

- **Déclaration d'intérêts de Mme : Claudine MANACH.....**

- **Activités de conseil, fonctions de gouvernance, rédaction de rapports**

*Non*

- **Essais cliniques, autres travaux, communications de promotion**

*Non*

- **Intérêts financiers (actions, obligations)**

*Non*

- **Liens avec des personnes ayant des intérêts financiers ou impliquées dans la gouvernance**

*Non*

- **Réception de dons sur une association dont je suis responsable**

*Non*

- **Perception de fonds d'une association dont je suis responsable et qui a reçu un don**

*Non*

- **Détention d'un brevet, rédaction d'un ouvrage utilisé par l'industrie**

*Non*



# Empreinte métabolique de l'alimentation

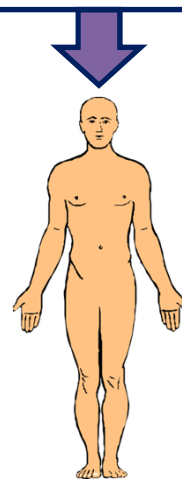
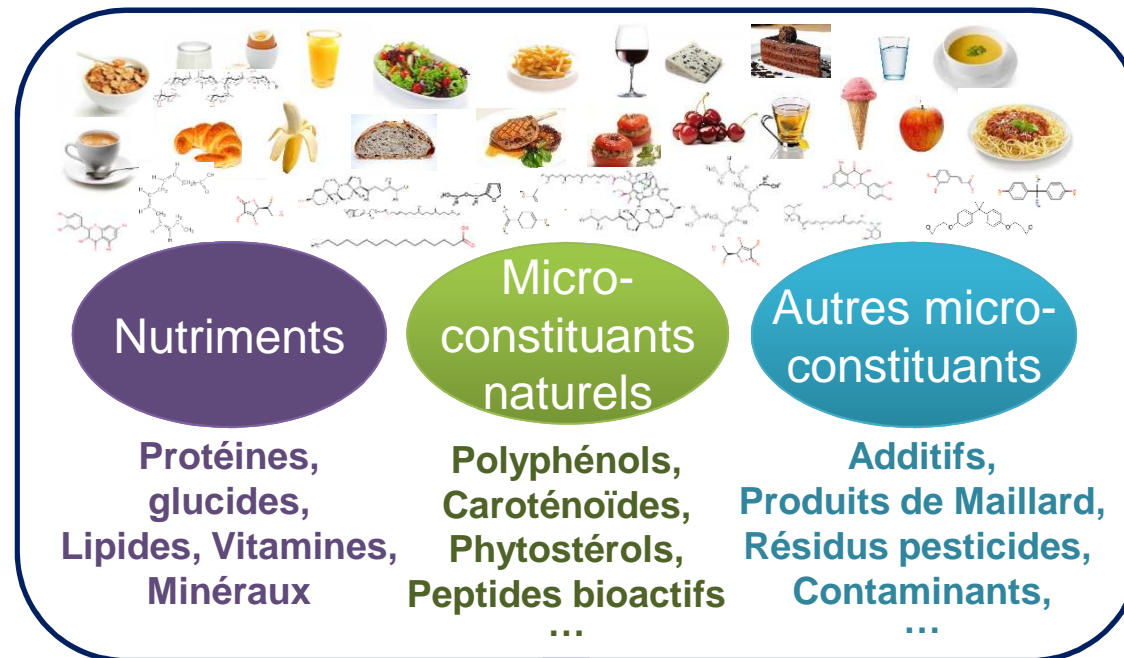


Claudine MANACH  
Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand

Nous avons accès à une extraordinaire  
diversité d'aliments

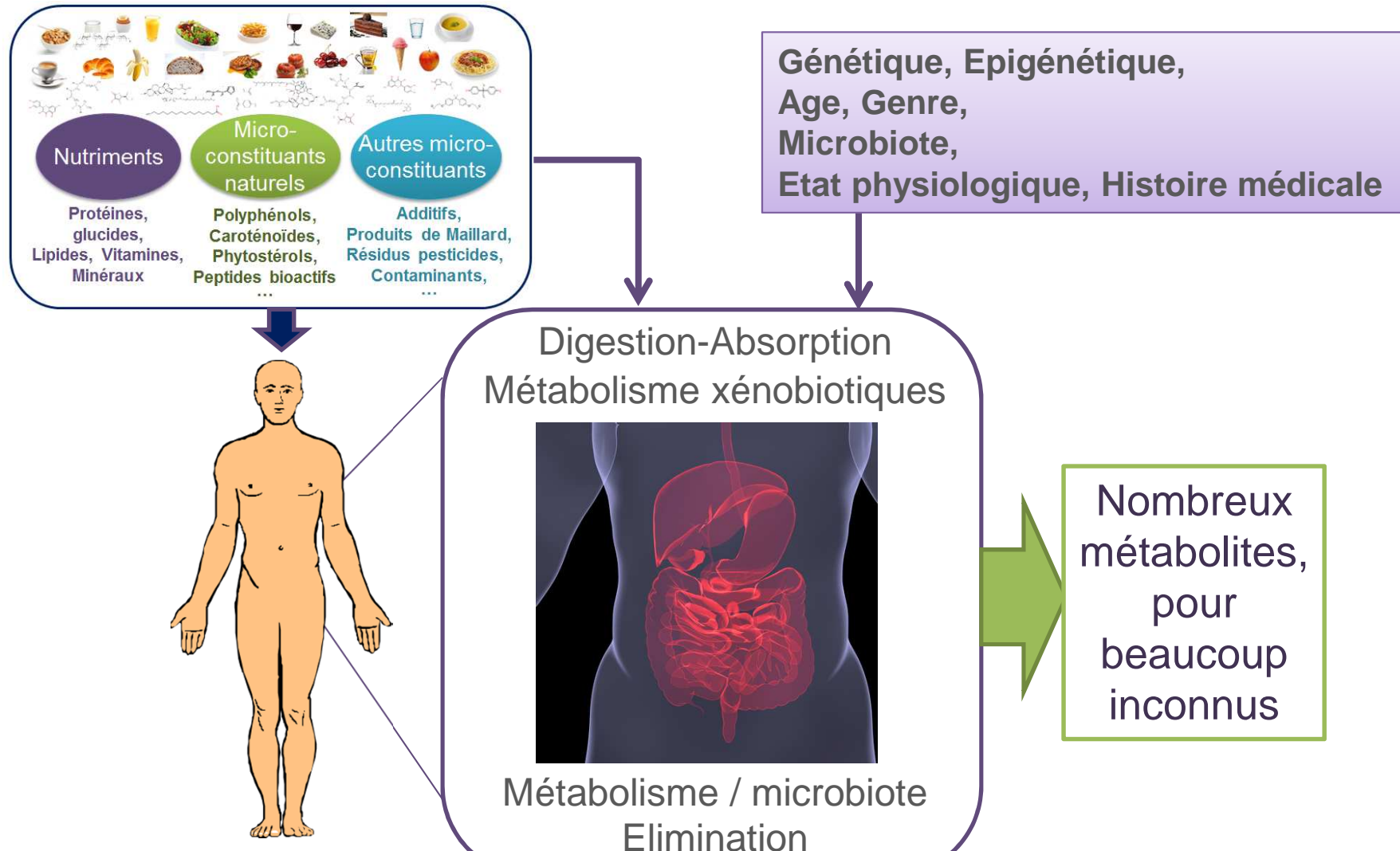
>8000 références / hypermarché

Plusieurs centaines de molécules différentes dans chaque aliment

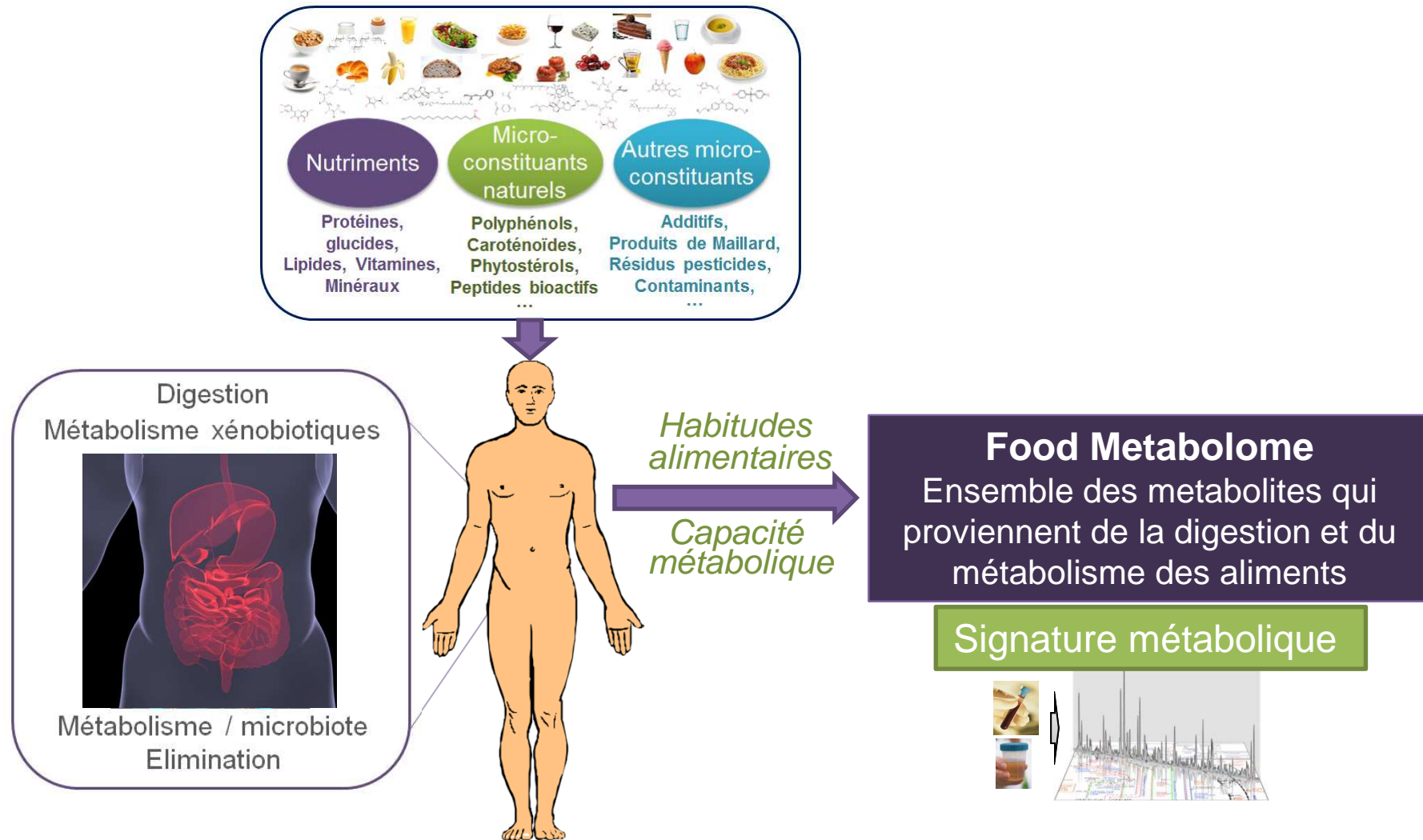


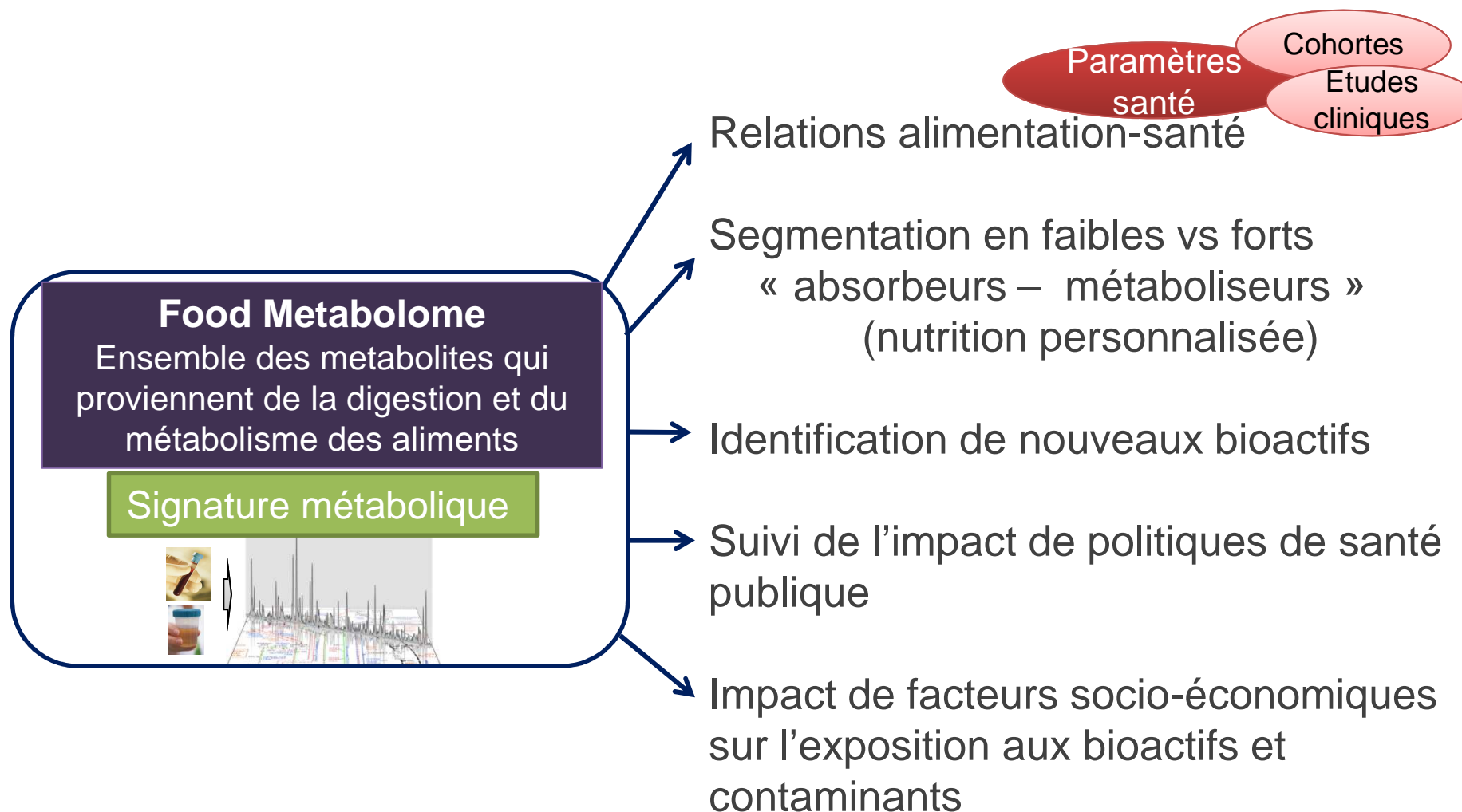
**Nos expositions nutritionnelles dépendent de nos habitudes alimentaires au sens large :**

- ❖ Préférences alimentaires
- ❖ Quantités consommées
- ❖ Qualité des aliments
- ❖ Pratiques culinaires



Pour une consommation identique, l'exposition interne peut varier d'un individu à l'autre

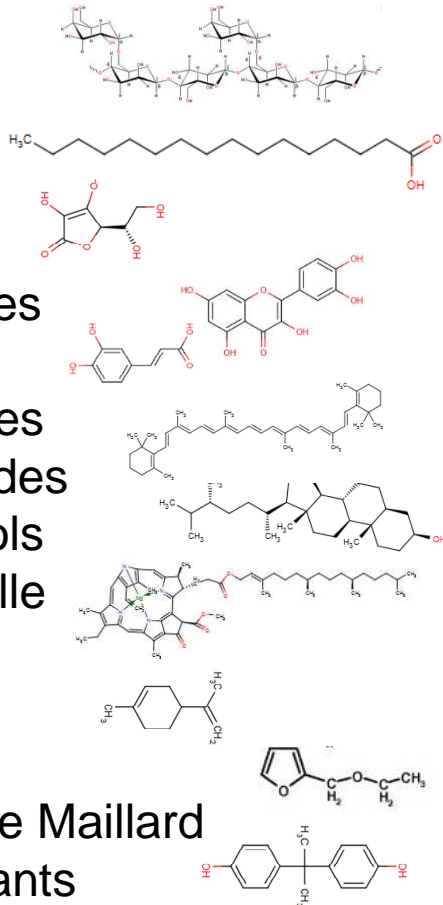




Food metabolome = >25,000 composés

Large gamme de concentrations  
mM  
nM

- Sucres
- Protéines
- Lipides
- Vitamines
- Minéraux
- Flavonoïdes
- Acides
- Phénoliques
- Caroténoïdes
- Phytostérols
- Chlorophylle
- Alcaloïdes
- Colorants
- Additifs
- Produits de Maillard
- Contaminants



## Biotransformations (hôte et microbiote)

Hydrolyse,  
Oxydation,  
Réduction,  
Méthylation,  
Déhydrogénation,  
Sulfatation,  
Glucuronidation,  
Acétylation,  
Conjugation au glutathion,  
...

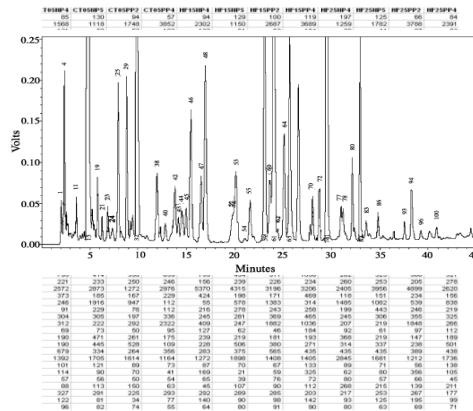
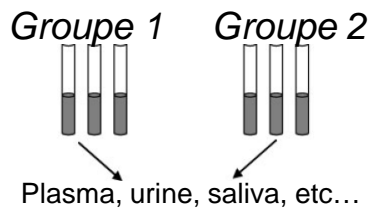
Nombreux inconnus

Analysés par des méthodes ciblées dist (GC-MS, LC-UV, LC-MS mode pos ou neg, ...)

Métabolomique non ciblée (LC-MS, GC-MS, RMN, ...)



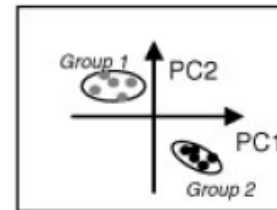
## 1 Analyse par spectrométrie de masse haute résolution ou RMN



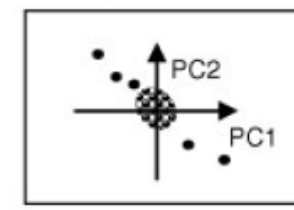
*Méthode non ciblée:*  
Détection d'un maximum de composés

## 2 Analyses statistiques multivariées (ACP, PLS-DA...)

N groupes  
X échantillons  
Pré-processing



Score plot (Echantillons)



Loading plot (signaux)

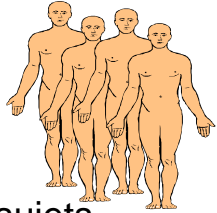
Visualisation de la discrimination  
Liste des signaux discriminants

## 3 Identification des signaux discriminants

Données spectrales (MS/MS,...)  
Bases de données, Librairies de spectres  
Analyse standards



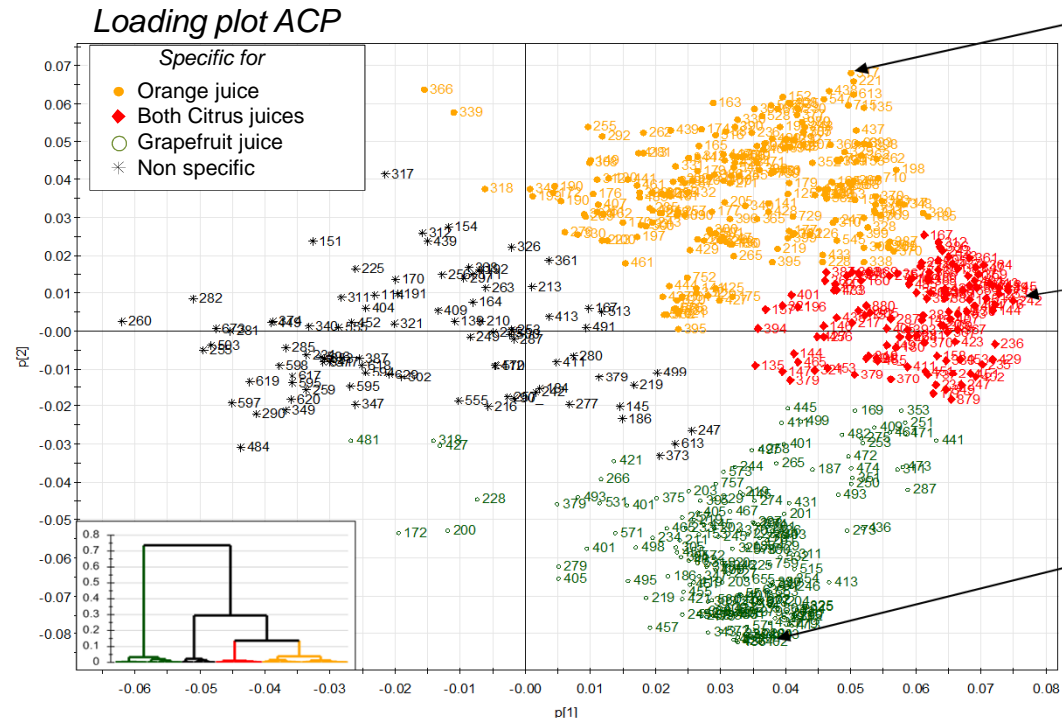
Librairies internes



4 sujets

Dose unique (600mL) Boisson contrôle, Jus d'orange & Jus de pamplemousse  
Régime contrôlé pauvre en produits végétaux  
Urine collectées sur 24hr après chaque boisson

Métabolomique non ciblée (UPLC-ESI+-Qtof-MS)



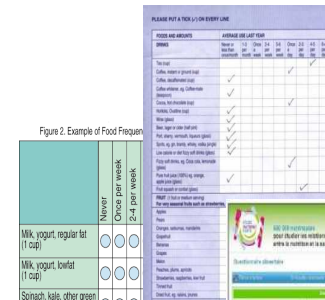
> 600 ions discriminants

# **FOOD METABOLOME & DÉCOUVERTE DE BIOMARQUEURS DE CONSOMMATION**

## ❖ Questionnaires alimentaires (FFQ, rappels 24hr ...)

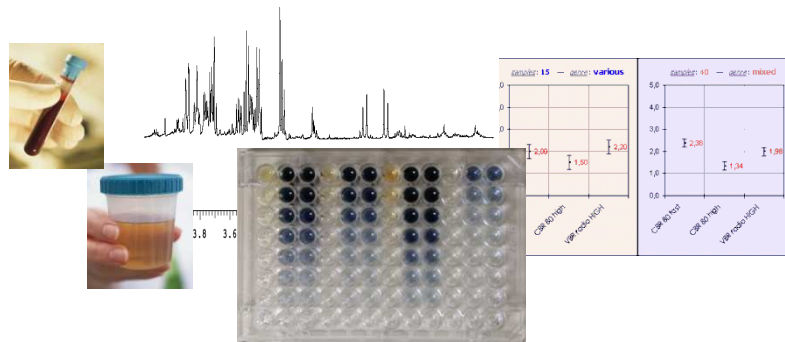
### Imprécisions liées à l'auto-évaluation:

Biais de mémoire, sur- ou sous-déclarations par certains groupes de populations



Besoin d'une large gamme de nouveaux biomarqueurs

## ❖ Biomarqueurs validés en nombre limité



### Principaux biomarqueurs / aliments

Vitamine C Plasma  
Carotenoides Plasma  
Alkylrésorcinol Plasma  
Méthylhistidine Urine  
TMAO Urine  
Polyphenols Urine

Fruits et légumes  
Fruits et légumes  
Céréales complètes (Blé et seigle)  
Viande  
Poisson  
Vin rouge, thé, soja, huile d'olive

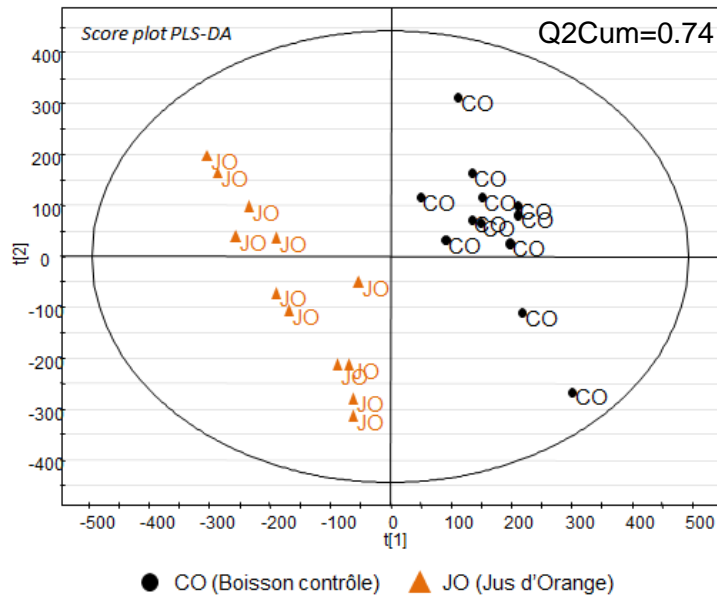
## Intervention contrôlée (cross-over)

12 volontaires

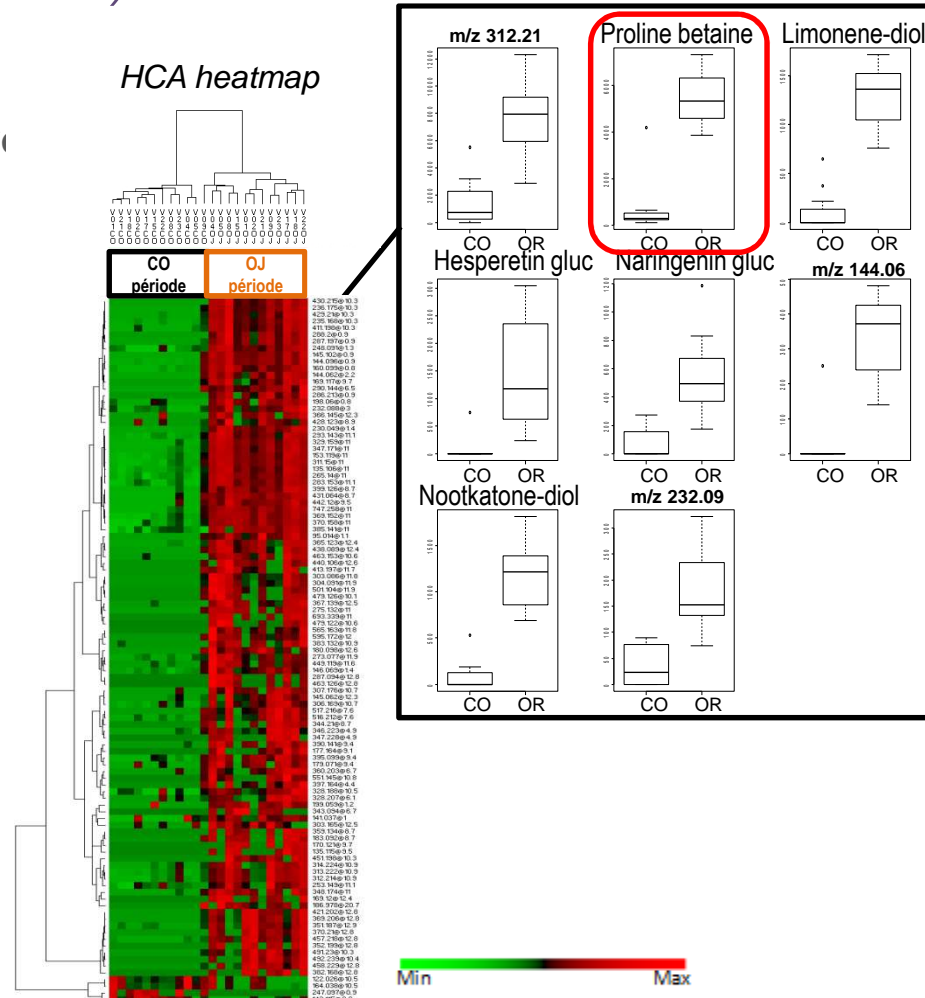
Diète habituelle, 4 semaines

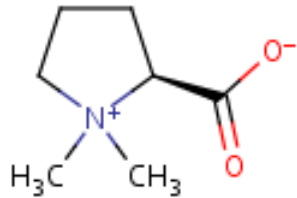
500 ml/j **Jus d'orange** vs **Boisson contrôlée**

Urine 24h J30; Analyse LC-ESI<sup>+</sup>-QTof



105 ions discriminants

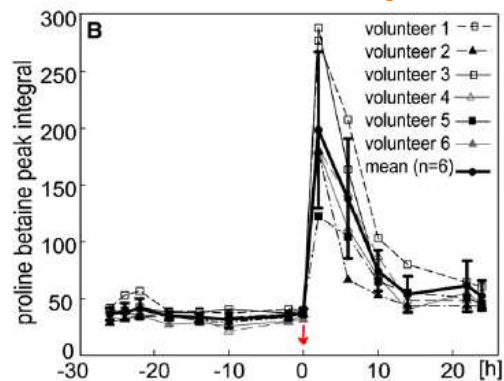




- ❖ Associée à la consommation d'agrumes dans **3 études en aigü, 3 interventions de moyen terme, 3 études de cohortes**
- ❖ Analyses métabolomiques diverses (RMN, LC-QToF,...)
- ❖ Urines 24hr, urines cinétique post-prandiale, spot urinaire matin

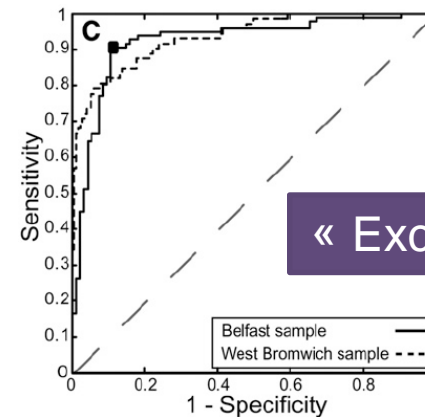
- ❖ Trouvée **presque exclusivement dans les agrumes**, avec dominance dans l'orange  
*Heinzmann et al., 2010; de Zwart et al., 2003; Slow et al., 2005*

## ❖ Pharmacocinétique



Prise 250 ml jus d'orange

## ❖ Analyse quantitative cohorte INTERMAP-UK

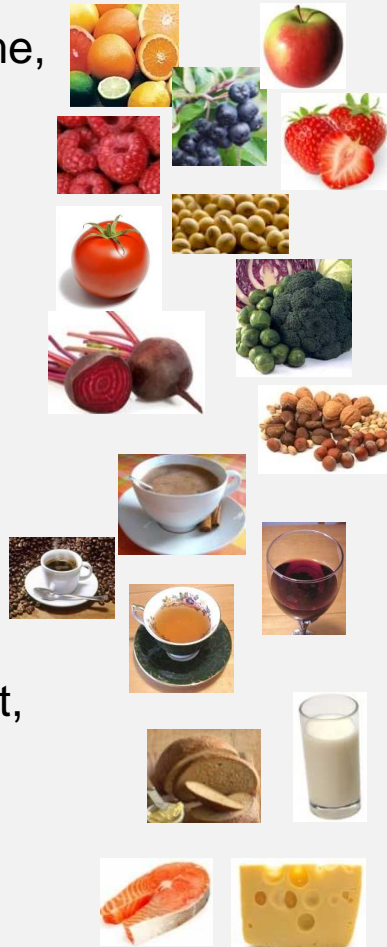


Courbe ROC  
Training set  $n=220$   
Validation set  $n=279$

« Excellent biomarqueur »

## 21 aliments ciblés

Agrumes, Pomme,  
Framboise,  
Aronia,  
Fraise,  
Tomate, Soja,  
Choux,  
Betterave,  
Amandes, Noix,  
Cacao,  
Café,  
Vin rouge,  
Jus de raisin,  
Thé noir, thé vert,  
Seigle complet,  
Lait, Fromage  
Saumon, Morue



Etudes d'interventions nutritionnelles



**145 biomarqueurs candidats**  
(75%= métabolites de micro-constituants végétaux)



**A VALIDER**



SU.VI.MAX2 (210 H & F; 55-70 ans)

Projet PhenoMeNEp 

Coll. S. Hercberg, P. Galan, M. Touvier  
UREN, Inserm/INRA/CNAM/Paris 13

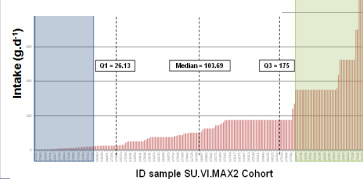
Six rappels 24h (1994-2002)  
+ FFQ 2007-2009

## Selection de faibles et forts consommateurs de 20 aliments

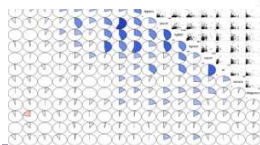


- Appariés sur:**
- Sexe
  - Classe âge (10 ans)
  - Saison prélèvement
  - IMC en 2 classes

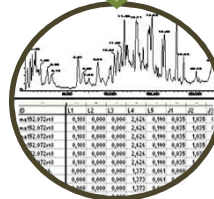
Distribution des consommations



Corrélations entre consommations



1 spot urine matin (Biobanque)

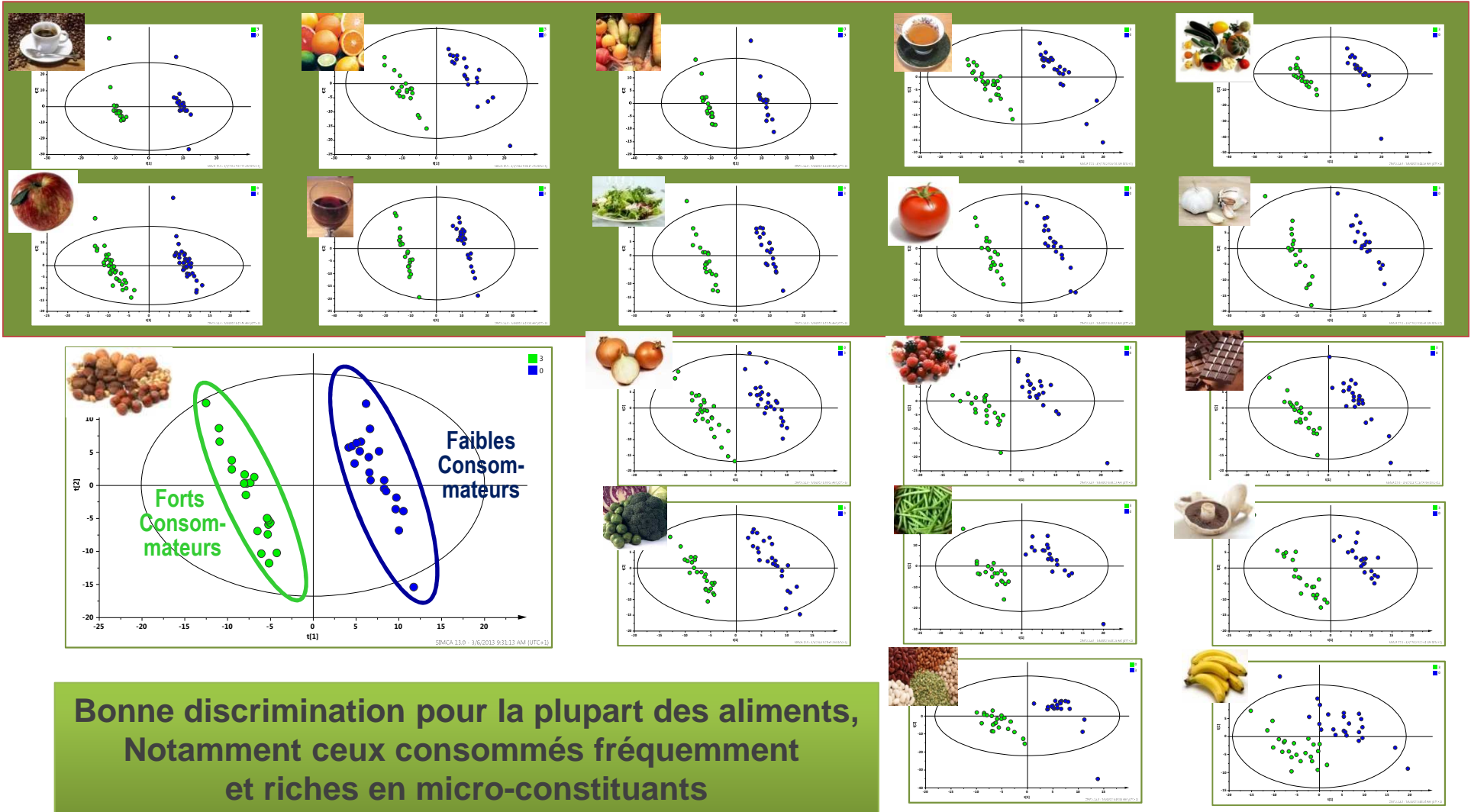


UPLC-ESI-QToF-MS (pos&neg)

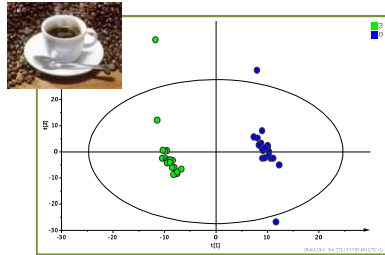
Comparaison des métabolomes de faibles et forts consommateurs pour chaque aliment



## Score Plots PLS-DA



Bonne discrimination pour la plupart des aliments,  
Notamment ceux consommés fréquemment  
et riches en micro-constituants



OPEN ACCESS Freely available online

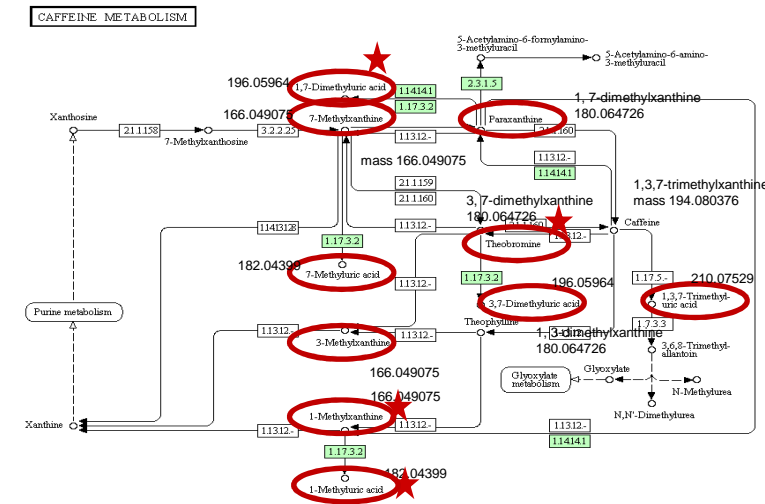
2014, Vol 9, e93474

PLOS ONE

## New Biomarkers of Coffee Consumption Identified by the Non-Targeted Metabolomic Profiling of Cohort Study Subjects

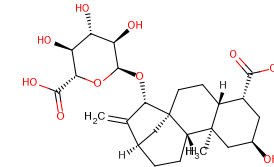
Joseph A. Rothwell<sup>1,2,3</sup>, Yoann Fillâtre<sup>1,2,3</sup>, Jean-François Martin<sup>1,3</sup>, Bernard Lyan<sup>1,3</sup>, Estelle Pujos-Guillot<sup>1,3</sup>, Leopold Fezeu<sup>4</sup>, Serge Hercberg<sup>4</sup>, Blandine Comte<sup>1,2</sup>, Pilar Galan<sup>4</sup>, Mathilde Touvier<sup>4</sup>, Claudine Manach<sup>1,2\*</sup>

### Nombreux métabolites de la caféine

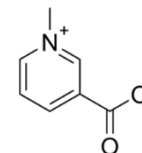


### Nouveaux biomarqueurs spécifiques

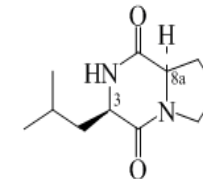
#### Atractyligénine glucuronide



#### Trigonelline



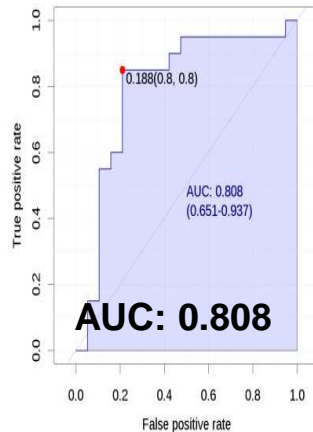
#### Cyclo-(Leu-Pro)



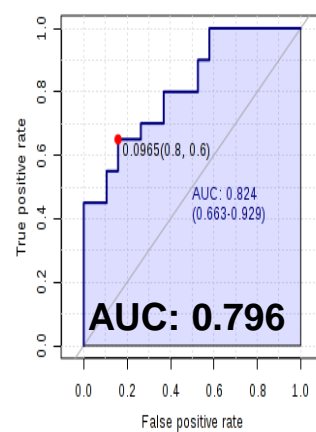
## Courbes RoC

Caffeine

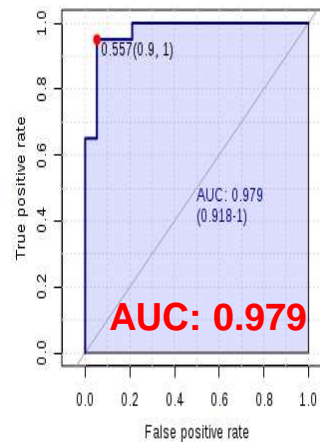
7.2.1



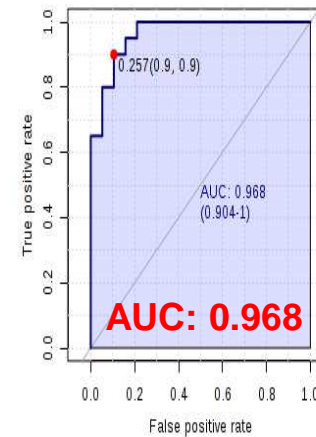
Hippuric acid



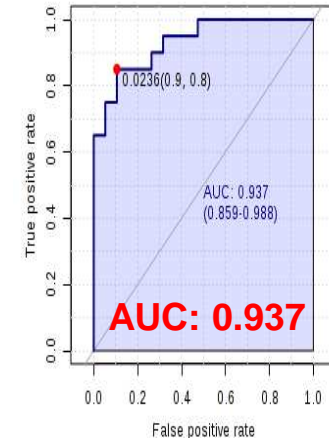
Atractyligenine glucuronide



Cyclo-(Leucyl-prolyl)



Trigonelline



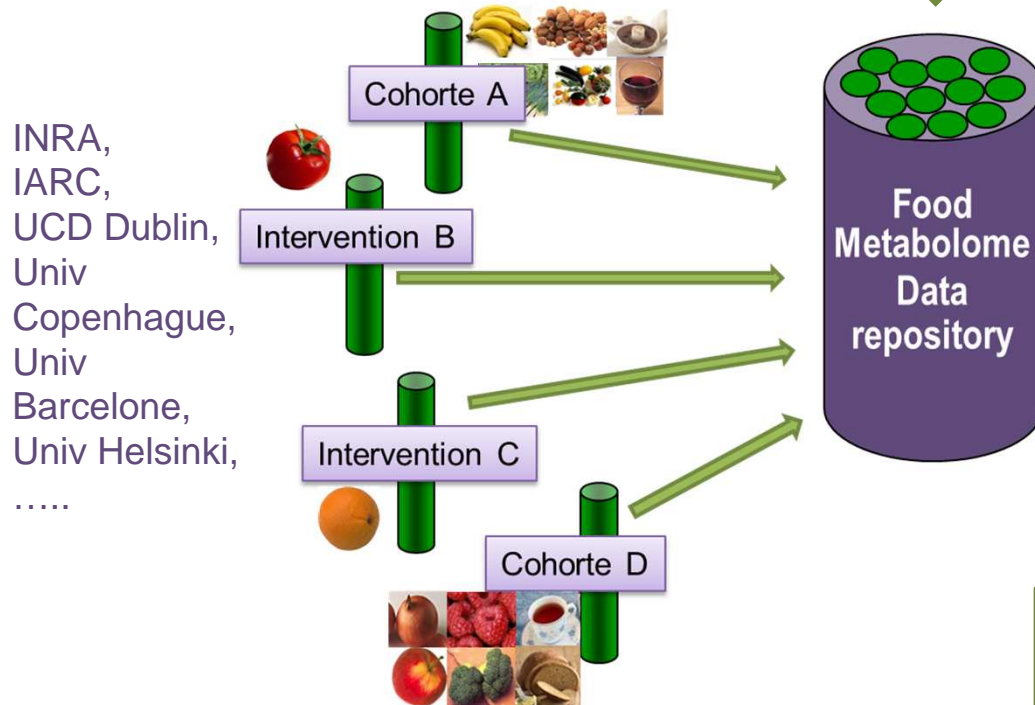
AUC : **0.9-1 : excellent**  
0.8-0.9 : bon  
0.7-0.8 : passable  
0.6-0.7 : pauvre  
0.5-0.6 : inadapté



La métabolomique est une approche efficace pour découvrir de nouveaux biomarqueurs de consommation spécifiques



## Etudes Food metabolome



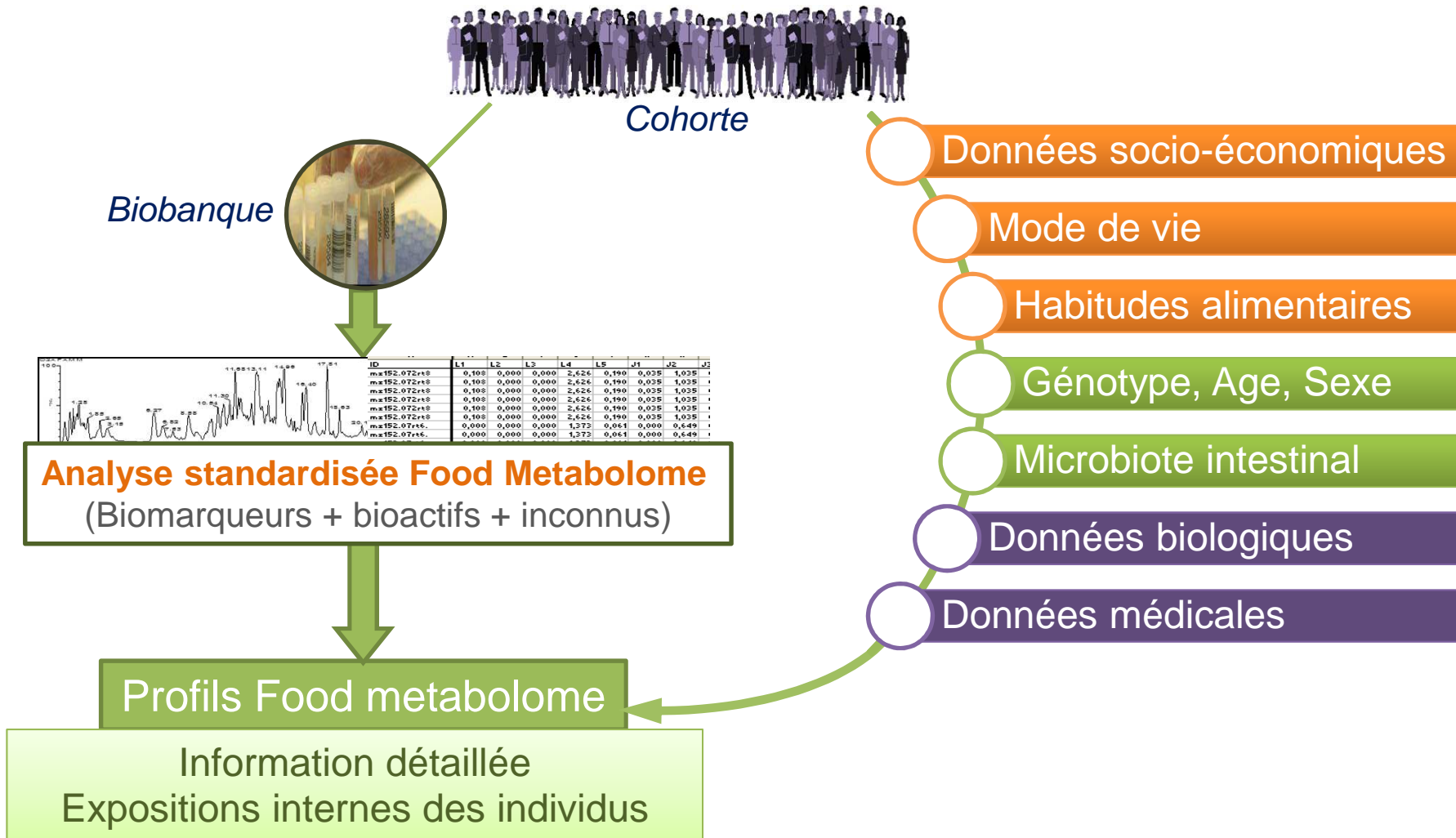
Biomarqueurs candidats dans l'étude A

Corrélation avec consommation de café dans toutes les études disponibles?



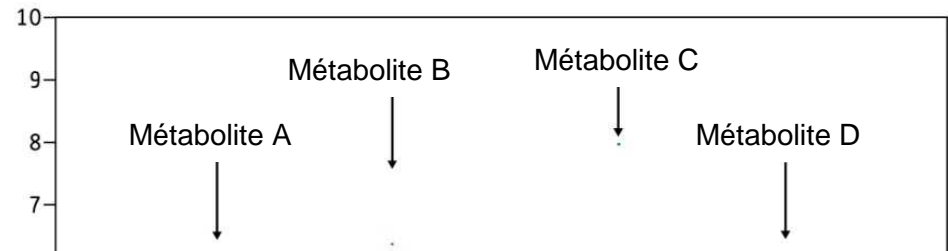
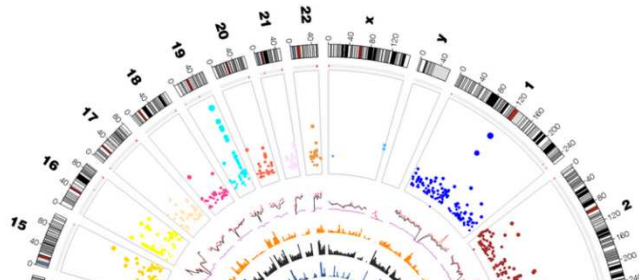
Projet Foodball  
« Food Biomarker Alliance »  
23 partenaires

# **FOOD METABOLOME & PROFILS D'EXPOSITION NUTRITIONNELLE**

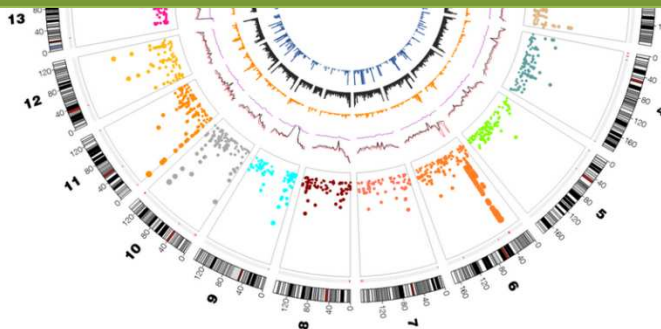


GWAS : Associations entre variants génétiques et incidence de pathologies

FMWAS : Associations entre expositions nutritionnelles et incidence de pathologies



La limite : Seulement 20% des métabolites identifiés dans les profils Food métabolome



Polymorphismes génétiques (SNPs)

Données incidence pathologies

Profil Food métabolome

Données incidence pathologies

## Procédure d'identification (LC-MS)

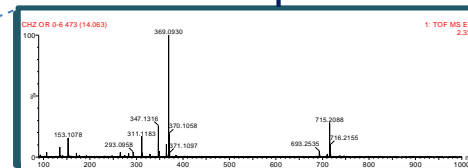
Déterminer la **masse exacte et formule élémentaire**  
(Orbitrap, FT-ICR...)

Interroger les **bases de composés** pour obtenir des **hypothèses plausibles**

Analyser les **standards**

**Validation de l'identification**

## Données spectrales



## Bases de composés



**Analyses complémentaires**



## Procédure d'identification (LC-MS)

Déterminer la **masse exacte et formule élémentaire**  
(Orbitrap, FT-ICR...)

*Mais :*

Pour les métabolites des micro-constituants alimentaires:



Projet Foodball


Amélioration des bases de données et de la disponibilité des standards

Analyser les **standards**

**Validation de l'identification**

**Analyses complémentaires**

PhytoHub Compounds Foods Search Advanced Search About Glossary Contact Us Version 1.0 Beta



## PhytoHub

PhytoHub is a freely available electronic database providing detailed information about dietary phytochemicals and human metabolites. Around 1,000 dietary phytochemicals are included which represent all the polyphenols, terpenoids, alkaloids and other plant secondary metabolites ingested with the human diet. For each phytochemical, the following will be available: 1) the main dietary sources (extracted from the literature and online databases like [FooDB](#) and [Phenol-Explorer](#)) with a direct link to FooDB food cards, 2) known human metabolites (extracted from literature and Phenol-Explorer), 3) predicted in silico metabolites, generated by an in-house tool that takes into account the knowledge of host and microbial metabolism for the various families of phytochemicals, 4) physico-chemical properties such as solubility and physiological charge, 5) monoisotopic mass and spectral data (collated from public databases such as [MassBank](#) and [ReSpec](#) (RIKEN MSn spectral database for phytochemicals), as well as from our [mass spectrometry/metabolomics laboratory](#) and collaborating groups).

PhytoHub Compounds Foods Search Advanced Search About Glossary Contact Us

### Compounds

All Precursors Known Metabolites Predicted Metabolites Precursors and Known Metabolites Selected

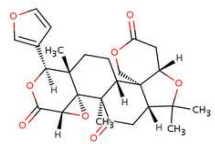
Select all Deselect all Copy Print Save 10 records per page

Chemical Name	Monoisotopic Mass	Formula	Family
<input type="checkbox"/> Limonene	136.125200512	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Terpenoids
<input type="checkbox"/> Limonin	470.194067936	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	Terpenoids Triterpenoids
<input type="checkbox"/> Limonin (17-beta-D-glucoside-)	650.257456052	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> O <sub>14</sub>	Terpenoids Triterpenoids
<input type="checkbox"/> Linalool	154.135765198	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Terpenoids Monoterpenoids

PhytoHub Compounds Foods Search Advanced Search About Glossary Contact Us

### Showing entry for Limonin

**Limonin**



Identification

- Properties
- Taxonomy
- Spectra
- Food Sources
- Metabolites

**Identification**

**Synonyms** Citrolimonin  
Dictamnolactone  
Evodin  
Obaculactone

**CAS Number** 1180-71-8

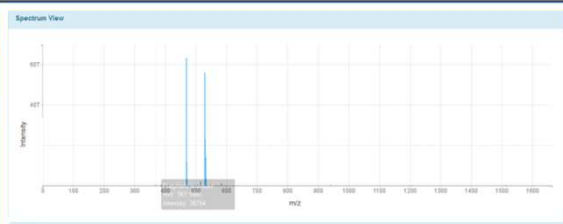
**Average Mass** 470.5116

**Monoisotopic Mass** 470.194067936

**Chemical Formula** C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>

**InChI**

**IU**



**Details**

**Source** MassBank  
**Source Entry** T190203  
**Instrument** LIMS-ET-TOF  
**Instrument Type** LC-ESI-FTOF

**MS Method**

**Type** Not Available  
**Collision energy** Not Available  
**Collision gas** Not Available  
**Desolvation gas flow** Not Available  
**Desolvation temper...** Not Available  
**Ionization energy** Not Available  
**Scanning** 0.1 sec/scan (m/z = 200-2000)

**Chromatography Method**

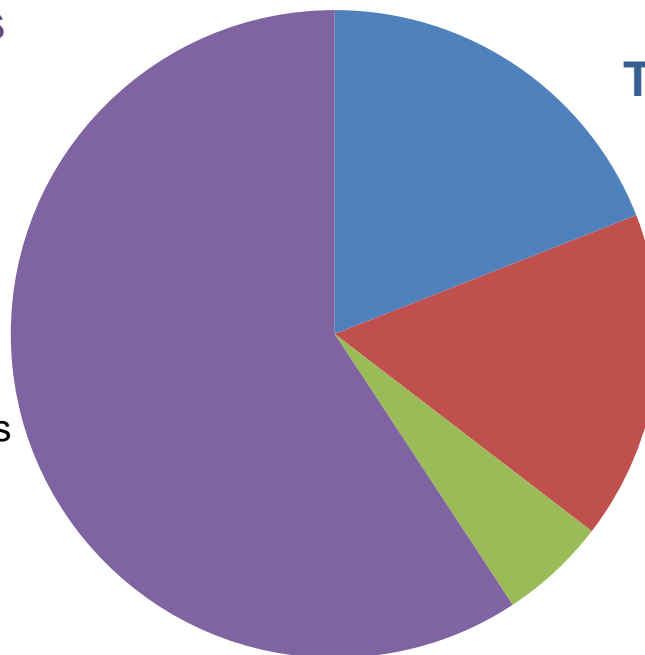
**Capillary voltage** Not Available  
**Column name** Waters Atlantis T3 (2.1 x 150 mm, 5 μm)  
**Column temperature** 40 C  
**Flow gradient** 10 % B to 100 % B/40 min  
**Flow rate** 0.2 mL/min  
**Retention time** 19.704117 min  
**Solvent** Solvent (A): 5 mM ammonium acetate, (B): CH<sub>3</sub>CO



> 1140 micro-constituants végétaux

**654 Polyphénols**

- Anthocyanins
- Flavanols
- Flavanones
- Flavones, Flavonols
- Isoflavones
- Other flavonoids
- Hydroxybenzoic acids
- Hydroxycinnamic acids
- Other phenolic acids
- Ellagitannins
- Stilbenes
- Lignans
- Coumarins



**240 Terpènes**

- Monoterpenoids
- Diterpenoids
- Sesquiterpenoids
- Triterpenoids
- Carotenoids
- Phytosterols

**181 Composés azotés**

- Alkaloids
- Betalaines
- Purine & pyrimidines
- Aminoacids
- Amines
- Glucosinolates

**69 Divers**

- Aliphatics
- Organic acids
- Fatty acids & lipids
- Thiosulfinates

- ❑ Données vérifiées par des experts des différentes familles
- ❑ Traçabilité des données

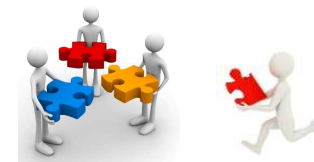


- ❖ **Les expositions nutritionnelles** sont plus complexes que ce qui a été considéré jusqu'à présent : **nombreux micro-constituants à prendre en compte**
- ❖ Le **Food metabolome** contient une mine d'information que nous commençons juste à explorer avec la **métabolomique basée sur la spectrométrie de masse**
- ❖ L'analyse du Food métabolome dans des urines et plasmas d'études d'interventions ou de cohortes permet déjà de découvrir de **nouveaux biomarqueurs de consommations alimentaires ...**



et pourrait devenir une **nouvelle méthode d'évaluation détaillée des expositions nutritionnelles**

- ❖ **Une forte collaboration internationale** est devenue essentielle





## UMR1019- Unité Nutrition Humaine

Yoann FILLATRE  
Joe ROTHWELL  
Mercedes QUINTANA  
Daniel CESAIRE  
Bruno CHABANAS  
Cécile GLADINE  
Christine MORAND  
André MAZUR



Estelle PUJOS-GUILLOT  
Charlotte JOLY  
Bernard LYAN  
Jean-François MARTIN  
Frank GIACOMONI



## UREN, Inserm/INRA/CNAM/Paris 13

Serge HERCBERG  
Pilar GALAN  
Mathilde TOUVIER  
Leopold FEZEU



## Edmonton, Canada

Craig KNOX  
Roman EISNER



## Financements



Projet Agruvasc  
Projet PhenoMeNEp



Bourse post-doctorale



Projet Foodball  
« Food Biomarker Alliance »

# 7<sup>th</sup> ICPH International Conference on Polyphenols and Health

MERCI DE VOTRE ATTENTION

**October 27-30, 2015**

Congress Center Tours, France

[www.icph2015.com](http://www.icph2015.com)

