 1-F1-P1*

### **A FUNCTIONAL GENOMICS ANALYSIS OF THE FLAVONOID PATHWAY IN ARABIDOPSIS SEED**

**Jean-Marc Routaboul<sup>1</sup>, Lucien Kerhoas<sup>2</sup>, Lucille Pourcel<sup>1</sup>, Jacques Einhorn<sup>2</sup>,  
Isabelle Debeaujon<sup>1</sup>, Loic Lepiniec<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Biologie des Semences, INRA Versailles, 78026 Versailles Cedex* <sup>2</sup>*Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA Versailles, 78026 Versailles Cedex*

*Arabidopsis thaliana* seed has become a model for flavonoid metabolism and its regulation due to the availability of a wide range of mutants affected in this pathway [1]. Because the loss of flavonoid pigments, that are not essential for plant growth, can easily be detected in seeds, 20 different loci affected in flavonoid synthesis have been identified on the basis of seed coat colour changes (*tt: transparent testa*). However, functional characterization of the genes involved in this pathway requires in-depth analysis of seed flavonoid structure and composition. Here, we report an analysis of the diverse and specific flavonoids that accumulate during seed development and maturation in wild types and mutants using HPLC-UV-ESI-MS-MS. Wild-type seed contained more than 26 different flavonoids belonging to flavonols (mono and diglycosylated quercetin, kaempferol and isorhamnetin derivatives) and flavan-3-ols (epicatechin monomers and soluble procyanidin polymers with degrees of polymerisation up to 9). Most of them are described for the first time in *Arabidopsis*. Interestingly, a novel group of four biflavonols that are dimers of quercetin-rhamnoside was also detected. Finally, eleven mutants affected in known structural or regulatory functions of the pathway and their three corresponding wild types were also studied. Flavonoid profiles of the mutants were consistent with previous predictions based on genetic and molecular data. In addition, they also revealed the presence of new products in seed and underlined the plasticity of this metabolic pathway in the mutants [2]. These results provide insight into critical steps in flavonoid biosynthesis that could be useful for designing strategies to modify related crop plants. They are also essential to discover gene function by comparing metabolic profiles of mutants with those of well-established reference mutants [3] or transgenic lines, and by QTL analysis with RILs of accessions with contrasting metabolic profiles.

[1] Lepiniec L. et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol*, AR press, 2006, 57 (in press)

[2] Routaboul J-M. et al. Flavonoid biosynthesis and accumulation in seed of *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 2006 (in press).

[3] Pourcel L. et al. *TRANSPARENT TESTA10* Encodes a Laccase-like Enzyme Involved in Oxidative Polymerization of Flavonoids in *Arabidopsis* Seed Coat. *Plant Cell* published October 21, 2005, 10.1105/tpc.105.035154.

## Session Flash 1-F2-P2

### EFFETS DE L'INFESTATION SUR LE PROFIL METABOLIQUE D'APEX DE VARIETES DE PECHER SENSIBLES ET RESISTANTES AU PUCERON VERT

JL Poëssel<sup>1\*</sup>, MH Sauge<sup>2</sup>, MN Corre<sup>1</sup>, C Deborde<sup>3</sup>, C Dufour<sup>4</sup>, C Renaud<sup>3</sup>, M Gaudillère<sup>3</sup>,  
M Maucourt<sup>3</sup>, M Loonis<sup>4</sup>, JP Lacroze<sup>2</sup>, T Pascal<sup>1</sup>, A Moing<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, INRA, Domaine St Paul, Site AgroParc, 84914 Avignon, cedex 9, <sup>2</sup>UMR INRA/UAPV Ecologie des Invertébrés, Avignon, <sup>3</sup>UMR Physiologie et Biotechnologie Végétales, INRA, Université Bordeaux 1, Université Bordeaux 2, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon, cedex. <sup>4</sup>UMR Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale INRA/UAPV, Avignon. \* poessel@avignon.inra.fr

Les bases fonctionnelles des interactions entre plante et insectes piqueurs suceurs tels les pucerons restent mal connues malgré l'impact de ces ravageurs en agriculture. Dans le cadre de la caractérisation fonctionnelle de l'interaction entre le puceron *Myzus persicae*, espèce modèle en écologie, et son hôte primaire, le pêcher (*Prunus persica* L. Batsch), espèce modèle pour l'étude des Rosacées, nous avons mis en oeuvre une démarche d'analyse du métabolome sur les apex de pêcher, site d'alimentation privilégié de l'insecte. Nous avons étudié, par spectroscopie de RMN du proton et analyses HPLC ciblées sur les principaux pools de métabolites primaires et secondaires hydrosolubles, les modifications de profil métabolique induites par l'infestation dans les apex de deux variétés de pêcher, sensible (GF305) ou résistante (Rubira) à *M. persicae* [1,2]. L'analyse en composante principale de la signature spectrale obtenue par RMN et les analyses en HPLC révèlent de profondes modifications des profils métaboliques chez la variété résistante 48 heures après l'infestation : on observe notamment une baisse de la teneur de la plupart des sucres et acides organiques, de certains acides aminés (glutamine, proline, thréonine) alors que les teneurs en acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine, valine) et aromatiques (phénylalanine, tyrosine) et en métabolites secondaires (composés phénoliques et cyanogéniques) augmentent. Les modifications observées chez la variété sensible sont faibles et pour la plupart divergent de celles observées chez la variété résistante. Ces résultats permettent d'émettre des hypothèses sur les voies métaboliques impliquées dans la réponse à l'infestation et sur la nature des effecteurs pouvant jouer un rôle dans la résistance induite chez Rubira. Cette étude met en lumière l'apport de l'approche métabolomique pour l'étude des interactions plante – insectes piqueurs suceurs.

#### Références

- [1] Sauge MH *et al.* Entomologia Experimentalis et Applicata (2002) 102 :29-37.  
[2] Sauge MH *et al.* Oikos (2006) À paraître.

### *Session Flash 1-F3-P3*

#### **ANALYSES DE METABOLITES EN VUE D'UNE APPROCHE GLOBALE TYPE METABOLOME**

**Stéphanie Boutet, Céline Diaz, Virginie Gaudon, Anne Krapp, Maud Lelandais, Marie Thérèse Leydecker, Céline Masclaux-Daubresse et Françoise Vedele.**

*Unité de Nutrition Azotée des Plantes, INRA, Rte de St-Cyr, 78026 Versailles cedex*

Les nombreuses données de séquences des génomes d'espèces cultivées (maïs, blé), ainsi que celles des génomes complets des plantes modèles *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, ont permis les études de génomique structurale. Le déficit qui reste à relever est de caractériser de manière fonctionnelle la nature de ces gènes. Par exemple, le séquençage d'*A. thaliana* a révélé l'existence de près de 25000 gènes, dont seulement 9% sont réellement caractérisés d'un point de vue fonctionnel [1]. L'une des approches utilisées pour la caractérisation de ces gènes consiste à les inactiver et d'en mettre en évidence les conséquences phénotypiques. Bien qu'une mutation n'ait souvent pas d'effet visible sur le phénotype (moins de 5% d'altération morphologique dans la collection de lignées insertion de Versailles), elle peut conduire à des altérations subtiles du métabolisme, détectables par un profil métabolique. L'exploration de la variabilité naturelle d'*A. thaliana* peut également révéler la fonction de gènes dont le polymorphisme est corrélé avec la variation quantitative d'un caractère. Dans ce cas, ces variations sont fines et nécessitent des mesures fiables et reproductibles.

Au laboratoire de Nutrition Azotée des Plantes nous nous intéressons plus particulièrement au métabolisme azoté et carboné et ses interactions (balance C/N). Pour cela, nous disposons d'appareils nous permettant l'étude de différents métabolites ciblés (Analyseur d'anions, Analyseur d'acides aminés libres, Analyseur GC MS). Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence, dans une population de lignées recombinantes d'*A. thaliana*, des relations fondamentales entre des stades de développement et des caractères physiologiques, comme la sénescence et les variations de certains métabolites [2] (sulfate, GABA, Gln...). Des essais préliminaires dans le cadre de projets nationaux d'étude des métabolites par GC MS [3] nous ont conduits à développer ces approches.

C'est dans cette optique, que l'institut Jean Pierre Bourgin (IJPB) a décidé d'acquérir courant 2006, un GC-TOF pour établir un nouvel outil de génomique fonctionnelle et de physiologie moléculaire, afin de mieux caractériser les différentes voies métaboliques et ses interconnexions.

[1] A. Krapp et al, La Génomique en biologie végétale, Edition INRA

[2] C. Diaz et al, *Plant Physiol.*, 2005,138, 898-908

[3] F. Fiehn et al, *Proteomics*, 2004, 4, 78-83

**FLOW INJECTION ATMOSPHERIC IONISATION MASS SPECTROMETRY OF WINES FOR CHARACTERISATION OF THEIR POLYPHENOLIC FRACTION.**

**G. Mazerolles<sup>1</sup>, S. Preys<sup>2</sup>, E. Meudec<sup>1</sup>, C. Bouchut<sup>1</sup>, H. Fulcrand<sup>2</sup>, J.M. Souquet<sup>2</sup>, D. Bertrand<sup>3</sup>, V. Cheynier<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>. *Plate forme de Recherches Polyphénols, UMR Sciences pour l'Oenologie, INRA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier.* <sup>2</sup>. *SSIP, UMR Sciences pour l'Oenologie, INRA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier.* <sup>3</sup>. *Unité de Sensométrie et de Chimiométrie, ENITIAA/INRA, Rue de la Géraudière, BP 82 225, 44322 Nantes cedex 03*

Polyphenols are responsible for major sensorial properties of red wines (especially colour and taste, *i.e.* astringency and, to a lesser extent, bitterness). Nevertheless, due to the complexity and the diversity of the polyphenolic compounds involved, an exhaustive characterisation of the polyphenolic fraction of a red wine is time consuming as it needs a large variety of analytical methods (High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detection, thiolysis,...).

In the present study, performed in the frame of the European project TYPIC (*Typical food products in Europe: consumer preference and objective assessment*), flow injection mass spectrometry is presented as an alternative for a rapid characterisation of the polyphenolic fraction of red wines. Atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation (both in the positive and negative mode) have been used for direct analysis of wines without any prior separation. The mass analyser used was a Time of Flight (TOF) allowing the separation of anions and cations formed on the basis of their molecular mass. The resulting mass spectrum can be seen as a fingerprint of the red wine analysed.

This methodology was applied to a large number of commercial red wines from different geographical origins and different vintages. All these wines were also characterised by usual chemical analysis in order to determine their enological parameters and by HPLC-DAD before and after thiolysis to determine their polyphenolic composition.

The fingerprints collected were treated using appropriate chemometrics tools. The results obtained showed that the fingerprint of wines obtained by mass spectroscopy could be valuable to discriminate groups of wines having different polyphenolic composition. The relationships between mass spectra and chemical composition of wines are actually studied more precisely.

Acknowledgments: to B. Labarbe, V. Lempereur (SICAREX Beaujolais - France) and U. Fischer (D.L.R Neustadt/Wstr., Deutschland) for providing the usual chemical analyses of Beaujolais wines. This work was financially supported by the EU-Commission (TYPIC QLK1-CT-2002-02225). It does not reflect its views and in no way anticipates the Commission's future policy in this area.

## *Session Flash 1-F5-P5*

### **ANALYSE METABONOMIQUE DES PERTURBATIONS D'ORIGINE TOXICO-NUTRITIONNELLE DU METABOLISME CHEZ L'ANIMAL**

**A. Paris<sup>1</sup>, C. Canlet<sup>1</sup>, N. Priymenko<sup>1</sup>, S. Claus<sup>1</sup>, G. Gottardi<sup>1</sup>, J. Molina<sup>1</sup>, P. Martin<sup>2</sup>, F. Lasserre<sup>2</sup>, A. Eveillard<sup>2</sup> et T. Pineau<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> UMR 1089-Xénobiotiques, INRA-ENVT, 180 chemin de tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse cedex 09, <sup>2</sup> UR 66 Pharmacologie Toxicologie, INRA, 180 chemin de tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse cedex 09.

La métabonomique est l'analyse quantitative des modifications du métabolisme général des organismes résultant de perturbations d'origine pathologique, génétique, nutritionnelle, hormonale ou toxique qu'ils subissent. La méthode de production de ces signatures biologiques s'appuie sur la quantification par RMN à haut champ ou par spectrométrie de masse des analytes présents dans les fluides biologiques ou dans les organes et l'exploitation chimiométrique des données spectroscopiques.

Nous présentons ici quelques applications d'analyse métabonomique.

Le premier exemple concerne l'évaluation de la qualité alimentaire de tubercules de pommes de terre récoltés à partir de variétés génétiquement modifiées (GM) ou isogéniques conventionnelles. Cette évaluation a été effectuée soit par l'analyse du métabolome par spectrométrie de masse à partir d'extraits méthanoliques de tubercules, soit par l'analyse métabonomique des urines de rats ayant consommé ces tubercules. Les empreintes analytiques obtenues par spectrométrie de masse Py-MAB-ToF ont permis de différencier d'abord l'origine variétale, puis les conditions sanitaires dans lesquelles étaient conduites les cultures et enfin les facteurs biotechnologiques impliqués dans la constitution des clones GM. Les empreintes urinaires obtenues par RMN ont permis de différencier d'abord l'origine variétale, puis dans certains cas, l'origine clonale, notamment pour les clones exprimant le gène codant pour la nitrate réductase.

Il a été également montré, dans le cas de l'analyse métabonomique de la toxicité d'un phtalate, le DEHP, chez la souris, que certaines voies métaboliques sont modifiées en réponse à l'administration de DEHP, et ce dès la très faible dose.

Cette méthode d'analyse globale de métabolisme est propice à la détection significative de faibles doses de disrupteurs ou de faibles variations dans la composition des nutriments.

*Session Flash 1-F6-P6*

**UN OUTIL BIOINFORMATIQUE GÉNÉRIQUE POUR LE STOCKAGE ET LE DATA-MINING DE DONNÉES  
DE MÉTABOLOME DE PLANTES**

**Hélène Ferry-Dumazet<sup>1</sup>, Daniel Jacob<sup>1</sup>, Aurélien Barré<sup>1</sup>, Cécile Cabasson<sup>2</sup>, Christel Renaud<sup>2</sup>,  
Catherine Deborde<sup>2</sup>, Annick Moing<sup>2</sup> et Antoine de Daruvar<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> Centre de Bioinformatique de Bordeaux. Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux. <sup>2</sup> UMR Physiologie et Biotechnologie Végétales, INRA, 71 Avenue Edouard Bourleaux, 33883 Villenave d'Ornon cedex*

Pour répondre aux besoins biologiques et bio-informatiques du projet MétaboP (programme Génoplante, [1]), nous avons choisi une stratégie adaptée au **stockage**, au **partage** et à **l'exploitation** de données de **métabolome de plante**. Cette stratégie implique la conception et le développement d'un outil **générique** qui utilise des **standards** de **vocabulaires contrôlés** mais également un standard de **modèle de données** (ArMet,[2]) s'appliquant à des expériences de métabolomique effectuées par et avec des équipes, des espèces et des méthodes différentes. L'exposé expliquera les choix que nous avons faits pour les différents standards ainsi que les raisons qui nous ont amenés à ces choix.

[1] Projet Générique MétaboP “Plant metabolome for genetic resource analysis, mutant and transformant screening and quantitative trait loci determination”. 2005-2006. <http://cbi.labri.fr/MetaboP/presentation.htm>

[2] <http://www.armet.org/>

*Session Flash 1-F7-P7*

**GENETIC DIVERSITY OF ENZYME CONCENTRATIONS AND GLYCOLYTIC FLUX IN INDUSTRIAL  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS**

**L. Grima, C. Dillmann, X. Raffoux, D. de Vienne and D. Sicard.**

*UMR de Génétique végétale, INRA/CNRS/INAPG/UPS, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette.*

Gene expression and regulation are commonly assumed to have evolved in response to environmental variability. However, the relationship between variation in gene expression and phenotypic variation is often poorly understood because most phenotypes result from the functioning of complex metabolic systems. Here, we analysed genetic diversity of glycolytic enzyme concentrations, glycolytic flux and growth rate in industrial *S. cerevisiae* strains and related these three levels of phenotypes to study whether selection can act to modify enzyme concentrations and flux.

A collection of 12 wine, brewing and baking yeast strains was grown in similar liquid glucose media. Glycolytic enzyme concentrations were estimated by quantitative proteomics, and glycolytic flux measured as glucose consumption overtime. Fitting with a population dynamic model allowed us to estimate the growth rate and carrying capacity.

We found genetic diversity for all the traits analyzed except for growth rate. Positive correlations between flux and some, but not all, glycolytic enzyme concentrations were detected suggesting that i) enzymes controlled differently the flux ii) selection for an increased flux also selected for an increased concentration of some glycolytic enzymes. Growth rate was robust to glycolytic enzyme concentrations and flux variation showing that glycolytic flux and growth rate are uncoupled in these anthropic environments.

# *Sessions Posters*

## *Session Poster-P8*

### **BIODISPONIBILITE ET METABOLISME DE PESTICIDES. INFLUENCE DE LEURS INTERACTIONS AVEC LES CONSTITUANTS DU SOL.**

**Stéphanie Durand, Pascale Besse, Bruno Combourieu, Martine Sancelme,  
Anne-Sophie Martin et Anne-Marie Delort**

*Laboratoire Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS, Université  
Blaise Pascal, 63177Aubière Cedex*

Après leur épandage, le devenir des pesticides dans les sols va dépendre essentiellement de processus de transfert et de dégradation, qui vont entrer en compétition ou bien s'associer pour accélérer la minéralisation. Ainsi, la mobilité des pesticides dans les sols, mais aussi leur biodisponibilité - et donc leur métabolisme- vont être notamment contrôlés par les phénomènes d'adsorption et de désorption.

Notre objectif est donc d'étudier les interactions pesticide-sol et de comprendre leur influence sur la biodisponibilité de ces pesticides. Nous avons choisi deux herbicides aux propriétés physico-chimiques très différentes : la mésotrione, nouvel herbicide sélectif du maïs, et le glyphosate (Roundup®).

Dans un premier temps, des essais de dégradation sont réalisés en milieu aqueux avec des souches microbiennes pures, afin de déterminer les conditions optimales et élucider la structure des métabolites. Les cinétiques de dégradation sont suivies en parallèle par HPLC et par RMN  $^1\text{H}$  *in situ*, technique à la fois qualitative et quantitative [1].

Une approche originale de RMN est développée pour étudier les interactions pesticide-sol ou modèles de sol (argiles): la RMN  $^1\text{H}$  HR-MAS [2]. Cette technique nous permet d'évaluer directement l'impact des constituants des sols sur le métabolisme des pesticides. Sa validité sera évaluée par comparaison des résultats obtenus avec ceux issus de techniques plus classiques comme les isothermes d'adsorption.

[1] N. Haroune et al.:  $^1\text{H}$  NMR: a tool to study the fate of pollutants in the environment. C.R. Acad. Sci. Paris, Chimie/Chemistry, (2001) 4:759-763.

[2] B. Combourieu et al.: Differentiation of mobile and immobile pesticide on anionic clays by  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR spectroscopy, *Chem. Commun.*, (2001) 21:2214-2215.

**HOW COULD ASTROCYTIC LACTATE CONTRIBUTE TO NEURONAL OXIDATIVE METABOLISM? AN *IN VITRO* STUDY.**

**A.-K. Bouzier-Sore<sup>1,\*</sup>, P. Voisin<sup>1</sup>, V. Bouchaud<sup>1</sup>, J.-M. Franconi<sup>1</sup>, P. J. Magistretti<sup>3</sup>, L. Pellerin<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>. *Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536 CNRS/Université, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France,* <sup>2</sup> *Institut de Physiologie, 7 rue du Bugnon, 1005 Lausanne, Suisse,* <sup>3</sup> *Ecole Polytechnique Fédérale, Brain and Mind Institute / Hôpital de Cery, Centre de Neurosciences Psychiatriques, Suisse.*

**Purpose :** During the past decades, evidence has been accumulated to support an astrocytic metabolic supply for neurons. Recently, concomitant lactate and glucose metabolism has been investigated in primary neuronal cultures, using <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, in presence of 5.5 mM glucose and lactate concentrations ranging from 1 to 11 mM. Results undoubtedly showed a preferential use of lactate for oxidative metabolism. Here, we reevaluated the participation of glucose and lactate to neuronal oxidative metabolism at a concentration closer to physiological condition.

**Methods :** Neuronal cultures were incubated for 4h in a medium containing either 1.1 mM glucose and 1.1 mM [3-<sup>13</sup>C]lactate, or 1.1 mM [1-<sup>13</sup>C]glucose and 1.1 mM lactate. <sup>1</sup>H-NMR, POCE sequence and proton-decoupled <sup>13</sup>C-NMR spectra were realized and <sup>13</sup>C-specific enrichments (SE) of different carbon were calculated.

**Results :** The major labeled substrate observed is glutamate. Since this metabolite is in equilibrium with the TCA cycle component alpha-ketoglutarate, the relative contribution of glucose and lactate to neuronal oxidative metabolism could be determined from the relative contribution of each substrate to glutamate labeling. Glutamate C4 SE is higher in the lactate-labeled condition, indicating that lactate, rather than glucose, is preferentially used by neurons for their oxidative metabolism. We also determined the contribution of each substrate to neuronal metabolism and found that lactate contribute to 70% to neuronal oxidative metabolism.

**Conclusion :** Our main finding is that glutamate C4 SE is higher when lactate is the labelled substrate. Calculation of the relative contribution of glucose and lactate to neuronal oxidative metabolism indicates that, for a concentration of lactate and glucose in the physiological range, lactate participates to a larger extent to neuronal oxidative metabolism.

**MetaSys : une plate-forme d'exploration fonctionnelle des systèmes métaboliques complexes.**

**Fabien Létisse & Jean-Charles Portais**

*MetaSys, Laboratoire Biotechnologie – Bioprocédés UMR INSA CNRS 5504 UMR INRA 792  
LBB/INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 TOULOUSE Cedex 4 – France*

D'émergence récente, la métabolomique vise à l'analyse globale des répercussions sur les systèmes métaboliques de perturbations d'origine génétique et/ou environnementale. En effet, le métabolome représente en effet à la fois la manifestation ultime de l'expression du génome et l'interface thermodynamique avec le milieu extérieur, et son analyse se présente actuellement comme un outil puissant de phénotypage global. Dans ce contexte, **MetaSys**, le centre d'analyse fonctionnelle du métabolome du Laboratoire de Biotechnologies Bioprocédés (UMR INSA-CNRS 5504 INRA 792, Toulouse) est un nouvel outil de biologie systémique qui vise à mettre à disposition des laboratoires les concepts, les méthodes et les outils d'analyse fonctionnelle de systèmes métaboliques complexes (cellules, tissus, organes, organismes). Centré sur l'analyse fonctionnelle du métabolome, **MetaSys** dispose d'équipements performants (RMN, LC-RMN, MS/MS, etc.) permettant d'offrir une capacité d'exploration à trois niveaux complémentaires :

- Métabolomique : analyse qualitative/quantitative des métabolites : analyse globale, ciblée, établissements de profils métaboliques
- *Fluxomique* : analyse des flux métaboliques: méthodes stœchiométriques, isotopiques ( $^{13}\text{C}$ , analyse par RMN et MS), cinétiques, combinaisons d'approches
- *RMN in vivo*: analyse *in situ* du métabolisme (métabolisme énergétique, carboné, azoté, etc.).

La plate-forme développe également l'analyse *in silico* du métabolisme (reconstruction métabolique, analyse topologique, etc.) ainsi que des outils de modélisation métabolique pour le calcul des flux et la réconciliation de données.

## *Session Poster-P11*

### **FLUXOMIQUE ET ANALYSE DE LA REPONSE ADAPTATIVE DU METABOLISME CENTRAL D' *E. COLI* A UNE MODULATION CONTROLEE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE**

**Cécile Nicolas<sup>1</sup>, Fabien Létisse<sup>1</sup>, Patrick Kiefer<sup>1</sup>, P. Soucaille<sup>1</sup>, Stéphane Massou<sup>2</sup> & Jean-Charles Portais<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire Biotechnologie – Bioprocédés UMR CNRS 5504 UMR INRA 792. LBB/INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 TOULOUSE Cedex 4, <sup>2</sup>Service de RMN, SFTCM 2599, Université Paul Sabatier, Toulouse.

A l'ère post-génomique, les méthodes d'analyse des flux par RMN (et MS) du <sup>13</sup>C sont devenues des outils précieux pour intégrer l'exploration fonctionnelle du métabolisme (fluxomique) dans un cadre plus général de biologie intégrative. Nous avons utilisé ces approches pour analyser les réponses adaptatives globales du métabolisme central d'*E. coli* à des perturbations génétiques. L'ambition est, à terme, de mettre en place une véritable étude quantitative de la relation structure/fonction/régulations au sein de réseaux métaboliques complexes. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une modification ponctuelle du génome d'*E. coli*, en analysant la redistribution des flux métaboliques après délétion du gène *zwf* codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), une enzyme clé du métabolisme central. Pour cela, une analyse isotopomérique des acides aminés protéinogéniques a été réalisée à la fois par RMN et par MS après culture des cellules sur un mélange de [1-<sup>13</sup>C]glucose (80%) et de [U-<sup>13</sup>C]glucose (20%). Ensuite, différents mutants d'expression ont été générés, présentant chacun un niveau fixe d'activité G6PDH. Cette stratégie permet de mimer des effets de régulation sur le gène *zwf*. Les distributions des flux métaboliques ont été déterminées par <sup>13</sup>C-MFA comme précédemment. La comparaison des cartes de flux obtenues pour chaque souche permet de déterminer non seulement la nature des réorganisations métaboliques qui permettent aux cellules de compenser l'absence de G6PDH (mutant de délétion), mais également d'étudier comment la modulation du niveau d'activité G6PDH se répercute sur l'ensemble du métabolisme. L'application du formalisme du contrôle métabolique permettra de déterminer la sensibilité des flux mesurables vis à vis de l'activité G6PDH.

## *Session Poster-P12*

### **OPTIMIZED PROCEDURE FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF A LARGE VARIETY OF INTRACELLULAR METABOLITES IN YEAST BY HIGH PERFORMANEC ANIONIC EXCHANGE CHROMATOGRAPHY**

**Marie-Odile Loret, Jean-Marie François.**

*Laboratoire Biotechnologie Bioprocédés, UMR-CNRS 5504 et INRA 792, INSA Toulouse. (Jean-Marie.Francois@insa-toulouse.fr)*

In order to fast metabolic analysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we previously reported methods for rapid metabolite extraction [1] and for quantification of a large number of intracellular metabolites using High Performance Ionic Chromatography (HPIC) coupled with amperometric detection [2]. Since several problems of interference of many peaks and reproducibility, we now have further optimized this technology by (i) dividing the whole separation procedures that is described in previous report [2, 3] into several smaller separation programs, each of being dedicated to subset of metabolites such as sugar phosphates, nucleosides, nucleotides, basis nucleotides and organic acids and (ii) by combining for each separation, amperometry or conductimetry detection with UV detection using a photodiode array detector.

This new procedure thus requires a little more work but turns out to be more selective and reproducible.

Using AS11H chromatography column, with a NaOH gradient, we separated and quantify by conductimetry detection method 10 organic acids, including all acids of the TCA cycle with a sensitivity of mg/l.

AS11 column was used to successfully separate, quantify, as well as to verify their specific spectrum, 13 nucleotides and sugar nucleotides using a NaOH gradient. Quantification was achieved at 260 nm with a detection limit of  $\mu\text{M}$ .

On the other hand, 12 sugar phosphates from glycolytic and pentose phosphate pathway could be separated on a PA1 column with a specific acetate gradient and quantify by amperometric measurement, with a detection limit of  $\mu\text{M}$ . These procedures were then successfully applied for intracellular metabolite profile in *Saccharomyces cerevisiae* subjected to a glucose pulse.

These different procedures could be useful for further data analysis using IC / MS-MS technology.

#### *References*

- 1- Gonzalez,B., Francois,J., Renaud,M. (1997).*Yeast*,13, 1347-1356,1997
- 2- Groussac,E., Ortiz,M., Francois,J. (2000). *Enzyme Microbial Tech*, 26,715-723
- 3- Bhattacharya,M., Fuhrman, L., Ingram,A., Nickerson,K.W. and Conway, T. (1995).*Anal Biochem*, 232, 98-106,

*Session Poster-P13*

**METABOLOMICS ANALYSIS OF RAT URINE BEFORE AND AFTER ADMINISTRATION OF  
VINPOCETINE**

**Emmanuel Varesio<sup>1</sup>, Roland F. Staack<sup>1</sup>, Gérard Hopfgartner<sup>1</sup>, Hans H. Maurer<sup>2</sup>, Ron  
Bonner<sup>3</sup> and Lyle L. Burton<sup>3</sup>;**

*<sup>1</sup>University of Geneva, Geneva, Switzerland; <sup>2</sup>University of Saarland, Homburg, Germany; <sup>3</sup>MDS  
Sciex, 71 Four Valley Road, Concord, ON, L4K 4V8, Canada*

We describe a preliminary metabolomics investigation of the effect of vinpocetine on rats. The study is facilitated by a new software tool, MarkerView™, that imports, analyzes and visualizes data. We show that the tool can be used to study both endogenous and xenobiotic metabolites and illustrate the importance of thoroughly understanding the metabolic behavior of the target compound.

*Session Poster-P14*

**PATTERN RECOGNITION TOOLS FOR PROCESSING MULTIPLE MS AND LCMS DATA SETS.**

**Ron Bonner<sup>1</sup>, Lyle L. Burton<sup>1</sup>, Andrew Butler<sup>2</sup>, Richard P. Schneider<sup>2</sup> and Pauline J. Vollmerhaus<sup>1</sup>;**

*<sup>1</sup>MDS Sciex, 71 Four Valley Road, Concord, ON, L4K 4V8, Canada*

*<sup>2</sup>Pfizer Inc., Eastern Point Road, Groton, CT, 06340, USA*

We describe the application of a software tool that allows unsupervised and supervised analysis of MS, LCMS and quantitative data to an LC/MS metabonomics study of drug toxicity. The combination of statistical methods facilitates the organization of data into groups and identifies the variables responsible for most of the significant differences

## *Session Poster-P15*

### **- PRESENTATION DE LA PLATEFORME « POLYPHENOLS » R.I.O. - – U.M.R. SCIENCES POUR L’ŒNOLOGIE – INRA MONTPELLIER**

**G. Mazerolles , C. Le Guernevé, E. Meudec , C. Bouchut , H. Fulcrand , V. Cheynier**

*Plate forme de Recherches Polyphénols, UMR Sciences pour l’Oenologie, INRA, 2 Place Viala,  
34060 Montpellier.*

La plateforme Polyphénols R.I.O (Réunion Inter organismes) met à la disposition de la communauté scientifique des équipements et un soutien pour tout projet relatif à :

- l’analyse structurale des composés phénoliques
- l’étude de l’organisation des systèmes supra moléculaires impliquant les composés phénoliques seuls ou en interaction avec d’autres molécules (protéines, polysaccharides)
- la caractérisation rapide de la composition phénolique d’un grand nombre d’échantillons de végétaux (approche métabolome) ou produits dérivés des végétaux.

Cette plateforme comprend trois services : spectrométrie de masse, spectrométrie de résonance magnétique nucléaire et chimiométrie.

Ses compétences sont mises en œuvre dans le cadre de programme de recherches visant à acquérir des connaissances sur 1) la structure chimique des composés polyphénoliques des fruits et de leurs produits de transformation 2) les mécanismes réactionnels qui les génèrent dans la plante (métabolite) ou les produits transformés 3) les phénomènes physico-chimiques les impliquant 4) leur modulation par les procédés technologiques.

Les objectifs de ces travaux concernent l’établissement de profils polyphénoliques pour les relier à la qualité et à la typicité de la matière première et de ses produits de transformation. Ces composés jouent par exemple un rôle déterminant dans les caractéristiques sensorielles (couleur, goût) et la stabilité colloïdale du vin, soit directement, soit du fait de leurs interactions entre eux et avec les autres constituants du milieu.

**METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DU GLYCEROL PAR RMN <sup>13</sup>C QUANTITATIVE**

**Elsa Caytan et Gérard Remaud**

*LAIEM, Université de Nantes, [gerald.remaud@univ-nantes.fr](mailto:gerald.remaud@univ-nantes.fr)*

La détermination de la distribution isotopique dans la molécule de glycérol pourrait apporter de précieux renseignements sur l'étude de la fermentation des sucres. Les analyses isotopiques comme la RMN-FINS<sup>TM</sup> permettent de distinguer et d'authentifier des produits de différentes origines en fonction de leurs répartitions isotopiques intramoléculaires. Cependant, dans le cas du glycérol, la symétrie de la molécule ne permet pas de distinguer tous les sites en RMN, ce qui engendre une perte d'information. [1]

Nous proposons ici une stratégie mettant en jeu une fonctionnalisation de la molécule de glycérol en une molécule chirale. Lors d'une première approche, nous avons retenu la transformation du glycérol en  $\alpha$ -monobenzoate de glycérol (MBG) par une réaction d'estérification asymétrique catalysée par une lipase. La sélectivité de la lipase *Candida antarctica* permet la synthèse de l'énantiomère *R* avec un excès énantiomérique supérieur à 50 %.

Nous avons montré récemment que la RMN quantitative du <sup>13</sup>C peut atteindre une précision et une justesse suffisantes pour déterminer la distribution isotopique du <sup>13</sup>C dans une molécule en abondance naturelle. [2] En analysant le (*R*)-MBG par RMN <sup>13</sup>C quantitative, les déviations isotopiques spécifiques des trois carbones du glycérol ont été déterminées pour des échantillons de glycérol de différentes origines. Les premiers résultats montrent l'intérêt de la distinction entre les carbones 2 et 3, et montrent également que la répartition du <sup>13</sup>C au sein de la molécule de glycérol est très différente de la répartition statistique et semble liée à son origine.

[1] Zhang B-L. et al., Consistency of NMR and mass spectrometry determinations of natural-abundance site-specific carbon isotope ratios: the case of glycerol. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2301-2306.

[2] Tenailleau E., *Development of quantitative <sup>13</sup>C-NMR at natural abundance*. Thèse de doctorat de chimie, LAIEM, Université de Nantes, 2005.

**QUANTIFICATION DU RECYCLAGE DES HEXOSES-PHOSPHATES CHEZ *SINORHIZOBIUM MELILOTI***

**Isabelle Gosselin, Arnaud Brique, Jean-Noël Barbotin et Jean-Charles Portais**

*Unité Génie Enzymatique et Cellulaire URM-CNRS 6022, Université de Picardie Jules Verne,  
Faculté des Sciences, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens cedex*

Un recyclage des hexoses-phosphates a été mis en évidence chez *Sinorhizobium meliloti* en croissance sur glucose ou fructose comme seule source de carbone [1,2]. Ce recyclage implique la dégradation des hexoses-phosphates par la voie d'Entner-Doudoroff et celle des Pentoses-Phosphates et leur reformation par néoglucogenèse avant polymérisation en oligo- ou polysaccharides. Ce cycle a d'importantes répercussions métaboliques: perte d'atomes de carbone sous forme de CO<sub>2</sub> et une diminution de la synthèse d'ATP et de NADH [3] et son origine a été recherchée. Nos résultats actuels montrent que plus la demande anabolique en glucose-6-phosphate est forte et plus le recyclage des hexoses-phosphates est faible et il semblerait que ce recyclage pourrait représenter un moyen indirect de dissiper le carbone et l'énergie en excès lorsque les flux glycolytiques sont trop importants par rapport aux besoins cellulaires. Pour vérifier cette hypothèse, une quantification des flux métaboliques impliqués dans ce recyclage des hexoses-phosphates est envisagée afin de déterminer leur modulation en fonction des conditions environnementales.

[1] Portais *et al.*, Eur. J. Biochem., 1999, 265, 473

[2] Gosselin *et al.*, FEBS Lett., 2001, 499, 45

[3] Portais *et al.*, J. Biotechnol., 2000, 77, 49

*Session Poster-P18*

**POLE METABOLOME A L'IFR 103 BIOLOGIE VEGETALE INTEGRATIVE DE BORDEAUX**

**C. Deborde<sup>1</sup>, C. Cabasson<sup>1</sup>, M. Maucourt<sup>1</sup>, C. Renaud<sup>1</sup>, M. Gaudillère<sup>1</sup>, M. Dieuaide-Noubhani<sup>1</sup>, D. Jacob<sup>2</sup>, H. Ferry-Dumazet<sup>2</sup>, A. Barré<sup>2</sup>, A. de Daruvar<sup>2</sup>, D. Rolin<sup>1</sup>, A. Moing<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>*UMR Physiologie et Biotechnologie Végétales, INRA - Universités Bordeaux 1 - Bordeaux 2, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex.* <sup>2</sup>*Centre de Bioinformatique de Bordeaux. Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux*

Le pôle Métabolome de l'IFR Biologie Végétale Intégrative (IFR 103) sert de support à des recherches principalement en génomique fonctionnelle et génétique végétale : de la plante à la qualité du fruit charnu, et à l'étude des relations hôte-pathogène. ([http://www.bordeaux.inra.fr/umr619/page\\_PF\\_metabolome.htm](http://www.bordeaux.inra.fr/umr619/page_PF_metabolome.htm))

Les études Métabolome reposent principalement sur l'établissement de profils métaboliques de composés polaires et non polaires par <sup>1</sup>H RMN sur extraits (Moing et al. 2004). En conditions RMN quantitative, trente à quarante métabolites individuels (sucres solubles, acides organiques et aminés, et d'autres métabolites majeurs) peuvent être quantifiés sur un extrait polaire de fruit de tomate. En condition d'acquisition haut débit, l'analyse chimiométrique des signatures spectrales permet de mettre en évidence les ressemblances-différences entre échantillons et les régions spectrales à l'origine de ces ressemblances-différences. La gestion et le data-mining des profils et des signatures métaboliques sont réalisés dans le cadre d'une étroite collaboration avec le CBiB. Les aspects dynamiques du métabolisme sont étudiés par une approche fluxomique et la quantification des flux métaboliques.

Ces approches et outils sont utilisés pour des projets de recherche de l'IFR 103, dans le cadre de collaborations locales (Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux), nationales (Génoplante, Projet Générique MétaboP "Plant metabolome for genetic resource analysis, mutant and transformant screening and quantitative trait loci determination". 2005-2006) et européennes (IP ISAFRUIT "Increasing Fruit consumption through a trans disciplinary approach leading to high quality produce from environmentally safe, sustainable methods" 2005-2008, STREP METAPHOR "Metabolomics for Plants, Health and OutReach" soumis en septembre 2005).

[1] Moing et al. Quantitative metabolic profiling by 1-dimensional <sup>1</sup>H-NMR analyses: application to plant genetics and functional genomics. *Funct.Plant Biol.* 2004, 31: 889-902

*Session Poster-P19*

**METABOLIC FINGERPRINTINGS OF GRAPE BERRIES FROM DIFFERENT VINTAGES, TERROIRS AND CULTIVARS BY MEANS OF <sup>1</sup>H NMR AND CHEMOMETRICS**

**G.E. Pereira<sup>1,2</sup>, J.-P. Gaudillère<sup>1</sup>, C. van Leeuwen<sup>1</sup>, G. Hilbert<sup>1</sup>, M. Maucourt<sup>3</sup>, C. Deborde<sup>3</sup>, A. Moing<sup>3</sup>, D. Rolin<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>UMR Œnologie-Ampélogie, INRA-ECAV, <sup>2</sup>Present address: Embrapa Semi-Arido, BR 428, Km152, CP 23, CEP 56302-970, Petrolina, PE –Brasil, <sup>3</sup>UMR Biotechnologie et Physiologie Végétales, INRA-Université Bordeaux 1-Bordeaux 2, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex

Grape berry quality at harvest depends strongly on vintage, soil type, cultivar and cultural practices. These factors play a role on metabolic composition of the grape berries, influencing the sugar, acidity, nitrogen and phenolic compound balance [1]. The knowledge of grape berry composition is crucial for the winemaking process. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy is a useful tool to determine metabolite fingerprints of plant extracts ([2], [3], [4]) in a complex mixture, without a previous knowledge of the samples. The aim of this work was to develop untargeted profiling methods to describe grape berry skin composition through metabolite fingerprints. We applied chemometrics on 1D <sup>1</sup>H NMR data to characterize grape berry samples harvested in Bordeaux-France. Three red cultivars (Merlot Noir, Cabernet Sauvignon and Cabernet Franc), 3 soil types on 3 vintages were chosen to study the predominant effects, among soil type, cultivar and vintage factors, on grape composition and quality. The results are presented on this poster. The same approach can be used to study the effect of cluster microclimate on berry composition.

[1] van Leeuwen C. *et al.*, Am. J. Enol. Vitic., 2004, 55, 207-217

[2] Moing A. *et al.*, 2004. *Funct. Plant Biol.*, 2004, 31, 889-902

[3] Krishnan P. *et al.*, 2005. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56, 255-265

[4] Pereira G.E. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 6382-6389

**METABOLIC PROFILING FOR THE SCREENING OF BABY URINE SAMPLES**

**Yann Hébert<sup>1</sup> ; Birgit Schneider<sup>2</sup>; Gabriela Zurek<sup>2</sup>; Carsten Baessmann<sup>2</sup>; Hartmut Schaefer<sup>3</sup>;  
Markus Godejohann<sup>3</sup>; Silke Keller<sup>3</sup>; Manfred Spraul<sup>3</sup>; Gerhard Fusch<sup>4</sup>; Matthias Nauck<sup>4</sup>;  
Christoph Fusch<sup>4</sup>**

*<sup>1</sup> Bruker Daltonique, 67160 Wissembourg, France; <sup>2</sup> Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, Germany; <sup>3</sup> Bruker BioSpin GmbH, 76287 Rheinstetten, Germany; <sup>4</sup> Universitätsklinikum Greifswald, 17487 Greifswald, Germany*

Inborn errors of metabolism receive much attention due to their clinical relevance, but they also represent a versatile system to demonstrate the benefits of metabolic profiling. Known genetic modifications and their effects on the metabolism have been well described for various diseases and targeted screening approaches (chemical tests, bloodspot screening, GC-MS) have been developed. However, these screenings only detect the known and expected species. Limits arise for those cases in which a disease has not been explicitly screened for or the dose of a drug is perturbing metabolism and the drug itself is not detected. A metabolic profiling system based on LC-MS and NMR has been developed and applied to child urine samples. These results clearly show the strength of combining NMR and LC-MS for the analysis of urine samples and the identification of unknowns.

**METABOLIC PROFILING OF FRUIT TISSUES DURING TOMATO DEVELOPMENT**

**F. Mounet, M. Lemaire-Chamley, M. Maucourt, C. Deborde, C. Rothan, D. Rolin, A. Moing**

*UMR Physiologie et Biotechnologie Végétales, INRA - Universités Bordeaux 1 - Victor Ségalen  
Bordeaux 2, IBVI, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex*

Tomato fruit is a complex organ composed of heterogeneous tissues that develop from ovary tissues after ovule fertilization. The carpel wall (pericarp) encloses the locular cavity containing the seeds attached to a central parenchymatous axis or columella. After successful fertilization of the ovules, the peripheral part of the columella, or placental tissue, develops into a tissue that will fill the locular cavity (locular tissue or gel). During the early stages of expansion phase, the outer pericarp cell layers continue to divide and are thus constituted of small cells. The inner pericarp and locular tissue cells undergo a large expansion. The locular tissue cells acquire a jelly-like appearance in the ripening fruit. Up to now, most of the studies were devoted to the whole fruit or the entire pericarp. In order to investigate the role of each fruit tissue, we initiated a metabolome study based on proton NMR and HPLC analyses along fruit development.

Fruits of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) cv. Ailsa Craig were harvested at 6 stages of fruit development from division phase to red ripe fruit. The different fruit tissues (exocarp, pericarp, placenta + columella, locular tissue and seeds) were separated and metabolites were extracted and analysed using <sup>1</sup>H NMR [1]. About 30 metabolites were detected in all tissues and stages of development, comprising 6 sugars, 13 amino acids, 5 organic acids, one phenolic compound, one quaternary amine and 6 unknown compounds. Starch was quantified using enzymatic analysis. Multivariate analyses such as principal component analysis (PCA) were used to describe the global metabolite variability between tissues and stages of development and to point to marker metabolites. The polar metabolite profiling data will be completed with NMR analysis of apolar extracts and with HPLC analysis of isoprenoids. The metabolome data will be interpreted, using Artificial Neural Network analyses in parallel with PCA, and in relation with transcriptome and cytology data.

[1] Moing et al. *Funct. Plant Biol.* (2004) 31: 889-902