



Novembre 2020

Recherche de marqueurs chimiques du miel de niaouli

Comparaison des polyphénols contenus dans 60 échantillons de
miels de Nouvelle-Calédonie – Recherche de marqueurs
moléculaires du miel de niaouli

Contexte et objectifs de l'étude

L'étude des polyphénols de 60 miels présentée dans ce rapport a été commandée par le centre de promotion pour l'apiculture de Nouvelle-Calédonie et fait partie d'un programme de caractérisation des miels locaux et en particulier du miel monofloral de niaouli, en vue de développer des labels distinctifs de miels à plus forte valeur ajoutée.

Cette étude fait suite au rendu d'un rapport bibliographique concernant les différentes techniques d'analyse de la chimie des miels (remis le 30 octobre 2017) et d'un protocole détaillé et budgétisé (remis le 15 décembre 2017) qui suggéraient l'étude des polyphénols et des composés volatils du miel à l'aide de techniques fiables, robustes et applicables avec les outils disponibles localement.

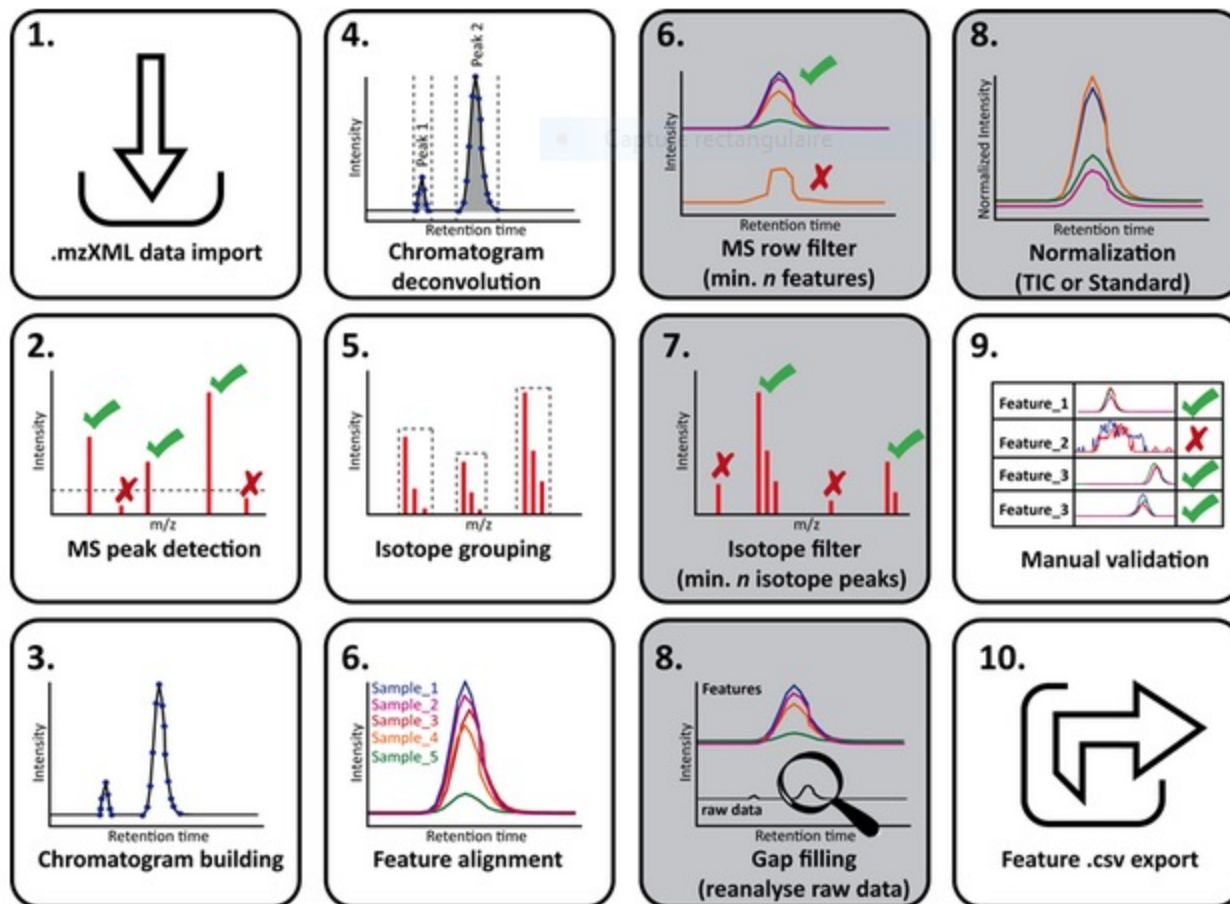
Cette étude fait également suite à une étude préliminaire menée sur 18 miels (rapport remis en mars 2019). Ces résultats préliminaires avaient mis en évidence que les différences entre miel de niaouli et autres miels se font principalement après ionisation positive des composés. Nous avons vérifié cette observation et nous avons ici approfondie ces résultats obtenus à partir de 60 miels.

Outils - méthodes

Les précédents rapports ont détaillé la méthode utilisée pour la préparation des échantillons de miel pour en extraire les composés phénoliques et leur analyse par LC-MS haute résolution. Le traitement des données à l'aide du logiciel MZMine obtenues peut permettre d'identifier des marqueurs chimiques des miels de niaouli. Pour cela, la méthode de traitement des données utilisée se base ensuite sur l'utilisation:

- D'outils statistiques pour mettre en évidence des différences entre miels de niaouli et autres miels > MetaboAnalyst
- L'annotation in-silico de la chimie des composés du miel > GNPS
- La méthode du Molecular networking : représentation graphique permettant de visualiser l'ensemble des données > Cytoscape

Data treatment avec MZ-MINE : rappel du workflow

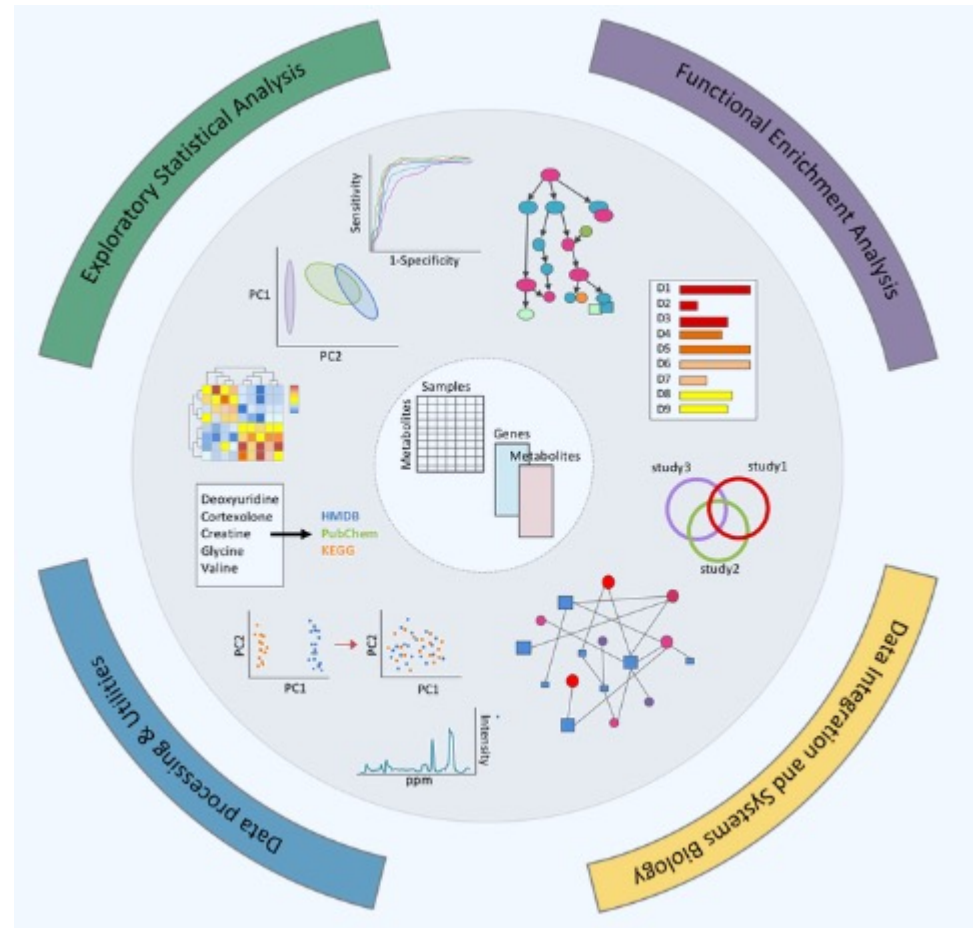


<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>

Approche statistique avec Metabo Analyst

Online data treatment >

<https://www.metaboanalyst.ca/docs/Overview.xhtml>



Molecular Networking

Molecular Networking

Un réseau moléculaire (Molecular network) est une représentation graphique visuelle de l'ensemble de l'espace chimique d'un échantillon détecté par spectrométrie de masse (MS/MS). Cette méthode permet de grouper les différents composés détectés en fonction de leur proximité structurale même lorsque leur structure n'est pas connue, en comparant leur profil de fragmentation MS/MS.

Les réseaux moléculaires créés avec GNPS ou Cytoscape représentent chaque ion (composé détecté) sous forme de nœuds, et les relations de proximité qui les lient aux autres composés comme des segments entre les nœuds. Les nœuds peuvent être annotés avec les données MS, MSMS mais aussi à partir des métadonnées associées et fournies par l'utilisateur (ex: miel de niaouli 0, 1 ou 2). Ces métadonnées peuvent être utilisées pour colorer ou dimensionner les nœuds pour mettre certaines choses en évidence (ex: composés les plus abondants dans un échantillon particulier).

Spectral Library Search

Les données MS/MS obtenues à partir des échantillons sont comparées à des données de références issues de différentes bibliothèques (Dictionary of Natural product, GNPS, etc.). Ces confrontations permettent d'annoter les différents composés du mélange, c'est à dire de proposer à plus ou moins de confiance une structure chimique associée à certains ions.

Feature Based Molecular Network with Cytoscape

The screenshot displays the Cytoscape interface with a feature-based molecular network. The network is visualized as a series of vertical columns of nodes, with node size and position determined by features. The 'Tool Panel' is highlighted in yellow, showing 'Node Layout Tools' with 'Scale' and 'Rotate' sliders. The 'Table Panel' at the bottom shows a data table with columns for node name, charge, parent mass, and various GNP groups.

name	charge	parent mass	GNPGROUP_SAPPLE	GNPGROUP_Occasionally	GNPGROUP_More_than_30	SunPeelIntensity
1801	0	915.9202	682.5811818181818	1476.6357000000287	1353.9096818182081	15016.796000000287
9483	0	452.7306	808.6942045454545	113.5720999999969	1516.470318181812	17791.272499999124
6079	0	972.7185	907.3123181818187	50.93929999999726	1784.7482727272698	19960.870999999966

<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSPDocumentation/featurebasedmolecularnetworking-cytoscape/>

Echantillons de miels analysés - 2020

Num_Echantillon	N_echantillon	Appellation	Niaouli_potentiel	pollen_niaouli	conductivite	Polyphenols	Dom_Famille	Dom_Genre	Dom_Sp	pollen_dominant
15	2019_53	Toutes fleurs	0	10	0,6	62	Rosaceae			90
23	2019_68	Toutes fleurs	0	10	1,0	56	Cunoniaceae			70
47	2019-100	Mouirange	0	10	0,6	52	Cunoniaceae			55
48	2019-113	Maqui	0	10	0,5	61	Cunoniaceae			60
50	2019-115	Lifou	0	12	1,1	76	ND			26
52	2019-124	Lifou	0	18	0,7	64	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	72
2	2019-06	Miellat	0	0	0,6	44	Mimosaceae	Mimosa	pubica	36
6	2019_15	Toutes fleurs	0	0	0,9	56	Cunoniaceae			52
12	2019_39	Ouvéa	0	0	0,5	58	Myrtaceae			30
13	2019_46	Lifou	0	0	0,7	54	Cunoniaceae			49
14	2019_48	Lifou	0	0	0,3	37	Oleaceae			50
16	2019_54	Maré	0	0	0,4	41	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	92
17	2019_56	Lifou	0	0	0,5	53	Cunoniaceae			27
18	2019_57	Lifou	0	0	0,6	66	Polygonaceae			62
25	2019_73	Lifou	0	0	0,6	62	Cunoniaceae			40
26	2019_74	Lifou	0	0	0,6	46	Cunoniaceae			57
44	2019-94	Lifou	0	0	0,5	63	Cunoniaceae			73
45	2019-95	Lifou	0	0	0,5	72	ND			29
46	2019-97	Lifou	0	0	0,3	48	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	36
49	2019-114	Lifou	0	0	0,3	49	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	34
51	2019-122	Lifou	0	0	0,0	61	Myrtaceae			52
53	2019-128	MARÉ	0	0	0,5	47	Cunoniaceae			72
54	2019-129	Lifou	0	0	0,4	53	Oleaceae			32
55	2019-130	Lifou	0	0	0,7	53	Cunoniaceae			41
27	2019_76_EN	Niaouli	2	91	1,4	49	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	91
3	2019_10_EN	Toutes fleurs	2	90	1,0	47	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	90
36	2019_85_EN	Niaouli	2	81	1,1	52	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	81
28	2019_77_EN	Niaouli	2	80	1,0	54	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	80
34	2019_83_EN	Niaouli	2	75	1,2	48	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	75
35	2019_84_EN	Niaouli	2	74	1,2	45	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	74
31	2019_80_EN	Niaouli	2	72	1,5	57	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	72
20	2019_63_EN	Niaouli	2	68	0,9	44	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	68
29	2019_78_EN	Niaouli	2	54	0,9	54	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	54
4	2019_12_EN	Toutes fleurs	2	49	0,8	27	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	49
38	2019_87_EN	Niaouli	2	44	1,0	49	Cunoniaceae			46
32	2019_81_EN	Niaouli	2	41	1,1	52	Cunoniaceae			47
30	2019_79_EN	Niaouli	2	36	1,4	60	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	36
43	2019_92_EN	Niaouli	2	33	1,0	52	Mimosaceae	Acacia		42
21	2019_64	Niaouli	2	32	1,5	60	Mimosaceae	Mimosa	pubica	64
42	2019_91_EN	Niaouli	2	32	1,0	60	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	32
41	2019_90_EN	Niaouli	2	29	1,0	43	Mimosaceae			59
24	2019_72_EN	Niaouli	2	26	1,1	62	Mimosaceae	Mimosa	pubica	43
1	2019-03	Maquis	2	19	0,7	46	Cunoniaceae			70
5	2019_13_EN	Toutes fleurs	2	16	0,8	42	Mimosaceae	Mimosa	pubica	58
37	2019_86_EN	Niaouli	2	15	1,3	58	Cunoniaceae			79
33	2019_82_EN	Niaouli	2	14	0,9	45	Cunoniaceae			80
10	2019_28	Toutes fleurs	2	13	0,7	57	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	73
9	2019_27	Toutes fleurs	2	12	0,7	58	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	72
7	2019_25_EN	Toutes fleurs	2	10	0,7	44	Mimosaceae	Mimosa	pubica	44
8	2019_26_EN	Toutes fleurs	2	0	0,7	46	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	95
11	2019_29	Toutes fleurs	2	0	0,9	56	Cunoniaceae			30
19	2019_62_EN	Niaouli	2	0	0,5	32	Myrtaceae			55
22	2019_66	Forêt	1	41	0,7	58	Myrtaceae	Melaleuca	quinquenervia	41
39	2019_88	Forêt	1	15	0,7	44	Cunoniaceae			79
40	2019_89	Forêt	1	26	0,6	69	Mimosaceae	Mimosa	pubica	28
56	2019-140	Maquis	1	29	0,7	73	Anacardiaceae	Schinus		55
57	2019-142	Toutes fleurs	1	0	0,6	52	Cunoniaceae			68
58	2019-145	Toutes fleurs	1	0	0,0	57	Cunoniaceae			73
59	2019-146	Toutes fleurs	1	0	0,5	49	Cunoniaceae			80
60	2019-148	Toutes fleurs	1	0	0,4	58	Anacardiaceae	Schinus	terebinthifolius	72

60 Echantillons de miels analysés - 2020

Métadonnées – informations utiles concernant les échantillons:

Niaouli potentiel: caractérise la présence +/- probable de niaouli dans le miel (0: très peu probable; 1: probable; 2: très probable) > **critère principal utilisé pour ségréguer les miels de niaouli 2 des miels autres 0.**

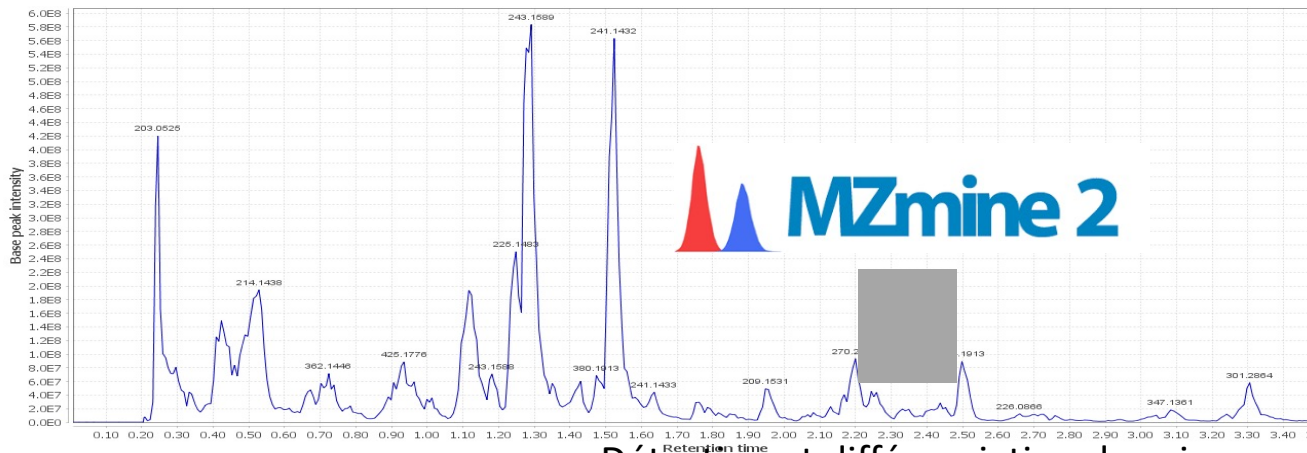
Conductivité: mesure effectuée sur les miels et corrélée selon les travaux de l'adecal à la proportion de miel de niaouli (>0,8 S/cm)

Polyphénols: dosage des polyphénols totaux des miels (non utilisé).

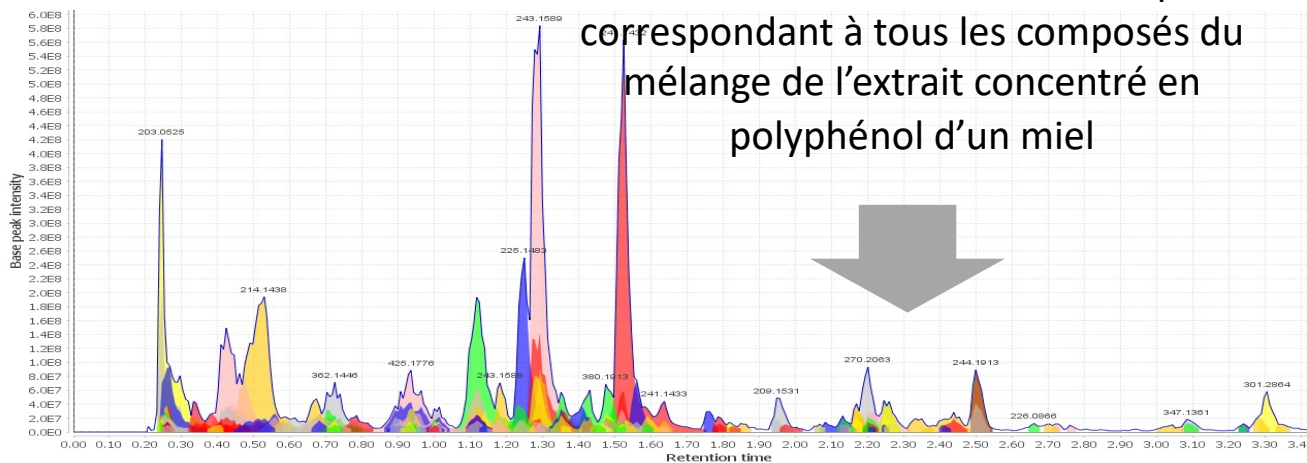
Analyse des pollens du miel :

- du pollen de niaouli a été observé dans les miels 0
- Certains miels 2 contiennent peu de pollen de niaouli
- Certains pollen (notamment mimosa punica et schinus sont retrouvés dans les miels 0 et 2 ce qui nuit à la distinction entre ces deux groupes.

Traitement des données



Détection et différenciation des pics
correspondant à tous les composés du
mélange de l'extrait concentré en
polyphénol d'un miel



- Utilisation mode d'ionisation Pos (permet une meilleure détection des polyphénols et une meilleure ségrégation des miels de niaouli comme l'avait déjà montré les essais préliminaires précédents.

- chaque pic est caractérisé par:
 - temps de rétention
 - Masse mol (hrms)
 - Masse Fragments
 - Aire du pic (abondance relative des différents composés)

> MATRICE DE DONNÉES

6456 pics quantifiés dans chaque miel

csv data + metadata

Approche statistique

Est-ce que les miels de niaoulis sont différents des autres miels?

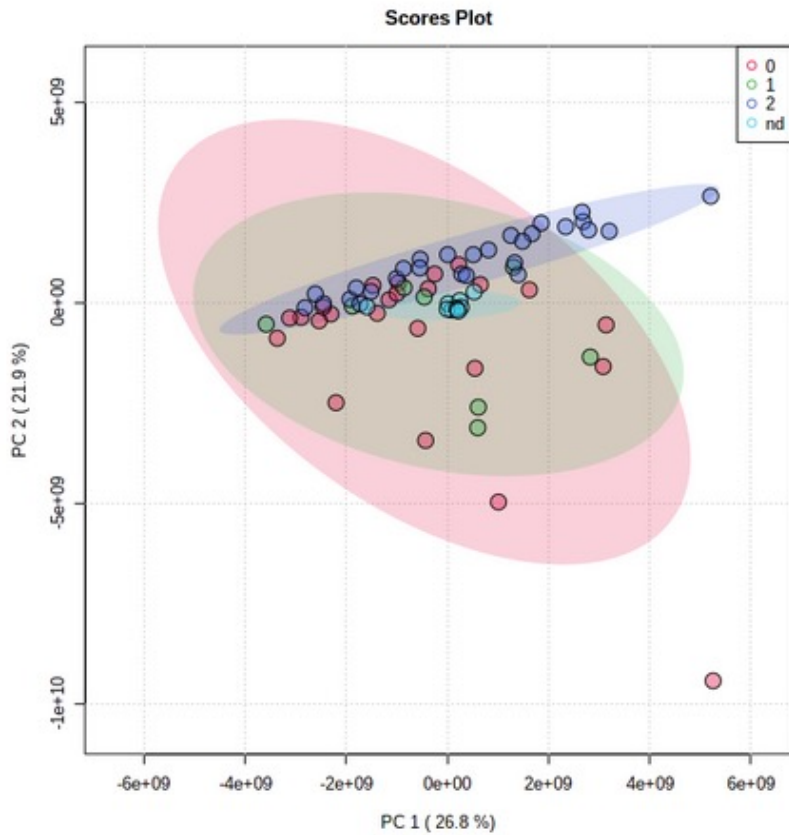
Quels composés sont spécifiques du miel de niaouli?

2 séries de données LC-MS comparées:

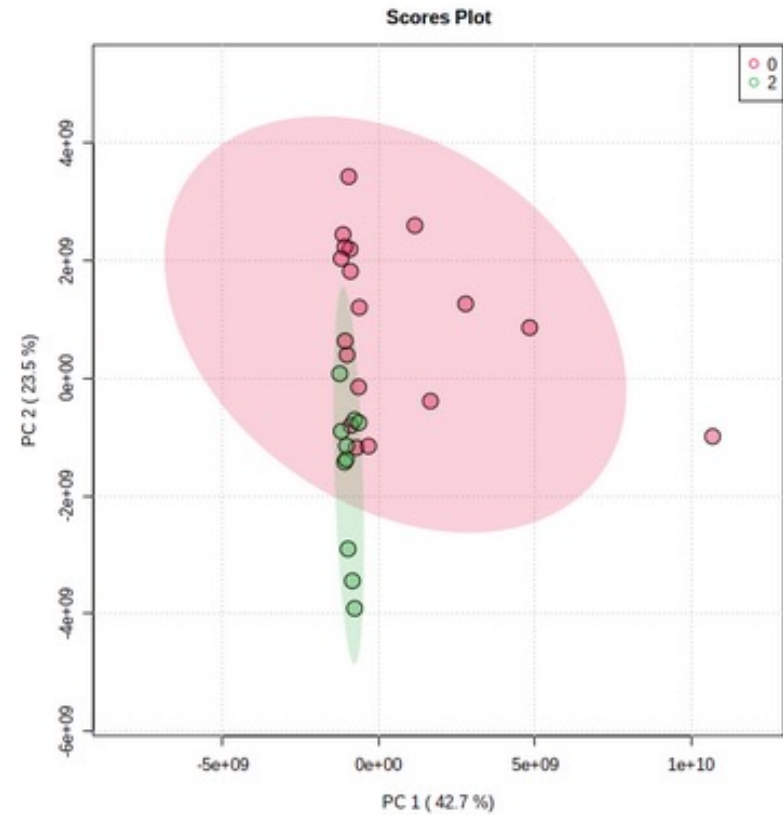
- 0/1/2
- 0/2 cleaned (uniquement les 0 sans niaouli et 2 avec une majorité de niaouli et sans *M. pudica* ou *S. terebinthifolius*).

ACP (non supervisée)

[0]-[1]-[2]



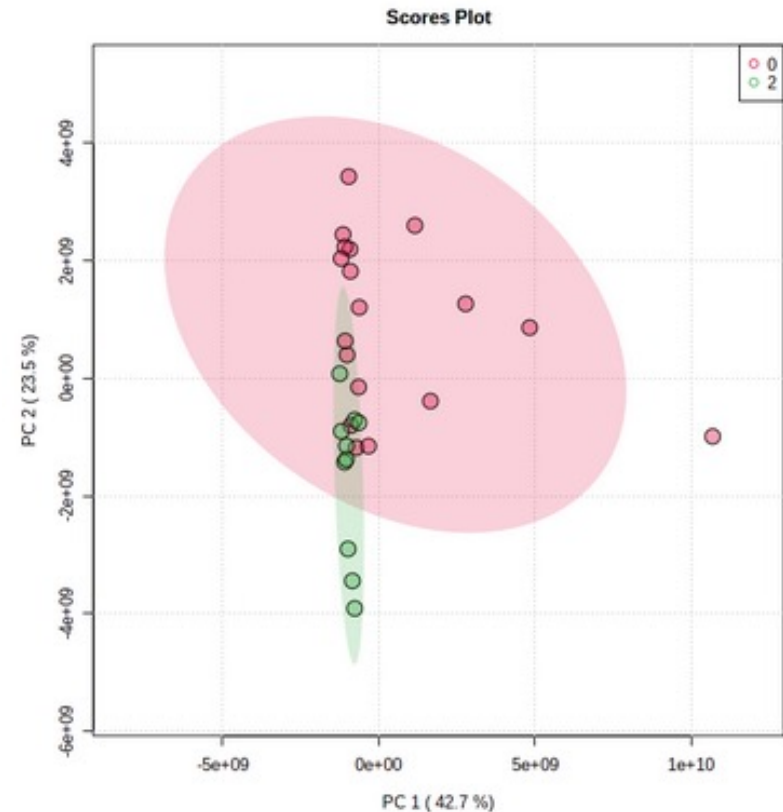
[0]-[2] cleaned



ACP (non supervisée)

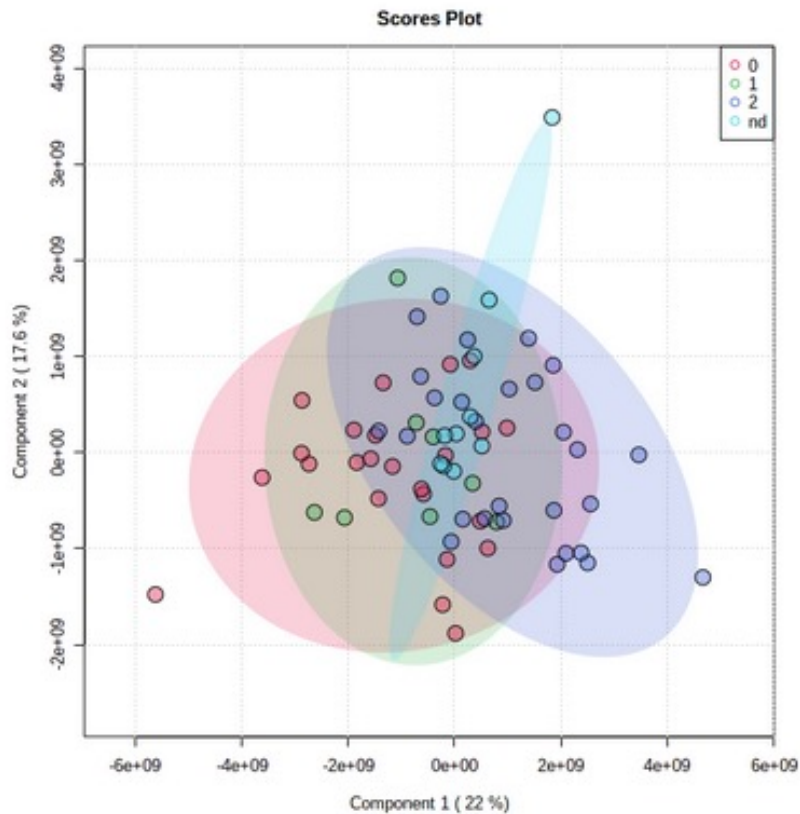
- Il semble que les miels de niaouli présentent des particularités
- Un nombre potentiellement important de composés ubiquitaires peuvent expliquer que les deux classes se chevauchent.
- Importance de l'échantillonnage et de l'utilisation des métadonnées pour percevoir ces spécificités

[0]-[2] cleaned

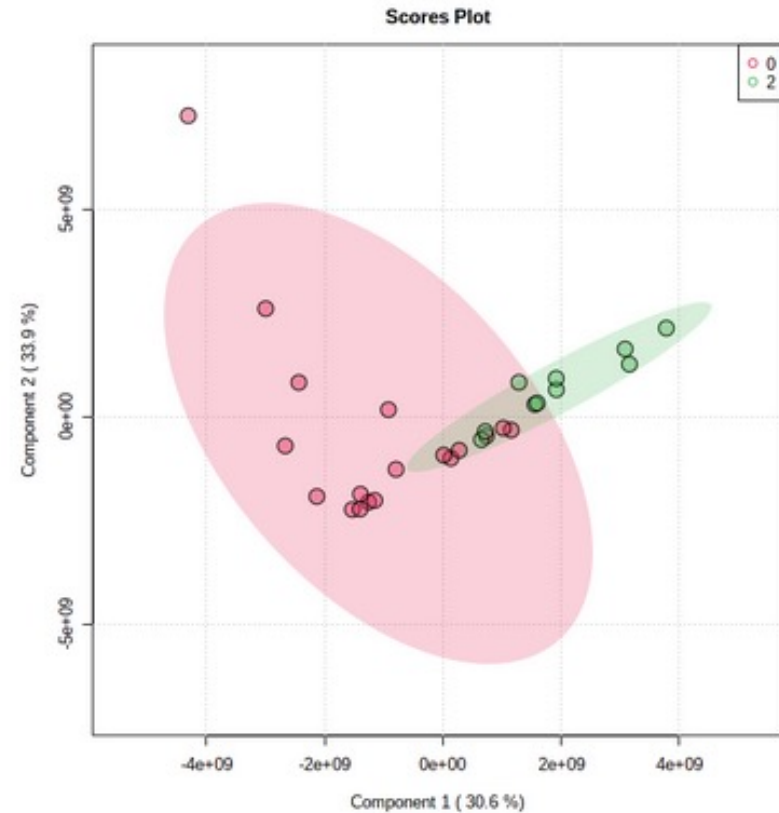


PLS-DA (suppervisé)

[0]-[1]-[2]



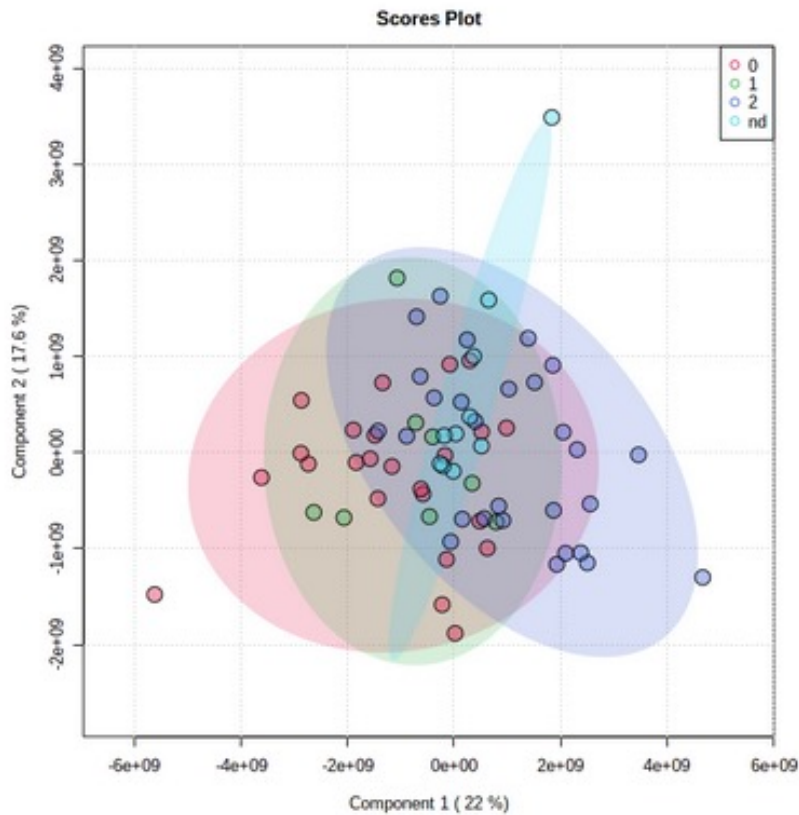
[0]-[2] cleaned



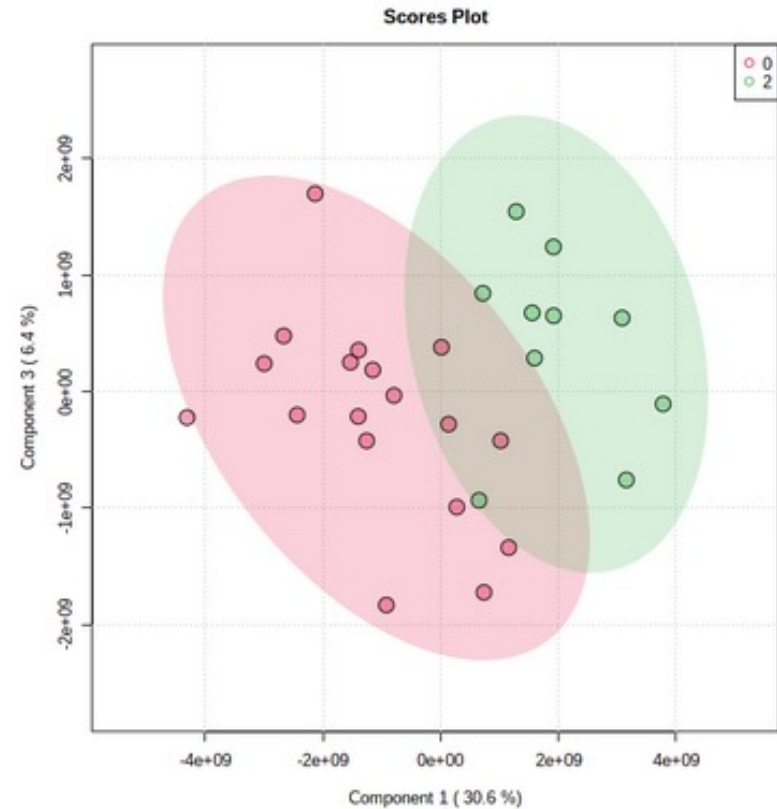
PLS-Discriminant Analysis (PLS-DA, Barker and Rayens, 2003) is a linear classification model that is able to predict the class of new samples.

PLS-DA (suppervisé)

[0]-[1]-[2]

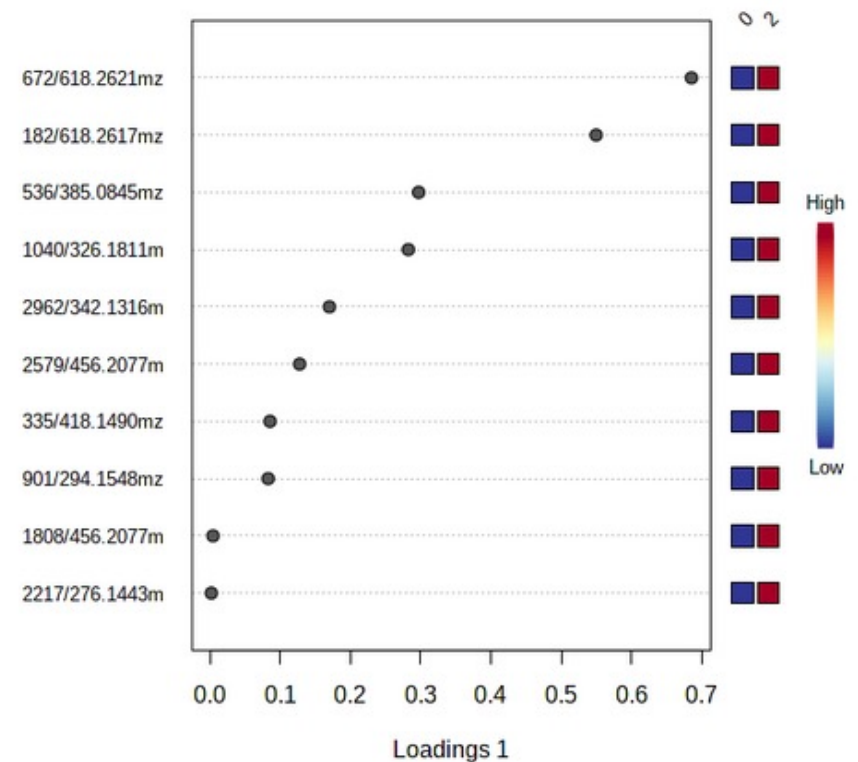
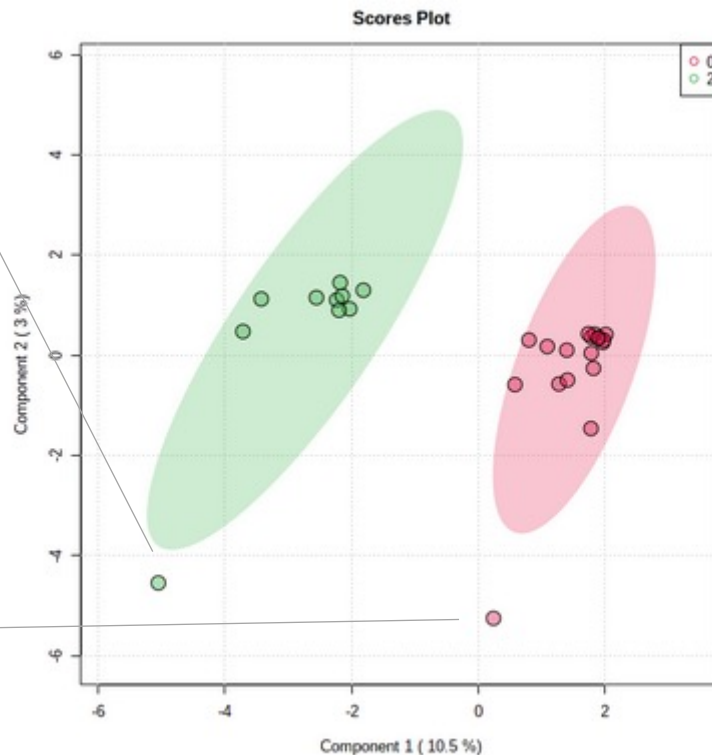


[0]-[2] cleaned

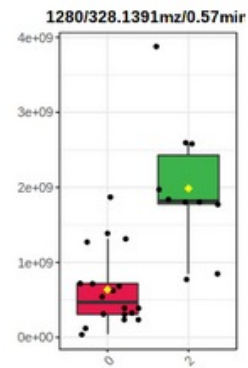
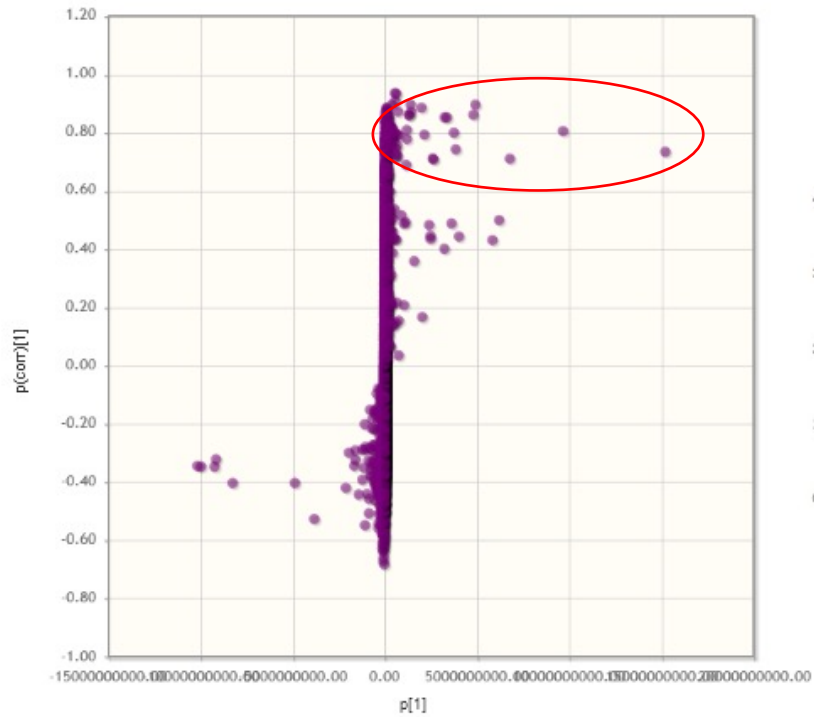


Sparse-PLSDA

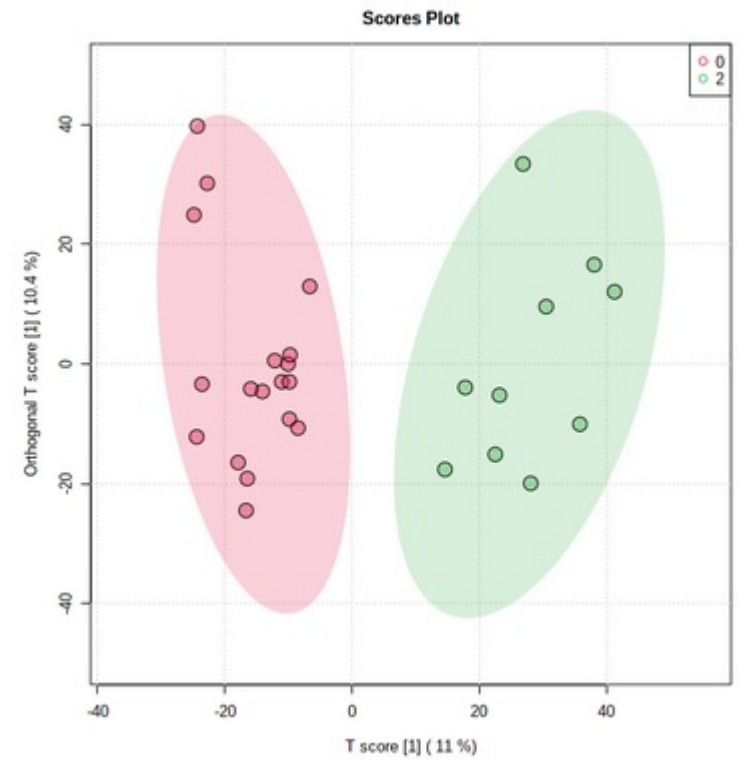
sparse PLS-DA (sPLS-DA) enables the selection of the most predictive or discriminative features in the data that help classify the samples (Lê Cao et al., 2011).



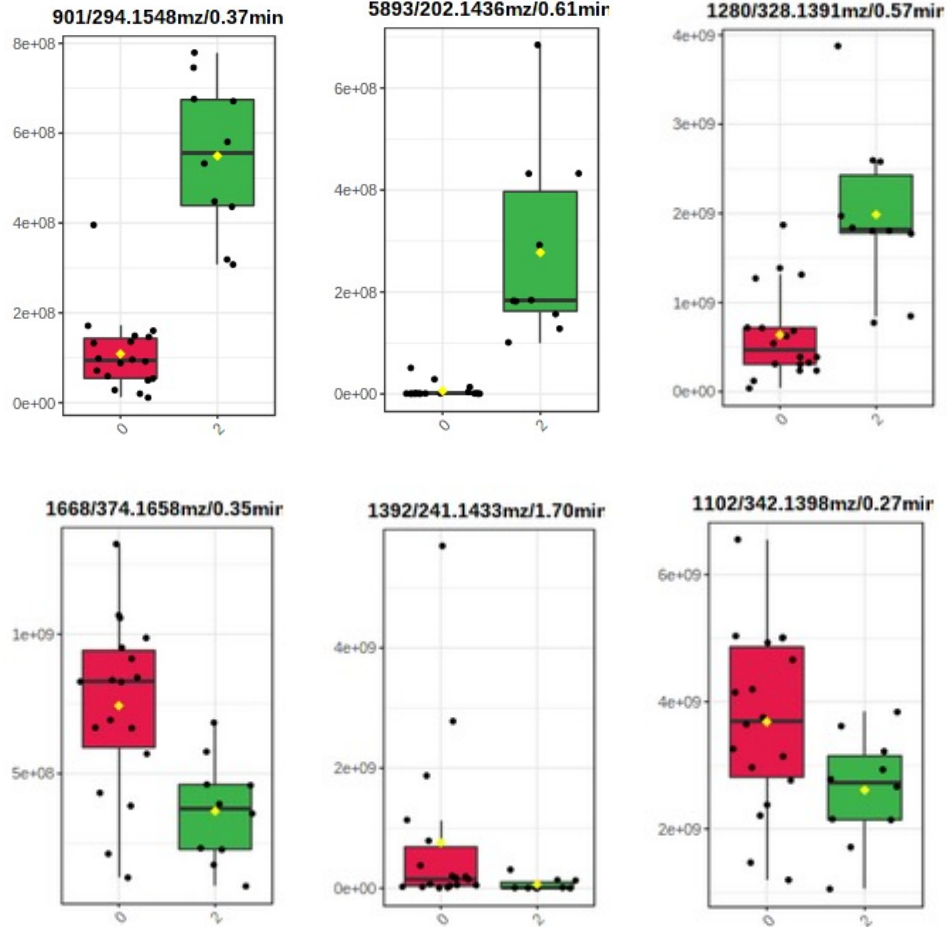
Ortho-PLSDA



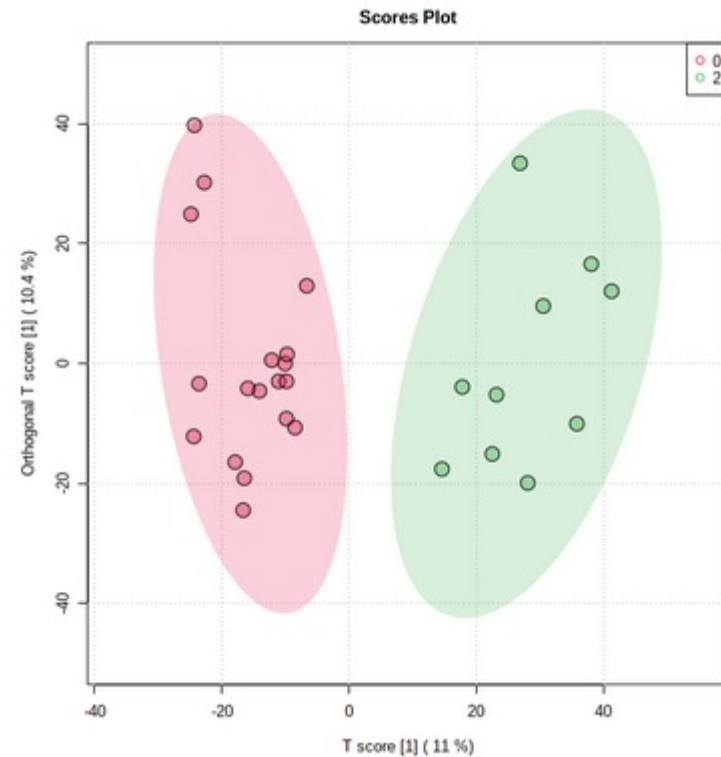
[0]-[2] cleaned



Ortho-PLSDA

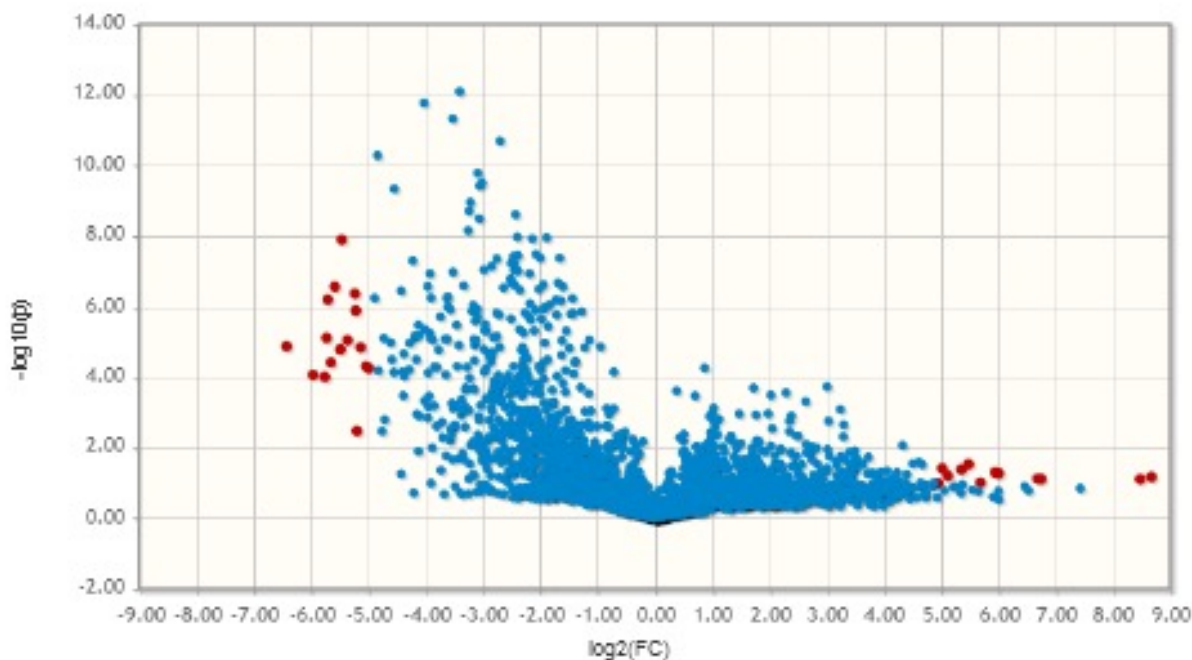


[0]-[2] cleaned

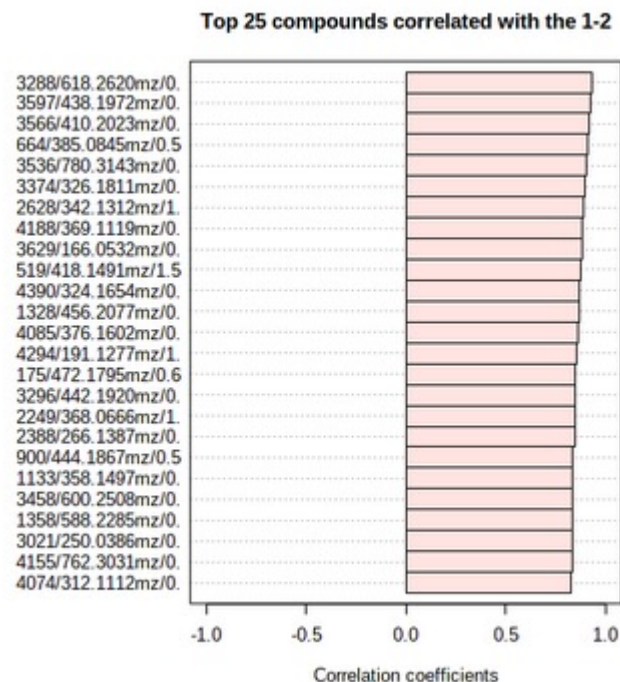


Composés discriminants [0]-[2] cleaned

Volcano Plot:



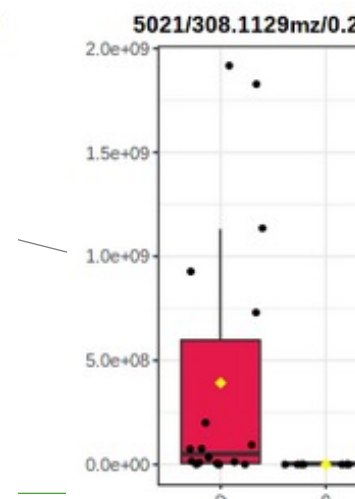
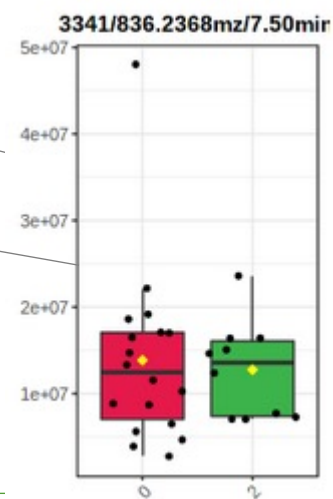
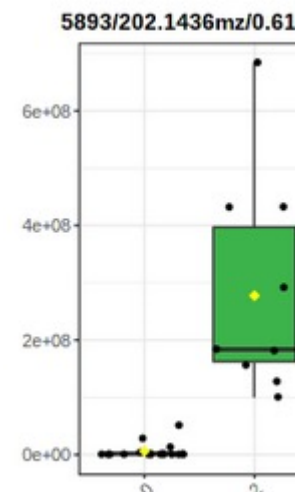
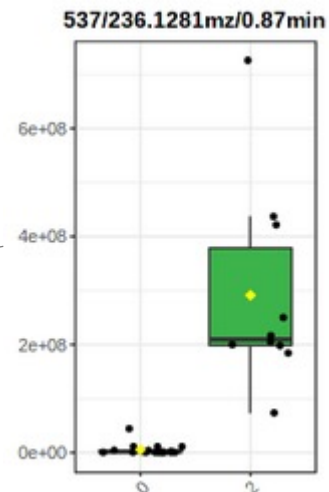
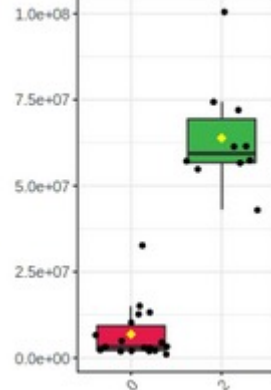
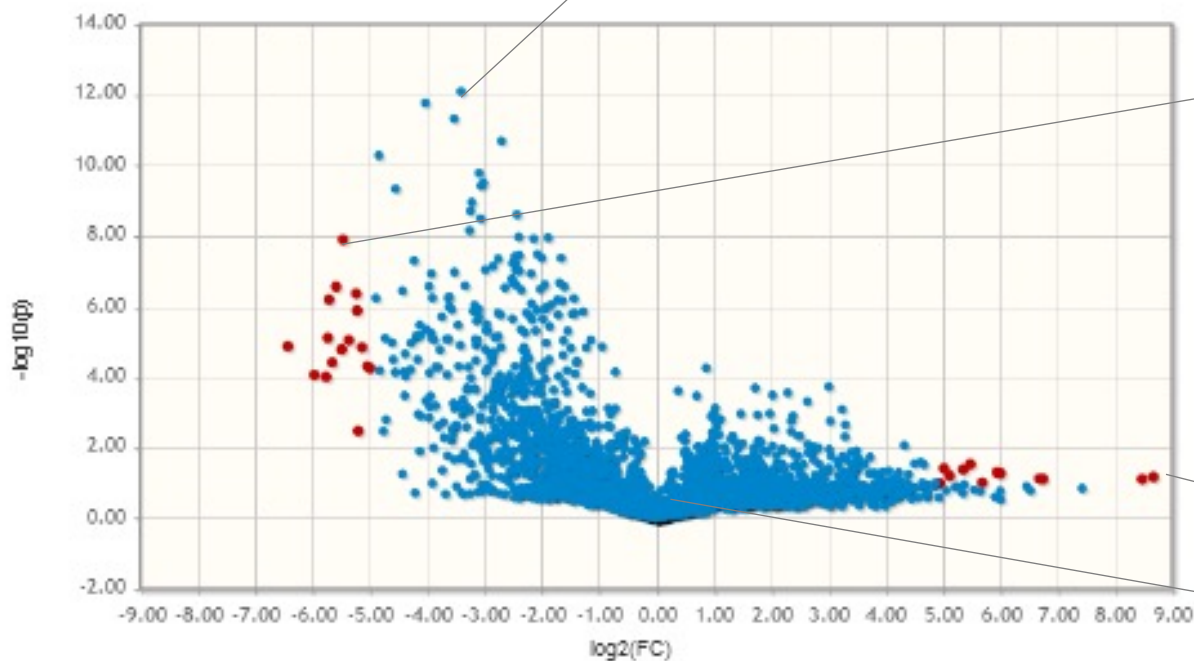
Pattern Hunter:



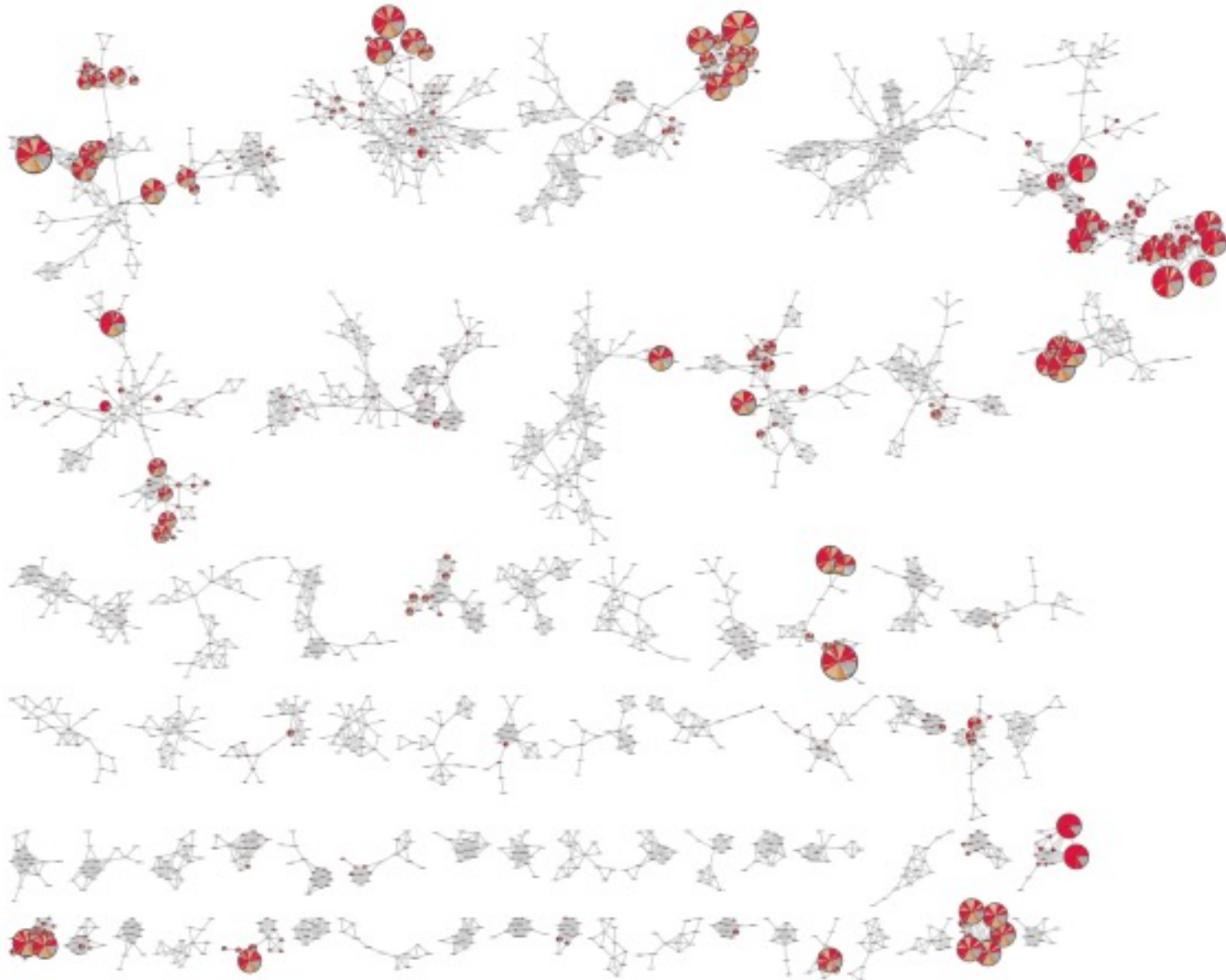
> Liste de pics (RT, MW, MSMS) dont la moyenne d'abondance entre les miels de niaouli [2] et non niaouli [0] est la plus importante.

Composés discrim

[0]-[2] cleaned



Approche graphique – FBMN Cytoscape



Approche graphique – FBMN Cytoscape

➤ Légende:

- Miel niaouli potentiel 0
- Miel niaouli potentiel 1
- Miel niaouli potentiel 2
- QC / blanc

Observations du réseau:

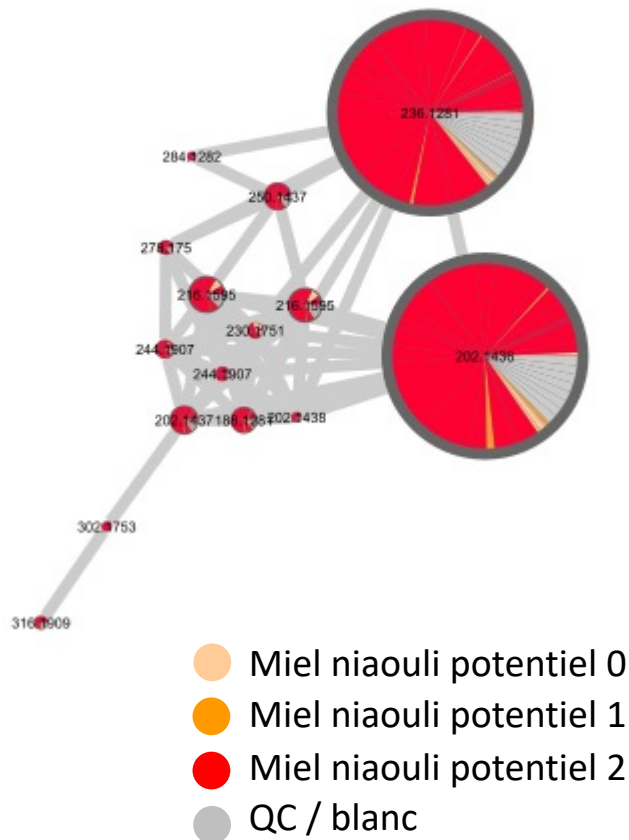
Les plus gros cluster contiennent plutôt des composés ubiquitaires

Beaucoup de petits composés phénoliques azotés

Beaucoup de composés non annotés > originaux? chimie des miels et plantes calédoniennes peu documentées.

Approche graphique – FBMN Cytoscape

Réseau spécifique des miels de niaouli:



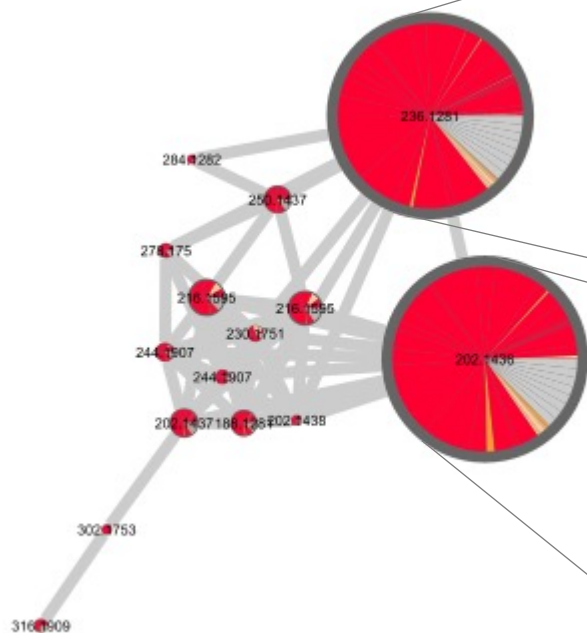
Liste des composés annotés (score, RT (=polarité), nom/N°CAS/info chimiotaxonomique > peu informatif pour les miels et plantes calédoniennes

- Dans les clusters spécifiques du niaouli
- Dans les clusters important d'un miel particulier (considéré comme le plus pure niaouli par ex le 27).

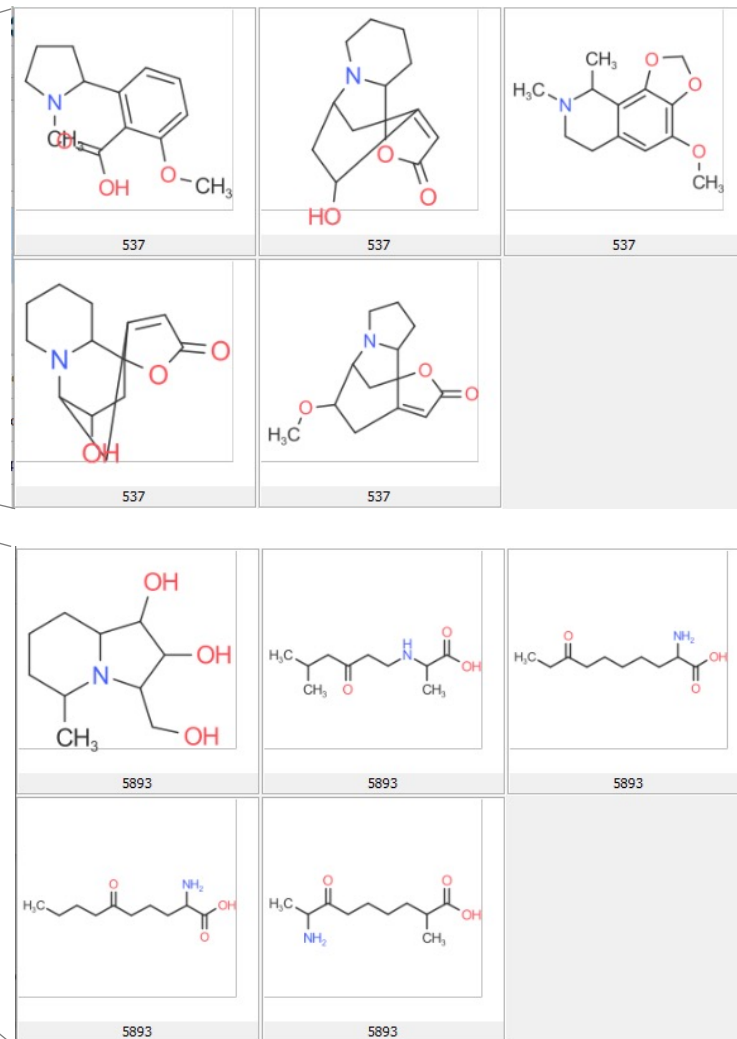
Approche graphique – FBMN Cytoscape

Réseau spécifique des miels de niaouli:

Cluster 1

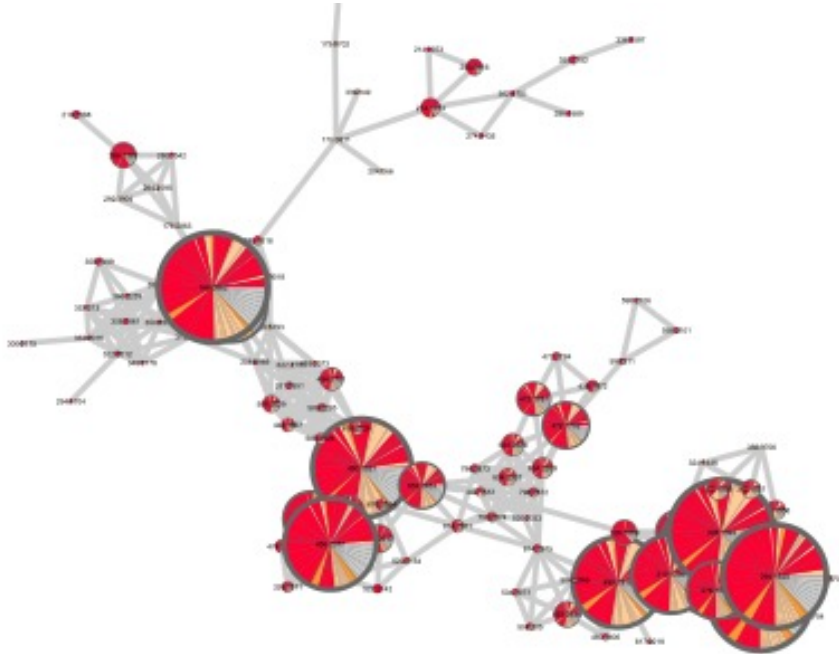


- Miel niaouli potentiel 0
- Miel niaouli potentiel 1
- Miel niaouli potentiel 2
- QC / blanc



Approche graphique – FBMN Cytoscape

Réseau spécifique des miels de niaouli: cluster 2

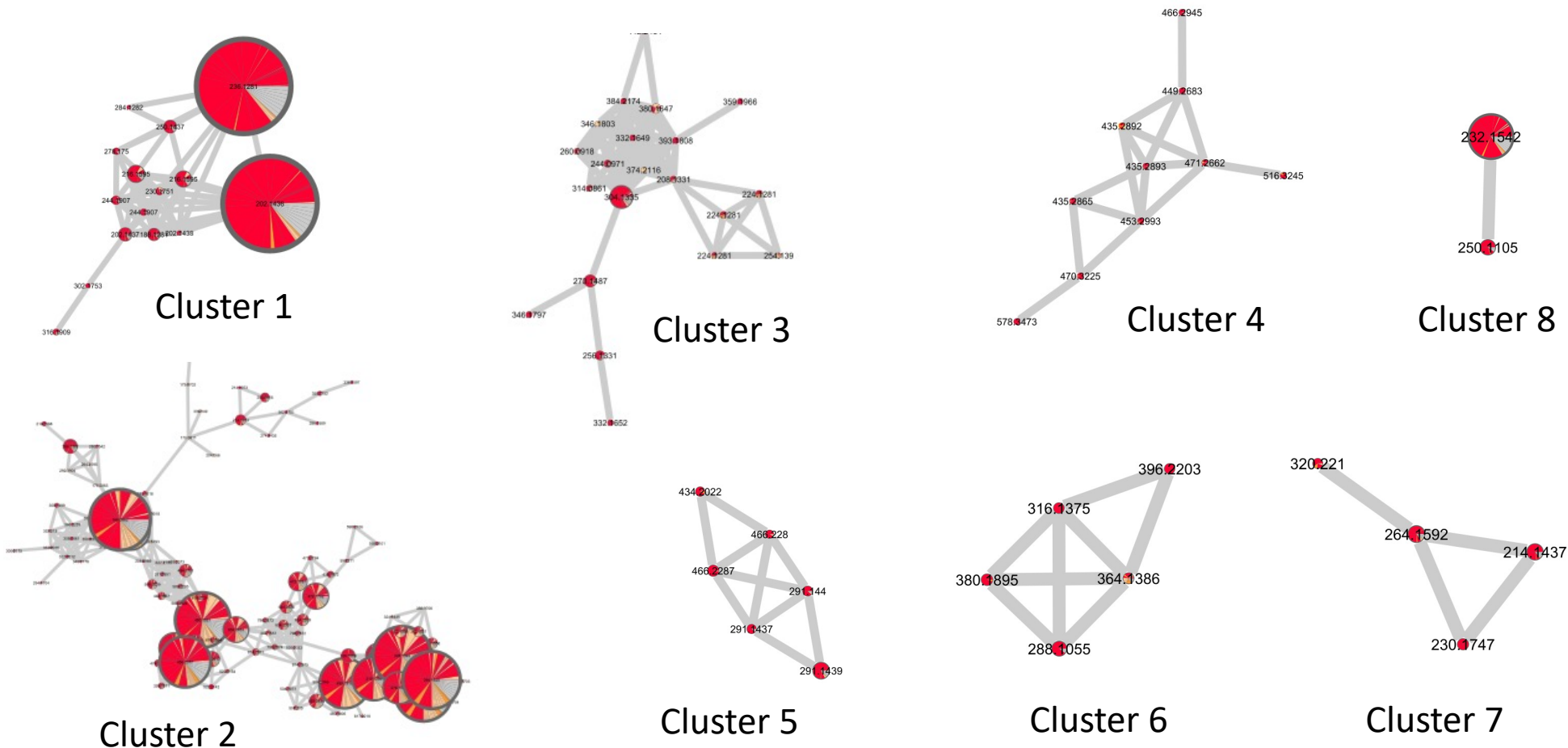


- Miel niaouli potentiel 0
- Miel niaouli potentiel 1
- Miel niaouli potentiel 2
- QC / blanc

					Image Unavailable
901	1256	1256	1256	1256	21
2217	2217	2217	4268	1309	1309
1309	1309	1256	1280	1280	1280
1280	1280	4352	4352	4352	

Approche graphique – FBMN Cytoscape

Clusters spécifiques du niaouli identifiés

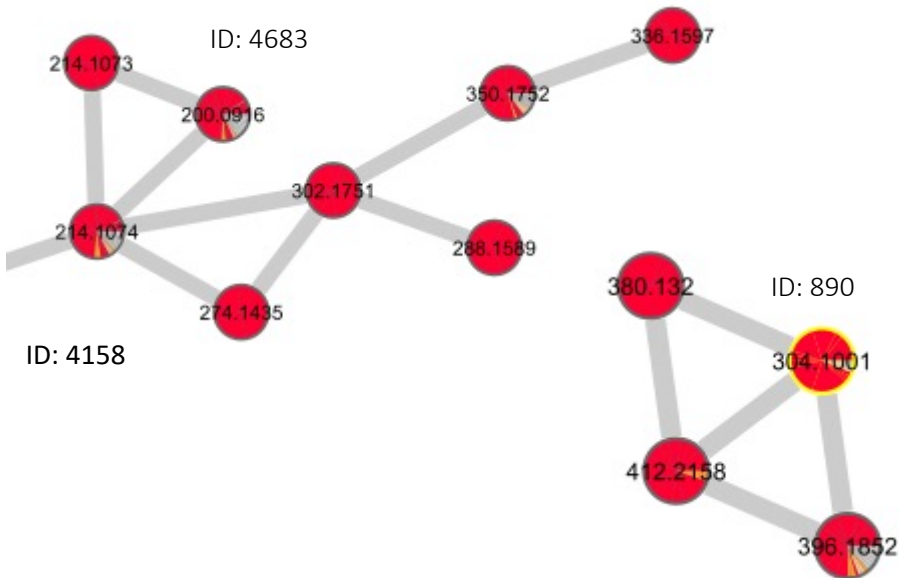


Pour aller plus loin



ID: 5094

**Autre clusters
spécifiques des
miels de niaoulis**

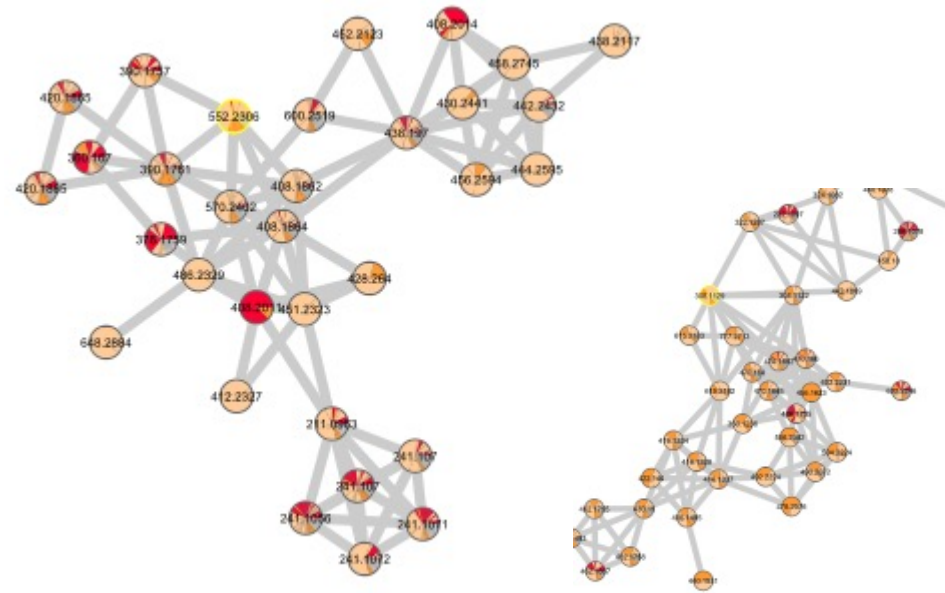


ID: 4158

**Clusters de
composés
absents des
miels de niaoulis**



ID: 3533



Pic ID	Test selection	M/Z	Graphical info
74	Volcano plot	267.1225	Dans cluster ubi
182	Volcano perso, pattern Hunter, S-PLSDA	618,2617	Cluster 2
328	Pattern hunter	626,427	Cluster 12
335	Pattern hunter, S-PLSDA	418,149	isolé
536	Pattern hunter, S-PLSDA	358,1858	Dans cluster ubi
537	Volcano plot	236.128	Cluster 1
672	Volcano perso, pattern Hunter, S-PLSDA	618,2621	Cluster 2
901	Pattern hunter, O-PLSDA, S-PLSDA	294,1548	Cluster 2
948	S-PLSDA	460,3635	isolé (ptt nb échantillons)
981	O-PLSDA	652,2453	Cluster 2
1040	Volcano perso, pattern Hunter, S-PLSDA	326,1811	Cluster 2
1104	O-PLSDA	243,0875	Dans cluster ubi
1126	O-PLSDA	490,1921	Cluster 2
1256	O-PLSDA	310,1286	Cluster 2
1280	O-PLSDA	328,1391	Cluster 2
1285	Volcano perso	216,1595	Cluster 1
1286	O-PLSDA	166,0862	Cluster 2
1294	Volcano perso	216,1595	Cluster 1
1309	O-PLSDA	328,1309	Cluster 2
1453	Volcano perso, Pattern hunter	266,1393	Cluster 2
1726	Volcano plot	200.1645	isolé
1808	Pattern hunter, S-PLSDA	542,1573	isolé (ptt nb échantillons)
2051	Volcano plot	288.1956	Dans cluster ubi
2140	Pattern hunter	588,2285	Cluster 2
2213	Pattern hunter	285,0976	Isolé
2217	Pattern hunter, O-PLSDA, S-PLSDA	276,1443	Cluster 2
2322	Pattern hunter	438,1972	Cluster 2
2326	Pattern hunter, O-PLSDA	472,1792	Cluster 2
2507	O-PLSDA	310,1288	Cluster 2
2579	Pattern hunter, O-PLSDA, S-PLSDA	456,2077	Cluster 2
2919	Pattern hunter	204,1594	Dans cluster ubi (ptt nb échantillons)
2950	Pattern hunter	444,1867	Cluster 2
2962	Pattern hunter, S-PLSDA	342,1316	Dans cluster ubi (ptt nb échantillons)
3098	Pattern hunter	472,1784	Cluster 2
3434	Volcano plot	224.1435	Dans cluster ubi
3485	Volcano perso	250,1437	Cluster 1
3689	Volcano perso, pattern hunter	232,1542	Cluster 9
3803	Volcano plot	202.1437	Cluster 1
4158	Volcano plot	214.1074	New cluster 10

Confrontation données Stat/Graph

> Bonne corrélation, notamment cluster 1 & 2 sont prometteurs pour la recherche de marqueurs du miel de niaouli

Conclusions

- Méthode puissante et efficace pour discriminer les miels de niaouli de miels issus d'autres fleurs
- L'échantillonnage et métadonnées associées sont des facteurs clés pour identifier des marqueurs du miel de niaouli.
- Deux clusters de petits composés phénoliques azotés (1 et 2) ont été identifiés comme marqueurs potentiel du miel de niaouli.
- D'autres pistes pourraient également être suivies (clusters minoritaires ou composés isolés).
- L'annotation des composés détectés est peu efficace sur les échantillons analysés, probablement du fait d'un manque de connaissance général sur la chimie des miels (peu d'étude MS/MS) et sur les plantes calédoniennes.

Perspectives possibles

- NC Bioressources s'associe à l'UNC pour développer un plateau technique d'analyse et va acquérir un spectromètre de masse qui permettra de faire les analyses localement. L'accès facilité à ces outils analytiques permettra d'améliorer significativement le service proposé. 2021
 - Créer une base de données sur la chimie des miels
 - Etablir un partenariat avec la NZ pour la poursuite des travaux > Fonds Pac

- Parmi les nombreuses possibilités d'études de la chimie des miels calédoniens, voici plusieurs pistes pour aller plus loin dans la connaissances des miels calédoniens et du miel de niaouli en particulier: 2022
 - Analyse du nectar des fleurs pour retracer l'origine des marqueurs
 - Essais de protocoles d'extraction alternatifs pour détecter d'autres composés.
 - Expertise stat et augmentation des réplicats.
 - Recherche d'activités biologiques associées aux composés détectés (notamment marqueurs).



NC BIORESSOURCES

L'innovation est naturelle

Etude réalisée par Paul Coulerie

Tel : (+687) 25 54 08

Mobile : (+687) 73 73 22

p.coulerie@ncbioressources.nc

Documentation

<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>

<https://www.metaboanalyst.ca/docs/Overview.xhtml>

<https://www.math.univ-toulouse.fr/~besse/Wikistat/>