

Mesure de la consommation de phytomicronutriments Identification de nouveaux biomarqueurs d'exposition L'approche métabolomique

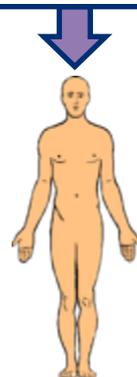
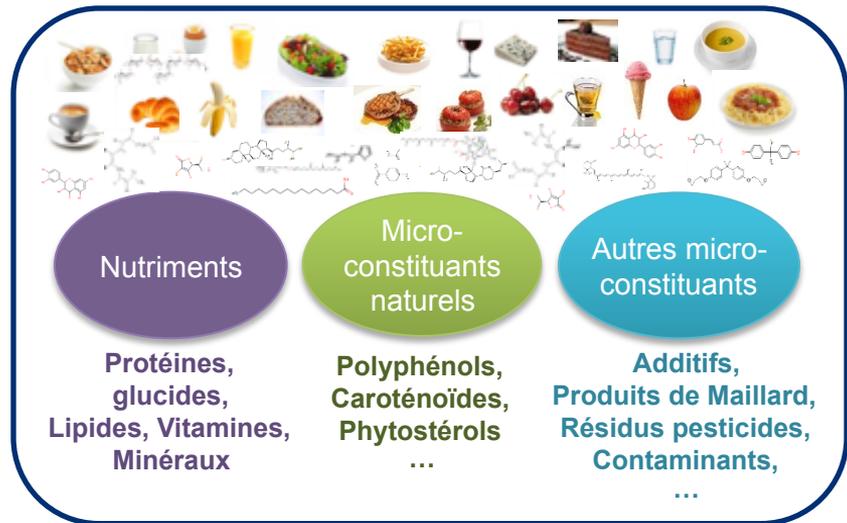


Claudine MANACH

Unité de Nutrition Humaine, INRA Auvergne-Rhône-Alpes

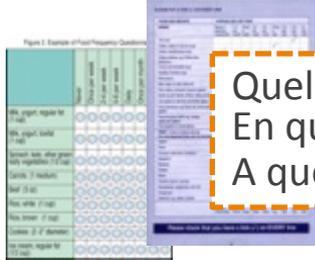


EXPOSITIONS NUTRITIONNELLES



EVALUATION DES CONSOMMATIONS

- ❖ **Questionnaires alimentaires**
(FFQ, rappels 24hr ...)



Quels aliments consommés?
En quelle quantité?
A quelle fréquence?

Internet, applications smartphones



Données consommation d'aliments



Données de consommation de nutriments

- ❖ **Tables de composition des aliments**



Approche adaptée
pour les nutriments essentiels

QUESTIONNAIRES ALIMENTAIRES : LES LIMITES

❖ Imprécisions liées à l'auto-évaluation:

Biais de mémoire

Sur-déclaration de produits sains (Ex: Fruits et légumes)

Sous-déclaration de produits riches en énergie

Simplification des données déclarées, voire des repas pris

Difficulté à estimer les quantités consommées...

➔ **Inappropriés pour certaines catégories de population**



LES TABLES DE COMPOSITION

❖ Quelques tables de référence...

Polyphénols,
caroténoïdes,
phytostérols

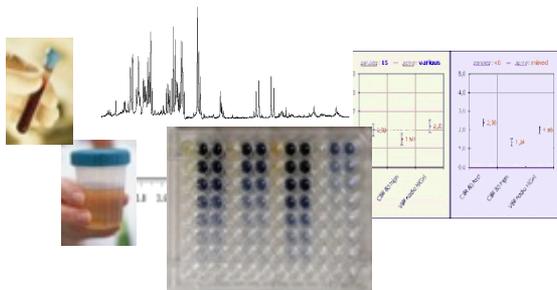


Mais incomplètes ou inexistantes
pour beaucoup de phytomicronutriments
(*terpènes, alcaloïdes, ...*)

Approche imprécise pour beaucoup de phytomicronutriments

BIOMARQUEURS DE CONSOMMATION

❖ Biomarqueurs validés en nombre limité



- ✓ Vitamine C et caroténoïdes plasmatiques pour F&L totaux
Faibles corrélations avec questionnaires alimentaires ($r=0.3-0.4$)
- ✓ Phytomicronutriments

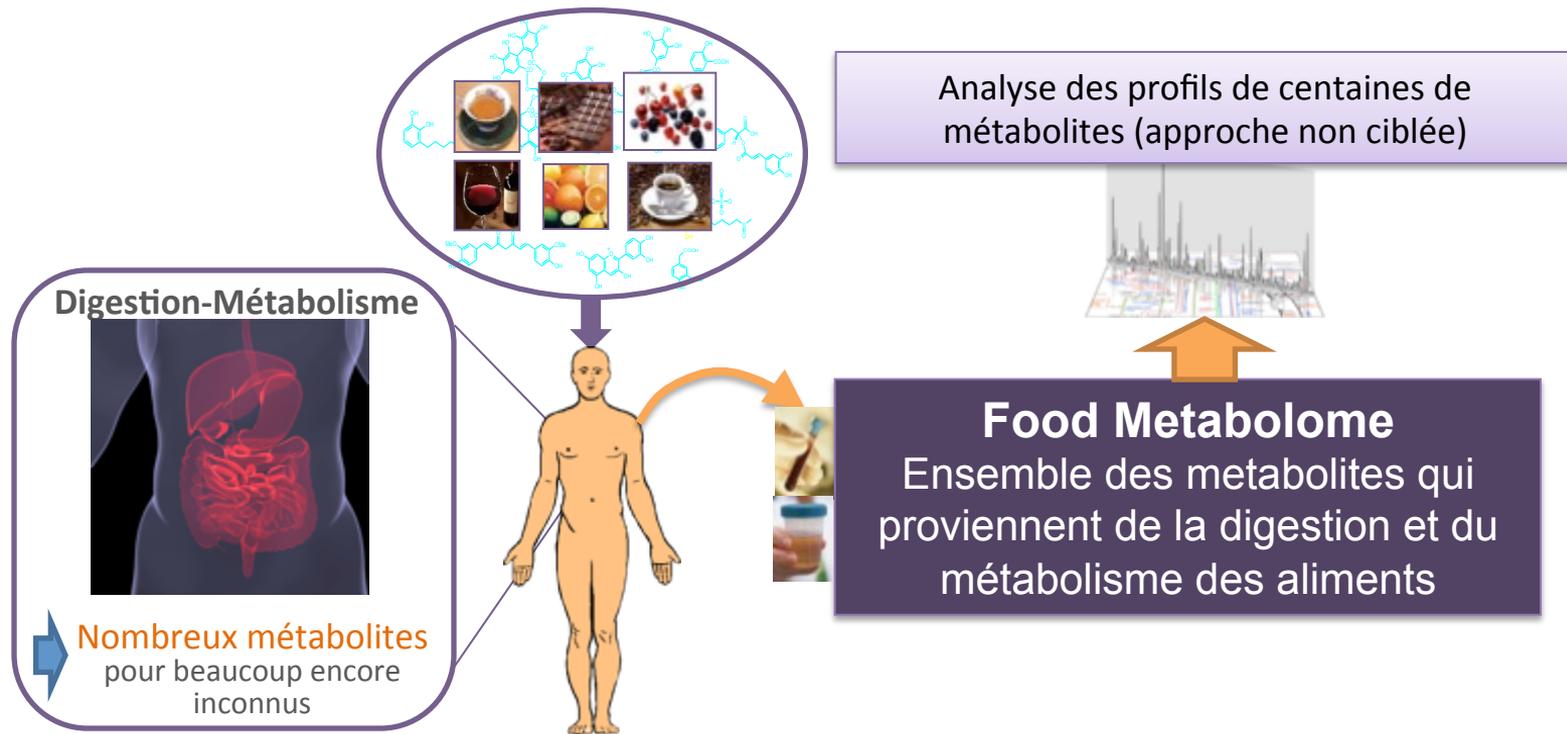
Hespérétine	Orange
Epicatechine	Thé
Lycopène	Tomate
Phlorétine	Pomme
Genistéine	Soja
Quercétine	Oignon
Acide allyl mercapturique	Ail
Isothiocyanates	Crucifères
Resvératrol	Vin rouge

Besoin d' une large gamme de nouveaux biomarqueurs spécifiques

1 Biomarqueur ↔ 1 Aliment
Spécificité?

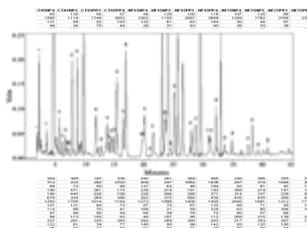
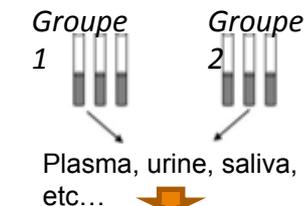
METABOLOMIQUE ET DECOUVERTE DE BIOMARQUEURS DE CONSOMMATION D'ALIMENTS RICHES EN PHYTMICRONUTRIMENTS

LE CONCEPT DU FOOD METABOLOME



LA METABOLOMIQUE: UNE APPROCHE EXPLORATOIRE

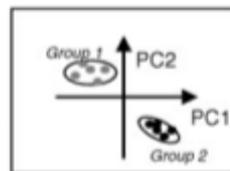
1 Analyse des échantillons (Spectrométrie de masse haute résolution ou RMN)



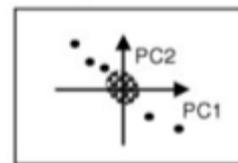
Méthode non ciblée:
Détection d'un maximum
de composés

Profils métaboliques →

2 Statistiques multivariées (ACP, PLS-DA...)



Score plot
(Echantillons)



Loading plot
(signaux)

Visualisation de la discrimination
Liste des signaux discriminants

3 Identification des signaux discriminants

Découverte de biomarqueurs

BIOMARQUEUR CONSOMMATION JUS D'ORANGE

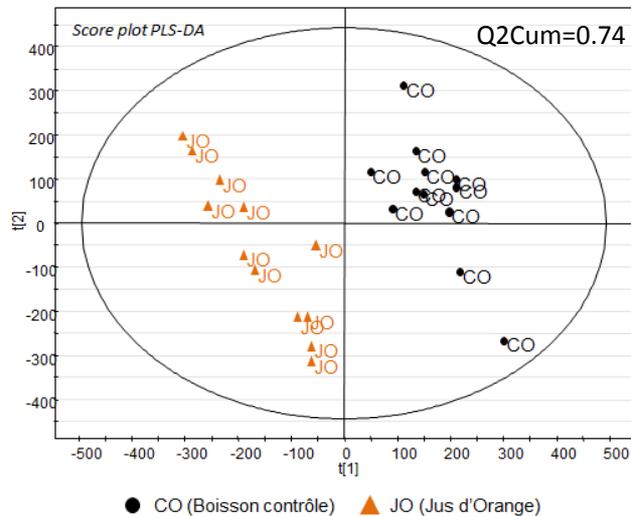
Intervention contrôlée (*cross-over*)

12 volontaires

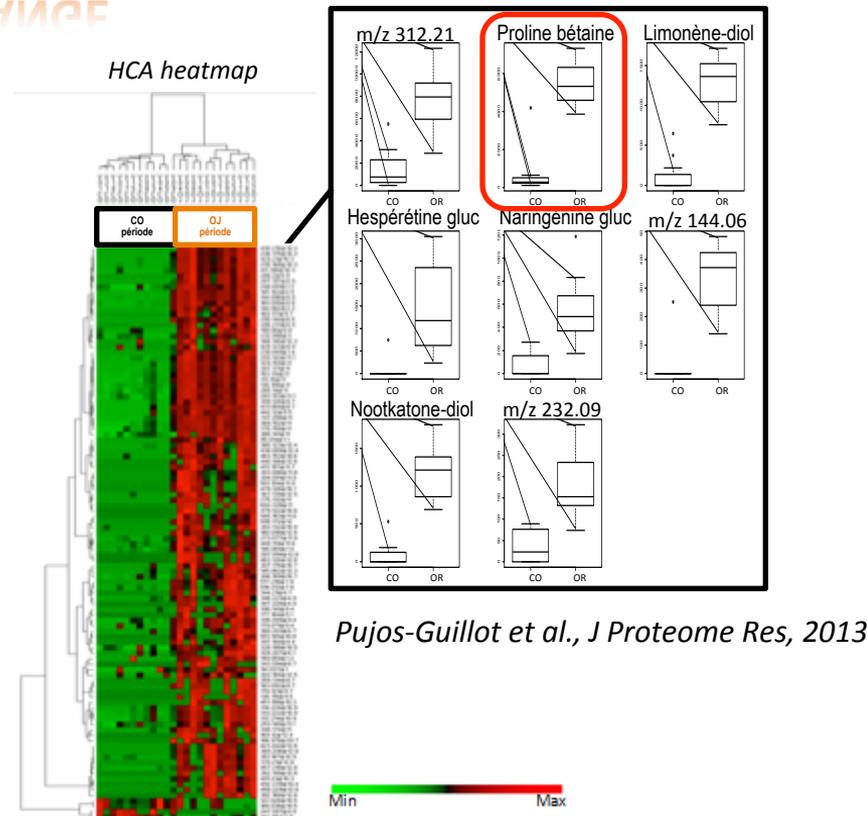
Diète habituelle, 4 semaines

500 ml/j Jus d'orange vs Boisson contrôlée

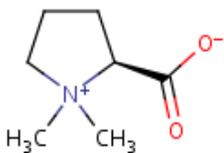
Urine 24h J30; Analyse LC-ESI⁺-QToF



105 ions discriminants



VALIDATION DE LA PROLINE BETAINE



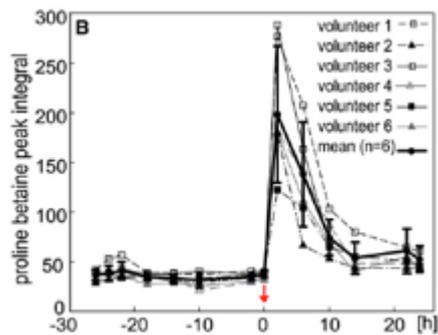
- ❖ Associée à la consommation d'agrumes dans **3 études en aigu, 3 interventions de moyen terme, 3 études de cohortes**
- ❖ Analyses métabolomiques diverses (RMN, LC-QTof,...)
- ❖ Urines 24hr, urines cinétique post-prandiale, spot urinaire matin

*Heinzmann et al., 2010,
Lloyd et al., 2011&2013,
Pujos-Guillot et al., 2013,
May et al., 2013,
Andersen et al., 2014*

- ❖ Trouvée **presque exclusivement dans les agrumes**, avec dominance dans l'orange

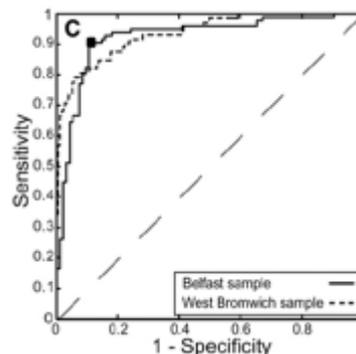
Heinzmann et al., 2010; de Zwart et al., 2003; Slow et al., 2005

❖ Pharmacocinétique



Prise 250 ml jus d' orange

❖ Validation dans cohorte INTERMAP-UK



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

« Excellent biomarqueur »

Heinzmann et al., 2010

BIOMARQUEURS DE CONSOMMATION

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
phytomicronutriments)



A VALIDER

Scalbert et al., AJCN 2014, 99(6):1286-1308

BIOMARQUEURS DE CONSOMMATION



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



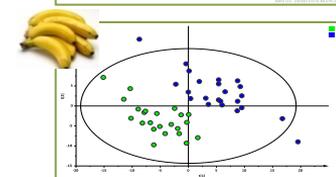
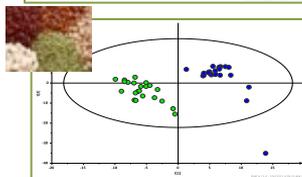
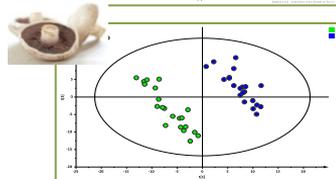
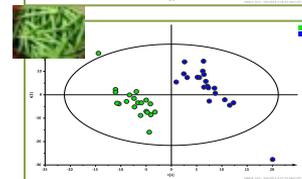
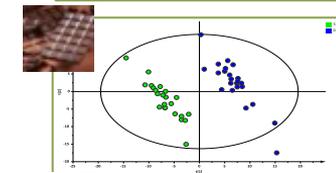
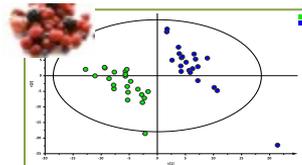
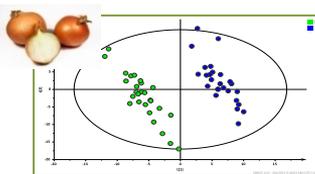
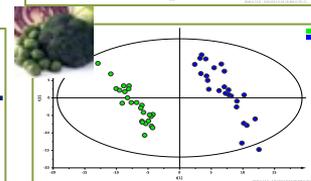
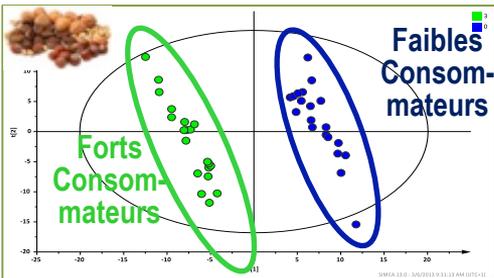
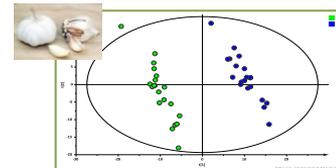
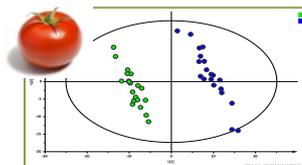
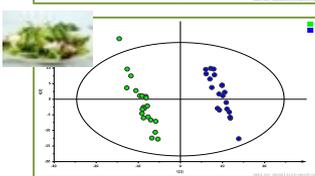
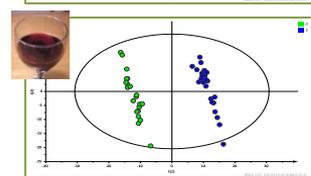
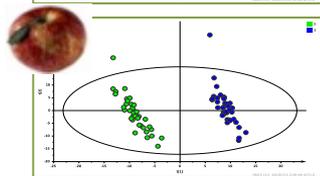
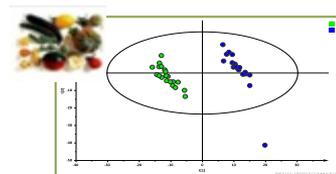
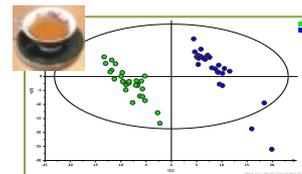
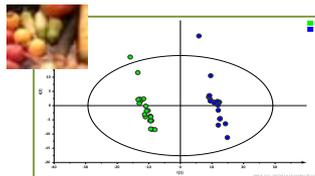
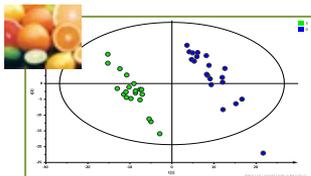
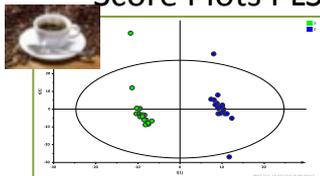
1 spot urine matin (Biobanque)

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

Comparaison des métabolomes de faibles et forts consommateurs pour chaque aliment

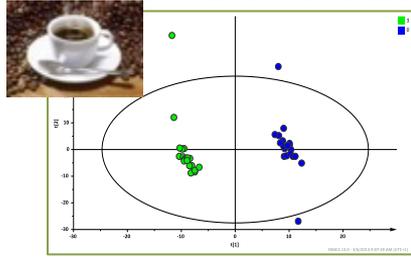
BIOMARQUEURS DE CONSOMMATION

Score Plots PLS-DA



Bonne discrimination pour la plupart des aliments, notamment ceux consommés fréquemment et riches en phytonutriments

BIOMARQUEURS CAFE



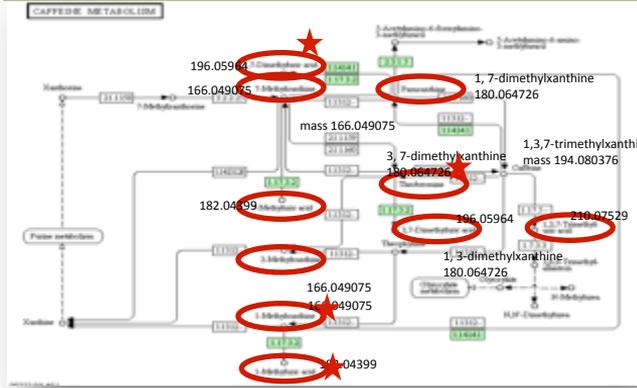
OPEN ACCESS Freely available online



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

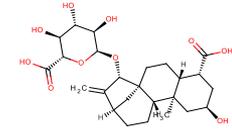
Joseph A. Rothwell^{1,2,5}, Yoann Fillâtre^{1,2,5}, Jean-François Martin^{1,3}, Bernard Lyan^{1,3}, Estelle Pujos-Guillot^{1,3}, Leopold Fezeu⁴, Serge Hercberg⁴, Blandine Comte^{1,2}, Pilar Galan⁴, Mathilde Touvier⁴, Claudine Manach^{1,2,6}

Nombreux métabolites de caféine

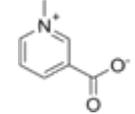


Nouveaux biomarqueurs spécifiques

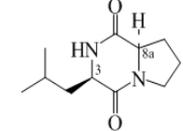
Atractyligénine glucuronide



Trigonelline



Cyclo-(Leu-Pro)



PERFORMANCE DES BIOMARQUEURS (Courbes ROC)

AUC :

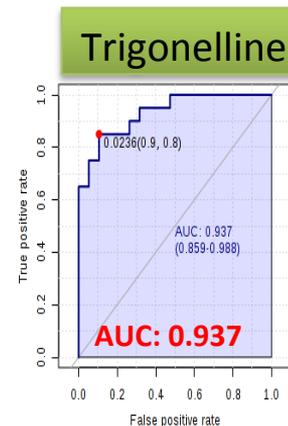
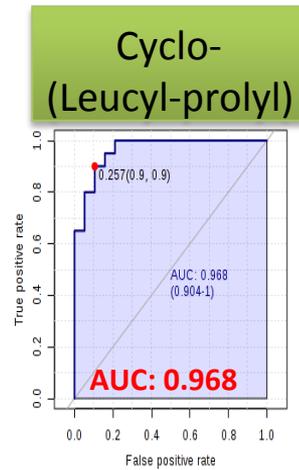
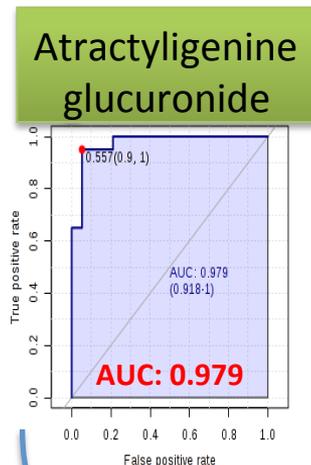
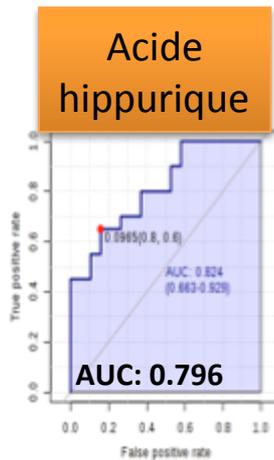
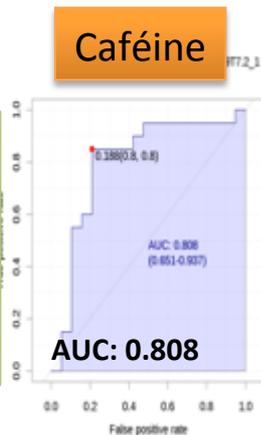
0.9-1 : excellent

0.8-0.9 : bon

0.7-0.8 : passable

0.6-0.7 : pauvre

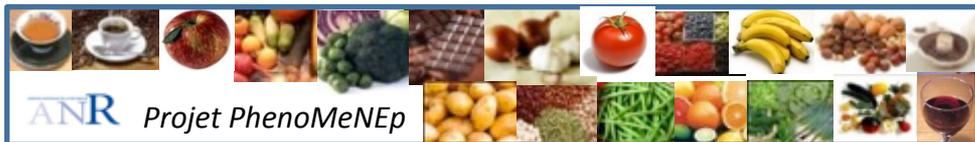
0.5-0.6 : inadapté



Index multi-marqueurs

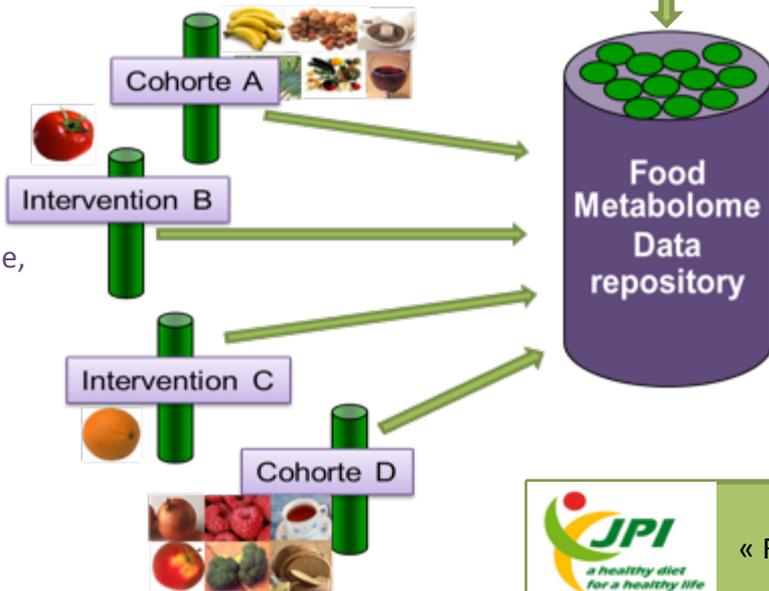
La métabolomique est une approche efficace pour découvrir de nouveaux biomarqueurs de consommation spécifiques

PARTAGE DES DONNÉES - VALIDATION DES BIOMARQUEURS



Etudes Food metabolome

INRA,
IARC,
UCD Dublin,
Univ Copenhague,
Univ Barcelone,
Univ Helsinki,
.....



Biomarqueurs candidats
dans l'étude A

Corrélation avec consommation
de café dans toutes les études
disponibles?



Projet Foodball
« Food Biomarker Alliance »
23 partenaires

METABOLOMIQUE ET PROFIL D'EXPOSITION AUX PHYTOMICRONUTRIMENTS

PROFILS D'EXPOSITION AUX PHYTOMICRONUTRIMENTS



Cohorte

Biobanque



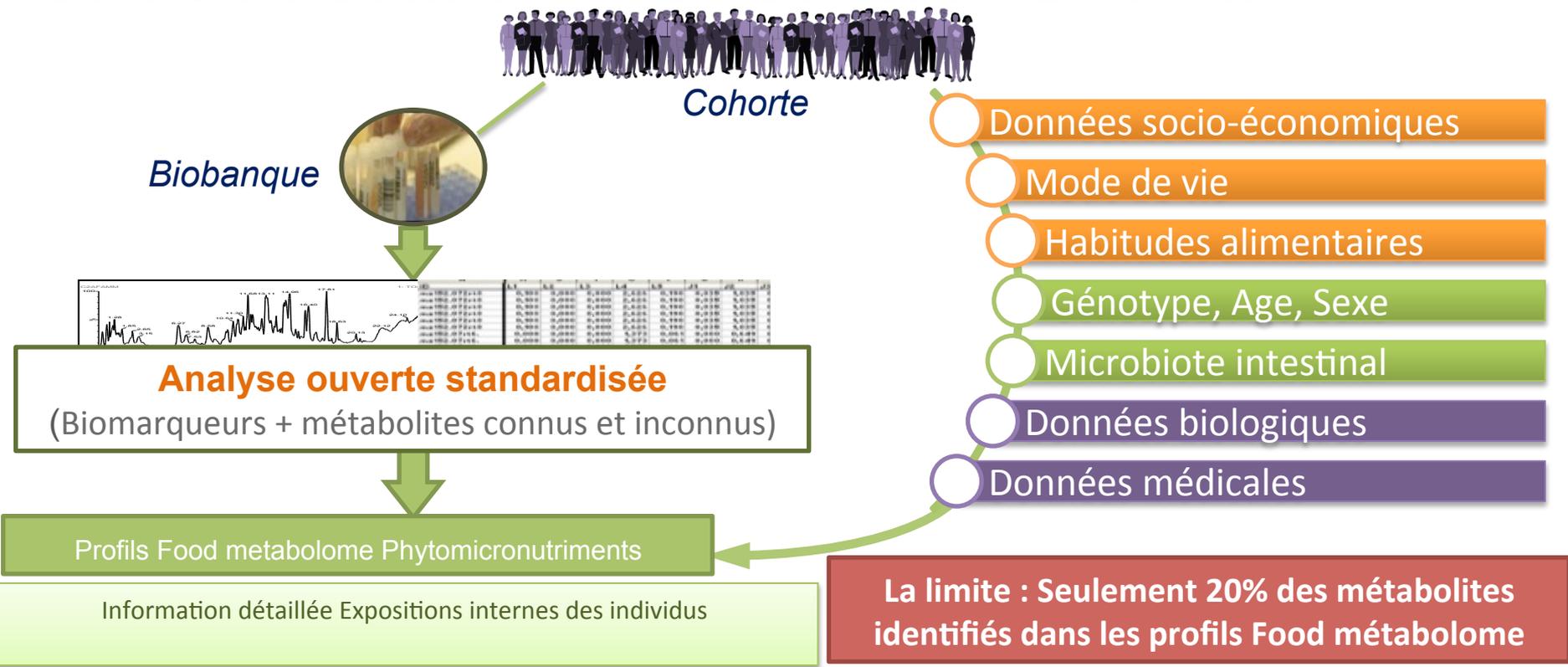
Analyse ouverte standardisée
(Biomarqueurs + métabolites connus et inconnus)

Profils Food metabolome Phytomicronutriments

Information détaillée Expositions internes des individus

Polyphenols (>650)	Terpènes (>240)
Anthocyanes Flavanols Flavanones Flavones Flavonols Isoflavones Acides phénoliques Ellagitannins Stilbènes Lignanes Coumarines	Monoterpènes Diterpènes Sesquiterpènes Triterpènes Caroténoïdes Phytostérols
Divers (>70)	Composés azotés (>180)
Aliphatiques Acides organiques Acides gras & lipides Thiosulfates	Alcaloïdes Bétaglucosides Purines & pyrimidines Acides aminés Amines Glucosinolates

PROFILS D'EXPOSITION AUX PHYTOMICRONUTRIMENTS



Cohorte

Biobanque



- Données socio-économiques
- Mode de vie
- Habitudes alimentaires
- Génotype, Age, Sexe
- Microbiote intestinal
- Données biologiques
- Données médicales

Analyse ouverte standardisée
(Biomarqueurs + métabolites connus et inconnus)

Profils Food metabolome Phytomicronutriments

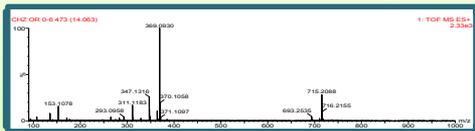
Information détaillée Expositions internes des individus

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

IDENTIFICATION DES METABOLITES : LA LIMITE

Procédure d'identification (LC-MS)

Analyser les **données spectrales**



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

Analyser les **standards**

Validation de l'identification

Bases de composés



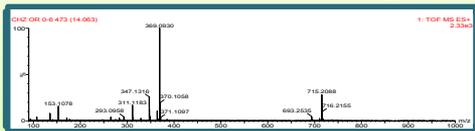
Dictionary of Food Compounds

Analyses complémentaires

IDENTIFICATION DES METABOLITES : LA LIMITE

Procédure d'identification (LC-MS)

Analyser les **données spectrales**



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

Analyser les **standards**

Validation de l'identification

Mais :

Pour les métabolites des phytomicronutriments :

- ✓ Les bases sont incomplètes
- ✓ Les standards manquent

Analyses complémentaires



Projet Foodball

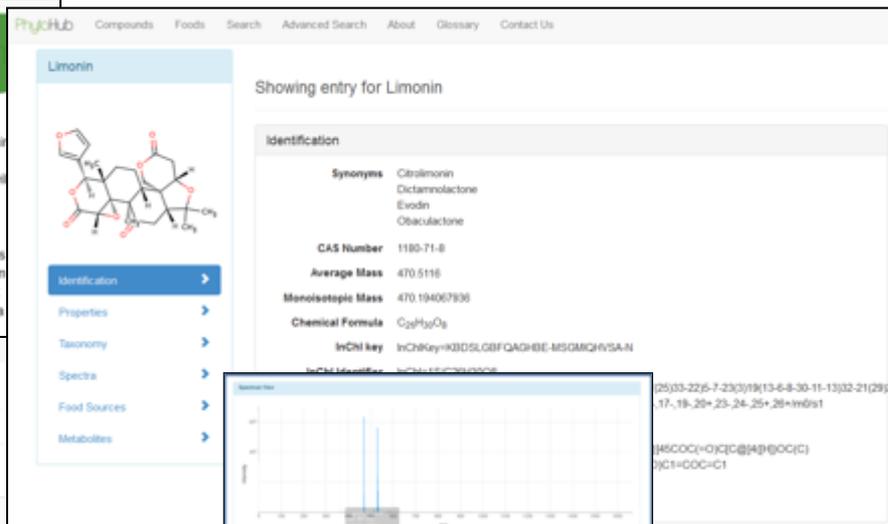
Amélioration des bases de données et de la disponibilité des standards



UNE NOUVELLE BASE DE DONNÉES : PHYTOHUB (www.phytohub.eu)



PhytoHub is a freely available electronic database contains detailed information about dietary phytochemicals and their human metabolites. Around 1,000 dietary phytochemicals are included which represent all the polyphenols, terpenoids, alkaloids and other plant secondary metabolites commonly 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 such as [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 uses expert knowledge of host and microbial metabolism for the various families of phytochemicals, 4) physico-chemical data such as solubility and physiological charge, 5) monoisotopic mass and spectral data (collected from libraries of spectra such as [MassBank](#) literature and from our mass



Showing entry for Limonin

Identification

Synonyms Citrolimonin
Dictamnolactone
Evodon
Obaculactone

CAS Number 1180-71-8

Average Mass 470.5156

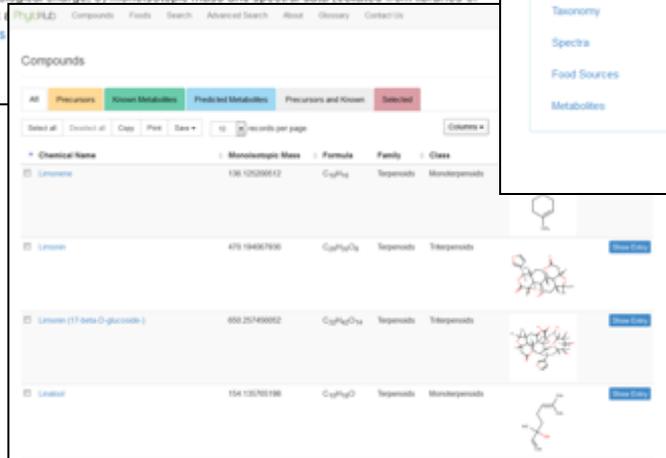
Monoisotopic Mass 470.194067936

Chemical Formula C₂₂H₃₂O₅

InChI key InChIKey=KQDLSGBFQAGHBE-MSQMQRHVA-N

InChI InChI=1S/C22H32O5/c1-11-10-19-20-23-24-25-26-1/m0/s1

SMILES [H]COC(=O)C[C@@H](O)C(C)C[C@@H](O)C=C1



Compounds

Chemical Name	Monoisotopic Mass	Formula	Family	Class
Limonin	470.194067936	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	Terpenoids	Monoterpenoids
Limonin (11 beta-D-glucoside)	650.257490032	C ₂₈ H ₄₂ O ₇	Terpenoids	Terpenoids
Limonin	154.132761196	C ₉ H ₁₄ O	Terpenoids	Monoterpenoids



COUVERTURE CHIMIQUE DE PHYTOHUB

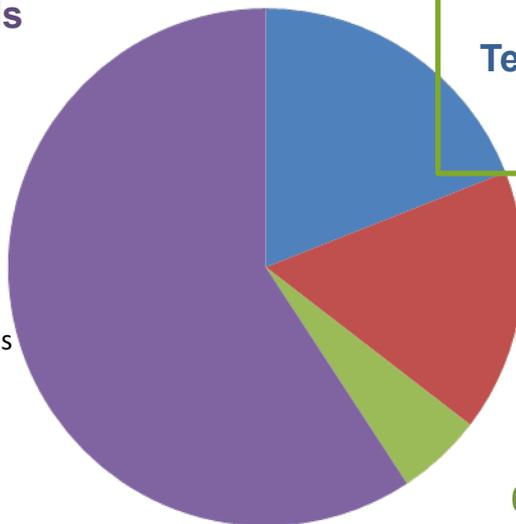


PhytoHub

> 1140 Phytomicronutriments

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

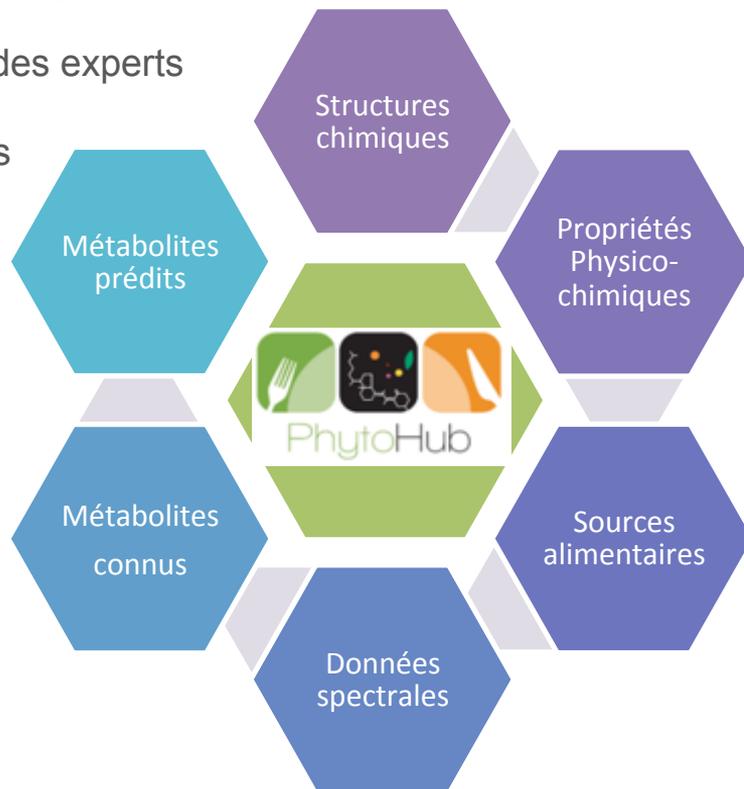
69 Divers

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

PhytoHub V1.0

PHYTOHUB [\(www.Phytohub.eu\)](http://www.Phytohub.eu)

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



Mise à jour tous les 2 mois

Formula search

Mass Search Formula Search Compound Search Food Search

Molecular formula e.g. C₁₆H₁₂O₆

Search Clear

Compound search

Mass Search Formula Search Compound Search Food Search

Search Full or Partial Compound Name:

E.g. Camphor Search Clear

Food search

Mass Search Formula Search Compound Search Food Search

Search Full or Partial Food Name:

E.g. Apple Search Clear



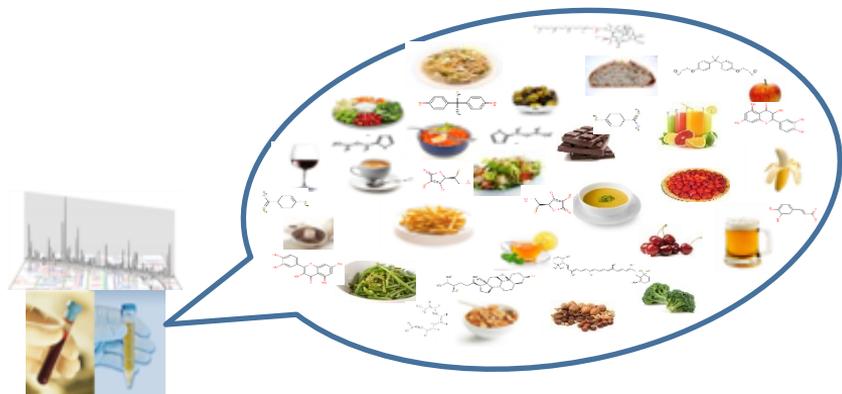
Quels sont les métabolites de phytomicronutriments attendus dans les fluides biologiques après consommation d'un aliment particulier?



Quels sont les phytomicronutriments ou leurs métabolites qui correspondent à une formule élémentaire recherchée? Quelles sont leurs origines alimentaires et métaboliques possibles?

CONCLUSION

- ❖ La **métabolomique basée sur la spectrométrie de masse** permet d'explorer plus en détail notre exposition aux phyto-micronutriments
- ❖ 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 de leurs aliments sources...**



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

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



REMERCIEMENTS



 **INRA**
SCIENCE & IMPACT

UMR1019- Unité Nutrition Humaine

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

 **METABOHUB**
Plate-Forme
EXPLORATION du METABOLISME
des gènes aux métabolites

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

 **PsychHub**

UREN, Inserm/INRA/CNAM/Paris 13

Mathilde TOUVIER
Leopold FEZEU
Pilar GALAN
Serge HERCBERG



Edmonton, Canada

Craig KNOX
Roman EISNER



Financements



Projet Agruvasc
Projet PhenoMeNEp



Bourse post-doctorale YF



Projet Football
« Food Biomarker Alliance »

7th
ICPH

International Conference on Polyphenols and Health

October 27-30, 2015

Congress Center Tours, France

www.icph2015.com



INRA
SCIENCE & IMPACT



CARREFOURS
DE L'INNOVATION AGRONOMIQUE