

# Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique

[http://www.bordeaux.inra.fr/ifr103/reseau\\_metabolome/accueil.htm](http://www.bordeaux.inra.fr/ifr103/reseau_metabolome/accueil.htm)

## Troisièmes Journées Scientifiques 7-8 Février 2008

### Génomique Fonctionnelle Bordeaux (GFB) Université Bordeaux 2 Bordeaux

#### Comité scientifique

Catherine Deborde	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Anne-Marie Delort	UMR 6504 SEESIB - Aubière
Annick Moing	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Jean-Charles Portais	LISBP INSA - Toulouse
Dominique Rolin	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux

#### Comité d'organisation

Stéphane Bernillon	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Cécile Cabasson	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Catherine Deborde	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Hélène Ferry-Dumazet	CBiB - GFB - Bordeaux
Muriel Gauthier	Documentation, IFR103 INRA - Bordeaux
Alain Girard	Communication INRA - Bordeaux
Florence Lartigaut	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Marie-Lou Lombard	IFR103 INRA - Bordeaux
Annick Moing	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Christel Renaud	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux
Dominique Rolin	UMR619 Biologie du Fruit INRA - Bordeaux

## Partenaires des Troisièmes Journées Scientifiques



**Institut national de la recherche agronomique**  
Centre de Bordeaux-Aquitaine  
Umr 619 Biologie du Fruit  
BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex

Site web: <http://www.bordeaux.inra.fr/umr619/>

**IFR 103**

*Biologie Végétale Intégrative*

**Institut fédératif de recherche 103**  
BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex

Site web: <http://www.bordeaux.inra.fr/ifr103/>



**CNRS - Fédération de Chimie**  
FR2404  
24 avenue des Landais, Chimie 6  
63177 Aubière cedex

Site web: <http://www.cnrs.fr/chimie/laboratoires/dr7.php>



**Génomique Fonctionnelle Bordeaux-Aquitaine**  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146, rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux

Site web: <http://www.pgfb.u-bordeaux2.fr>



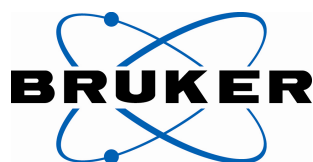
**Université Bordeaux 2**  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Site web: <http://www.u-bordeaux2.fr/>



**META-PHOR** program (Consortium)  
Metabolomics for Plants, Health and Out Reach

Site web: <http://www.meta-phor.eu/index.php>



**Bruker BioSpin S.A.**  
Tel. +33-3-88736800  
contact e-mail : [bruker@bruker.fr](mailto:bruker@bruker.fr)

Site web: <http://www.bruker.com/>



**Dionex S.A.**  
164-166 avenue Joseph Kessel  
78960 Voisins Le Bretonneux  
contact e-mail: [info@dionex.fr](mailto:info@dionex.fr)

Site web: <http://www1.dionex.com/en-us/index.html>



**WATERS SAS.**  
78280 - Guyancourt

Site web: <http://www.waters.com>

# Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique

3<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques - 7 & 8 février 2008

Génomique Fonctionnelle Bordeaux

## Programme

**Jeudi 7 février 2008**

8h30 –9h00 *Accueil des participants*

9h00 –9h20 **Introduction aux Journées.** Anne-Marie Delort, Jean-Charles Portais, Dominique Rolin du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique  
**Allocution de Bienvenue.** Antoine de Daruvar, CBI B GFB

**9h20 –11h05** **Session 1 « Développements technologiques au service de l'homme, la santé et l'alimentation »**

**Chairman : Jean-Charles Portais, Toulouse, France**

9h25 –9h45 **Nouvelles approches métabonomiques en nutrition : Intérêts et contraintes de la spectrométrie de masse.**  
Estelle Pujos, Clermont-Ferrand, France

9h50 –10h10 **Métabolomique de la réponse à un agent chimiothérapeutique dans un modèle de mélanome. Mise en évidence de mécanismes d'efficacité thérapeutique et d'adaptation au traitement.**  
Daniel Morvan, Clermont-Ferrand, France.

10h15 –10h35 **NMR-based metabonomics in epidemiological studies and disease screening.**  
Manfred Spraul, Rheinstetten, Allemagne

10h40 –11h00 **Waters small molecule profiling systems.**  
Emma Marsden-Edwards, Manchester, Royaume-Uni

11h05 –11h30 *PAUSE*

**11h30 –13h15 Session 2 « Base de données - Outils informatiques »**

**Chairmen : Antoine de Daruvar et Daniel Jacob, Bordeaux, France**

11h30 –11h50 **TIM, une interface de saisie pour les données du métabolisme.**  
Nicolas Parisey, Bordeaux, France

11h55 –12h15 **Getting relevant chemical and biological information from metabolomics data.**  
Marianne Defernez, Norwich, Royaume-Uni

12h20 –12h40 **Organisation et identification des signaux issus d'approches métabonomiques par spectrométrie de masse.**  
Erwan Werner, Gif sur Yvette, France.

12h45 –13h05 **Inférence et analyse de réseaux métaboliques à partir de données métabolomiques obtenues en masse haute résolution. Application à *Trypanosoma Brucei*.**  
Fabien Jourdan, Toulouse, France.

13h15 –14h30 Repas Restaurant Universitaire Le Mascaret

**14h30 –14h40 Session Flash - Poster**

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

14h30 **Analyse par RMN <sup>1</sup>H des lipides du myocarde de souris surexprimant l'apolipoprotéine O.**  
Franck Desmoulin, Toulouse, France

14h35 **Profils et empreintes métaboliques par RMN du proton pour évaluer les modifications attendues et inattendues de la composition de tomates transgéniques.**  
Cécile Cabasson, Bordeaux, France

14h40 **Développement et application d'une approche métabolomique par LC-ESI-LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup> pour l'étude de troubles de la reproduction chez l'homme liés à une exposition aux perturbateurs endocriniens.**  
Frédérique Courant, Nantes, France

**14h45 –15h35 Session Base de données - Outils informatiques (Suite)**

**Chairmen : Antoine de Daruvar et Daniel Jacob, Bordeaux, France**

**14h45 -15h05 Mise à disposition d'un système bioinformatique de gestion des données de métabolomique issues de plantes : MetaboDB.**  
Hélène Ferry-Dumazet, Bordeaux, France

**15h10 -15h30 Métabolomique et Biologie Systémique: à la recherche d'effets transgénomiques.**  
Marc-Emmanuel Dumas, Lyon, France

**15h35 -17h20 Session Table Ronde et Posters**

**15h35 -16h20 Table Ronde « Bases de données et Partage de données Métabolomiques: objectifs et besoins de la communauté concernant le partage des données métabolomiques. »**

**16h20 -17h20 PAUSE et Session Posters - Echanges informels**

**17h20-18h15 Session Fluxomique et Réseaux Métaboliques**

**Chairwoman : Anne-Marie Delort, Clermont-Ferrand, France**

**17h25 –17h45 NMR-based fluxomics : Quantitative 2D-NMR Methods for Isotopomer Analysis.**  
Stéphane Massou, Toulouse

**17h50 -18h10 Tracking drug interactions with yeast metabolism by metabolomics and fluxomics.**  
Stéphanie Heux, Zurich, Suisse.

**18h15 –19h30 Assemblée Générale du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique**

**20h15 Dîner Hôtel Alton**

## Vendredi 8 février 2008

### 9h00 –10h35 Session Plantes

Chairwoman Annick Moing, Bordeaux, France

- 9h05 –9h35 **What about "Plant metabolomics" - a focal point of European research".**  
Robert Hall, Wageningen, Pays-Bas
- 9h40 –10h00 **Metabolome adjustments induced by osmotic stress in the extremophile *Thellungiella halophila*, an Arabidopsis relative species.**  
Raphaël Lugan, Rennes, France.
- 10h05 –10h25 **Integration of cytological, metabolome and transcriptome data in relation with the acquisition of the fleshy trait in tomato pericarp and locular tissue.**  
Fabien Mounet, Bordeaux, France.

### 10h30 –11h00 Session Flash -Poster (suite)

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

- 10h30 **Mise en place d'une approche de fluxomique dans le fruit de tomate.**  
Raphaël Henri, Bordeaux, France
- 10h35 **Métabolisme énergétique des trypanosomes.**  
Frédéric Bringaud, Bordeaux, France
- 10h40 **Mise au point d'une méthode analytique sur des échantillons de plasma, en vue d'une étude métabonomique.**  
Hélène Pereira, Clermont-Ferrand, France
- 10h45 **Etudes métabolomique et lipidomique de lignées cellulaires de glioblastomes: mise en évidence d'un indice métabolique de radiorésistance.**  
Denis Desoubzdanne, Toulouse, France
- 10h50 **Plant Cuticle Analysis Using GC-MS techniques.**  
Frédéric Domergue, Bordeaux, France
- 10h55 **Mise en évidence de l'administration d'hormone de croissance équine par approche métabolomique LC-ESI-HRMS. Application au contrôle anti-dopage.**  
Fanny Kieken, Nantes, France.

**11h -12h00** **PAUSE** et **Session Posters - Echanges informels**

**12h00 -12h50** **Session 5 « Biotechnologie et environnement »**  
**Chairman : Dominique Rolin, Bordeaux, France**

**12h00 –12h20** **NMR study of plant fibre degradation by *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes*.**  
Anne-Marie Delort, Clermont-Ferrand, France

**12h25 -12h45** **Etude par RMN <sup>31</sup>P *in vivo* de cellules de *Rhodococcus Rhodochrous* en présence du 2-aminobenzothiazole, de fer et de lumière.**  
Charlène Choraou, Clermont-Ferrand, France

**13h00 –14h30** Repas Restaurant Universitaire Le Mascaret

**14h30 –15h40** **Session 6 « Modélisation »**  
**Chairman : Jean-Charles Portais, Toulouse, France**

**14h30 –14h50** **« La Calculette Métabolique » : un modèle biochimique simple pour étudier le métabolisme énergétique des mammifères – Exemple sur le métabolisme de la mamelle.**  
Sophie Lemosquet, Saint-Gilles, France.

**14h55 –15h15** **Principes de l'analyse modulaire du contrôle et de la régulation et application à la bioénergétique cardiaque *in situ*.**  
Philippe Diolez, Bordeaux, France

**15h20 –15h40** **Une modélisation multi-niveaux du métabolisme énergétique mitochondrial.**  
Jean-Pierre Mazat, Bordeaux, France

**15h45 -16h00** Clôture des Journées

## **Résumés**



## *Communications Orales*

### **Session 1 « Développements technologiques au service de l'homme, la santé et l'alimentation »**

#### *Session 1 - 01*

### **Nouvelles approches métabonomiques en nutrition : Intérêts et contraintes de la spectrométrie de masse**

**Estelle Pujos-Guillot**

*Plateforme Métabolisme et Spectrométrie de Masse, UMR 1019-Unité de Nutrition Humaine, INRA, Centre de Recherche de Clermont Ferrand/Theix, 63122 Saint Genès-Champanelle*

L'objectif des recherches clermontoises en Nutrition Humaine est d'améliorer la Nutrition de l'homme, notamment au cours du vieillissement. Il s'agit de ralentir le développement de pathologies liées au vieillissement telles que la sarcopénie, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II ou le cancer. Pour cela, il est important de bien connaître les mécanismes d'action des nutriments (aussi bien macronutriments comme les acides aminés que micronutriments comme les polyphénols). Les travaux réalisés considèrent de plus en plus les nutriments comme des régulateurs de fonctions métaboliques et pas uniquement comme des substrats entrant dans les voies métaboliques.

La plateforme « Métabolisme et Spectrométrie de Masse » développe l'utilisation de l'outil métabonomique dans le champ de la nutrition. Il permet d'aborder les problèmes de biocomplexité en décrivant de façon globale les métabolites générés ou modifiés dans certaines conditions nutritionnelles.

La spectrométrie de masse, notamment par sa sensibilité et son « universalité » offre d'importantes possibilités dans la caractérisation du métabolome. Cependant ces approches globales nécessitent une évolution méthodologique, tant au niveau de l'optimisation de la préparation d'échantillons et de l'analyse, qu'au niveau de leurs validations. Par exemple, comment envisager le développement d'une méthode d'analyse du métabolome dans des matrices biologiques complexes (plasma, tissus), ou comment évaluer et contrôler les principales sources de variabilité analytique ?

De plus, les signaux acquis par ces techniques sont porteurs d'une information très riche qui demande, en vue d'une exploitation performante, d'acquérir un savoir faire poussé dans les domaines du traitement du signal (déconvolution spectrale, bases de données).

Cette présentation décrira, à partir d'exemples concrets, les possibilités et problèmes soulevés par l'utilisation de l'HPLC / (ESI) QToF en métabonomique dans le champ de la nutrition.

## *Session 1 - O2*

### **Métabolomique de la réponse à un agent chimiothérapeutique dans un modèle de mélanome. Mise en évidence de mécanismes d'efficacité thérapeutique et d'adaptation au traitement.**

**Demidem A, Stepien G, Rio P, Morvan D.**

*UMR484 INSERM, INRA et CRLCC Jean Perrin, F63000 Clermont-Ferrand*

Le mélanome est une tumeur particulièrement agressive, à fort potentiel métastatique et résistante aux agents anticancéreux [1]. Les mécanismes moléculaires et métaboliques de cette résistance sont mal connus. Nous avons mis à profit de récents travaux de notre groupe en métabolomique basée sur la spectroscopie RMN du proton [2] pour explorer les voies métaboliques de la réponse à une chimiothérapie anti-mélanome. Le modèle était un mélanome B16 murin se développant en quelques dizaines de jours après inoculation sous-cutanée de  $5 \times 10^5$  cellules. Les tumeurs ont été traitées par la fotémustine, une chloroéthylnitrosourée utilisée dans le traitement du mélanome humain et administrée à des doses cliniques. Les tumeurs ont été prélevées en phase de prolifération pour les tumeurs contrôles, en phases d'inhibition et de reprise de prolifération, après échappement à l'agent anticancéreux, pour les tumeurs traitées. Notre analyse métabolomique basée sur la spectroscopie RMN 2D du proton (« total correlation spectroscopy ») nous permet d'identifier une trentaine de métabolites et de réaliser une analyse différentielle de leurs concentrations entre les deux phases du groupe traité et le groupe contrôle. Nous montrons que la phase d'inhibition de prolifération est associée à une forte activité métabolique et que l'efficacité thérapeutique se traduit par une inhibition de la glycolyse et de la synthèse de nucléotides, mise en évidence par l'accumulation de glucose ( $p < 0.05$ ), d'aspartate ( $p < 0.001$ ), de glutamine ( $p < 0.001$ ). S'y associent une accumulation de phosphatidylcholine ( $p < 0.01$ ) fortement hydrolysée avec des taux élevés de glycérophosphocholine ( $p < 0.001$ ) et une diminution marquée du succinate ( $p < 0.001$ ) suggérant une réactivation du cycle de Krebs et des phosphorylations oxydatives mitochondriales. En phase de reprise de prolifération, le métabolome des tumeurs traitées se caractérise par une accumulation d'acides gras et une diminution du glutathion ( $p < 0.05$ ), suggérant l'acquisition par la tumeur d'un certain degré de différenciation à l'origine d'une baisse de sensibilité à la fotémustine.

[1] Kleeberg UR et al. *Melanoma Res* 2004, 5: 195-200.

[2] Morvan D, Demidem A. *Cancer Res.* 2007, 67 :2150-9.

## *Session 1 - 03*

### **NMR-based Metabonomics in Epidemiological studies and disease screening**

**M.Spraul, H.Schäfer and B.Schütz**

*Bruker BioSpin GmbH Silberstreifen D-76287 Rheinstetten Germany*

NMR is a very important analytical Tool for metabolic fingerprinting and profiling. Its main advantages are quantitative results, robustness, high throughput under full automation and low cost per sample as well as structural information. Being used in statistical applications creates the need for lowest system internal variance. This can be achieved by extensive control of temperature, creating flat baseline and error-free phase correction to just name a few parameters. Besides the NMR experiment itself, the sample preparation and transfer to the instrument has to be integrated. Having the achieved the quality level needed, large studies can be addressed. The integration of epidemiological metadata with the NMR spectra allows to investigate multiple parameters and their influence to the NMR spectra of body fluids.

Several parameter influences are discussed like the aging process, body mass index reflexion into urine. An updated scheme to screen newborns for inborn errors of metabolism is presented, that also acts as a general disease filter and can check retardation in development.

Lipoprotein Subclass analysis by NMR is introduced and the advantage of ultrahighfield NMR demonstrated.

## *Session 1 - 04*

### **Waters Small Molecule Profiling Systems**

**Emma Marsden-Edwards**

*Waters Corporation, Atlas Park, Manchester M22 5PP, UK*

The profiling of small molecules in complex background matrices (biological, food or chemical) can be a challenging and time consuming task. The rapid detection of as many target analytes in the matrix, with as high a degree of sensitivity and resolution as possible, is critical. Of equal importance is the need to be able to easily process and interpret the large amounts of data generated, converting the raw LC-MS data into meaningful information.

In this presentation we will describe work that we have undertaken, investigating the capabilities of a Waters Synapt HDMS system, a hybrid quadrupole/Travelling Wave IMS/ oa-TOF mass spectrometer, coupled with a Waters ACQUITY UPLC system, a high resolution liquid chromatography system, for metabolite identification. In addition to the orthogonal separation afforded by ion mobility, this instrument enables fragmentation both pre-IMS and post-IMS separation, which can be used in a selective fashion to provide structural information upon the metabolite molecules under investigation.

Using several examples taken from biological studies, we will demonstrate the advantages offered from the most recent improvements to the Waters small molecule profiling solution, which now includes UPLC/MS, UPLC/HDMS or GC/MS platforms, with specialized MassLynx data handling tools. The MarkerLynx, application manager which compares and discriminates data sets using multivariate statistics has direct integration to Unimetrics' SIMCA-P. It facilitates the identification of exact mass retention time pairs (EMRTs) and enables them to be easily recorded within the MarkerLynx results table(s). Elemental formulas of the EMRTs can now be automatically calculated using iFit, with the ability to search local or online databases (based on exact mass or elemental composition) such as Kegg and ChemSpider. This reduces the time taken to positively identify EMRTs and helps improve the metabolomic workflow. Confirmation of the database hits can subsequently be achieved by evaluating the fragment ion data with MassFragment software.

## Session 2 « Base de données - Outils informatiques »

### Session 2 - 05

#### **TIM, une interface de saisie pour les données du métabolisme.**

**Nicolas Parisey<sup>1</sup>, Florent Collot<sup>1</sup>, Raphaël Henri<sup>2</sup>, Bertrand Beauvoit<sup>2</sup>, Martine Dieuaide-Noubhani<sup>2</sup>, Dominique Rolin<sup>2</sup>, Sophie Colombié<sup>2</sup>, M. Beurton-Aimar <sup>\*1</sup>**

*\* 1, LaBRI, Université Bordeaux1, 351, cours de la Libération 33405 Talence Cedex*

*E-mail : beurton@labri.fr Tel (+33) 5 57 57 46 29*

*\* 2, UMR 619 - Biologie du Fruit (UMR 619) INRA, BP 81. 71 Avenue Edouard Bourleaux. 33140 VILLENAVE D'ORNON. Tél : +33 (0) 5 57 12 25 77*

Dans le cadre du projet ANR TomatoFlux, nous cherchons à modéliser le réseau métabolique du métabolisme carboné du fruit de tomate, organisme modèle, à partir de données issues d'expériences de marquage de carbone (C13 et C14) analysées par spectrométrie (RMN principalement). Afin de capitaliser les informations de la littérature et d'exploiter au mieux les données expérimentales produites, nous avons mis en place une base de données dédiée à ce métabolisme du fruit de tomate. Cette base est construite grâce à la plateforme PathwayTools qui permet de réaliser des bases de données spécifiques du métabolisme sur le modèle de MetaCyc en mettant à disposition une interface de création/modification de base de données. Toutefois, pour la modélisation de flux métaboliques de la tomate basée sur des expériences de marquage, des informations spécifiques initialement non prévues dans MetaCyc, sont nécessaires. Citons par exemple, la compartimentation des réactions ou voies métaboliques avec les réactions d'échange entre compartiment et la visualisation du devenir des atomes de carbones pour chaque réaction. Nous avons donc choisi de développer une base TomaCyc qui respecte majoritairement le format de l'ensemble des bases gérées par PathwayTools et nous avons adjoint à cette base un complément qui stocke les informations supplémentaires. Comme l'interface PathwayTools n'est pas disponible sur la forme de page web, nous avons également développé un éditeur qui nous permette de saisir ou de modifier les informations contenues dans TomaCyc. TIM -Tools to Input Metabolim data- permet ainsi de créer ou de modifier des "pathways" de TomaCyc et de consulter et modifier les informations sur les enzymes et les réactions enzymatiques. A l'heure actuelle, TomaCyc contient des pathways ou voies métaboliques importées depuis AraCyc (<http://www.arabidopsis.org/biocyc/index.jsp>) puis modifiées pour correspondre aux connaissances de l'équipe sur le fruit de tomate. Ces voies impliquent plus de 200 réactions et enzymes qui sont également contenues dans la base. TIM fournit aussi un ensemble de routines qui permettent de générer des fichiers au format d'outils de calcul de flux tel que C13Flux (<http://www.uni-siegen.de/fb11/simtec/software/13cflux/>). L'utilisation conjointe de PathwayTools et de TIM permet donc de bénéficier à la fois des traitements disponibles sur la plateformes BioCyc (génération de réseaux, vérification de la cohérence...) et aussi de spécifier de nouvelles données et automatiser la production de fichiers pour le calcul de flux métaboliques.

## Session 2 - 06

### Getting relevant chemical and biological information from metabolomics data

**Marianne Defernez**<sup>\*1</sup>, **Stephane Bernillon**<sup>2,3</sup>, **Ian J. Colquhoun**<sup>1</sup>, **Gwenaelle LeGall**<sup>1</sup>, **E. Katherine Kemsley**<sup>1</sup>, **Annick Moing**<sup>2</sup>, **Fabien Mounet**<sup>2</sup>, **Henri S. Tapp**<sup>1</sup>

\* marianne.defernez@bbsrc.ac.uk, Tel: +44 (0) 1603 255316

<sup>1</sup>*Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK*

<sup>2</sup>*UMR 619 Biologie du Fruit, <sup>3</sup>Plateforme Métabolome-Fluxome de GFB, IFR 103, INRA – Université Bordeaux 1 - Université V. Segalen Bordeaux 2 - BP 81 – F-33140 Villenave d'Ornon.*

Metabolomics studies often involve the comparison of samples for which non-targeted analytical data is recorded as part of a large series of measurements. The raw data can be associated both with bias introduced by instrumental or chemical phenomena, and difficulties in extracting the information that is relevant to the biological problem under study. This talk will highlight some of the issues that we have encountered through our work in plant and human metabolomics, and describe tools or approaches that have been found to be suitable.

One issue is that of ‘data registration’. Multivariate approaches (e.g. principal component analysis) give a global view of the data and are thus very popular. However they rely on being able to represent the data in a matrix, where each row corresponds to a sample and each column to a given variable or measurement. We show that judicious pre-processing of the data can have a beneficial effect in cases when this assumption, and the subsequent model interpretation, is invalid; we focus here on NMR data where shifts in peak position of the signals occur for some compounds or in certain types of samples.

Another challenge for interpreting biological phenomena is linked with data abundance; it is not unusual, particularly with LC-MS, for the data analyses to highlight numerous variables as being linked to the phenomenon under study. We are developing graphical tools to assist the meaningful interpretation of these outcomes in terms of chemistry and biology. In addition we are also exploring the usefulness of less commonly employed mathematical tools (e.g. genetic algorithms), and developing statistically robust approaches to their use.

## Session 2 - 07

### Organisation et identification des signaux issus d'approches métabonomiques par spectrométrie de masse.

**Erwan Werner<sup>1</sup>, Eric Ezan<sup>1</sup>, Jean-Claude Tabet<sup>2</sup>, Pierre Chaminade<sup>3</sup>, Christophe Junot<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, iBiTec-S/SPI, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex.*

<sup>2</sup> *Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, UMR 7613-CNRS, Université Paris 6, 4 place Jussieu 75252 Paris cedex 5.*

<sup>3</sup> *Groupe de chimie analytique de Paris Sud, E.A. 4041, Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Université Paris XI, 5 rue J.B Clément, 92296 Chatenay-Malabry Cedex.*

La chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est aujourd'hui devenue une technique de référence en analyse métabonomique [1, 2]. Cependant, malgré les récentes avancées technologiques telle que l'ultra-haute résolution qui permet la mesure de masses précises et facilite donc l'accès aux formules brutes des composés détectés, l'organisation et l'identification de ces derniers restent une gageure.

Ainsi, la diversité des espèces chimiques composant le métabolome et l'absence de base de données de métabolites endogènes exhaustives - dont le besoin se fait de plus en plus ressentir - requièrent le développement de nouveaux outils de visualisation, d'organisation, et d'identification des signaux générés en LC-MS.

A cette fin, nous proposons l'exploitation combinée des indices de Kendrick [3] et de la modélisation de la rétention des composés sur colonne de silice greffée octadecyl.

En effet, les indices de Kendrick permettent dans un premier temps de visualiser et d'organiser les données en regroupant les composés par familles chimiques dont chaque membre ne diffère que par son nombre de groupement méthylène. Héritée de la pétroléomique, la limitation majeure de cette méthode tient en son incapacité à discriminer les composés ayant la même formule brute mais pouvant présenter une isomérisation de fonction. Il est ainsi courant d'observer plusieurs pics chromatographiques correspondant à une même masse, aussi exacte soit elle.

L'exploitation des modèles de rétention sur phase C<sub>18</sub> liés à la sélectivité méthylène de ce type de phase [4] permet alors de différencier les familles composés qui étaient précédemment confondues avec les indices de Kendrick.

L'application de cette stratégie à des données biologiques obtenues par approche métabonomique (HPLC-LTQ Orbitrap) ouvre de nouvelles perspectives en termes d'identifications de composés, de ciblage de familles chimiques d'intérêt, et de construction de base de données, qui restent des facteurs limitant à l'expansion des approches métabonomiques globales.

[1] Idborg et al., Anal. Chem., 2003

[2] Lafaye et al., RCM., 2003

[3] Hughey et al., Anal. Chem., 2001

[4] Gaudin et al., J. Chrom. A, 2002.

**Mots-clés :** Métabonomique, HPLC-HRMS, Indices de Kendricks, Sélectivité méthylène

## Session 2 - 08

### **Inférence et analyse de réseaux métaboliques à partir de données métabolomiques obtenues en masse haute résolution. Application à *Trypanosoma Brucei*.**

**Fabien Jourdan\***

\* [fjourdan@toulouse.inra.fr](mailto:fjourdan@toulouse.inra.fr).

UMR1089 Xénobiotiques INRA-ENVT, 180 chemin de Tournefeuille, St-Martin-du-Touch BP 3  
31931 TOULOUSE CEDEX.

La spectrométrie de masse haute résolution (FT-ICR, Orbitrap) permet d'obtenir des informations plus précises sur la nature des métabolites contenus dans un échantillon. En effet les travaux de Breitling et al [1] ont montré qu'avec une précision inférieure ou égale à 2 PPM la formule d'un métabolite peut être inférée de manière quasi certaine. Partant de ce type de données nous développons des outils permettant de mettre en relation les métabolites. En particulier nous avons développé deux approches pour reconstruire des réseaux de métabolites.

La première approche est une implémentation de la méthode proposée par Breitling et al [2]. Celle-ci est basée sur la différence entre chaque paire de masses du jeu de données. Cette différence est alors confrontée à une base de données de transformations potentielles. Si cette différence correspond à une transformation alors un lien est défini entre les deux métabolites. Par exemple si la différence correspond au poids moléculaire d'une molécule d'eau alors un lien modélisant l'ajout/suppression d'une molécule d'eau reliera les deux métabolites. Cette méthode dite *ab initio* permet de reconstruire un réseau de transformations potentielles à partir 1) d'une liste de masses obtenues en haute résolution et 2) d'une liste de transformations.

La masse haute résolution permet d'associer aux masses des données quantitatives (taille de l'aire sous les pics). A partir de cette information et quand les analyses métabolomiques ont été réalisées dans le cadre d'une perturbation du métabolisme, nous proposons d'utiliser la reconstruction du réseau par la méthode des corrélations [3]. Avec cette approche deux métabolites ayant des données quantitatives similaires dans les différentes conditions seront reliés.

Les deux approches modélisent différentes informations métaboliques. Nous proposons donc également la construction de réseaux unissant ces deux types de résultats.

Nous avons implémenté ces méthodes dans un « plugin » du logiciel de visualisation et d'analyse de réseaux métaboliques Cytoscape [4]. Ce plugin, appelé Metanetter [5], permet en outre le calcul et la visualisation de métriques structurelles sur le réseau telles que le degré, l'indice de clustering, la « force » de connectivité des liens.

Le développement de cet outil fait parti d'un projet à plus long terme qui vise à permettre la compréhension et l'analyse des modifications du réseau métabolique à partir de données métabolomiques. En particulier nous utilisons cette approche pour étudier la modification métabolique subie par le parasite *Trypanosoma Brucei* (responsable de la maladie du sommeil) lors de son passage de la mouche tsé-tsé au sang humain.

[1] Breitling R, Pitt AR, Barrett MP. Trends in Biotechnology, 2006, 24: 543-548.

[2] Breitling R et al. Metabolomics, 2006, 2: 155-164.

[3] Steuer, R. Briefings in Bioinformatics, 2006, 7, 151-158.

[4] Shannon P et al. Genome Research, 2003, 13: 2498-2504.

[5] Jourdan F et al. Bioinformatics, 2007, In press.



## *Session 2 - 09*

### **Mise à disposition d'un système bioinformatique de gestion des données de métabolomique issues de plantes : MetaboDB**

**Hélène Ferry-Dumazet\*, Daniel Jacob, Laurent Gil, Antoine de Daruvar.**

*CBiB, Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Université de Bordeaux 2*

Un système bioinformatique a été développé dans le cadre d'un projet Génoplante appelé MétaboP. Ce projet consistait en la mise au point et la comparaison de différentes méthodes pour l'analyse métabolomique d'échantillons végétaux.

Pour répondre aux besoins de ce projet multi-plateformes, multi espèces et multi-techniques, l'application MetaboDB a été développée. Elle est actuellement utilisée par les partenaires du projet MétaboP. Ce système dispose de plusieurs fonctionnalités telles que saisie, stockage, interrogation, et restriction d'accès aux données.

De plus, le système s'appuie fortement sur les standards internationaux en cours de développement par MSI (<http://msi-workgroups.sourceforge.net/>), afin de permettre l'échange, la comparaison et la publication des données de métabolomique.

Les différentes fonctionnalités du système seront présentées et illustrées par un exemple de gestion d'un projet de métabolomique.

Enfin, les perspectives et les développements à venir seront exposés.

**Mots-clés** : Base de données, gestion de profils métabolomiques, plantes, vocabulaires contrôlés.

\* [helene.dumazet@u-bordeaux2.fr](mailto:helene.dumazet@u-bordeaux2.fr) , 05 57 57 92 42

## Session 2 - O10

### Métabolomique et Biologie Systémique: à la recherche d'effets transgénomiques

Marc-Emmanuel Dumas

Centre de RMN à Très Hauts Champs, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69364 Lyon, cedex 7.

L'étude de maladies multifactorielles telles que la résistance à l'insuline ou de processus complexes tels le vieillissement représente un réel déficit en termes de santé publique pour le monde occidental et les pays en voie de développement [1].

Les modèles animaux de maladies humaines peuvent être utilisés pour isoler la variation génétique de la variation environnementale. En ce sens, les biotechnologies à hauts débits en "omique" telle que la génomique, transcriptomique et la métabolomique sont des méthodologies précieuses pour étudier les pathologies reliées à la résistance à l'insuline (diabète de type 2, obésité).

Dans cet exposé, je montrerai comment les phénotypes métaboliques générés par spectroscopie RMN (et MS), ou métabotypes, peuvent être utilisés en tant qu'observation structurante pour révéler la signature latente de mutations silencieuses chez *Caenorhabditis elegans* [2].

Je montrerai également comment ces profils métaboliques permettent de comprendre les effets du métabolisme de la flore microbienne sur la résistance à l'insuline chez la souris [3]. Ensuite, je présenterai l'intégration de métabotypes avec un génotypage à l'échelle du génome [4] ainsi que les données transcriptomiques pour étendre le spectre de la génétique des modèles animaux à l'étude des interactions transgénomiques entre la flore intestinale symbiotique et l'hôte mammalien.

Enfin, je montrerai comment les métabotypes humains sont influencés par l'environnement au sein de cohortes épidémiologiques [5].

1. Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787 (2001).
2. Blaise, B.J. et al., Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19808-12 (2007).
3. Dumas, M.E. et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12511-6 (2006).
4. Dumas, M.-E. et al. Direct quantitative trait locus mapping of mammalian metabolic phenotypes in diabetic and normoglycemic rat models. *Nat Genet* 39, 666-672 (2007).
5. Dumas, M.E. et al. Assessment of analytical reproducibility of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem*. 78, 2199-208 (2006).

## Session 3 « Fluxomique et Réseaux Métaboliques »

### Session 3 - 011

#### **NMR-based fluxomics : Quantitative 2D-NMR Methods for Isotopomer Analysis.**

**Stéphane Massou<sup>1</sup>, Cécile Nicolas<sup>1</sup>, Fabien Letisse<sup>1,2</sup>, Jean-Charles Portais<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>. *Ingénierie des Systèmes biologiques et des Procédés, UMR 5504, UMR792, CNRS, INRA, INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France.*

<sup>2</sup>. *Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne 31062, Toulouse, France.*

NMR combined with <sup>13</sup>C-labeling strategies has been increasingly used over the past two decades to measure metabolic fluxes in living systems. NMR is unique in providing direct access to the amount of <sup>13</sup>C atom incorporated in individual carbon positions of metabolites. This makes NMR a reliable method for monitoring the fate of specifically labelled substrates – e.g. [1-<sup>13</sup>C]glucose – in biological systems, but also for resolving the distribution of positional isotopomers in experiments carried out with uniformly labelled substrates – e.g. [U-<sup>13</sup>C]glucose –. 2D-NMR methods have been developed to measure positional isotopomers from complex mixtures of metabolites (e.g. cell extracts, biomass hydrolysates, etc).

In this work, we have investigated the reliability of 2D-COSY and 2D-TOCSY experiments to provide accurate measurements of <sup>13</sup>C-enrichments in complex mixtures of <sup>13</sup>C-labelled metabolites. 2D-COSY does not provide reliable measurements of <sup>13</sup>C-enrichments. The quantification is altered by: i) the application of magnitude correction, and ii) the occurrence of neighbour <sup>13</sup>C atoms. In contrast, accurate determination of <sup>13</sup>C-enrichments can be obtained from 2D-TOCSY, even at low isotopic abundance, provided ZQ filters are applied. 2D-TOCSY can be combined to 2D-HSQC to obtain the actual distribution of positional isotopomers from complex mixtures of metabolites. It is applicable to various types of biological material (e.g. plant tissues, animal cells, micro-organisms), to different combinations of labelled substrates (e.g. specifically and uniformly labelled substrates), and even to examine non steady-state conditions.

## Session 3 - O12

### Tracking Drug Interactions with Yeast metabolism by metabolomics and fluxomics

**Stéphanie Heux<sup>1,3\*</sup>, Jennifer Edwald<sup>1,3</sup>, Thomas J. Fuchs<sup>2,3</sup>, Joachim M. Buhmann<sup>2,3</sup>, Uwe Sauer<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zürich, Zürich, Switzerland.* <sup>2</sup>*Institut of Computational Science, ETH Zürich, Zürich, Switzerland.* <sup>3</sup>*CC-SPMD, ETH Zürich, Zürich, Switzerland.* \*heux@imsb.biol.ethz.ch, +41446332131.

Is it possible to use fluxomics and metabolomics tools to optimize the identification/validation of targets and toxicity effects of drugs? The ability to assess and manipulate global gene expression of drug treated yeast cells has greatly contributed to uncovering the mode of action of bioactive compounds. However, these techniques do not monitor the actual function and phenotype. For a more direct functional readout, we use here metabolic flux and intracellular metabolite concentration to screen drug interactions with complex metabolic networks in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. As a proof of concept, a set of 40 drugs with known specific targets in metabolism that are highly relevant for metabolic disease and toxicity were assayed in quadruplicates at two 2 different concentrations. To enable high-throughput metabolome analysis, we developed a filter plate cultivation that enables exponential growth and rapid quenching of metabolism. By directly injecting sample into an ESI-MS/MS, we semi-quantitatively detected 80 intracellular metabolites within central metabolism. Additionally, central metabolic fluxes were calculated from GC-MS-detected <sup>13</sup>C-pattern in protein-bound amino acids [1, 2]. Here, we will present that central metabolic fluxes remained rather robust to the perturbations but that metabolite concentrations are a more sensitive readout on drug-metabolism interaction. By using supervised machine learning techniques to integrate the metabolome data with metabolic network topology, we will distinguish local, presumably specific, from global metabolic perturbations (i.e. potentially unspecific drug effects). Specially, we will address whether drug targets and toxicity can be inferred from such responses.

[1]. Blank L. et al., Genome Biol., 2005, 6:R49.

[2]. Fischer E. and Sauer U., Nat. Genet., 2005, 37:636.

**Keywords:** Drug-metabolism interaction, Flux analysis, ESI-MS/MS, Metabolic Profiling, Machine learning, *Saccharomyces cerevisiae*.

## **Session 4 « Plantes »**

### ***Session 4 - O13***

#### **What about "Plant metabolomics" - a focal point of European research"**

**Dr Robert D. Hall**

*Plant Research International, P.O. Box 16, and Centre for BioSystems Genomics, P.O. Box 98, 6700 AA Wageningen, The Netherlands*

The field of plant metabolomics is developing rapidly. Early emphasis, placed almost solely on technology development, both in the lab and *in silico*, is now quickly switching to methodological application in a wide variety of fields. Metabolomics approaches are already giving us a deeper insight into the biochemical composition of plant tissues and particularly, how this changes during development and is perturbed by genetic and environmental factors. Applications have already been reported for fundamental scientific approaches to e.g. biochemical pathway elucidation and the analysis of (metabolic) mutants as well as in an applied context. Metabolomics analysis provides valuable information on e.g. how our food composition changes during Pasteurization and processing; how the profile of health-promoting compounds in fresh vegetables is influenced by genetic background and cultivation practice; and how authentication and fabrication of products can more rapidly be confirmed. In this presentation a brief overview shall be given of the current state of the technology using results from our own laboratory on plants such as tomato, coffee and rice. Attention will also be given to which future developments, concerning both wet and dry technologies can be expected. In this regard, activities within a current EU project (META-PHOR) will be described which are related to the possible future role metabolomics may also play in issues related to global nutrition and population health.

## Session 4 - O14

### Metabolome adjustments induced by osmotic stress in the extremophile *Thellungiella halophila*, an *Arabidopsis* relative species

**R. Lukan<sup>1\*</sup>, J. Kopka<sup>2</sup>, M.F. Niogret<sup>1</sup>, L. Leport<sup>1</sup>, A. Savouré<sup>3</sup> and A. Bouchereau<sup>1</sup>**

\* *raphael.lukan@univ-rennes1.fr ; 02 23 23 68 74*

<sup>1</sup>*OMS, UMR CNRS 6026 ICM, Université de Rennes 1, 35042 Rennes cedex, France.*

<sup>2</sup>*Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie 14424 Potsdam, Germany*

<sup>3</sup>*PCMP, UMR CNRS 7180 Université Pierre et Marie Curie-Paris6 Paris F-75005, France.*

Plants submitted to osmotic stress subsequently to water deficit, high salinity or freezing, develop responses involving overall physiology, from morphogenetic to molecular processes, and reflect various adaptation abilities. Since those processes rely on genetic background, identification of “tolerance genes” was undertaken with some success, but it obviously appeared that crop improvement could hardly be achieved by single gene genetic engineering, given that osmotic stress tolerance is rather determined by a global regulation network than a particular mechanism. As a matter of fact, despite a 90% genome homology with *Arabidopsis* and a similar morphology, the extremophile species *Thellungiella halophila* is highly tolerant to salt and cold, suggesting a different organization at the molecular level. Indeed, recent transcriptomic studies have highlighted this multidimensional response to salt stress, related to sodium management and metabolism regulation.

Many questions remain in the field of metabolic adjustments induced by stress, including metabolite participation to osmotic regulation and the unclear role of stress related compounds, like proline, accumulated by both sensitive *Arabidopsis* and tolerant *Thellungiella*. Consequently we used an integrative approach to consider global metabolic configuration in both species. First, a metabolomic scale semi-quantitative analysis (GC-Q-MS) allowed a clear discrimination of *Thellungiella* and *Arabidopsis* grown under optimal or hypersaline conditions. Noticeable differences were found among several primary and secondary metabolites, traducing different basic metabolic regimes for carbohydrates, organic acids, amino acids, phenolics and polyamines. Then we proceeded in a more targeted and quantitative analysis (by GC-FID and UPLC-PDA) on plants of both genotypes, grown on NaCl 75 mM (*Arabidopsis* 50% growth inhibition) and 240 mM (*Thellungiella* 50% growth inhibition), and also on PEG solutions exerting an equivalent osmotic stress. Short and medium terms metabolic responses are drawn under those conditions to surround effects of osmotic and ionic components of a salt stress and to discuss links between growth inhibition and metabolome reconfigurations in tolerant and sensitive relative species.

**Mots-clés :** Metabolic profiling, osmotic stress, *Arabidopsis*

## Session 4 - O15

### Integration of cytological, metabolome and transcriptome data in relation with the acquisition of the fleshy trait in tomato pericarp and locular tissue

Fabien Mounet<sup>1</sup>, Annick Moing<sup>1</sup>, Johann Petit<sup>1</sup>, Michael Maucourt<sup>1,2</sup>, Virginie Garcia<sup>1</sup>, Catherine Deborde<sup>1,2</sup>, Stéphane Bernillon<sup>1,2</sup>, Gwénaëlle Legall<sup>3</sup>, Ian J. Colquhoun<sup>3</sup>, Marianne Defernez<sup>3</sup>, Jean-Luc Giraudel<sup>4</sup>, Dominique Rolin<sup>1</sup>, Christophe Rothan<sup>1</sup>, Martine Lemaire-Chamley<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR 619 Biologie du Fruit, <sup>2</sup> Plateforme Métabolome-Fluxome de GFB, IFR 103, INRA – Université Bordeaux 1 - Université Victor Segalen Bordeaux 2 - INRA de Bordeaux - BP 81 – F-33140 Villenave d'Ornon

<sup>3</sup> Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK

<sup>4</sup> EPCA, ISM, UMR 5255, CNRS-Université Bordeaux 1, F-24019 Périgueux cedex, France

The acquisition of the fleshy trait in fruit involves, after the cell division phase, the differentiation of large vacuolated cells (up to > 1mm length in tomato) that accumulate water, sugars, organic acids and other compounds. In order to get new insights concerning the mechanisms controlling and regulating these processes, which are crucial for both fruit development and fruit quality, we undertook a comparative study of two expanding fruit tissues in the model plant tomato (*Solanum lycopersicum*) by using detailed cytological analyses and large scale approaches (transcriptome, metabolome). Pericarp and locular tissue were dissected from fruits harvested at 12, 20 and 35 days post anthesis. Metabolite profiling was achieved by proton NMR, HPLC-DAD and LC-MS, and transcriptome profiling by using 13.5K tomato microarrays (TOM1). Principal Component Analysis and Kohonen Self-Organizing-Maps showed that pericarp and locular tissues differed considerably in their metabolite composition, especially with regards to sugars and organic acids content. The integration of transcriptome and metabolome data revealed that changes in tissue composition were related to transcriptional changes, not only of genes involved in central metabolism but also of genes implicated in diverse signalling pathways. Pearson correlations allowed the identification of several genes potentially related with metabolic changes and/or cell expansion during fruit development. These hypotheses will be tested by transient modification of their expression in tomato fruits through agro-injection of RNAi and over expression vectors.

**Mots-clés :** Metabolome, transcriptome, tomato fruit, development, locular tissue, mesocarp

## Session 5 « Biotechnologie et Environnement »

### Session 5 - O16

#### **NMR study of plant fibre degradation by *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes*.**

**M. Matulova<sup>a</sup>, R. Nouaille<sup>b,c</sup>, P. Capek<sup>a</sup>, M. Péan<sup>d</sup>, A.-M. Delort<sup>b\*</sup> and E. Forano<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*

<sup>b</sup>*Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS - Université Blaise Pascal, Aubière, France*

<sup>c</sup>*Unité de Microbiologie, INRA, Clermont-Ferrand-Theix, St-Genès-Champagnelle*

<sup>d</sup>*DEVN/GRAP, CEA Cadarache, France.*

\* E-mail: A-Marie.DELORT@univ-bpclermont.fr tel : 04 73 40 77 14

Cellulose and wheat straw degradation by *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes* was monitored using NMR spectroscopy and chemolytic methods (1). *In situ* solid state NMR, <sup>13</sup>C CP MAS (cross polarisation magic angle spinning) was used to monitor the modification of the composition and the structure of cellulose and <sup>13</sup>C-enriched wheat straw during growth of the bacteria on this substrate. There was no preferential degradation either of amorphous regions of cellulose versus crystalline ones, or of cellulose versus hemicelluloses in wheat straw whatever the bacterial species. Liquid state 2D NMR experiments and chemolytic methods were used to analyse in details the sugars released in the culture medium, and integration of NMR signals enabled their quantification at various times of culture. The results showed different mode of attack of the plant fibres by the two bacteria: cellodextrins were accumulated in the culture medium of *R. albus*, but not of *F. succinogenes*, and sequential activity of the esterases on hemicelluloses was also different in the two species. This suggests that the two cellulolytic bacteria have specific roles in plant cell wall degradation in the rumen ecosystem.

(1) Matulova et al (2005). Appl. Environ. Microbiol. 71 :1247-1253

**Mots-clés :** microorganismes, RMN solide et liquide, cellulose, rumen



## Session 5 - O17

### Etude par RMN $^{31}\text{P}$ *in vivo* de cellules de *Rhodococcus Rhodochrous* en présence du 2-aminobenzothiazole, de fer et de lumière

**Charlene Chorao**<sup>a,b\*</sup>, Pascale Besse-Hoggan<sup>a</sup>, Martine Sancelme<sup>a</sup>, Mounir Traikia<sup>a</sup>, Richard Bligny<sup>c</sup>, Elisabeth Gout<sup>c</sup>, Gilles Mailhot<sup>b</sup>, Anne-Marie Delort<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS – Université. Blaise Pascal, Aubière

<sup>b</sup> Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, UMR 6505 CNRS – Université Blaise Pascal, Aubière

<sup>c</sup> CEA, Grenoble

\* charlene.chorao@univ-bpclermont.fr – 04 73 40 71 20

Les benzothiazoles sont des composés organiques dont la structure comprend un cycle benzénique accolé à un cycle thiazole. Utilisés par les industries du pneumatique, des médicaments, des fongicides et des colorants, leur présence dans l'environnement est inévitable et s'avère problématique de par la toxicité qu'ils expriment envers les microorganismes, les plantes, les animaux et l'homme. Il est ainsi nécessaire de déterminer le moyen de les dégrader.

Des études de dégradation ont déjà été réalisées sur cette famille de molécules mais la littérature reste encore pauvre sur le sujet. H. de Wever *et al.* ont isolé des souches de bactéries du bassin de traitement des eaux d'une usine pharmaceutique utilisant des benzothiazoles. Parmi les composés étudiés en présence de ces souches bactériennes, certains sont dégradés très rapidement alors que d'autres comme le 2-aminobenzothiazole (ABT), se montrent récalcitrants. L'ABT n'absorbant pas la lumière, nous avons alors pensé à utiliser la photodégradation en présence d'un photoinducteur (complexe FeNTA) qui produirait des radicaux libres pouvant attaquer le xénobiotique. Les résultats montrent une dégradation limitée. En revanche lorsqu'il y a combinaison des deux procédés, i.e. présence de cellules et du complexe de fer, en présence ou non de lumière, la dégradation est rapide et quasi-totale. Ce résultat met en évidence un second rôle joué par le fer, son action sur les enzymes de dégradation.

Le travail présenté ici concerne l'étude par RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo* des cellules de *Rhodococcus Rhodochrous* lors des processus de biodégradation. En suivant les signaux de certaines molécules phosphorées (ATP, AMPc, Pi, polyphosphates) nous pouvons suivre l'état métabolique de ces bactéries lorsqu'elles sont mises en présence d'ABT, de fer et de lumière pour nous assurer qu'elles ne sont pas intoxiquées par le xénobiotique, le complexe de fer, les radicaux OH<sup>•</sup>, les métabolites et les photoproduits. Pour réaliser ces expériences, les bactéries ont été encapsulées dans un gel d'alginate puis placées dans un tube RMN alimenté en milieu et en oxygène grâce à un système de périfusion, un éclairage *in situ* est également intégré au système.

**Mots-clés :** RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo*

## Session 6 « Modélisation »

### Session 6 - O18

#### « La Calculette Métabolique » : un modèle biochimique simple pour étudier le métabolisme énergétique des mammifères – Exemple sur le métabolisme de la mamelle

S. Lemosquet<sup>1</sup>, J. Van Milgen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA UMR1080 Production du Lait, F-35590 Saint Gilles.

<sup>2</sup>INRA UMR1079 Systèmes d'Élevage, Nutrition Animale et Humaine, F-35590 Saint Gilles.

Le modèle de calculette métabolique élaboré par J. Van Milgen [1] prend en compte l'ensemble des principales voies biochimiques d'utilisation des nutriments dans les trois métabolismes glucidique, protéique et lipidique. Sa structure est basée sur un nombre restreint de pivots biochimiques (glucose, glucose-6-phosphate, pyruvate, acétyl coenzyme A,  $\alpha$ -cétoglutarate, oxaloacétate et sérine) qui correspondent à des carrefours importants entre les voies métaboliques. Elle intègre les cofacteurs impliqués dans les transformations biochimiques (ATP, NADH mitochondrial et cytosolique, NADPH, FADH<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>). A chaque voie correspond une équation (54) dont les seuls paramètres sont la quantité de pivots et cofacteurs synthétisés ou utilisés. En combinant les voies métaboliques d'intérêt, la calculette permet de quantifier la stœchiométrie des transformations métaboliques (par exemple, le rendement en ATP de l'oxydation complète de la glutamine). L'utilisateur de la calculette doit choisir les équations en évitant une accumulation ou un déficit de pivots, de cofacteurs et d'ATP. Les entrées et sorties de la calculette sont les métabolites utilisés et ou synthétisés (glucides, acides gras, et acides aminés). La calculette est écrite sous Excel et l'ajustement est piloté de façon manuelle par l'utilisateur. Elle peut être facilement adaptée à tout type cellulaire ou tissulaire en ajoutant ou supprimant des équations de voies métaboliques. Elle peut également être utilisée pour comprendre les échanges inter-organes des métabolites énergétiques (néoglucogenèse à l'échelle de l'organisme). La calculette, initialement construite pour représenter le métabolisme des monogastriques, a été adaptée pour étudier le métabolisme énergétique mammaire chez la vache laitière en ajoutant 3 pivots et 13 équations permettant de décrire la synthèse des acides gras à partir de l'acétate et du  $\beta$ -hydroxybutyrate. Ce modèle, appliqué à nos études sur vaches laitières, doit permettre de reconstruire le métabolisme mammaire à partir de la mesure des prélèvements de nutriments et de la composition du lait. Nous avons choisi d'analyser l'effet d'apport de protéines sur la synthèse de lait au travers de deux essais. L'apport de protéines a augmenté la synthèse de lactose, de protéines et d'acides gras dans les deux essais mais a conduit à des prélèvements mammaires de nutriments très différents d'un essai à l'autre (augmentation du prélèvement d'acides aminés ou des prélèvements de l'ensemble des nutriments). Cette différence de résultats pourrait être liée à la méthodologie de mesure du prélèvement (débit sanguin). Il s'agit de voir si les deux scénarios de prélèvements sont possibles du point de vue du fonctionnement énergétique de la mamelle. Ce travail est un pré requis avant d'étudier l'effet des acides aminés sur la synthèse de lactose et de choisir l'approche la plus adaptée (étude de l'expression d'enzymes ou suivi d'une voie métabolique avec les isotopes stables).

[1] Van Milgen J., J.Nutr., 2002,132:3195-3202.

**Mots-clés :** modèle, biochimie, mammifères, energy, ATP, cofacteurs

## Session 6 - O19

### Principes de l'Analyse Modulaire du Contrôle et de la Régulation et Application à la bioénergétique cardiaque *in situ*.

Philippe Diolez, Véronique Deschodt-Arsac, Guillaume Calmettes, Pierre Dos Santos\*, Eric Thiaudière, Laurent Arsac, Jean-Michel Franconi.

*RMSB, UMR5536 CNRS-Université Victor Segalen Bordeaux 2, Equipe Contrôle Métabolique de la Fonction Contractile (CMFC). diolez@rmsb.u-bordeaux2.fr.*

*\*INSERM U441, Pessac, France. Avec le soutien de l'IFR4, Bordeaux.*

L'analyse modulaire du contrôle métabolique, une des branches de l'analyse du contrôle métabolique, permet de développer de nouveaux outils dans le cadre de la Biologie Intégrative (*System's Biology*). Basées sur la mesure des flux et des concentrations d'intermédiaires métaboliques, ces méthodes sont aussi bien applicables *in situ* que sur extraits cellulaires et permettent de développer des méthodes d'analyse intégrée du métabolisme. L'analyse modulaire fournit une description quantitative des interactions et régulations internes du système métabolique considéré (branchements, inhibition *feed-back*, ...). Il est ainsi possible de définir qualitativement et surtout quantitativement toute modification induite dans la voie métabolique, par exemple par une pathologie ou un changement des conditions externes.

Nous avons utilisé ces approches sur des systèmes variés allant de la mitochondrie isolée jusqu'à la bioénergétique cardiaque sur cœur isolé et l'activité musculaire *in vivo*. Les mécanismes de contrôle et de régulation de la contraction cardiaque sont décrits à l'aide de la spectroscopie RMN non-traumatique et avec l'appui analytique de l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA) développée au Laboratoire [1, 2]. MoCA constitue ainsi une nouvelle approche intégrée des pathologies et des thérapeutiques cardiaques associées. Par opposition au muscle squelettique et à la plupart des voies métaboliques, la contraction du muscle cardiaque se caractérise par l'absence de modification des intermédiaires énergétiques (PCr, ATP, Pi) en réponse à une augmentation d'activité, même importante [3]. MoCa nous a permis de démontrer *in situ* l'existence d'une activation parallèle de l'ensemble du métabolisme énergétique par le Calcium; l'activation directe de l'activité mitochondriale étant responsable de l'homéostasie des intermédiaires [1]. L'analyse Modulaire, en intégrant la complexité des interactions cellulaires, devrait voir son application élargie à la régulation de voies métaboliques *in situ* dans des cellules, tissus ou organes entiers [4].

1. Diolez P. *et al*: Modular regulation analysis of heart contraction: application to *in situ* demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am J Physiol : Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 293:13-19.
2. Diolez P. *et al*: Mitochondria do not control heart bioenergetics. *Mol Biol Rep* 2002, 29(1-2):193-196.
3. Kushmerick M.J.: Skeletal muscle: a paradigm for testing principles of bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr*, 1995, 27(6):555-569.
4. Cascante M *et al*: Metabolic control analysis in drug discovery and disease. *Nature Biotechnol.*, 2002, 20(3):243-249.

## *Session 6 - O20*

### **UNE MODELISATION MULTI-NIVEAUX DU METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL.**

**Coordonnateur :** Jean-Pierre MAZAT, INSERM U688, Université Bordeaux 2. [jpm@u-bordeaux2.fr](mailto:jpm@u-bordeaux2.fr)

**Participants :** Marie Beurton-Aimar ([aimar@labri.fr](mailto:aimar@labri.fr)); Pascal Ballet ([pascal.ballet@univ-brest.fr](mailto:pascal.ballet@univ-brest.fr)); Juan Elezgaray ([j.elezgaray@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:j.elezgaray@iecb.u-bordeaux.fr)); David Fell ([dfell@brookes.ac.uk](mailto:dfell@brookes.ac.uk)); Charles Lalès ([Lales@labri.fr](mailto:Lales@labri.fr)); Thierry Letellier ([Thierry.Letellier@phys-mito.u-bordeaux2.fr](mailto:Thierry.Letellier@phys-mito.u-bordeaux2.fr)); Christine Nazaret ([nazaret@sm.u-bordeaux2.fr](mailto:nazaret@sm.u-bordeaux2.fr)); Nicolas Parisey ([parisey@labri.fr](mailto:parisey@labri.fr)); Stéphane Ransac ([ransac@ibgc.u-bordeaux2.fr](mailto:ransac@ibgc.u-bordeaux2.fr)); Christine Reder ([Christine.Reder@math.u-bordeaux1.fr](mailto:Christine.Reder@math.u-bordeaux1.fr)); Rodrigue Rossignol ([Rodrigue.Rossignol@phys-mito.u-bordeaux2.fr](mailto:Rodrigue.Rossignol@phys-mito.u-bordeaux2.fr)); Michel Rigoulet ([michel.rigoulet@ibgc.u-bordeaux2.fr](mailto:michel.rigoulet@ibgc.u-bordeaux2.fr)); Michael K. Pidcock ([mkpidcock@brookes.ac.uk](mailto:mkipidcock@brookes.ac.uk)); Gireg Desmeulles ([desmeulles@enib.fr](mailto:desmeulles@enib.fr)); Claire Pertuiset ([Claire.pertuiset@u-bordeaux2.fr](mailto:Claire.pertuiset@u-bordeaux2.fr)); Odile Bunoust ([odile.bunoust@ibgc.u-bordeaux2.fr](mailto:odile.bunoust@ibgc.u-bordeaux2.fr)); Nicole Averet ([nicole.averet@ibgc.u-bordeaux2.fr](mailto:nicole.averet@ibgc.u-bordeaux2.fr))

Il s'agit, dans ce projet ANR, d'adopter une approche de modélisation multi-niveaux qui utilise des techniques appropriées (équations différentielles, systèmes multi-agents, approches stochastiques, etc.) à la modélisation du métabolisme énergétique mitochondrial à chaque niveau et qui permette le passage explicite entre des niveaux adjacents. Notre modélisation s'appuie sur un ensemble important de données, disponible dans les laboratoires faisant partie du projet ; des expériences complémentaires seront entreprises pour aider à la construction des modèles, à la détermination de paramètres et finalement au test des prédictions des modèles théoriques.

Enfin notre modélisation permettra d'étudier les effets au niveau moléculaire ou au niveau cellulaire plus global (phénotypique) de différentes mutations telles qu'elles apparaissent dans un certain nombre de pathologies mitochondriales.

## *Communications Flash-Poster*

### *Session Flash F1-P1*

#### **Analyse par RMN <sup>1</sup>H des lipides du myocarde de souris surexprimant l'apolipoprotéine O.**

**F. Desmoulin\*, R. Harmancey, M. Galinier, P. Massabuau, A. Turkieh, T. Andriamihafy, M. Lamant, F. Smih et P. Rouet.**

desmoulin@chimie.ups-tlse.fr, tél : 05 61 14 59 98

*I2MR INSERM U858 Equipe 7 "Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques", Faculté de Médecine, Service de Pharmacologie, 37, Allées Jules Guesde, 31073 Toulouse*

L'obésité, définie par l'indice de masse corporelle (IMC), induit très souvent une hypertension artérielle et une surcharge lipidique du myocarde qui favorise le développement de l'insuffisance cardiaque (IC). Comme l'âge et l'IMC moyen des populations augmentent, cette situation conduit à une incidence accrue de l'IC.

Les études concernant l'influence de l'obésité sur le transcriptome cardiaque, réalisées par notre équipe, mettent en évidence la surexpression de certains gènes. Ces travaux menés sur un modèle animal d'obésité nutritionnelle (régime gras) ont montré l'installation précoce et séquentielle d'anomalies moléculaires au niveau du transcriptome cardiaque [1,2]. De plus, un transcriptome cardiaque très spécifique chez le patient obèse a été observé [3]. Ces résultats nous ont notamment permis de découvrir et de caractériser une nouvelle apolipoprotéine qui a été nommée O (ApoO). Nous avons montré que l'ApoO est induite dans le myocarde de patients diabétiques de type II [4].

Nous développons des modèles expérimentaux (cardiomyocytes et souris transgéniques) surexprimant la forme humaine de cette protéine. Nous présentons ici les résultats préliminaires réalisés sur un modèle de souris transgénique surexprimant l'ApoO de manière ciblée dans le myocarde. L'analyse des lipides totaux, extraits du ventricule gauche, a été réalisée par RMN du <sup>1</sup>H. Bien que la méthode n'autorise pas la quantification des lipides selon leur classe, elle permet la quantification précise et directe de certains paramètres globaux comme en particulier le degré d'insaturation moyen des chaînes aliphatiques. Nous avons généré 3 lignées d'animaux transgéniques et montré par RT-qPCR une surexpression de l'ApoO à un niveau différent selon les individus et les lignées. Une corrélation linéaire entre le degré d'insaturation des lipides et le niveau d'expression de l'ApoO a été observée. Ainsi, le degré d'insaturation moyen des chaînes aliphatiques diminue avec l'augmentation du niveau d'expression de l'ApoO. De plus, le rapport des signaux méthyles terminaux / cholines augmente avec le niveau d'expression de l'ApoO suggérant que la diminution de l'insaturation moyenne est liée à une entrée de lipides plus saturés. Ces observations pourraient témoigner d'une implication de l'ApoO dans les mécanismes de surcharge lipidique du myocarde.

1 Philip-Couderc P. et al., Hypertension, 2003, 41: 414-21.

2 Philip-Couderc P. et al., Physiol. Genomics, 2004, 19: 32-40.

3 Philip-Couderc P. et al., FASEB J., 2004, 18: 1539-40.

4 Lamant M. et al., J. Biol. Chem., 2006, 281: 36289-302.

**Mots-clés :** lipides, RMN <sup>1</sup>H, myocarde, obésité, ApoO

## *Session Flash F2-P2*

### **Profils et empreintes métaboliques par RMN du proton pour évaluer les modifications attendues et inattendues de la composition de tomates transgéniques.**

**Yosra Ben Akal<sup>1</sup>, Ethel Mendocilla Sato<sup>2</sup>, Gwenaëlle Spieldenner<sup>2</sup>, Raphaël Henry<sup>2</sup>, Catherine Deborde<sup>2,3</sup>, Stéphane Bernillon<sup>2,3</sup>, Cécile Cabasson<sup>2</sup>, Martine Dieuaide-Noubhani<sup>2</sup>, Aline Le Menn<sup>3</sup>, Mickaël Maucourt<sup>2,3</sup>, Annick Moing<sup>2</sup>, Christophe Rothan<sup>2</sup>, Dominique Rolin<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>*Unité de Recherche Morphogénèse et Biotechnologies Végétales, Université Tunis El Manar Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie*

<sup>2</sup>*UMR 619 Biologie du Fruit, INRA – Université Bordeaux 1 – Université Victor Ségalen Bordeaux 2, IFR103 BVI, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France*

<sup>3</sup>*Plateforme Métabolome-Fluxome de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, IFR 103 BVI, BP 81, F-33140 Villenave d'Ornon, France*

<sup>4</sup>*UGAFL, INRA, BP 94, 84143 Montfavet, France*

Email : cecile.cabasson@bordeaux.inra.fr

Des modifications de la composition des fruits et feuilles de transformants de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ferum) ont été mises en évidence à l'aide d'empreintes et de profils métaboliques obtenus par spectrométrie RMN du proton. L'étude concerne trois lignées antisens pour *Sl-Ppc2* codant pour une isoforme particulière au fruit de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) qui intervient dans la synthèse d'acides organiques à un stade précoce du développement du fruit. Les données, soit d'empreintes métaboliques de limbes foliaires matures, soit de métabolites ciblés quantifiés sur les limbes foliaires et les péricarpes de fruit à différents stades du développement, ont été comparées à celles d'un témoin non transgénique à l'aide des analyses statistiques multivariée (ACP) et univariée (ANOVA). Une modification prévisible du métabolisme primaire a été constatée dans les péricarpes des lignées transgéniques avec le changement des teneurs en acides organiques (malique et citrique) et des ratios Sucres/Acides Organiques et Sucres/Acides Aminés. Des effets inattendus ont également été mis en évidence sur le métabolisme primaire des limbes foliaires alors que la construction génétique ciblait spécifiquement l'activité PEPC dans les fruits. La méthodologie RMN du proton développée par la Plateforme Métabolome de Génomique Fonctionnelle Bordeaux s'est avérée être un outil pertinent pour mettre en évidence dans des matrices complexes de plantes des altérations attendues de la composition, mais également des altérations inattendues qui vont permettre de proposer des hypothèses sur le métabolisme.

**Mots-clés :** matrice complexe ; profil métabolique ; empreinte métabolique ; RMN du proton ; OGM ; *Solanum lycopersicum* L.

### *Session Flash F3-P3*

## **Développement et application d'une approche métabolomique par LC-ESI-LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup> pour l'étude de troubles de la reproduction chez l'homme liés à une exposition aux perturbateurs endocriniens**

**Frédérique COURANT\*<sup>1</sup>, Jean-Philippe ANTIGNAC<sup>1</sup>, Fabrice MONTEAU<sup>1</sup>  
Niels JORGENSEN<sup>2</sup>, Anders JUUL<sup>2</sup>, Niels SKAKKEBAEK<sup>2</sup>, Bruno LE BIZEC<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Ecole Nationale Vétérinaire (ENVN), USC INRA 2013, Nantes, France <sup>2</sup> Department of Growth and Reproduction, Copenhagen University Hospital, Denmark*

Un certain nombre de résidus et contaminants chimiques présents dans l'environnement et la chaîne alimentaire sont connus pour leurs propriétés de perturbateurs endocriniens. Dans le cadre de son domaine d'activité général, qui est celui de l'étude des polluants chimiques depuis leur source jusqu'à l'homme, le LABERCA développe des approches globales de type métabolomique dans le but d'étudier le lien entre une exposition chimique et certaines situations de perturbation endocrinienne. Dans ce contexte, le laboratoire va participer dès 2008 à un projet européen ayant pour objectif d'étudier l'impact de facteurs environnementaux sur les fonctions de reproduction et de développement de l'homme.

Une première étude de faisabilité a été réalisée au sein du laboratoire. Deux populations d'hommes adultes ont été étudiées : la première composée de volontaires sains pour laquelle aucun effort particulier n'a été fait pour réduire la variabilité inter-individus, la seconde, composée de patients atteints de cancers des testicules, population associée au cours de cette étude à des troubles de la reproduction sévères. Des échantillons de sérum provenant de ces deux populations ont tout d'abord été filtrés sur une membrane possédant un seuil de coupure de 10 KDa, puis analysés par LC-HRMS, sur un appareil hybride de type LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup>, opérant en mode d'ionisation électrospray, à une résolution de 30000, en balayant la gamme de masse de 50 à 800 unités. Les données brutes ont été traitées par le logiciel XCMS dans le but de révéler les éventuelles différences existantes entre ces deux types de population, celles-ci pouvant correspondre à des biomarqueurs de la pathologie concernée.

Les résultats de cette étude préliminaire montrent qu'il est possible, sur la base d'une prise d'empreinte métabolique plasmatique, de différencier des patients sains de patients atteints de cancer des testicules. Quatre biomarqueurs sont apparus particulièrement discriminants vis à vis des deux populations de cette étude. L'élucidation structurale de ces composés, à l'aide de la spectrométrie de masse multidimensionnelle, actuellement en cours, sera également discutée.

## *Session Flash F4-P4*

### **Mise en place d'une approche de fluxomique dans le fruit de tomate**

**Raphael Henri, Katia Pianelli, Marie-Hélène Andrieu, Bertrand Beauvoit, Sophie Colombié, Dominique Rolin et Martine Dieuaide-Noubhani**

*UMR619 Biologie du Fruit – INRA, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Université Bordeaux I, BP81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France*

La composition finale d'un fruit dépend largement de l'importation des sucres et de leur métabolisme au cours des différentes phases de développement. Les voies métaboliques impliquées sont connues et des analyses biochimiques, puis plus récemment des analyses du transcriptome ont permis de mettre en évidence des modifications métaboliques au cours du développement du fruit. Nous développons une approche de fluxomique dans le fruit de tomate avec pour objectif d'étudier les effets de modification du génome (transgénése) sur le métabolisme carboné du fruit. Cette étude est réalisée chez des fruits âgés de 20J, ce qui correspond à des fruits prélevés dans leur phase de grandissement cellulaire.

Des « lamelles » de fruit sont prélevées et incubées dans une solution minérale nutritive. Après avoir montré que les tissus sont maintenus dans un état stationnaire métabolique, du glucose enrichi en C13 a été fourni afin de réaliser l'analyse des flux. Deux variétés ont été testées : Ailsa Creg et MP1. L'analyse des sucres et des acides aminés par RMN du 1H et du C13 [1,2] montre des différences de marquage significatives, traduisant des différences de flux dans les voies métabolique impliquées chez ces 2 lignées. Cependant l'analyse quantitative du réseau métabolique [3] reste partielle du fait de la présence de nombreux pools de métabolites peu ou mal enrichis.

[1] Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D (2002) *J Biol Chem* 277: 43948 – 43960

[2] Alonso AP, Vigeolas H, Raymond P, Rolin D, Dieuaide-Noubhani M. (2005). *Plant Physiol.* 138: 2220-2232.

[3] Alonso AP, Raymond P, Hernould M, Rondeau-Mouro C, de Graaf A, Chourey P, Lahaye M, Shachar-Hill Y, Rolin D and Dieuaide-Noubhani M (2007) *Metabolic Engineering.* 9: 419-432



## *Session Flash F5-P5*

### **Métabolisme énergétique des trypanosomes**

**Virginie Coustou<sup>1</sup>, Marc Biran<sup>2</sup>, Loïc Rivière<sup>1</sup>, Marc Breton<sup>1</sup>, Fabien Guegan<sup>1</sup>, Nicolas Plazolles<sup>1</sup>, Jean-Michel Franconi<sup>2</sup>, Frédéric Bringaud<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup>, *Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, UMR-5234 CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.*

<sup>2</sup>, *Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR-5536 CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France*

Les trypanosomes (*Trypanosoma brucei*) sont des parasites protozoaires responsables de la maladie du sommeil en Afrique. Les trypanosomes ont un cycle parasitaire complexe avec plusieurs formes parasitaires très différentes adaptées à l'hôte mammifère (dont l'homme) ou à l'insecte vecteur (mouche tsétsé du genre *Glossina*). Nous nous intéressons particulièrement au métabolisme énergétique de la forme procyclique rencontrée dans le tractus digestif de l'insecte vecteur. Cette forme parasitaire cultivée *in vitro* a la particularité de préférer le glucose comme source de carbone bien qu'elle évolue naturellement dans un environnement dépourvu de glucose et riche en acides aminés (la proline est le combustible de la mouche lors du vol).

Pour étudier le métabolisme énergétique de cette forme parasitaire cultivée en milieu contenant ou pas de glucose, nous avons développé une stratégie basée sur la production d'un nombre important de mutants (RNAi et knockout), dont les changements métaboliques sont étudiés par une approche d'analyse globale (RMN).

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence que le glucose exerce un contrôle négatif sur le métabolisme de la proline. Ce contrôle s'exerce à différents niveaux puisque le glucose affecte (1) la vitesse de consommation de la proline qui est divisée par 6 lorsque le parasite est cultivé en présence de glucose, (2) la voie catabolique de la proline (le succinate est le principal produit final du métabolisme de la proline excrété par le parasite en présence de glucose, alors qu'en absence de glucose, le succinate est ensuite converti en alanine) et (3) le mode de production de l'ATP (l'ATP est produit essentiellement par phosphorylation au niveau du substrat en présence de glucose et par phosphorylation oxydative en absence de glucose).

## *Session Flash F6-P6*

### **Mise au point d'une méthode analytique sur des échantillons de plasma, en vue d'une étude métabonomique**

**Hélène Pereira, Jean François Martin, Jean Louis Sébédio, Estelle Pujos-Guillot**

*UMR 1019-Unité de Nutrition Humaine, INRA, Centre de Recherche de Clermont Ferrand/Theix, 63122 Saint Genès-Champagnelle*

La métabolomique ou l'analyse globale de métabolites dans des échantillons biologiques nécessite une compréhension importante d'un point de vue chimie analytique. Dans le cadre d'une étude métabonomique, où le but est d'analyser des empreintes métaboliques afin de mesurer les effets d'une intervention, nutritionnelle, nous avons développé des méthodes analytiques adaptées à l'étude d'échantillons de plasma. La complexité des échantillons étudiés requière des développements analytiques qui concernent la préparation d'échantillons, la séparation (HPLC, GC) et la spectrométrie de masse. De plus, différents outils de traitements des données sont nécessaires à une étude métabonomique, tels que, des outils d'extraction et d'analyse de données, et des bases de données. Or tous ces outils sont nécessitent actuellement d'être testés.

L'objectif de cette étude a été de développer une méthode d'analyse globale du plasma dans le but d'analyser des empreintes métaboliques. La première étape est donc **une précipitation protéique**<sup>1, 2,3</sup> qui va également permettre d'extraire les métabolites contenus dans le plasma. Nous avons comparé les trois méthodes publiées. En plus de la méthode d'extraction des métabolites, pour la matrice « plasma », il a fallu déterminer l'influence de l'anticoagulant utilisé (Héparine ou EDTA), la méthode chromatographique, les paramètres du spectromètre de masse et le logiciel d'extraction de données.

Ensuite, ces échantillons ont été analysés par un couplage HPLC, ESI (+ et -), Qtof (micromass). La contrainte analytique dans le cas d'une analyse d'empreinte de métabolites, est liée à la diversité des propriétés physico-chimiques des métabolites dans le plasma. De plus, nous avons rencontré plusieurs problèmes pouvant induire des biais dans l'interprétation des données : l'encrassement de la source lié aux échantillons plasmatiques, le phénomène de suppression d'ions liés à l'ionisation et la saturation du détecteur.

Pour répondre à notre objectif, nous avons comparé différentes méthodes analytiques à l'aide de standards dopés dans le plasma.

1\_ Want, Solvent-Dependent Metabolic Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry, 2006, 78,743:752

2\_ Boernsen, Controlled Protein Precipitation in Combination with Chip-Based Nanospray Infusion Mass Spectrometry. An Approach for Metabolomics Profiling of Plasma. 2005, 77, 7255:7264.

3\_ Folch and al., Biol.Chem., 1957, 226, 497-509

## *Session Flash F7-P7*

### **Etudes métabolomique et lipidomique de lignées cellulaires de glioblastomes : mise en évidence d'un indice métabolique de radiorésistance.**

**D. Desoubzdanne<sup>1,\*</sup>, D. Bon<sup>1</sup>, C. Delmas<sup>2</sup>, M. Malet-Martino<sup>1</sup>, C. Toulas<sup>2</sup>, E. Cohen-Jonathan Moyal<sup>2</sup>, J. Bertrand-Michel<sup>3</sup>, F. Tercé<sup>3</sup>, R. Martino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université Paul Sabatier - LSPCMIB - UMR5068 - Groupe de RMN Biomédicale - Toulouse Cedex 9. <sup>2</sup>Département de Radiothérapie - Centre de Lutte Contre le Cancer Claudius Regaud - Toulouse Cedex. <sup>3</sup>IFR 30 - Génopôle Toulouse - INSERM U563 Bât. C - CHU Purpan, Toulouse Cedex 3.

\*desou@chimie.ups-tlse.fr, tél.: (0033)5.61.55.68.74

Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales humaines dont le pronostic de survie est très mauvais. Le traitement standard associe l'intervention chirurgicale et la radiothérapie. Cependant, la plupart des glioblastomes récidivent et la survie des patients atteints d'une telle tumeur est de 10 à 12 mois. La mise en évidence de(s) mécanisme(s) cellulaires induisant la radiorésistance est nécessaire afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans cette étude, nous avons choisi l'approche métabolomique pour une meilleure identification des facteurs de radiorésistance.

Nous avons identifié le profil métabolomique par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H de 4 lignées cellulaires humaines de glioblastomes : 2 radiorésistantes (RR : U87 et SF763) et 2 radiosensibles (RS : U251 et SF767). Les analyses RMN ont été effectuées à partir de la fraction aqueuse des extraits cellulaires. Une étude statistique multivariée par analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur une série de 40 spectres à l'aide d'un logiciel dédié (KnowItAll<sup>®</sup>, BioRad). Le résultat de l'ACP a révélé une discrimination entre les lignées RR et RS. Cette discrimination est due à l'intensité de la somme de deux signaux, Phosphocholine (PC) et Glycérophosphocholine (GPC). L'analyse quantitative discrète de la PC et de la GPC a confirmé ce résultat statistique. En effet, une proportion significativement plus élevée ( $p \ll 10^{-6}$ ) de composés à phosphocholine (PC+GPC) a été observée pour les lignées cellulaires RR. De ce fait, la somme des signaux PC+GPC pourrait être un bon indice de radiorésistance de lignées cellulaires de glioblastomes. L'étude lipidomique a porté sur le dosage par CPG et HPLC de composés tels que les phospholipides, les céramides, les sphingomyélines et les lipides neutres et n'a rien révélé de significatif entre les lignées RR et RS.

Des études enzymatique et transcriptomique sont en cours afin de comprendre le phénotype métabolomique observé.

**Mots clés :** lignées cellulaires de glioblastomes ; radiorésistance ; métabolomique ; lipidomiques.

## *Session Flash F8-P8*

### **Plant Cuticle Analysis Using GC-MS techniques**

**Frédéric Domergue, Brice Bourdenx, Jérôme Joubès and René Lessire.**

*Laboratoire de biogenèse membranaire UMR 5200 CNRS – Université Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat – Case 92, 33076 Bordeaux Cedex FRANCE*

The cuticle that covers all aerial parts of terrestrial plants is thought to play a crucial role in limiting uncontrolled water loss from the plant to the dry air environment. This barrier is exclusively synthesised by epidermal cells and contains two major lipid-derived constituents that are responsible for the highly hydrophobic nature of the cuticle. The first constituent is a biopolymer of inter-esterified medium-chain fatty acids named cutin. The second one is a complex mixture of very long-chain fatty acid derivatives usually referred to as cuticular waxes.

In *Arabidopsis thaliana*, the major cutin monomer families are fatty acids,  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acids,  $\omega$ -hydroxyacids, fatty alcohols and 2-hydroxy acids while the major wax classes are fatty alcohols, aldehydes, alkanes and ketones. Since each family or class contains monomers of various chain length (C16 to C22 in cutin and C24 to C34 in waxes), the cuticle is made of more than 50 components having in common a similar backbone, the acyl-chain.

In that context and as part of our lipidomic platform (<http://www.biomemb.cnrs.fr/>), we have developed protocols based on GC-MS techniques that enable the separation, identification and quantification of all the lipid-derived constituents of the cuticle.

## *Session Flash F9-P9*

### **Mise en évidence de l'administration d'hormone de croissance équine par approche métabolomique LC-ESI-HRMS. Application au contrôle anti-dopage.**

**Fanny KIEKEN<sup>1,2</sup>, Gaud PINEL<sup>1</sup>, Jean-Philippe ANTIGNAC<sup>1</sup>, Marie-Agnès POPOT<sup>2</sup>,  
Yves BONNAIRE<sup>2</sup>, Bruno LE BIZEC<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Ecole Nationale Vétérinaire (ENVN), USC INRA 2013, route de Gachet, 44307 Nantes Cedex 3.* <sup>2</sup>*Laboratoire des Courses Hippiques (LCH), 15 rue de Paradis, 91370 Verrières-le-Buisson.*

L'hormone de croissance (GH), appelée également somatotropine, est une protéine de 191 acides aminés produite par l'hypophyse antérieure des mammifères. Sa forme recombinante (rGH), produite par génie-génétique, est administrée en médecine humaine pour le traitement de pathologies affectant la croissance des individus, et en médecine vétérinaire afin de favoriser la cicatrisation de blessures. En dépit d'une législation qui interdit l'utilisation de cette molécule en Europe en tant que promoteur de croissance, son administration est suspectée dans le domaine du sport pour augmenter les performances physiques et dans les élevages pour accroître la production de lait et/ou de viande. Dans ce contexte de lutte anti-dopage, des méthodes de mesure sensibles et spécifiques de l'hormone, par LC-MS/MS, dans les fluides biologiques, ont été récemment développées. Cependant, celles-ci se heurtent au temps de demi-vie très court de la GH qui empêche ainsi un contrôle à long terme.

Une nouvelle approche, plus globale, de dépistage non spécifique de type métabolomique, a donc été envisagée dans le but de mettre en évidence une administration de somatotropine équine (reGH) à des chevaux. Ainsi, des empreintes métaboliques obtenues par couplage LC-ESI-HRMS, à partir d'échantillons urinaires collectés chez des chevaux traités et non traités à la reGH, ont été établies. Lors de ce processus de prise d'empreintes métaboliques, une attention particulière a été portée à la vérification de la robustesse de la répétabilité de la préparation d'échantillon et de la mesure. Les données brutes ont été retraitées à l'aide du logiciel xcms et analysées par Analyse en Composante Principale (ACP). Les résultats obtenus ont tout d'abord permis de démontrer la faisabilité de cette approche sur le plan analytique, et de mettre en évidence un certain nombre d'ions discriminants entre les deux populations étudiées. Une validation de ces ions en tant que biomarqueurs potentiels de l'administration de reGH ainsi que leur identification structurale doit être désormais réalisée dans le but d'obtenir une méthode de dépistage de la reGH basée sur le suivi de ces marqueurs.

## *Communications Posters*

### *Session Poster-P10*

#### **A comparison of analysis of amino acids in leaf extracts of Arabidopsis by gas-chromatography-time-of-flight-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography**

**Caroline Lelarge-Trouverie<sup>1</sup>, Caroline Mauve<sup>1</sup>, Gaëlle Bergot<sup>2</sup>, Dorothée Thominet<sup>2</sup>, Jean-Louis Prioul<sup>2</sup>, Graham Noctor<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Plate-forme "Métabolisme-Métabolome", IFR87 "La Plante et son Environnement", Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris sud XI, 91405 Orsay cedex, France*

<sup>2</sup>*Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris sud XI, UMR CNRS 8618, 91405 Orsay cedex, France*

Gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) has become a promising technique for simultaneous and rapid analysis of small metabolites in complex mixtures. The aim of this work was to establish the quantitative nature of the information generated of crude leaf extracts using GC-TOF-MS. Dried aliquots of methanol/water extracts of Arabidopsis leaves were analyzed in parallel by GC-TOF-MS following trimethylsilylation or high performance liquid chromatography and fluorescence detection of o-phthaldialdehyde derivatives (OPA-HPLC). Twenty amino acids could be routinely detected in leaf extracts by both methods. Because of instability of some trimethylsilylated derivatives, all GC-TOF-MS analyses were performed within a window of 2 h 30 min following derivatization. Repeatability studies showed that relative standard deviations for multiple injections of a single extract were below 20% for both techniques, though significantly smaller for OPA-HPLC. Similar between-extract variability and condition-independent biological variation were detected by OPA-HPLC and GC-TOF-MS, and both techniques detected similar environmentally induced changes in four major amino acids. Recovery of standard compounds through the extraction procedure was between 80% and 120% for OPA-HPLC but more variable when analysed by GC-TOF-MS. When quantified on the basis of tissue fresh weight according to response factors of mixed standards, the two techniques gave consistent values for a number of amino acids but divergent values for others. Taken together, the results suggest GC-TOF-MS analysis of Arabidopsis leaves with the present protocol provides useful information on biological variability in most amino acids.

1. Noctor G, Bergot G, Thominet D, Mauve C, Lelarge-Trouverie C, Prioul JL (2007) *Metabolomics* 3: 161-174.

**Mots-clés :** Amino acids, GC-TOF-MS, HPLC, Arabidopsis, Leaf

## *Session Poster-P11*

### **Comparative genetic and metabolic analyses of intra-specific variation in the genus *Saccharomyces***

**Marianne Defernez<sup>1</sup>, Donald A. MacKenzie<sup>1</sup>, Santiago R. M. Seco de Herrera<sup>2</sup>, Linda J. Fuller<sup>1</sup>, Georgina A. Pope<sup>1</sup>, Warwick B. Dunn<sup>3</sup>, Marie Brown<sup>3</sup>, and Ian N. Roberts<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK,*

<sup>2</sup>*Escuela de Ingenierias Agrarias, University of Extremadura, Carretera Caceres s/n 06071, Badajoz, Spain,*

<sup>3</sup>*Manchester Interdisciplinary Biocentre, 131 Princess Street, The University of Manchester, Manchester, M1 7DN, UK*

In the industrial sector there is a continuing need for new, more rapid methods for the improved characterisation of yeast strains. The identification and classification of yeast isolates is currently usually applied at the genomic level. However, the genetic complexity inherent in commercially used species such as brewing yeast strains can result in misclassification and often poor separation of closely-related strains. With this in mind, we have been employing metabolomic methods to differentiate yeast strains based on their metabolic activities.

Intra-specific variation at the genetic and metabolic level was investigated in a range of strains from the genus *Saccharomyces*, selected from the UK National Collection of Yeast Cultures ([www.ncyc.co.uk](http://www.ncyc.co.uk)). Several brewing strains were genetically fingerprinted by Amplified Fragment Length Polymorphism analysis and their metabolite profiles determined, following growth under defined conditions, by Direct Injection Mass Spectrometry and by Gas Chromatography-Time-of-Flight-Mass Spectrometry. A similar approach was applied to a group of medically associated yeast strains that included human clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* variants that are used as probiotic supplements. The closeness (or similarity) between strains estimated by univariate and multivariate (e.g. principal components analysis) analyses of the metabolic data varied when compared with the interrelationships inferred from genetic fingerprinting and did not correlate perfectly in all cases.

**Acknowledgements:** This work was supported by a BBSRC Competitive Strategic Grant.

## *Session Poster-P12*

### **Utilisation de profils métaboliques obtenus par RMN-<sup>1</sup>H pour la localisation spatiale de métabolites primaires dans le melon charentais**

**Benoît BIAIS<sup>1</sup>, Catherine DEBORDE<sup>1,2</sup>, Mickaël MAUCOURT<sup>1,2</sup>, Bertrand BEAUVOIT<sup>1</sup>, William ALLWOOD<sup>3</sup>, Roy GOODACRE<sup>3</sup>, Dominique ROLIN<sup>1</sup>, Annick MOING<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UMR619 Biologie du Fruit, INRA – Universités Bordeaux 1 - Victor Ségalen Bordeaux 2, <sup>2</sup> Plateforme Métabolome-Fluxome de l'IFR103 BVI, BP 81, F-33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>3</sup> Laboratory for Bioanalytical Spectroscopy, Manchester Interdisciplinary Biocentre, The University of Manchester, Manchester, M1 7DN, Royaume-Uni

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet européen META-PHOR (FOOD-CT-2006-036220) dont les objectifs sont de développer une plateforme européenne de phénotypage des végétaux par une approche « métabolome », des analyses biochimiques à l'analyse statistique et aux bases des données, en travaillant notamment sur le melon (<http://www.meta-phor.eu/>). Des mesures préliminaires de pH, d'indice de réfraction et/ou d'osmolarité, réalisées sur le jus de trois variétés de melons (Cézanne, Escrito et Hugo) cultivées en France (CEFEL, Moissac) ont montré des variations en fonction du tissu (épicarpe/mésocarpe) et de la position dans le mésocarpe. Une approche métabolomique a été mise en œuvre afin de mettre en évidence les métabolites primaires majeurs participant à ces variations. Des jus ont été recueillis à partir de sections réalisées dans des tranches longitudinales et équatoriales de melon puis additionnés de méthanol-d<sub>4</sub> et analysés par RMN du proton avec une référence électronique (ERETIC, Electronic REference To access In vivo Concentrations) permettant la quantification. D'une part, les signatures spectrales ont été analysées par analyse en composantes principales, après réduction des données (bucketing), et d'autre part, 14 métabolites ont été quantifiés. Ceci a permis de mettre en évidence une localisation hétérogène de certains métabolites avec l'existence de gradients notamment pour le saccharose, en accord par exemple avec les données de Sugiyama *et al.* (1999), mais aussi pour l'alanine et l'éthanol qui pourraient révéler des conditions hypoxiques. Le dosage de l'ATP et l'ADP par bioluminescence dans les différentes régions de la chair du fruit permettra d'étayer cette dernière hypothèse. Ces travaux seront également complétés par des analyses GC-TOF-MS et d'imagerie FT-IR.

Sugiyama *et al.* 1999. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 2715 -2718.



### *Session Poster-P13*

## **Metabolic profiles reveal changes induced by ochratoxin A, a feed-borne mycotoxin, in sheep.**

**H. BOUDRA<sup>1</sup>, M. GODEJOHANN<sup>2</sup> and D. P. MORGAVI<sup>1</sup>**

*1- INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint Genès-Champanelle.*

*2- Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Germany.*

Ochratoxins (OTs) are secondary metabolites produced by some species of *Aspergillus* and *Penicillium*. They are commonly found in foods and feeds and are highly toxic to animals. Ruminants are considered to be less sensible because OTs are hydrolysed by rumen microorganisms into a less toxic compound. However, it was recently found that the rumen detoxification action may be less important than previously reported as OT was detected in blood and milk of sheep receiving a contaminated feed. We used a combined LC-MS/NMR approach to follow changes in urinary metabolites of sheep throughout a 1-month exposure to contaminated feed. OT administration did not affect live zootechnical parameters. Principal component analysis of LC-MS and NMR data uncovered differences in the metabolic profiles of animals before and following exposition suggesting that these analytical tools could be used to monitor subtle, early metabolic changes induced by mycotoxins.

## *Session Poster-P14*

### **Profils métaboliques de plantes tropicales à racines et tubercules du Vanouatou, (Mélanésie)**

**A. Champagne<sup>1,2</sup>, S. Bernillon<sup>2</sup>, A. Moing<sup>2</sup>, L. Legendre<sup>1</sup>, D. Rolin<sup>2,3</sup>, V. Lebot<sup>4</sup>**

*1 UJM St Etienne - LBVPAM - Faculté de Sciences et Techniques, 23 rue du Dr P. Michelon, 42023 Saint Etienne cedex 2, France*

*2 INRA Bordeaux - UMR 619 BF, Centre INRA de Bordeaux BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France*

*3 Plateforme Métabolome-Fluxome de GFB - IFR103 BVI, Centre INRA de Bordeaux BP 81, 33140 Villenave d'Ornon, France*

*4 CIRAD Vanouatou - UR 75 – Equipe Plantes Tubéreuses, P.O.Box 946, Port Vila Vanouatou*

Etant donné l'importance des plantes à racines et tubercules dans de nombreux pays tropicaux, il serait grandement utile pour l'amélioration génétique des cultures de rente ou vivrières, de disposer de données précises sur les compositions chimiques des génotypes qui seront sélectionnés sur leurs valeurs propres. Ce travail porte essentiellement sur des plantes, qui sont d'un intérêt majeur pour les pays des régions tropicales : le taro, *Colocasia esculenta* ; le macabo, *Xanthosoma sagittifolium* ; l'allocase, *Alocasia macrorrhiza* ; des ignames, *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta*, *D. cayenensis*, *D. pentaphylla* ; la patate douce, *Ipomoea batatas* ; le manioc, *Manihot esculenta*.

Selon les variétés, les organes de stockage présentent des couleurs très variées, allant du blanc au violet foncé en passant par le jaune, l'orange, le rose, le rouge et le violet. Ces organes peuvent être de couleur uniforme, bicolore, voire tricolore, parfois, avec des fibres colorées ou non. Ces couleurs sont associées à des métabolites secondaires, des pigments, présents en concentrations variables, notamment des isoprénoïdes responsables de couleurs allant du jaune au rouge. C'est le subtil mélange de ces molécules qui donne les diverses couleurs de chair observées.

Un échantillon représentant les principales plantes à racines et tubercules consommées en Mélanésie, et au Vanouatou en particulier, a été choisi pour constituer un large spectre de plantes appartenant à quatre familles botaniques différentes. Dans une optique de sélection de ces plantes tropicales, le travail porte donc sur l'étude de la variabilité inter-spécifique des profils métaboliques. L'amélioration de plantes à multiplication végétative passe, en effet, par le choix judicieux de parents ainsi que par le criblage de grands nombres au niveau des descendances. 163 échantillons lyophilisés ont été extraits et les profils réalisés par CLHP, puis les teneurs et compositions ont été déterminées à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes. Les standards CLHP, choisis dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes, permettent d'établir des profils métaboliques, et d'étudier la variabilité au niveau interspécifique.

**Mots-clés :** Caroténoïdes, racines et tubercules, agrobiodiversité

## *Session Poster-P15*

### **Alteration of global metabolites accumulation in the leaves of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing a phloem protein of unknown function.**

**Gilles Clément<sup>1</sup>, Françoise Vilaine<sup>3</sup>, Stéphanie Boutet<sup>1</sup>, Jean-Pierre Boutin<sup>2</sup>, Pavel Kerchev<sup>3</sup> and Sylvie Dinant<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>: *Laboratoire commun de chimie du Végétal* <sup>2</sup>: *Laboratoire de biologie des semences,*

<sup>3</sup>: *Laboratoire de biologie cellulaire, Institut Jean Pierre Bourgin, INRA de versailles  
78026 Versailles France*

Among phloem specific transcripts found in Celery (Vilaine et al., 2003; Plant J. 36:67-81), one was found to share significant amino acid sequence similarity with *NHL 26* in *Arabidopsis thaliana* (*NHL* means, “NDR1/HIN1-like”, NDR1 meaning “nonrace-specific disease resistance gene” and HIN1 “harpin-induced gene1”). We determined that *NHL26* presents also a phloem specific pattern of expression in *Arabidopsis*. The similarity in tissue-specific expression of these two genes in unrelated species suggests that they may code for a conserved phloem specific function.

Over-expression of *NHL26* in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants induces anthocyanins, sucrose and starch accumulation in leaves, accompanied with plant growth defects. Ectopic expression limited to companion cells is sufficient to trigger these effects. The alteration of sugar accumulation was not associated to an increase in sucrose concentration in the phloem sap, suggesting a defect in sugar export.

In this work we realised a GC-EI-TOF metabolomic analysis of leaves from plants overexpressing *NHL26* and presenting various degrees of anthocyanins accumulation (high, medium and none) as well as leaves of the wild type Col 0 plants. Unexpectedly, we found that mutant plants accumulated not only mono and di-saccharides but also every amino-acid, several organic acids (malic, tartaric, sinapic, threonic, pentonic, etc.), nitrogen containing compounds such as urea, ethanolamine and putrescine, as well as large amount of glutamine and glutamate. One of our hypotheses is that the defect in sugar export induces a downstream effect on the assimilation of nitrogen compounds, as revealed by the increase in amino acids as well as glutamine and glutamate, consistent with the observation that carbon metabolism is tightly coupled to nitrogen assimilation. A few compounds seemed not affected such as glycerol and inositol.

## *Session Poster-P16*

### **Développement et application d'approches métabolomiques par LC-ESI-LTQ-Orbitrap™ pour le contrôle de l'utilisation frauduleuse de promoteurs de croissance en élevage.**

**Jean-Philippe ANTIGNAC, Claire LOPEZ, Fabrice MONTEAU et Bruno LE BIZEC**

*Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Ecole Nationale Vétérinaire (ENVN), USC INRA 2013, Nantes, France.*

Dans le domaine de la sécurité physico-chimique des aliments, le principal intérêt de la métabolomique est d'établir un lien entre d'une part une exposition chimique donnée, et d'autre part un état physiologique reflétant à la fois cette exposition et ses éventuels effets. Le développement de telles approches au sein du LABERCA est avant tout envisagé pour répondre à des besoins liés à son statut de Laboratoire National de Référence pour le contrôle de différentes familles de résidus et contaminants de l'environnement dans les denrées d'origine animale. En effet, le développement de nouvelles stratégies de contrôle, notamment en termes de dépistage à large spectre et à haut débit, est aujourd'hui une nécessité. La mise en évidence d'une administration illégale de xénobiotiques en élevage par la mesure indirecte d'un profil métabolique représente de ce point de vue un objectif du laboratoire. L'identification de biomarqueurs spécifiques signant une exposition à certains résidus et contaminants est un second objectif. La stratégie du laboratoire dans ce domaine est dans un premier temps d'accorder une attention toute particulière aux outils et méthodes utilisés. En effet, les nombreux choix techniques intervenant à chaque niveau du processus analytique ont une importance cruciale. La nature de la préparation des échantillons, le choix de la technique d'ionisation, le type d'analyseur, la stratégie d'acquisition du signal, et enfin le processus de traitement du signal brut, sont notamment autant d'éléments déterminants pour la qualité des données générées et donc pour leur interprétation. Dans ce contexte, après l'acquisition d'un équipement de type LTQ-Orbitrap™ autorisant à la fois une prise d'empreinte à très haute résolution et la possibilité de spectrométrie de masse multidimensionnelle, un certain nombre de travaux ont été menés afin de dégager un certain nombre de règles et de fixer un cadre analytique robuste pour ce genre d'approche. L'application support de ces travaux a consisté à différencier des échantillons de tissus collectés chez des bovins témoins *versus* traités aux stéroïdes anabolisants. Au-delà de la démonstration de l'efficacité de cette approche qui est un premier résultat majeur en soi, cette étude a notamment permis de mettre en évidence l'importance de la stratégie de traitement des échantillons sur les résultats obtenus, et plus précisément la complémentarité de différentes techniques qui, utilisées de façon concomitantes, peuvent aboutir à la génération de profils métaboliques dont le contenu informatif s'avère largement accru.

## Session Poster-P17

### Analyse en composante principale des variables caractérisant différentes classes de métabolites (phosphorés, hydrophiles ou lipophiles) obtenues par échantillonnage de plusieurs spectres de RMN.

D. Bon <sup>1</sup>, C. Camy <sup>1</sup>, L. Fanucchi <sup>1</sup>, F. Smih <sup>2</sup>, M. Galinier <sup>2</sup>, Ph. Rouet <sup>2</sup>, F. Desmoulin <sup>1,2</sup>

1- Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse

2- I2MR INSERM U858 Equipe 7 "Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques", Faculté de Médecine, 37, Allées Jules Guesde, 31073 Toulouse.

Les études en métabonomique ou visant à caractériser une empreinte métabolique par RMN sont réalisées essentiellement à partir de données provenant de l'échantillonnage automatisé d'un seul spectre du <sup>1</sup>H par individu statistique [1]. Cependant plusieurs types d'informations métaboliques peuvent être transmis selon la nature de l'échantillon ou le noyau atomique observé. Ces études étant fondamentalement basées sur l'analyse sans a priori des métabolites, il est donc pertinent de combiner les différentes informations métaboliques obtenues après échantillonnage de différents spectres par individu. La combinaison statistique des données a deux objectifs : le premier est d'aboutir à une meilleure discrimination entre groupes, le second est la possibilité de caractériser les corrélations existant entre différentes classes de métabolites (phosphorés, hydrophiles ou lipophiles).

Nous présentons les résultats et les écueils rencontrés au cours du développement de cette approche pour deux études. La première concerne l'analyse en composantes principales des données provenant des spectres HRMAS du <sup>1</sup>H et du <sup>31</sup>P [2], obtenus sur trois variétés de courges potagères (Potimarron et Bleu de Hongrie de l'espèce *Cucurbita maxima* et Butternut de l'espèce *Cucurbita moshata*). La seconde concerne l'analyse en composantes principales des données provenant des spectres du <sup>1</sup>H des fractions aqueuses et des fractions organiques d'extraits de tissus cardiaques de 4 groupes de rats SHHF obèses ou maigres (âgés de 4 et 10 mois) [3].

La transformation, nécessaire, de chaque matrice en une matrice de données centrées et réduites conduit à une augmentation du poids statistique des variables dont les valeurs sont proches du bruit. Deux méthodes ont été utilisées pour éliminer ces variables avant normalisation : l'écrêtage ou l'analyse supervisée de la variance des variables (ANOVA supervisée par une classification k-means).

Les informations complémentaires apportées par les métabolites phosphorylés augmentent très sensiblement la discrimination des échantillons issus des différentes variétés de courges potagères. L'analyse combinant les métabolites hydrosolubles aux lipides des échantillons de cœurs confirme que les rats SHHF obèses présentent une altération métabolique plus précoce que celles de rats SHHF maigres lors de l'évolution vers l'insuffisance cardiaque.

1 Beckonert O. et al, Nat. Protocols, 2007, 11 : 2692-2703.

2 Desmoulin F. et al., C.R. Chimie, 2007 disponible en ligne doi:10.1016/j.yjmcc.2006.11.007

3 Roncalli J. et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 2006, 42 : 526-539.

## *Session Poster-P18*

### **Identification of Myb transcription factor functions regulating secondary metabolism in *Arabidopsis Thaliana* by Metabolomics.**

**Laetitia Shintu<sup>1</sup>, Benedicte Lebouteiller<sup>2</sup>, Cathie Martin<sup>2</sup>, Ian J. Colquhoun<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Food Research, NRP, Colney, Norwich NR4 7UA, UK*

<sup>2</sup> *John Innes Centre, NRP, Colney, Norwich NR4 7UH, UK*

Generally, plant transcription factors belong to large families of proteins which share domains for DNA binding and protein-protein interaction. In the frame of our project, the transcription factors belong to the R2R3Myb gene family which is divided into sub-families sharing common biological functions dictated by their recognition of common DNA binding sites and their common interactions with other proteins. These transcription factors are involved in a wide range of processing including the control of secondary metabolism which is our area of interest.

We propose to use metabolite profiling techniques (NMR, LC/MS and LC/NMR) in order to determine the precise regulatory roles that these transcription factors play in *Arabidopsis* and to define the similarities and differences for the genes within a particular sub-family. For this purpose, the gene is over-expressed in several *Arabidopsis* lines. Then, the metabolism of these transgenic lines is compared to that of the control lines using multivariate statistical analysis (PCA, PLS-DA) which allows highlighting of the metabolites and pathways affected by the genetic modification.

In this poster, we show the methodology used for the study of one particular gene, AtMyb4, known to be a negative regulator of general phenylpropanoid metabolism, targeting in particular the expression of the gene encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) [1]. This methodology consisted in the study of NMR and LC/MS profiles of transgenic and control lines. Statistical analysis was used to characterise the metabolites responsible of the discrimination between the two groups. The identification of the most discriminant metabolites was performed using inhouse databases and the LC/NMR technique.

[1] Jin *et al.*, EMBO J., 2000, 19:6150-6161.

## *Session Poster-P19*

### **Etude de la voie de biosynthèse des strigolactones et de leur implication dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules**

**Maria-Victoria Gomez-Roldan<sup>1</sup>, Virginie Puech-Pages<sup>1</sup>, Saida Danoun<sup>1</sup>, Fabien Létisse<sup>2</sup>, Jean-Charles Portais<sup>2</sup>, Rada Matusova<sup>3</sup>, Harro Bouwmeester<sup>3</sup>, Soizic Rochange<sup>1</sup>, Guillaume Bécard<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>SCSV, UMR 5546, Université de Toulouse 3-CNRS, Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup>Laboratoire Biotechnologie - Bioprocédés, INSA, Toulouse, France

<sup>3</sup>Laboratory for Plant Physiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Tél: (33) 5 62 19 35 11 ; e-mail : gomez@scsv.ups-tlse.fr

La symbiose mycorhizienne à arbuscules est une association entre les racines des plantes (80% des espèces végétales) et certains champignons du sol (Gloméromycètes). Cette symbiose, aujourd'hui très répandue, a été conservée au cours de l'évolution car elle contribue à améliorer la nutrition hydrique et minérale des plantes.

Avant même que les deux partenaires symbiotiques n'entrent en contact, ils interagissent et se reconnaissent via un dialogue moléculaire. Il a été montré que des molécules appelées strigolactones présentes dans les exsudats racinaires, stimulent la croissance du champignon et seraient utilisées par le celui-ci comme signaux de reconnaissance de la plante hôte (1). Les strigolactones ont été proposées comme étant des dérivées de caroténoïdes (2). Elles sont exsudées à très faibles concentrations, et particulièrement difficiles à détecter.

Afin de caractériser la voie de biosynthèse des strigolactones et de déterminer l'importance de ces composés dans la symbiose mycorhizienne, nous avons analysé par UPLC-Q-TOF les exsudats de différents mutants de pois affectés dans des enzymes de clivage des caroténoïdes. Nous avons montré que ces mutants ne produisaient plus de strigolactones confirmant ainsi l'origine biosynthétique de ces molécules (apocaroténoïdes). Nous avons aussi montré que ces mutants étaient affectés dans leur capacité à être mycorhizés. Grâce au logiciel Metabolyx (Waters) nous avons observé que les exsudats racinaires des mutants et sauvages de pois présentaient d'autres différences dans leur profil métabolomique.

1. Besserer *et al.* PLoS Biol, 2006, 4 (7) : e226

2. Matusova *et al.* (2005) Plant Physiol 139 : 920-34

## **ANALYSE DU PROFIL METABOLIQUE CHEZ DES PLANTS DE TOMATE EN REPONSE AU STRESS CADMIQUE**

**H. HEDIJI<sup>1</sup>, C. CABASSON<sup>2</sup>, P. GALLUSCI<sup>2</sup>, W. DJEBALI<sup>1</sup>, M. MAUCOURT<sup>3</sup>, A. BERTRAND<sup>2</sup>, C. DEBORDE<sup>3</sup>, A. MOING<sup>2</sup>, P. BALDET<sup>2</sup>, D. ROLIN<sup>2</sup>, R. BROUQUISSE<sup>4</sup> et W. CHAÏBI<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>*Unité de Biologie et Physiologie Cellulaires Végétales. Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie*

<sup>2</sup>*UMR 619 Biologie du Fruit, INRA, Universités Bordeaux 1 et Bordeaux 2, BP 81, F-33140 Villenave d'Ornon, France*

<sup>3</sup>*Plateforme Métabolome-Fluxome de GFB, IFR 103 BVI, BP 81, F-33140 Villenave d'Ornon, France*

<sup>4</sup>*UMR IPMSV Centre de Sophia Antipolis, BP 167, F-06903 Sophia Antipolis Cedex, France*

Le cadmium (Cd) est un polluant chimique, toxique pour les plantes et les animaux, qui entraîne de profonds dysfonctionnements cellulaires [1]. Ses effets sur les principaux pools de métabolites primaires et secondaires (22 et 25 métabolites respectivement pour les fruits et les feuilles) de plants de tomate ont été analysés par spectroscopie de RMN du proton et par HPLC. Cette étude a porté sur les organes aériens (feuilles et fruits mûrs) de plants de Tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivés en hydroponie en présence de différentes concentrations en cadmium (0, 20 et 100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>).

Les analyses univariées et multivariées des profils métaboliques obtenus révèlent des modifications significatives des teneurs en certains métabolites en fonction de la concentration en Cd et de l'organe considéré. Parmi la vingtaine de métabolites primaires quantifiés (sucres, acides aminés et acide organiques), en présence de 20  $\mu\text{M}$  de Cd par exemple, la plupart diminue dans les jeunes limbes (acides organiques, glutamine...) alors que dans les limbes matures la majorité augmente (saccharose, citrate...). En outre, le Cd entraîne une chute globale des teneurs en isoprénoïdes dans les limbes foliaires matures et dans les fruits à l'exception de la teneur en  $\alpha$  tocophérol (Vitamine E) qui augmente significativement dans tous ces organes.

L'analyse en composantes principales (ACP), réalisée sur l'ensemble des métabolites, permet de discriminer les plantes témoins des contaminées. Les variables qui ont la plus forte contribution sont le citrate, connu comme chélateur du Cd, et le tocophérol, que l'on suppose contribuer au renforcement du système de défense de la plante contre la production massive d'espèces oxygénées réactives.

Cette approche métabolomique permet de mettre en évidence des modifications du réseau métabolique en réponse au stress cadmique.

1 Sanita di Toppi L. and Gabrielli R. Environ Exp Bot (1999) 41:105-130.



## *Session Poster-P21*

### **La LIPIDOMIQUE : Une approche de métabolomique ciblée, complément essentiel d'études en Transcriptomique, Génomique ou Physiologie.**

**Justine Bertrand-Michel<sup>1,2</sup>, V. Roques<sup>1,2</sup>, M.A. Madoui<sup>3</sup>, B. Dumas<sup>3</sup>, J.P. Niel<sup>4</sup>, J. P. Miolan<sup>4</sup>, S. Rebouissou<sup>5</sup>, J. Zucman-Rossi<sup>5</sup> & F. Tercé<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Plateau de Lipidomique, IFR 30, Génopole de Toulouse, CPTP bât c, CHU Purpan BP 3028, 31024 TOULOUSE Cedex 3. Tél : 05 62 74 86 56 <http://www.ifr30.toulouse.inserm.fr/>*

<sup>2</sup>*Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, F-31300 France*

<sup>3</sup>*UMR 5546 CNRS-Université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan*

<sup>4</sup>*Laboratoire de Physiologie Neurovégétative, UMR CNRS 6153 - INRA 1147, IFR 11, Université Paul Cézanne, Marseille*

<sup>5</sup>*INSERM U674, Génomique fonctionnelle des tumeurs solides, Paris*

La lipidomique s'inscrit dans le développement récent des moyens d'étude du monde du vivant (toutes approches en « omique » confondues) et peut-être considérée comme de la métabolomique ciblée dans le monde complexe des lipides. Le plateau technique de Lipidomique de l'IFR30-Génopole de Toulouse est spécialisé dans l'analyse qualitative et quantitative de lipides sur tout type de micro-échantillons (tissus, biofluides, cellules, parasites, végétaux...). Nous proposons des analyses de lipides neutres, stérols, acides gras libres ou totaux, céramides, sphingomyélines, phospholipides, acides biliaires ou encore des profils de lipoprotéines, permettant d'apporter une expertise dans des études où la modulation du métabolisme lipidique est une donnée potentiellement importante. Nous présentons au travers de 3 exemples, la pertinence d'une analyse de lipidomique ciblée venant en complément d'approches en transcriptomique, génomique ou en physiologie :

1- L'étude de l'origine moléculaire du stockage lipidique dans des adénomes hépatocellulaires (HCA) dont la protéine HNF1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) est mutée : une analyse lipidique semi-globale corrobore les modifications observées en transcriptomique en comparant tissus sains et HCA.

2- L'étude de la voie de synthèse des stérols chez *Aphanomyces euteiches* (micro-organisme pathogène de plantes cultivées) : l'analyse des stérols par lipidomique corrélée à l'étude génomique permet de proposer de nouvelles cibles pour de futurs fongicides.

3- La démonstration d'une nouvelle voie de transmission de l'influx nerveux ne dépendant pas des potentiels d'action: l'analyse par lipidomique a permis de montrer l'implication dans cette voie de la génération de céramides dans les rafts de fibres nerveuses sur un modèle physiologique de ganglion coeliaque du lapin.

Contact : [justine.bertrand-michel@toulouse.inserm.fr](mailto:justine.bertrand-michel@toulouse.inserm.fr)

## Session Poster-P22

### **Profils métaboliques de pêche: une étude des métabolites primaires et secondaires par RMN-<sup>1</sup>H et HPLC de deux descendance révèle de profondes variations entre génotypes et la présence de composés inattendus.**

**JL Poëssel<sup>1</sup>, C Croset<sup>1</sup>, C Renaud<sup>2</sup>, B Quilot<sup>1</sup>, C Deborde<sup>3-4</sup>, E Dirlewanger<sup>2</sup>, M Maucourt<sup>3-4</sup>, S Monllor<sup>2</sup>, V Signoret<sup>1</sup>, T Pascal<sup>1</sup>, P Arus<sup>5</sup>, A Moing<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRA, UR1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, BP 94, F-84143 Montfavet, France

<sup>2</sup>INRA, UR419 Espèces Fruitières, BP81, F-33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>3</sup>INRA, Université Victor Segalen Bordeaux2, Université Bordeaux 1, UMR619 Biologie du Fruit, BP 81, F-33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>4</sup>Plateforme Métabolome-Fluxome de GFB, IFR 103 BVI, BP81, F-33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>5</sup>IRTA, Centre de Recerca en Agrigenòmica CSIC-IRTA-UAB, Crta. de Cabrils Km 2, E-08348 Cabrils, Spain

Le projet intégré européen ISAFRUIT (2006-2010, n° FP6-FOOD 016279-2) est un programme de recherches pluridisciplinaires ayant pour objectifs d'accroître la consommation de fruits par la fourniture de produits de haute qualité, issus de méthodes de production durables et respectueuses de l'environnement, et de contribuer ainsi à l'amélioration de la santé humaine. L'analyse des bases génétiques de la composition des fruits en vue de la création de nouvelles variétés fruitières de haute qualité est abordée dans le programme de travail Genfruit (Workpackage 6.1) sur deux espèces fruitières majeures du genre *Prunus*, le pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) et l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.). Le phénotypage biochimique des fruits de pêcher présenté ici est engagé sur deux descendance issues de croisements intra et interspécifiques, respectivement entre deux cultivars présentant des caractères de qualité très contrastés et entre deux cultivars et une espèce sauvage apparentée au pêcher, *Prunus davidiana* (Carr.) Franch.

L'analyse de la composition des fruits d'environ 120 hybrides par descendance, par une approche non ciblée de profilage métabolique par RMN-<sup>1</sup>H 1D pour les métabolites majeurs et par HPLC-DAD ciblée pour les composés phénoliques, a permis de révéler une grande diversité de métabolites présents dans la chair. Ainsi, plus de 70 composés phénoliques ont été détectés et la caractérisation de certains d'entre eux par LC-MS est en cours. Un composé cyanogénique caractéristique des organes végétatifs du pêcher, la prunasine, a également été mis en évidence de manière inattendue dans la chair des fruits. Des variations quantitatives très importantes entre génotypes ont été observées pour la plupart des composés. Enfin des corrélations entre teneurs en métabolites primaires et secondaires ont été mises en évidence. L'origine de ces corrélations est discutée.

La cartographie génétique menée en parallèle permettra à terme de localiser des loci (QTL) impliqués dans le contrôle génétique des teneurs en métabolites du fruit. La cartographie en cours de 150 gènes candidats impliqués dans le métabolisme des sucres, des acides organiques et des polyphénols permettra également de mettre en évidence des co-localisations entre gènes candidats et QTL et d'émettre des hypothèses fonctionnelles sur l'origine des variations quantitatives observées.

## Session Poster-P23

### **Biofluid MS-based metabonomics in nutrition research - Pup metabolic responses to protein restriction during pregnancy in rat.**

**Marie-Cécile ALEXANDRE-GOUABAU\*<sup>1</sup>, Jean-Philippe ANTIGNAC<sup>2</sup>,  
Pascale FANCA<sup>1</sup>, Dominique DARMAUN<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes, Cedex 3, France ; <sup>2</sup> Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Ecole Nationale Vétérinaire (ENVN), USC INRA 2013, Nantes, France.

**BACKGROUND:** Relatively small birth size has been associated with a higher risk of cardiovascular disease, hypertension and type II diabetes in human adult. It has been hypothesised that associations between perinatal factors and adult diseases may be attributed to intrauterine growth retardation (IUGR) that in turn leads to persistent changes in organ structure or function and metabolic aberrations. We have previously shown alterations in the expression level of mitochondrial proteins involved in the energy generation in the colonic crypts of intrauterine growth restricted rats, which seems to be in agreement with this hypothesis. In this study, we used a metabonomic approach to provide an inside in the metabolic adaptative responses of the babies to a protein restriction during pregnancy.

**AIM:** To generate plasmatic comprehensive profiles of low-molecular-weight metabolites of new born that are modulated in response to a low-protein diet during gestation in order to get a better understanding of the mechanisms of metabolic alterations linked to IUGR.

**METHODS:** Blood samples were collected into heparinized tubes from IUGR (born from protein deprived mothers) and control young (5, 12 and 16 days of life) rats and immediately centrifugated at 3000g for 10 min at room temperature. Plasma were separated and stored at -80°C until analysis by LC-ESI-HRMS (Thermo LTQ-Orbitrap™). Minimal sample preparation consisted to a 10kD cut-off filtration for discarding a majority of proteins that could disturb the LC-ESI-HRMS fingerprinting process. An Uptisphere C<sub>18</sub> stationary phase was used for the HPLC separation (150 x 2.1, 3.5 µm). Elution gradient consisted to (A) water with 0,1% acetic acid and (B) acetonitrile from 0:100 to 100:0 (v/v, A/B) over 30 min and flow rate set at 200 µL/min. Positive ions generated by electrospray ionization were monitored in full scan mode [m/z 50-800] at a 30,000 resolution. Raw data were processed by the *xcms* software. Principal component analysis (PCA) was then applied to the *xcms*-processed data to explore the relationships between the different analysed samples and reveal potential groups associated to the IUGR factor investigated in this study.

**RESULTS:** Our preliminary results first indicated that the main factor explaining the observed non supervised classification of the plasmatic profiles corresponded to the age of the IUGR and control rats, *i.e.* the stage of development. Then, despite an intersubject variability in the plasma composition, consistent metabolic changes could be also identified following protein restriction during gestation (*i.e.* IUGR *versus* control rats), whatever the considered age. Finally, some of the ions found discriminant between IUGR *versus* control rats are common between the different age groups (J5, J12 and J16).

**CONCLUSION:** LC-ESI-HRMS metabonomic fingerprinting performed on plasma samples collected from IURG *versus* control rats revealed metabolic perturbations which could result from nutritional stimuli during gestation. Additional work is now on-going to confirm these preliminary results as well as the chemical structure of the biomarkers revealed by this approach.

**Quantification de signaux RMN-HRMAS proton du cerveau de rongeur : application aux désordres métaboliques lors de Crises Epileptiques induites par un gaz neurotoxique**

**F. Fauvelle<sup>1</sup>, H. Rabeson<sup>2</sup>, G. Testylier<sup>3</sup>, D. Graveron-Demilly<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>-CRSSA/BCM, RMN, La Tronche, France;

<sup>2</sup>- CREATIS-LRMN; CNRS UMR 5220; INSERM U630 ; Université Lyon 1; INSA de Lyon ; Villeurbanne, France

<sup>3</sup>-CRSSA/Toxicologie, La Tronche, France

**Introduction**

Le Soman est un gaz neurotoxique inhibiteur irréversible des cholinestérases. Il induit des crises épileptiques qui peuvent durer plusieurs heures, conduisant à des lésions neuronales dans plusieurs régions cérébrales, principalement le cortex piriforme et l'hippocampe. On connaît peu les désordres métaboliques induits par le soman, alors que les perturbations électrophysiologiques et histologiques à différentes phases de l'intoxication sont bien connues<sup>1</sup>.

Le but de cette étude est donc d'analyser par RMN HRMAS proton les variations de proportion des métabolites cérébraux à différentes phases de l'intoxication.

**Matériel et Méthode**

Six groupes d'animaux ont été intoxiqués et sacrifiés à 1h, 4h, 24h, 48h, 72h et 7 jours après. Les spectres RMN <sup>1</sup>H des biopsies intactes de cortex piriforme et de cervelet ont été acquis à 400MHz sur un spectromètre Bruker Avance 400 avec une séquence CPMG (temps d'écho de 30 ms) pour atténuer le signal des lipides et macromolécules.

La quantification a été réalisée avec la procédure Subtract-QUEST de l'algorithme jMRUI (<http://www.mrui.uab.es/mrui/>) en utilisant une base de 23 signaux de métabolites simulés.

**Résultats**

Durant la phase initiale (1h à 4h après l'injection du Soman), les concentrations de l'Alanine, de l'Acétate, de la Choline et du GABA varient fortement.

Lorsque les lésions neuronales sont bien installées (1 à 3 jours après l'intoxication), ce sont les concentrations du Lactate et de la Glutamine qui augmentent tandis que celles du MyoInositol et du NAA diminuent.

**Discussion**

Différents profils métaboliques ont été clairement identifiés, correspondant aux événements majeurs induits par l'intoxication. La quantification rapide et fiable des séries de signaux RMN-HRMAS est possible avec l'algorithme QUEST.

La méthode est maintenant utilisée au laboratoire pour l'étude d'autres stress cérébraux sur modèle rongeur.

<sup>1</sup> Lemerrier *et al.*, 1983, *Acta Neuropathol.* 61:123-129

## *Session Poster-P25*

### **Caractérisation par approche lipidomique d'un mutant de levure affecté dans le métabolisme lipidique**

**Sophie Ayciriex\*, Marina Le Guédard\*, Jean-Marie Schmitter<sup>o</sup>, René Lessire\*, Jean-Jacques Bessoule\*, Eric Testet\***

*\*Laboratoire de biogenèse membranaire UMR 5200 CNRS – Université Bordeaux 2*

*<sup>o</sup>Institut Européen de Chimie et Biologie de Bordeaux (IECB)*

De récents développements en spectrométrie de masse ont montré qu'il était devenu possible de réaliser une identification précise et une quantification de l'ensemble des espèces moléculaires d'un extrait lipidique cellulaire et de constituer ainsi une véritable empreinte lipidique du contenu d'une cellule dans un état physiologique donné.

Ce projet de recherche vise à mettre en place des méthodes d'analyse globale du lipidome de *S. cerevisiae* par spectrométrie de masse et à les appliquer dans des recherches de type approche lipidomique. Dans le cadre d'une première application biologique, nous avons comparé l'empreinte lipidique d'un mutant de délétion pour un gène du métabolisme lipidique avec celle de la souche sauvage. Nous avons alors examiné les effets de la délétion sur la composition en espèces moléculaires des lipides et obtenu des informations sur la fonction de l'enzyme, une acyltransferase impliquée dans le remodelage des phospholipides.

A terme, notre objectif sera de développer des supports méthodologiques étendus aux cellules végétales et animales. Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de l'offre de service de la plateforme Métabolome-Fluxome de Génomique Fonctionnelle Bordeaux. Il bénéficie des moyens du laboratoire de spectrométrie de masse de l'IECB. Sophie Ayciriex est financée par une Bourse de Docteur Ingénieur CNRS – Conseil Régional Aquitaine.

## Session Poster-P26

### Metabolite profiling as a tool to examine genotype-environment interactions

**Caroline Mauve<sup>1</sup>, Jutta Hager<sup>2</sup>, Caroline Lelarge-Trouverie<sup>1</sup>, Dorothée Thominet<sup>2</sup>, Till Pellny<sup>3</sup>, Jean-Louis Prioul<sup>2</sup>, Rosine De Paepe<sup>2</sup>, Christine H. Foyer<sup>4</sup>, Graham Noctor<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Plateforme "Métabolisme Métabolome", IFR87 "La Plante et son Environnement", Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris sud XI, 91405 Orsay cedex, France

<sup>2</sup>Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris sud XI, UMR CNRS 8618, 91405 Orsay cedex, France

<sup>3</sup>Rothamsted Research, Harpenden, Herts AL5 2JQ, UK

<sup>4</sup>School of Agriculture, Food and Rural Development, Agriculture Building, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, NE17RU, UK.

The *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant lacks mitochondrial complex I and respire through alternative NADH dehydrogenases. To analyze how the metabolic phenotype of this mutant interacts with the environment, targeted quantitative metabolite analyses and non-targeted metabolite profiling was performed on leaves of wild-type and CMSII tobacco growing under different CO<sub>2</sub> and nitrogen regimes. Samples were subject to spectrophotometric analysis of NADH and NAD<sup>+</sup> [1], gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (GC-TOF-MS) analysis of 71 metabolites followed by hierarchical clustering of compounds that showed significant genotype- or condition-dependent variation, and amino acid analysis by quantitative HPLC [2]. This analysis showed that : 1. NAD(H) contents were dependent on both genotype and nutritional conditions; 2. for plants growing on either nitrate or ammonium nitrate, the most striking genotype-dependent differences in GC-TOF-MS profiles were observed for amino acids; 3. at low nitrogen genotype-dependent differences in GC-TOF-MS profiles were much less marked; 4. genotype-dependent metabolite profiles could be fractionated into photorespiration-dependent and -independent groups; 5. most of the condition- and genotype-dependent differences in amino acids detected by GC-TOF-MS were confirmed by HPLC; 6. a good correlation was observed between NAD(H) and total amino acid contents across all the sample groups.

#### References

1. Queval G, Noctor G (2007) *Analytical Biochemistry* 363: 58-69
2. Noctor G, Bergot G, Thominet D, Mauve C, Lelarge-Trouverie C, Prioul JL (2007) *Metabolomics* 3: 161-174

**Mots-clés :** CMSII, NADH, NAD<sup>+</sup>, GC-TOF-MS, HPLC, amino acids

*Session Poster-P27*

**600 MHz-<sup>1</sup>H NMR profiling for quality assessment of greenhouse-grown tomato fruit**

**M. Maucourt<sup>1,2</sup>, C. Deborde<sup>1,2</sup>, S. Keller<sup>3</sup>, M. Spraul<sup>3</sup>, B. Biais<sup>1,2\*</sup>, S. Bernillon<sup>1,2</sup>, P. Baldet<sup>2</sup>, C. Favé<sup>3</sup>, D. Rolin<sup>1,2</sup>, A. Moing<sup>1,2</sup>**

*1 Plate-forme RIO-IBiSA Métabolome-Fluxome, IFR103 BVI, 2UMR619 Fruit Biology, INRA - Universités Bordeaux 1 - Victor Ségalen Bordeaux 2, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon cedex, France*

*3 Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany*

*4 Hortis-Aquitaine, Domaine de Lalande, F-47110 Sainte Livrade, France*

The third region for tomato (*Solanum lycopersicum* L.) production in France is Aquitaine (South-West of France, more than 50 000 t per year for the fresh market). The major part of Aquitaine production is now grown soilless under greenhouse conditions with harvest from March to November. In order to characterize changes in the fruit organoleptic quality during an entire season, two varieties ('Palmiro' harvested in bulk and 'Clotilde' harvested in clusters) were studied during 8 months (March to October). Fruits were harvested at commercial maturity once a month. The seeds and locular tissue were separated from the rest of the fruit (deseeded fruit). Proton NMR analysis (<sup>1</sup>H-NMR) of polar extracts of deseeded fruit samples was performed on Metabolic Profiler (600 MHz) equipped with a 5 mm TCI cryoprobe to provide an overview of some major determinants of the fruit organoleptic quality. Each <sup>1</sup>H-NMR spectra was acquired in less than 3 min. The <sup>1</sup>H-NMR spectra were processed to identify the major metabolites including soluble sugars, organic acids and amino acids. The NMR data were visualized with Principal Component Analysis using AMIX software (v 3.7.10) to reveal sample dissimilarities and to highlight discriminant metabolites.

## *Liste des Participants*

**Alexandre-Gouabau Marie-Cécile**

CHU - Hotel DIEU  
HNB1 - UMR PhAN (Physiologie des  
Adaptations Nutritionnelles)  
44093Nantes cedex 1

**Andrieu Marie-Hélène**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Antignac Jean-Philippe**

ENV  
Laberca  
44307 Nantes cedex 3

**Ayciriex Sophie**

UMR 5200, Université Bordeaux II  
33076 Bordeaux cedex

**Beaujard François**

UMR PIAF  
INRA Centre de Clermont-Ferrand  
63100 Clermont-Ferrand

**Beauvoit Bertrand**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Bergot Gaëlle**

INRA  
Biochimie bactérienne  
78352 Jouy-en-Josas cedex

**Bernard Laurence**

INRA  
Unité de Recherche sur les Herbivores  
63122 Saint Genès Champanelle

**Bernillon Stéphane**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Bertrand-Michel Justine**

Plateau de LIPIDOMIQUE  
IFR30 INSERM U563 Bat C CHU Purpan  
31024 Toulouse cedex 3

**Beurton-Aimar Marie**

Université de Bordeaux  
LaBRI  
33405 Talence cedex

**Biran Marc**

UMR 5536 RMSB CNRS / Université Victor  
Segalen Bordeaux 2  
33076 Bordeaux

**Blay David**

Dionex SA  
31672 Labège

**Bon Delphine**

Université Paul Sabatier  
Laboratoire de Synthèse et Physicochimie de  
Molécules d'Intérêt Biologique  
UMR 5068 Groupe de RMN Biomédicale  
31062 Toulouse cedex 9

**Bouchereau Alain**

UMR 118 INRA-Agrocampus Rennes-  
Université de Rennes 1  
35042 Rennes cedex

**Boudra Hamid**

INRA, UR1213 Herbivores  
63122 Saint Genès Champanelle

**Briand Gilbert**

CHRU Lille  
59037 Lille

**Bringaud Frédéric**

Centre de Résonance Magnétique des  
Systèmes Biologiques (RMSB), UMR-5536  
CNRS Université Victor Segalen Bordeaux 2,  
33076 Bordeaux cedex

**Bromet Norbert**

Biotec Centre  
45071 Orléans cedex 2

**Cabasson Cécile**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon



**Cahais Vincent**

INRA UNH, Plateforme Métabolisme et  
Spectrométrie de Masse  
63122 Saint Genès Champanelle

**Camarasa Carole**

INRA Montpellier Sciences pour l'Œnologie  
34060 Montpellier cedex 01

**Canlet Cécile**

INRA/ENVT UMR Xénobiotiques  
31931 Toulouse cedex 9

**Celton Magalie**

INRA Montpellier Sciences pour l'Œnologie  
34060 Montpellier cedex 01

**Champagne Antoine**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Chorao Charlène**

S.E.E.S.I.B UMR 6504  
63177 Aubière cedex

**Claude Christian**

Waters  
78056 Saint-Quentin-en-Yvelines

**Clément Gilles**

INRA LCCV  
INRA Versailles-Grignon,  
78026 Versailles

**Colombié Sophie**

UMR Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33883 Villenave d'Ornon

**Combourieu Bruno**

Université Blaise Pascal / CNRS  
S.E.E.S.I.B UMR 6504  
63177 Aubière cedex

**Courant Frédérique**

ENV  
Laberca  
44307 Nantes cedex 3

**Coutant Jérôme**

Bruker  
67166 Wissembourg

**Dabadie Christophe**

Thermo Fisher Scientific  
91963 Courtaboeuf cedex

**Danoun Saïda**

CNRS-UPS UMR5546  
Pôle de Biotechnologie Végétale  
31326 Castanet

**de Daruvar Antoine**

CBiB  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
33076 Bordeaux cedex

**Deborde Catherine**

Plate-forme Métabolome-Fluxome, IFR103  
BVI, UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Defernez Marianne**

Institute of Food Research  
Norwich, UK

**Delort Anne-Marie**

S.E.E.S.I.B  
CNRS-Université Blaise Pascal  
63177 Aubière cedex

**Desmoulin Franck**

I2MR INSERM U858  
Equipe "Obésité et insuffisance cardiaque:  
approches moléculaires et cliniques"  
Faculté de Médecine, Service de  
Pharmacologie  
31073 Toulouse

**Desoubzdanne Denis**

Université Paul Sabatier  
Laboratoire SPCMIB  
31062 Toulouse cedex 9

**Dieuaide-Noubhani Martine**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Diolez Philippe**

UMR 5536 CNRS / Université Victor Segalen  
Bordeaux 2  
33076 Bordeaux

**Domange Céline**

INRA/ENVT UMR Xénobiotiques  
31931 Toulouse cedex 9

**Domergue Frédéric**

UMR 5200, Université Bordeaux II  
33076 Bordeaux cedex

**Dumas Marc-Emmanuel**

Centre de RMN à Très Hauts Champs,  
Ecole Normale Supérieure de Lyon,  
69364 Lyon, cedex 7.

**Ezan Eric**

CEA  
DSV/IBiTec-S/SPI/LEMM  
91191 Gif sur Yvette cedex

**Fauvelle Florence**

CRSSA (centre de recherche du service de  
santé des armées)  
Biophysique Cellulaire et Moléculaire,  
laboratoire de RMN  
38702 La Tronche cedex

**Fernandez Xavier**

UMR TANDEM, ENSAT  
Avenue de l'agrobiopole  
31320 Auzeville Tolosane

**Ferry-Dumazet Hélène**

CBiB  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
33076 Bordeaux cedex

**Gomez-Roldan Marie-Victoria**

CNRS-UPS UMR5546  
Pôle de Biotechnologie Végétale  
31326 Castanet

**Gravot Antoine**

UMR 118 INRA-Agrocampus Rennes-  
Campus de Beaulieu, Université Rennes 1  
35042 Rennes cedex

**Hall Robert**

Centre for BioSystems Genomics CBSG2012  
6700 AB Wageningen NL

**Haroune Nicolas**

Chemispec  
Wharncliffe street, Darwin Building,  
University of sunderland  
Sunderland, UK

**Hébert Yann**

Bruker Daltonique  
67166 Wissembourg

**Hediji Hédia**

Faculté des Sciences de Tunis  
Unité de Biologie et Physiologie Cellulaires  
Végétales  
Tunis, Tunisie

**Henri Raphaël**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Universités Bordeaux 1 & 2  
3140 Villenave d'Ornon

**Heux Stéphanie**

ETH Zürich  
8093 Zurich, Suisse

**Husarova Slavomira**

S.E.E.S.I.B  
CNRS-Université Blaise Pascal  
63177 Aubière cedex

**Jacob Daniel**

CBiB  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
33076 Bordeaux cedex

**Jourdan Fabien**

UMR1089 Xénobiotiques INRA-ENVT  
31931 Toulouse cedex

**Kieken Fanny**

ENV  
Laberca  
44307 Nantes cedex 3

**Laurent Gil**

CBiB  
Université Bordeaux 2  
33076 Bordeaux cedex

**Le Floc'h-Burban Nathalie**

INRA  
SENAH  
35590 Saint-Gilles

**Lelarge-Trouverie Caroline**

Institut de Biotechnologie des Plantes  
UMR 8618 Université Paris Sud - CNRS,  
Bâtiment 630  
91405 ORSAY Cedex

**Lemosquet Sophie**

INRA UMR PL  
35590 Saint Gilles

**Létisse Fabien**

INSA Toulouse  
Ingénierie des Systèmes Biologiques et des  
Procédés, UMR5504, UMR792 CNRS, INRA,  
INSA31077 Toulouse cedex 4

**Lugan Rafaël**

UMR 6026 CNRS-Université de Rennes1  
Campus de Beaulieu  
35042 Rennes cedex

**Marsden-Edwards Emma**

Waters Corporation  
Atlas Park, Manchester M22 5PP, UK

**Martin Jean-François**

INRA  
UNH, Plateforme Métabolisme et  
Spectrométrie de Masse  
63122 Saint Génès Champanelle

**Martin Jean-Charles**

UMR INRA 1260/INSERM 476, Nutrition  
Humaine et Lipides : Biodisponibilité,  
métabolisme et régulations,  
Faculté de médecine de La Timone  
13385 Marseille cedex 5

**Massou Stéphane**

INSA Toulouse  
Ingénierie des Systèmes Biologiques et des  
Procédés, UMR5504, UMR792 CNRS, INRA,  
INSA31077 Toulouse cedex 4

**Maucourt Mickaël**

Plate-forme Métabolome-Fluxome, IFR103  
BVI, UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Université Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Mauve Caroline**

Institut de Biotechnologie des Plantes  
Université Paris Sud - CNRS,  
Bâtiment 630  
91405 ORSAY Cedex

**Mazat Jean-Pierre**

Laboratoire de Physiologie Mitochondriale  
Université Bordeaux 2 et INSERM  
33076 Bordeaux cedex

**Métreau-Grognet Elisabeth**

Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse  
91191 Gif sur Yvette cedex

**Moing Annick**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Universités Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Monnet Véronique**

INRA  
Biochimie bactérienne  
78352 Jouy-en-Josas cedex

**Morvan Daniel**

INSERM U484  
63005 Clermont-Ferrand

**Mounet Fabien**

UMR619 Biologie du Fruit  
INRA Universités Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Netter Claude**

Dionex S.A.  
78960 Voisins le Bretonneux

**Noctor Graham**

Institut de Biotechnologie des Plantes  
UMR 8618 Université Paris Sud - CNRS,  
Bâtiment 630  
91405 ORSAY Cedex

**Pages Virginie**

Université Paul Sabatier  
CNRS UPS UMR5546  
31326 Castanet Tolosan

**Paris Alain**

INRA/ENVT UMR Xénobiotiques  
31931 Toulouse cedex 9

**Parisey Nicolas**

Université de Bordeaux  
LaBRI  
33405 Talence cedex

**Penchenier François**

UMR Biologie du Fruit  
INRA Universités Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Pereira Hélène**

INRA UNH  
Plateforme Métabolisme et Spectrométrie de  
Masse  
63122 Saint-Genès-Champanelle

**Perret Alain**

Genoscope (Institut de génomique/CEA)  
91000 Evry

**Pianelli Katia**

UMR Biologie du Fruit  
INRA Universités Bordeaux 1 & 2  
33140 Villenave d'Ornon

**Poëssel Jean-Luc**

INRA Unité de Génétique et d'Amélioration  
des Fruits et Légumes  
84914 Avignon cedex 9

**Portais Jean-Charles**

Ingénierie des Systèmes Biologiques et des  
Procédés, UMR5504, UMR792 CNRS, INRA,  
INSA, INSA Toulouse  
31077 Toulouse cedex 4

**Priymenko Nathalie**

INRA/ENVT UMR Xénobiotiques  
31931 Toulouse cedex 9

**Pujos-Guillot Estelle**

INRA UNH  
Plateforme Métabolisme et Spectrométrie de  
Masse  
63122 Saint-Genès-Champanelle

**Ransac Stéphane**

INSERM U688 - Université Bordeaux 2  
33076 Bordeaux cedex

**Renaud Christel**

INRA UREF  
33140 Villenave d'Ornon

**Richert Thierry**

Bruker  
67166 Wissembourg

**Rolin Dominique**

UMR Biologie du Fruit  
INRA Universités Bordeaux 1 & 2  
33883 Villenave d'Ornon

**Salanoubat Marcel**

Genoscope (Institut de génomique/CEA)  
91000 Evry

**Sanchou Laurent**

Ingénierie des Systèmes Biologiques et des  
Procédés, UMR5504, UMR792 CNRS, INRA,  
INSA  
31077 Toulouse cedex 4

**Sébédio Jean-Louis**

INRA UNH  
Plateforme Métabolisme et Spectrométrie de  
Masse  
63122 Saint-Genès-Champanelle

**Shintu Laëtitia**

Institute of Food Research  
Norwich, UK

**Simonetto Paolo**

Université de Bordeaux  
LaBRI  
33405 Talence cedex

**Spraul Manfred**

Bruker Biospin GmbH  
Rheinstetten  
Allemagne

**Stojiljkovic Natali**

Laboratoire des Courses Hippiques  
91370 Verrières le Buisson

**Testet Eric**

UMR 5200, Université Bordeaux II  
33076 Bordeaux cedex

**Thébault Patricia**

CBiB  
Université Bordeaux 2  
146, rue Léon Saignat  
33076 Bordeaux cedex

**Traïkia Mounir**

S.E.E.S.I.B  
CNRS-Université Blaise Pascal  
63177 Aubière cedex

**Werner Erwan**

CEA  
DSV/IBiTec-S/SPI/LEMM  
91191 Gif sur Yvette cedex