Développement de méthodologies pour l'étude du lipidome d'isolats de Pseudomonas aeruginosa provenant d'un patient atteint d'une infection pulmonaire chronique.

Estelle Deschamps

▶ **To cite this version:**

Estelle Deschamps. Développement de méthodologies pour l'étude du lipidome d'isolats de Pseudomonas aeruginosa provenant d'un patient atteint d'une infection pulmonaire chronique.. Chimie thérapeutique. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR054 . tel-03129984

HAL Id: tel-03129984
https://theses.hal.science/tel-03129984

Submitted on 3 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de méthodologies pour l'étude du lipidome d'isolats de *Pseudomonas aeruginosa* provenant d'un patient atteint d'une infection pulmonaire chronique

Présentée et soutenue par
Estelle DESCHAMPS

Thèse soutenue publiquement le 14 Décembre 2020 devant le jury composé de		
Mme Corinne BURE	Ingénieure de recherche CNRS, Université de Bordeaux, Laboratoire CGFB, Bordeaux	Rapporteure
M. Jean-Marc BERJEAUD	Professeur de l'Université de Poitiers, Laboratoire EBI, Poitiers	Rapporteur
M. Olivier LAPREVOTE	Professeur de l'Université de Paris Descartes, Laboratoire CiTCoM, Paris	Examinateur
M. Thierry JOUENNE	Directeur de recherche CNRS, Université de Rouen Normandie, Laboratoire PBS, Mont-Saint-Aignan	Examinateur
M. Stéphane ALEXANDRE	Chargé de recherche CNRS, Université de Rouen Normandie, Laboratoire PBS, Mont-Saint-Aignan	Directeur de thèse
Mme Corinne LOUTELIER-BOURHIS	Maître de conférences de l'Université de Rouen Normandie, Laboratoire COBRA, Mont-Saint-Aignan	Codirectrice de thèse

Thèse dirigée par le Dr. Stéphane ALEXANDRE, laboratoire PBS UMR 6270
Codirigée par la Dr. Corinne LOUTELIER-BOURHIS, laboratoire COBRA UMR 6014

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

PBS Polymères Biopolymères Surfaces UMR 6270

Laboratoire Cobra

A mes parents,

A mon grand-frère

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés, à l'Université de Rouen-Normandie, au sein de l'équipe BRICS du laboratoire PBS, sous la direction du Dr. Stéphane Alexandre, et de l'équipe 1 analyse du laboratoire COBRA, sous la direction de la Dr. Corinne Loutelier-Bourhis.

Je tiens à remercier en premier lieu le Dr. Lhousseine Touqui, pour avoir initié ce projet de recherche et fourni la souche de référence utilisée dans ces travaux, ainsi que le Dr. Philippe Morand, pour avoir fourni les isolats cliniques et réalisé les tests phylogénétiques.

Je souhaite remercier la Dr. Corinne Buré et le Pr. Jean-Marc Berjeaud d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'au Pr. Olivier Laprévote et Pr. Thierry Jouenne pour avoir accepté d'être examinateurs.

Merci beaucoup à mes encadrants de m'avoir suivie tout le long de cette thèse. Ce n'était pas toujours facile d'avoir autant de correcteurs, notamment pour la rédaction des articles et de la thèse. Vous avez tous, et toutes, pris le temps de répondre à mes questions, de me conseiller et, surtout, de suivre avec très grand sérieux l'avancée de ma thèse. Je n'aurais pas réussi à avancer aussi loin sans votre aide et je vous suis vraiment reconnaissante pour cela. Merci surtout de votre patience… je reconnais avoir mon petit caractère. J'espère que vous avez apprécié travailler avec moi autant que j'ai apprécié travailler avec vous.

Merci à mon directeur de thèse, le Dr. Stéphane Alexandre, pour votre grande disponibilité, vos connaissances scientifiques, de m'avoir aidée à interpréter mes données dans leur contexte biologique et à prendre du recul. Merci pour votre grand calme aussi !

Merci à ma co-directrice de thèse, la Dr. Corinne Loutelier-Bourhis, pour ta grande disponibilité, tes connaissances scientifiques, de m'avoir aidée plus d'une fois dans le traitement de mes données et la rédaction. Merci beaucoup pour ta bonne humeur et ton dynamisme !

Merci à mon encadrante, la Dr. Annick Schaumann, de m'avoir enseignée tous les protocoles de microbiologie et de m'avoir donné, plus de fois que je ne peux le compter, un coup de main pour les réaliser.

Merci à ma seconde encadrante, Mme Isabelle Schmitz-Afonso, pour ta très grande disponibilité, ton aide à la résolution des problèmes techniques (bien que le Synapt et la Dionex, soient bien moins capricieux que le FT, il peut leur arriver un petit « bip bip » de temps en temps), et tes explications sur l'acquisition et le traitement des données des analyses non-ciblées.

Merci à la responsable de l'équipe BRICS, la Pr. Emmanuelle Dé, de m'avoir grandement aidée pour la rédaction de mon 2nd article et la correction de la bibliographie de cette thèse. Merci de m'avoir expliquée tout un tas de notions, notamment en microbiologie et sur les antibiotiques.

Merci au responsable de l'équipe 1, le Pr. Carlos Afonso, de m'avoir aidée à la rédaction des articles, notamment pour mieux « raconter une histoire » et pour vos nombreuses idées.

Cette thèse a été par moment éprouvante, notamment pour la préparation des échantillons biologiques. Je n'aurais pas réussi à tenir sans la très bonne humeur qui règne dans l'équipe BRICS et l'équipe 1.

Merci à mes collègues de l'équipe BRICS pour vos nombreux délires, surtout le midi. Tout le monde déborde d'imagination… c'était parfait pour se changer les idées. J'ai apprécié que tout le monde se réunisse, doctorants, post-doc, stagiaires, comme permanents, dans cette ambiance conviviale. Dommage, cette année mon anniversaire est tombé le premier jour du 1er confinement, je n'ai donc pas pu répondre à mon devoir en terme de gâteau d'anniversaire. En plus de mes encadrants, merci aux permanents, Julie, Laurent, Pascal, Thierry, Clément et Amine, aux anciens doctorants, Marion et Charlotte « une » et aux doctorants actuels, Charlotte « deux », Yuzhen, Brandon et Salomé, et notre super ancien post-doc Sébastien.

Merci à mes collègues de l'équipe 1 pour votre bonne humeur. J'ai particulièrement apprécié l'ambiance d'entraide qu'il y avait, entre doctorants notamment. C'est un peu plus calme depuis que Johann, alias tonton Jojo, est parti, mais la bonne humeur est toujours là… juste avec un peu moins de blagues beaufs. En plus de mes encadrants, merci à Marie et Mathilde d'être disponibles pour nous aider et nous conseiller. Un grand merci aux doctorants, devenus docteurs depuis, tonton Jojo (aussi alias Tic ou Docteur²), Julien (alias Tac), Sébastien, à ceux à deux doigts d'y arriver (courage !), Guillaume et Matthieu, à ceux en bonne voie, Oscar, Olivier, Monica, Nathaniel, Charlotte, Hend, Aurélien, Aël et aux post-doc, Justine, Leïla et Valentina. J'ai de très bons souvenirs de ma thèse à vos côtés, que ce soit des discussions enflammées du midi sur les marvels ou des congrès, notamment les clubs jeunes et l'ASMS (ohlala !).

Je tiens à remercier chaleureusement ma super stagiaire Laurine Dewolf. Tu as juste assuré ! Je n'aurais, tout simplement, pas réussi à finir ma thèse dans les temps sans ta précieuse aide. Tu m'as vraiment impressionnée par la qualité de ton travail et ta grande maturité. Merci de ta patience, je sais que je manque de tact par moments et tu as toujours bien réagi. Bon courage pour ton école d'ingénieur, ça ne va pas être facile, mais je sais que tu auras la force de surmonter les obstacles !

Enfin, merci à tous mes ami(e)s d'avoir été là pour me soutenir et me faire rire : mon meilleur ami Titi, tu es tout simplement le meilleur et un cher ami depuis plus de 16 ans, ma meilleure amie Caro, qui a soupiré plus d'une fois face mon impulsivité (je t'entends dire « alalala, Esu ! »), mes amis du lycée, avec qui je suis restée en contact depuis tout ce temps, Axel et Aurélie (courage pour ton master !), mes amis de longue date, que j'ai piqué à mon grand-frère : Pierre, Micka, Ben et Séb, et ma complice de bavardages et de délires en DUT, Sandra.

Merci à Papa et à Maman de m'avoir toujours soutenue dans tout ce que je voulais faire. Dire que je pensais m'arrêter après mon DUT, au final la curiosité scientifique m'aura entraînée un petit peu plus loin. J'espère que je ne parle pas trop en jargon scientifique !

Merci à mon grand-frère, d'essayer toujours d'aiguiser mon sens critique, d'avoir essayé de m'expliquer les analyses statistiques, ça n'a pas été facile, loin de là (et je sais que tu n'es pas encore satisfait de mon niveau !) et d'avoir relu une partie de ma bibliographie.

Pour finir, merci à toi Clément de m'avoir soutenue tout le long de ma thèse, malgré mes sautes d'humeur et le fait que toi aussi tu es dans le bain ! J'ai confiance en toi, ça va le faire !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 9
ABREVIATIONS 17

CHAPITRE I Introduction 21
I.1 Pseudomonas aeruginosa 23
I.1.1 Caractéristiques de *P. aeruginosa* 23
I.1.2 Infections et résistance aux antibiotiques 24
I.1.1 Les traitements antibiotiques 28
I.1.2 L'enveloppe cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa* 35
Références Chapitre I.1 45
I.2 Techniques d'analyse 50
I.2.1 Sciences « omiques » et lipidomique 50
I.2.2 Analyse par UHPLC-IMS-MS 57
I.2.3 Outils de bioinformatique 73
Références Chapitre I.2 81
I.3 Problématique, objectif et plan 87
Références Chapitre I.3 89

CHAPITRE II Développement des méthodes : de la préparation de l'échantillon biologique à l'analyse par spectrométrie de masse et l'interprétation des données 91
II.1 Préparation de l'échantillon biologique 93
II.1.1 Souches bactériennes utilisées 95
II.1.2 Préparation des milieux SCFM et SCFM-PC 96
II.1.3 Culture bactérienne et obtention des culots bactériens 98
II.1.4 Lyse des alginates 99
II.1.5 Rupture des membranes et enrichissement en lipides membranaires 99
II.1.6 Extraction liquide-liquide 100

II.2 Analyse par spectrométrie de masse 102
II.2.1 Précautions quant à l'utilisation du matériel : la chasse aux contaminants.... 102
II.2.2 Préparation des échantillons..... 104
II.2.3 Préparation et suivi du bon déroulement d'une séquence métabolomique .. 104
II.2.4 Instrumentation 108
II.3 Traitement des données..... 115
II.3.1 Logiciels 115
II.3.2 Interprétation des données LC-MS 116
II.3.3 Calcul des sections efficaces de collision (CCS) 121
II.3.4 Traitement des données de type métabolomique 124
Références Chapitre II 134

CHAPITRE III Etude de la souche de référence *P. aeruginosa* PAK 135
III.1 Présentation et objectifs 137
III.2 Résultats 141
III.2.1 Etude structurale par mesure des CCS (1er article) 141
III.2.2 Etude de l'influence du milieu de culture (2nd article) 179
III.3 Conclusion..... 221
References Chapitre III (hors articles) 224

CHAPITRE IV Etudes de souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* 225
IV.1 Présentation et objectifs 227
IV.2 Résultats 228
IV.2.1 Etude préliminaire et sélection des souches 228
IV.2.2 Etude des lipides membranaires extraits d'une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un patient atteint d'une infection pulmonaire chronique (3ème article) 237
IV.3 Conclusion..... 269

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 273

ANNEXES 281

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE 287

ABREVIATIONS

acylPG	acylPhosphatidylGlycérol
AFM	Microscopie à Force Atomique (*Atomic Force Microscopy*)
ANOVA	Analyse de la variance (*analysis of variance*)
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (*atmospheric pressure chemical ionisation)*
ASM	*Artificial Sputum Medium*
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCS	Section efficace de collision (*Collision Cross Section*)
CL	Cardiolipide (nom usuel pour les diphosphatidyldiglycérols)
DIMS	Spectrometry de mobilité ionique par tube de dérive *(drift-tube ion mobility spectrometry)*
DO	Densité Optique
DOPC	1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
^{DT}CCS	CCS mesurées par la technologie DIMS
ESI	Ionisation par électronébuliseur (*electrospray ionisation)*
FA	acide gras (*fatty acid*)
GC	chromatographie gazeuse (*gaz chromatography*)
HILIC	chromatographie d'interaction hydrophile (*hydropholic interation chromatography*)
HPLC	chromatographie liquide à haute performances (*high performances liquid chromatography*)
IMS	Spectrométrie de Mobilité Ionique (*Ion Mobility Spectrometry*)
LB	milieu de culture Lysogeny (*Lysogeny broth*)
LC	Chromatographie Liquide (*Liquid Chromatography*)
LCL	LysoCardiolipide
LPA	Acide lysophosphatidic (*lysophosphatidic acid*)
LPC	LysoPhosphatidylCholine

LPE	LysoPhosphatidylEthanolamine
LPS	LipoPolySaccharide
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice (m*atrix assisted laser desorption ionisation*)
MGM	Milieu minimum en glucose (*minimum glucose medium*)
MHB	Muller-Hilton *Broth* (milieu de culture commercial)
MRM	*multiple reaction monitoring*
MS	Spectrométrie de Masse (*Mass Spectrometry*)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NPLC	chromatographie en phase normale (*normal phase liquid chromatography*)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PA08A/B/C	isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* prélevés en 2008 (3 isolats)
PA18A/B	isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* prélevés en 2018 (2 isolats)
PAK	souche PAK de *Pseudomonas aeruginosa*
PC1/2	composante principale 1 ou 2 (*principal component*)
PC	PhosphatidylCholine
PCA	analyse en composante principale (*principal component analysis*)
PE	PhosphatidylEthanolamine
PG	PhosphatidylGlycérol
PLS-DA	Régression des moindres carrés partiels – analyse discriminante (*partial least squares – discriminant analysis, PLS-DA*)
QC	contrôle qualité (*quality control*)
RPLC	chromatographie en phase inverse (*reverse phase liquid chromatography)*

SCFM	*Synthetic Cystic Fibrosis Medium* (milieu de culture mimant le mucus des poumons)
SCFM-PC	SCFM complété par du DOPC
SFC	Chromatographie en phase supercritique (*supercritical fluid chromatography*)
t_D	temps de dérive
^{TIM}CCS	CCS mesurées par la technologie TWIMS
TIMS	*trapped ion mobility spectrometry*
ToF	temps de vol (*time of flight*)
TQ	Triple Quadripôle
t_R	temps de rétention
^{TW}CCS	CCS mesurées par la technologie TIMS
^{TW}IMS	*traveling wave ion mobility spectrometry*
UFC/mL	Unité Formant Colonie par millilitre
UHPLC	chromatographie liquide à ultra haute performances (*ultra-high performances liquid chromatography*)
W4M	Workflow4Metabolomics

CHAPITRE I INTRODUCTION

I.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

I.1.1 Caractéristiques de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie à gram-négatif de la famille des *Pseudomonadaceae* et du genre *Pseudomonas*. Son nom est composé d'une première partie avec les termes grecques *pseudo* (simili ou imitation) et *monas* (unité), ainsi que d'une seconde partie latine *aeruginosa* (vert-de-gris, en référence aux pigments produits par cette bactérie). Cette bactérie est un bacille (en forme de bâtonnet) dont la longueur est de l'ordre de grandeur du 1 µm [1], comme illustré par la **Figure 1**.

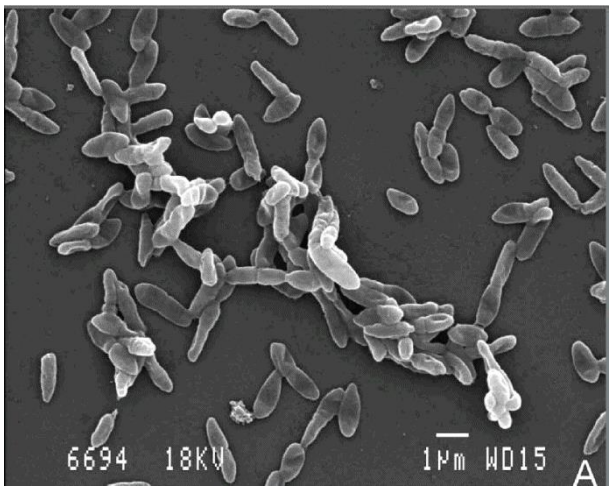


Figure 1 Images de *P. aeruginosa* fixées sur du verre, par microscopie à balayage électronique. (figure 1a de Deligianni *et al*. (2010) [1]).

P. aeruginosa est capable de coloniser des environnements très variés tels que l'eau [2], le sol et l'air [3] et de nombreux organismes vivants (plantes [4], animaux [5], Homme [6]). Cette aptitude à vivre dans des milieux très variés et même dans des conditions hostiles et pauvres en nutriments, est due à sa capacité à adapter son métabolisme selon les nutriments disponibles [7,8].

P. aeruginosa est particulièrement difficile à maîtriser dans le milieu hospitalier parce qu'elle peut se développer dans des solutions antiseptiques ou même sur des surfaces stériles [9].

De ce fait, *P. aeruginosa* est l'une des principales bactéries responsables des infections liées aux soins [10]. Bien qu'elle puisse vivre à l'état commensal chez l'Homme (colonise l'hôte sans provoquer de maladie), cette bactérie est un agent pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'elle devient pathogène lorsque le système immunitaire de l'hôte est affaibli. Dans ce cas, *P. aeruginosa* peut provoquer des infections graves touchant de nombreuses parties du corps [11]. Puisque certaines souches de cette bactérie sont aussi multi-résistantes aux antibiotiques, elle compte parmi les bactéries les plus létales pour les patients hospitalisés. Pour ces raisons, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré *P. aeruginosa* comme bactérie prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques [12].

I.1.2 Infections et résistance aux antibiotiques

I.1.2.1 Les infections à P. aeruginosa

P. aeruginosa est un problème de santé publique majeur, frappant particulièrement les patients immunodéprimés tels que les grands brûlés ou les personnes atteintes de la mucoviscidose [11,13].

En raison de la capacité de *P. aeruginosa* à coloniser des milieux et tissus très variés (sang [14], peau [15]…), les infections dues à *P. aeruginosa* sont très variables : endocardite (infection du cœur), septicémie (infection généralisée se propageant par le sang), infection urinaire, kératite (infection de la cornée, faisant suite au port de lentilles de contact), otite externe très sévère, méningite, infections pulmonaires (pouvant faire suite à une colonisation des appareils de ventilation mécanique), etc. [16,17]. Grâce à sa capacité à survivre sur des surfaces propres et le matériel opératoire, *P.aeruginosa* est aussi capable d'infecter les plaies chirurgicales [9].

Les infections à *P. aeruginosa* peuvent être aiguës (infection rapide et très agressive) [18]. Elles sont liées à un mode de vie bactérien planctonique (bactéries isolées et pouvant se déplacer dans le milieu).

Les infections peuvent également devenir chroniques (infection perdurant plusieurs années) en passant à un mode de vie bactérien en biofilm (bactéries en agrégats enfermées dans une matrice extracellulaire autoproduite) [19].

I.1.2.2 Infections chez les patients atteints de pathologies chroniques, exemple de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique rare touchant majoritairement les populations caucasiennes. Elle est à transmission autosomique récessive avec une incidence qui, par exemple en Europe, est comprise entre 1/1353 (Irlande) et 1/10 000 (Russie). En France, l'incidence est estimée à 1/4500 [20]. Quand la maladie fut décrit la première fois par Dorothy H. Anderson en 1938 [21], l'espérance de vie était de quelques années. Aujourd'hui, l'espérance de vie médiane est estimée à environ 50 ans [22].

Cette maladie est liée à la mutation d'un gène codant pour la protéine « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator », CFTR. Cette protéine est responsable du transport des ions chlorures et bicarbonates à la surface des épithéliums [23]. La mutation de cette protéine induit des anomalies de transfert ionique menant à l'épaississement du mucus sécrété par les organes tels que les poumons (au niveau des bronches), le pancréas ou les intestins [24]. Contrairement au mucus des personnes saines, la très haute viscosité du mucus des personnes atteintes de la mucoviscidose ne permet pas au mucus de répondre à son objectif de défense immunitaire et forme même un environnement très propice au développement bactérien (milieu nutritif riche, faible tension d'oxygène…), et notamment à celui de *P. aeruginosa* [23].

Si la mucoviscidose entraîne de nombreux problèmes respiratoires pour le patient, la caractéristique clinique la plus importante est l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* [23]. Plus de 80 % des patients atteints de la mucoviscidose succombent à une insuffisance respiratoire provoquée par une infection bactérienne chronique et une inflammation continue des voies respiratoires [25].

Bien que chez l'enfant, les principales bactéries retrouvées soient *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* [24], au cours de l'évolution de la maladie, la fréquence de l'infection à *P. aeruginosa* augmente avec l'âge et peut atteindre 80 % des bactéries isolées chez les adultes [26].

Lorsque l'infection devient chronique, *P. aeruginosa* subit un changement de mode de vie pour s'adapter à son environnement en changeant son métabolisme. L'infection chronique est associée à des modifications de l'expression de certains gènes et donc de certains phénotypes de la bactérie, dont les principaux sont : un métabolisme réduit, un ralentissement de la croissance, un manque de motilité (déplacement bactérien) et une surproduction d'alginates (composant principal des biofilms) [27-29].

Ces modifications rendent *P. aeruginosa* particulièrement tolérante aux antibiotiques car : i) l'épaisseur élevée du biofilm rend l'accès à *P. aeruginosa* difficile pour les antibiotiques et ii) les cibles moléculaires des antibiotiques sont moins produites de par son métabolisme réduit [19]. De plus, comme il sera détaillé dans la partie I.1.2.3, *P. aeruginosa* possède une résistance intrinsèque aux médicaments et une forte capacité à développer de nouvelles résistances. De ce fait, afin de développer de nouveaux antibiotiques, les études sur les souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de la mucoviscidose sont indispensables [30-34].

I.1.2.3 Développement de la résistance aux antibiotiques

Depuis plusieurs décennies, le nombre de souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes aux antibiotiques croît au point qu'il devient particulièrement difficile de soigner les infections qu'elles provoquent, surtout dans le cas d'infections liées aux soins. *P. aeruginosa* est en effet devenue résistante à la plupart des classes d'antibiotiques disponibles sur le marché : β–lactamines dont les carbapénèmes (illustré par la **Figure 2**), aminosides, macrolides et fluoroquinolones [35].

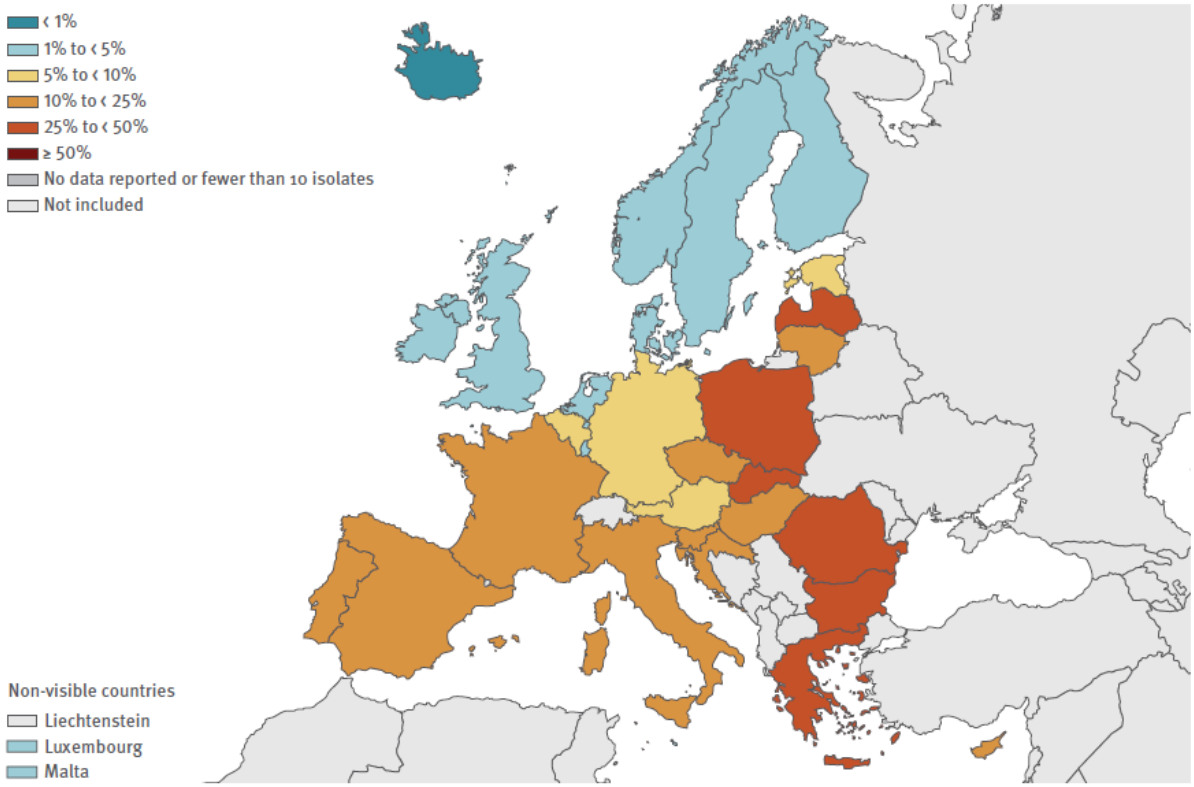


Figure 2 Pourcentage d'isolats invasifs de *P. aeruginosa* présentant une résistance combinée (résistance à trois groupes antimicrobiens ou plus parmi la pipéracilline ± tazobactam, la ceftazidime, les fluoroquinolones, les aminoglycosides et les carbapénèmes), par pays, pays de l'UE/EEE, 2018 (figure 3.18 du rapport du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (2019) [36]).

P. aeruginosa possède une résistance naturelle (intrinsèque) aux antibiotiques, mais est en plus capable d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance.

Sa résistance intrinsèque est due à i) la faible perméabilité de sa membrane, ii) la présence de pompes d'efflux et iii) la présence d'enzymes capables de dégrader les antibiotiques. *P. aeruginosa* possède une enveloppe cellulaire constituée de deux membranes interne et externe, (description détaillée en I.1.2.1), cette dernière est particulièrement imperméable aux composés hydrophobes tels que la rifampicine, la gentamycine et la novobiocine [37]. Cependant, les antibiotiques hydrophiles de petite taille tels que les β–lactamines et les quinolones peuvent traverser la membrane externe et pénétrer la cellule bactéienne *via* les porines (protéines formant des canaux permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles) [37]. Pour contrer cela, *P. aeruginosa* possède des pompes d'efflux (systèmes de transport actifs) lui permettant d'expulser les molécules nocives, et en particuliers les antibiotiques, vers le milieu extracellulaire [38].

Enfin, *P. aeruginosa* possède aussi des enzymes capables de dégrader les antibiotiques telles que, par exemple, les β–lactamases lui permettant d'inactiver les β–lactamines par hydrolyse [35].

P. aeruginosa développe sa résistance à la fois par mutations génétique, et par l'acquisition de matériel génétique étranger. Ces mutations peuvent être transmises à la descendance, permettant ainsi l'apparition de souches multi-résistantes [35]. Ces mutations peuvent induire la surproduction de certains systèmes de pompes d'efflux et/ou d'enzymes inactivatrices d'antibiotiques, mais aussi entraîner la modification des cibles des antibiotiques comme par exemple, la modification des lipopolysaccharides (LPS) par ajout d'une phosphoéthanolamine afin de contrer les peptides antimicrobiens comme la colistine [39].

I.1.1 Les traitements antibiotiques

I.1.1.1 Antibiotiques actuels

Dans le cas d'une infection avérée à *P. aeruginosa*, plusieurs antibiotiques peuvent être utilisés. Les classes d'antibiotiques les plus utilisées sont résumées dans le **Tableau 1** [40,41].

Tableau 1 Principales classes d'antibiotiques utilisées et leur mode de fonctionnement.

Classe	Exemples	Mode de fonctionnement	Cible thérapeutique
pénicillines anti-*Pseudomonas aeruginosa* (β–lactamines)	carbenicilline, pipéracilline (en combinaison avec le tazobactam, un inhibiteur des β–lactames)	Inhibe la synthèse du peptidoglycane, engendre la lyse de la bactérie	transpeptidase (enzyme)
carbapénèmes (β–lactamines)	imipenem, meropenem		

Tableau 1 Principales classes d'antibiotiques utilisées et leur mode de fonctionnement.

Classe	Exemples	Mode de fonctionnement	Cible thérapeutique
fluoroquinolones	ciprofloxacine, levofloxacine	Empêche la réplication de l'ADN bactérien	ADN gyrase et ADN topoisomérases (enzymes)
aminoglycosides	gentamicine, isépamicine	Interfère avec la traduction des ARN messagers en protéines, induit l'accumulation de protéines aberrantes puis l'apoptose	Ribosomes
peptides polycationique (peptides anti-microbiens)	colistine, polymixin B	Déstabilise la membrane externe et augmente la perméabilité membranaire	Groupements phosphates des lipopolysaccharides (LPS)

Du fait de l'apparition dans les hôpitaux de souches de *P. aeruginosa* résistantes à de nombreux antibiotiques, le traitement d'une infection nosocomiale est particulièrement complexe. Comme il a été illustré par la **Figure 2** (I.1.2.3), et décrit par da Costa *et al*. (2017) [42] pour d'autres antibiotiques, la résistance aux antibiotiques dépend du lieu de prélèvement de la bactérie, chaque pays ayant sa propre politique sanitaire. De plus, la résistance de *P. aeruginosa* dépend des traitements administrés précédemment, elle est donc également dépendante du patient.

Ainsi, dans le cas d'infections graves, avant d'administrer un antibiotique, un schéma clinique doit être suivi [10], dont un exemple est décrit dans la **Figure 3**. Selon les critères de co-morbidité, les facteurs de risque liés à *P. aeruginosa* et la nature de l'infection, une combinaison d'antibiotiques est délivrée dans un premier temps. Ensuite, une fois les résultats des tests de résistance aux antibiotiques connus, un seul antibiotique est prescrit (afin de limiter le risque d'augmentation de la résistance à plusieurs antibiotiques et de réduire les effets secondaires des antibiotiques).

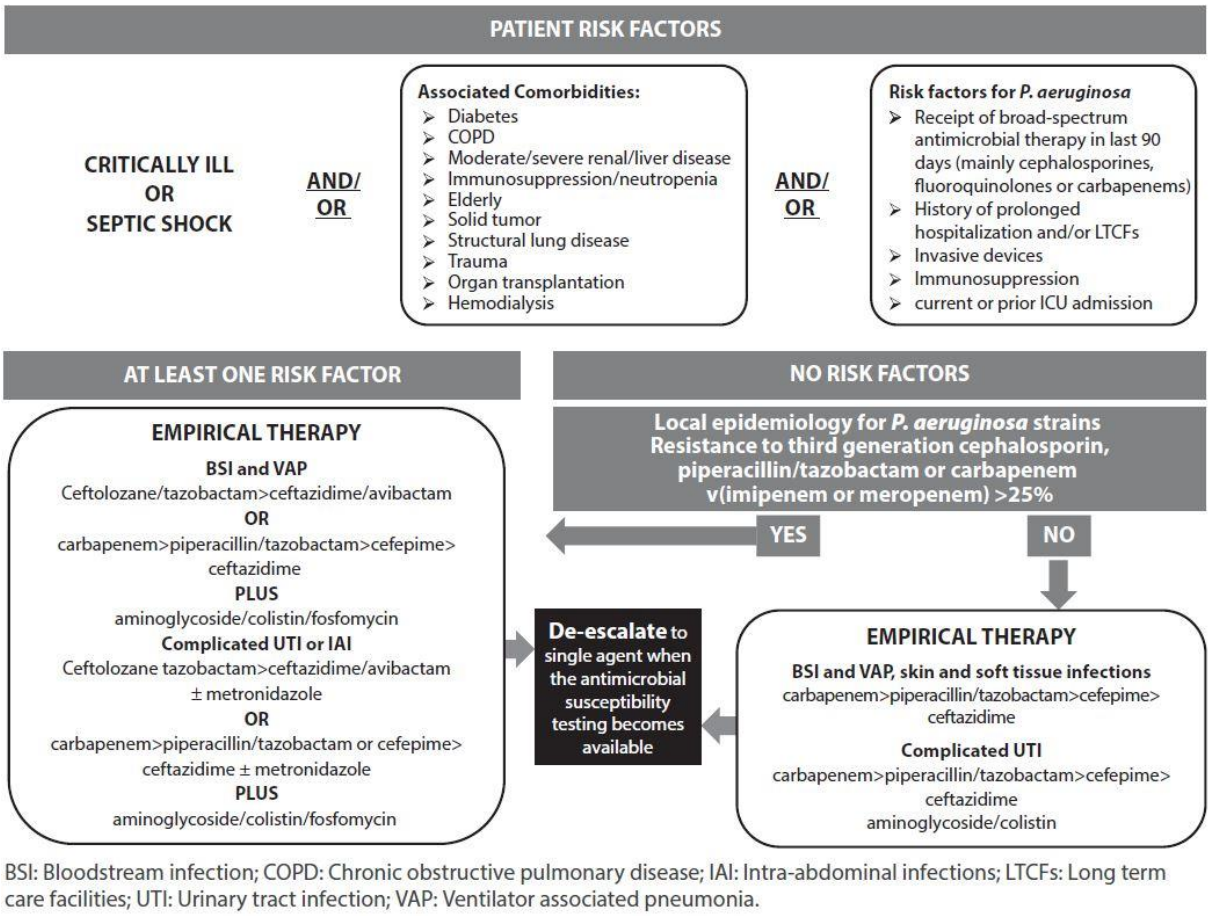


Figure 3 Schéma clinique à suivre pour délivrer l' antibiotique approprié contre *Pseudomonas aeruginosa*.(Figure 1 de Bassetti, *et al*. (2018) [10]).

I.1.1.2 Nouveaux traitements

De nouveaux antibiotiques, au fonctionnement similaire à ceux décrits précédemment, viennent d'être mis sur le marché, en fonctionnement seul ou en combinaison : β–lactamine en combinaison avec un inhibiteur des β–lactamases (Ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam, meropenem/vaborbactam) et un aminoglycoside (plazomicin) [41]. Cependant, puisque leur fonctionnement est similaire aux antibiotiques pour lesquels *P. aeruginosa* a développé des mécanismes de résistance, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été envisagées, puisqu'un développement rapide de la résistance à ces antibiotiques peut être attendu. Le sommaire des traitements alternatifs est donné dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 Exemples de stratégies thérapeutiques alternatives de lutte contre *P. aeruginosa* (tableau 3 traduit de Pang *et al*. (2019), [35] avec ajout de Breiyeh *et al.* (2020) [43]).

Stratégie thérapeutique	Avantages	Désavantages
Inhibition du quorum sensing (capacité à détecter la densité bactérienne par utilisation de métabolites)	Prévention ou réduction de la formation de biofilms, diminution de la virulence et de la résistance bactérienne	effet aussi sur les bactéries du microbiote humain
Inhibition des lectines (protéines de la membrane externe permettant d'adhérer aux tissus de l'hôte)	Grande stabilité, faible risque de développement de la résistance bactérienne	Faible efficacité en raison de l'expression de plus d'un type de lectines par bactérie
Chélation du fer	Disponibilité des médicaments approuvés par la FDA, administration facile	Toxicité
Utilisation de bactériophages (virus des bactéries)	Traitement local (réplication du phage sur le site d'infection), spécifique de *P. aeruginosa* (sans effets sur la flore commensale), activité sur les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, facilité d'administration	Manque de connaissances sur le mode d'action des phages et la résistance bactérienne liée, difficulté à éliminer les phages après traitement, mauvaise stabilité des préparations de phages
Vaccination	Développement du système immunitaire de l'hôte, prévention de futures infections	Faible efficacité, aucun vaccin homologué
Complexes métalliques (principalement Ruthénium, Gallium, Bismuth, Argent)	Modes d'action uniques et variés (dissociation de la membrane bactérienne pour Ru, inhibe le métabolisme bactérien du fer pour Ga)	Mécanismes d'action et de toxicité mal connus
Utilisation de nanoparticules	Haute pénétrabilité de la membrane bactérienne, perturbation de la formation des biofilms, transport d'antibiotiques possible	Toxicité
Electrochimie sur support conducteur d'ingénierie tissulaire (production locale de H_2O_2)	Dissociation des biofilms bactériens, augmentation de l'accès d'autres antibiotiques à leurs cible thérapeutique	Difficulté à implanter lors d'essais cliniques

Les principales difficultés de mise en place de ces stratégies thérapeutiques sont : i) la toxicité pour le patient, ii) la difficulté à appliquer le traitement et ii) le manque de connaissances sur les mécanismes d'action. Probablement, les nouveaux traitements anti-*P. aeruginosa* devront consister en un mélange de plusieurs stratégies thérapeutiques complémentaires, (exemple : combinaison d'un agent anti-biofilm avec un antibiotique [44]).

Nous pouvons remarquer que la plupart des antibiotiques actuellement utilisés ciblent des enzymes, protéines ou le ribosome. Peu des antibiotiques prescrits ciblent les constituants non-protéiques de la membrane bactérienne (LPS ciblé par les peptides polycationiques), alors qu'il s'agit d'une barrière de protection très efficace pour les bactéries, notamment pour les bactéries à Gram-négatif telles que *P. aeruginosa*.

Quelques antibiotiques ont été décrits comme capables de cibler les lipides constitutifs des membranes bactériennes (**Figure 4**). Ainsi, la cinamycine et la duramycine (antibiotiques non-prescrits) peuvent cibler les phosphatidyléthanolamines, alors que la telomycine interagirait avec les cardiolipines (actif sur les bactéries à Gram positif). La daptomycine interagirait, quant à elle, préférentiellement avec les lipides anioniques et notamment les phosphatidylglycérols (actif uniquement sur les bactéries à gram-positif) [45].

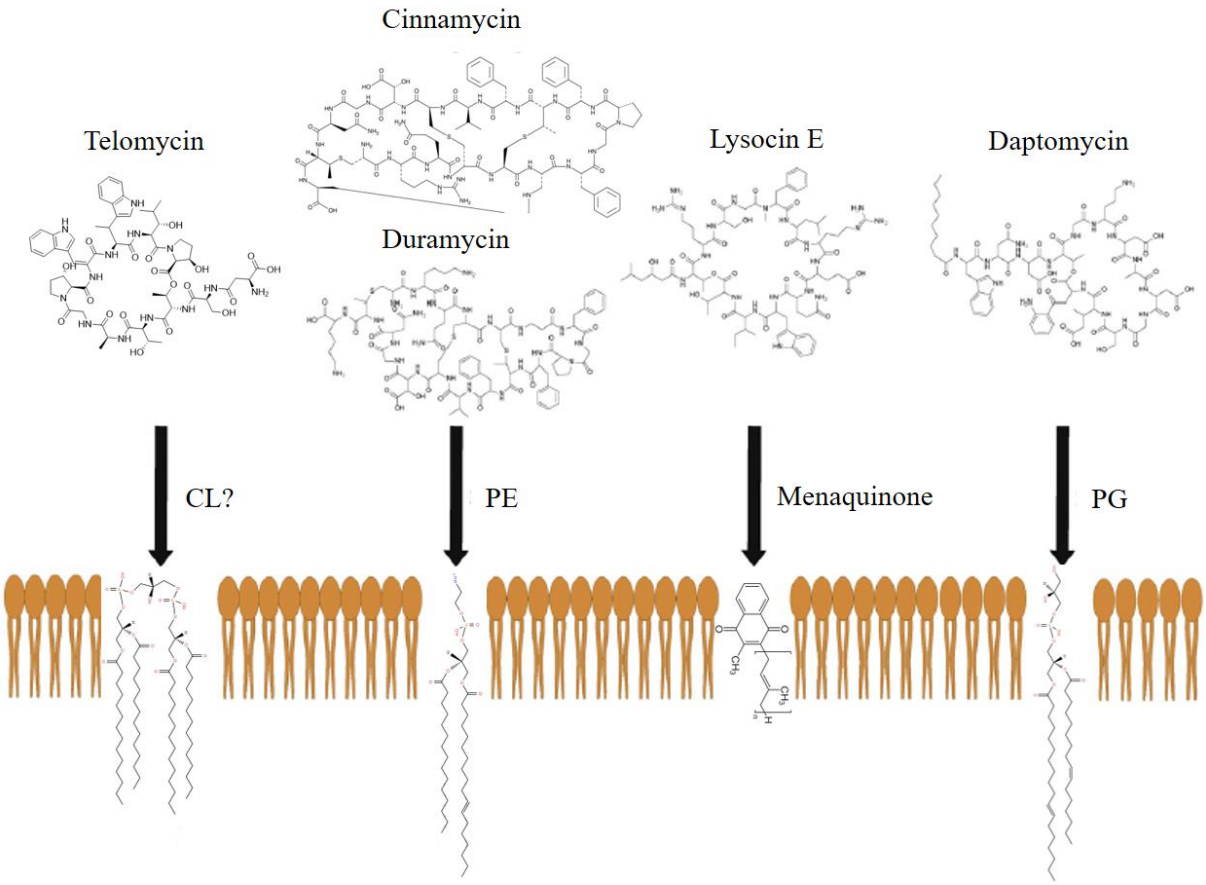


Figure 4 Les structures chimiques des huit peptides antimicrobiens et leurs cibles lipidiques respectives au sein de la membrane cellulaire bactérienne. Les peptides antimicrobiens suivants ont été bien caractérisés en ce qui concerne leur interaction spécifique avec les lipides membranaires : la télomycine cible la cardiolipine (CL), la cinnamycine et la duramycine cible la phosphatidyléthanolamine (PE), la lysocine E cible la ménaquinone, et la daptomycine cible le phosphatidylglycérol (PG). (figure 3 de Epand *et al.* (2015) [45]).

De nouveaux dérivés amphiphiles d'aminoglycosides ont été récemment développés en ajoutant des groupements lipophiles sur une structure néamine. Plusieurs structures de ces dérivés sont données dans la **Figure 5**. Zimmerman *et al.* (2018) ont montré que ces molécules avaient une activité antibiotique sur des souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* [46].

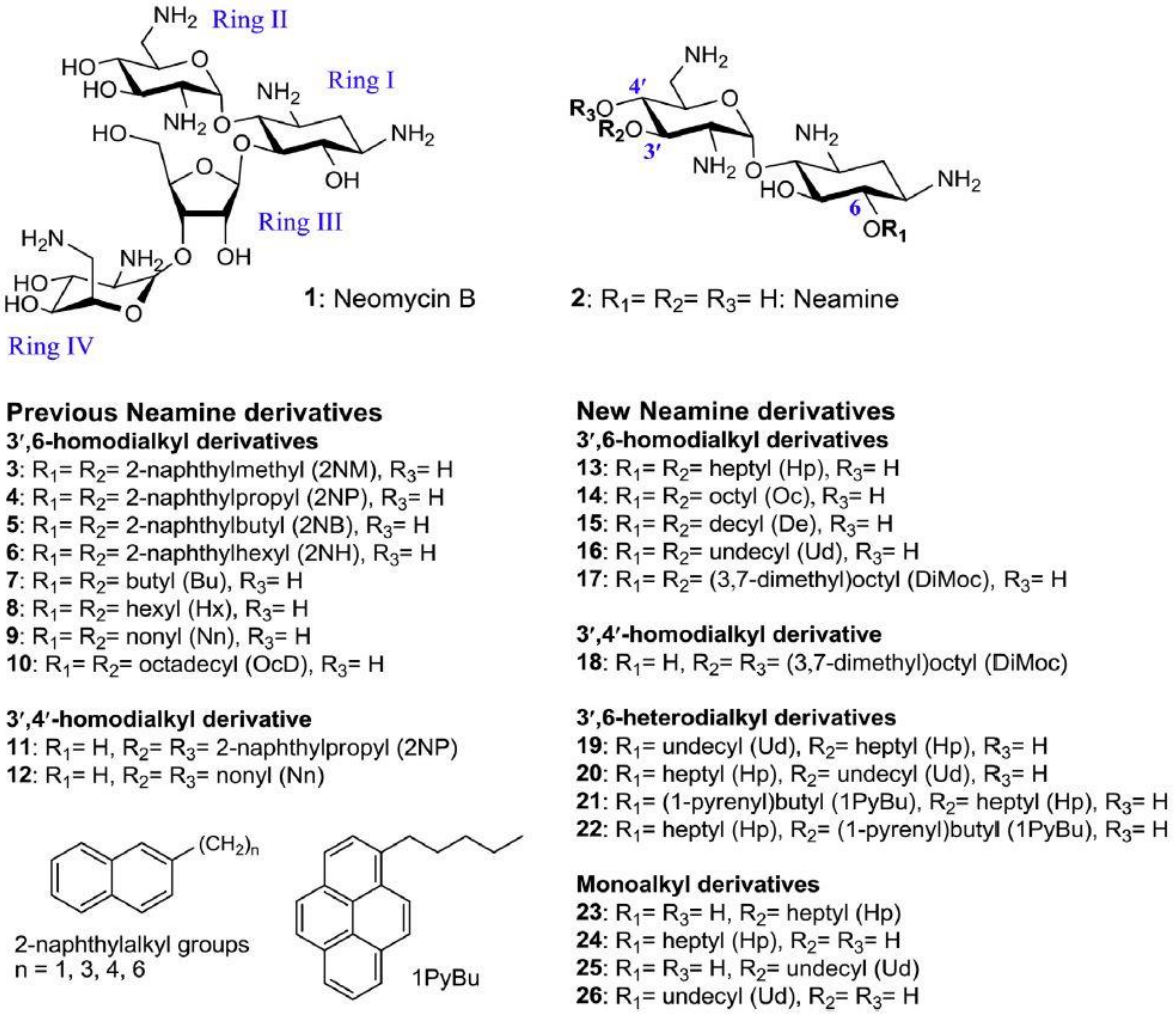


Figure 5 Structure de l'antibiotique naturel neomycin B (1) à partir duquel les dérivés synthéthiques de la néamine (2) ont été développés. (Figure 1 de Zimmermann *et al.* (2018) [46]).

Ouberai *et al.* (2011) ont montré que les dérivés de naphtylméthyl néamine entraînaient chez *P. aeruginosa* une dépolarisation et une perméabilisation de la membrane suite à l'insertion de l'antibiotique dans la bicouche lipidique [47]. El Khoury *et al.* (2017) ont décrit l'action d'un autre dérivé de la néamine, le 3',6-dinonyl néamine, sur les micro-domaines lipidiques composés de cardiolipines [48]. Comme illustré par la **Figure 6**, le traitement de *P. aeruginosa* par du 3',6-dinonyl néamine induit une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne, ainsi que la perte de la forme en bacille (**Figure 6**).

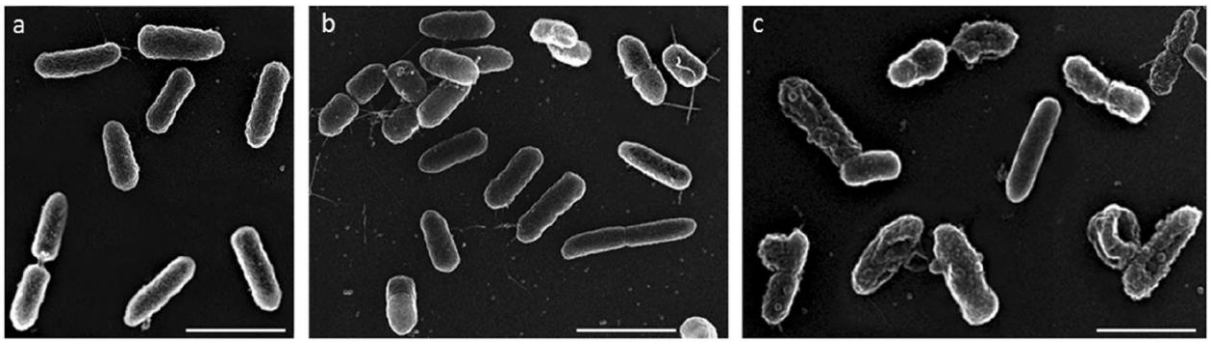


Figure 6 Le 3',6-dinonyl neamine induit des défauts de morphologie des cellules de *P. aeruginosa*. (a) Microscopie électronique à balayage de contrôle et (b,c) cellules précédemment traitées au 3',6-dinonyl néamine à 1 et 5 µM, respectivement. Les barres d'échelle correspondent à 2 µm. (Figure 7 de El Khoury *et al*. (2017) [48])

Originellement, les dérivés amphiphiles d'aminoglycosides ont été développés pour être de nouveaux aminoglycosides moins susceptibles au développement de la résistance bactérienne [46]. Il a été démontré que l'augmentation de l'hydrophobicité a mené en fait à un changement de cible thérapeutique (du ribosome pour les aminoglycosides, à la membrane bactérienne pour les dérivés amphiphiles d'aminoglycosides) [49].

De ce fait, bien que ces nouveaux antibiotiques ciblent la membrane bactérienne, initialement, ils n'avaient pas été développés dans ce but. Une meilleure connaissance de la constitution en lipides membranaires de *P. aeruginosa*, notamment lors d'une infection chronique, devrait permettre le développement de nouveaux antibiotiques (dérivés amphiphiles d'aminoglycosides ou d'autres classes) spécifiques de cette bactérie et adaptés à l'infection.

I.1.2 L'enveloppe cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa*

I.1.2.1 Une double-membrane

L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif (**Figure 7**) est constituée d'une première membrane interne (ou cytoplasmique) enveloppant le cytoplasme, séparée d'une seconde membrane externe par un espace périplasmique (contenant le peptidoglycane).

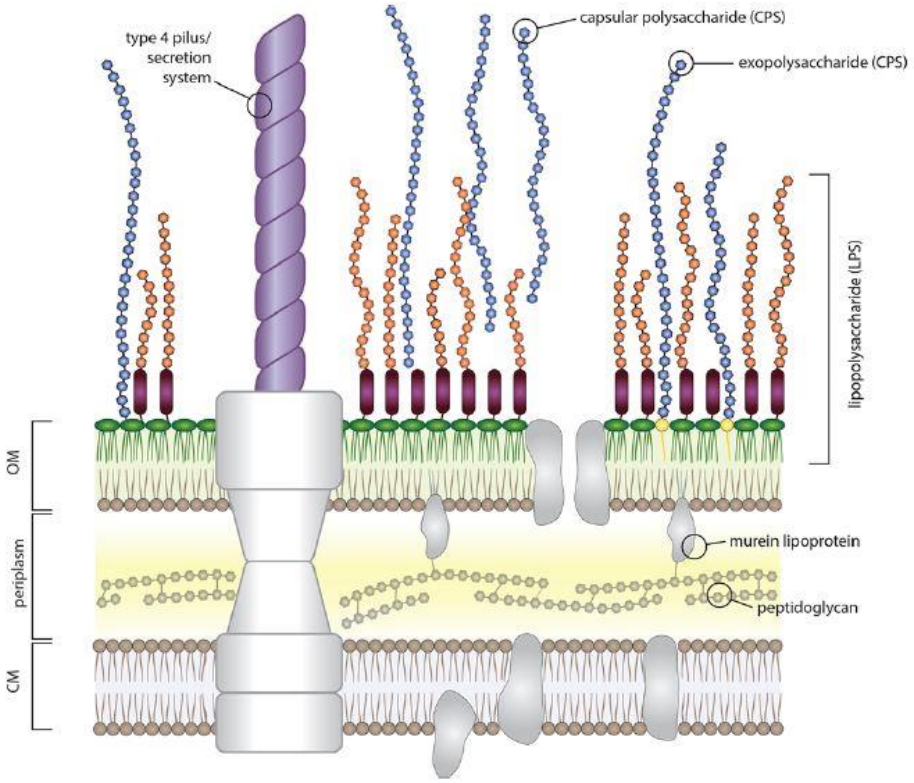


Figure 7 Schéma de l'enveloppe d'une bactérie à Gram-négatif. (Figure 1 *de* Filloux *et al.* (2016) [50])

Le peptidoglycane est un polymère complexe formé d'une partie polysaccharidique réticulée par des peptides étirables. Le réseau élastique qui en résulte permet de maintenir la forme de la bactérie, de la protéger contre la pression osmotique et contre la lyse [51].

Les deux membranes sont principalement composées de phospholipides et de protéines dans un ratio massique total d'environ 1/1 [52].

Certaines protéines traversent les deux membranes : le flagelle (permet le déplacement et à un rôle important dans la pathogénicité), les pili (permettent l'adhésion à la surface des cellules épithéliales) et les systèmes de sécrétion (système de défense bactérien). D'autres ne sont situées que dans l'une des deux membranes, comme les porines (permettent la diffusion de petites molécules hydrophiles) situées dans la membrane externe [17].

Les phospholipides de la membrane interne forment une bicouche symétrique. A l'inverse, la membrane externe est asymétrique avec une monocouche interne (en contact avec le peptidoglycane) composée de phospholipides et une monocouche externe (en contact avec le milieu extérieur) composée essentiellement de lipopolysaccharides (LPS) [50].

Les LPS sont des molécules amphiphiles constituées d'une première partie hydrophobe ancrée dans la membrane externe (chaînes d'acides gras du lipide A) reliée par une seconde partie oligosaccharidique à une troisième partie polysaccharidique (**Figure 8**) [53]. Cette couche de LPS contribue grandement à l'intégrité structurelle de la bactérie et protège la membrane de certains types d'attaques chimiques. Les LPS sont aussi des toxines, notamment, *via* le lipide A qui en est le principe pro-inflammatoire.

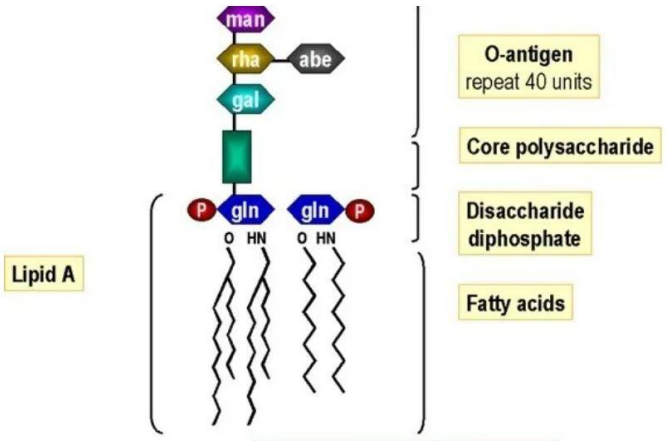


Figure 8 Structure générales des LPS chez les bactéries à Gram-négatif.

La structure des membranes est maintenue grâce aux interactions lipide-protéine dépendantes de divers facteurs (tête polaire des phospholipides, composition en acides gras et épaisseur de la membrane) [54]. Les membranes peuvent être visualisées comme des matrices de lipides (bicouche de phospholipides pour la membrane interne ou bicouche phospholipides/ acides gras du lipide A pour la membrane externe) dans lesquelles sont intégrées des protéines.

Pour qu'une protéine soit favorablement incorporée dans la membrane et pour que des interactions lipide-protéine se forment, la longueur des chaînes acyles (épaisseur hydrophobe) doit correspondre à la longueur hydrophobe de la protéine (**Figure 9**) [55].

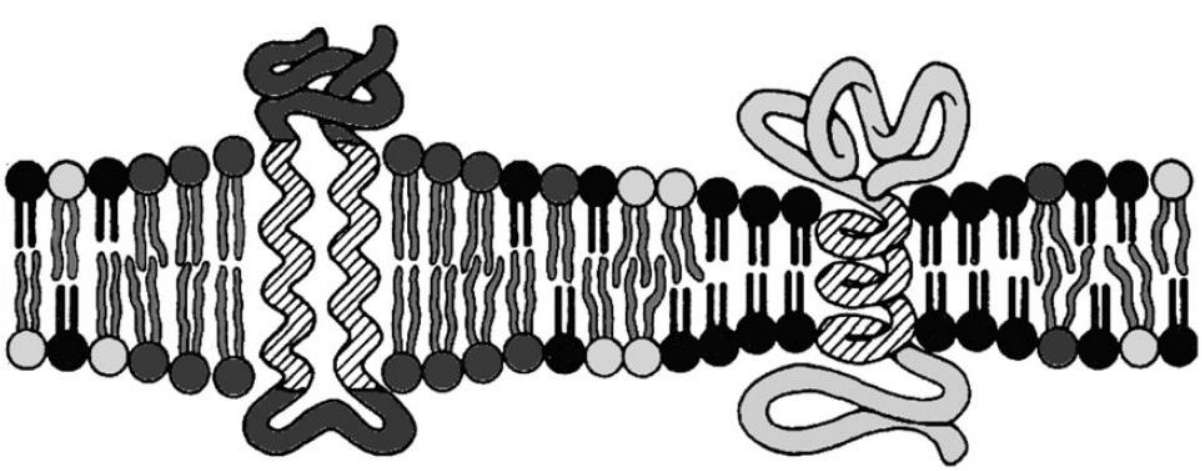


Figure 9 Illustration des interactions lipide-protéines dans une bicouche lipidique. (Figure 6b de Mouritsen *et al.* (2011) [56]).

Les lipides entourant la protéine forment une enveloppe de solvatation, appelée anneau, en phase liquide désordonnée [54]. La rigidité de la structure membranaire est obtenue par d'autres lipides environnant en phase cristalline liquide lamellaire [57].

Ainsi, l'intégrité de la membrane dépend de la capacité des lipides à s'ordonner selon différentes phases physiques. Cela est possible grâce à la diversité des phospholipides présents dans les membranes.

I.1.2.2 Diversité des phospholipides membranaires de P. aeruginosa

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles formées d'une tête polaire et d'une partie hydrophobe comportant une à quatre chaînes d'acides gras. La majorité des phospholipides rencontrés chez *P. aeruginosa* sont des glycérophospholipides :

La tête polaire est composée d'un glycérol-3-phosphate sur lequel est greffé un groupe polaire, dont les majoritaires retrouvés chez *P. aeruginosa* sont : éthanolamine, glycérol et choline. Les noms des classes de glycérophospholipides sont liés à ce groupement polaire : phosphatidyléthanolamine (PE, **Figure 10A**), phosphatidylcholine (PC, **Figure 10B**), et phosphatidylglycérol (PG, **Figure 10C**). Chez les bactéries, deux PG peuvent être utilisés pour synthétiser une cardiolipine (CL, **Figure 10D**) [58].

La charge du phospholipide est portée par la tête polaire. A pH physiologique (pH = 7), les PE et PC portent une charge globale neutre alors que les PG et CL portent une charge négative.

La partie hydrophobe est constituée d'une à deux chaînes (R_1, R_2) d'acide gras sur les positions *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol-3-phosphate. Plusieurs longueurs de chaîne d'acide gras peuvent être retrouvées chez *P. aeruginosa* : de 14 à 20 carbones. Ces chaînes peuvent être saturées ou mono-insaturées (**Figure 10E**). Elles peuvent également contenir un groupement cyclopropane provenant de la cyclopropylation d'une insaturation ou un branchement méthyl en position iso ou anteiso (**Figure 10E**) [59].

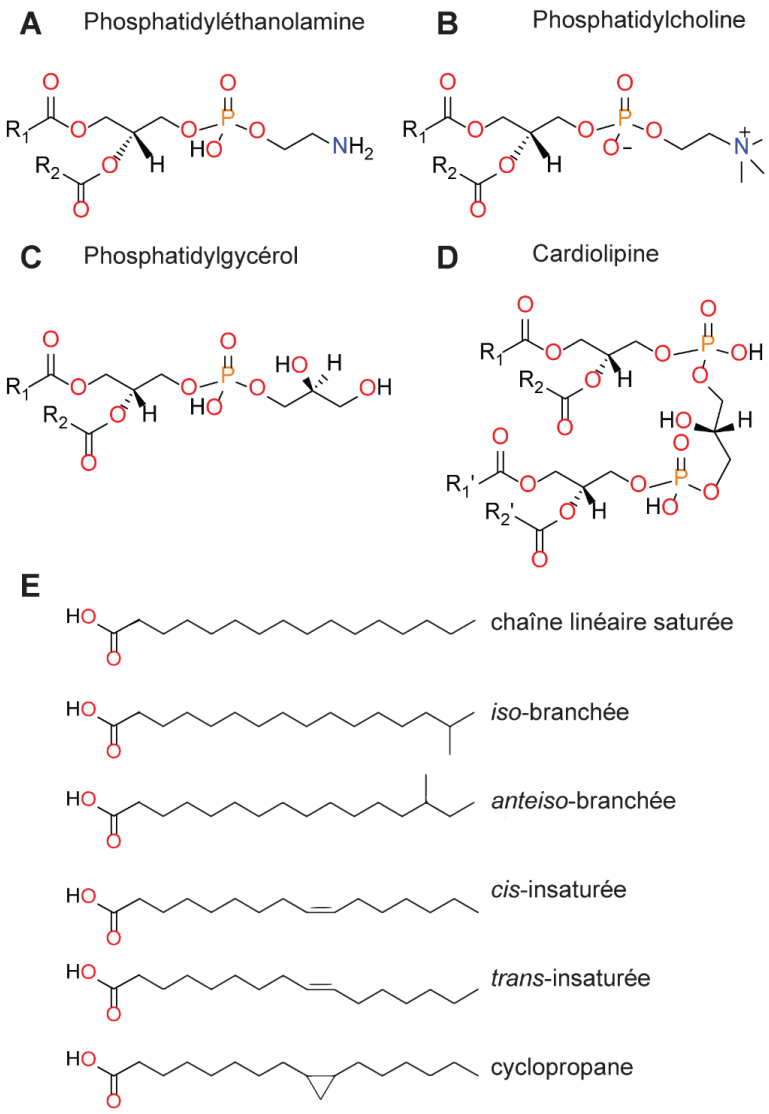


Figure 10 Structures de différentes classes de phospholipides membranaires de *P. aeruginosa* et les différentes chaînes d'acide gras possibles. A : phosphatidyléthanolamine (PE), B : phosphatidylcholine (PC), C : phosphatidylglycérol (PG), cardiolipine (CL), E : différentes chaînes d'acides gras possibles, sous la forme d'acides gras entiers (inspiré de Denich *et al.* (2003), [54]).

Au sein de la membrane, les glycérophospholipides sont disposés avec les têtes polaires orientées vers l'extérieur et les chaînes acyles dirigées vers l'intérieur de la bicouche. La composition lipidique peut varier entre la membrane interne et externe, mais aussi au sein d'une même membrane. Par exemple, dans la membrane interne d'*Escherichia coli*, les PE et CL seraient situés de préférence dans la couche interne et les PG dans la couche externe de la bicouche lipidique [52].

La répartition des phospholipides de *P. aeruginosa* PAO1, cultivée dans un milieu casaminoacides (milieu riche proche du Mueller Hilton Broth utilisé dans ces travaux de thèse), est la suivante : 15,1% PG, 4.0% PC, 68,1% PE, 12.5% CL. Les deux chaînes d'acides gras les plus retrouvées sont : acide (E)-octadéc-11-énoïque (C18:1) et acide palmitique (C16:0) [60].

I.1.2.3 Homéostasie de la membrane

Dans le cas d'une croissance bactérienne à température optimale pour *P. aeruginosa* (37°C), les chaînes d'hydrocarbures sont majoritairement désordonnées et flexibles. Les lipides peuvent tourner et diffuser librement dans le plan de la bicouche. Cette fluidité membranaire induite est essentielle pour le bon fonctionnement des protéines membranaires intégrées dans la bicouche [57].

La survie des bactéries dépend de leur capacité à garantir l'homéostasie (maintien des propriétés physiques) de leur membrane en réponse aux changements environnementaux (antibiotiques, température, osmolarité, salinité, pH…). Cette homéostasie peut être obtenue en modifiant les quantités des différents phospholipides, lors de leur biosynthèse ou par modification de phospholipides déjà existants [61].

La **Figure 11** résume les modifications de la membrane bactérienne rencontrées chez les bactéries résistantes aux peptides antimicrobiens [62]. Ces modifications peuvent aussi avoir lieu en réponse à leur environnement.

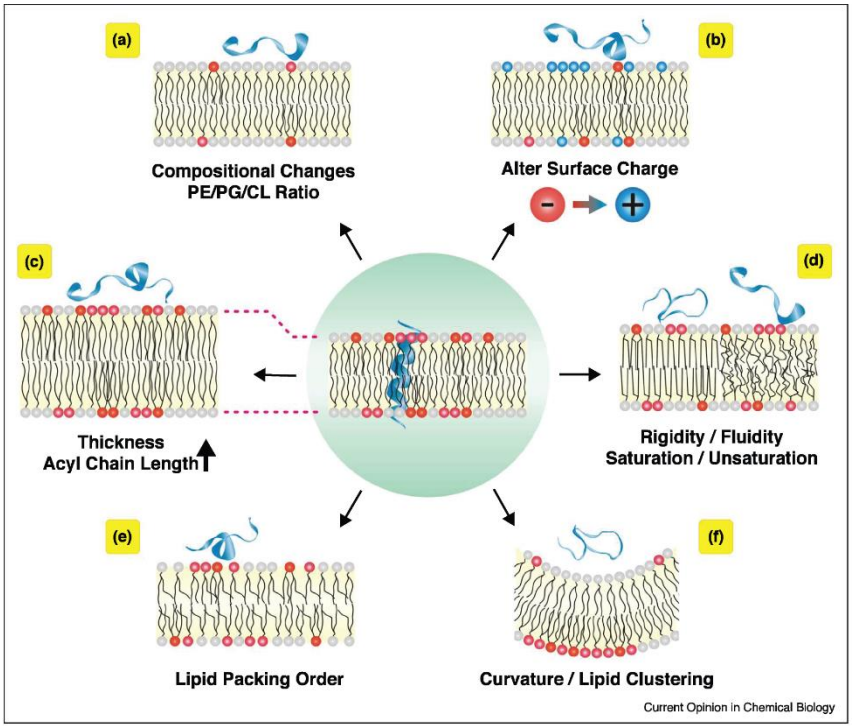


Figure 11 Mécanismes par lesquels les bactéries modifient la composition de la membrane pour repousser les peptides antimicrobiens. (Figure 2 de Lee *et al*. (2019), [62])

Le ratio entre les phospholipides chargés négativement (CL et PG) et les phospholipides neutres (PE) ou (PC) peut être modifié afin de rendre la membrane moins sensible au pH ou à la salinité du milieu (**Figure 11b**) [63]. L'état de charge à la surface de la bactérie peut aussi être changée par la modification des LPS [39]. L'augmentation du ratio PC/PE permet également d'augmenter la stabilité de la membrane, car les bicouches composées de PC sont plus stables que celles composées de PE (**Figure 11a**) [57].

L'augmentation de la quantité de phospholipides saturés, et/ou ayant les chaînes d'acides gras les plus longues, permet d'augmenter la rigidité membranaire (**Figure 11d**) et l'épaisseur de la membrane (**Figure 11c**) [57].

Inversement, la fluidité membranaire peut être augmentée en introduisant une double liaison, un cyclopropyle (plus stable en milieu acide qu'une double liaison) ou un méthyle en bout de chaîne sur la chaîne acide gras [64]. Pour cela, des enzymes permettent de modifier les phospholipides présents dans la membrane, comme illustré par la **Figure 12**.

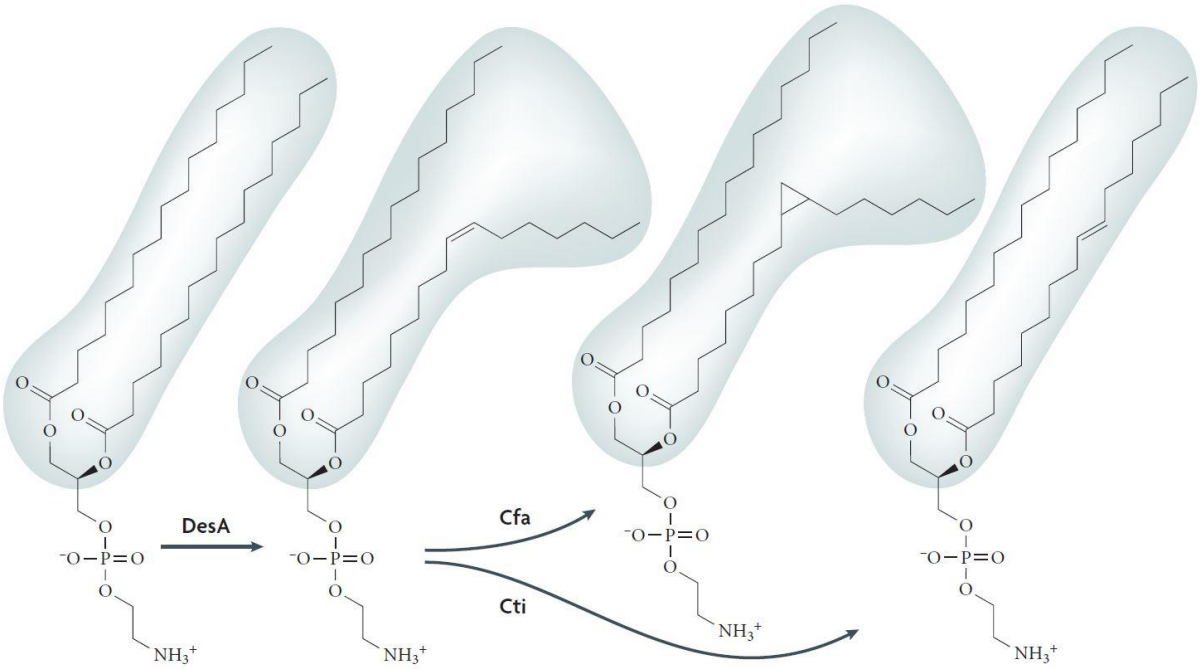


Figure 12 Modification des structures phospholipidiques existantes dans les bactéries, exemple de la modification d'un PE 16:0/16:0. DesA : phospholipid acyl-chain desaturase; Cfa : Cyclopropane fatty acid synthase ; Cti : phospholipid cis–trans isomerase. Le volume moléculaire induit par les chaînes acides gras est représenté par un ombrage gris. (figure 3 *de* Zhang*, et al.* (2008)*,* [61])

La transition de la phase cristalline liquide à la phase gel des lipides permet aussi une adaptation à l'environnement (**Figure 11e**). Celle-ci dépend de la conformation des chaînes d'acides gras, mais aussi des protéines membranaires environnantes [54].

La modification de la courbure de la membrane peut aussi être utilisée afin d'empêcher l'adhésion de peptides antimicrobiens (**Figure 11f**). Par exemple, de par leur forme conique, les CL ont une influence sur la courbure de la membrane (notamment puisqu'elles peuvent former des micro-domaines lipidiques) [65].

Les membranes de *P. aeruginosa* dépendent aussi des nutriments disponibles. Il a été montré que, en présence d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture, *P. aeruginosa* est capable de produire des phospholipides polyinsaturés [66]. Dans le cas de l'utilisation d'un tampon de milieu de culture tris(hydroxymethyl)aminomethane, *P. aeruginosa* peut synthétiser des phospholipides dérivés de ce tampon (utilisé comme groupe polaire) [67].

Il a aussi été décrit que *P. aeruginosa* pouvait construire sa membrane à partir de lipides dépourvus de phosphore, les lipides à ornithine, lors d'une culture dans un milieu sans phosphate [68].

Enfin, il faut noter que la composition lipidique de *P. aeruginosa* n'est pas figée dans le temps. En effet, il a été montré que les quantités de phospholipides à chaînes d'acides gras impaires de *P. aeruginosa* PAO1 évoluaient selon les différentes phases de la croissance bactérienne (avec une évolution inverse pour les chaînes paires), que ce soit en mode de vie planctonique ou en biofilm [69]. Cela montre une modulation de la membrane liée à l'adaptation physiologique de la bactérie à ses conditions de croissance et de ce fait aux nutriments disponibles (car le milieu de culture n'est pas renouvelé).

I.1.2.1 Condensé des études sur les lipides de P. aeruginosa

Le **Tableau 3** résume les études sur la caractérisation complète des lipides (lipidome) de *P. aeruginosa* réalisées avec des souches de laboratoire et dans des milieux de culture riches (commerciaux : MHB, LB) ou pauvres (à composition chimique contrôlée : MGM, AB), avec une analyse par spectrométrie de masse. Le fonctionnement et/ou les applications des techniques d'analyses citées seront détaillés dans le chapitre I.2.

D'autres études sur la composition lipidique générale ont été réalisées par chromatographie sur couche mince (CCM) [60,70] ou par chromatographie en phase gazeuse [60,71], afin de déterminer les classes de lipides ou les chaînes d'acides gras constitutives des lipides, respectivement.

Tableau 3 Publications sur la composition lipidique de souches de *P. aeruginosa* par spectrométrie de masse.

Auteurs/ref	Souche	Milieu de culture	Objectif étude	Technique d'analyse
Benamara *et al.* 2011 [72]	PAO1	Minimum glucose medium (MGM)	Comparer les lipides de la membrane interne de PAO1 cultivée en mode biofilm *vs* en mode planctonique	Infusion *electrospray* (ESI)-spectrométrie de masse (MS) (triple quadrupole TQ)
Benamara *et al.* 2014 [59]	PAO1	MGM	Comparer les lipides de la membrane interne de PAO1 cultivée en mode biofilm à différents temps de culture	Infusion ESI-MS (TQ) et chromatographie gazeuse (GC)-MS
Groenewold *et al.* 2018 [73]	PAO1 et mutants	Milieu AB (milieu minimal)	Déterminer le lien entre l'homéostasie de la membrane et une protéine liée aux acides phosphatidiques	Infusion ESI-MS (orbitrap)
Han *et al.* 2018 [74]	PAK et mutants	MHB II	Déterminer les modifications lipidiques liées à la résistance aux polymixines	Chromatographie liquide (LC)-ESI-MS (orbitrap)
Le Sénéchal *et al.* 2019 [69]	PAO1	Lysogeny Broth (LB)	Comparer l'influence de la phase de croissance et de l'état d'immobilisation (planctonique ou biofilm) sur les lipides	Identification par infusion ESI-MS (TQ) quantification par LC-ESI-MS (TQ)

RÉFÉRENCES CHAPITRE I.1

1. Deligianni E, Pattison S, Berrar D, Ternan NG, Haylock RW, Moore JE, Elborn SJ, Dooley JS (2010) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. BMC Microbiol 10:38. doi:10.1186/1471-2180-10-38

2. Khan NH, Ahsan M, Yoshizawa S, Hosoya S, Yokota A, Kogure K (2008) Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the ocean. Appl Environ Microbiol 74 (20):6194-6205. doi:10.1128/AEM.02322-07

3. Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environ Microbiol 7 (11):1673-1685. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x

4. Starkey M, Rahme LG (2009) Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. Nature protocols 4 (2):117-124. doi:10.1038/nprot.2008.224

5. Haenni M, Bour M, Châtre P, Madec J-Y, Plésiat P, Jeannot K (2017) Resistance of Animal Strains of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenems. Frontiers in microbiology 8:1847-1847. doi:10.3389/fmicb.2017.01847

6. De Soyza A, Hall AJ, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Kaca W, Drulis-Kawa Z, Stoitsova SR, Toth V, Coenye T, Zlosnik JE, Burns JL, Sa-Correia I, De Vos D, Pirnay JP, Kidd TJ, Reid D, Manos J, Klockgether J, Wiehlmann L, Tummler B, McClean S, Winstanley C, pathogens EFfCABCsvdocf (2013) Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. MicrobiologyOpen 2 (6):1010-1023. doi:10.1002/mbo3.141

7. Oberhardt MA, Puchalka J, Fryer KE, Martins dos Santos VA, Papin JA (2008) Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 190 (8):2790-2803. doi:10.1128/JB.01583-07

8. Cain AK, Nolan LM, Sullivan GJ, Whitchurch CB, Filloux A, Parkhill J (2019) Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PAK. Microbiol Resour Announc 8 (41):e00865-00819. doi:10.1128/MRA.00865-19

9. Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P (2019) Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes & diseases 6 (2):109-119. doi:10.1016/j.gendis.2019.04.001

10. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context 7:212527. doi:10.7573/dic.212527

11. Maraolo AE, Cascella M, Corcione S, Cuomo A, Nappa S, Borgia G, De Rosa FG, Gentile I (2017) Management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: state of the art. Expert Rev Anti Infect Ther 15 (9):861-871. doi:10.1080/14787210.2017.1367666

12. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, Aboderin AO, Al-Abri SS, Awang Jalil N, Benzonana N, Bhattacharya S, Brink AJ, Burkert FR, Cars O, Cornaglia G, Dyar OJ, Friedrich AW, Gales AC, Gandra S, Giske CG, Goff DA, Goossens H, Gottlieb T, Guzman Blanco M, Hryniewicz W, Kattula D, Jinks T, Kanj SS, Kerr L, Kieny M-P, Kim YS, Kozlov RS, Labarca J, Laxminarayan R, Leder K, Leibovici L, Levy-Hara G, Littman J, Malhotra-Kumar S, Manchanda V, Moja L, Ndoye B, Pan A, Paterson DL, Paul M, Qiu H, Ramon-Pardo P, Rodríguez-Baño J, Sanguinetti M, Sengupta S, Sharland M, Si-Mehand M, Silver LL, Song W, Steinbakk M, Thomsen J, Thwaites GE, van der Meer JWM, Van Kinh N, Vega S, Villegas MV, Wechsler-Fördös A, Wertheim HFL, Wesangula E, Woodford N, Yilmaz FO, Zorzet A (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 18 (3):318-327. doi:10.1016/s1473-3099(17)30753-3

13. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH (2007) The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Drugs 67 (3):351-368. doi:10.2165/00003495-200767030-00003

14. Sánchez-Diener I, Zamorano L, Peña C, Ocampo-Sosa A, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Almirante B, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodriguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Navas A, Oliver A (2020) Weighting the impact of virulence on the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Microbiol Infect 26 (3):351-357. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.034

15. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, Herndon DN (2009) Emerging infections in burns. Surg Infect (Larchmt) 10 (5):389-397. doi:10.1089/sur.2009.024

16. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 13 (6):560-578. doi:https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x

17. Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P (2018) Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. American journal of respiratory and critical care medicine 197 (6):708-727. doi:10.1164/rccm.201705-1043SO

18. Turner KH, Everett J, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M (2014) Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. PLoS Genet 10 (7):e1004518-e1004518. doi:10.1371/journal.pgen.1004518

19. Ciofu O, Tolker-Nielsen T (2019) Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. Frontiers in microbiology 10:913. doi:10.3389/fmicb.2019.00913

20. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM (2020) Newborn Screening for CF across the Globe—Where Is It Worthwhile? Int J Neonatal Screen 6 (1):18. doi:10.3390/ijns6010018

21. ANDERSEN DH (1938) CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS AND ITS RELATION TO CELIAC DISEASE: A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY. Am J Dis Child 56 (2):344-399. doi:10.1001/archpedi.1938.01980140114013

22. Scotet V, L'Hostis C, Férec C (2020) The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery. Genes 11 (6):589. doi:10.3390/genes11060589

23. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K (2016) Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. BMC Pulm Med 16 (1):174. doi:10.1186/s12890-016-0339-5

24. Hubert D (2005) Mucoviscidose. EMC - Med 2 (1):34-41. doi:10.1016/j.emcmed.2004.09.004

25. Heijerman H (2005) Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. J Cyst Fibros 4 Suppl 2:3-5. doi:10.1016/j.jcf.2005.05.005

26. Pernet E, Guillemot L, Burgel P-R, Martin C, Lambeau G, Sermet-Gaudelus I, Sands D, Leduc D, Morand PC, Jeammet L, Chignard M, Wu Y, Touqui L (2014) *Pseudomonas aeruginosa* eradicates Staphylococcus aureus by manipulating the host immunity. Nat Commun 5 (1). doi:10.1038/ncomms6105

27. La Rosa R, Johansen HK, Molin S (2019) Adapting to the Airways: Metabolic Requirements of *Pseudomonas aeruginosa* during the Infection of Cystic Fibrosis Patients. Metabolites 9 (10). doi:10.3390/metabo9100234

28. Schobert M, Tielen P (2010) Contribution of oxygen-limiting conditions to persistent infection of *Pseudomonas aeruginosa*. Future Microbiol 5 (4):603-621. doi:10.2217/fmb.10.16

29. Yang L, Haagensen JA, Jelsbak L, Johansen HK, Sternberg C, Hoiby N, Molin S (2008) In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. J Bacteriol 190 (8):2767-2776. doi:10.1128/JB.01581-07

30. Diaz Iglesias Y, Van Bambeke F (2020) Activity of Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a In Vitro Model of Biofilms in the Context of Cystic Fibrosis: Influence of the Culture Medium. Antimicrob Agents Chemother 64 (4):e02204-02219. doi:10.1128/AAC.02204-19

31. Varga JJ, Barbier M, Mulet X, Bielecki P, Bartell JA, Owings JP, Martinez-Ramos I, Hittle LE, Davis MR, Jr., Damron FH, Liechti GW, Puchalka J, dos Santos VA, Ernst RK, Papin JA, Alberti S, Oliver A, Goldberg JB (2015)

Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. BMC genomics 16:883. doi:10.1186/s12864-015-2069-0

32. Kozlowska J, Rivett DW, Vermeer LS, Carroll MP, Bruce KD, Mason AJ, Rogers GB (2013) A relationship between Pseudomonal growth behaviour and cystic fibrosis patient lung function identified in a metabolomic investigation. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society 9 (6). doi:10.1007/s11306-013-0538-5

33. Rao J, Damron FH, Basler M, Digiandomenico A, Sherman NE, Fox JW, Mekalanos JJ, Goldberg JB (2011) Comparisons of Two Proteomic Analyses of Non-Mucoid and Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Cystic Fibrosis Patient. Frontiers in microbiology 2:162. doi:10.3389/fmicb.2011.00162

34. Son MS, Matthews WJ, Jr., Kang Y, Nguyen DT, Hoang TT (2007) In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. Infect Immun 75 (11):5313-5324. doi:10.1128/IAI.01807-06

35. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv 37 (1):177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

36. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 (2019). European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm. doi:10.2900/22212

37. Delcour AH (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta 1794 (5):808-816. doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005

38. Aeschlimann JR (2003) The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. PHARMACOTHERAPY 23 (7):916-924. doi:10.1592/phco.23.7.916.32722

39. Gunn JS (2001) Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. Journal of Endotoxin Research 7 (1):57-62. doi:10.1177/09680519010070011001

40. Giamarellou H, Antoniadou A (2001) ANTIPSEUDOMONAL ANTIBIOTICS. Med Clin North Am 85 (1):19-42. doi:https://doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70303-5

41. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G (2019) The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. Frontiers in public health 7:151. doi:10.3389/fpubh.2019.00151

42. da Costa ME, Machado HS (2017) Evolution of Antimicrobial Resistance in Europe: A Factual Review. J of Allergy Ther 8 (1):250-264. doi:10.4172/2155-6121.1000250

43. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R (2020) Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. Molecules 25 (6). doi:10.3390/molecules25061340

44. Torres NS, Montelongo-Jauregui D, Abercrombie JJ, Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK, Leung KP (2018) Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Synergistic Combinations of a Commercially Available Small Compound Library With Colistin Against *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology 9 (2541). doi:10.3389/fmicb.2018.02541

45. Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA (2016) Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. Biochim Biophys Acta 1858 (5):980-987. doi:10.1016/j.bbamem.2015.10.018

46. Zimmermann L, Kempf J, Briee F, Swain J, Mingeot-Leclercq MP, Decout JL (2018) Broad-spectrum antibacterial amphiphilic aminoglycosides: A new focus on the structure of the lipophilic groups extends the series of active dialkyl neamines. Eur J Med Chem 157:1512-1525. doi:10.1016/j.ejmech.2018.08.022

47. Ouberai M, El Garch F, Bussiere A, Riou M, Alsteens D, Lins L, Baussanne I, Dufrene YF, Brasseur R, Decout JL, Mingeot-Leclercq MP (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: a target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? Biochim Biophys Acta 1808 (6):1716-1727. doi:10.1016/j.bbamem.2011.01.014

48. El Khoury M, Swain J, Sautrey G, Zimmermann L, Van Der Smissen P, Decout JL, Mingeot-Leclercq MP (2017) Targeting Bacterial Cardiolipin Enriched Microdomains: An Antimicrobial Strategy Used by Amphiphilic Aminoglycoside Antibiotics. Sci Rep 7 (1):10697. doi:10.1038/s41598-017-10543-3

49. Mingeot-Leclercq M-P, Décout J-L (2016) Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. MedChemComm 7 (4):586-611. doi:10.1039/c5md00503e

50. Filloux A, Whitfield C (2016) Editorial: The many wonders of the bacterial cell surface. FEMS Microbiol Rev 40 (2):161-163. doi:10.1093/femsre/fuv047

51. Huang KC, Mukhopadhyay R, Wen B, Gitai Z, Wingreen NS (2008) Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 105 (49):19282-19287. doi:10.1073/pnas.0805309105

52. Alvarez AF, Georgellis D (2018) Bacterial Lipid Domains and Their Role in Cell Processes. Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Springer International Publishing, Cham. doi:10.1007/978-3-319-43676-0_39-1

53. Knirel YA, Bystrova OV, Kocharova NA, Zahringer U, Pier GB (2006) Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. J Endotoxin Res 12 (6):324-336. doi:10.1179/096805106X118906

54. Denich TJ, Beaudette LA, Lee H, Trevors JT (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. J Microbiol Methods 52 (2):149-182. doi:https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0

55. Gil T, Ipsen JH, Mouritsen OG, Sabra MC, Sperotto MM, Zuckermann MJ (1998) Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes. Biochim Biophys Acta 1376 (3):245-266. doi:10.1016/s0304-4157(98)00022-7

56. Mouritsen OG (2011) Lipidology and lipidomics--quo vadis? A new era for the physical chemistry of lipids. Phys Chem Chem Phys 13 (43):19195-19205. doi:10.1039/c1cp22484k

57. Goldfine H (2016) Membrane Lipid Biogenesis. In: Geiger O (ed) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Springer International Publishing, Cham, pp 1-14. doi:10.1007/978-3-319-43676-0_34-1

58. Schlame M (2008) Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. J Lipid Res 49 (8):1607-1620. doi:10.1194/jlr.R700018-JLR200

59. Benamara H, Rihouey C, Abbes I, Ben Mlouka MA, Hardouin J, Jouenne T, Alexandre S (2014) Characterization of membrane lipidome changes in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm growth on glass wool. PLoS One 9 (9):9. doi:10.1371/journal.pone.0108478.g001

60. Baysse C, Cullinane M, Denervaud V, Burrowes E, Dow JM, Morrissey JP, Tam L, Trevors JT, O'Gara F (2005) Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. Microbiology 151 (Pt 8):2529-2542. doi:10.1099/mic.0.28185-0

61. Zhang YM, Rock CO (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat Rev Microbiol 6 (3):222-233. doi:10.1038/nrmicro1839

62. Lee T-H, Hofferek V, Separovic F, Reid GE, Aguilar M-I (2019) The role of bacterial lipid diversity and membrane properties in modulating antimicrobial peptide activity and drug resistance. Curr Opin Chem Biol 52:85-92. doi:10.1016/j.cbpa.2019.05.025

63. Lewis RN, McElhaney RN (2000) Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and (31)P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids. Biophys J 79 (3):1455-1464. doi:10.1016/S0006-3495(00)76397-1

64. Romantsov T, Wood JM (2016) Contributions of Membrane Lipids to Bacterial Cell Homeostasis upon Osmotic Challenge. In: Geiger O (ed) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Springer International Publishing, Cham, pp 1-22. doi:10.1007/978-3-319-43676-0_58-1

65. Huang KC, Ramamurthi KS (2010) Macromolecules that prefer their membranes curvy. Molecular microbiology 76 (4):822-832. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07168.x

66. Baker LY, Hobby CR, Siv AW, Bible WC, Glennon MS, Anderson DM, Symes SJ, Giles DK (2018) *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. BMC Microbiol 18 (1):117. doi:10.1186/s12866-018-1259-8

67. Abbes I, Rihouey C, Hardouin J, De E, Jouenne T, Alexandre S (2016) *Pseudomonas aeruginosa* produces phosphatidyltris(hydroxymethyl)aminomethane and derivatives when grown in Tris-buffered medium. Biochim Biophys Acta 1861 (8 Pt A):703-714. doi:10.1016/j.bbalip.2016.04.017

68. Lewenza S, Falsafi R, Bains M, Rohs P, Stupak J, Sprott GD, Hancock REW (2011) The olsA gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility. FEMS Microbiol Lett 320 (2):95-102. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02295.x

69. Le Senechal C, Crouzet M, Costaglioli P, Barthe C, Bure C, Vilain S (2019) Phospholipid Content of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Is Modulated by the Growth Phase Rather Than the Immobilization State. Lipids 54 (9):519-529. doi:10.1002/lipd.12184

70. Ghorbal SK, Chatti A, Sethom MM, Maalej L, Mihoub M, Kefacha S, Feki M, Landoulsi A, Hassen A (2013) Changes in membrane fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* in response to UV-C radiations. Curr Microbiol 67 (1):112-117. doi:10.1007/s00284-013-0342-5

71. Hancock IC, Meadow PM (1969) The extractable lipids of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids 187 (3):366-379. doi:https://doi.org/10.1016/0005-2760(69)90010-1

72. Benamara H, Rihouey C, Jouenne T, Alexandre S (2011) Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta 1808 (1):98-105. doi:10.1016/j.bbamem.2010.09.004

73. Groenewold MK, Massmig M, Hebecker S, Danne L, Magnowska Z, Nimtz M, Narberhaus F, Jahn D, Heinz DW, Jansch L, Moser J (2018) A phosphatidic acid-binding protein is important for lipid homeostasis and adaptation to anaerobic biofilm conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. The Biochemical journal 475 (11):1885-1907. doi:10.1042/BCJ20180257

74. Han ML, Zhu Y, Creek DJ, Lin YW, Anderson D, Shen HH, Tsuji B, Gutu AD, Moskowitz SM, Velkov T, Li J (2018) Alterations of Metabolic and Lipid Profiles in Polymyxin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 62 (6). doi:10.1128/AAC.02656-17

I.2 TECHNIQUES D'ANALYSE

I.2.1 Sciences « omiques » et lipidomique

I.2.1.1 Sciences « omiques »

Depuis les années 80, le développement exponentiel de l'informatique et des techniques d'analyses, a permis d'envisager une analyse de plus en plus fine du fonctionnement des organismes biologiques. Le développement de la capacité de traitement et de stockage des données a lancé une véritable course à l'information. Notamment, le projet génome humain, lancé en 1988, ayant pour but d'établir le séquençage complet de l'ADN du génome humain, a engendré une compétition scientifique à l'échelle mondiale [2]. Avec ce projet s'est développé la « génomique » : domaine interdisciplinaire visant à caractériser et quantifier tous les gènes d'un organisme, leurs interrelations et leur influence sur l'organisme [3].

Par analogie, d'autres disciplines visant à étudier un échantillon dans sa globalité sont nées : transcriptomique pour les ARN messagers, protéomique pour les protéines, métabolomique pour les métabolites (**Figure 13**) . Ainsi, la métabolomique concerne l'étude de tous les métabolites d'un organisme vivant. Les métabolites étudiés en santé humaine sont principalement des métabolites primaires, indispensables au fonctionnement physiologique de l'organisme. Il s'agit de composés de faible poids moléculaire (PM < 1500) par rapport à la protéomique.

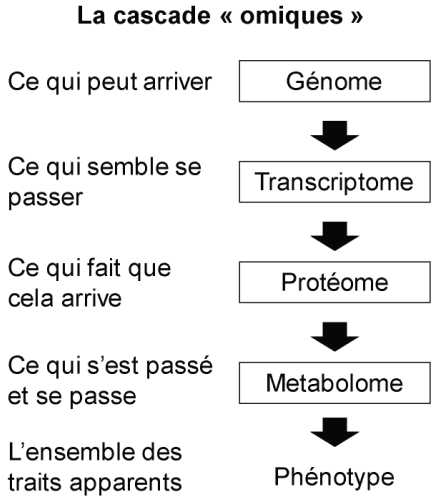


Figure 13 Description de l'étude des processus biologiques d'un organisme *via* la cascade « omiques ». Figure 1 de Dettner *et al.* (2007) [1]

Avec ces nouvelles disciplines, une façon radicalement différente d'aborder les sciences s'est répandue. Plutôt que de chercher à démontrer expérimentalement une hypothèse précise, les sciences « omiques » cherchent à étudier un objet dans sa globalité sans *a priori*. Cette approche permet d'acquérir une grande quantité d'informations, mais en plus, de diminuer grandement les biais de confirmation.

Au vu des quantités massives de données générées (milliers de variables), des outils informatiques, de tri et de visualisation des données spécifiques ont dû être développés et sont actuellement toujours en cours de développement. Ces outils ont pu voir le jour grâce à l'interdisciplinarité des mathématiques (analyses statistiques) avec l'informatique, la chimie analytique et la biologie [4]. Leur fonctionnement sera décrit en I.2.3.

I.2.1.2 La lipidomique

La lipidomique est une sous-branche de la métabolomique visant la caractérisation exhaustive des lipides d'un organisme. Elle englobe la compréhension globale de l'influence des lipides sur les processus d'un organisme : signalisation cellulaire, architecture des membranes, modulation transcriptionnelle et translationnelle, interactions lipides-lipides et lipides-protéines, réaction aux variations environnementales dans le temps. Elle englobe aussi l'étude de l'expression, la régulation des gènes et des enzymes impliquées dans le métabolisme et le transport des lipides [5,6].

Selon la description courante vue dans les manuels scolaires, les lipides sont des molécules solubles dans les solvants organiques [7], ou formant la matière grasse des êtres vivants. La famille des lipides enveloppe donc une grande variété de structures chimiques différentes. Les lipides peuvent être séparés en huit catégories (acides gras **Figure 14a**, glycérolipides **Figure 14b**, glycérophospholipides **Figure 14c**, sphingolipides **Figure 14d**, stérols **Figure 14e**, prénols **Figure 14f**, saccharolipides **Figure 14g** et polycétides **Figure 14h**) [8]. Chacune de ces huit catégories de lipides comprend d'autres classes et sous-classes de lipides, ce qui donne un total de 43 636 lipides dans la base de données de structure LIPIDMAPS (LMSD), parmi lesquels 21 683 composés ont des données expérimentales et 21 953 sont des lipides générés par calcul (en Octobre 2019) [9].

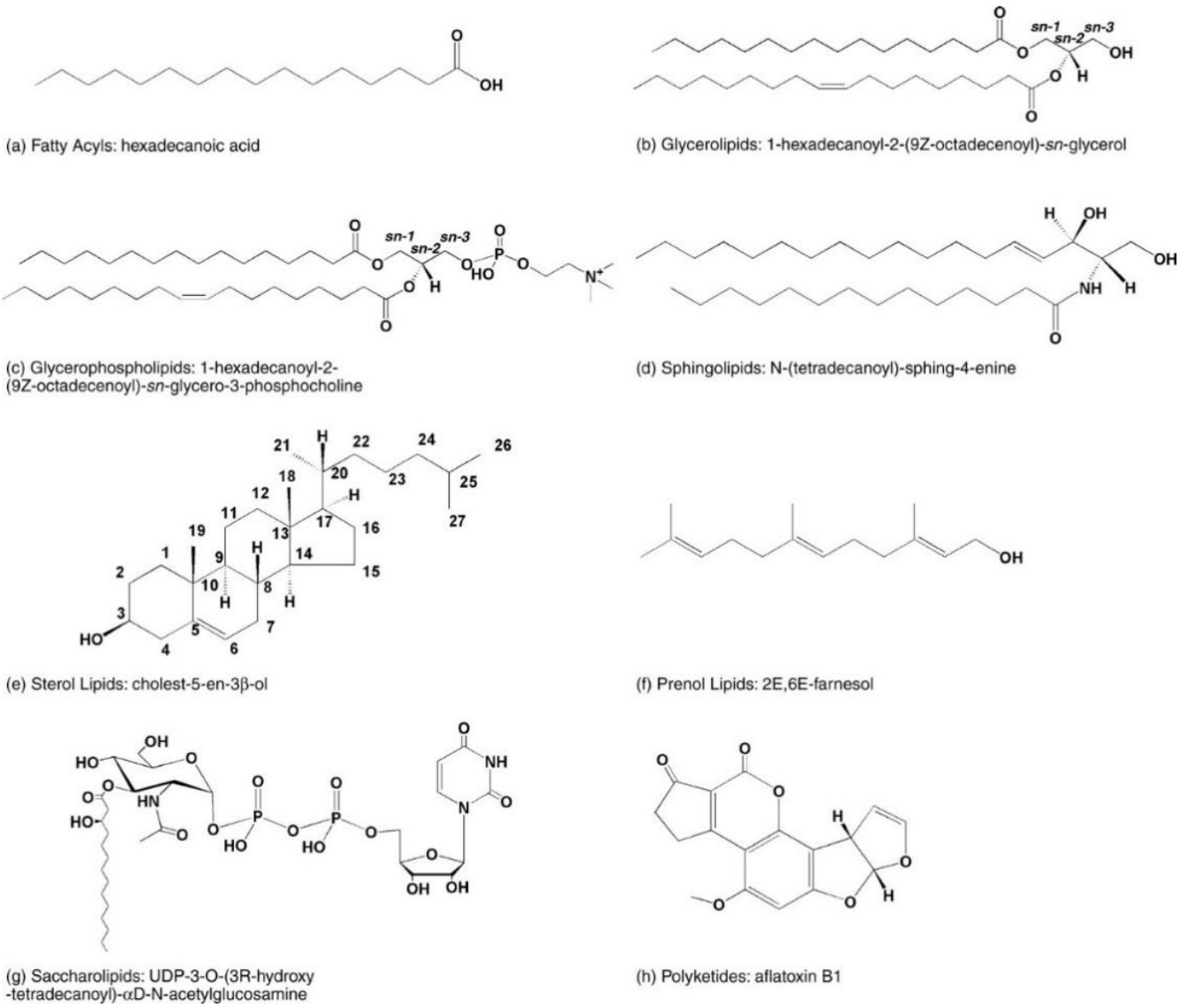


Figure 14 Les 8 classes principales des lipides. Figure 1 de Fahy *et al.* (2005) [8]

La **Figure 15** résume les différentes étapes d'une analyse lipidomique : échantillonage, préparation de l'échantillon, acquisition des données, traitement des données (méthodes automatiques, analyses statistiques, identification, quantification…), interprétation des données.

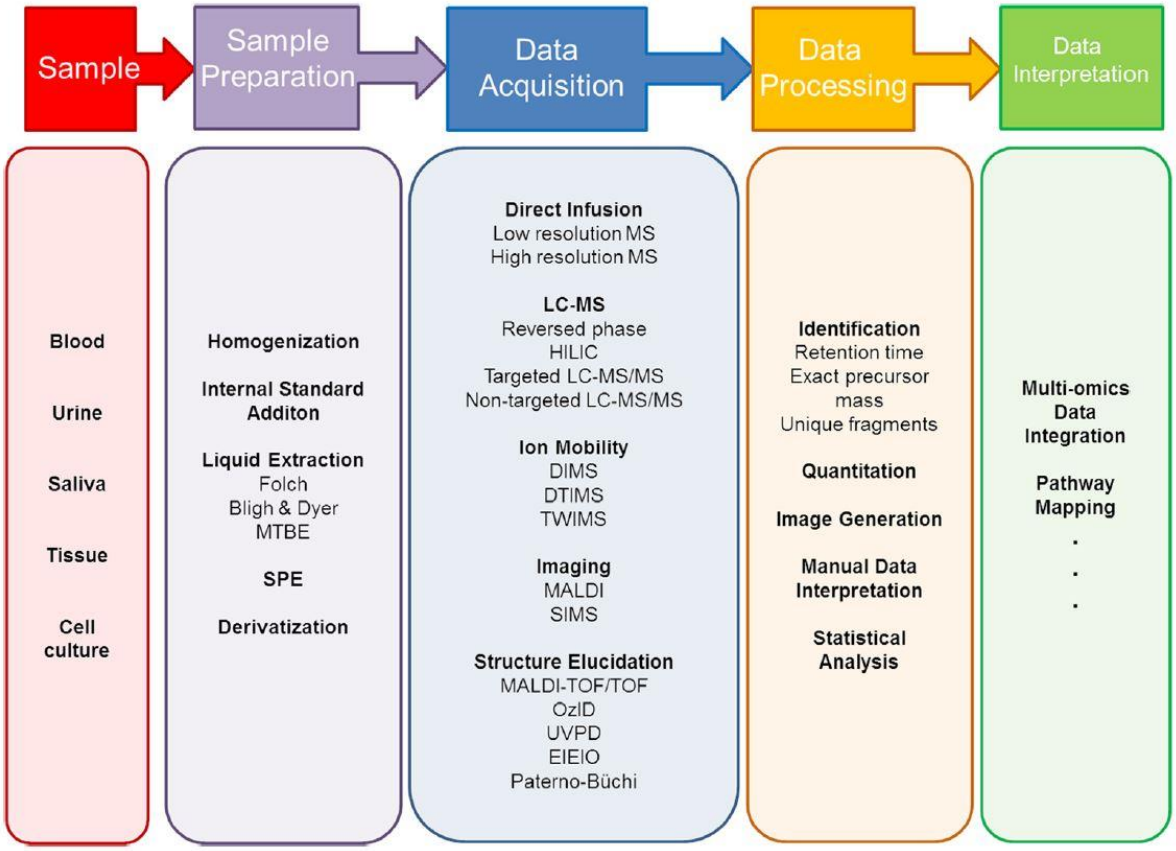


Figure 15 Workflow utilisé en lipidomique comprenant toutes les étapes essentielles de l'échantillon au résultat biologique. Figure 2 de Zullig *et al.* (2019) [9]

Concernant l'**échantillon**, les échantillons biologiques étudiés en lipidomique peuvent être variés : fluides, tissus, cellules, bactéries... L'expérience va chercher à répondre à la question : quelles sont les différences (biomarqueurs) entre les différents groupes d'échantillons ? Le type d'échantillon dépend de son accessibilité (plasma et urine facilement disponibles) et de la question biologique à traiter. De ce fait, les échantillons sont souvent prélevés à partir de groupes de patients (ou animaux de laboratoire…) sains vs malades.

Dans le cadre de cette thèse, les groupes considérés étaient différentes idolats cliniques de *P. aeruginosa*, mais le raisonnement est identique.

Concernant les **étapes de préparation**, l'extraction des lipides est une étape indispensable qui peut être assez complexe de par : i) la présence de molécules aux structures et polarités variées, et ii) la nécessité de prendre des précautions particulières pour éviter la dénaturation de l'échantillon (oxydation, hydrolyse des lipides…).

La **Figure 16** résume les différents solvants qui peuvent être utilisés pour l'extraction des lipides par extraction liquide-liquide. La méthode la plus utilisée est la méthode de Bligh and Dyer, utilisant du méthanol et du chloroforme. D'autres méthodes publiées comprennent des extractions à base i) de chloroforme et de méthyl-tertbutyléther (MTBE), ii) de butanol, iii) de butanol-méthanol (BUME), et iv) d'acide acétique (AcOH) avec de l'isopropanol et de l'hexane [10].

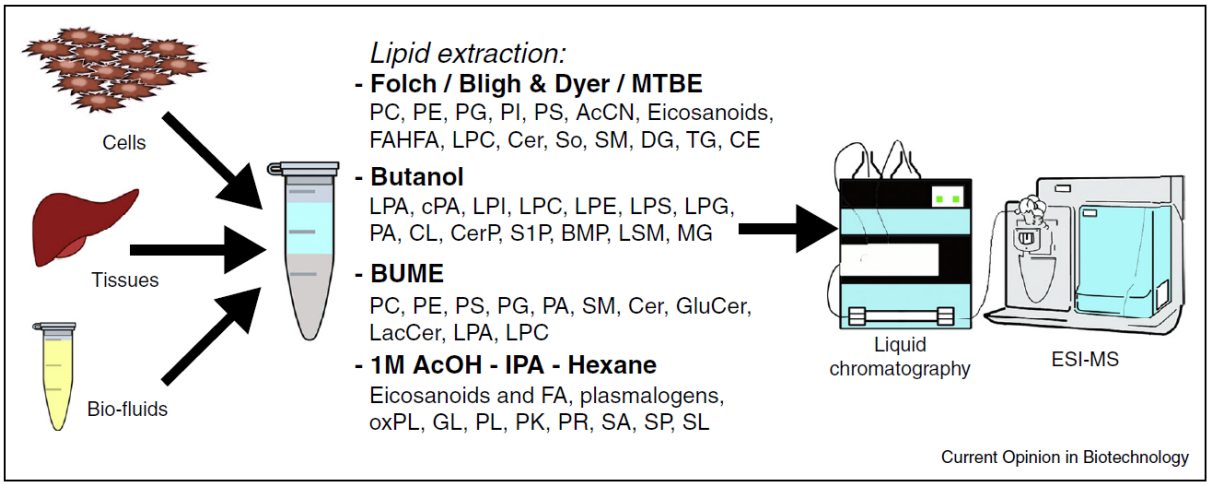


Figure 16 Procédures d'extraction couramment utilisées en lipidomique et les classes de lipides qu'elles couvrent. Acronymes : (L)PC, (lyso)phosphatidylcholine ; (L)PE, (lyso)phosphatidyléthanolamie ; (L)PG, (lyso)phosphatidylglycérol ; (L)PI, (lyso)phosphatidylinositol ; (L)PS, (lyso)phosphatidylsérine ; AcCN, acylcarnitine ; FAHFA, esters d'acides gras ramifiés d'acides gras hydroxylés ; Cer, céramide ; So, sphingosine ; (L)SM, (lyso)sphingomyéline ; DG, diglycéride ; TG, triglycéride ; CE, ester de cholestérol ; (L)PA, acide (lyso)phosphatidique ; cPA, acide phosphatidique cyclique ; CL, cardiolipine ; CerP, céramide-phosphate ; S(1)P, sphingosine-1-phosphate ; BMP, bis(monoglycéride)phosphate ; MG, monoglycéride ; GluCer, glucosyl-ceramide ; LacCer, lactosyl-ceramide ; FA, acide gras ; oxPL, phospholipides oxydés ; GL, glycérides ; PL, phospholipides ; PK, polycétides ; PR, prénols ; SL, sphingolipides. Figure 1 de Tumanov *et al.* (2017) [10]

L'**acquisition des données** est principalement réalisée par spectrométrie de masse (MS) en infusion directe ou en couplage avec la chromatographie liquide (LC) et/ou la spectrométrie de mobilité ionique (IMS). Ces techniques seront davantage détaillées en I.2.2.

Le couplage de la chromatographie en phase supercritique (SFC) avec la spectrométrie de masse a été décrit pour l'identification et la quantification de lipides [11]. L'avantage de cette technique de séparation est qu'elle est un compromis entre la chromatographie liquide et la chromatographie gazeuse, mais contrairement à la chromatographie gazeuse, elle ne nécessite pas la dérivatisation des échantillons. Elle est complémentaire à ces deux techniques chromatographiques, notamment pour l'étude des isomères.

L'imagerie par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)-MS [12] est utilisée pour l'analyse de coupes de tissus (cerveau [13], poumons [14]…).

La chromatographie gazeuse (GC) est utilisée pour l'analyse des acides gras [15]. Cependant, l'analyse des lipides requiert en général leur dérivatisation préalable.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut aussi être envisagée (spectres du proton ^{1}H ou du phosphore ^{31}P pour les phospholipides). Cependant, cette technique est moins utilisée que la MS en raison de sa faible sensibilité et au fait que cette technique n'est pas adaptée pour analyser des mélanges de molécules [7].

Le **traitement des données** est généralement réalisé automatiquement. Il est suivi de tests d'analyses statistiques afin de faire ressortir les variables pertinentes. Il sera détaillé en partie I.2.3 et décrit dans le chapitre II (II.3.4) pour ce qui concerne notre étude.

Deux descripteurs principaux sont utilisés pour l'identification des lipides : la mesure de masse précise qui permet l'obtention des formules brutes, ainsi que les spectres MS/MS. L'identification des molécules est principalement réalisée automatiquement à l'aide des bases de données de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS, voir partie I.2.1.3). Un troisième descripteur est aujourd'hui mis en place en lipidomique : la mesure des sections efficaces de collision. Enfin, dans des conditions données, le temps de rétention permet une identification de lipides par rapport à des composés de référence. Des expériences supplémentaires peuvent être réalisées sur les biomarqueurs significatifs : par quantification absolue (requiert d'avoir un étalon pour chaque lipide biomarqueur) ou par semi-quantification (requiert au moins un étalon par classe chimique, voir chapitre II.3.2).

Enfin, les biomarqueurs significatifs des groupes sont interprétés dans leur **contexte biologique**. Pour cela ces informations peuvent être considérées dans un contexte plus global en les incluant à des données de protéomique et génomique (analyse multi-omique), ou dans les voies métaboliques [16].

I.2.1.3 Bases de données de lipidomique

Plusieurs bases de données pour l'identification des lipides existent. Ces bases de données permettent une recherche selon le rapport masse sur charge (*m/z*), la formule brute ou selon la classification établie (décrite en I.2.1.1) du lipide. Elles peuvent aussi contenir une bibliothèque de spectres MS/MS, expérimentaux et/ou théoriques, pour une identification automatique par comparaison des fragments obtenus. Plus récemment, des bases de données de sections efficaces de collision (CCS) obtenues par IMS ont vu le jour.

Les bases de données les plus pertinentes sont présentées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 Bases de données pour l'identification de lipides à partir de données MS.

Nom/ référence	Lien	Commentaire
Lipidmaps [17]	www.lipidmaps.org	Référence pour la nomenclature et la classification, recherche par structure, identification par MS ou MS/MS
Lipidblast [18]	https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects /lipidblast	Identification par MS et MS/MS
Metlin [19]	https://metlin.scripps.edu	Base de données MS/MS de nombreux métabolites
The Human Metabolome Database (HMBD) [20]	https://hmdb.ca/	Base de données LC-MS(/MS), GC/MS, RMN 1D/2D (^{1}H ou ^{13}C)
LipidIMMS Analyzer [21]	http://imms.zhulab.cn/LipidIMMS/	Identification à partir de données *m/z*, temps de rétention (t_R), CCS, MS/MS
AllCCS [22]	http://allccs.zhulab.cn/	Base de données de CCS de petites molécules à partir de données expérimentales et prédites par *machine learning*
Unified CCS Compendium [23]	https://mcleanresearchgroup.shinyapps.io/CCS-Compendium/	Regroupe toutes les bases de données de CCS, régressions *m/z*-CCS par classes de métabolites disponibles

L'adoption de la lipidomique pour l'étude des bactéries a été plus tardive que son application chez les mammifères et autres eucaryotes [24,25]. Le « Lipid A Spectral Library » (LASL) est un exemple d'une base de données, nouvellement développée, qui a été motivée par la nécessité de combler un manque dans les ressources existantes pour la lipidomique. Cette base de données permet l'identification de bactéries par l'utilisation de *machine learning* et de spectres MS/MS du lipide A (capable d'identifier correctement 97% des spectres d'*Acinetobacter baumannii* avec un taux de faux positif inférieur à 1%) [26].

Il y a un véritable manque de base de données spécifiques aux lipides bactériens. Elles sont pourtant nécessaires pour rendre les identifications automatiques plus pertinentes. En effet, l'utilisation de bases de données eucaryotes peut mener à de mauvaises identifications des lipides bactériens. Des exemples seront présentés dans le chapitre II (II.3.2).

Pour le moment, la vérification manuelle des attributions automatiques est indispensable afin d'obtenir des données biologiquement pertinentes. Malgré cela, au vu de l'avancée actuelle de la recherche dans le domaine de la lipidomique, il est très plausible que de nouveaux outils d'identification plus adaptés soient développés dans les années à venir.

I.2.2 Analyse par UHPLC-IMS-MS

I.2.2.1 Description

I.2.2.1.1 Chromatographie liquide à ultra haute performances (UHPLC)

La chromatographie liquide à ultra haute performances (UHPLC) est l'amélioration technologique (réduction du temps d'analyse et augmentation de la résolution) de la chromatographie liquide à haute performances (HPLC) grâce à l'élaboration de particules de plus faibles diamètres (1,7 µm en UHPLC contre 3 µm minimum en HPLC). Sa commercialisation est relativement récente puisque le premier système UHPLC a été commercialisé en 2004 [27].

Son fonctionnement repose donc sur les mêmes principes physico-chimiques que ceux de la HPLC. Comme la HPLC, l'UHPLC est une technique de séparation basée sur la différence de distribution des composés non-volatils d'un mélange entre deux phases : une phase mobile constituée d'un mélange de solvants et une phase stationnaire contenue dans une colonne. Les interactions mises en jeu peuvent être de différentes natures : adsorption, partage, échange d'ions, affinité, [28]... L'identification et la quantification sont possibles grâce à l'utilisation d'un détecteur (détecteur Ultra-Violet, détecteur évaporatif à diffusion de la lumière, spectromètre de masse…) et de composés étalons.

Au vu des applications très variées de la HPLC (et de fait de l'UHPLC), de nombreux modes de séparation ont été développés. Pour l'analyse des lipides les trois modes les plus fréquemment utilisés sont i) la chromatographie en phase inverse (RP-HPLC), ii) la chromatographie en phase normale (NPLC) et iii) la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) [29].

I.2.2.1.1.1 Chromatographie en phase inverse (RPLC)

En phase inverse (RPLC), la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile polaire. La phase stationnaire est composée de particules de silice greffées par des chaînes alkyles (principalement C18), des groupements cyano (-CN) ou phényle [30].

La phase mobile est composée de deux éluants (une phase mobile « aqueuse » ou éluant faible et une autre « organique » ou éluant fort) souvent utilisés en gradient. En analyse lipidomique, la phase mobile « aqueuse » est un mélange eau/solvants organiques (ex : eau/acétonitrile (40/60) [31,32]). La phase mobile organique est souvent composée d'isopropanol ainsi que d'autres solvants (ex : isopropanol/acétonitrile (90/10) [33]). L'utilisation d'additifs dans la phase mobile est fortement recommandée pour améliorer la séparation chromatographique (meilleure résolution des pics et diminution de l'effet de traînée des pics), ainsi que la détection des lipides (notamment pour une meilleure ionisation avec la source *electrospray* d'un spectromètre de masse, en particulier en ions positifs).

Ainsi, des solutions de formiate ou d'acétate d'ammonium (5-10 mM) et de l'acide formique ou acétique (0,05-0,1%) sont utilisées [30].

Les lipides sont séparés selon leur lipophilie, qui est régie par la longueur des chaînes d'acides gras et le nombre de doubles liaisons. Ainsi, les lipides contenant des chaînes d'acides gras plus longues sont éluées plus tardivement que les lipides à chaînes plus courtes. De même, les chaînes acides gras saturées sont éluées plus tard que leurs analogues polyinsaturés [29].

I.2.2.1.1.2 Chromatographie en phase normale (NPLC)

En phase normale (NPLC), la phase stationnaire est polaire (silice ou alumine) et la phase mobile apolaire. La phase stationnaire est composée de particules de silice vierge (avec différentes tailles de pores allant de 60 Å² à 100 Å²).

Seuls des solvants organiques plutôt apolaires à faible capacité d'ionisation doivent être utilisés en NPLC. La séparation commence avec un éluant faible (ex : heptane [34], n-hexane/isopropanol/ méthyl tert-butyl éther (0,2/1.2/1) [35]), suivi par un gradient avec un éluant fort, plus polaire (ex : heptane/isopropanol/acétonitrile (96/2/2) [36]). Les additifs utilisés en NPLC sont 0,5% de NH_4OH ; 5-15 mM d'ammonium acétate ou formiate d'ammonium, diéthylamine, acide formique ou de petites quantités d'eau (0,5-3 %) [29].

Les lipides sont séparés en fonction de leurs fonctionnalités hydrophiles (tête polaire du lipide), et donc en fonction de leurs classes ou sous-classes représentatives.

I.2.2.1.1.3 Chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC)

En chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est également polaire (mais moins qu'en RPLC). Ici, le pourcentage d'eau dans la phase mobile peut varier pendant la séparation HILIC (5-40%) et un minimum de 2% est essentiel pour son fonctionnement. En effet, en HILIC, la séparation est basée sur l'équilibre de partage des solutés entre la phase mobile et les couches d'eau semi-immobilisées à la surface de la face stationnaire [37].

De ce fait, contrairement à la NPLC, des solvants aqueux et organiques miscibles à l'eau sont utilisés, ce qui permet une meilleure compatibilité avec l'ionisation *electrospray*.

En éluant faible, l'acétonitrile est généralement utilisé seul [38], tandis que l'éluant fort est généralement constitué d'eau [39] ou d'eau en mélange avec des solvants organiques (ex : eau/méthanol (1/1) [40]). Les additifs utilisés en lipidomique sont 0,1-0,2% d'acide formique, 5-10 mM d'acétate d'ammonium, 20 mM de formiate d'ammonium ou 10 mM de NH_4OH. Comme en NPLC, les lipides sont séparés en fonction de leurs têtes polaires.

Le choix du type de chromatographie dépend de la polarité des lipides étudiés, mais également du choix analytique. En effet, la séparation des lipides en HILIC, selon leur tête polaire, peut être limitante pour l'identification des espèces individuelles de lipides. Cependant, cela est un atout pour effectuer de la semi-quantification puisqu'un seul étalon pourra être utilisé par classe ou sous-classe de lipide (même temps de rétention, contrairement à la RPLC). De plus, les limites de séparation rencontrées en LC ne constituent cependant pas un problème majeur puisque le couplage avec la spectrométrie de masse offre une seconde dimension de séparation, en particulier en recourant aux mesures de masse précises, comme il sera détaillé dans la partie suivante (I.2.2.1.2).

I.2.2.1.2 Spectrométrie de masse (MS) [41,42]

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse permettant de déterminer la masse moléculaire isotopique des composés d'un échantillon *via* la mesure des rapports masse sur charge (*m/z*). Un spectromètre de masse est constitué de :

_ un système d'introduction de l'échantillon, qui peut être liquide (infusion directe, couplage avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire), solide ou gazeux (couplage avec la chromatographie gazeuse ou chromatographie en phase supercritique),

_une source d'ionisation permettant l'ionisation des molécules, différentes technologies de sources existent (ionisation électronique (EI), ionisation *electrospray* (ESI), ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)…), les deux sources les plus utilisées en lipidomique l'ESI et l'APCI seront décrites par la suite,

_un ou plusieurs analyseurs pour séparer les composés selon leur rapport *m/z*. Plusieurs analyseurs fonctionnant selon différents principes physiques existent (quadripôle, temps de vol, pièges à ions, spectromètres à transformée de Fourier…), les analyseurs utilisés lors de cette thèse (quadripôle et temps de vol) seront présentés par la suite,

_un détecteur, souvent un couple dynode de conversion/multiplicateur d'électrons formant un signal électrique proportionnel à la quantité d'ions détectés,

_un système d'acquisition et de traitement des données.

I.2.2.1.2.1 Ionisation par electrospray (ESI)

L'ionisation par électronébuliseur (ou *electrospray*) (ESI) est une technique permettant l'ionisation de molécules polaires en solution et à pression atmosphérique. Cette technique est dite douce car elle ne génère que peu de fragmentation par rapport aux anciennes méthodes d'ionisation telles que l'ionisation électronique.

En effet, comme décrit dans la **Figure 17**, des gouttelettes (micro ou nano-gouttelettes selon le diamètre du capillaire de nébulisation et le débit de solution infusée) hautement chargées sont formées, en sortie du capillaire, sous l'influence d'un champ électrique intense (kV) entre une électrode (pointe du capillaire) et une contre-électrode. Selon, les polarités du capillaire et de la contre-électrode, des ions chargés positivement ou négativement peuvent être formés [43].

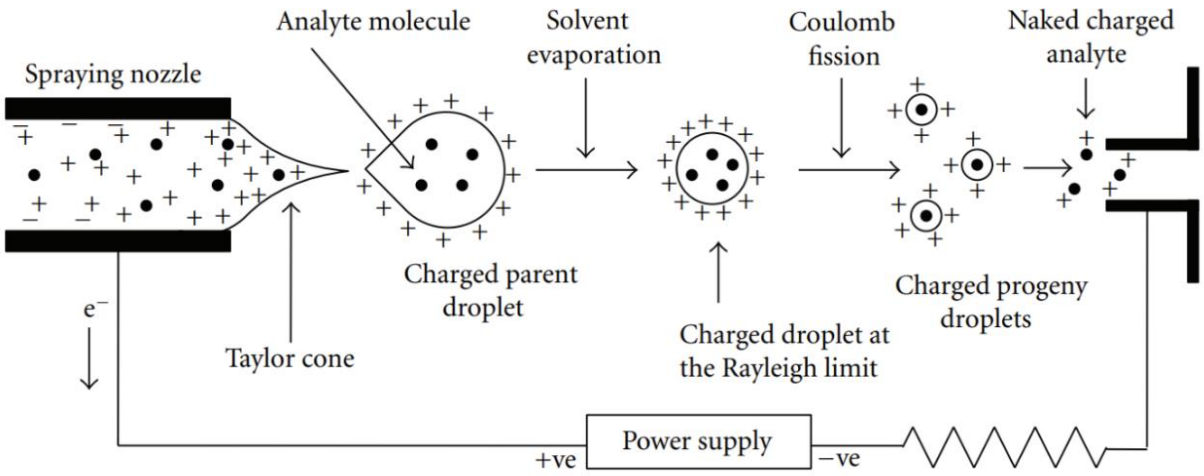


Figure 17 Représentation schématique du fonctionnement de la source ESI. Figure 6 de Banerjee *et al.* (2012) [43]

La particularité de cette méthode d'ionisation est que les ions formés peuvent être monochargés ou multichargés (selon la taille de l'analyte et le nombre de fonctions ionisables). De plus, différents types d'adduits peuvent être formés : molécule protonée, adduits avec des ions sodium, ammonium, chlorure…). Ainsi, une molécule peut s'ioniser en différents adduits et de fait, plusieurs signaux peuvent être observés pour chaque molécule.

Il s'agit de la méthode d'ionisation la plus utilisée en analyse lipidomique, notamment lors d'un couplage LC-MS (RPLC ou HILIC). En mode positif, elle permet l'ionisation d'une large gamme de lipides : des apolaires (diglycérides, triglycérides…) aux plus polaires (phospholipides et sphingolipides [39,44]). L'ESI en ions négatifs est adaptée pour certains phospholipides tels que les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylglycérols [45,46].

I.2.2.1.2.2 Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique permettant l'ionisation de molécules polaires et apolaires en phase gazeuse et à pression atmosphérique. L'échantillon en solution est introduit dans un nébuliseur pneumatique à la pression atmosphérique où il est nébulisé par un flux de diazote chaud à 300-400 °C (**Figure 18**).

A la sortie du nébuliseur, une électrode émet des électrons sous la forme d'une décharge corona conduisant à l'ionisation du gaz (plasma d'azote), puis indirectement du solvant et de l'analyte. En effet, les ions radicalaires ($N_2^{+\bullet}$ et $N_4^{+\bullet}$) du plasma participent à une cascade de réactions chimiques qui induisent l'ionisation du solvant, puis des molécules de l'échantillon, par un processus d'échange de charge ou de transfert de proton. Selon la polarité de la décharge corona, ce mode d'ionisation fonctionne en mode positif ou négatif. Ainsi les ions formés sont soit des cations ou anions radicalaires ($M^{+\bullet}$ et $M^{-\bullet}$), dans le cas d'un solvant aprotique, soit des molécules protonées $[M+H]^+$ comme déprotonées $[M-H]^-$, dans le cas d'un solvant protique (méthanol, eau…) [47].

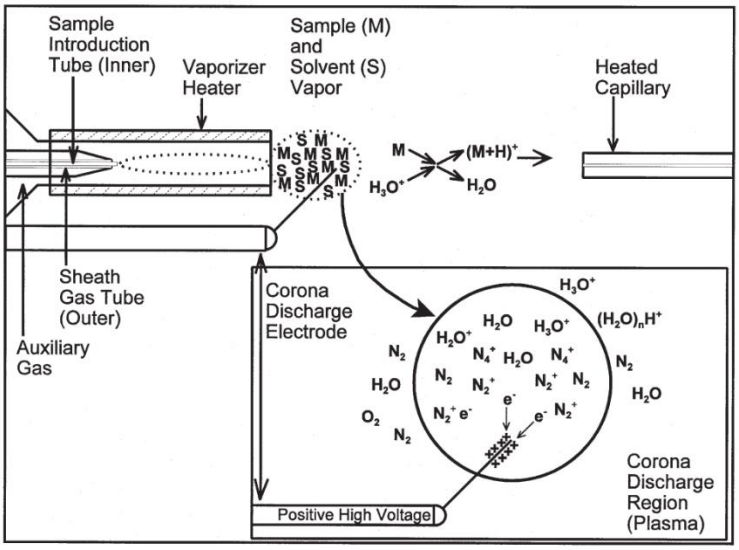


Figure 18 Représentation schématique du fonctionnement de la source APCI. Figure 2 de Birdwell. (2001) [48]

L'APCI permet une meilleure ionisation que l'ESI pour les lipides apolaires tels que les triglycérides [49], esters d'acides gras et de stérols. En revanche, l' APCI est moins adaptée que l'ESI pour ioniser les phospholipides qui présentent des fonctions ionisables (exemple : phosphate pour PE, PG…) [48]. Cependant, la simplification du signal (plusieurs adduits en ESI) fait que cette technique d'ionisation peut être complémentaire à l'ESI pour l'analyse des phospholipides.

I.2.2.1.2.3 Simple quadripôle et triple quadripôle (TQ) [41,50]

L'analyseur quadripolaire permet la transmission des ions à travers un champ électrodynamique. Il est constitué de quatre électrodes parallèles. Les électrodes parallèles sont reliées deux à deux et soumises à la fois à une tension continue U et une tension alternative V (de radiofréquence ω). L'inversion successive de la polarité des électrodes, deux à deux, permet la formation d'un champ électrique quadripolaire dans lequel les ions traversent l'analyseur en oscillant (**Figure 19**).

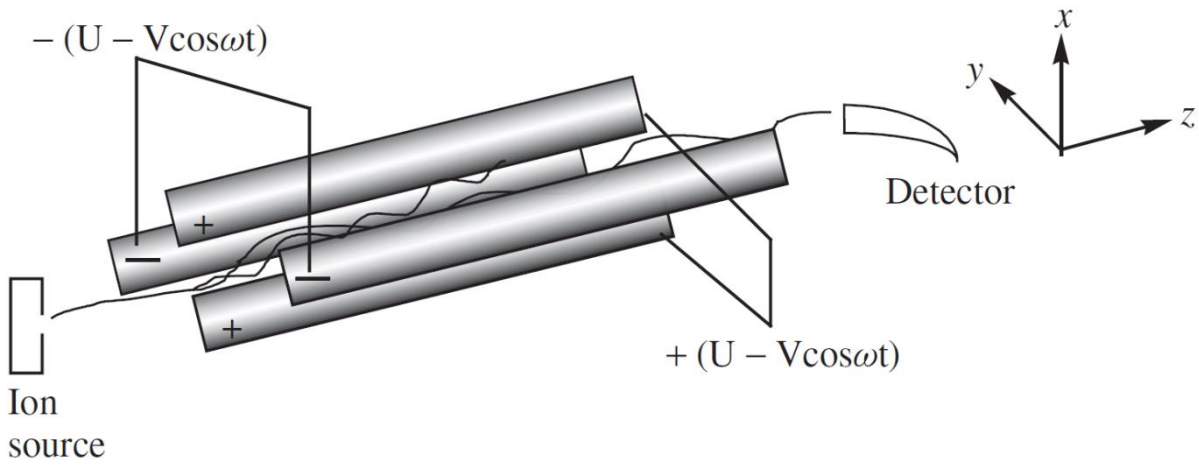


Figure 19 Schématisation du fonctionnement d'un quadripôle. Figure 3.6 de Dass (2007) [41]

Un balayage des potentiels U et V suivant un rapport U/V constant (droite de fonctionnement) permet de laisser passer les ions présentant des rapports *m/z* différents, de façon successive, à travers le quadripôle jusqu'au détecteur. Ce mode de fonctionnement est dit en balayage ou *scan*.

Lorsque les valeurs de U et V sont fixées, une seule valeur de *m/z* peut traverser le quadripôle, il s'agit du mode sélectif SIM (*single ion monitoring*).

En l'absence de tension continue (U), tous les ions de rapport *m/z* supérieur à celui fixé par la valeur de V appliquée auront une trajectoire stable, le quadripôle sert alors de focalisateur d'ions.

Ce mode est utilisé dans les cellules de collision (généralement de taille plus petite que les quadripôles) : la fragmentation, ou activation collisionnelle, des ions est réalisée à l'aide d'un gaz inerte (argon) et de l'application d'une tension (augmentation de l'énergie cinétique).

Le quadripôle peut être utilisé seul (simple quadripôle), en tandem (triple quadripôle) ou en association avec un autre analyseur (temps de vol (ToF), piège à ions, cellule à résonnance cyclotronique ionique (ICR)…) constituant alors un instrument dit hybride.

Le triple quadripôle (TQ) est constitué de trois quadripôles en série. Le second quadripôle est une cellule de collision. Cet assemblage permet de combiner les différents modes de fonctionnement de cet analyseur.

L'utilisation dédiée du TQ est le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) pour lequel, le premier quadripôle assure la sélection d'un ion précurseur (ion à fragmenter), le second la fragmentation et le troisième la sélection d'un ou plusieurs ions fragments. Ce mode est très utilisé en quantification, car il permet d'obtenir une très bonne sensibilité.

En lipidomique, la quantification ou semi-quantification peut être réalisée par MRM sur des biomarqueurs obtenus après analyses statistiques (voir partie I.2.1.2). Le mode descendant (sélection d'un précurseur, fragmentation, puis balayage de tous les ions fragments) peut aussi être utilisé pour réaliser l'analyse structurale des biomarqueurs. Cependant, au vu de la faible résolution de cet analyseur (basse résolution, précision de mesure à 0,1 Da) et de la relativement faible sensibilité du mode balayage, d'autres instruments sont plus adaptés pour l'analyse structurale (instrument hydride quadripôle – temps de vol Q-ToF, …).

I.2.2.1.2.4 Temps de vol (ToF) [41,42]

L'analyseur à temps de vol (*time-of-flight*, ToF) est composé d'une zone d'accélération (par application d'une tension) et d'un tube de vol, libre de tout champ électrique, dans laquelle les ions sont séparés sur la base de leurs différences de vitesse (même énergie cinétique, ½ mv^2). Des ions de *m/z* différents se déplacent à des vitesses différentes et arrivent séparément au détecteur d'ions (**Figure 20**). La mesure du temps de vol permet de déterminer le rapport *m/z*.

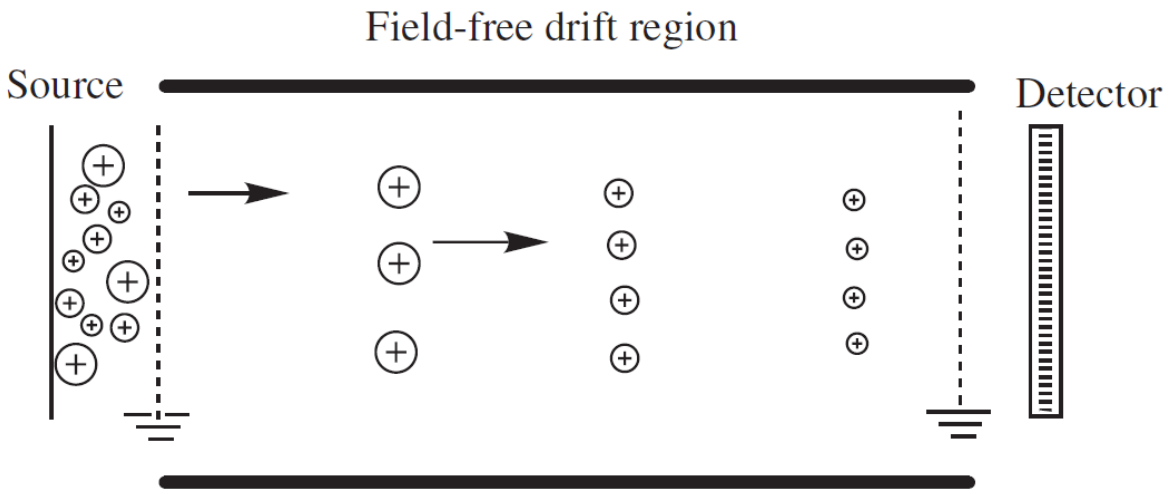


Figure 20 Schématisation de la séparation d'un analyseur ToF. Figure 3.10 de Dass (2007) [41] ref

Pour réaliser cette mesure, le temps initial doit être contrôlé, pour cela les ions sont envoyés par paquets de façon orthogonale *via* un système de plaques accélératrices appelé *pulser*. Le ToF est donc orthogonal à l'axe initial de déplacement des ions. Cela permet de mieux focaliser les ions dans le *pulser* et ainsi, par rapport à une géométrie axiale (anciens ToF), d'améliorer la sensibilité et la résolution de l'instrument [51].

La résolution d'un analyseur TOF est proportionnelle à la longueur du tube. En pratique, la résolution est limitée par la dispersion de l'énergie cinétique des ions. Une manière d'améliorer la résolution est de positionner à la fin du tube de vol un miroir électrostatique aussi appelé *reflectron*. Les ions y seront réfléchis de telle sorte que, pour une même valeur de *m/z* mais de vitesses initiales différentes, les plus rapides —pénètrent plus profondément dans le *reflectron* allongeant leur trajectoire— rattrapent les plus lents en un point où sera situé le détecteur.

L'utilisation du *reflectron* permet d'augmenter la résolution en corrigeant la dispersion d'énergie cinétique des ions de même rapport *m/z.* La distance parcourue par les ions est augmentée au détriment de leur transmission et par conséquent de la sensibilité. Certains ToF commercialisés possèdent deux *reflectron*, tels que le Synapt, instrument utilisé pendant cette thèse. Avec ce type d'instrument, le ToF peut fonctionner avec un ou avec deux *reflectron*. Ainsi l'utilisateur peut choisir entre une analyse sensible ou une avec une meilleure résolution.

Les analyseur TOF associés à un *reflectron* sont aujourd'hui des appareils à haute résolution, comprise entre 8 000 et 100 000, à fonctionnement rapide (en opposition avec des analyseurs à accumulation tels que ceux à transformée de Fourier). Il s'agit actuellement de l'analyseur MS le plus adapté pour le couplage LC-MS (haut échantillonnage des pics chromatographiques et haute résolution).

I.2.2.1.3 Spectrométrie de mobilité ionique (IMS) [52]

Les spectromètres de masse à mobilité ionique (IMS-MS) sont des instruments hybrides qui combinent un système de séparation IMS avec un analyseur MS. Un spectromètre de mobilité ionique (IMS) peut également fonctionner de façon autonome [53].

La spectrométrie de mobilité ionique est une technique de séparation des ions en phase gazeuse. Globalement, les ions traversent, guidés par un champ électrique, une cellule remplie d'un gaz inerte (gaz tampon qui est généralement N_2 ou He). Pour un état de charge donné, les ions les plus compacts sont moins ralentis par le gaz tampon que les ions les moins compacts. Les ions les plus petits ont donc un temps de dérive (t_D, temps pour traverser la cellule) plus petit que les ions les plus volumineux. La séparation IMS dépend de la taille, de la forme et de la charge des ions. Les temps de dérive sont à l'échelle des millisecondes. La mobilité ionique peut donc être utilisée en couplage avec une séparation chromatographique en amont (séparation de l'ordre de la minute).

La **Figure 21** illustre le fonctionnement des cellules les plus courantes : *drift-tube* (DTIM), *Traveling Wave Ion Mobility* (TWIM) et *trapped ion mobility* (TIM).

Dans une cellule DTIM, les ions sont guidés par un champ électrique linéaire et ralentis par un flux de gaz tampon à contre-courant [54].

Dans une cellule TWIM, un signal électrique appliqué alternativement aux électrodes de la cellule permet de former une « vague » guidant les ions dans la cellule remplie du gaz inerte [55].

Dans une cellule TIM, les ions sont piégés par une force électrostatique dans la direction inverse au flux d'ions pendant qu'un flux de gaz tampon pousse les ions. En réduisant lentement l'intensité du champ électrique, les ions peuvent être successivement élués de la cellule. A l'inverse des technologies DTIM et TWIM, les ions les plus volumineux sortent en premier de la cellule [56].

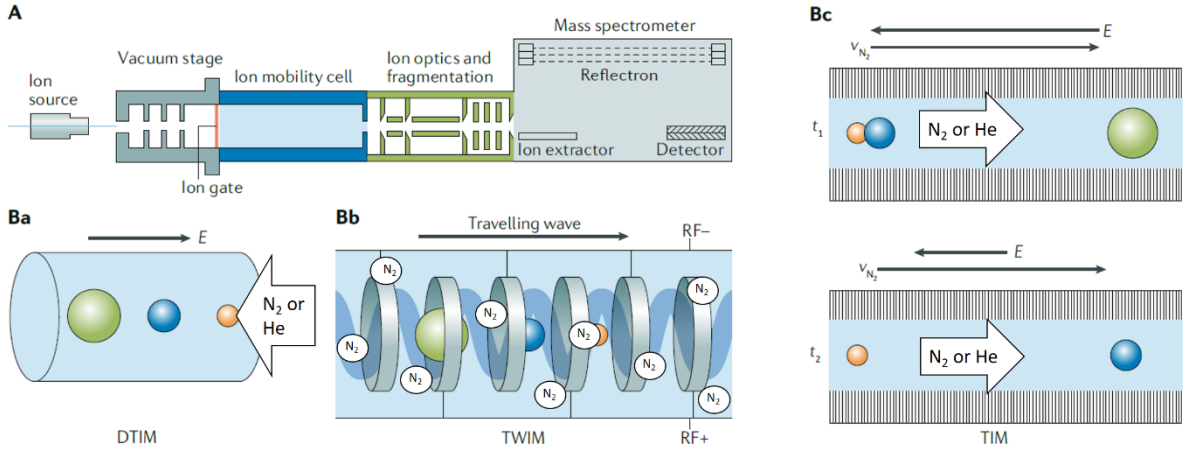


Figure 21 Schématisation d'un spectromètre de masse à mobilité ionique (A) et des cellules DTIM (Ba), TWIM (Bb) et TIM (Bc). Figure 1 de *Kalenius et al.* (2019) [56], modifiée par l'ajout du flux à contre-courant de diazote ou helium pour la cellule DTIM et de molécules de diazote dans la cellule TWIM.

A partir de la mesure du t_D, il est possible de déterminer la section efficace de collision (CCS) expérimentale d'un ion dans un gaz tampon donné. Elle est donc étroitement liée à la structure 3D de l'ion et est prédictible. De plus, puisque les CCS sont répétables (Δ<2% [57]) et reproductibles (Δ<5% [58]), elles peuvent être utilisée comme descripteurs d'une molécule et compléter une identification par les autres descripteurs *m/z,* spectres MS/MS et t_R. Les CCS expérimentales déterminées par DTIMS (^{DT}CCS) sont utilisées comme références car leur détermination ne nécessite pas le recours à un étalonnage. Celles déterminées par TWIMS (^{TW}CCS) ou TIMS (^{TIMS}CCS), nécessitent un étalonnage externe. La détermination des ^{TW}CCS sera détaillée dans le chapitre II (II.3.3)

Puisque les CCS sont liées à la structure 3D de l'ion, elles peuvent être calculées à partir de structures théoriques. Les CCS théoriques sont déterminées à l'aide de méthodes de calcul telles que : la méthode des trajectoires (TM), l'approximation de la projection (PA) et la méthode de diffusion exacte sur sphère dure (EHSS) [59]). Elles peuvent aussi être prédites par *machine learning* [60,22].

I.2.2.2 Utilisation du couplage LC-MS en lipidomique

De nombreuses études en lipidomique ont été réalisées par spectrométrie de masse en infusion directe [61]. Cette technique est bien plus rapide (3 minutes) que le couplage LC-MS (30 minutes en UHPLC), mais elle présente plusieurs limites, dont les principales sont i) l'impossibilité de séparer des isomères, ii) la possibilité d'effectuer une identification incorrecte pour certains lipides (ex : fragments en source) et iii) la perte de signal pour les ions de plus faible concentration, notamment en ESI (effet de suppression du signal) [10].

Comme illustré par la **Figure 22**, le nombre de publications de lipidomique par LC-MS a particulièrement augmenté cette dernière décennie.

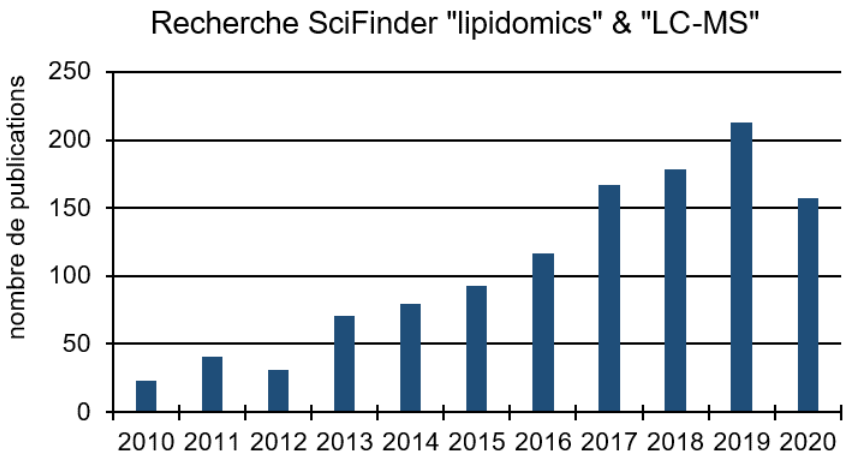


Figure 22 Nombre de publications ayant le sujet de recherche "lipidomics" ET "LC-MS" par années entre 2010 et 2020, données obtenues en utilisant SciFinder (Septembre 2020).

Le couplage LC-MS a été, et continue d'être, largement utilisé pour toutes les applications de la lipidomique : bioactivité, sécurité, qualité [62] et traçabilité alimentaire [63]; étude de syndrômes métaboliques (maladies cardiovasculaires, inflammatoires, diabète… [64]) ; étude des désordres neurologiques (maladie de Alzheimer [65]…) ; étude des cancers [66]; maladies de la vision [67,68]; développement de nouveaux médicaments (*drug discovery* [69]) ; étude d'organismes (plantes [70], animaux, microorganismes… [25]).

Concernant *P. aeruginosa*, une seule étude en lipidomique a été reportée par couplage LC-MS par *Han et al.* (2018) [61]. Cette étude récente traite des modifications des métabolites et lipides dues à la résistance de *P. aeruginosa* aux polymixines (peptides cycliques antimicrobiens). Cette étude a montré que la résistance aux polymixines était associée à une diminution globale des quantités de phospholipides produits par *P. aeruginosa.*

I.2.2.3 Utilisation du couplage (LC)-IMS-MS en lipidomique

L'utilisation du couplage mobilité ionique – spectrométrie de masse (IMS-MS) pour l'analyse lipidomique est récent et actuellement en plein essor, comme illustré par la **Figure 23**.

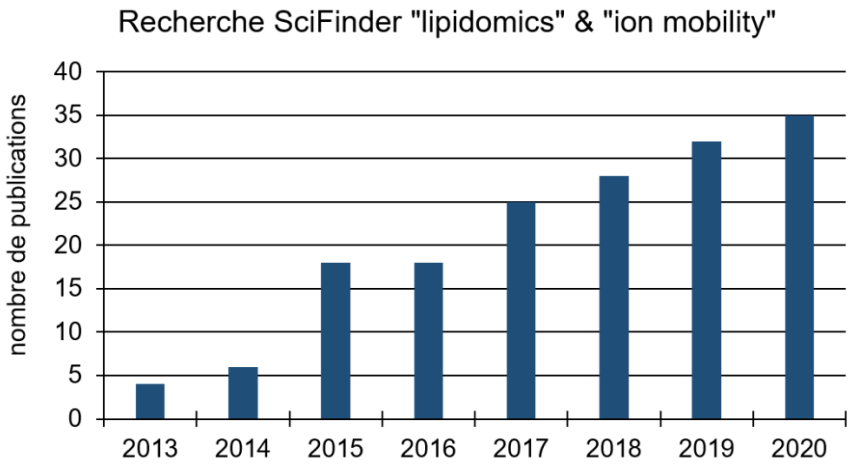


Figure 23 Nombre de publications ayant le sujet de recherche "lipidomics" ET "ion mobility" par années entre 2013 et 2020, données obtenues en utilisant SciFinder (Septembre 2020).

La majorité des publications traitant de l'analyse lipidomique par IMS-MS, avec ou sans couplage avec la chromatographie liquide, sont des articles de méthodologie et de développement analytique [71-75]. Cela montre que l'utilisation de cette technique, en lipidomique, n'est pas aussi courante que ne l'est le couplage LC-MS. Cela est dû au fait que les instruments hydrides IMS-MS sont assez récents (premier instrument commercialisé en 2006).

Contrairement au temps de rétentions (t_R), obtenus par chromatographie, les CCS, obtenues par mobilité ionique, sont prédictibles et reproductibles entre les différentes technologies d'instruments. Pour ces deux raisons, il y a depuis quelques années un véritable engouement, menant à des initiatives à l'échelle mondiale, pour développer des méthodes et bases de données permettant l'identification des lipides par les CCS.

Le laboratoire « Zhu lab » développe très régulièrement de nouveaux outils d'identification des métabolites et des lipides à partir de leur CCS et de leur *m/z*, depuis 2016 avec la publication de l'outil « MetCCS » (http://www.zhulab.cn/MetCCS/) [76]. Ces outils sont basés sur des mesures expérimentales par *drift-tube*, des algorithmes de prédiction et du *machine learning*. L'outil « LipidCCS » (http://www.zhulab.cn/LipidCCS/), publié en 2017, permet la prédiction de CCS de lipides à partir de leur structure SMILES, ainsi que la recherche dans la base de données et l'identification des lipides par CCS, en complément du *m/z [77]*. L'outil « LipidIMMS » (http://imms.zhulab.cn/LipidIMMS/), publié en 2019, permet l'identification automatique des lipides à partir de données LC-IMS-MS(/MS) expérimentales [21]. Enfin, le dernier outil « AllCCS » (http://allccs.zhulab.cn/), publié en 2020, est une amélioration du « LipidCCS » permettant la prédiction pour une grande diversité de petites molécules. Il est basé sur du *machine learning* réalisé à partir de 3539 valeurs de CCS expérimentales et contient environ 12 000 000 valeurs de CCS prédites [22].

Bien que n'étant pas centrée sur les lipides, la base de données à échelle mondiale, lancée en 2018, « Unified CCS Compendium » (https://mcleanresearchgroup.shinyapps.io/ CCS-Compendium/), est particulièrement remarquable [23]. Cette base de données est un répertoire de plus de 3800 valeurs de CCS d'étalons acquises expérimentalement par *drift-tube* (dont 2617 par méta-analyse). Le compendium comprend 14 super classes chimiques structurales (illustrées par la **Figure 24**), dont 80 classes chimiques et 157 sous-classes.

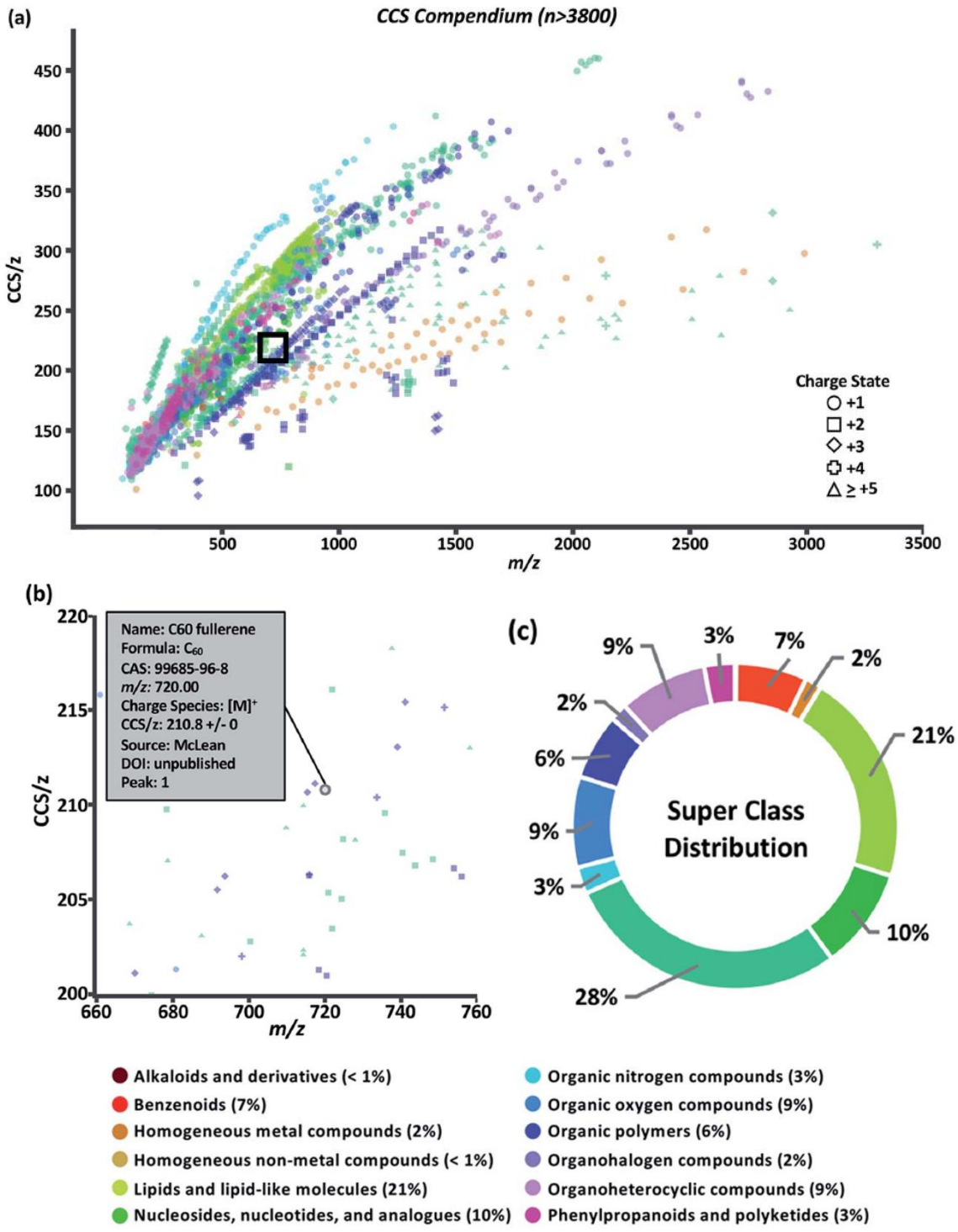


Figure 24 Interface du compendium (https://mcleanresearchgroup.shinyapps.io/CCS-Compendium/) (a) décrit les points de données mesurés classés en super classes indiquées dans la légende ci-dessus. Une version agrandie de la zone à l'intérieur de la boîte noire est présentée au point (b) pour illustrer comment chaque point de données révèle une boîte d'information dans le compendium en ligne. (c) Distribution des composés dans les 14 super classes structurelles. Figure 2 tirée de Picache *et al.* (2019) [23]

A partir de cet ensemble de données, des régressions mathématiques et statistiques prédictives ont été réalisées pour décrire des corrélations *m/z*-CCS pour chaque classe chimique. Ces régressions peuvent être utilisées pour aider l'identification d'inconnus obtenus par analyse métabolomique (et lipidomique [78]).

Concernant *P. aeruginosa*, l'article 1 de cette thèse est la première et, actuellement, la seule publication traitant de l'analyse des lipides de *P. aeruginosa* par IMS-MS. De manière générale, peu d'études de lipidomique bactérienne ont été réalisées par IMS-MS : étude des modifications lipidiques chez des bactéries gram-positives résistantes à la daptomycine [74], altération des lipides produits par des souches de *Escherichia coli* mutées pour avoir des défauts de production de phospholipides [79] et étude du lien entre la résistance de souches multirésistantes de *Staphylococcus aureus* à des peptides antimicrobiens et les quantités de phosphatidylglycérols (diminution des PG avec des chaînes d'acides gras courtes liée à l'augmentation de la résistance) [80].

I.2.3 Outils de bioinformatique

Comme décrit précédemment, les analyses « omiques » non-ciblées engendrent des quantités massives de données (milliers de variables). Afin de réduire le temps d'interprétation des données et de diminuer les biais de confirmation, ces données sont traitées par des outils informatiques de tri et de visualisation des données.

Pour cela, les données doivent être mises sous la forme d'une matrice. En raison de la variabilité biologique (entre les échantillons d'un même groupe) et de la disparité de concentration élevée entre les différentes espèces lipidiques, la matrice de données ne peut pas être utilisée telle quelle. Plusieurs étapes de normalisation sont nécessaires [81]. L'obtention et la normalisation de la base de données seront décrites de manière globale dans la partie suivante. Le détail des étapes avec la plateforme Workflow4Metabolomics (W4M, https://workflow4metabolomics.usegalaxy.fr/) [82] sera décrit dans le chapitre II (II.3.4).

I.2.3.1 Création d'une matrice de données et normalisation

Les tests statistiques ne peuvent être réalisés que sur des matrices de données (**Figure 25**). Elles contiennent les intensités des variables (en lignes, ici il s'agit des ions identifiés par leur couple *m/z*-t_R, aussi nommé *feature*) pour chaque échantillon (en colonnes).

Pour obtenir une matrice de données, plusieurs étapes sont nécessaires (**Figure 25**). Différents logiciels libres ou commerciaux permettent de réaliser ces étapes. Parmi ces logiciels, MZmine [83], XCMS [84] (utilisé par le W4M) et R sont les plus utilisés.

Généralement les étapes sont : 1) détection des pics (extraction des *m/z*, tracé des chromatogrammes d'ions extraits, filtration du bruit de fond et intégration des pics chromatographiques), 2) appariement des pics chromatographiques entres les échantillons, 3) alignement des temps de rétention (correction de la déviation analytique), 4) recherche des valeurs manquantes et 5) création d'une matrice de données. A chacune de ces étapes, l'utilisateur doit adapter les paramètres automatiques : certains sont dépendants de l'instrument (largeur à mi-hauteur moyenne des pics chromatographiques, précision de mesure du spectromètre de masse…) et d'autres dépendants de l'expérience (signal sur bruit, temps de l'acquisition, gamme de *m/z*…).

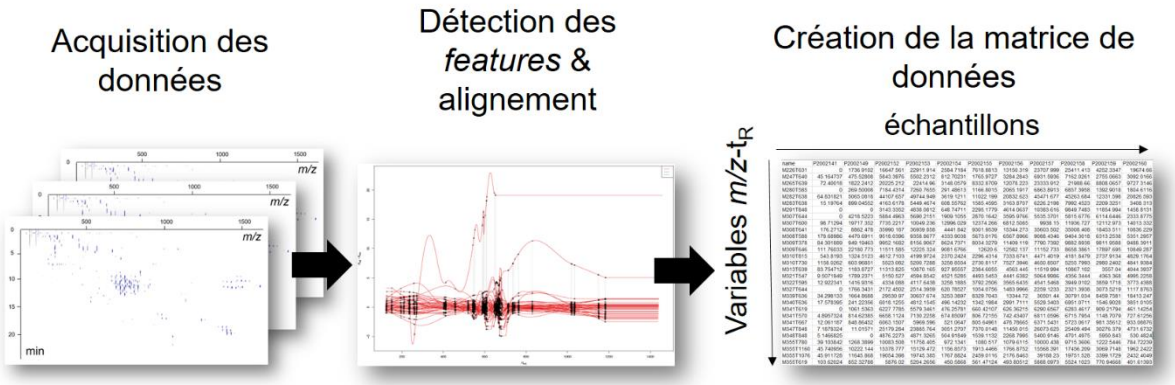


Figure 25 Représentation simplifiée des étapes nécessaires pour l'obtention de la matrice de données : i) acquisition des données LC-MS, ii) détection automatique des couples *m/z*-t_R (*features*) puis alignement des t_R et des *m/z*, iii) obtention d'une table de valeurs d'intensités des variables *m/z*-t_R (lignes) pour chaque échantillon (colonnes).

Plusieurs étapes de filtration et normalisation sont réalisées ensuite afin d'obtenir des analyses statistiques plus pertinentes. Ces étapes permettent de créer une matrice de données comprenant uniquement les variables de l'échantillon (filtration des contaminants) et dont les intensités ont été corrigée de la dérive analytique. En effet, dans le cas de données présentant un faible rapport signal/bruit (contenant donc beaucoup de variables aléatoires), les outils statistiques ne permettront pas de mettre en valeur les différences significatives entre les différents groupes d'échantillons.

Une première filtration peut être effectuée en retirant les ions présents dans le blanc. L'étape suivante, qui est indispensable, consiste en la correction de la déviation analytique au cours du temps. Cette étape permet de corriger la baisse d'intensité souvent observée lors de longues acquisitions. Pour cela, les contrôles qualité (QC), régulièrement injectés lors de l'expérience, sont utilisés comme références. Ensuite, à la place ou en complément de la filtration des ions du blanc, un tri des ions dont le coefficient de variation est supérieur à 30 % (CV(QC)>30%) peut être effectué. En effet, une variation trop importante peut être caractéristique de phénomènes aléatoires. Enfin, puisque les disparités de concentration peuvent être très élevées entre les différents lipides, une étape de normalisation est réalisée (le plus souvent sur l'intensité totale). Dans certains cas, la transformation de la matrice de données (ex : log10) peut être nécessaire afin de faire ressortir les variations les plus infimes.

I.2.3.2 Analyses univariées

Les tests univariés traitent chaque variable de manière indépendante pour l'ensemble des échantillons [85]. Pour cela, les intensités des variables dans chaque échantillon sont utilisées pour comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons et la distribution de la probabilité (variance). Ces tests permettent de savoir si la réponse (ici l'intensité) de chaque métabolite est significativement différente entre les deux groupes par le biais de la *p-value*. Dans le cas d'études biologiques, le seuil communément admis est 0,05, c'est-à-dire que les groupes pourront être considérés significativement différents pour une *p-value* inférieure à 0,05.

Les données peuvent être représentées par des boîtes à moustaches (ou *boxplot*) représentant la variation de l'intensité normalisée d'une variable selon chaque groupe d'échantillons (**Figure 26**).

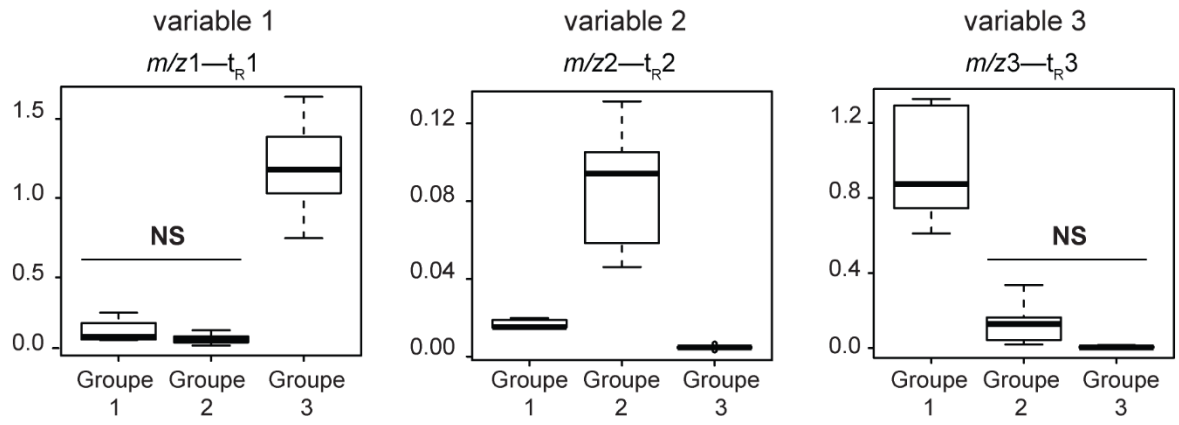


Figure 26 Exemple de boîtes à moustaches obtenues après une analyse univariée. Les résultats des tests ont été représentés pour trois variables significativement plus intense dans le groupe 3, 2 ou 1. ordonnée : intensité normalisée. NS : différences non significatives (*p-value* > 0,05). Lorsqu'elle n'est pas mentionnée, la *p-value* est inférieure à 0,05 (différences significatives).

Les tests peuvent être paramétriques (T-test, Weslch-Test, ANOVA…) ou non paramétriques (Mann-Withney-Wilcoxon, Kruskal-Wallis…). Le choix entre tests paramétriques et non paramétriques se fait en fonction de la taille de la population étudiée et de la tendance de la distribution du métabolite étudié au sein des différents groupes à se rapprocher d'une loi normale. Les deux tests les plus couramment utilisés sont le T-test (comparaison de deux groupes) et ANOVA (*analysis of variance*, comparaison de plus de deux groupes). Ces tests peuvent être biaisés par la présence d'échantillons aberrants (*outliers*). De fait, avant d'effectuer un test univarié, il est recommandé de réaliser une analyse en composante principale (PCA, voir I.2.3.3.1) afin de les déterminer et les retirer du jeu de données.

I.2.3.3 Analyses multivariées

Les approches multivariées prennent en compte la corrélation et la dépendance entre les métabolites et sont plus robustes pour les grands ensembles de données contenant beaucoup de bruit (variables aléatoires), en particulier si la taille de l'échantillon est importante [86]. Ces méthodes permettent de condenser l'information contenue dans un jeu de données de grande taille (analyses en composantes principales), de classer les individus selon leur profil (méthodes de classification), ou de modéliser une relation linéaire entre un jeu de données et une ou plusieurs variables qualitatives (modèles de régression). Les deux méthodes les plus fréquemment utilisées seront décrites par la suite, mais il existe d'autres méthodes : classification hiérarchique, *orthogonal projection to latent - structure discriminant analysis* (OPLS-DA) [87]…

I.2.3.3.1 Analyse en composante principale (PCA) [88]

L'Analyse en Composantes Principales (PCA) est une analyse multivariée non supervisée. Elle permet de résumer l'information contenue dans un jeu de données quantitatives sans *a priori* (c'est-à-dire sans variable descriptive). Elle permet de représenter graphiquement au mieux la variabilité des individus d'un ensemble de données. Sur une PCA, les échantillons sont représentés par des points sur un graphique avec en abscisse la composante principale 1 (PC1) et en ordonnée la composante principale 2 (PC2) (**Figure 27**).

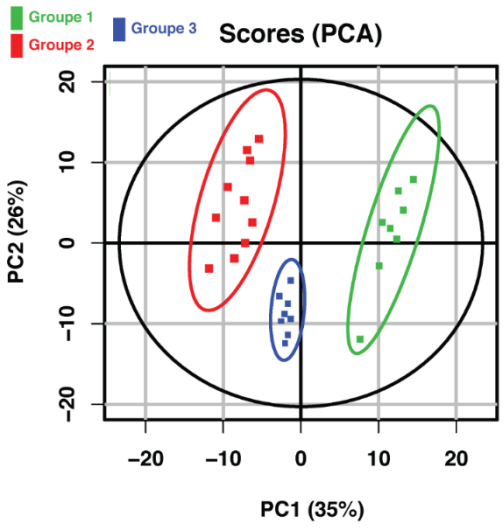


Figure 27 Exemple de graphique obtenu à partir d'une PCA.

A partir de la matrice de données, l'algorithme PCA calcule de nouvelles variables appelées composantes principales (PC) qui sont des combinaisons linéaires des variables originelles. La PC1 doit présenter la plus grande variance (distribution de la probabilité) possible. La PC2 est calculée sous la contrainte d'être orthogonale à la PC1 et de présenter la plus grande variance possible. D'autres composantes sont calculées de la même manière jusqu'à représenter 100% de la variance. Le pourcentage PC1 et PC2 (**Figure 27**) correspond à la variabilité représentée par la PC correspondante.

Les valeurs de ces nouvelles variables pour les observations sont appelées scores factoriels. Les scores factoriels (échelles abscisses et ordonnées de la **Figure 27**) peuvent être interprétés géométriquement comme les projections des observations sur les composantes principales.

I.2.3.3.2 Régression des moindres carrés partiels – analyse discriminante (*partial least squares – discriminant analysis*, PLS-DA)

Si la PCA permet de résumer les informations de la matrice de données et la classification des échantillons (selon les scores factoriels) de manière non biaisée, elle ne permet pas la prédiction de l'appartenance des échantillons à un groupe. Pour réaliser cela, des variables descriptives doivent être prises en compte dans les analyses multivariées, ces méthodes sont alors dites supervisées. Souvent les variables descriptives sont des variables qualitatives (obtention d'une classification), mais elles peuvent aussi être quantitatives (obtention d'une régression). La méthode d'analyse multivariée supervisée la plus utilisée est la PLS-DA (*partial least squares – discriminant analysis*).

Le fonctionnement de la PLS-DA est représenté par la **Figure 28**.

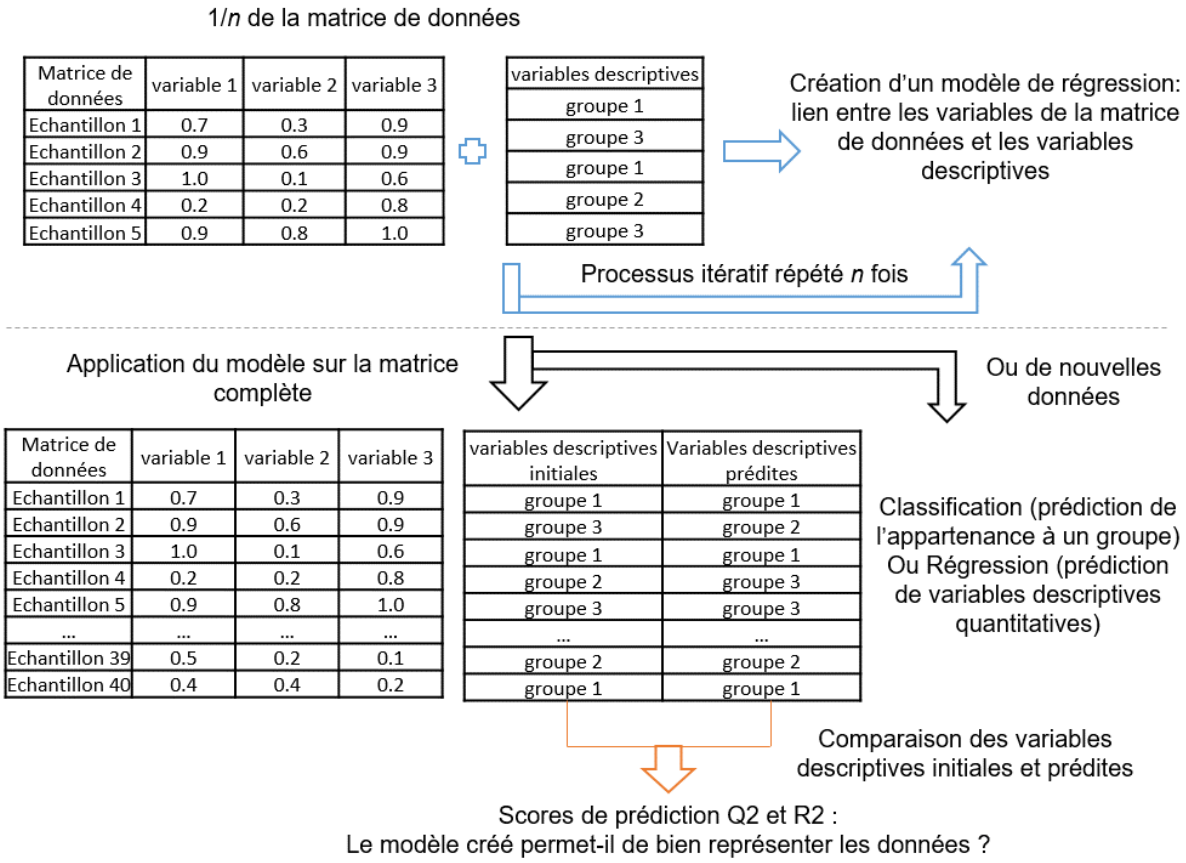


Figure 28 Représentation simplifiée du fonctionnement d'un algorithme de PLS-DA.

Dans un premier temps, une partie de la matrice de données (ou une matrice de données test) avec les variables descriptives correspondantes (définies par l'utilisateur) sont utilisées pour créer un modèle de régression. Ce modèle est construit en regroupant les composantes qui varient en fonction des variables descriptives définies par l'utilisateur. Ces composantes sont nommées variables latentes. Par un processus itératif, l'ensemble de la matrice de données est traité afin de créer un modèle de régression général.

Dans un second temps, ce modèle de régression est appliqué à la matrice de données complète pour prédire de nouvelles variables descriptives. La comparaison des variables descriptives initiales et de celles prédites par l'algorithme permet de rendre compte de la pertinence du modèle, qui est représentée par les valeurs de Q2 (prédictibilité du modèle comparativement aux données originales) et R2 (proportion des données expliquée par le modèle) [81]. Plus ces valeurs se rapprochent de 1 et plus le modèle permet de bien représenter les données.

Cependant, il n'y a pas de consensus sur des valeurs de Q2 et R2 représentatives ou non d'un bon modèle PLS(-DA). Selon la littérature, Henseler *et al.* (2010) [89] ont décrit qu'une valeur de Q2 > 0.67 représentait un bon modèle alors que Westerhuis *et al*. (2010) [90] ont décrit qu'une valeur Q2 > 0.5 était acceptable pour une analyse biologique.

RÉFÉRENCES CHAPITRE I.2

1. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev 26 (1):51-78. doi:10.1002/mas.20108

2. Manzoni C, Kia DA, Vandrovcova J, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, Ferrari R (2018) Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. Brief Bioinformatics 19 (2):286-302. doi:10.1093/bib/bbw114

3. Medicine Io (2012) Omics-Based Clinical Discovery: Science, Technology, and Applications. In: Micheel CM, Nass SJ, Omenn GS (eds) Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward. The National Academies Press, Washington, DC, p 354. doi:doi:10.17226/13297

4. Johnson CH, Ivanisevic J, Benton HP, Siuzdak G (2015) Bioinformatics: the next frontier of metabolomics. Anal Chem 87 (1):147-156. doi:10.1021/ac5040693

5. van Meer G, Leeflang BR, Liebisch G, Schmitz G, Goñi FM (2007) The European Lipidomics Initiative: Enabling Technologies. In: Methods in Enzymology, vol 432. Academic Press, pp 213-232. doi:https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)32009-0

6. Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L (2009) From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. Trends Analyt Chem 28 (4):393-403. doi:10.1016/j.trac.2008.12.004

7. Wenk MR (2005) The emerging field of lipidomics. Nat Rev Drug Discov 4 (7):594-610. doi:10.1038/nrd1776

8. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Jr., Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA (2005) A comprehensive classification system for lipids. J Lipid Res 46 (5):839-861. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200

9. Zullig T, Trotzmuller M, Kofeler HC (2019) Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. Anal Bioanal Chem. doi:10.1007/s00216-019-02241-y

10. Tumanov S, Kamphorst JJ (2017) Recent advances in expanding the coverage of the lipidome. Curr Opin Biotechnol 43:127-133. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.008

11. Takeda H, Izumi Y, Takahashi M, Paxton T, Tamura S, Koike T, Yu Y, Kato N, Nagase K, Shiomi M, Bamba T (2018) Widely-targeted quantitative lipidomics method by supercritical fluid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. J Lipid Res 59 (7):1283-1293. doi:10.1194/jlr.D083014

12. Touboul D, Brunelle A, Laprévote O (2011) Mass spectrometry imaging: Towards a lipid microscope? Biochimie 93 (1):113-119. doi:10.1016/j.biochi.2010.05.013

13. Ridenour WB, Kliman M, McLean JA, Caprioli RM (2010) Structural characterization of phospholipids and peptides directly from tissue sections by MALDI traveling-wave ion mobility-mass spectrometry. Anal Chem 82 (5):1881-1889. doi:10.1021/ac9026115

14. Zemski Berry KA, Murphy RC, Kosmider B, Mason RJ (2017) Lipidomic characterization and localization of phospholipids in the human lung. J Lipid Res 58 (5):926-933. doi:10.1194/jlr.M074955

15. Davenport PW, Griffin JL, Welch M (2015) Quorum Sensing Is Accompanied by Global Metabolic Changes in the Opportunistic Human Pathogen Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 197 (12):2072-2082. doi:10.1128/JB.02557-14

16. Kopczynski D, Coman C, Zahedi RP, Lorenz K, Sickmann A, Ahrends R (2017) Multi-OMICS: a critical technical perspective on integrative lipidomics approaches. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids 1862 (8):808-811. doi:10.1016/j.bbalip.2017.02.003

17. Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S (2007) LIPID MAPS online tools for lipid research. Nucleic Acids Res 35 (Web Server issue):W606-612. doi:10.1093/nar/gkm324

18. Kind T, Liu K-H, Lee DY, DeFelice B, Meissen JK, Fiehn O (2013) LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. Nat Methods 10 (8):755-758. doi:10.1038/nmeth.2551

19. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database. Ther Drug Monit 27 (6):747-751. doi:10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39

20. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res 35 (Database issue):D521-526. doi:10.1093/nar/gkl923

21. Zhou Z, Shen X, Chen X, Tu J, Xiong X, Zhu Z-J (2019) LipidIMMS Analyzer: integrating multi-dimensional information to support lipid identification in ion mobility—mass spectrometry based lipidomics. Bioinformatics 35 (4):698-700. doi:10.1093/bioinformatics/bty661

22. Zhou Z, Luo M, Chen X, Yin Y, Xiong X, Wang R, Zhu Z-J (2020) Ion mobility collision cross-section atlas for known and unknown metabolite annotation in untargeted metabolomics. Nat Commun 11 (1):4334. doi:10.1038/s41467-020-18171-8

23. Picache JA, Rose BS, Balinski A, Leaptrot KL, Sherrod SD, May JC, McLean JA (2019) Collision cross section compendium to annotate and predict multi-omic compound identities. Chem Sci 10 (4):983-993. doi:10.1039/c8sc04396e

24. Appala K, Bimpeh K, Freeman C, Hines KM (2020) Recent applications of mass spectrometry in bacterial lipidomics. Anal Bioanal Chem 412 (24):5935-5943. doi:10.1007/s00216-020-02541-8

25. Rezanka T, Kolouchova I, Gharwalova L, Palyzova A, Sigler K (2018) Lipidomic Analysis: From Archaea to Mammals. Lipids 53 (1):5-25. doi:10.1002/lipd.12001

26. Ryu SY, Wendt GA, Chandler CE, Ernst RK, Goodlett DR (2019) Model-Based Spectral Library Approach for Bacterial Identification via Membrane Glycolipids. Anal Chem 91 (17):11482-11487. doi:10.1021/acs.analchem.9b03340

27. Mazzeo JR, Neue UD, Kele M, Plumb RS (2005) Advancing LC Performance with Smaller Particles and Higher Pressure. Anal Chem 77 (23):460 A-467 A. doi:10.1021/ac053516f

28. Veuthey J-L (2020) Chromatographie en phase liquide Introduction. Tech Ing (ref. article : p1454)

29. Cajka T, Fiehn O (2014) Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. Trends in analytical chemistry : TRAC 61:192-206. doi:10.1016/j.trac.2014.04.017

30. Lange M, Ni Z, Criscuolo A, Fedorova M (2018) Liquid Chromatography Techniques in Lipidomics Research. Chromatographia 82 (1):77-100. doi:10.1007/s10337-018-3656-4

31. Bird SS, Marur VR, Sniatynski MJ, Greenberg HK, Kristal BS (2011) Lipidomics profiling by high-resolution LC-MS and high-energy collisional dissociation fragmentation: focus on characterization of mitochondrial cardiolipins and monolysocardiolipins. Anal Chem 83 (3):940-949. doi:10.1021/ac102598u

32. Paglia G, Astarita G (2017) Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility mass spectrometry. Nature Protocols 12 (4)

33. Damen CW, Isaac G, Langridge J, Hankemeier T, Vreeken RJ (2014) Enhanced lipid isomer separation in human plasma using reversed-phase UPLC with ion-mobility/high-resolution MS detection. J Lipid Res 55 (8):1772-1783. doi:10.1194/jlr.D047795

34. Sommer U, Herscovitz H, Welty FK, Costello CE (2006) LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. J Lipid Res 47 (4):804-814. doi:10.1194/jlr.M500506-JLR200

35. Sokol E, Almeida R, Hannibal-Bach HK, Kotowska D, Vogt J, Baumgart J, Kristiansen K, Nitsch R, Knudsen J, Ejsing CS (2013) Profiling of lipid species by normal-phase liquid chromatography, nanoelectrospray ionization, and ion trap–orbitrap mass spectrometry. Anal Biochem 443 (1):88-96. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.08.020

36. Holčapek M, Cífková E, Červená B, Lísa M, Vostálová J, Galuszka J (2015) Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1377:85-91. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.023

37. Gama MR, da Costa Silva RG, Collins CH, Bottoli CBG (2012) Hydrophilic interaction chromatography. Trends Analyt Chem 37:48-60. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.009

38. Cifkova E, Holcapek M, Lisa M, Ovcacikova M, Lycka A, Lynen F, Sandra P (2012) Nontargeted quantitation of lipid classes using hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry with single internal standard and response factor approach. Anal Chem 84 (22):10064-10070. doi:10.1021/ac3024476

39. Bure C, Ayciriex S, Testet E, Schmitter JM (2013) A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics. Anal Bioanal Chem 405 (1):203-213. doi:10.1007/s00216-012-6466-9

40. Wang S, Li J, Shi X, Qiao L, Lu X, Xu G (2013) A novel stop-flow two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry method for lipid analysis. Journal of Chromatography A 1321:65-72. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.069

41. Dass C (2007) Mass Analysis and Ion Detection. In: Dass C (ed) Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Wiley, pp 67-117. doi:10.1002/9780470118498.ch3

42. Gross JH (2011) Instrumentation. In: Gross JH (ed) Mass Spectrometry: A Textbook. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 117-221. doi:10.1007/978-3-642-10711-5_4

43. Banerjee S, Mazumdar S (2012) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. Int J Anal Chem 2012:282574. doi:10.1155/2012/282574

44. Le Senechal C, Crouzet M, Costaglioli P, Barthe C, Bure C, Vilain S (2019) Phospholipid Content of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Is Modulated by the Growth Phase Rather Than the Immobilization State. Lipids 54 (9):519-529. doi:10.1002/lipd.12184

45. Pulfer M, Murphy RC (2003) Electrospray mass spectrometry of phospholipids. Mass Spectrom Rev 22 (5):332-364. doi:10.1002/mas.10061

46. Gathungu RM, Larrea P, Sniatynski MJ, Marur VR, Bowden JA, Koelmel JP, Starke-Reed P, Hubbard VS, Kristal BS (2018) Optimization of Electrospray Ionization Source Parameters for Lipidomics To Reduce Misannotation of In-Source Fragments as Precursor Ions. Anal Chem 90 (22):13523-13532. doi:10.1021/acs.analchem.8b03436

47. Awad H, Khamis MM, El-Aneed A (2015) Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. Appl Spectrosc Rev 50 (2):158-175. doi:10.1080/05704928.2014.954046

48. Byrdwell WC (2001) Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. Lipids 36 (4):327-346. doi:10.1007/s11745-001-0725-5

49. Byrdwell WC, Emken EA (1995) Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Lipids 30 (2):173-175. doi:10.1007/BF02538272

50. Menet M-C (2011) Principes de la spectrométrie de masse. Rev Francoph des Lab 2011 (437):41-53. doi:10.1016/s1773-035x(11)71211-4

51. Guilhaus M, Selby D, Mlynski V (2000) Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. Mass Spectrom Rev 19 (2):65-107. doi:10.1002/(sici)1098-2787(2000)19:2<65::aid-mas1>3.0.co;2-e

52. Ewing MA, Glover MS, Clemmer DE (2016) Hybrid ion mobility and mass spectrometry as a separation tool. J Chromatogr A 1439:3-25. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.080

53. Eiceman GA, Stone JA (2004) Ion mobility spectrometers in national defence. Anal Chem 76 (21):390a-397a. doi:10.1021/ac041665c

54. Cumeras R, Figueras E, Davis CE, Baumbach JI, Gracia I (2015) Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation. Analyst 140 (5):1376-1390. doi:10.1039/c4an01100g

55. Pringle SD, Giles K, Wildgoose JL, Williams JP, Slade SE, Thalassinos K, Bateman RH, Bowers MT, Scrivens JH (2007) An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. International Journal of Mass Spectrometry 261 (1):1-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijms.2006.07.021

56. Kalenius E, Groessl M, Rissanen K (2019) Ion mobility–mass spectrometry of supramolecular complexes and assemblies. Nat Rev Chem 3 (1):4-14. doi:10.1038/s41570-018-0062-2

57. Tejada-Casado C, Hernandez-Mesa M, Monteau F, Lara FJ, Olmo-Iruela MD, Garcia-Campana AM, Le Bizec B, Dervilly-Pinel G (2018) Collision cross section (CCS) as a complementary parameter to characterize human and veterinary drugs. Analytica chimica acta 1043:52-63. doi:10.1016/j.aca.2018.09.065

58. May JC, Morris CB, McLean JA (2017) Ion Mobility Collision Cross Section Compendium. Anal Chem 89 (2):1032-1044. doi:10.1021/acs.analchem.6b04905

59. Gabelica V, Marklund E (2018) Fundamentals of ion mobility spectrometry. Curr Opin Chem Biol 42:51-59. doi:10.1016/j.cbpa.2017.10.022

60. Plante PL, Francovic-Fontaine E, May JC, McLean JA, Baker ES, Laviolette F, Marchand M, Corbeil J (2019) Predicting Ion Mobility Collision Cross-Sections Using a Deep Neural Network: DeepCCS. Anal Chem 91 (8):5191-5199. doi:10.1021/acs.analchem.8b05821

61. Han ML, Zhu Y, Creek DJ, Lin YW, Anderson D, Shen HH, Tsuji B, Gutu AD, Moskowitz SM, Velkov T, Li J (2018) Alterations of Metabolic and Lipid Profiles in Polymyxin-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 62 (6). doi:10.1128/AAC.02656-17

62. Řezanka T, Matoulková D, Benada O, Sigler K (2015) Lipidomics as an important key for the identification of beer-spoilage bacteria. Lett Appl Microbiol 60 (6):536-543. doi:10.1111/lam.12415

63. Gilbert-López B, Valdés A, Acunha T, García-Cañas V, Simó C, Cifuentes A (2017) Chapter 10 - Foodomics: LC and LC-MS-based omics strategies in food science and nutrition. In: Fanali S, Haddad PR, Poole CF, Riekkola M-L (eds) Liquid Chromatography (Second Edition). Elsevier, pp 267-299. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805392-8.00010-4

64. Yang K, Han X (2016) Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. Trends Biochem Sci 41 (11):954-969. doi:10.1016/j.tibs.2016.08.010

65. Proitsi P, Kim M, Whiley L, Pritchard M, Leung R, Soininen H, Kloszewska I, Mecocci P, Tsolaki M, Vellas B, Sham P, Lovestone S, Powell JF, Dobson RJB, Legido-Quigley C (2015) Plasma lipidomics analysis finds long chain cholesteryl esters to be associated with Alzheimer's disease. Transl Psychiatry 5 (1):e494-e494. doi:10.1038/tp.2014.127

66. Chen X, Chen H, Dai M, Ai J, Li Y, Mahon B, Dai S, Deng Y (2016) Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. Oncotarget 7 (24):36622-36631. doi:10.18632/oncotarget.9124

67. Lam SM, Tong L, Reux B, Duan X, Petznick A, Yong SS, Khee CBS, Lear MJ, Wenk MR, Shui G (2014) Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome. J Lipid Res 55 (2):299-306. doi:10.1194/jlr.P041780

68. Magny R, Auzeil N, Olivier E, Kessal K, Regazzetti A, Dutot M, Mélik-Parsadaniantz S, Rat P, Baudouin C, Laprévote O, Brignole-Baudouin F (2020) Lipidomic analysis of human corneal epithelial cells exposed to ocular irritants highlights the role of phospholipid and sphingolipid metabolisms in detergent toxicity mechanisms. Biochimie. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.015

69. Dehairs J, Derua R, Rueda-Rincon N, Swinnen JV (2015) Lipidomics in drug development. Drug Discov Today Technol 13:33-38. doi:10.1016/j.ddtec.2015.03.002

70. Okazaki Y, Kamide Y, Hirai MY, Saito K (2013) Plant lipidomics based on hydrophilic interaction chromatography coupled to ion trap time-of-flight mass spectrometry. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society 9 (1):121-131. doi:10.1007/s11306-011-0318-z

71. Paglia G, Angel P, Williams JP, Richardson K, Olivos HJ, Thompson JW, Menikarachchi L, Lai S, Walsh C, Moseley A, Plumb RS, Grant DF, Palsson BO, Langridge J, Geromanos S, Astarita G (2015) Ion mobility-derived collision cross section as an additional measure for lipid fingerprinting and identification. Anal Chem 87 (2):1137-1144. doi:10.1021/ac503715v

72. Paglia G, Kliman M, Claude E, Geromanos S, Astarita G (2015) Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis. Anal Bioanal Chem 407 (17):4995-5007. doi:10.1007/s00216-015-8664-8

73. Groessl M, Graf S, Knochenmuss R (2015) High resolution ion mobility-mass spectrometry for separation and identification of isomeric lipids. Analyst 140. doi:10.1039/x0xx00000x

74. Hines KM, May JC, McLean JA, Xu L (2016) Evaluation of Collision Cross Section Calibrants for Structural Analysis of Lipids by Traveling Wave Ion Mobility-Mass Spectrometry. Anal Chem 88 (14):7329-7336. doi:10.1021/acs.analchem.6b01728

75. Harris RA, Leaptrot KL, May JC, McLean JA (2019) New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. Trends Analyt Chem. doi:10.1016/j.trac.2019.03.031

76. Zhou Z, Shen X, Tu J, Zhu Z-J (2016) Large-Scale Prediction of Collision Cross-Section Values for Metabolites in Ion Mobility-Mass Spectrometry. Anal Chem 88 (22):11084-11091. doi:10.1021/acs.analchem.6b03091

77. Zhou Z, Tu J, Xiong X, Shen X, Zhu ZJ (2017) LipidCCS: Prediction of Collision Cross-Section Values for Lipids with High Precision To Support Ion Mobility-Mass Spectrometry-Based Lipidomics. Anal Chem 89 (17):9559-9566. doi:10.1021/acs.analchem.7b02625

78. Leaptrot KL, May JC, Dodds JN, McLean JA (2019) Ion mobility conformational lipid atlas for high confidence lipidomics. Nat Commun 10 (1):985. doi:10.1038/s41467-019-08897-5

79. Hines KM, Xu L (2019) Lipidomic consequences of phospholipid synthesis defects in Escherichia coli revealed by HILIC-ion mobility-mass spectrometry. Chem Phys Lipids 219:15-22. doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.01.007

80. Hines KM, Shen T, Ashford NK, Waalkes A, Penewit K, Holmes EA, McLean K, Salipante SJ, Werth BJ, Xu L (2019) Occurrence of cross-resistance and beta-lactam seesaw effect in glycopeptide, lipopeptide, and lipoglycopeptide-resistant MRSA correlates with membrane phosphatidylglycerol levels. bioRxiv:671438. doi:10.1101/671438

81. Worley B, Powers R (2013) Multivariate Analysis in Metabolomics. Curr Metabolomics 1 (1):92-107. doi:10.2174/2213235X11301010092

82. Giacomoni F, Le Corguille G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Petera M, Duperier C, Tremblay-Franco M, Martin JF, Jacob D, Goulitquer S, Thevenot EA, Caron C (2015) Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 31 (9):1493-1495. doi:10.1093/bioinformatics/btu813

83. Katajamaa M, Miettinen J, Oresic M (2006) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. Bioinformatics 22 (5):634-636. doi:10.1093/bioinformatics/btk039

84. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G (2006) XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. Anal Chem 78 (3):779-787. doi:10.1021/ac051437y

85. Saccenti E, Hoefsloot HCJ, Smilde AK, Westerhuis JA, Hendriks MMWB (2013) Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society 10 (3):361-374. doi:10.1007/s11306-013-0598-6

86. Checa A, Bedia C, Jaumot J (2015) Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. Analytica chimica acta 885:1-16. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.068

87. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ (2013) Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. Comput Struct Biotechnol J 4:e201301009. doi:10.5936/csbj.201301009

88. Abdi H, Williams LJ (2010) Principal component analysis. Wiley Interdiscip Rev Comput Stat 2 (4):433-459. doi:10.1002/wics.101

89. Henseler J, Fassott G (2010) Testing Moderating Effects in PLS Path Models: An Illustration of Available Procedures. In: Esposito Vinzi V, Chin WW, Henseler J, Wang H (eds) Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 713-735. doi:10.1007/978-3-540-32827-8_31

90. Westerhuis JA, van Velzen EJ, Hoefsloot HC, Smilde AK (2010) Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society 6 (1):119-128. doi:10.1007/s11306-009-0185-z

I.3 PROBLEMATIQUE, OBJECTIF ET PLAN

P. aeruginosa a été déclarée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme bactérie prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.

Afin de développer de nouveaux types d'antibiotiques, il est nécessaire que ceux-ci agissent sur de nouvelles cibles thérapeutiques, comme les lipides membranaires, moins susceptibles de conduire à l'acquisition d'un mécanisme de résistance par *P. aeruginosa*. En effet, les phospholipides composent une barrière de protection très efficace pour les bactéries à Gram-négatif telles que *P. aeruginosa*.

Pour avoir une meilleure connaissance de la membrane bactérienne de *P. aeruginosa,* ses lipides membranaires doivent être étudiés dans un contexte clinique. Or les études précédentes avaient été réalisées sur des souches de laboratoire cultivées dans des milieux de laboratoire. Ces souches peuvent avoir des génomes et des phénotypes très distincts des souches cliniques (isolées de patients) [1]. De plus, la composition de ces milieux de laboratoire est généralement trop éloignée de la composition du milieu originel des souches cliniques (ex : mucus pulmonaire pour les infections bronchiques).

Afin d'obtenir une description biologiquement pertinente de souches cliniques (utilisable pour le développement de nouveaux médicaments), l'étude devrait être réalisée sur un large panel de patients (minimum 100). Le traitement entièrement manuel de ce type de données n'est donc pas envisageable.

Pour cela, il est nécessaire d'utiliser les sciences « omiques », telles que la métabolomique ou la lipidomique, consistant à recueillir le maximum d'informations sur un échantillon biologique, puis à étudier ces données sans *a priori* à l'aide d'outils de bioinformatique. Cependant, bien que des études en génomique [1, 2], protéomique [3, 4] et métabolomique [5-7] aient été réalisées sur des souches cliniques de *P. aeruginosa*, il n'y a actuellement aucune étude lipidomique sur ce type de souches.

Bien que la lipidomique soit une sous-branche de la métabolomique, son développement a été bien plus récent. De fait, ses outils sont toujours en développement et leur utilisation n'est pas encore au stade de routine (à l'opposé des analyses génomiques par exemple).

Ainsi, avant de réaliser une étude des lipides de *P. aeruginosa* sur un large panel de patients, il convient de commencer par mettre au point une méthodologie d'analyse sur un nombre restreint de souches cliniques.

Puisque les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* sont très dangereuses et difficiles à traiter, notamment pour les patients atteints de la mucoviscidose (I.1.2.2), l'étude des lipides de souches cliniques, isolées de ce type de patients, est particulièrement pertinente dans le but de développer de nouveaux traitements contre *P. aeruginosa*.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de mettre au point une méthodologie permettant l'analyse méticuleuse des lipides de souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteint d'une infection pulmonaire chronique.

Le chapitre II détaillera le développement des méthodes utilisées lors de cette thèse. Ce chapitre a également pour objectif de montrer le processus de réflexion utilisé de la préparation de l'échantillon biologique au traitement et à l'interprétation des données.

Le chapitre III présentera deux études sur la souche de laboratoire *P. aeruginosa* PAK (fournie par le Dr. Lhousseine Touqui, Institut Pasteur, Paris, France) et le développement méthodologique associé (analytique pour la 1ère étude, biologique pour la 2nde).

Le chapitre IV sera dédié à l'étude de souches de *P. aeruginosa* isolées d'un patient atteint de la mucoviscidose et d'une infection pulmonaire chronique. Pour cela, nous avons obtenu du Dr. Philippe Morand (Hôpital Cochin, Paris, France) cinq isolats d'une même souche de *P. aeruginosa* (lien phylogénétique). Sur ces cinq isolats, trois ont été isolés en 2008 et deux en 2018.

REFERENCES CHAPITRE I.3

1. J.J. Varga, M. Barbier, X. Mulet, P. Bielecki, J.A. Bartell, J.P. Owings, I. Martinez-Ramos, L.E. Hittle, M.R. Davis, Jr., F.H. Damron, G.W. Liechti, J. Puchalka, V.A. dos Santos, R.K. Ernst, J.A. Papin, S. Alberti, A. Oliver, J.B. Goldberg, Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains, BMC genomics, 16 (2015) 883, doi :10.1186/s12864-015-2069-0

2. K. Hornischer, A. Khaledi, S. Pohl, M. Schniederjans, L. Pezoldt, F. Casilag, U. Muthukumarasamy, S. Bruchmann, J. Thoming, A. Kordes, S. Haussler, BACTOME-a reference database to explore the sequence- and gene expression-variation landscape of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, Nucleic Acids Res, 47 (2019) D716-D720, doi: 10.1093/nar/gky895

3. J. Erdmann, J.G. Thoming, S. Pohl, A. Pich, C. Lenz, S. Haussler, The Core Proteome of Biofilm-Grown Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates, Cells, 8 (2019), doi: 10.3390/cells8101129

4. J. Rao, F.H. Damron, M. Basler, A. Digiandomenico, N.E. Sherman, J.W. Fox, J.J. Mekalanos, J.B. Goldberg, Comparisons of Two Proteomic Analyses of Non-Mucoid and Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Cystic Fibrosis Patient, Frontiers in microbiology, 2 (2011) 162, doi: 10.3389/fmicb.2011.00162

5. V. Behrends, B. Ryall, J.E.A. Zlosnik, D.P. Speert, J.G. Bundy, H.D. Williams, Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections, Environ. Microbiol., 15 (2013) 398-408, doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02840.x

6. J. Kozlowska, D.W. Rivett, L.S. Vermeer, M.P. Carroll, K.D. Bruce, A.J. Mason, G.B. Rogers, A relationship between Pseudomonal growth behaviour and cystic fibrosis patient lung function identified in a metabolomic investigation, Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society, 9 (2013), doi: 10.1007/s11306-013-0538-5

7. O. Moyne, Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose, Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, Université de Grenoble Alpes, 2019.

CHAPITRE II DEVELOPPEMENT DES METHODES : DE LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON BIOLOGIQUE A L'ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET L'INTERPRETATION DES DONNEES

L'objectif de la thèse étant de comparer les lipides membranaires de souches de *P. aeruginosa* prélevées chez un patient atteint d'une infection pulmonaire chronique, une attention particulière a été portée sur la préparation des échantillons biologiques. Tout au long de cette thèse, les protocoles, le matériel, comme les matériaux (constituants d'un milieu de culture par exemple), ont été les sujets d'une réflexion continue et d'une remise en question permanente. Concernant l'analyse des lipides par spectrométrie de masse, la réflexion a été portée sur la préparation, l'acquisition, ainsi que le traitement des données.

Ce chapitre II décrit les protocoles utilisés tout en illustrant la réflexion portée sur leur développement.

II.1 PREPARATION DE L'ECHANTILLON BIOLOGIQUE

Le protocole de préparation de l'échantillon (**Figure 1**) a d'abord été mis au point sur la souche PAK avant d'être appliqué aux souches cliniques.

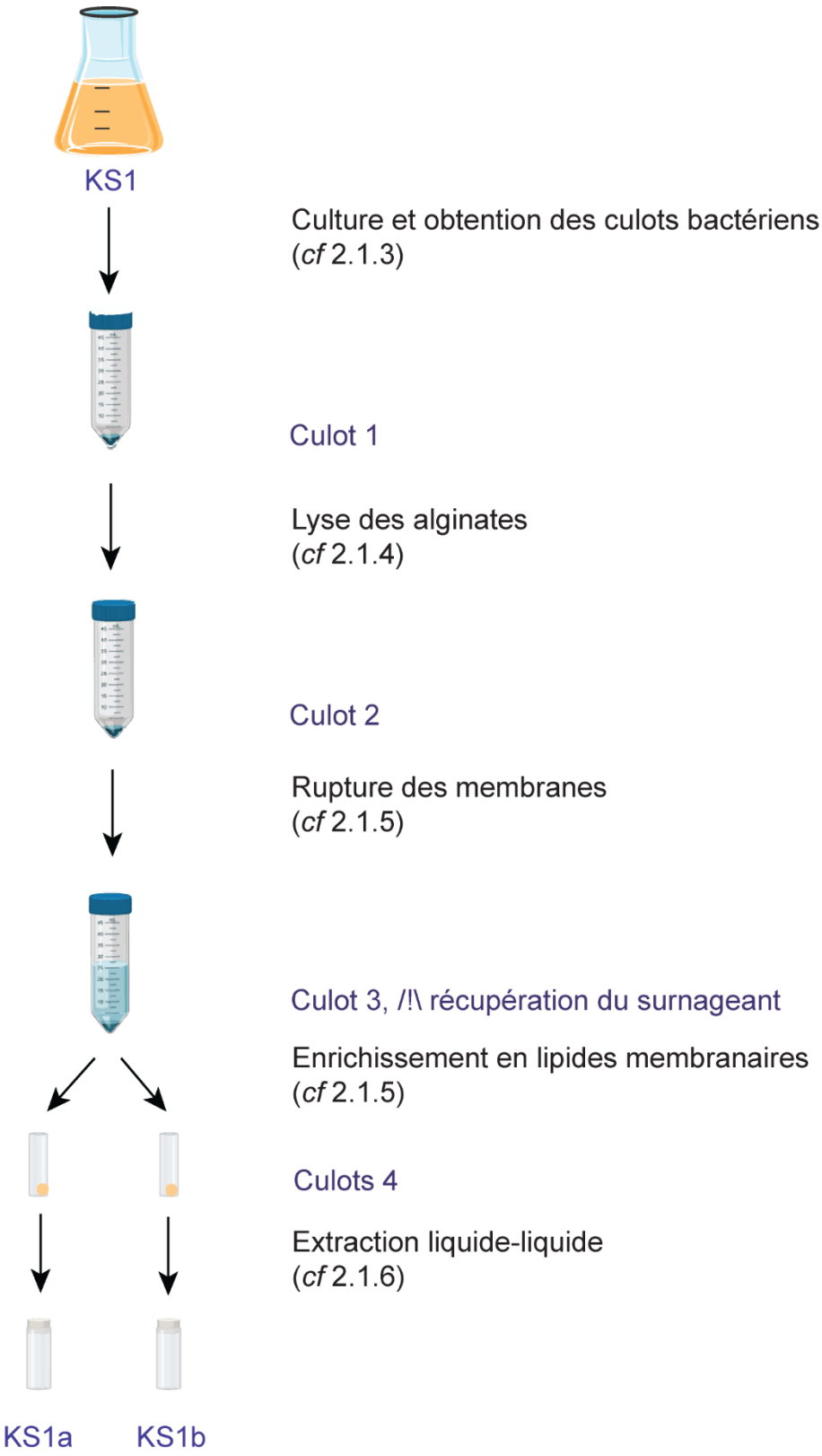


Figure 1 Résumé des étapes de la préparation de l'échantillon biologique. Un exemple de notation des échantillons est donné : souche ou isolat clinique (K, 08A,08B… pour PAK, PA08A, PA08B…), milieu de culture (M, S, SP, pour MHB, SCFM, SCFM-PC), n° du réplicat de culture en chiffres, n° du réplicat d'extraction avec a ou b.

II.1.1 Souches bactériennes utilisées

II.1.1.1 Souche de référence Pseudomonas aeruginosa PAK

La souche *P. aeruginosa* PAK, cultivée sur gélose Mueller-Hilton (MH) agar, a été fournie par le Dr Lhousseine Touqui (Institut Pasteur, Paris, France) à partir d'un isolat initialement obtenu auprès du Pr Eric Pearlman (CaseWestern Reserve University, Cleveland, OH, USA).

Pour constituer le souchier de PAK, cinq colonies bactériennes ont été prélevées puis mises en pré-culture puis culture, chacune séparément, dans du milieu MHB tel que décrit en II.1.3 (cultures dans 20mL dans des tubes à centrifugation). A partir de chaque culture, 5 aliquots sont prélevés et conservés dans du glycérol (30% pour un volume final de 1 ml), à -80°C.

II.1.1.2 Isolats cliniques

Une collection de 5 isolats de *Pseudomonas aeruginosa* a été obtenue à partir des expectorations d'un seul patient souffrant de mucoviscidose, recueillis à 10 ans d'intervalle. Trois isolats correspondant à des morphotypes phénotypiquement différents ont été obtenus à partir de la culture de routine d'un seul échantillon d'expectorations datant de 2008, et deux autres à partir d'un autre échantillon d'expectorations datant de 2018 (**Figure 2**). Le prélèvement et l'isolement de *P. aeruginosa*, ainsi que les tests phylogénétiques du lien entre les isolats (voir Annexe 1), a été réalisé au sein du Service de Bactériologie, AP-HP.Centre – Université de Paris, site Cochin.

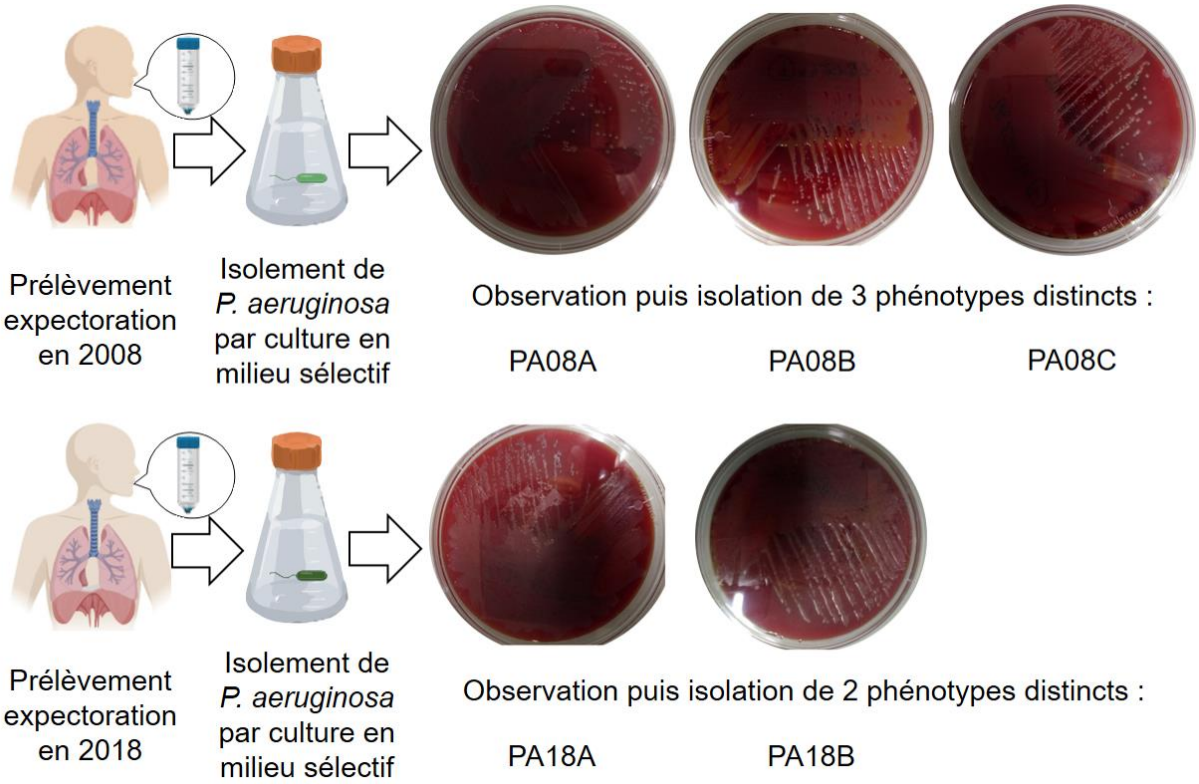


Figure 2 Schéma simplifié du prélèvement et de l'isolement de PA08A, PA08B, PA08C, PA18A et PA18B. Photographies : boîtes de pétri des 5 isolats après récupération des bactéries pour leur stockage à -80°C dans du glycérol/MHB (15%/85%).

Afin de minimiser les mutations (dues à l'adaptation aux conditions de laboratoire) du génome des souches cliniques, un protocole de prélèvement et conservation de ces souches a été mis en place, sensiblement différent de celui de la souche de référence, PAK.

Chaque isolat clinique a été obtenu sur boîte de Pétri. La totalité des bactéries qui se sont développées à la surface de la boîte est récupérée à l'aide d'anses, plongée dans 1 ml de mélange glycérol/MHB (15%/85%) puis conservée à –80°C. Une seule solution par isolat clinique est réalisée de cette façon, constituant ainsi le souchier des souches cliniques.

II.1.2 Préparation des milieux SCFM et SCFM-PC

Afin de reproduire le mucus pulmonaire de patients atteints de la muscoviscidose, nous avons dans un premier temps essayé de travailler avec le milieu Synthetic Cystic Fibrosis Medium (SCFM) développé par Palmer *et al.* [1].

Toutefois, de nombreux ajustements se sont avérés nécessaires. En effet, ce milieu est préparé à l'aide de solutions mères distinctes pour chacun de ses 32 composants et avec une stérilisation par filtration, ce qui s'avérait coûteux en temps et source possible d'erreurs. De manière à simplifier le protocole, le nombre de solutions mères a été réduit en mélangeant les acides aminés ou sels dans une même solution mère, quand cela était possible. Les concentrations ont été adaptées pour éviter les problèmes de solubilité. De plus, la stérilisation du milieu a été modifiée par un autoclavage au lieu d'une filtration.[1]

En étudiant les phospholipides de PAK cultivée dans le milieu SCFM, nous nous sommes aperçus que les PC n'étaient pas, ou très peu, produites par *P. aeruginosa* (voir article 2, Chapitre III.2.2). Or, nous savons que les PC sont produites par *P. aeruginosa* à partir d'une choline (et non pas à partir d'une PE) [2]. D'autre part, des PC sont présentes dans le mucus pulmonaire et pourraient donc servir comme source de choline. Par conséquent, nous avons décidé d'ajouter une PC dans le milieu SCFM. Pour cela, nous nous sommes inspirés du milieu SCFM 2 décrit par Turner *et al.* [3]; il s'agit du milieu SCFM auquel ont été ajoutés de l'ADN, de la mucine et de la 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC).

Il est à noter que nous avions déjà testé auparavant un autre milieu de culture contenant de la mucine et de l'ADN : le milieu Artificial Sputum Medium décrit par Kirschner *et al.* [4]. Cependant, la présence de ces deux derniers composés augmentait fortement la viscosité du milieu, rendant impossible la mesure de la densité optique (DO). De plus, plusieurs essais de courbes de croissance ont montré que PAK ne s'y développait pas de manière suffisante pour récupérer une quantité exploitable de bactéries. Pour ces raisons, nous avons décidé de ne pas utiliser le milieu SCFM 2 tel que, mais de l'accommoder pour qu'il puisse répondre à notre problématique, et l'avons nommé SCFM-PC (SCFM + DOPC). Ce dernier est donc semblable au milieu SCFM auquel a simplement été ajouté de la DOPC. Le protocole complet de préparation des milieux SCFM et SCFM-PC est donné en annexe du second article (Chapitre III.2.2).

[1] Le milieu SCFM, avant et après autoclavage, a été analysé par infusion ESI-MS. Aucune détérioration, due à l'autoclavage, n'a été observée. De plus, les courbes de croissances de la souche PAK, effectuées dans le milieu filtré ou autoclavé, ne montrent aucune influence du mode de stérilisation sur la croissance de *P. aeruginosa*. Cela a été démontré pour le second article (*cf* SI.1 de l'article 2, III.2.2).

II.1.3 Culture bactérienne et obtention des culots bactériens

Afin de pouvoir extraire une quantité exploitable de lipides membranaires, *P. aeruginosa* doit être cultivée dans un milieu nutritif. Etant stockée à -80 °C, une étape de pré-culture est nécessaire pour habituer la bactérie à ses conditions de culture. Il est important de noter que les isolats cliniques n'étant pas stockées de la même façon que la souche PAK (*cf* 2.1.1), la mise en pré-culture doit également être adaptée.

Pour PAK, la pré-culture se réalise de façon classique avec l'ajout de 20 µL de la solution mère bactérienne à 20 mL de milieu de culture (MHB ou SCFM) dans un tube à centrifuger de 50 mL.

Pour les isolats cliniques, un prélèvement d'environ 2 mm de diamètre est obtenu en grattant la solution mère, encore congelée, avec un ensemenceur de 1 µL, puis mélangé à 10 mL de milieu de culture (SCFM ou SCFM-PC) dans un tube à centrifuger de 50 mL.

Quelle que soit la souche ou l'isolat mise en pré-culture, les tubes sont ensuite mis à incuber à 37 °C pendant une nuit, sous agitation à 140 RPM, et à l'abri de la lumière. Parallèlement, un témoin ne contenant que le milieu de culture est incubé, dans les mêmes conditions, pour s'assurer que le milieu n'est pas contaminé.

Après une nuit, 330 mL de SCFM (ou SCFM-PC) sont ensemencés à partir de cette pré-culture à une concentration finale en bactéries de 10^6 unités formant colonies (UFC)/mL dans un erlenmeyer de 1L[2]. La culture est ensuite incubée (37 °C, 140 RPM, à l'abri de la lumière) jusqu'à l'obtention d'une concentration bactérienne d'environ $5x10^8$ UFC/mL pour PAK, ou $5x10^7$ pour les souches cliniques. Cette concentration correspond à un arrêt de la culture juste avant l'état stationnaire. Cela permet d'obtenir une quantité de bactéries suffisante pour l'extraction, tout en ayant peu de mort cellulaire. De plus, la quantité obtenue est reproductible d'un réplicat à l'autre puisque la croissance est arrêtée en fin de phase exponentielle.

[2] Grâce aux courbes de croissance réalisées pour l'ensemble des souches, il a été estimé que cette concentration est obtenue pour une mesure de Densité Optique (DO) de 0,001.

Afin de séparer les bactéries du milieu, les 330 mL de culture sont ensuite centrifugés (2600 × *g*, 10 min, 20 °C). Puis, le culot obtenu (culot 1, **Figure 1**) est lavé dans 10 mL d'une solution de tampon Tris 100 mM pH 8,0, et stocké à −20°C.

II.1.4 Lyse des alginates

Comparativement aux souches PAO1 et PA14, précédemment étudiées au laboratoire PBS, PAK est une souche produisant davantage d'alginates (polysaccharides permettant de structurer les biofilms) [5]. Nous avons observé que la présence accrue de ces polymères rendait plus difficile la récupération des différents culots obtenus lors de la préparation de l'échantillon. Par conséquent, le protocole existant au sein de l'équipe a dû être adapté par l'ajout d'une étape de lyse des alginates avant l'extraction des membranes.

Ainsi, le culot obtenu précédemment est décongelé et ramené à température ambiante, puis 10 mL de solution tampon phosphate salin (PBS) et 3 mg d'alginate lyase sont ajoutés. Après agitation pendant une heure, un culot (culot 2, **Figure 1**) est obtenu par centrifugation (5000 × *g*, 10 min, 20 °C), puis lavé dans 10 mL de Tris 100 mM pH 8,0, puis conservé à -20°C.

II.1.5 Rupture des membranes et enrichissement en lipides membranaires

Après décongélation et retour à température ambiante, le culot est mis en suspension dans 6 mL de Tris 100 mM pH 8.0, puis soumis à des cycles de sonication à l'aide d'une sonde de type conique (cycles de 30 s on / 10 s off pendant 2 min). La suspension est ensuite centrifugée (5200 × *g*, 20 min, 20 °C), afin de séparer le cytoplasme bactérien [principalement ADN et protéines, dans le culot (culot 3, **Figure 1**)], des membranes (principalement composées de lipides et solubilisées sous la forme de vésicules, dans le surnageant). Le surnageant est séparé en deux (deux fois 2,6 mL), puis subit une ultracentrifugation (70 000 × *g*, 1h, 4 °C) afin de sédimenter les vésicules lipidiques. Les deux culots obtenus (culots 4, **Figure 1**) seront ensuite pesés afin d'adapter les masses d'étalons dopées avant l'extraction liquide-liquide (voir II.1.6), puis congelés à -20 °C.

II.1.6 Extraction liquide-liquide

Le culot obtenu après ultracentrifugation ne contenant pas que des lipides (présence entre autres de protéines membranaires), une extraction liquide-liquide est nécessaire. Celle-ci a été adaptée à partir du protocole de Bligh and Dyer [6].

Ce protocole utilisant des solvants permettant l'extraction des plastifiants (méthanol et chloroforme), tout contenant en plastique est à proscrire. La verrerie doit donc être en verre et les bouchons en téflon. Avant de procéder à l'extraction, il convient de s'assurer de la propreté du matériel. La verrerie est nettoyée de la façon suivante (eau de qualité milli Q) :

1) Après utilisation de la verrerie, la stocker dans de l'eau en attendant le nettoyage,
2) Seulement pour les tubes de centrifugation en verre : remplir avec une solution de potasse alcoolique (10 pastilles de NaOH, 100 mL eau/éthanol, 50/50), laisser agir 5 minutes maximum puis rincer à l'eau,
3) Plonger la verrerie dans une solution d'octanoate de sodium (1 g/L), mettre 15 minutes au bain à ultrasons,
4) Rincer la verrerie à l'eau, puis la plonger dans de l'eau et mettre 15 minutes au bain à ultrasons, répéter cette étape deux fois,
5) Rincer au méthanol, puis faire sécher sous vide.

La solution de potasse alcoolique permet de désincruster les protéines du verre, mais peut fragiliser le verre, il ne faut donc pas laisser agir plus de 5 minutes. L'octanoate de sodium est un détergeant utilisé ici en solution concentrée, le double nettoyage à l'eau est donc nécessaire afin d'éviter la contamination des échantillons par celui-ci. Le séchage sous-vide permet de réduire la contamination par les acides gras de l'air ambiant.

Dans le but de comparer les extraits lipidiques de manière semi-quantitative, des étalons internes sont ajoutés avant l'extraction. Le protocole suivant a été adapté pour un culot de 20 mg obtenu après ultracentrifugation, les volumes de solvants et les masses des étalons ont été ajoutés proportionnellement à la masse du culot à extraire.

Après la décongélation du culot, celui-ci est repris dans 500 µL d'eau milli-Q. La solution est transférée dans un tube à centrifuger en verre, puis agitée au vortex pendant 5 minutes. Afin de dégrader et d'éliminer les protéolipides, 1,2 mL de méthanol sont ajoutés, puis la solution est agitée au vortex pendant 15 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé (4000 x *g*, 10 min, 22°C), puis la phase liquide est récupérée (les protéolipides dénaturés sédimentant majoritairement dans le culot).

Après avoir ajouté 0,6 mL de chloroforme enrichi avec des étalons de phospholipides (PC(17:0/17:0) 0,5µg, PE(17:0/17:0) 2.5µg, PG(17:0/17:0) 1µg, LPC(17:0) 1µg, LPE(13:0) 2.5µg, CL(14:0/14:0/14:0/14:0/14:0) 5µg[3]), la solution est agitée au vortex pendant 15 minutes, puis soumise au bain à ultrasons pendant 15 minutes. Puis un ajout de 0,6 mL de chloroforme est suivi d'une agitation au vortex pendant 15 minutes ; d'un dernier ajout de 0,62 mL d'acétate d'ammonium 1M et d'une agitation au vortex pendant 15 minutes. L'acétate d'ammonium permet la formation d'un anneau protéique à l'interface entre la phase aqueuse (eau/méthanol, contenant de petites molécules polaires) et la phase organique (chloroforme/méthanol, contenant les lipides). Enfin, le mélange est laissé à décanter pendant 30 minutes afin de permettre la séparation des trois phases : phase aqueuse, anneau protéique et phase organique.

La phase organique, qui a décanté au fond du tube, est récupérée et conservée. Puis 0,94 mL de chloroforme sont ajoutés au surnageant (phase aqueuse et anneau protéique) pour une seconde extraction liquide-liquide. Après 15 minutes d'agitation au vortex, le mélange est de nouveau mis à décanter pendant 30 minutes. La seconde phase organique est prélevée, puis regroupée avec la précédente. La phase organique résultante est évaporée sous argon. L'extrait lipidique sec est alors repris dans 250 µL d'une solution chloroforme : méthanol (4:1 v/v) puis séparé en trois aliquots (1/5, 1/5, 3/5). Chaque extrait est divisé en trois aliquots afin de pouvoir analyser plusieurs fois un échantillon sans risquer une oxydation liée à un trop grand nombre de cycles re-suspension/séchage. Les aliquots sont de nouveau séchés sous argon et stockés à -20°C.

[3] Ces masses d'étalons ont été déterminées empiriquement à partir des données LC-MS de PAK. Elles ont été obtenues après trois essais de différentes concentrations en étalons.

II.2 ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

II.2.1 Précautions quant à l'utilisation du matériel : la chasse aux contaminants

Une attention particulière doit être portée sur la qualité des solvants, tampons utilisés, ainsi que sur la propreté de la verrerie. En effet, les solvants utilisés pour l'analyse des lipides (notamment le chloroforme et l'isopropanol) permettent une très bonne solubilisation de nombreux polluants comme les plastifiants par exemple (provenant autant de l'environnement du laboratoire que des instruments, chromatographe ou spectromètre de masse).

Ces contaminations ne sont pas à négliger puisqu'elles peuvent i) engendrer de mauvaises interprétations (la structure chimique de certains plastifiants pouvant être proche de celle des lipides) et ii) entraîner un phénomène de suppression de signal dû à une compétition à l'ionisation entre les contaminants et les lipides (phénomène fréquemment observable avec la source d'ionisation *electrospray*). Le recours à des blancs de solvant (contenant uniquement les solvants de reprise et ceux de dilution, notés S1 et S2, *cf* II.2.2), ainsi que des blancs d'extraction (extraction liquide-liquide sans échantillon, puis dilués dans S1/S2), permet d'identifier les contaminants liés aux processus d'extraction et au système analytique.

De plus, au vu des disparités de concentration des lipides (par exemple, PE 34:1 est approximativement 80 fois plus concentrée que CL 68 :3[4]), la limite de solubilisation de certains lipides est rapidement atteinte lors de la concentration de l'échantillon. Ainsi, à part quelques lipides, l'échantillon est globalement peu concentré. Afin d'obtenir un bon signal sur bruit, Il convient de réduire au maximum les risques de contamination.

Pour cela, des protocoles très rigoureux de nettoyage de verrerie sont donc mis en place, ainsi que l'utilisation de solvants de qualité LCMS. Concernant la préparation des échantillons et des phases mobiles, les précautions suivantes doivent être appliquées :

[4] Approximation à partir d'une acquisition : utilisation des masses dopées d'étalons internes PE 34 :0/ CL 56 :0 et de la règle de proportionnalité $\left(m_{PE\ 34:1} = aire_{PE\ 34:1} \times \frac{m_{PE\ 34:0}}{aire_{PE\ 34:0}}\ et\ m_{CL\ 68:3} = aire_{CL\ 68:3} \times \frac{m_{CL\ 56:0}}{aire_{CL\ 56:0}}\right)$.

1) Eviter au maximum les plastiques : pesée du formiate d'ammonium à effectuer dans des béchers en verre, ne pas filtrer les phases mobiles (pour s'assurer de la bonne solubilisation du tampon, passer les phases mobiles au bain à ultrasons), ne pas pipeter le méthanol, le chloroforme et l'acide formique avec un cône en plastique, utiliser de l'acide formique dans un contenant en verre[5],
2) Utiliser des solvants, du formiate d'ammonium et de l'acide formique, de grade LC-MS et ne jamais prélever directement dans les flacons,
3) Avant de préparer les phases mobiles, tester la qualité des solvants (surtout pour l'isopropanol) et des tampons (sources possibles de polyéthylène glycol) en ESI-MS (infusion),
4) Pour éviter les contaminations croisées, dédier des bouteilles pour la préparation des phases mobiles, spécifiquement pour les analyses des lipides,
5) Avant chaque utilisation, rincer les bouteilles avec quelques millilitres de solvants LC-MS, puis effectuer le même rinçage après utilisation et sécher à l'étuve.

Concernant l'utilisation du chromatographe et du spectromètre de masse :

1) Avant et après chaque analyse, nettoyer à l'éthanol la source d'ionisation, dans le cas d'une source avec le système Lockspray, démonter la pièce *baffle* pour la nettoyer et accéder au fond de la source (attention toutefois de ne pas toucher aux capillaires ESI et *lockspray* !),
2) Utiliser un cône dédié pour les analyses métabolomiques/lipidomiques,
3) Utiliser des solvants de rinçage des pistons et de l'aiguille contenant de l'isopropanol afin d'assurer le bon nettoyage du chromatographe,
4) Après équilibration de la colonne, faire l'acquisition de plusieurs blancs.

[5] Si non disponible, vérifier la qualité du contenant en plastique, si celui-ci est devenu jaune pendant le stockage, la présence de Polyéthylène glycols peut être attendue.

II.2.2 Préparation des échantillons

Afin d'éviter l'oxydation des extraits lipidiques, ceux-ci doivent être séchés et conservés sous argon après chaque utilisation. Deux mélanges de solvants sont utilisés pour re-suspendre les extraits lipidiques pour l'analyse LC-MS (décrits par Paglia *et al.* [7]*)*:

_le mélange de reprise S1 : chloroforme/méthanol (2/1), nécessaire pour la bonne solubilisation des lipides ;

_le mélange de dilution S2 : isopropanol/ acétonitrile/ eau (4/3/1), nécessaire pour éviter un phénomène de front diffus des pics chromatographiques (déformation des pics due à une force éluante du solvant de dilution trop élevée) et pour éviter la détérioration prématurée de la colonne (phase stationnaire sensible au méthanol et au chloroforme) ou du système chromatographique (mélange S1 très volatil : risque de précipitation de l'échantillon lors de l'injection).

Les extraits lipidiques de la souche *P. aeruginosa* PAK sont repris dans 50 µL de S1, alors que les extraits lipidiques des souches cliniques sont repris dans 30 µL de S1.[6] Dix microlitres de ces solutions mères sont dilués au cinquième dans du S2 ; le restant est séché et conservé sous argon. Les échantillons peuvent éventuellement être stockés, après analyse, pendant un mois à -20°C, à condition de changer les bouchons dont le septum a été percé lors de l'analyse.

II.2.3 Préparation et suivi du bon déroulement d'une séquence métabolomique

Les analyses de type métabolomique impliquent l'acquisition d'un grand nombre d'échantillons afin d'obtenir une réponse à une question biologique. Puisque la variabilité instrumentale est bien plus faible que la variabilité biologique, il est plus pertinent d'utiliser des réplicats biologiques qu'analytiques.

[6] Ces volumes ont été déterminés empiriquement, afin d'obtenir un bon rapport signal/bruit. Les variations de concentration entre les échantillons sont ensuite corrigées par l'utilisation des étalons internes.

De plus, réaliser des réplicats analytiques pour chaque réplicat biologique entraînerait des séquences d'acquisition très longues, allant de plusieurs jours à plusieurs semaines. Par conséquent, les séquences d'analyses métabolomiques consistent à privilégier l'utilisation d'un grand nombre d'échantillons biologiques pour chaque condition à comparer (ex : patients malades *vs* patients sains) plutôt que d'effectuer des réplicats analytiques. Cela implique i) d'obtenir des conditions analytiques robustes (absence de contamination croisée, stabilité des temps de rétention, limitation des pollutions extérieures, conditionnement de la colonne...), ii) de corriger la déviation analytique lors de la séquence, iii) de limiter les effets dus au hasard par une bonne aléatoirisation des échantillons, et iv) de disposer d'un nombre de réplicats biologiques suffisant pour pouvoir écarter ceux étant trop éloignés de la tendance générale, sans compromettre la validité du résultat.

Afin de répondre aux trois premières conditions, une première réflexion doit avoir lieu sur la liste de la séquence d'acquisition : quels sont les échantillons à analyser ? Peut-on les distinguer en groupes ? Peut-on utiliser des références pour corriger la déviation analytique ? Comment l'ordre d'injection peut-il impacter les résultats ?

Cette séquence d'acquisition est constituée telle qu'illustrée par le **Tableau 1**, à partir des recommandations de Broadhurst *et al.* [8]. La séquence illustrée ne contient qu'un lot d'analyses (*batch)*. Ce lot a été répété deux fois afin d'obtenir les données LC-MS en mode positif et négatif. Des blancs solvants sont injectés afin de nettoyer la colonne et pour pouvoir déterminer le bruit de fond. Nous avons ensuite fait le choix d'injecter une gamme d'étalonnage externe afin de calculer les rendements d'extraction liquide-liquide. Des blancs extractions permettent de distinguer les contaminants des composés d'intérêt. Des contrôles qualités (QC pour *quality control*) sont dans un premier temps injectés pour équilibrer la colonne (répond à la problématique i), conditions analytiques robustes) et pour corriger la déviation analytique (répond la problématique ii), correction de la déviation analytique). Ces QC sont préparés en mélangeant 10 µL de chaque échantillon.

Tableau 1 Exemple de séquence d'acquisition pour l'analyse de PAK *vs* PA08B *vs* PA18B, ne contenant qu'un lot d'analyses (*batch*). La notation des échantillons est la suivante : souche ou isolat clinique (K, 08A,08B… pour PAK, PA08A, PA08B…), milieu de culture (SP pour SCFM-PC), n° du réplicat de culture (entre 1 et 5), n° du réplicat d'extraction (a ou b).

n° injection	échantillon
1	blanc solvant
2	blanc solvant
3	mix étalons étalonnage externe 1
4	mix étalons étalonnage externe 2
5	mix étalons étalonnage externe 3
6	mix étalons étalonnage externe 4
7	mix étalons étalonnage externe 5
8	mix étalons étalonnage externe 6
9	blanc extraction
10	blanc extraction
11	QC
12	QC
13	QC dilution 1/8
14	QC dilution 1/4
15	QC dilution 1/2
16	QC
17	QC
18	KSP4b
19	18BSP5a
20	8BSP4a
21	18BSP3b
22	KSP2a
23	8BSP2b
24	QC
25	18BSP5b
26	8BSP1a
27	KSP2b
28	18BSP2a
29	KSP5a
30	8BSP4b
31	QC
32	8BSP5b
33	18BSP1b
34	KSP4a
35	KSP1b
36	8BSP3a
37	18BSP4a
38	QC
39	18BSP3a
40	8BSP3b
41	8BSP5a
42	KSP3b

n° injection	échantillon
43	18BSP4b
44	KSP1a
45	QC
46	KSP3a
47	18BSP2b
48	KSP5b
49	8BSP2a
50	18BSP1a
51	8BSP1b
52	QC
53	QC
54	blanc extraction
55	blanc extraction

Pour le bon déroulement de l'acquisition, d'autres précautions sont à prendre. Notamment, puisqu'il n'y a pas de réplicat analytique, il est primordial que les échantillons soient bien agités au vortex, aussi pour éviter l'apparition d'une bulle d'air dans l'insert. Cette agitation doit aussi être réalisée entre chaque lot d'analyse (acquisition des mêmes échantillons sous d'autres conditions analytiques), afin de pouvoir comparer les lots d'analyse entre eux.

Ensuite, la robustesse des conditions analytiques doit être vérifiée tout au long de l'acquisition : bonne sensibilité et bon étalonnage du spectromètre de masse, répétabilité de la pression de la colonne chromatographique ainsi que des temps de rétention, répétabilité des *m/z* et de l'intensité des ions.

Pour vérifier cela, trois QCs sont injectés avant la séquence et plusieurs ions diagnostiques (répartis sur la gamme *m/z* et sur le chromatogramme) sont suivis. Le suivi de ces ions lors de l'acquisition permet ensuite de vérifier le bon déroulement de l'expérience.

Ce suivi est indispensable puisqu'il permet d'intervenir rapidement en cas de problème technique. En effet, l'utilisation de QCs permet de ne pas avoir à ré-injecter tous les échantillons, mais de recommencer la séquence à partir du dernier QC injecté. Bien que l'acquisition des échantillons soit automatique, ce type d'expérience nécessitant plusieurs jours à plusieurs semaines, il est primordial de réaliser un suivi attentif et régulier afin de limiter au maximum les erreurs.

II.2.4 Instrumentation

II.2.4.1 Chromatographie liquide

La colonne était une colonne de phase inverse Acquity UPLC CSH C18 de 1,0 x 100 mm, 1,7 µm (Waters, Manchester, UK) équipée d'un préfiltre de 0,2 µm. Le greffage (C18) de la phase stationnaire a été choisi afin de permettre une séparation des phospholipides selon la longueur de chaînes de leurs acides gras constitutifs.

Le système chromatographique utilisé est une chaîne de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) RSLC Dionex Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

La température de l'injecteur automatique était de 4°C afin d'assurer la conservation des extraits lipidiques et limiter les risques d'oxydation. Aucune précipitation n'a été observée (stockage des échantillons, entre deux expériences, à -20°C également possible).

La température du four était de 50 ° C, selon les recommandations de Paglia *et al* [7]. L'utilisation d'une grande proportion d'isopropanol, dans le gradient d'élution, entraîne de fortes pertes de charges dans la colonne (ΔP = 800 bars en 100% phase mobile B, avec le four à 50°C). Le chauffage de la colonne permet de réduire la viscosité des phases mobiles et donc l'utilisation de ce type de phases mobiles sans dépasser la limite de pression acceptable pour ce modèle de chromatographe (1250 bars).

Le volume d'injection était de 1 µL ou 3 µL (pour les expériences MS/MS) et le débit de 100 µL/min. Ce débit est adapté pour une colonne de type UHPLC (particules de 1.7 µm de diamètre et 1,0 mm de diamètre) et le couplage avec un spectromètre de masse.

Les phases mobiles, inspirées des travaux de Paglia *et al.* [7], ont été ajustées de façon à obtenir le maximum de séparation des lipides recherchés (notamment les CL). La phase mobile A est constituée d'un mélange acétonitrile / eau (60/40), 10 mM formiate d'ammonium, 0,1% d'acide formique et la phase mobile B de isopropanol/ acétonitrile/ eau (88/8/4), 10 mM formiate d'ammonium, 0,1% d'acide formique.

La phase mobile B a été modifiée, par rapport aux travaux de Paglia *et al.* [7], par l'ajout de 4% d'eau afin d'assurer la solubilisation totale du formiate d'ammonium. De plus, pour cette même raison, le formiate d'ammonium est solubilisé dans l'eau avant d'effectuer le mélange avec les autres solvants organiques. Pour finir les phases mobiles A et B, l'acide formique est ajouté en dernier et les bouteilles sont mises 5 minutes au bain à ultrasons.

Plusieurs gradients d'élution ont été testés et celui retenu est reporté dans le **Tableau 2** :

Tableau 2 Gradient d'élution LC.

Temps (min)	% B
0	6
3	62
5	62
8	70
12,5	70
13	86
16	86
16,5	94
19,5	94
20	100
26	100
26,5	6
30	6

La solution de rinçage des pistons, de l'aiguille et de la seringue d'injection, est : isopropanol/ acétonitrile/ eau (60/30/10). Un rinçage avec cette solution est réalisé à chaque fin de séquence. Le volume de rinçage de l'aiguille est de 100 µL (vitesse de rinçage 5 µL/sec). Si un effet de contamination croisée (*carryover*) est observé, le volume de rinçage de l'aiguille peut être augmenté à 300 µL (vitesse de rinçage 7 µL/sec).

II.2.4.2 Spectromètre de masse couplé à une cellule de mobilité ionique (IMS-Q-ToF)

Lors de ces travaux de thèse, la majorité des expériences a été réalisée au moyen d'un spectromètre hybride quadripôle - temps de vol (Q-ToF) équipé d'une cellule de mobilité ionique « Traveling Wave Ion Mobility » (TWIMS) (SYNAPT G2 HDMS, Waters MS Technologies, Manchester, UK) en couplage avec le système chromatographique UHPLC décrit précédemment. Le schéma du fonctionnement de cet instrument est donné en **Figure 3**.

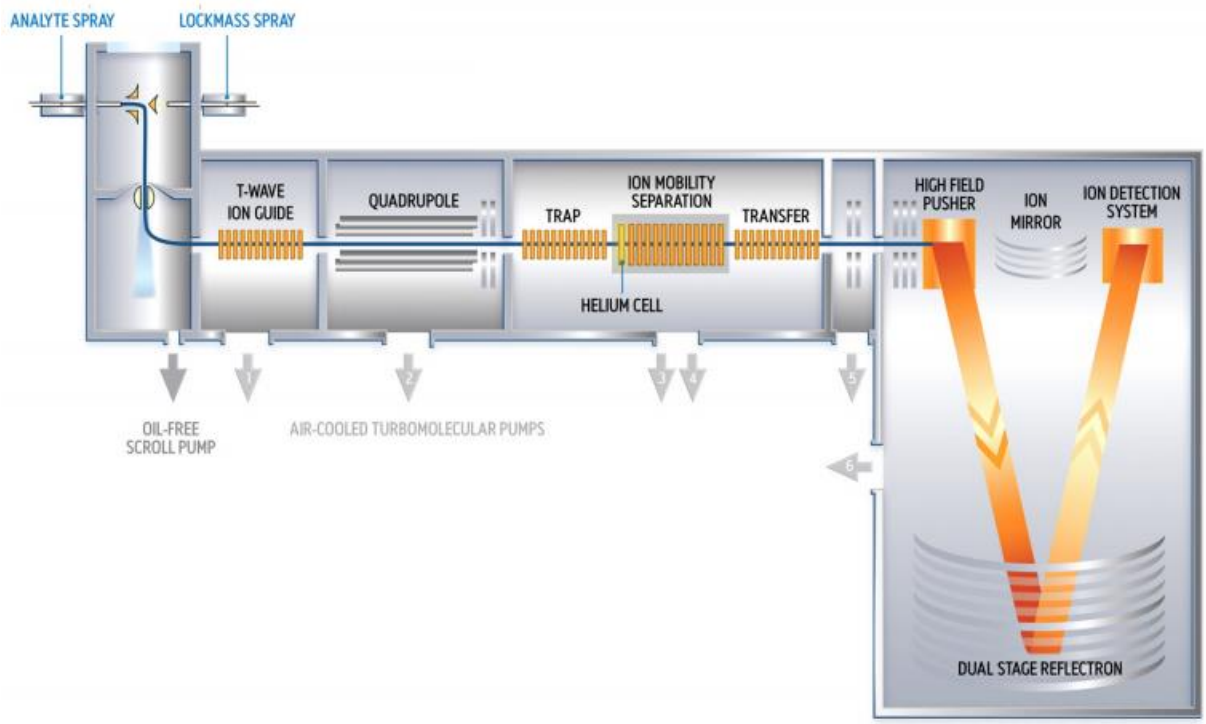


Figure 3 Schéma du Synapt G2 HDMS. Le trajet des ions est illustré pour le mode de résolution V. Figure tirée de www.waters.com.

Brièvement, après l'ionisation, les ions sont guidés à travers le spectromètre de masse par des champs électromagnétiques. Le quadripôle permet de réaliser la sélection d'ions précurseurs ou fonctionne en tant que guide d'ions.

Les cellules TRAP et TRANSFER permettent de réaliser la fragmentation des ions, respectivement, en amont ou en aval de la cellule de mobilité ionique TWIMS. Ces cellules peuvent êtres activées toutes les deux, séparément ou servir de guides d'ions (mode MS).

La cellule de mobilité ionique TWIMS peut être activée (mode Q-IMS-ToF) ou désactivée (mode Q-ToF). Enfin, le ToF peut fonctionner avec un seul réflectron (mode « sensibilité S » ou « résolution V ») ou les deux réflectrons (mode « haute-résolution W »). Il est à noter que l'utilisation de la mobilité ionique et/ou l'utilisation des modes V ou W (par rapport au mode S) engendre une perte de signal (due à l'augmentation de la pression dans la cellule TWIMS ou l'allongement du parcours des ions pour les modes V ou W).

La déviation en masse peut être corrigée tout au long de l'acquisition par l'utilisation du système *Lockmass*. Ce système permet d'alterner rapidement entre l'acquisition de l'échantillon et l'acquisition d'un étalon (leucine enképhaline).

II.2.4.2.1 Ionisation ESI

La source d'ionisation *electrospray* (ESI) a été utilisée en mode positif et négatif afin de détecter respectivement les LPC, LPE, PE, PC, CL d'une part et LPE, LPG, PE, PG, CL d'une autre part. Les paramètres ont été travaillés et ajustés pour permettre l'ionisation d'un maximum de composés, sachant que ces réglages restent un compromis entre « transmettre un maximum d'ions » et « limiter la fragmentation des plus fragiles », fragmentation (*CID in source*) de certains phospholipides de plus petite masse. Ce phénomène de fragmentation en source des lipides est bien connu et a été reporté [9]. Il est important de garder à l'esprit ce phénomène afin d'éviter de commettre des erreurs d'attribution lors du traitement des données (voir II.3.2).

En mode positif, après ajustement, les tensions retenues et appliquées sur le capillaire (*capillary*), le cône d'extraction (*extraction cone*) et le cône (*sampling cone*) étaient, respectivement, de 3 kV, 6 V et 50 V. Les débits de gaz de cône et de gaz de désolvatation étaient de 40 L/h et 600 L/h. La température de désolvatation était de 400 °C et la température de source de 120 °C.

En mode négatif, les tensions du capillaire, du cône d'extraction et du cône étaient, respectivement, de -2,4 kV, 5 V et 45 V. Les débits de gaz de cône et de gaz de désolvatation étaient de 60 L/h et 900 L/h. La température de désolvatation était de 500 °C et la température de source de 120 °C.

Une correction de la masse en continu (*lockmass*) est effectuée par infusion de la leucine enképhaline (2 ng/µL, 3 µL/min) *via* l'interface LockSpray™ (fréquence de balayage de référence, tension capillaire et tension du cône de 10 s, 3,5 kV et 40 V respectivement en mode positif et 10 s, 2,5 kV, 30 V respectivement en mode négatif). Afin que la correction soit automatiquement appliquée en fin d'acquisition, l'option « acquire Lockmass, apply correction » doit être sélectionnée dans la méthode MS File.

II.2.4.2.2 Mobilité Ionique

Les paramètres IMS étaient les suivants : débit d'hélium 180 mL/min, hauteur de vague 40 V, débit d'azote dans la cellule TWIMS 70 mL/min (3,01 mbar), vitesse de vague 600 m/s.

Ces paramètres ont été optimisés afin de pouvoir observer les phospholipides les plus petits (ex : lysophosphatidylcholines), comme les plus grands (CL) en une seule acquisition et assurer une bonne résolution des pics. Par rapport, aux paramètres proposés par Paglia *et al*. [7], la vitesse du débit d'azote dans la cellule TWIMS et la vitesse de la vague ont été diminués (90 mL/min et 900 m/s respectivement préconisés).

Avant chaque acquisition, la cellule de mobilité ionique est équilibrée pendant une demi-heure. Pour le calcul de sections efficaces de collision (CCS), la polyalanine [10], le dextran [11,12] et un mélange de PE/PC [13] sont utilisés. La détermination des CCS est décrite en II.3.3.

II.2.4.2.3 Quadrupole-Time of Flight (Q-ToF)

Nous avons choisi de travailler en mode « V resolution » (voir **Figure 3**), c. à d. avec une résolution de 20000 FWHM pour l'analyseur ToF, afin d'avoir un bon compromis entre précision de masse et sensibilité (comparativement au mode «W resolution »).

Les expériences MS/MS sont réalisées en mode négatif avec les paramètres de résolution du quadripôle fixés pour les basses masses (LM resolution) à 10 et pour les hautes masses (HM resolution) à 15. Les ions précurseurs sont sélectionnés dans le quadripôle en utilisant des fenêtres de temps de rétention dans la méthode MS. Afin d'avoir la plus grande sensibilité, plusieurs acquisitions sont effectuées pour obtenir les spectres MS/MS de tous les lipides en co-élution et le mode lockmass a été désactivé. La fragmentation a lieu dans la cellule TRANSFER. Les ions précurseurs et les rampes d'énergies de collision sont rassemblés dans le **Tableau 3**. A noter, que l'énergie de collision pour les CL n'a pas pu être optimisée malgré plusieurs essais (fonctionne pour quelques CL mais pas toutes).

Tableau 3 Résumé des paramètres MS/MS avec le Synapt G2.

Classe de lipides	Ion précurseur	Energie de collision dans le TRANSFER (eV)
PE	$[M-H]^-$	Rampe de 25 à 40
PG	$[M-H]^-$	Rampe de 25 à 40
PC	$[M+OAc]^-$	Rampe de 25 à 40
acylPG	$[M-H]^-$	Rampe de 35 à 45
lysoCL	$[M-H]^-$	Rampe de 25 à 55
CL	$[M-H]^-$	65

II.2.4.3 Spectromètre de masse Triple quadripôle (TQ)

L'instrument utilisé pour l'analyse semi-quantitative était un triple quadripôle XEVO-TQSmicro (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Cet instrument était couplé avec la chaîne chromatographique décrite précédemment.

II.2.4.3.1 Ionisation ESI

Les paramètres de la source sont en mode positif : tensions capillaire et de cône 2,3 kV et 30 V, débits de gaz de cône et de désolvatation 40 L/h et 600 L/h, température de désolvatation 400 °C.

Pour le mode négatif : tensions capillaire et de cône -2,1 kV et 35 V, débits de gaz de cône et de gaz de désolvatation 40 L/h et 700 L/h, température de désolvatation 500 °C.

Ces paramètres ont été adaptés à partir des paramètres sources du Synapt G2 puisqu'ils ont été optimisés pour les lipides de la souche PAK et que les sources du Synapt G2 et du Xevo-TQSmicro sont de géométrie très proche.

II.2.4.3.2 Triple quadrupôle

Les acquisitions ont été effectuées en utilisant le mode d'acquisition « *multiple reaction monitoring* » (MRM) en utilisant l'argon comme gaz cible. Les fenêtres de temps de rétention ont été fixées à ± 1 minute du temps de rétention prévu (*cf* SI.2 du 3ème article, IV.2.2). Le « *dwell time »* a été réglé automatiquement. Les transitions du MRM sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 4 Paramètres de transition du MRM pour chaque classe de phospholipides.

Classe de lipide	Mode d'ionisation	MS1 (*m/z*)	MS2 (*m/z*)	Energie de collision (eV)
LPE	ESI −	$[M-H]^-$	$[FA-H]^-$	28
LPG	ESI −	$[M-H]^-$	$[FA-H]^-$	28
LPC	ESI −	$[M-CH_3+OAc]^-$	$[M-CH_3-H]^-$ $[FA-H]^-$	28 28
PE	ESI −	$[M-H]^-$	153.0 171.0	35 35
PG	ESI −	$[M-H]^-$	153.0 171.0	35 35
PC	ESI +	$[M+H]^+$	184.1	35
acylPG	ESI −	$[M-H]^-$	$[FA(sn\text{-}3')-H]^-$	40
LCL	ESI −	$[M-H]^-$	153.0 171.0	72 72
CL	ESI −	$[M-H]^-$	153.0 171.0	72 72

FA : fatty acid

II.3 TRAITEMENT DES DONNEES

II.3.1 Logiciels

Pour les données n'ayant pas été acquises par approche de type métabolomique, le traitement des données a été effectué avec les logiciels constructeurs : MassLynx 4.1, DriftScope 2.8 et UNIFI 1.8.2.169 (Waters, Manchester, UK). D'autres logiciels en libre accès auraient pu être utilisés tels que mMass, MZminee ou OpenChrom.

Il faut cependant noter que l'utilisation de ce type de logiciels nécessite souvent une étape de conversion des données brutes du format constructeur à un format libre de droits tel que mzXML. Cette conversion est particulièrement longue et peut ne pas être compatible avec tous les fonctionnements des spectromètres de masse. Dans le cas du Synapt, l'acquisition avec la correction lockmass nécessite une modification des données brutes avant la conversion (procédure détaillée dans la partie II.4.4.) et les données LC-IMS-MS ne peuvent pas être converties.

Masslynx est le logiciel de contrôle de l'instrument. Il permet de réaliser l'acquisition mais également le traitement des données manuellement ou de façon automatique en utilisant certains outils tels que TargetLynx. Cependant, ce logiciel ne permet pas de prendre en compte le couplage LC-IMS. En effet, les données LC et IMS sont accessibles séparément, mais il n'est pas possible de visualiser les données IMS-MS liées à un temps de rétention précis.

Le logiciel Driftscope permet de traiter manuellement les données (LC)-IMS-MS, notamment par le biais des cartes bidimensionnelles « temps de dérive en fonction du *m/z* » (l'intensité des pics étant représentée par une échelle de couleur). Ce logiciel prenant en compte le couplage LC-IMS, il peut afficher les données IMS-MS correspondant à un pic chromatographique, puis il est possible d'extraire ces données afin de les traiter avec Masslynx.

La détection des pics IMS-MS et l'étalonnage CCS sont disponibles, mais étant peu fiables (faible peak picking, impossibilité de réaliser la régression gaussienne des pics…), la détermination des CCS (détaillée partie II.4.3) a été réalisée au moyen de tableurs tels que excel.

Le logiciel UNIFI a été conçu pour traiter les données LC-IMS-MS de façon automatique. Les données peuvent être traitées, de manière qualitative comme quantitative, par l'utilisation d'une base de données t_R, *m/z* (et CCS) interne. Ce logiciel comporte aussi d'autres options d'aide à l'identification comme, par exemple, la recherche de fragments communs ou la recherche dans des bases de données (Pubchem, Lipidmaps…).

II.3.2 Interprétation des données LC-MS

II.3.2.1 Identification

Afin d'identifier les lipides membranaires de *P. aeruginosa*, les extraits lipidiques ont été analysés par couplage de la chromatographie liquide en phase inverse avec la spectrométrie de masse.

En plus de permettre la séparation, au moins partielle, des lipides, le couplage de la chromatographie liquide permet une meilleure identification des lipides que lorsque les échantillons sont analysés par infusion directe. Pour illustrer cela, la figure 3 montre : i) le chromatogramme d'un extrait de PAK cultivée dans le milieu SCFM-PC ainsi que ii) le spectre de masse moyen extrait du pic chromatographique majoritaire.

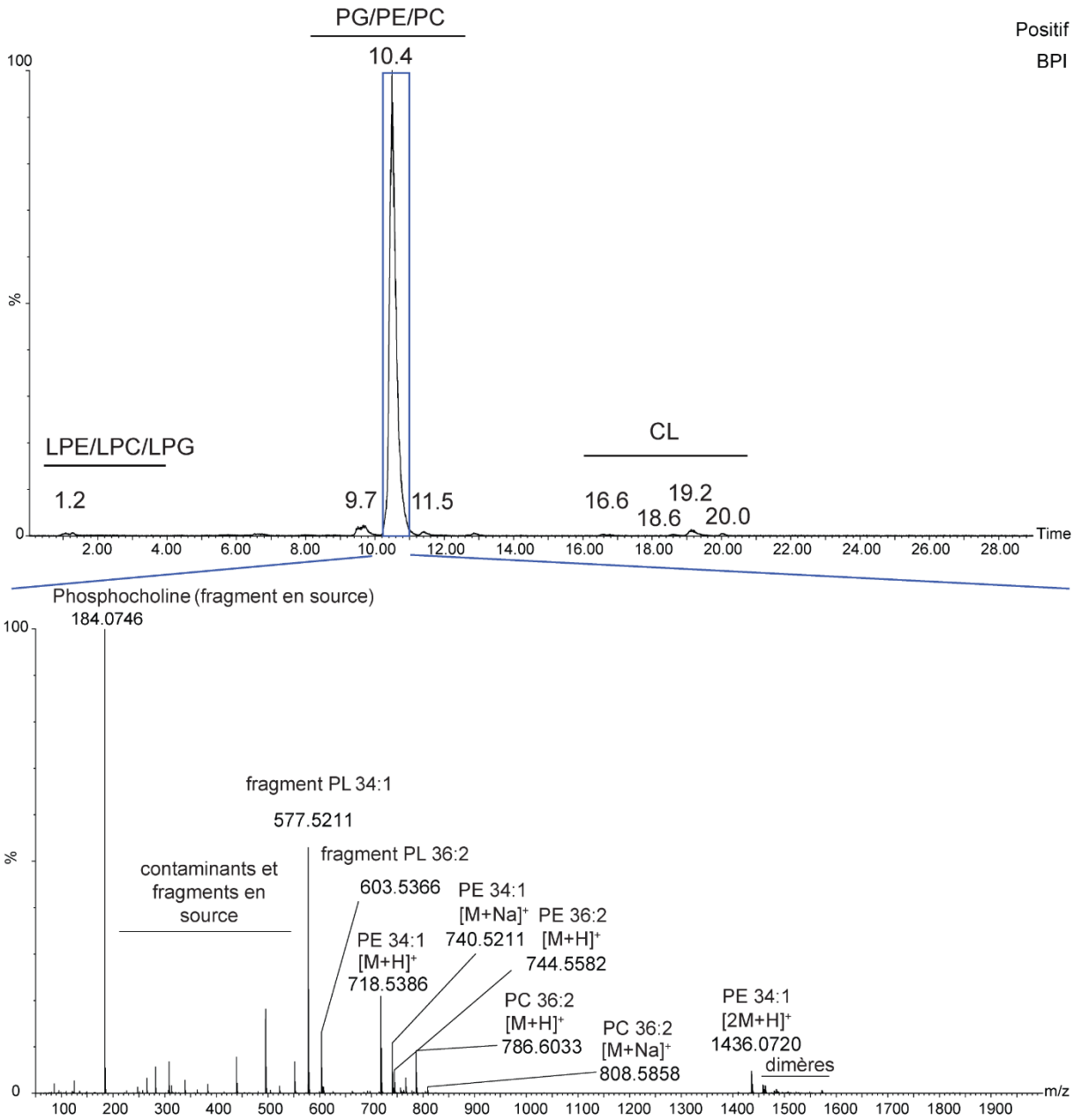


Figure 4 Spectre de masse cumulé entre 10,5 min et 11,0 min (chromatogramme extrait du PE 34:1), échantillon : KSDt2b. Les pics majoritaires identifiés montrent la co-élution de plusieurs phospholipides ainsi que la présence de nombreux fragments en sources et dimères de phospholipides.

Un examen rapide du chromatogramme montre une grande disparité d'intensité entre les différents pics. Notez bien que cela ne reflète pas directement la concentration des phospholipides puisque le rendement d'ionisation des classes de phospholipides diffère grandement. En effet, par exemple, les CL ont une ionisation bien plus faible que les autres phospholipides, pour une même concentration.[7] Ces différences d'ionisation sont à prendre en compte puisque la compétition à l'ionisation, observée avec la source ESI, peut induire une suppression du signal pour les composés à la capacité d'ionisation la plus faible.

Sur le chromatogramme cumulé entre 10,5 min et 11 min, nous pouvons observer la co-élution de plusieurs phospholipides ainsi que plusieurs signaux pour chacun d'entre eux. En effet, chaque phospholipide peut s'ioniser avec plusieurs adduits (principalement $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$), former des dimères ($[2M+H]^+$ et $[2M+Na]^+$, dimère d'un même phospholipide ou combinaison de plusieurs phospholipides) et se fragmenter en source (perte de la tête polaire puis réarrangements). La présence de ces multiples signaux rend l'identification assez complexe, et peut mener à de mauvaises identifications, notamment dans le cas d'utilisation de bases de données de métabolites provenant de cellules eucaryotes.

Le **Tableau 5** donne des exemples possibles de mauvaises identifications. Ces exemples ne sont pas en lien avec la **Figure 4** présentée précédemment. Les deux premières peuvent être facilement évitées par l'utilisation d'un spectromètre de masse à haute-résolution, cependant ce n'est pas le cas des deux suivantes. Dans le cas du *m/z* 603.5 (et d'autres fragments en source), le tracé de son chromatogramme d'ion extrait (EIC) montre plusieurs pics en co-élution avec les autres phospholipides (CL aussi). Cela ne serait pas possible si cet ion n'était pas un fragment en source.[8] Dans le cas des *m/z* 712.5 et *m/z* 745.5, les lipides de cellules eucaryotes peuvent être polyinsaturés (exemple : Ω-3), mais il est peu probable que ce type de lipide soit produit~~s~~ par *P. aeruginosa*. Même sans avoir recours à la MS/MS, l'hypothèse de lipides polyinsaturés peut être rejetée grâce à la séparation par chromatographie liquide puisque les adduits $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ ont le même temps de rétention.

[7] Les aires des étalons internes illustrent bien la différence d'ionisation. A partir des données LC-MS du mélange d'étalons internes, nous pouvons observer les aires suivantes : CL 14:0/14:0/14:0/14:0 (0.1 µg/µL) $8x10^3$, PE 17:0/17:0 (0.05 µg/µL) $2x10^4$, PC 17:0/17:0 (0.01 µg/µL) $2x10^5$.

[8] Attention, il est possible d'avoir plusieurs pics, lors du tracé d'EIC, ne correspondant pas à des fragments en source. En effet, le second pic du massif isotopique du phospholipide ayant une insaturation de plus sera présent sur l'EIC du pic cherché (ex illustré sur la **Figure 5** : P+2 du PC 34:2 et pic isotopique du PC 34:1).

De plus, dans le cas de *m/z* 745.5, les PG ne s'ionisent en mode positif qu'avec un adduit sodium, il est donc peu probable que cet ion corresponde au $[M+H]^+$ du PG 34:3.

Tableau 5 Exemples d'erreurs possibles d'identification.

Identification base de données			Identification plus probable			Δ*m/z* théorique (ppm)[9]
Identification	Adduit	*m/z* théorique	Identification	Adduit/ fragment	*m/z* théorique	
PS 31:2	$[M+H]^+$	718.4654	PE 34:1	$[M+H]^+$	718.5381	101.2
DG 33:1	$[M+Na]^+$	603.4959	DAG^+ 36:2	fragment	603.5347	64.3
PE 34:4	$[M+H]^+$	712.4912	PE 32:1	$[M+Na]^+$	712.4888	3.4
PG 34:3	$[M+H]^+$	745.5014	PG 32:0	$[M+Na]^+$	745.4990	3.2

NB : les « identifications base de données » ont été obtenues à partir d'une base de données telle que Lipidmaps. Ces espèces n'étaient pas présentes dans les extraits lipidiques de *P. aeruginosa.*

Enfin pour finir sur les sources possibles d'erreurs, comme décrit précédemment, les phospholipides peuvent s'ioniser sous la forme de dimères. Les masses de ces dimères étant très proches de celles des CL (ex : $[2\ PE\ 32:1+H]^+$ *m/z* 1380.0064 ; $[CL\ 66:1+H]^+$ *m/z* 1379.9952 (Δ*m/z* = 8.2 ppm)), l'identification des CL peut donc être compromise sans séparation chromatographique en amont.

II.3.2.2 Semi-quantification

Afin de comparer les quantités des phospholipides identifiés pour une même souche selon les différentes conditions de croissance (2nd article, *cf* III.2.2) ou entre différents souches/isolats (3ème article, *cf* IV.2.2), une approche de quantification par semi-quantification est utilisée.

[9] Ici Δ*m/z* théorique correspond à la différence entre les *m/z* des deux identifications et non l'erreur de mesure.

Pour cela, les aires relatives sont calculées par le ratio entre l'aire du phospholipide identifié et l'aire du phospholipide étalon de la même classe $\left(Aire\ relative = \frac{\text{Aire du PC 34:1}}{\text{Aire du PC 17:0/17:0}}, cf\ \mathbf{Figure\ 5}\right)$. Les aires sont automatiquement déterminées à partir des chromatogrammes d'ions extraits (EIC).

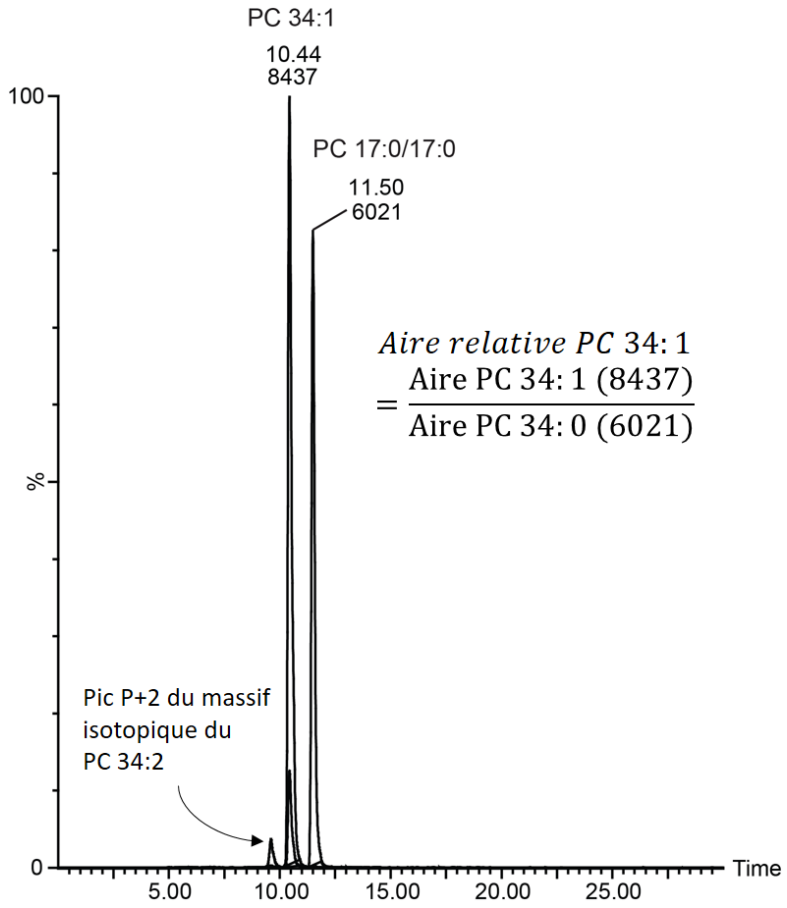


Figure 5 Superposition de deux chromatogrammes d'ions extraits : *m/z* 760.5 et *m/z* 762.5 et illustration du calcul de l'aire relative du PC 34 :1. Le pic à 9.9 min correspond au second pic du massif isotopique du PC 34:2 (*m/z* 760.5).

A noter que, comme décrit précédemment (*cf* extraction liquide-liquide, II.1.6), la masse dopée de chaque étalon a été adaptée aux extraits lipidiques de la souche PAK et n'est pas la même pour tous les étalons. Aussi, puisque, la réponse ionique varie entre les classes de phospholipides (aussi discuté précédemment *cf* II.3.2.1), la comparaison des aires relatives entre différentes classes de phospholipides ne reflète pas une différence absolue en terme de quantités.

De ce fait, les aires relatives peuvent être utilisées pour comparer les différences de quantité d'un même phospholipide entre différents échantillons (les masses d'étalons ont été adaptées au culot obtenu après ultracentrifugation, *cf* II.1.6), mais pas pour comparer des phospholipides de classes différentes, même au sein d'un même échantillon (ex : masse dopée du PE 17:0/17:0 = 0.05 µg/µL *vs* PC 17:0/17:0 = 0.01 µg/µL).

Par rapport à la quantification absolue, la semi-quantification ne permet pas d'avoir accès aux concentrations des différents phospholipides. Toutefois, elle permet de comparer des échantillons entre eux et est beaucoup plus rapide à mettre en place qu'une quantification absolue. Pour cette dernière, il faudrait utiliser un étalon (idéalement déutéré) pour chacun des lipides identifiés. Or, peu de ces étalons sont commercialement accessibles.

De plus, l'objectif de la thèse étant la mise au point de méthodologies pour des études cliniques, la semi-quantification est plus adaptée pour les études non-ciblées sur larges cohortes, car elle permet d'obtenir un aperçu quantitatif avec un minimum d'informations (classes de lipides).

II.3.3 Calcul des sections efficaces de collision (CCS)

Avec la cellule de mobilité ionique TWIMS, la détermination des $^{TW}CCS_{N2}$ s'effectue par étalonnage externe avec des valeurs de référence $^{DT}CCS_{N2}$. Lors de ces travaux de thèse (chapitre III), nous avons utilisé trois étalons CCS : la polyalanine décrite par *Bush et al.*, le dextran décrite par *Pagel et al.* et un mélange de phospholipides décrit par *Hines et al.* Les valeurs $^{DT}CCS_{N2}$ de ces étalons sont données dans les annexes de l'article 1 (Chapitre III.2).

Chaque étalon est infusé avec les mêmes paramètres de source et de mobilité ionique que les échantillons (voir II.2.4.2).

En utilisant MassLynx, les spectres de mobilité ionique sont extraits pour chaque *m/z* des étalons de référence. Une régression gaussienne est ensuite réalisée au moyen du logiciel OriginPro. Cette opération permet d'extraire des temps de dérive très répétables et la largeur à mi-hauteur des pics. La courbe d'étalonnage est établie, à partir de ces temps de dérive et des valeurs de CCS de référence, à l'aide du logiciel Excel.

Pour remarque, il est possible de réaliser le calcul des CCS de manière automatique avec UNIFI. Pour cela, un fichier cal.csv est construit (sur le modèle du fichier obtenu après étalonnage avec Driftscope). Il est complété avec les valeurs de section efficace de collision réduites (CCS', valeurs de la littérature) et les temps de dérive (t_D) obtenus lors de l'étalonnage manuel. Ce fichier est alors ajouté dans le dossier correspondant à chaque donnée brute (.raw, dossier construit comme décrit dans la **Figure 6**).

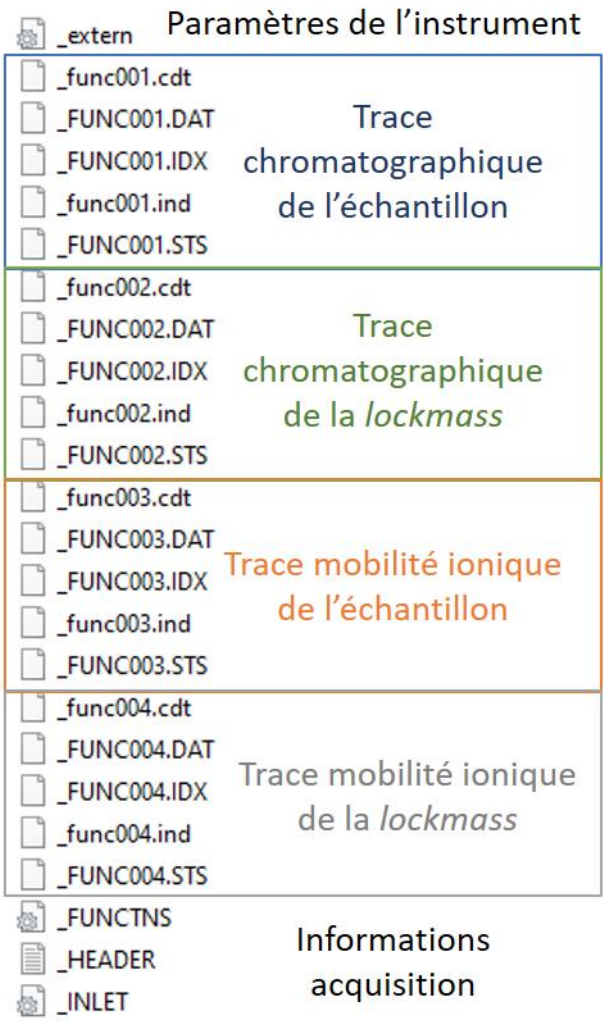


Figure 6 Fichiers constitutifs d'une donnée brute Waters en .raw ayant été enregistrée en mode Q-IMS-ToF avec la correction *lockmass*. Chaque fonction (ou trace) contient les données *m/z* en fonction du temps (temps de rétention ou temps de dérive) pour l'échantillon ou la *lockmass*. Les fichiers _extern (paramètres de l'instrument, lecture possible par l'utilisateur car fichier texte), _FUNCTNS, _HEADER et _INLET (lecture non possible par l'utilisateur) contiennent des informations sur l'acquisition.

Après avoir implémenté cette donnée brute au niveau du logiciel Unifi, le calcul des $^{TW}CCS_{N2}$ avec UNIFI fonctionne bien avec les étalons polyalanine et lipides. Cependant, nous avons observé une grande différence (ΔCCS>5%) pour les CL, entre les $^{TW}CCS_{N2}$ déterminées par UNIFI et celles déterminées manuellement, dans le cas d'un étalonnage avec le dextran en ions négatifs. Pour cette raison, nous avons effectué la détermination manuelle des $^{TW}CCS_{N2}$ à partir des temps de dérive extraits par UNIFI, pour l'ensemble des lipides pour garder une homogénéité de traitement de données.

Avant de réaliser l'étalonnage, il est nécessaire de calculer CCS' qui est la $^{DT}CCS_{N2}$ de la littérature corrigée par la masse réduite (1/μ) et l'état de charge de l'ion (z) :

$$CCS' = \frac{CCS}{z \times \sqrt{\frac{1}{\mu}}} \quad (1)$$

Avec

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{M_{ion}} + \frac{1}{M_{gaz}} \quad (2)$$

M_{ion} et M_{gaz} correspondent à la masse molaire de l'ion et du gaz utilisé dans la cellule TWIMS (ici N_2).

L'étalonnage que nous avons utilisé est un étalonnage logarithmique (meilleur facteur de régression qu'avec un étalonnage linéaire) :

$$\ln(\mathrm{CCS}') = X \ln(\mathrm{t}_D) + \ln(A) \quad (3)$$

En traçant ln(CCS') = f(ln(td)), nous pouvons obtenir les coefficients X et A. Le facteur de régression R^2 doit être supérieur à 0.98.

Enfin, pour obtenir la $^{TW}CCS_{N2}$:

$$^{TW}CCS_{N2} = A \times z \times \sqrt{\frac{1}{\mu}} \times {t_D}^X \quad (4)$$

II.3.4 Traitement des données de type métabolomique

L'analyse de données LC-MS par approche dite métabolomique requiert un traitement des données spécifique. Une grande partie de ce traitement est consacrée à la confection d'une matrice de données pouvant être utilisée par les algorithmes d'analyses statistiques. Les logiciels utilisés étaient Masslynx (pour la conversion des données du mode *profile* au mode *centroïd*), MSConvert de Proteowizard (pour la conversion du format constructeur au format libre), mzMine (pour vérifier le bon déroulement de la conversion) et la plateforme en ligne Workflow4Metabolomics (W4M, codée sous R). Les différentes étapes et paramètres nécessaires, sont détaillés ci-après. Pour rappel (*cf* II.2.3), les échantillons ont été analysés deux fois (deux *batch* ou lots d'analyses) pour les modes d'ionisation positif et négatif. Le traitement des données a été réalisé séparément pour ces deux lots d'analyse.

II.3.4.1 Conversion des données brutes

Dans un premier temps, nous avons choisi de réaliser l'acquisition en mode *profile* afin de pouvoir accéder à la totalité des données LC-MS. Ce type d'acquisition engendrant des données très lourdes, la conversion en mode *centroïd* est nécessaire afin de réaliser les étapes suivantes sur W4M (ex : *batch neg* en mode *profile* = 36 Go ; *batch neg* en mode *centroïd* = 3.5 Go). Cette conversion est réalisée avec Masslynx (tools\ accurate mass measure\ process type : automatic peak detection).

Ensuite, les données nécessitent d'être converties du format constructeur (.*raw* de Waters) à un format libre (ici mzXML). Le fait que les données LC-MS soit enregistrées en utilisant le système *Lockmass* (permettant un ré-étalonnage des valeurs de *m/z* durant toute l'acquisition) engendre, lors de la conversion directe des données vers un format libre, des fichiers dans lesquels les données LC-MS de l'échantillons et celles de la *lockmass* sont superposées. Ces fichiers ne sont donc pas utilisables en l'état.

Afin de pallier à ce problème, les données brutes *.raw* doivent être modifiées en supprimant la fonction *lockmass*. Cela peut être réalisé de manière automatique (avec un petit utilitaire comme AntRenamer) en ajoutant le suffixe «.old » à la fin de la fonction liée à la *lockmass* (_FUNC002.DAT.old, *cf* **Figure 6**). La correction de mesure de masse ayant été réalisée lors de l'acquisition, cette étape n'affecte pas la précision de mesure et la fonction *lockmass* peut être inactivée.

Enfin, les données sont converties en format mzXML à l'aide de l'utilitaire MSConvert de Proteowizard (filtre utilisé : Peak picking algorithme CWT).

II.3.4.2 W4M : Preprocessing ou Création de la matrice de données à partir des données LC-MS

La suite du traitement des données est réalisée sur le site Workflow4Metabolomics (W4M), disponible à l'adresse suivante : https://workflow4metabolomics.usegalaxy.fr [14]. Ce site propose une interface graphique permettant le traitement des données *via* l'accès à un serveur de la plateforme Genotoul bioinformatics (plateforme française mais **site en anglais)**. Les données envoyées sur ce serveur sont traitées avec le logiciel R. Les démarches à suivre pour réaliser le traitement des données sont très détaillées et le site est assez simple d'utilisation. La force de cette plateforme est son aspect communautaire avec le partage de fichiers, l'accès à des tutoriels et fichiers exemples. Un inconvénient est la création d'un nombre considérable de fichiers lors du traitement des données (jusqu'à 700 pour un seul batch en essayant différents paramètres !). Il est donc primordial de tenir un cahier dédié en notant les étapes de l'analyse de données et numéro des fichiers correspondants.

II.3.4.2.1 Import

En plus de l'import des données mzXML, un fichier *sampleMetadata* contenant les informations sur les données LC-MS doit être importé. Ce fichier doit être enregistré au format *tabular* (csv avec séparation tabulation). Le **Tableau 6** illustre un exemple de *sampleMetadata*.

Pour que le fichier puisse être valide, les noms des colonnes et noms *sampleType* doivent être respectés.

Tableau 6 Exemple réduit de sampleMetadata à partir des données du batch positif.

sampleMetadata	injectionOrder	sampleType	batch	strain
P2002149	2	blank	3	NA
P2002158	9	pool	3	NA
P2002167	18	sample	3	8B

L'ordre d'injection est nécessaire pour la correction de la déviation analytique (voir partie suivante). Ici, *pool* correspond au QC décrit dans la partie II.2.3. La colonne *strain* est propre à cette analyse ; elle sera utilisée pour les outils d'analyses statistiques.

II.3.4.2.2 MSn base, Find ChromPeak et Find Chrompeak Merger

Puisque la plateforme Workflow4Metabolomics utilise le logiciel R, la première étape (MSn base) après l'import consiste en la conversion en fichiers lisibles par ce logiciel (RData).

L'étape suivante (Find ChromPeak) permet de réaliser le *peak processing* : détermination automatique des couples t_R – *m/z via* le tracé d'EICs. Les paramètres suivants ont été adaptés en se basant sur les données brutes : **min, max retention time filter** 0,1440 ; min, **max filter on *m/z*** 200,1510 ; méthode Centwave ; **max tolerated ppm *m/z* deviation in consecutive scans** 25 ppm ; **min, max peak width in seconds** 20,80 ; **S/N cut off** 1 ; **prefilter** 0,0 ; **peak limits based on real data.**

Malgré le test de nombreux paramètres, il n'a pas été possible que le *peak processing* prenne en compte les CL. En effet, les pics chromatographiques des CL sont très peu résolus et peu intenses.

La troisième étape (Find ChromPeak Merger) permet de regrouper les fichiers R.Data en un seul fichier. Cette étape nécessite l'utilisation de la *sampleMetadata* décrite précédemment.

II.3.4.2.3 GroupChromPeak

L'étape GroupChromPeak va permettre de regrouper les variables (couples t_R-*m/z*) de toutes les données LC-MS en une matrice de données. Les fichiers créés sont la matrice de données *datamatrix*, la *sampleMetadata* actualisée, la matrice de variables *variablemetadata,* ainsi qu'un fichier R.Data nécessaire pour la suite du pre-processing. Un fichier pdf *plotchrom* est aussi créé et permet de visualiser le regroupement des pics.

Les paramètres suivants ont été adaptés aux données LC-MS traitées ici et dépendants des conditions chromatographiques : **méthode** Peakdensity ; **bandwidth** 5 ; **minimum fraction of samples** 0.2 ; **minimum of samples** 1 ; **width of overlapping *m/z* slices** 0.1, **max features per slide** 1000.

Il est possible d'utiliser directement les fichiers *datamatrix*, *sampleMetadata* et *variablemetadata* obtenus lors de cette étape sans réaliser les étapes suivantes du pre-processing.

II.3.4.2.4 Adjust time et FillChromPeak

Le fichier R.Data obtenu à l'étape précédente est ensuite utilisé dans cette étape Adjust time, permettant d'aligner les variables en temps de rétention. Les paramètres utilisés sont : **Peakgroups with minimum fraction** 0.75. Après cette étape, il est nécessaire d'effectuer à nouveau l'étape de GroupChromPeak avec les paramètres décrits précédemment. Ensuite, il est fortement recommandé de réaliser l'étape FillChromPeak. Cette étape permet de remplir les cases vides de la matrice de données avec des 0, ce qui est nécessaire pour les tests statistiques. Les paramètres de base sont utilisés ici.

II.3.4.2.5 CAMERA.annotate et CAMERA.combinexsAnnos

L'outil CAMERA.annotate (Collection of Algorithm for MEtabolite pRofile Annotation) permet de regrouper les variables provenant d'une même molécule, c'est-à-dire : isotopes, adduits et fragments. Il est possible d'utiliser une liste personnelle. CAMERA.combinexAnnos permet de comparer les annotations des modes d'ionisation positif et négatif, afin de corriger les mauvaises annotations et regrouper les données des deux modes d'acquisitions en une seule matrice. Bien que ces outils semblent intéressants, ils se sont révélés peu fonctionnels sur les données traitées ici. Malgré de nombreux tests des paramètres, les annotations n'étaient pas cohérentes. Ainsi, les outils CAMERA n'ont pas été utilisés et les variables obtenues après les tests statistiques ont été triées manuellement.

II.3.4.3 W4M : Tri et normalisation de la matrice de données

Afin de s'assurer de la qualité de la filtration et de la normalisation, des vérifications à l'aide de l'outil *quality metrics* sont réalisées en amont et à chacune des étapes suivantes.

II.3.4.3.1 Suppression des ions du blanc et des blancs

La filtration s'effectue à partir de l'outil *generic filters* dans *data handling*. Pour supprimer les ions du blanc, les paramètres sont les suivants : **Deleting samples and/or variables according to Numerical values** yes ; **on** variableMetadata ; **name of the column to filter** blankMean_over_sampleMean ; **Interval of values to remove** upper **; Remove all values upper than** 0.5.

Pour supprimer les blancs : **Deleting samples and/or variables according to qualitative values** yes ; **on** sampleMetadata ; **name of the column to filter** sampleType ; **Remove factor when** blank.

II.3.4.3.2 Correction batch

La correction *batch* permet de corriger à la fois la déviation analytique (déviation de l'intensité) et la déviation entre lots d'analyse (*batch*). Les paramètres utilisés sont les suivants : **type of regression** loess ; **span** 1.0 ; **factor of interest** : strain. La correction a été réalisée sur les QCs.

II.3.4.3.3 Suppression des ions dont le CV dans les QCs est supérieur à 30% (CV QC > 30%) et suppression des QCs

La suppression des ions de la matrice de donnée au coefficient de variation (CV) > 30% pour les QC est aussi réalisée avec l'outil *generic filters* avec les paramètres suivants : **Deleting samples and/or variables according to Numerical values** yes ; **on** variableMetadata ; **name of the column to filter** pool_CV ; **Interval of values to remove** upper ; **Remove all values upper than** 0.3.

De la même manière que pour supprimer les blancs, afin de supprimer les QCs, les paramètres du *generic filters* sont les suivants : **Deleting samples and/or variables according to qualitative values** yes ; **on** sampleMetadata ; **name of the column to filter** sampleType ; **Remove factor when** pool.

II.3.4.3.4 Normalisation par intensité totale

La dernière étape consiste en la normalisation des intensités de la matrice de données à partir de l'intensité totale, à partir de l'option *total intensity* de l'outil *normalization*. Dans certains cas, il peut être nécessaire de réaliser une transformation (log10, racine…) de la matrice de données afin de réaliser les tests statistiques. Cette transformation permet de modifier la distribution des données (ici l'intensité des variables dans chaque échantillon) afin qu'elle corresponde à une distribution statistiquement normale.

Le choix d'appliquer la transformation dépend des données brutes, au cas par cas. Ici il n'a pas été nécessaire de l'appliquer car la matrice de données telle quelle permettait de réaliser des tests statistiques significatifs.

II.3.4.4 W4M : Outils statistiques

De nombreux outils statistiques sont disponibles sur le site W4M. Leur utilisation est guidée et les paramètres de base n'ont pas besoin d'être modifiés (plusieurs méthodes de calcul sont disponibles). Il peut y avoir plusieurs manières de traiter les données, après plusieurs tests, celle retenue est la suivante :

II.3.4.4.1 Analyse en Composante Principale (PCA) : un outil de contrôle

L'Analyse en Composante Principale est une méthode non supervisée, car aucune donnée préalable n'est donnée sur les échantillons. Elle permet d'obtenir une représentation graphique condensée des données sans a priori. Chaque point (composante) représente un échantillon de l'analyse, les groupes peuvent être identifiés à l'aide d'ellipses.

Cet outil permet de souligner les échantillons aberrants de deux manières : i) un échantillon n'apparaît pas dans le bon groupe et ii) à l'aide de la représentation *observation diagnostics*. Pour ii), les échantillons statistiquement aberrants auront une distance orthogonale et/ou une distance score plus élevée(s) que le reste des autres échantillons.

Dans le cas d'une distance orthogonale plus élevée, cela signifie que l'échantillon n'est pas bien représenté par le modèle PCA, autrement dit, cet échantillon ne répond pas à la tendance générale. Dans le cas d'une distance score trop élevée, cela signifie que l'échantillon est trop éloigné de l'origine de la PCA.

La **Figure 7** illustre la présence d'échantillons aberrants.

Deux échantillons provenant de la souche 18B sont aberrants : un échantillon a une composante se retrouvant dans le groupe des souches 8B, le second à une distance orthogonale trop élevée par rapport aux autres échantillons. Deux échantillons de PAK sont aberrants par leur distance orthogonale trop élevée.

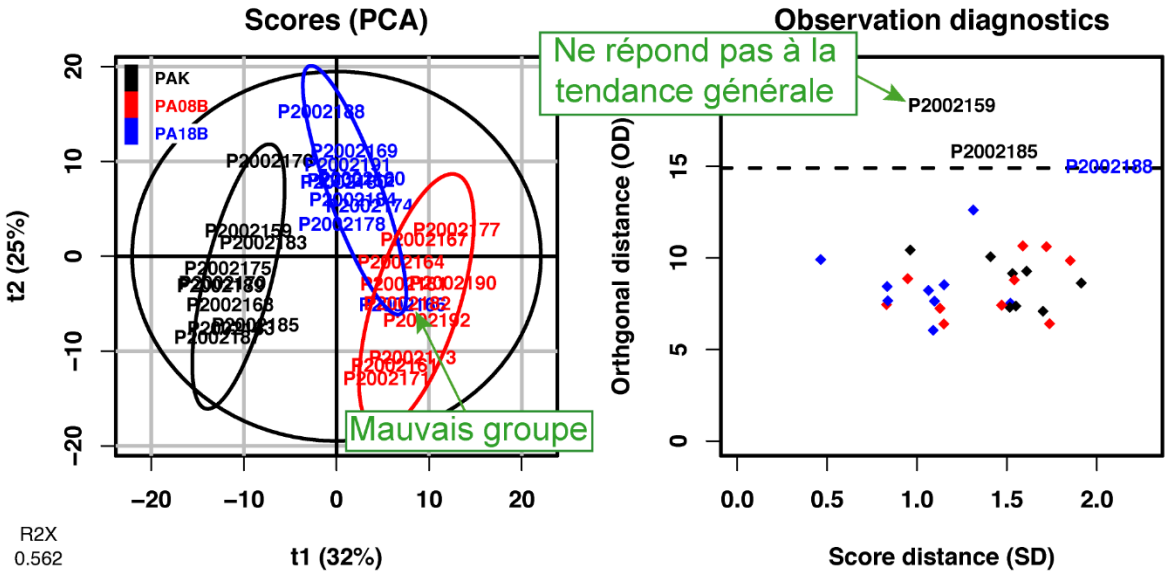


Figure 7 Exemple de PCA (données batch positif) illustrant la présence d'échantillons aberrants.

Afin de s'assurer de la pertinence des résultats, il convient de vérifier que la suppression des échantillons aberrants permet de garder un minimum de réplicats biologiques (au minimum 3, ici 5 ont pu être gardés pour le batch positif comme négatif).

Les échantillons aberrants peuvent être supprimés en utilisant un *generic filter* : **Deleting samples and/or variables according to qualitative values** yes ; **on** sampleMetadata ; **name of the column to filter** sampleMetadata ; **Remove factor when** « nom-de-l'acquisition » (ex P2002159).

II.3.4.4.2 Tri des variables statistiquement significatives

Après le tri des échantillons aberrants, les données sont triées pour ne garder que les variables statistiquement significatives. Pour cela, plusieurs tests univariés sont disponible sur le site W4M.

Dans le cadre de cette étude, le test choisi est le test d'analyse de la variance (ANOVA) car plus de deux groupes sont comparés. Le facteur d'intérêt est *strain* et la valeur maximum pour la p-value est $p < 0.05$.

Après le test, les colonnes strain_anova_fdr (valeurs de la p-value) et strain_anova_sig (significatif si 1) sont ajoutées au fichier *variableMetadata.*

Pour ne garder que les variables statistiquement significatives, il faut utiliser un *generic filter* : **Deleting samples and/or variables according to qualitative values** yes ; **on** variableMetadata ; **name of the column to filter** strain_anova_sig ; **Remove factor when** 0. La matrice de données ne contient alors que la liste de variables significatives avec une p-value < 0.05.

II.3.4.4.3 Comparaison des souches deux à deux par PLS-DA

Avant de comparer les souches deux à deux, des analyses statistiques supervisées, sur la totalité des échantillons, sont réalisées afin de vérifier la qualité des données : appartenance des échantillons dans les bons groupes (souche ou isolat clinique) et bon modèle prédictif (coefficient R2>0.67) pour la PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis). La régression PLS-DA permet une classification sur un facteur qualitatif (souche ou isolat clinique). En complément, la carte de chaleur (*heatmap*) permet de réaliser un clustering hiérarchique des échantillons et des variables.

Afin de déterminer quelles variables permettent la différentiation des souches, les souches ont été comparées deux à deux (outil *generic filter,* colonne à filtrer sur la *sampleMetadata* : *strain*).

Des PLS-DA ont été réalisées pour chaque cas. A chaque fois, la composante n°1 correspondait à la variation entre les souches et la composante n°2 à la variation entre les échantillons d'une même souche. Ainsi, les variables pouvaient être facilement triées selon leur score VIP (positif pour une souche, négatif pour l'autre). Après tri selon les scores VIP, les variables ont été recherchées dans les données brutes afin de vérifier leur cohérence et ne garder qu'un adduit par phospholipide (puisque l'outil CAMERA n'a pas été fonctionnel en raison de la présence d'isotopes, de différents adduits et de fragments en source).

L'utilisation de ces outils statistiques a permis de prendre du recul sur une identification manuelle des lipides. Comme il sera décrit dans le chapitre IV, l'utilisation de ces outils a permis d'identifier deux classes de lipides (acylphosphatidylglycérols et lysocardiolipines) qui n'avaient pas été identifiées chez PAK, alors qu'elles étaient présentes à l'état de traces. Cependant, l'inverse (non identifié par cette approche utilisant des analyses statistiques) a pu être observé aussi : comme décrit en II.3.4.2.2, le peak processing n'a pas permis de prendre en compte les CL dans la matrice de données.

RÉFÉRENCES CHAPITRE II

1. Palmer KL, Aye LM, Whiteley M (2007) Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. J Bacteriol 189 (22):8079-8087. doi:10.1128/JB.01138-07

2. Wilderman PJ, Vasil AI, Martin WE, Murphy RC, Vasil ML (2002) *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. J Bacteriol 184 (17):4792-4799. doi:10.1128/jb.184.17.4792-4799.2002

3. Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M (2015) Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. Proc Natl Acad Sci 112 (13):4110-4115. doi:10.1073/pnas.1419677112

4. Kirchner S, Fothergill JL, Wright EA, James CE, Mowat E, Winstanley C (2012) Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung. J Vis Exp (64):e3857. doi:10.3791/3857

5. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR (2001) Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. J Bacteriol 183 (18):5395-5401. doi:10.1128/jb.183.18.5395-5401.2001

6. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. Can J Physiol Pharmacol 37 (8), doi: 10.1139/o59-099

7. Paglia G, Astarita G (2017) Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility mass spectrometry. Nature Protocols 12 (4), doi: 10.1038/nprot.2017.013

8. Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, Kuligowski J, Wilson ID, Lewis MR, Dunn WB (2018) Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society 14 (6):72. doi:10.1007/s11306-018-1367-3

9. Gathungu RM, Larrea P, Sniatynski MJ, Marur VR, Bowden JA, Koelmel JP, Starke-Reed P, Hubbard VS, Kristal BS (2018) Optimization of Electrospray Ionization Source Parameters for Lipidomics To Reduce Misannotation of In-Source Fragments as Precursor Ions. Anal Chem 90 (22):13523-13532. doi:10.1021/acs.analchem.8b03436

10. Bush MF, Campuzano ID, Robinson CV (2012) Ion mobility mass spectrometry of peptide ions: effects of drift gas and calibration strategies. Anal Chem 84 (16):7124-7130. doi:10.1021/ac3014498

11. Hofmann J, Struwe WB, Scarff CA, Scrivens JH, Harvey DJ, Pagel K (2014) Estimating collision cross sections of negatively charged N-glycans using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. Anal Chem 86 (21):10789-10795. doi:10.1021/ac5028353

12. Pagel K, Harvey DJ (2013) Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: collision cross sections of sodiated N-linked glycans. Anal Chem 85 (10):5138-5145. doi:10.1021/ac400403d

13. Hines KM, May JC, McLean JA, Xu L (2016) Evaluation of Collision Cross Section Calibrants for Structural Analysis of Lipids by Traveling Wave Ion Mobility-Mass Spectrometry. Anal Chem 88 (14):7329-7336. doi:10.1021/acs.analchem.6b01728

14. Giacomoni F, Le Corguille G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Petera M, Duperier C, Tremblay-Franco M, Martin JF, Jacob D, Goulitquer S, Thevenot EA, Caron C (2015) Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 31 (9):1493-1495. doi:10.1093/bioinformatics/btu813

CHAPITRE III ETUDE DE LA SOUCHE DE REFERENCE *P. aeruginosa* PAK

III.1 PRESENTATION ET OBJECTIFS

Lors du second chapitre, nous avons présenté le développement des protocoles de préparation de l'échantillon biologique et d'analyse par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de mobilité ionique et la spectrométrie de masse. Ce troisième chapitre porte sur les résultats obtenus pour la souche *P. aeruginosa* PAK, qui constituera une souche de référence pour l'étude des isolats cliniques. Ce chapitre III s'articule autour des deux thématiques suivantes : i) analyse du lipidome de *P. aeruginosa* PAK, ii) obtention des conditions de croissance bactérienne mimant au mieux celles rencontrées chez l'hôte infecté par *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps, les lipides membranaires de *P. aeruginosa* PAK, cultivée dans le milieu Muller-Hinton Broth (MHB), ont été étudiés par couplage LC-IMS-MS/MS. Une première approche LC-MS/MS a permis d'identifier les phospholipides présents chez *P. aeruginosa*, dont les classes sont les suivantes : phosphatidyléthanolamines (PE), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylglycérols (PG) et cardiolipines (CL).

L'ajout de la mobilité ionique au couplage LC-MS a permis de déterminer leurs sections efficaces de collision (CCS) expérimentales, nouveaux descripteurs moléculaires qui, associés aux mesures de masse précise et aux expériences MS/MS, permettent une identification structurale plus robuste des lipides à étudier.

Comme décrit dans le second chapitre, la détermination de $^{TW}CCS_{N2,}$ avec notre cellule de mobilité ionique TWIMS, nécessite un étalonnage. Pour déterminer les $^{TW}CCS_{N2}$ expérimentales des phospholipides de *P. aeruginosa*, nous avons travaillé avec trois étalons classiquement utilisés pour l'étude de biomolécules (polyalanine, dextran et lipides).

Nous avons en particulier eu recours à des étalons de phospholipides, car certains auteurs recommandent d'utiliser des étalons de même nature chimique que les analytes. Cependant, le nombre d'étalons lipidiques était encore limité, en particulier, aucun étalon de CL n'était alors disponible.

En comparant les $^{TW}CCS_{N2}$ obtenues pour chaque phospholipide avec les trois étalonnages, nous avons observé des valeurs proches mais ayant des écarts systématiques ($\Delta CCS_{étalonnages} \geq$ 2%). De plus, en comparant les $^{TW}CCS_{N2}$ des phospholipides de *P. aeruginosa* communs avec la littérature (ex : PE 32:0 ou PE 34:0), des écarts ont également été observés ($\Delta CCS_{expérimental\text{-}littérature} \geq$ 2%).

De ce fait, pour pallier à ces disparités, nous avons développé une nouvelle approche permettant l'usage d'étalons tels que polyalanine ou dextran, mais impliquant une correction des courbes d'étalonnage à partir des $^{DT}CCS_{N2}$[1] de phospholipides. Cette approche a permis de déterminer les $^{TW}CCS_{N2}$ des lipides de *P. aeruginosa*, en particulier, celles des CL, jusqu'alors non reportées pour les ions $[M-H]^-$ et $[M+H]^+$. Le détail de cette étude fait l'objet d'un premier article, publié dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* sous la référence :

Deschamps, E., *et al.* Determination of the collision cross sections of cardiolipins and phospholipids from *Pseudomonas aeruginosa* by traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry using a novel correction strategy. *Anal Bioanal Chem* 411, 8123–8131 (2019).

Dans un second temps, l'identification du lipidome de *P. aeruginosa* étant obtenu pour la souche PAK cultivée dans un milieu de culture commercial, nous avons pu travailler sur la mise au point d'un milieu de culture devant répondre à deux impératifs : i) se rapprocher le plus possible des conditions biologiques rencontrées chez un patient infecté et ii) obtenir une quantité de matière suffisante pour l'extraction et l'analyse sensible des lipides membranaires. Or, reproduire l'environnement biologique (ici le mucus pulmonaire, les poumons et la respiration), impose de nombreuses contraintes et difficultés en termes de technicité et de moyens. Nous avons travaillé sur la composition du milieu de culture afin de reproduire au mieux la composition chimique d'un mucus pulmonaire modèle [1].

Pour cela, nous avons choisi le milieu SCFM (Synthetic Cystic Fibrosis Medium), publié par *Palmer et al.* [1]*,* en première approche. Puis le milieu ASM (Artificial Sputum Medium), publié par Kirchner *et al.* [2], a été testé mais s'est révélé inutilisable dans le cadre de notre étude.

[1] Les valeurs de CCS mesurées par *drift tube* ne nécessitant pas d'étalonnage, elles peuvent être utilisées comme étalons.

En effet, quoique plus proche du mucus pulmonaire grâce à l'introduction d'ADN et de mucine, les difficultés rencontrées pour la préparation et la stérilisation de ce milieu, ainsi que la trop faible croissance de *P. aeruginosa* PAK dans ces conditions (viscosité trop élevée), nous ont conduits à l'écarter. Pour ces mêmes raisons, nous n'avons pas retenu le milieu SCFM 2, tel que décrit et publié par Turner *et al* [3]..

Nous avons finalement mis au point le milieu SCFM-PC. Il s'agit du milieu SCFM modifié par l'ajout d'un phospholipide, la 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC). En effet, la comparaison des phospholipides produits par *P. aeruginosa* PAK, a révélé une production des PC bien plus faible dans le milieu SCFM que dans le milieu MHB. De ce fait, la DOPC a été introduit dans le milieu SCFM comme source de choline, mais cet ajout est également primordial dans la mesure où la présence de PC a été décrite dans le mucus pulmonaire [4,5]. Le développement et la préparation des milieux SCFM et SCFM-PC ont été décrits dans le chapitre II.

Constatant l'influence des milieux de culture sur les phospholipides produits, nous nous sommes alors interrogés sur l'influence des milieux de culture sur la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*, ainsi que le lien entre la modification de la résistance et la modification de la composition lipidique membranaire. Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une étude multidisciplinaire combinant différentes techniques : mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en antibiotiques, imagerie par Microscopie à Force Atomique (AFM) et spectrométrie de masse. Cette étude est décrite dans le second article, soumis au journal *Biochemica et Biophysica Acta*, sous la référence :

Deschamps, E., *et al.* (2020). "Membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a cystic fibrosis mucus-mimicking medium." *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1863(1): 183482.

III.2 RESULTATS

III.2.1 Etude structurale par mesure des CCS (1er article)

Determination of the collision cross sections of cardiolipins and phospholipids from *Pseudomonas aeruginosa* by traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry using a novel correction strategy

Estelle Deschamps[1,2], Isabelle Schmitz-Afonso[1], Annick Schaumann[2], Emmanuelle Dé[2],

Corinne Loutelier-Bourhis[1], Stéphane Alexandre[2], Carlos Afonso[1]

1 Normandie Univ, COBRA, UMR 6014 and FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

2 Normandie Univ, PBS, UMR 6270 and FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, CURIB, 25 Rue Lucien Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

Corresponding authors:

* Estelle Deschamps estelle.deschamps@etu.univ-rouen.fr

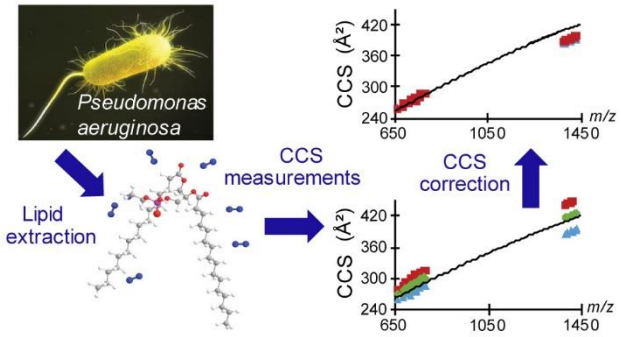
* Corinne Loutelier-Bourhis corinne.loutelier@univ-rouen.fr

Keywords: Ion mobility spectrometry, Mass spectrometry, *Pseudomonas aeruginosa*, Cardiolipins, Phospholipids, CCS calibration

Received: 22 July 2019 / Revised: 16 September 2019 / Accepted: 7 October 2019 / Published online: 27 November 2019

ABSTRACT

Collision Cross Section (CCS) values are descriptors of the 3D structure of ions which can be determined by ion mobility spectrometry (IMS). Currently, most lipidomic studies involving CCS values determination concerns eukaryote samples (*e.g.* human, bovine) and to a lower extent prokaryote samples (*e.g.* bacteria). Here, we report CCS values obtained from Traveling Wave Ion Mobility spectrometry ($^{TW}CCS_{N2}$) measurements from the bacterial membrane of *Pseudomonas aeruginosa* - a bacterium ranked as priority 1 for the R&D of new antibiotics by the World Health Organization. In order to cover the lack of reference compounds which could cover the *m/z* and CCS range of the membrane lipids of *P. aeruginosa*, three calibrants (polyalanine, dextran and phospholipids) were used for the $^{TW}CCS_{N2}$ calibration. A shift from the published lipids CCS values was systematically observed (ΔCCS% up to 9%), thus we proposed a CCS correction strategy. This correction strategy allowed to reduce the shift (ΔCCS%) between our measurements and published values to less than 2%. This correction was then applied to determine the CCS values of *Pseudomonas aeruginosa* lipids which have not been published yet. As a result, 32 $^{TW}CCS_{N2}$ values for $[M+H]^+$ ions and 24 $^{TW}CCS_{N2}$ values for $[M-H]^-$ ions were obtained for four classes of phospholipids (phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylglycerols (PG) and diphosphatidylglycerols —known as cardiolipins (CL)).



INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a bacterium known to have intrinsic resistances to antibiotics and easily acquire genes encoding resistance to new drugs [1]. This bacterium is responsible of 18% of the bacteria-induced nosocomial pneumonia [2] which, combined with its virulence, dramatically increases the death rate of immunocompromised patients. As a result, *P. aeruginosa* is one of the deadliest bacteria in hospitals, thus ranked by the World Health Organization (WHO) as priority number one for the R&D of new antibiotics [3].

Due to the numerous resistance mechanisms of *P. aeruginosa* against antibiotics targeting proteins or enzymes [4], new antibiotic strategies are required. One of the current new drug strategies involves membrane cell destabilization or destruction leading to the bacteria lysis [5]. Thus, it is necessary to know the composition and 3D structure of the membrane cell lipids to develop such antibiotics. However, while the proteome of *P. aeruginosa* has been extensively studied [6–8], only few data have been reported on the membrane cell lipidome of *P. aeruginosa* [9, 10].

Here, we focused on the membrane lipids of *P. aeruginosa* and especially on the identification of the different compounds by ion mobility spectrometry coupled to mass spectrometry (IMS-MS). IMS is a post-ionization separation technique in which analyte ions travel through an inert gas (generally N_2 or He) in a cell under the influence of an electric field. For equal charge state, the most compact ions will have the smallest drift times since they are less slowed down by the buffer gas than the largest ions. Consequently, the IMS separation depends on charge, size and shape [11, 12]. Moreover, drift time (t_D) can be converted to the experimental collision cross section (CCS) of the ion within the buffer gas. CCS values are closely related to the 3D structure of each ion. These experimental CCS can be compared with calculated CCS obtained from theoretical structures using computational methods (*i.e.* trajectory meth- od (TM), projection approximation (PA) and exact hard sphere scattering (EHSS) methods [13]) or CCS predicted by using a machine learning approach [14] as CCS are predictable values [15].

For CCS determination, in most cases, and in particular for non-uniform field instruments such as traveling wave ion mobility spectrometry (TWIMS), the use of calibration is required with compounds of known CCS [16]. As an example, polyalanine, one of the most common calibrant for TWIMS, has been used for lipid CCS determination [17–19]. However, caution must be taken when choosing calibrants since shifts with the literature can be observed when using calibrants not chemically close to the sample [13]. Indeed, Hines *et al.* [20] confirmed that using calibrants structurally close to targets reduced the error in calibrated CCS values obtained with TWIMS. Thus, PCs are recommended for phospholipid calibration in positive mode and PEs for phospholipid calibration in negative mode [21]. Using definite calibrants, CCS values are extremely repeatable (RSD < 0.5%) [22], reproducible in intra-laboratory studies (RSD < 2%) [23] and reproducible in inter-laboratory studies (RSD < 5% using different ion mobility techniques, RSD < 2% using drift-tube) [19]. Consequently, CCS values can be used as an additional descriptor, together with *m/z* and retention time, to increase the confidence in automatic identification [19, 24]. For such reasons, the number of biological sample studies using IMS as a separation and characterization tool has been constantly increasing over the last decade [15, 17–20, 24–30].

Herein, we report the identification of the cell membrane phospholipids of *P. aeruginosa* strain PAK (PAK) and the experimental CCS values of their positive and negative ions. The data were acquired on a TWIMS, with nitrogen as drift gas, yielding $^{TW}CCS_{N2}$ values based on conventional notations [23]. To ensure our $^{TW}CCS_{N2}$ measurements, we used three approaches with different calibrating substances: (i) polyalanine [19] and (ii) lipid calibrants [20] which have been previously used for phospholipids, (iii) dextran which is a calibrant that can cover the required *m/z* and CCS ranges of PAK lipids, from the short fatty acyl chain phospholipids to the cardiolipins. We show here that the use of polyalanine or dextran requires a post-calibration $^{TW}CCS_{N2}$ correction using commercial phospholipid standards. This correction strategy was validated by comparing our corrected $^{TW}CCS_{N2}$ values with $^{DT}CCS_{N2}$ values of the literature. Then, the correction was applied to all the $^{TW}CCS_{N2}$ values of *P. aeruginosa* lipids. It is the first time to our knowledge that experimental $^{TW}CCS_{N2}$ values of both protonated and deprotonated ions of diphosphatidylglycerols—commonly called cardiolipins (CL)—are reported.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

Milli-Q grade water was obtained from an 18 MΩ Milli-Q (EMD Millipore Corporation, Molsheim, France). Methanol, chloroform, acetonitrile and isopropanol were purchased from Fischer Scientific (UK), ammonium formate from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and formic acid from Merck (Germany). Except for chloroform which was HPLC grade, all solvents and buffers used were LC-MS grade. Polyalanine and dextran, used as IMS calibration substances, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Phospholipid standards for the IMS calibration were purchased from Avanti Polar Lipids (AL, USA): PE 6:0/6:0, PE 10:0/10:0, PE 15:0/15:0, PE 17:0/17:0, PC 17:0/17:0, PC 20:0/20:0, PC 24:0/24:0. Leucine enkephalin was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Biological sample preparation

A *P. aeruginosa* strain PAK (PAK) was pre-cultured in a 50-mL centrifugal tube containing 20 µL of bacterial stock solution (Muller-Hinton Broth (MHB)/glycerol, 70/30) and 20 mL of MHB. The flask was incubated overnight at 37 °C on a rotary shaker (140 rpm). After incubation, the pre-culture was used to inoculate 330 mL of MHB at a final concentration of 10^4 colony-forming units (CFU)/mL in a 1 L Erlenmeyer flask. The culture was incubated on a rotary shaker (140 rpm) at 37 °C for 7 h. Then, the culture was centrifuged (2600×*g*, 10 min, 20 °C). The obtained pellet was washed in 10 mL of 100 mM Tris pH 8.0. Ten milliliters of phosphate-buffered saline (PBS) and 3 mg of alginate lyase were added at room temperature during 1 h for the lysis of alginates, produced by *P. aeruginosa* PAK strain, which can be deleterious for mass spectrometric analysis. A pellet was obtained by centrifugation (5000×*g*, 10 min, 20 °C) and washed in 100 mM Tris pH 8.0. The pellet was resuspended in 6 mL of 100 mM Tris pH 8.0 and was subjected to sonication (cycles of 30 s on/10 s off for 2 min). The suspension was then centrifuged (5200×*g*, 20 min, 20 °C). The supernatant, containing the inner and outer membranes, was ultra-centrifuged (70,000×*g*, 1 h, 4 °C), then the resulting pellet was stocked at -20 °C.

Finally, the lipid extraction was carried out according to an adapted Bligh and Dyer protocol [31]. After waiting for the pellet to warm up to room temperature, 500 µL of Milli-Q water was added to dissolve the pellet and then vortex mixed for 5 min. 1.2 mL of methanol was added and then vortex mixed for 15 min. To degrade and eliminate proteolipids, the mixture was centrifuged (4000×*g*, 10 min, 22 °C), then the liquid phase was recovered. After adding 0.6 mL of chloroform, the solution was vortex mixed for 15 min and sonicated for 15 min. 0.6 mL of chloroform was added and then vortex mixed for another 15 min. 0.62 mL of a 1 M ammonium acetate was added and vortex mixed for 15 min. Finally, the mixture was left to rest for 30 min in order to allow the three phase separation (aqueous phase, protein interphase and organic phase). One milliliter of the organic phase was recovered and 0.94 mL of chloroform was added to the aqueous phase for a second liquid-liquid extraction. After stirring for 15 min, the mixture was left to rest again for 30 min. The aqueous phase was removed and organic phases were mixed and evaporated under argon. The organic phase was separated in aliquots and evaporated under argon. Lipid extracts were conserved under argon at -20 °C. To ascertain the quantity of lipids obtained, one aliquot of the lipid extract was diluted in a chloroform: methanol (4/1, v/v) solution. Then, the lipid extract concentration was checked by measuring the surface pressure of Langmuir monolayers.

Sample and calibrant mix solution preparation

The lipids extracted from the membrane of PAK were reconstituted in chloroform/methanol (2/1, v/v) to obtain a concentration of 1 µg/µL which was estimated as previously mentioned. Five microliters of this solution was then diluted in 20 µL of isopropanol/acetonitrile/water (4/3/1, v/v) for analysis. The dextran calibrant solution was prepared from a stock solution (1 mg/mL in water) diluted to 10^{-5} mol/L in water/ acetonitrile (1/1, v/v). The polyalanine calibrant solution was prepared from a stock solution (1 mg/mL in water/acetonitrile (1/1, v/v)) diluted to 10^{-5} mol/L in water/acetonitrile/acetic acid (49.5/49.5/1, v/v). Commercial PEs and PCs used as IMS standards were individually dissolved at 10^{-4} mol/L in chloroform/methanol (2/1, v/v), then mixed and diluted in isopropanol/acetonitrile/water (4/3/1, v/v) to obtain a lipid calibrant solution at 10^{-5} mol/L.

Instrumentation

The LC-IMS-MS experiments were performed using an UHPLC system (Dionex Ultimate 3000 RSLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to an IMS Q-TOF mass spectrometer (SYNAPT G2 HDMS, Waters MS Technologies, Manchester, UK) equipped with an electrospray interface, a traveling wave ion mobility (TWIMS) cell. Data treatment was performed with MassLynx 4.1, DriftScope 2.8 and UNIFI 1.8.2.169 software (Waters, Manchester, UK).

The column used was a 1.0 × 100 mm, Acquity UPLC CSH C18 1.7 µm column (Waters, Manchester, UK) equipped with a 0.2 µm prefilter. The sample tray and column oven temperatures were set at 4 °C and 50 °C, respectively. The injection volume was set at 1 µL. A flow rate of 100 µL/ min was used. Mobile phase A consisted of acetonitrile/ aqueous 10 mM ammonium formate (60/40) + 0.1 % formic acid and mobile phase B of isopropanol/acetonitrile/aqueous 10 mM ammonium formate (88/8/4) + 0.1 % formic acid. The gradient elution was the following: 0–3 min, 6–62% B; 3–8 min, 62–70% B; 8–13 min, 70% B; 13–15 min, 70–89% B; 15–20 min, 89% B; 20–22 min, 89–100% B; 22–26 min, 100% B; 26–27 min, 100–6% B; 27–30 min, 6% B.

LC-IMS-MS data were acquired in triplicate in positive and negative ion modes. The source parameters were in positive mode: capillary, extraction cone and cone voltages set at 3 kV, 6 V and 50 V, respectively; the cone gas and desolvation gas flows were 40 L/h and 600 L/h, respectively; and the desolvation temperature was 400 °C. For negative ion mode, the capillary, extraction cone and cone voltage were − 2.4 kV, 5 V and 45 V, respectively; the cone gas and desolvation gas flows were 60 L/h and 900 L/h, respectively; and the desolvation temperature was 500 °C.

The IMS parameters were helium cell flow 180 mL/min, traveling wave height 40 V, IMS cell nitrogen flow 70 mL/min (3.01 mbar) and traveling wave velocity 600 m/s.

Mass spectra were recorded over a *m/z* 50–2000 range in resolution mode (resolution 20 000 FWHM). External *m/z* calibration was performed with a sodium formate solution.

Lockmass correction was performed by infusing leucine enkephalin (2 ng/µL, 3 µL/min) via the LockSpray™ interface (reference scan frequency, lock spray capillary and cone voltage of 10 s, 3.5 kV and 40 V, respectively, in positive mode and 10 s, 2.5 kVand 30 V, respectively, in negative mode).

MS/MS experiments were performed in both positive and negative ionization mode. Precursor ions were selected in the quadrupole, at a resolution of 1 *m/z* unit, using retention time windows in the acquisition method. Several acquisitions were performed to obtain the MS/MS spectra for all co-eluting lipids. The collisional activation was performed in the trap cell using argon as target gas (6.10^{-3} mbar) and a collision energy of 35 eV. MS/MS spectra were processed using MassLynx 4.1 (Waters).

For calibrants, raw data were first opened with DriftScope 2.8 (Waters) in order to only select the singly charged ions on the 2D map (drift times plotted against *m/*z). Ion mobility spectra were then exported and processed with MassLynx 4.1 (Waters). For PAK samples, raw data were processed with UNIFI 1.8.2.169 (Waters). PAK lipids were first manually identified in order to create a home-made library from retention time (t_R) and *m/*z, for each of the lipids described in this publication. This library was then used to automatically obtain the lipids t_D.

Collision cross section measurements

Due to the use of an inhomogeneous electric field in the TWIMS cell, an external CCS calibration is required. For this purpose, we used singly charged ions of three published calibrants: dextran oligomers [32, 33], polyalanine oligomers [34] and phospholipids (PEs and PCs) [20]. Thus, these calibrant solutions were individually infused for 2 min in positive and negative modes. Ion mobility spectra were fitted with a Gauss function [35] using OriginPro 2016 9.3.226 (OriginLab Corporation) to obtain the drift time of each calibrant ion. Using charge- and mass-independent $^{DT}CCS_{N2}$ values (CCS') and drift times (t_D), calibration curves ln CCS' = f(ln t_D), for singly charged positive and negative ions, were obtained in nitrogen according to the procedure of Smith [16]. LC-IMS-MS data of the PAK sample were processed with the UNIFI software (Waters) in order to automatically obtain drift time values.

Drift time values were collected for retention time variation lower than 0.3 min, mass error lower than 5 ppm and relative intensity higher than 0.1%.

Then, $^{TW}CCS_{N2}$ were determined using the calibration curve established previously. Finally, the $^{TW}CCS_{N2}$ values were corrected using the CCS correction strategy that will be developed in the results section of this paper. This correction involves plotting $^{DT}CCS_{N2}$ against $^{TW}CCS_{N2}$, for the phospholipid CCS standards, using calculation spreadsheets (see Electronic Supplementary Material (ESM) ESM_3).

RESULTS AND DISCUSSION

Lipid profiling

The LC-IMS-MS analysis of PAK membrane extract is reported in Fig. 1. The LC dimension allows the separation of the different classes of lipids, *i.e.* phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylglycerols (PG) and cardiolipins (CL). Using our chromatographic conditions, the following separation could be achieved: PC, PE and PG classes (two fatty acid chains on phospholipids) from 8.5 to 12 min and CL class (four fatty acid chains on phospholipids) from 18.8 to 20.5 min. Some co-elution was still observed for isomers of phospholipids exhibiting different combinations of fatty acyl chains (*e.g.* PG 16:1/16:0 and PG 18:1_14:0, see ESM_1 Fig. S1) and for phospholipids consisted of fatty acyl chains showing two methylene and one more double bond (noted as DBE for double bond equivalent) than other phospholipids of the same class (*e.g.* PE 30:0, PE 32:1 and PE 34:2). Lipid identification was achieved thanks to the orthogonal MS dimension, more precisely from MS/MS data and accurate mass measurements.

Thus, 41 lipids were clearly identified in the membrane of PAK (see ESM_1: Tables S1, S2, and S3): 28 phospholipids (8 PGs, 13 PEs and 7 PCs) and 13 CLs. Please note that with our analytical conditions (*i.e.* buffered mobile phases), the cardiolipins were detected as singly charged species but not as doubly charged species—as previously described with other analytical conditions [36]. The lipid annotation is based on the nomenclature of Liebisch *et al.* [37].

To our knowledge, this study is the first one on the membrane lipids of the strain PAK —other studies were performed on the strains PAO1 and PA14 [9, 10]. No relevant differences between the membrane lipids of the strains PAK, PAO1 and PA14 were observed.

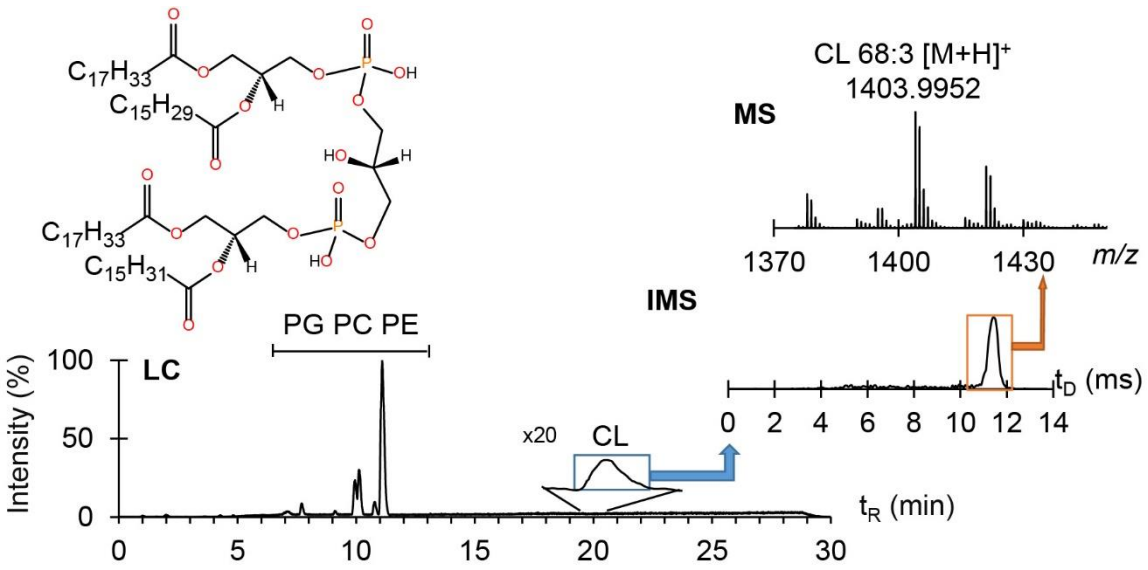


Fig. 1 Base Peak Chromatogram (BPC), extracted ion mobility spectrum and mass spectrum from LC-IMS-MS analysis of PAK membrane extract. The enlarged retention time zone corresponds to cardiolipins. The ion mobility spectrum was extracted for CL 68:3 (*m/z* 1403.9952). The mass spectrum is obtained by integrating the ion mobility spectra from 10.5 ms to 12.5 ms. A possible structure for *m/z* 1403.9952 is given on the left.

$^{TW}CCS_{N2}$ determination, comparison with published CCS values and post-calibration correction

Most of the CCS reported in the literature for phospholipids (PL) have been obtained using either a drift-tube IMS instrument [15, 20, 38, 39] or a TWIMS cell calibrated with polyalanine ions [17–19]. In the latter case, Hines *et al.* [20, 25] had previously demonstrated that the $^{TW}CCS_{N2}$ determination of PL requires TWIMS cell calibration with PL calibrants. However, obtaining the most representative $^{TW}CCS_{N2}$ values would require to have lipid calibration curves for each chemical class present in the sample (PC, PE, PG or CL) and for each number of double bonds on the fatty acyl chains (0, 1 or 2).

Because of the lack of such calibrants, we chose to use a single calibrant to determine the CCS values of all the PAK membrane lipids. For this reason, we choose the dextran calibrant which covers the required *m/z* and CCS ranges, in particular for CLs.

Please note that an extrapolated polyalanine calibration was considered as well, but for clarity, the following methodology will be described for the dextran calibration first. The calibration curves obtained with dextran (in both positive and negative modes) were then used for our PAK sample (see ESM_2). Thus, the $^{TW}CCS_{N2}$ of $[M+H]^+$ were measured for PEs, PCs and CLs in positive ion mode while the $^{TW}CCS_{N2}$ of $[M-H]^-$ were measured for PEs, PGs and CLs in negative ion mode. Triplicate of $^{TW}CCS_{N2}$ measurements were carried out for each sample (in positive and negative ion mode) and gave repeatable CCS values ($0.1\% \leq \%RSD < 0.4\%$, $n = 3$). However, when we compared our measured $^{TW}CCS_{N2}$ values with those published (5 PEs and 6 PCs inpositive mode, 6 PEs and 4 PGs in negative mode), shifts in CCS were systematically observed ($\Delta CCS \geq 2\%$) (ESM_1: Tables S4 and S5). This is also illustrated in Fig. 2a: the experimental $^{TW}CCS_{N2}$ values obtained after dextran calibration in positive ion mode (red squares) are significantly shifted towards higher CCS values compared with the lipid CCS values from the literature [20] (extrapolated black line).

In order to avoid this issue, we propose here a CCS correction strategy to reduce the shift due to the dextran calibration. The CCS correction strategy was carried out, using the IMS lipid calibrants (PEs and PCs, see ESM_2), by plotting correlation curves between their experimental $^{TW}CCS_{N2}$ calibrated with dextran and their published $^{DT}CCS_{N2}$ [20]. In both positive and negative ion mode, a linear regression was obtained with high coefficient of determination ($R2 \geq 0.999$, ESM_3). This post-calibration correction was then applied to the $^{TW}CCS_{N2}$ values of lipids present in PAK strain (red squares of Fig. 2b). Please note that previous work had shown that the fatty acyl chains of phospholipids extracted from *P. aeruginosa* can be different from the ones of eukaryotes —especially odd-chains which can be cyclopropylated or methylated [9, 40]. However, considering the resolving power of TWIMS, linear, cyclopropylated or methylated fatty acyl chain isomers would not be separated. Hence, we could use easily available phospholipid standards rather than bacterial phospholipids for the correction.

In parallel, as proof of concept for our correction strategy, we also determined $^{TW}CCS_{N2}$ for PAK lipids using polyalanine or lipid calibration curves (see ESM_2). These calibration curves were extrapolated to higher CCS values in order to exceed those of CLs.

The experimental $^{TW}CCS_{N2}$ for PAK lipids, using these extrapolated calibration curves, are reported in Fig. 2a as green (polyalanine cal) and blue (PL cal) points. One can notice that the CCS range of our $^{TW}CCS_{N2}$ obtained with polyalanine calibration (ESM_1: Table S2) are consistent with the cardiolipins $^{TW}CCS_{N2}$ of $[M+2K]^{2+}$ and $[M-2H]^{2-}$ from *Escherichia coli* recently published by Hines *et al.* (CCS range of 380−425 Å^2) [25]. The correction strategy, previously described for the $^{TW}CCS_{N2}$ calibrated with dextran, was also applied for $^{TW}CCS_{N2}$ values calibrated with polyalanine (green points of Fig. 2b).

Figure 2b shows that the correction strategy applied for $^{TW}CCS_{N2}$ values calibrated by either dextran or polyalanine, and the $^{TW}CCS_{N2}$ calibration —without correction— with PL, lead to convergent experimental $^{TW}CCS_{N2}$ values. Moreover, for CLs, these convergent $^{TW}CCS_{N2}$ values are smaller than the extrapolated PE/PC $^{DT}CCS_{N2}$ black line. This result suggests that cardiolipins are more compact (smaller $^{TW}CCS_{N2}$ value) than any PE or PC which would have a similar m/z value (extrapolated black line). This might be explained by the fact that cardiolipins are biosynthesized from a phosphatidylglycerol and a phosphatidic acid [41] which have smaller CCS values than PEs or PCs [15]. The details of all the $^{TW}CCS_{N2}$ values we measured are reported in the supplementary information (ESM_1: Tables S1 to S3): $^{TW}CCS_{N2}$ values using the three types of calibration (dextran (Table S1), polyalanine (Table S2) and lipids (Table S3)) and the two corrections (dextran corrected with lipids (Table S1) and polyalanine corrected with lipids (Table S2).

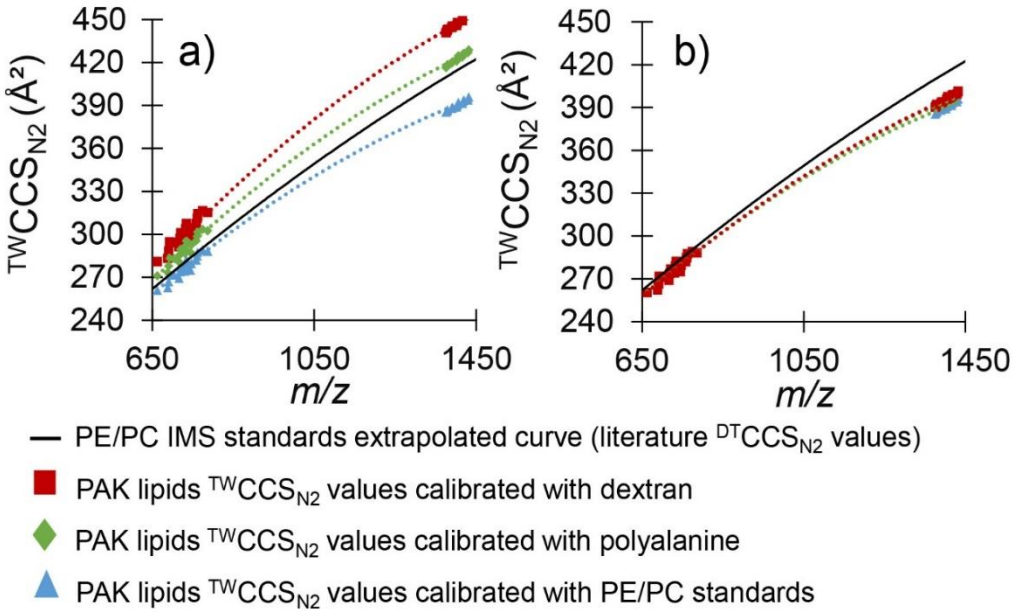


Fig. 2 $^{TW}CCS_{N2}$ plotted against *m/z* for positive ions of PAK lipids. (a) represents $^{TW}CCS_{N2}$ of PAK lipids before correction of the $^{TW}CCS_{N2}$ values. (b) represents $^{TW}CCS_{N2}$ of PAK lipids after the correction. In both (a) and (b), the black line represents the lipid IMS standards extrapolated curve ($^{DT}CCS_{N2}$ values from Hines *et al.* [20]). $^{TW}CCS_{N2}$ of PAK lipids are represented by red squares when calibrated with dextran, green squares when calibrated with polyalanine and blue squares when calibrated with lipid standards.

In order to validate our correction strategy (calibration with dextran followed by a post-calibration correction with lipids, as mentioned above), the corrected $^{TW}CCS_{N2}$ values were compared with the published ones. Note that several phospholipids (PEs, PGs and PCs) present in our sample had published CCS values (17 in positive mode and 16 in negative mode). On the other hand, CCS values of protonated and deprotonated prokaryote cardiolipins had never been reported. Considering that published CCS values from different ion mobility techniques have some disparities ($0.04\% \leq \Delta CCS\% \leq 3.84\ \%$, ESM_1: Tables S6 and S7), our $^{TW}CCS_{N2}$ are consistent with the CCS values from the literature, as reported in Table S5. One can note that the CCS disparities in the literature could be due to differences in lipid structures (*e.g.* double bond location and geometry cis/trans). This structural heterogeneity would give rise to small, but measurable, CCS difference [38].

In addition, one can observe that the correction strategy allows a shift reduction to less than 2% between our corrected $^{TW}CCS_{N2}$ and those reported by Zhou *et al.* [15] and Hines *et al.* [20], as shown in Table 1. Since such deviation is acceptable for inter-laboratory reproducibility, we can highlight the validation of the post-calibration correction strategy. Furthermore, the $^{TW}CCS_{N2}$ values of phospholipids extracted from PAK membrane are similar to the CCS values of lipid standards from the literature; therefore, we can suppose that the phospholipids in PAK have similar tridimensional structures in gas phase than the phospholipids used by Zhou *et al.* and Hines *et al.* (synthetic standards) [15, 20]. Besides, a similar decrease of the shift between our experimental $^{TW}CCS_{N2}$ values and those of the literature was observed for the experimental CCS values obtained by polyalanine calibration and post-calibration lipid correction, as illustrated in Fig. 2b. All comparisons with the literature are given in ESM_1 Tables S4 and S5.

Table 1. Comparison of our experimental $^{TW}CCS_{N2}$, from PAK, with the published values. a and b correspond to relative shifts between our CCS and $^{DT}CCS_{N2}$ from a: Zhou *et al.* (2017) [15] and b: Hines *et al.* (2016) [20], respectively.

	Positive ion mode $[M+H]^+$					
Lipid	Calibration using dextran			After calibration correction		
	$^{TW}CCS_{N2}$ (Å^2)	ΔCCS^a (%)	ΔCCS^b (%)	$^{TW}CCS_{N2}$ (Å^2)	ΔCCS^a (%)	ΔCCS^b (%)
PC 32:0	307.6	8.0	8.9	282.0	-1.0	-0.2
PE 32:0	294.6	7.8	8.5	271.4	-0.7	0.0
PE 34:0	301.0	7.5	8.5	276.6	-1.2	-0.3
PE 34:1	297.1	7.4	8.7	273.4	-1.2	0.0

	Negative ion mode $[M-H]^-$					
Lipid	Calibration using dextran			After calibration correction		
	$^{TW}CCS_{N2}$ (Å^2)	ΔCCS^a (%)	ΔCCS^b (%)	$^{TW}CCS_{N2}$ (Å^2)	ΔCCS^a (%)	ΔCCS^b (%)
PE 32:0	274.4	5.6	5.8	257.1	-1.1	-0.9
PE 34:0	281.4	5.7	6.0	263.4	-1.1	-0.8
PE 34:1	279.5	5.5	5.7	261.6	-1.3	-1.1

CCS correction application

Once the post-calibration correction was validated, this methodology was then extended to all the lipids of PAK. Table 2 reports the $^{TW}CCS_{N2}$ values of lipids in PAK extracts which constitute new findings, in particular for CLs. Indeed, the $^{TW}CCS_{N2}$ of $[M+H]^+$ and $[M-H]^-$ are determined for the first time for PAK cardiolipins (Table 2, ESM_1: Tables S1 to S3). As previously mentioned, the doubly charged cardiolipins were not detected since the ionization of the singly charged species was favored by our analytical conditions. In the case of phospholipids, we could verify that our corrected experimental CCS were consistent with those of phospholipids de- scribed in literature (ESM_1: Tables S4 and S5).

In total, 56 $^{TW}CCS_{N2}$ values were measured and corrected, including 32 for positive ions and 24 for negative ions. Using the dextran calibration, the $^{TW}CCS_{N2}$ range was from 303 Å² to 455 Å² in positive mode and from 266 Å² to 418 Å² in negative mode, whereas when the dextran calibration was corrected, the $^{TW}CCS_{N2}$ range was from 278 Å² to 401 Å² in positive mode and from 249 Å² to 387 Å² in negative mode. More precisely for cardiolipins, the $^{TW}CCS_{N2}$ range was from 441 Å² to 455 Å² in positive mode and from 411 Å² to 418 Å² in negative mode, whereas when the dextran calibration was corrected, the $^{TW}CCS_{N2}$ range was from 390 Å² to 401 Å² in positive mode and from 380 Å² to 387 Å² in negative mode. Moreover, for cardiolipins in negative mode, the $^{TW}CCS_{N2}$ values were consistent with the first two $^{DT}CCS_{N2}$ of CL (CL 72:6 and CL 72:7) described from bovine heart by Groessl *et al.* [38].

Table 2. $^{TW}CCS_{N2}$ values, with dextran calibration and lipid correction, for phospholipids extracted from the membrane of PAK.

Origin	Lipid	$^{TW}CCS_{N2}$ (Å²) for $[M+H]^+$	$^{TW}CCS_{N2}$ (Å²) for $[M-H]^-$
Phospholipids extracted from the membrane of PAK	PE 30:1	260.2	249.7
	PE 33:1	271.0	258.7
	PE 35:1	276.0*	264.9
	PG 30:0	nd	258.3
	PG 35:2	nd	269.7
	CL 66:3	390.1	380.4
	CL 66:2	391.2	381.6
	CL 66:1	391.9	nd
	CL 67:3	392.8	nd
	CL 67:2	393.7	nd
	CL 68:4	394.0	nd
	CL 68:3	395.7	nd
	CL 68:2	397.4	386.9
	CL 69:4	396.7	nd
	CL 69:3	398.3	nd
	CL 69:2	399.0	nd
	CL 70:4	399.4	nd
	CL 70:3	401.2	nd

These values are new to the literature, apart from the CCS noted with *. nd: not detected.

PAK lipid $^{TW}CCS_{N2}$ vs m/z correlation

Fig. 3 illustrates the correlation between the corrected $^{TW}CCS_{N2}$ values and *m/z* values in negative mode: for all lipids in Fig. 3a and for PEs and PGs in Fig. 3b. As shown in Fig. 3a, a polynomial fit for $^{TW}CCS_{N2}$ plotted against *m/z* in negative mode (> 0.999) was observed. A polynomial fit (> 0.99) was also observed for positive values (ESM_1: Fig. S9). By plotting $^{TW}CCS_{N2}$ against *m/z* for each chemical family, we can observe that PGs, PEs and CLs present similar slopes.

In negative ion mode, deprotonated molecules of PEs and PGs present close $^{TW}CCS_{N2}$ values for a same *m/z* range (Fig. 3b), also for PEs and PGs constituted of the same acyl chains. The $^{TW}CCS_{N2}$ of PGs are slightly higher than the ones of the PEs (*e.g.* $^{TW}CCS_{N2}$(PG 34:1) = 268.5 Å² > $^{TW}CCS_{N2}$ (PE 34:1) = 261.6 Å²). A similar trend was observed for PEs and PCs, in positive mode, with PC's $^{TW}CCS_{N2}$ being slightly higher than the ones of the PEs (ESM_1: Fig. S9).

Moreover, as shown in Fig. 3b, we can make several observations. First, as previously described by Jackson *et al.* [28], the CCS linearly decreases when the number of double-bonds increases in the fatty acyl chains for definite chain lengths (*e.g.* C32:0, C32:1 and C32:2). Secondly, the slope observed from this linear pattern was identical for every chemical classes, leading to a symmetrical figure, as described by Leaptrot *et al* [39]. Thirdly, for positive ions (ESM_1: Fig. S9), CCS values of phospholipids with odd number of carbon atoms in the fatty acyl chains and with 0, 1 or 2 DBE were closer than the CCS values of phospholipids with even number of carbon atoms. All of these observations could be explained by the folding of the fatty acyl chain with the increase of the DBE, as previously described [15,28,42].

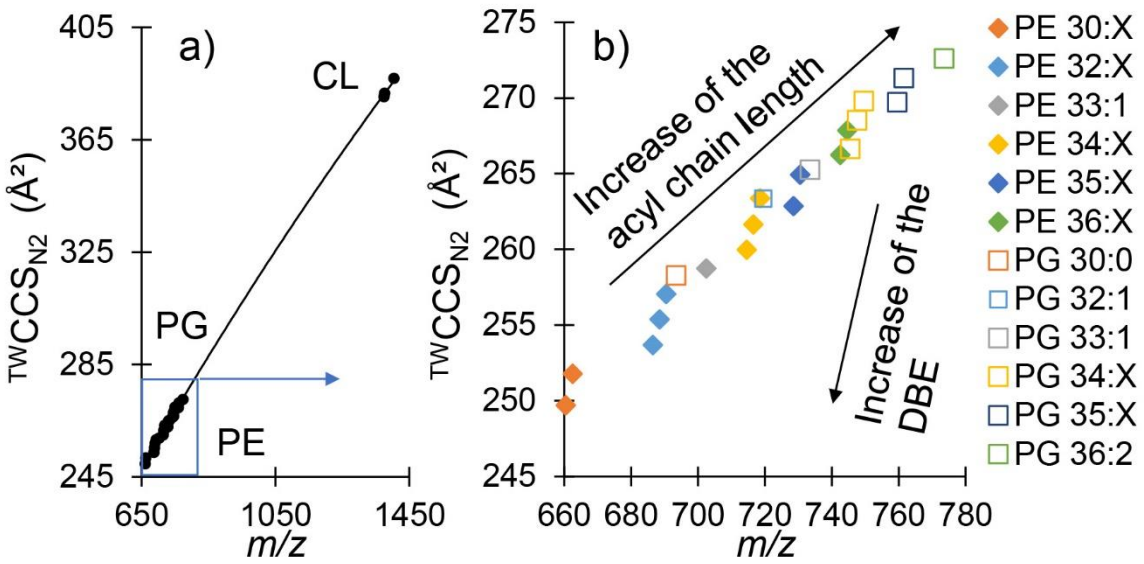


Fig. 3 $^{TW}CCS_{N2}$ values plotted against *m/z* for negative ions. 3a represents values for every class of phospholipids, whereas 3b only represents values for PEs and PGs. 3b was inspired from the Fig. 4 from Zhou et al (2017) [15]. PGs are represented by squares, PEs by diamonds. X refers to the number of double-bonds on the fatty acid moiety of the phospholipid which can be 0, 1 or 2 for PEs and PGs.

CONCLUSION

In this study, new knowledge about the membrane phospholipids of *P. aeruginosa* was obtained. In particular, new prokaryote lipid CCS values were determined. We worked on a methodology to allow the measurement of $^{TW}CCS_{N2}$ within high *m/z* and CCS ranges. Our work resulted in a CCS correction strategy. After applying the correction, we showed that the CCS deviation observed between the CCS values of the literature and the ones measured with the dextran or polyalanine calibration could be lessened. We measured 32 $^{TW}CCS_{N2}$ values in positive ionization mode and 24 in negative mode, with a good repeatability (RSD ≤ 0.4%). In particular, we measured 18 new $^{TW}CCS_{N2}$ values for cardiolipins, a unique class of phospholipids whose CCS values were lacking in the literature for protonated and deprotonated molecules. Such values can be used to complete existing CCS databases. Moreover, regarding antibiotic research against *P. aeruginosa*, cardiolipins are of high interest as a recent study described new antibiotic therapies targeting cardiolipins [43].

FUNDING INFORMATION

The authors gratefully acknowledge European Regional Development Fund (ERDF, no. HN0001343), Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029) and Région Normandie for their financial support.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R (2005) Nosocomial Infections Due to Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and Treatment Options. PHARMACOTHERAPY 25 (10):11

2. Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P (2018) Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. American journal of respiratory and critical care medicine 197 (6):708-727. doi:10.1164/rccm.201705-1043SO

3. Tacconelli E, *et al.* (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases 18 (3):318-327. doi:10.1016/s1473-3099(17)30753-3

4. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context 7:212527. doi:10.7573/dic.212527

5. Escriba PV (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. Trends Mol Med 12 (1):34-43. doi:10.1016/j.molmed.2005.11.004

6. Gaviard C, Jouenne T, Hardouin J (2018) Proteomics of *Pseudomonas aeruginosa*: the increasing role of post-translational modifications. Expert Rev Proteomics 15 (9):757-772. doi:10.1080/14789450.2018.1516550

7. Kamath KS, Krisp C, Chick J, Pascovici D, Gygi SP, Molloy MP (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Proteome under Hypoxic Stress Conditions Mimicking the Cystic Fibrosis Lung. Journal of proteome research 16 (10):3917-3928. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00561

8. Hare NJ, Solis N, Harmer C, Marzook NB, Rose B, Harbour C, Crossett B, Manos J, Cordwell SJ (2012) Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. BMC Microbiol 12:16. doi:10.1186/1471-2180-12-16

9. Benamara H, Rihouey C, Abbes I, Mlouka MAB, Hardouin J, Jouenne T, Alexandre S (2014) Characterization of Membrane Lipidome Changes in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Growth on Glass Wool. Plos One 9 (9):9. doi:10.1371/journal.pone.0108478.g001

10. Benamara H, Rihouey C, Jouenne T, Alexandre S (2011) Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta 1808 (1):98-105. doi:10.1016/j.bbamem.2010.09.004

11. Ewing MA, Glover MS, Clemmer DE (2016) Hybrid ion mobility and mass spectrometry as a separation tool. J Chromatogr A 1439:3-25. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.080

12. Cumeras R, Figueras E, Davis CE, Baumbach JI, Gracia I (2015) Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation. Analyst 140 (5):1376-1390. doi:10.1039/c4an01100g

13. Gabelica V, Marklund E (2018) Fundamentals of ion mobility spectrometry. Curr Opin Chem Biol 42:51-59. doi:10.1016/j.cbpa.2017.10.022

14. Plante PL, Francovic-Fontaine E, May JC, McLean JA, Baker ES, Laviolette F, Marchand M, Corbeil J (2019) Predicting Ion Mobility Collision Cross-Sections Using a Deep Neural Network: DeepCCS. Anal Chem 91 (8):5191-5199. doi:10.1021/acs.analchem.8b05821

15. Zhou Z, Tu J, Xiong X, Shen X, Zhu ZJ (2017) LipidCCS: Prediction of Collision Cross-Section Values for Lipids with High Precision To Support Ion Mobility-Mass Spectrometry-Based Lipidomics. Analytical chemistry 89 (17):9559-9566. doi:10.1021/acs.analchem.7b02625

16. Smith DP, Knapman TW, Campuzano I, Malham RW, Berryman JT, Radford SE, Ashcroft AE (2009) Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies. European journal of mass spectrometry 15 (2):113-130. doi:10.1255/ejms.947

17. Paglia G, Astarita G (2017) Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility-mass spectrometry. Nat Protoc 12 (4):17. doi:10.1038/nprot.2017.013

18. Paglia G, Kliman M, Claude E, Geromanos S, Astarita G (2015) Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis. Anal Bioanal Chem 407:12

19. Paglia G, Williams JP, Menikarachchi L, Thompson JW, Tyldesley-Worster R, Halldorsson S, Rolfsson O, Moseley A, Grant D, Langridge J, Palsson BO, Astarita G (2014) Ion mobility derived collision cross sections to support metabolomics applications. Analytical chemistry 86 (8):3985-3993. doi:10.1021/ac500405x

20. Hines KM, May JC, McLean JA, Xu L (2016) Evaluation of Collision Cross Section Calibrants for Structural Analysis of Lipids by Traveling Wave Ion Mobility-Mass Spectrometry. Analytical chemistry 88 (14):7329-7336. doi:10.1021/acs.analchem.6b01728

21. Levy AJ, Oranzi NR, Ahmadireskety A, Kemperman RHJ, Wei MS, Yost RA (2019) Recent progress in metabolomics using ion mobility-mass spectrometry. TrAC Trends in Analytical Chemistry 116:274-281. doi:10.1016/j.trac.2019.05.001

22. Tejada-Casado C, Hernandez-Mesa M, Monteau F, Lara FJ, Olmo-Iruela MD, Garcia-Campana AM, Le Bizec B, Dervilly-Pinel G (2018) Collision cross section (CCS) as a complementary parameter to characterize human and veterinary drugs. Anal Chim Acta 1043:52-63. doi:10.1016/j.aca.2018.09.065

23. May JC, Morris CB, McLean JA (2017) Ion Mobility Collision Cross Section Compendium. Analytical chemistry 89 (2):1032-1044. doi:10.1021/acs.analchem.6b04905

24. Schrimpe-Rutledge AC, Sherrod SD, McLean JA (2018) Improving the discovery of secondary metabolite natural products using ion mobility-mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol 42:160-166. doi:10.1016/j.cbpa.2017.12.004

25. Hines KM, Xu L (2019) Lipidomic consequences of phospholipid synthesis defects in Escherichia coli revealed by HILIC-ion mobility-mass spectrometry. Chemistry and physics of lipids 219:15-22. doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.01.007

26. Zheng X, Aly NA, Zhou Y, Dupuis KT, Bilbao A, Paurus VL, Orton DJ, Wilson R, Payne SH, Smith RD, Baker ES (2017) A structural examination and collision cross section database for over 500 metabolites and xenobiotics using drift tube ion mobility spectrometry. Chem Sci 8 (11):7724-7736. doi:10.1039/c7sc03464d

27. Ridenour WB, Kliman M, McLean JA, Caprioli RM (2010) Structural characterization of phospholipids and peptides directly from tissue sections by MALDI traveling-wave ion mobility-mass spectrometry. Analytical chemistry 82 (5):1881-1889. doi:10.1021/ac9026115

28. Jackson SN, Ugarov M, Post JD, Egan T, Langlais D, Schultz JA, Woods AS (2008) A study of phospholipids by ion mobility TOFMS. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 19 (11):1655-1662. doi:10.1016/j.jasms.2008.07.005

29. Harris RA, Leaptrot KL, May JC, McLean JA (2019) New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. TrAC-Trend Anal Chem 116:316-323. doi:10.1016/j.trac.2019.03.031

30. Hinz C, Liggi S, Griffin JL (2018) The potential of Ion Mobility Mass Spectrometry for high-throughput and high-resolution lipidomics. Curr Opin Chem Biol 42:42-50. doi:10.1016/j.cbpa.2017.10.018

31. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37 (8):7

32. Hofmann J, Struwe WB, Scarff CA, Scrivens JH, Harvey DJ, Pagel K (2014) Estimating collision cross sections of negatively charged N-glycans using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. Analytical chemistry 86 (21):10789-10795. doi:10.1021/ac5028353

33. Pagel K, Harvey DJ (2013) Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: collision cross sections of sodiated N-linked glycans. Analytical chemistry 85 (10):5138-5145. doi:10.1021/ac400403d

34. Bush MF, Campuzano ID, Robinson CV (2012) Ion mobility mass spectrometry of peptide ions: effects of drift gas and calibration strategies. Analytical chemistry 84 (16):7124-7130. doi:10.1021/ac3014498

35. Domalain V, Hubert-Roux M, Tognetti V, Joubert L, Lange CM, Rouden J, Afonso C (2014) Enantiomeric differentiation of aromatic amino acids using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. Chem Sci 5 (8):3234-3239. doi:10.1039/c4sc00443d

36. Garrett TA, Kordestani R, Raetz CRH (2007) Quantification of Cardiolipin by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 433:213-230. doi:10.1016/s0076-6879(07)33012-7

37. Liebisch G, Vizcaino JA, Kofeler H, Trotzmuller M, Griffiths WJ, Schmitz G, Spener F, Wakelam MJ (2013) Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. Journal of lipid research 54 (6):1523-1530. doi:10.1194/jlr.M033506

38. Groessl M, Graf S, Knochenmuss R (2015) High resolution ion mobility-mass spectrometry for separation and identification of isomeric lipids. Analyst 140 (20):6904-6911. doi:10.1039/c5an00838g

39. Leaptrot KL, May JC, Dodds JN, McLean JA (2019) Ion mobility conformational lipid atlas for high confidence lipidomics. Nature communications 10 (1):985. doi:10.1038/s41467-019-08897-5

40. Chao J, Wolfaardt GM, Arts MT (2010) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. Can J Microbiol 56 (12):1028-1039. doi:10.1139/W10-093

41. Schlame M (2008) Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. Journal of lipid research 49 (8):1607-1620. doi:10.1194/jlr.R700018-JLR200

42. Kim HI, Kim H, Pang ES, Ryu EK, Beegle LW, Loo JA, Goddard WA, Kanik I (2009) Structural characterization of unsaturated phosphatidylcholines using traveling wave ion mobility spectrometry. Analytical chemistry 81 (20):8289-8297. doi:10.1021/ac900672a

43. El Khoury M, Swain J, Sautrey G, Zimmermann L, Van Der Smissen P, Décout J-L, Mingeot-Leclercq M-P (2017) Targeting Bacterial Cardiolipin Enriched Microdomains: An Antimicrobial Strategy Used by Amphiphilic Aminoglycoside Antibiotics. Sci Rep 7 (1). doi:10.1038/s41598-017-10543-3

FICHIERS SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 1

Supplementary Information S1: MS/MS spectrum and $^{TW}CCS_{N2}$ measurements.

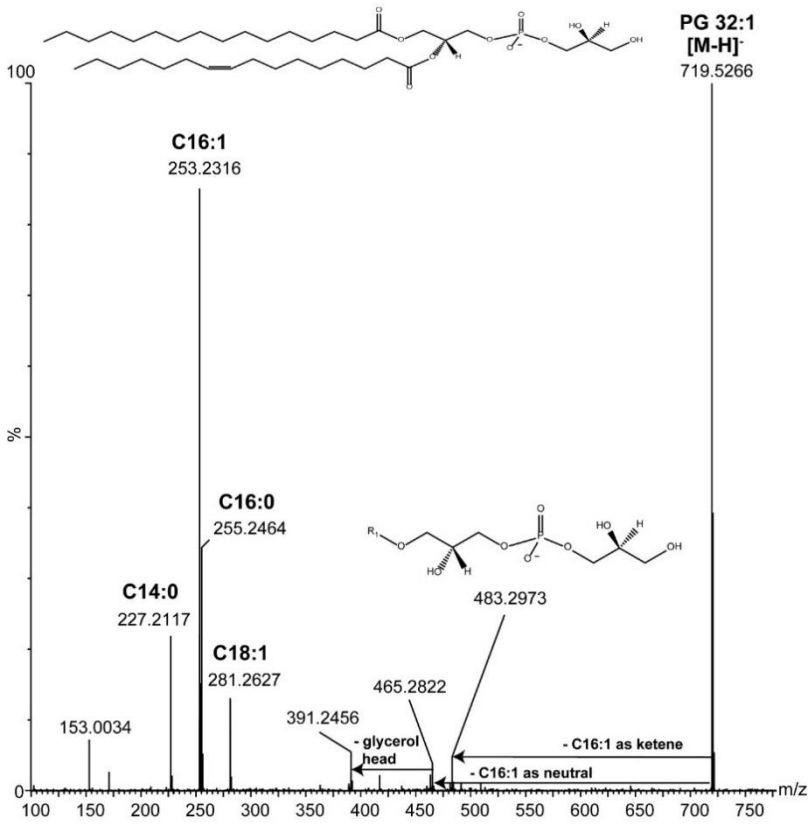


Fig S1. MS/MS Spectra of PG 32:1. A possible structure of the most abundant isomer is given (cis or trans isomerism cannot be determined with this experiment). The ion of *m/z* 153.0034 corresponds to the Glycerol-3-phosphate ion with loss of H_2O. The $[M-H]^-$ of the fatty acyl chains show the presence the isomers PG 16:0_16:1 and PG 14:0_18:1. Knowing that the loss of *sn-2* is favoured, since ions of *m/z* 483.2973, 465.2822, 391.2456 and 253.2316 are the most abundant, we can conclude that for PG 16:0/16:1, the most abundant isomer, the 16:0 is on position *sn-1* and the 16:1 is on position *sn-2*.

Structural elucidation was performed according to Hsu F-F, Turk J (2009) Electrospray Ionization with Low-energy Collisionally Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry of Glycerophospholipids: Mechanisms of Fragmentation and Structural Characterization. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877 (26):22.

Table S2 $^{TW}CCS_{N2}$ values calibrated with **dextran** for the membrane lipids of PAK

		Positive ions					Negative ions				
membrane lipids of PAK	**Formula**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**
PC 32:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	732.5538	303.6	0.1	278.7					
PC 32:0	$C_{40}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	734.5694	307.6	0.1	282.0					
PC 34:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	758.5694	307.5	0.1	281.9					
PC 34:1	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	760.5851	311.0	0.1	284.7					
PC 34:0	$C_{42}H_{84}NO_8P$	$[M+H]^+$	762.6007	314.2	0.4	287.3					
PC 35:1	$C_{43}H_{84}NO_8P$	[M+H]+	774.6007	316.3	0.1	289.0					
PC 36:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	786.6007	315.1	0.1	288.1					
PE 30:1	$C_{35}H_{68}NO_8P$	$[M+H]^+$	662.4755	280.8	0.1	260.2	$[M-H]^-$	660.4610	266.3	0.1	249.7
PE 30:0	$C_{35}H_{70}NO_8P$						$[M-H]^-$	662.4766	268.6	0.1	251.8
PE 32:2	$C_{37}H_{70}NO_8P$	$[M+H]^+$	688.4912	283.2	0.1	262.2	$[M-H]^-$	686.4766	270.7	0.2	253.7
PE 32:1	$C_{37}H_{72}NO_8P$	$[M+H]^+$	690.5068	288.3	0.1	266.3	$[M-H]^-$	688.4923	272.6	0.1	255.4
PE 32:0	$C_{37}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	692.5225	294.6	0.0	271.4	$[M-H]^-$	690.5079	274.4	0.1	257.1
PE 33:1	$C_{38}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	704.5225	294.1	0.1	271.0	$[M-H]^-$	702.5079	276.3	0.1	258.7
PE 34:2	$C_{39}H_{73}NO_8P$	$[M+H]^+$	716.5225	291.4	0.1	268.8	$[M-H]^-$	714.5079	277.7	0.1	260.0
PE 34:1	$C_{37}H_{76}NO_8P$	$[M+H]^+$	718.5381	297.1	0.1	273.4	$[M-H]^-$	716.5236	279.5	0.0	261.6
PE 34:0	$C_{39}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	720.5538	301.0	0.1	276.6	$[M-H]^-$	718.5392	281.4	0.1	263.4
PE 35:2	$C_{40}H_{76}NO_8P$	$[M+H]^+$	730.5381	297.8	0.1	274.0	$[M-H]^-$	728.5236	280.9	0.1	262.9
PE 35:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	[M+H]+	732.5538	300.3	0.1	276.0	[M-H]-	730.5392	283.2	0.0	264.9
PE 36:2	$C_{41}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	744.5538	298.8	0.1	274.8	$[M-H]^-$	742.5392	284.6	0.1	266.2
PE 36:1	$C_{41}H_{80}NO_8P$	[M+H]+	746.5694	304.4	0.1	279.3	[M-H]-	744.5549	286.4	0.1	267.9

		Positive ions					Negative ions				
membrane lipids of PAK	**Formula**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**
PG 30:0	$C_{36}H_{71}O_{10}P$						[M-H]-	693.4712	275.8	0.1	258.3
PG 32:1	$C_{38}H_{71}O_{10}P$						$[M-H]^-$	719.4869	281.4	0.1	263.4
PG 33:1	$C_{39}H_{75}O_{10}P$						$[M-H]^-$	733.5025	283.5	0.1	265.3
PG 34:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$						$[M-H]^-$	745.5025	285.1	0.1	266.6
PG 34:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$						$[M-H]^-$	747.5182	287.1	0.1	268.5
PG 35:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$						$[M-H]^-$	759.5182	288.5	0.1	269.7
PG 35:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$						$[M-H]^-$	761.5338	290.2	0.1	271.3
PG 36:2	$C_{42}H_{79}O_{10}P$						$[M-H]^-$	773.5338	291.7	0.1	272.6
CL 66:3	$C_{75}H_{140}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1375.9639	441.0	0.2	390.1	$[M-H]^-$	1373.9493	411.2	0.3	380.4
CL 66:2	$C_{75}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1377.9795	442.3	0.0	391.2	$[M-H]^-$	1375.9650	412.5	0.4	381.6
CL 66:1	$C_{75}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1379.9952	443.2	0.1	391.9					
CL 67:3	$C_{76}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1389.9795	444.4	0.2	392.8					
CL 67:2	$C_{76}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1391.9952	445.4	0.2	393.7					
CL 68:4	$C_{77}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1401.9795	445.8	0.2	394.0					
CL 68:3	$C_{77}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1403.9952	447.9	0.1	395.7					
CL 68:2	$C_{77}H_{146}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1406.0108	450.1	0.2	397.4	$[M-H]^-$	1403.9963	418.4	0.3	386.9
CL 69:4	$C_{78}H_{144}O_{17}P_2$	[M+H]+	1415.9952	449.2	0.2	396.7					
CL 69:3	$C_{78}H_{146}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1418.0108	451.1	0.2	398.3					
CL 69:2	$C_{78}H_{148}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1420.0265	452.0	0.1	399.0					
CL 70:4	$C_{79}H_{146}O_{17}P_2$	[M+H]+	1430.0108	452.4	0.1	399.4					
CL 70:3	$C_{79}H_{148}O_{17}P_2$	[M+H]+	1432.0265	454.7	0.1	401.2					

Table S3 $^{TW}CCS_{N2}$ values calibrated with **polyalanine** for the membrane lipids of PAK

		Positive ions					Negative ions				
membrane lipids of PAK	**Formula**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**
PC 32:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	732.5538	291.9	0.1	278.9					
PC 32:0	$C_{40}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	734.5694	295.5	0.1	282.1					
PC 34:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	758.5694	295.4	0.1	282.0					
PC 34:1	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	760.5851	298.6	0.1	284.8					
PC 34:0	$C_{42}H_{84}NO_8P$	$[M+H]^+$	762.6007	301.6	0.4	287.4					
PC 35:1	$C_{43}H_{84}NO_8P$	[M+H]+	774.6007	303.5	0.1	289.1					
PC 36:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	786.6007	302.4	0.1	288.2					
PE 30:1	$C_{35}H_{68}NO_8P$	$[M+H]^+$	662.4755	270.9	0.1	260.4	$[M-H]^-$	660.4610	259.2	0.1	249.7
PE 30:0	$C_{35}H_{70}NO_8P$						$[M-H]^-$	662.4766	261.6	0.1	251.8
PE 32:2	$C_{37}H_{70}NO_8P$	$[M+H]^+$	688.4912	273.1	0.1	262.4	$[M-H]^-$	686.4766	263.8	0.2	253.7
PE 32:1	$C_{37}H_{72}NO_8P$	$[M+H]^+$	690.5068	277.8	0.1	266.5	$[M-H]^-$	688.4923	265.7	0.1	255.4
PE 32:0	$C_{37}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	692.5225	283.6	0.0	271.6	$[M-H]^-$	690.5079	267.6	0.1	257.1
PE 33:1	$C_{38}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	704.5225	283.2	0.1	271.2	$[M-H]^-$	702.5079	269.5	0.1	258.8
PE 34:2	$C_{39}H_{73}NO_8P$	$[M+H]^+$	716.5225	280.6	0.1	269.0	$[M-H]^-$	714.5079	270.9	0.1	260.0
PE 34:1	$C_{37}H_{76}NO_8P$	$[M+H]^+$	718.5381	285.9	0.1	273.6	$[M-H]^-$	716.5236	272.8	0.0	261.7
PE 34:0	$C_{39}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	720.5538	289.5	0.1	276.8	$[M-H]^-$	718.5392	274.8	0.1	263.4
PE 35:2	$C_{40}H_{76}NO_8P$	$[M+H]^+$	730.5381	286.5	0.1	274.2	$[M-H]^-$	728.5236	274.2	0.1	262.9
PE 35:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	[M+H]+	732.5538	288.8	0.1	276.2	[M-H]-	730.5392	276.6	0.0	265.0
PE 36:2	$C_{41}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	744.5538	287.4	0.1	274.9	$[M-H]^-$	742.5392	278.0	0.2	266.3
PE 36:1	$C_{41}H_{80}NO_8P$	[M+H]+	746.5694	292.5	0.1	279.5	[M-H]-	744.5549	279.9	0.1	267.9

		Positive ions					Negative ions				
membrane lipids of PAK	**Formula**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**
PG 30:0	$C_{36}H_{71}O_{10}P$						[M-H]-	693.4712	269.0	0.1	258.3
PG 32:1	$C_{38}H_{71}O_{10}P$						$[M-H]^-$	719.4869	274.8	0.1	263.4
PG 33:1	$C_{39}H_{75}O_{10}P$						$[M-H]^-$	733.5025	276.9	0.1	265.3
PG 34:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$						$[M-H]^-$	745.5025	278.5	0.1	266.7
PG 34:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$						$[M-H]^-$	747.5182	280.6	0.1	268.6
PG 35:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$						$[M-H]^-$	759.5182	282.0	0.1	269.8
PG 35:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$						$[M-H]^-$	761.5338	283.8	0.1	271.4
PG 36:2	$C_{42}H_{79}O_{10}P$						$[M-H]^-$	773.5338	285.3	0.1	272.7
CL 66:3	$C_{75}H_{140}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1375.9639	416.5	0.2	388.9	$[M-H]^-$	1373.9493	409.5	0.3	382.4
CL 66:2	$C_{75}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1377.9795	417.7	0.0	389.9	$[M-H]^-$	1375.9650	410.9	0.4	383.6
CL 66:1	$C_{75}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1379.9952	418.6	0.1	390.6					
CL 67:3	$C_{76}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1389.9795	419.6	0.2	391.5					
CL 67:2	$C_{76}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1391.9952	420.6	0.1	392.4					
CL 68:4	$C_{77}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1401.9795	420.9	0.2	392.7					
CL 68:3	$C_{77}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1403.9952	422.8	0.1	394.4					
CL 68:2	$C_{77}H_{146}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1406.0108	424.7	0.2	396.1	$[M-H]^-$	1403.9963	417.0	0.3	389.1
CL 69:4	$C_{78}H_{144}O_{17}P_2$	[M+H]+	1415.9952	423.9	0.2	395.4					
CL 69:3	$C_{78}H_{146}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1418.0108	425.6	0.2	396.9					
CL 69:2	$C_{78}H_{148}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1420.0265	426.5	0.1	397.6					
CL 70:4	$C_{79}H_{146}O_{17}P_2$	[M+H]+	1430.0108	426.8	0.1	398.0					
CL 70:3	$C_{79}H_{148}O_{17}P_2$	[M+H]+	1432.0265	428.8	0.1	399.7					

Table S4 $^{TW}CCS_{N2}$ values calibrated with **phospholipids** for the membrane lipids of PAK

		Positive ions				Negative ions			
membrane lipids of PAK	**Formula**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction (Å²)**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**
PC 32:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	732.5538	279.0	0.1				
PC 32:0	$C_{40}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	734.5694	282.2	0.1				
PC 34:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	758.5694	282.1	0.1				
PC 34:1	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	760.5851	284.9	0.1				
PC 34:0	$C_{42}H_{84}NO_8P$	$[M+H]^+$	762.6007	287.4	0.3				
PC 35:1	$C_{43}H_{84}NO_8P$	[M+H]+	774.6007	289.1	0.1				
PC 36:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	$[M+H]^+$	786.6007	288.2	0.1				
PE 30:1	$C_{35}H_{68}NO_8P$	$[M+H]^+$	662.4755	260.8	0.1	$[M-H]^-$	660.4610	253.9	0.1
PE 30:0	$C_{35}H_{70}NO_8P$					$[M-H]^-$	662.4766	256.0	0.1
PE 32:2	$C_{37}H_{70}NO_8P$	$[M+H]^+$	688.4912	262.7	0.1	$[M-H]^-$	686.4766	257.9	0.2
PE 32:1	$C_{37}H_{72}NO_8P$	$[M+H]^+$	690.5068	266.8	0.1	$[M-H]^-$	688.4923	259.5	0.1
PE 32:0	$C_{37}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	692.5225	271.8	0.0	$[M-H]^-$	690.5079	261.2	0.1
PE 33:1	$C_{38}H_{74}NO_8P$	$[M+H]^+$	704.5225	271.5	0.1	$[M-H]^-$	702.5079	262.9	0.1
PE 34:2	$C_{39}H_{73}NO_8P$	$[M+H]^+$	716.5225	269.2	0.1	$[M-H]^-$	714.5079	264.1	0.1
PE 34:1	$C_{37}H_{76}NO_8P$	$[M+H]^+$	718.5381	273.8	0.1	$[M-H]^-$	716.5236	265.7	0.0
PE 34:0	$C_{39}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	720.5538	277.0	0.1	$[M-H]^-$	718.5392	267.4	0.1
PE 35:2	$C_{40}H_{76}NO_8P$	$[M+H]^+$	730.5381	274.4	0.1	$[M-H]^-$	728.5236	266.9	0.1
PE 35:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	[M+H]+	732.5538	276.4	0.1	[M-H]-	730.5392	269.0	0.0
PE 36:2	$C_{41}H_{78}NO_8P$	$[M+H]^+$	744.5538	275.1	0.1	$[M-H]^-$	742.5392	270.2	0.1
PE 36:1	$C_{41}H_{80}NO_8P$	[M+H]+	746.5694	279.6	0.1	[M-H]-	744.5549	271.8	0.1

		Positive ions				Negative ions			
membrane lipids of PAK	**Formula**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction (Å²)**	**$^{TW}CCS_{N2}$ %RSD**	**corrected $^{TW}CCS_{N2}$ (Å²)**	**ion**	***m/z***	**$^{TW}CCS_{N2}$ without correction (Å²)**
PG 30:0	$C_{36}H_{71}O_{10}P$					[M-H]-	693.4712	262.4	0.1
PG 32:1	$C_{38}H_{71}O_{10}P$					$[M-H]^-$	719.4869	267.4	0.1
PG 33:1	$C_{39}H_{75}O_{10}P$					$[M-H]^-$	733.5025	269.3	0.1
PG 34:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$					$[M-H]^-$	745.5025	270.6	0.1
PG 34:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$					$[M-H]^-$	747.5182	272.5	0.1
PG 35:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$					$[M-H]^-$	759.5182	273.7	0.1
PG 35:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$					$[M-H]^-$	761.5338	275.3	0.1
PG 36:2	$C_{42}H_{79}O_{10}P$					$[M-H]^-$	773.5338	276.5	0.1
CL 66:3	$C_{75}H_{140}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1375.9639	385.4	0.2	$[M-H]^-$	1373.9493	381.4	0.3
CL 66:2	$C_{75}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1377.9795	386.4	0.0	$[M-H]^-$	1375.9650	382.6	0.4
CL 66:1	$C_{75}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1379.9952	387.1	0.1				
CL 67:3	$C_{76}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1389.9795	387.9	0.2				
CL 67:2	$C_{76}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1391.9952	388.8	0.1				
CL 68:4	$C_{77}H_{142}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1401.9795	389.0	0.2				
CL 68:3	$C_{77}H_{144}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1403.9952	390.6	0.1				
CL 68:2	$C_{77}H_{146}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1406.0108	392.2	0.1	$[M-H]^-$	1403.9963	387.7	0.3
CL 69:4	$C_{78}H_{144}O_{17}P_2$	[M+H]+	1415.9952	391.6	0.1				
CL 69:3	$C_{78}H_{146}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1418.0108	393.0	0.2				
CL 69:2	$C_{78}H_{148}O_{17}P_2$	$[M+H]^+$	1420.0265	393.7	0.1				
CL 70:4	$C_{79}H_{146}O_{17}P_2$	[M+H]+	1430.0108	394.0	0.1				
CL 70:3	$C_{79}H_{148}O_{17}P_2$	[M+H]+	1432.0265	395.8	0.1				

Table S5 Comparison between the experimental $^{TW}CCS_{N2}$ values for the phospholipids of PAK and CCS values of the literature for $[M+H]^+$. 1: dextran calibration, 2: dextran calibration and lipid correction, 3: polyalanine calibration, 4: polyalanine calibration and lipid correction, 5 phospholipids calibration

	Leaptrot 2019 - drift tube						Zhou 2017 - drift tube						Hines 2016 - drift tube						Paglia 2015 - TWIMS polyalanine calibration					
Lipid	**CCS [M+H]+ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**	**CCS [M+H]+ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**	**CCS [M+H]+ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**	**CCS [M+H]+ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**
PC 32:0	278.4	10.5	1.3	6.0	1.3	1.4	283.4	8.5	-0.5	4.1	-0.5	-0.4	282.5	8.9	-0.2	4.4	-0.1	-0.1	291.0	5.7	-3.1	1.4	-3.1	-3.0
PC 32:1	276.5	9.8	0.8	5.6	0.9	0.9	282.6	7.4	-1.4	3.3	-1.3	-1.3							287.0	5.8	-2.9	1.7	-2.8	-2.8
PC 34:0							289.7	8.5	-0.8	4.1	-0.8	-0.8							297.0	5.8	-3.3	1.5	-3.2	-3.2
PC 34:1	282.0	10.3	1.0	5.9	1.0	1.0	287.1	8.3	-0.8	4.0	-0.8	-0.8							295.0	5.4	-3.5	1.2	-3.5	-3.4
PC 34:2	279.5	10.0	0.9	5.7	1.9	1.9	285.2	7.8	-1.2	3.6	-0.1	-0.1							293.0	4.9	-3.8	0.8	-2.8	-2.8
PC 35:1	287.1	10.2	0.7	5.7	0.7	0.7	289.2	9.4	-0.1	4.9	0.0	0.0												
PC 36:2	288.6	9.2	-0.2	4.8	-0.1	-0.1	291.3	8.2	-1.1	3.8	-1.1	-1.1							301.0	4.7	-4.3	0.5	-4.3	-4.3
PE 32:0							271.4	8.5	0.0	4.5	0.1	0.1	271.5	8.5	0.0	4.5	0.0	0.1						
PE 32:1							267.2	7.9	-0.3	4.0	-0.3	-0.2												
PE 32:2													263.8	7.4	-0.6	3.5	-0.5	-0.4						
PE 34:0							277.5	8.5	-0.3	4.3	-0.3	-0.2	277.4	8.5	-0.3	4.4	-0.2	-0.1						
PE 34:1	270.1	10.0	1.2	5.9	1.3	1.4	274.7	8.2	-0.5	4.1	-0.4	-0.3	273.4	8.7	0.0	4.6	0.1	0.1	272.0	9.2	0.5	5.1	0.6	0.7
PE 34:2	268.5	8.5	0.1	4.5	0.2	0.3	272.7	6.8	-1.4	2.9	-1.4	-1.3												
PE 35:1							276.6	8.6	-0.2	4.4	-0.1	-0.1												
PE 35:2							275.0	8.3	-0.4	4.2	-0.3	-0.2												
PE 36:1	277.0	9.9	0.8	5.6	0.9	0.9	281.3	8.2	-0.7	4.0	-0.7	-0.6												
PE 36:2	275.1	8.6	-0.1	4.5	-0.1	0.0	279.3	7.0	-1.6	2.9	-1.6	-1.5	277.9	7.5	-1.1	3.4	-1.1	-1.0	279.0	7.1	-1.5	3.0	-1.5	-1.4

Table S6 Comparison between the experimental $^{TW}CCS_{N2}$ values for the phospholipids of PAK and CCS values of the literature for $[M-H]^-$. 1: dextran calibration, 2: dextran calibration and lipid correction, 3: polyalanine calibration, 4: polyalanine calibration and lipid correction, 5 phospholipids calibration

	Leaptrot 2019 - drift tube						Zhou 2017 - drift tube						Hines 2016 - drift tube						Paglia 2015 - TWIMS polyalanine calibration					
Lipid	**CCS $[M-H]^-$ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**	**CCS $[M-H]^-$ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**	**CCS $[M-H]^-$ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**	**CCS $[M-H]^-$ (Å²)**	**% Δ 1**	**% Δ 2**	**% Δ 3**	**% Δ 4**	**% Δ 5**
PE(30:0)													253.3	6.0	-1.4	2.3	-1.4	0.2						
PE(32:1)							256.6	6.2	-0.5	3.5	-0.5	1.1												
PE(32:0)													259.4	5.8	-0.9	3.2	-0.9	0.7						
PE(32:2)													256.3	5.6	-1.0	2.9	-1.0	0.6						
PE(34:0)													265.5	6.0	-0.8	3.5	-0.8	0.7	274	2.7	-3.9	0.3	-3.9	-2.4
PE(34:1)	266.9	4.7	-2.0	2.2	-2.0	-0.5	263.1	6.2	-0.6	3.7	-0.5	1.0	264.5	5.7	-1.1	3.1	-1.1	0.5						
PE(34:2)	265.6	4.6	-2.1	2.0	-2.1	-0.6																		
PE(36:1)	273.6	4.7	-2.1	2.3	-2.1	-0.7																		
PE(36:2)	272.1	4.6	-2.2	2.2	-2.1	-0.7	268.5	6.0	-0.9	3.5	-0.8	0.6	270.7	5.1	-1.7	2.7	-1.6	-0.2						
PG(32:1)							263.3	6.9	0.0	4.4	0.0	1.6												
PG(33:1)							266.4	6.4	-0.4	4.0	-0.4	1.1												
PG(34:0)																			283	2.0	-4.7	-0.3	-4.6	-3.3
PG(34:1)							270.2	6.3	-0.6	3.8	-0.6	0.9							281	2.2	-4.4	-0.1	-4.4	-3.0
PG(34:2)							268.7	6.1	-0.8	3.6	-0.7	0.7							279	2.2	-4.4	-0.2	-4.4	-3.0
PG(35:1)							272.7	6.4	-0.5	4.1	-0.5	0.9												
PG(36:2)																			289	0.9	-5.7	-1.3	-5.6	-4.3

Table S7: ΔCCS (%) comparison between CCS values of the literature for $[M+H]^+$

Lipid	Leaptrot / Zhou	Leaptrot / Hines	Zhou / Hines	Zhou / Paglia	Hines / Paglia
PC(32:0)	-1.8	-1.5	0.3	-2.6	-2.9
PC(32:1)	-2.2			-1.5	
PC(34:0)				-2.5	
PC(34:1)	-1.8			-2.7	
PC(34:2)	-2.0			-2.7	
PC(36:2)	-0.9			-3.2	
PE(32:0)			0.0		
PE(34:0)			0.0		
PE(34:1)	-1.7	-1.2	0.5	1.0	0.5
PE(36:2)	-1.5	-1.0	0.5	0.1	-0.4

Table S8: ΔCCS (%) comparison between CCS values of the literature for $[M-H]^-$

	Δ Comparison between the literature (%)			
Lipid	Leaptrot / Zhou	Leaptrot / Hines	Zhou / Hines	Zhou / Paglia
PE(34:1)	1.4	0.9	-0.5	
PE(36:2)	1.3	0.5	-0.8	
PG(34:1)				-3.8
PG(34:2)				-3.7

The following figure describes the ***$^{TW}CCS_{N2}$ vs m/z correlation***

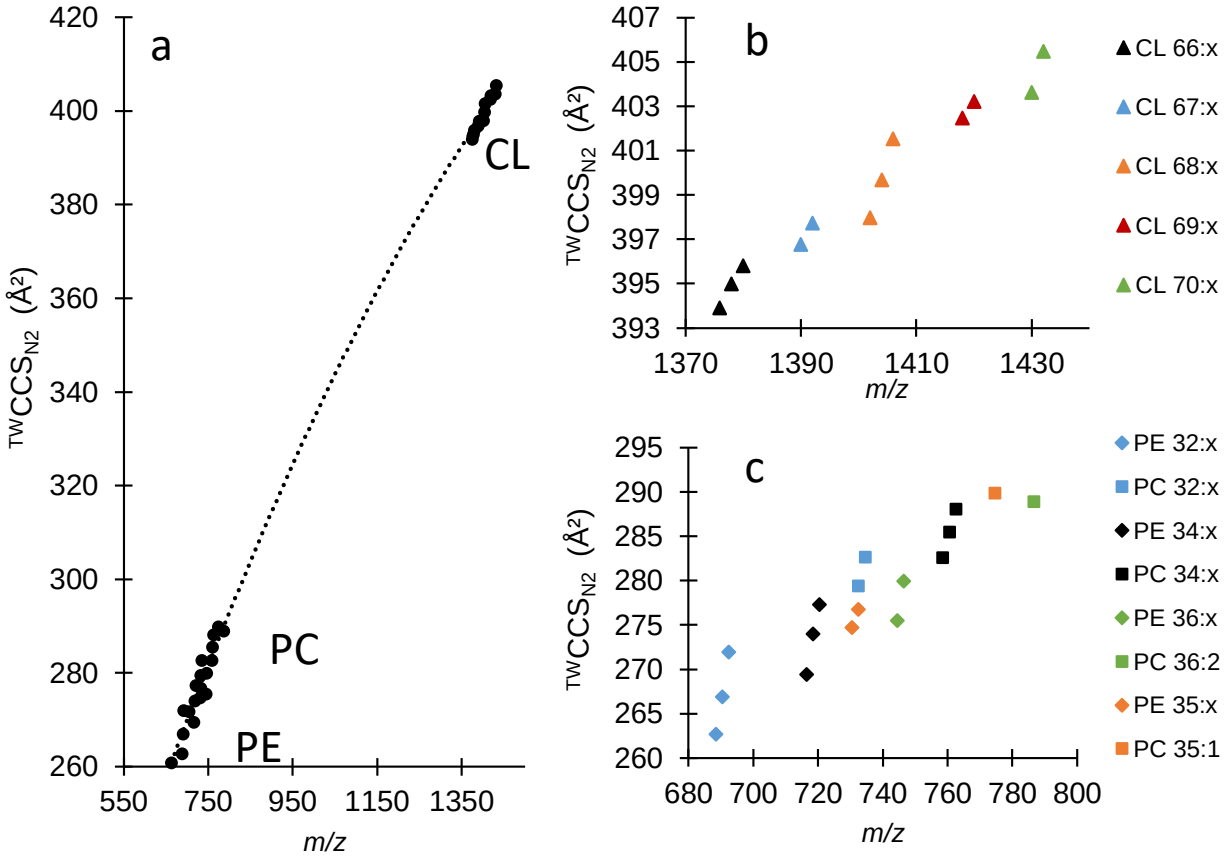


Figure S9: $^{TW}CCS_{N2}$ values plotted against *m/z* for positive ions. (a) represents values for every class of phospholipids, whereas (b) only represents values for CLs and (c) only represents values for PCs and PEs. CLs are represented by triangles, PCs are represented by squares, PEs by diamonds. x refers to the number of double-bonds on the fatty acid moiety of the phospholipid which can be equal to 0, 1, 2 (for PCs and PEs) or up to 3, 4 (for CLs).

S2 Dextran, polyalanine and phospholipids CCS Calibration

Positive Dextran Calibration

M(N2) 28.0134

Glc_n		m/z	z	m	CCS (N_2) in Å²	1/μ	Ω'(N2) litt	td	ln(Ω'(N2))	ln(td)		
2	$[M+Na]^+$	365.11	1	365.11	179.54	0.04	915.77	2.28	6.82	0.82		
3	$[M+Na]^+$	527.16	1	527.16	215.00	0.04	1108.88	3.21	7.01	1.17		
4	$[M+Na]^+$	689.21	1	689.21	243.36	0.04	1262.66	4.01	7.14	1.39		
5	$[M+Na]^+$	851.26	1	851.26	273.81	0.04	1425.94	4.89	7.26	1.59		
6	$[M+Na]^+$	1013.32	1	1013.32	302.06	0.04	1577.08	5.75	7.36	1.75	x	0.590
7	$[M+Na]^+$	1175.37	1	1175.37	330.94	0.04	1731.10	6.74	7.46	1.91	lnA	6.328
8	$[M+Na]^+$	1337.42	1	1337.42	355.80	0.04	1863.77	7.68	7.53	2.04	A	560.026
9	$[M+Na]^+$	1499.48	1	1499.48	377.70	0.04	1980.68	8.53	7.59	2.14	r^2	0.9998

Positive Polyalanine Calibration

M(N2) 28.0134

Sequenz	m/z	z	m	CCS (N_2) in Å²	1/μ	Ω'(N2) litt	td	ln(Ω'(N2))	ln(td)		
A4	303.208	1	303.2	166.00	0.04	840.62	2.06	6.73	0.72		
A5	374.208	1	374.2	181.00	0.04	924.03	2.42	6.83	0.88		
A6	445.208	1	445.2	195.00	0.04	1001.08	2.76	6.91	1.02		
A7	516.308	1	516.3	211.00	0.04	1087.66	3.17	6.99	1.15	x	0.563
A8	587.308	1	587.3	228.00	0.04	1178.96	3.67	7.07	1.30	lnA	6.336
A9	658.308	1	658.3	243.00	0.04	1259.62	4.12	7.14	1.42	A	564.400
A10	729.408	1	729.4	256.00	0.04	1329.66	4.54	7.19	1.51	r^2	0.9991
A11	800.408	1	800.4	271.00	0.04	1409.88	5.01	7.25	1.61		
A12	871.508	1	871.5	282.00	0.04	1469.14	5.50	7.29	1.70		
A13	942.508	1	942.5	294.00	0.04	1533.45	5.98	7.34	1.79		
A14	1013.508	1	1013.5	306.00	0.04	1597.66	6.45	7.38	1.86		

Positive Lipids Calibration

M(N2) 28.0134

Lipide	m/z	z	m	CCS (N_2) in Å²	1/μ	Ω'(N2) litt	td	ln(Ω'(N2))	ln(td)		
PE 6:0/6:0	412.2095	1	412.2095	202.1	0.04	1035.08	2.94	6.94	1.08		
PE 10:0/10:0	524.3347	1	524.3347	233	0.04	1201.54	4.06	7.09	1.40		
PE 15:0/15:0	664.4912	1	664.4912	265	0.04	1373.92	5.30	7.23	1.67	x	0.512
PE 17:0/17:0	720.5538	1	720.5538	277.4	0.04	1440.48	5.76	7.27	1.75	lnA	6.380
PC 20:0/20:0	846.6946	1	846.6946	306.4	0.04	1595.52	6.96	7.37	1.94	A	590.169
PC 24:0/24:0	958.8198	1	958.8198	330.9	0.04	1726.34	7.98	7.45	2.08	r^2	0.9981

Negative Dextran Calibration

M(N2) 28.0134

Glc_n		m/z	z	m	CCS (N_2) in Å²	1/μ	Ω'(N2) litt	td	ln(Ω'(N2))	ln(td)		
2	$[M-H]^-$	341.11	1	341.11	174.56	0.04	888.17	2.02	6.79	0.70		
3	$[M-H]^-$	503.16	1	503.16	202.34	0.04	1042.30	3.03	6.95	1.11		
4	$[M-H]^-$	665.21	1	665.21	233.96	0.04	1213.00	3.92	7.10	1.37		
5	$[M-H]^-$	827.27	1	827.27	265.39	0.04	1381.45	4.86	7.23	1.58		
6	$[M-H]^-$	989.32	1	989.32	296.73	0.04	1548.76	5.85	7.35	1.77	x	0.546
7	$[M-H]^-$	1151.37	1	1151.37	319.21	0.04	1669.34	6.71	7.42	1.90	lnA	6.374
8	$[M-H]^-$	1313.43	1	1313.43	343.55	0.04	1799.25	7.71	7.50	2.04	A	586.226
9	$[M-H]^-$	1475.48	1	1475.48	365.21	0.04	1914.89	8.64	7.56	2.16	r^2	0.9953

Negative Polyalanine Calibration

M(N2) 28.0134

Sequenz	m/z	z	m	CCS (N_2) in Å²	1/μ	Ω'(N2) litt	td	ln(Ω'(N2))	ln(td)		
A4	301.151	1	301.2	165.00	0.04	835.32	2.09	6.73	0.74		
A5	372.188	1	372.2	179.00	0.04	913.65	2.48	6.82	0.91		
A6	443.225	1	443.2	195.00	0.04	1000.94	2.86	6.91	1.05		
A7	514.262	1	514.3	209.00	0.04	1077.24	3.28	6.98	1.19	x	0.576
A8	585.300	1	585.3	223.00	0.04	1153.02	3.67	7.05	1.30	lnA	6.301
A9	656.337	1	656.3	238.00	0.04	1233.63	4.12	7.12	1.42	A	545.101
A10	727.374	1	727.4	253.00	0.04	1314.01	4.58	7.18	1.52	r^2	0.9998
A11	798.411	1	798.4	267.00	0.04	1389.01	5.06	7.24	1.62		
A12	869.448	1	869.4	279.00	0.04	1453.45	5.50	7.28	1.70		
A13	940.485	1	940.5	294.00	0.04	1533.40	6.04	7.34	1.80		
A14	1011.522	1	1011.5	308.00	0.04	1608.06	6.58	7.38	1.88		

Negative Lipids Calibration

M(N2) 28.0134

Lipide	m/z	z	m	CCS (N_2) in Å²	1/μ	Ω'(N2) litt	td	ln(Ω'(N2))	ln(td)		
PE 6:0/6:0	410.1949	1	410.1949	199.3	0.04	1020.58	3.03	6.93	1.10		
PE 10:0/10:0	522.3201	1	522.3201	223.2	0.04	1150.89	3.85	7.05	1.34		
PE 15:0/15:0	662.4766	1	662.4766	253.3	0.04	1313.18	4.92	7.18	1.59	x	0.517
PE 17:0/17:0	718.5392	1	718.5392	265.5	0.04	1378.61	5.39	7.23	1.68	lnA	6.359
PC 20:0/20:0	904.7012	1	904.7012	305.1	0.04	1590.39	7.15	7.37	1.96	A	577.820
PC 24:0/24:0	1016.8264	1	1016.8264	331	0.04					r^2	0.9998

[M+CH3COO-]

S3 Dextran and polyalanine correction curves

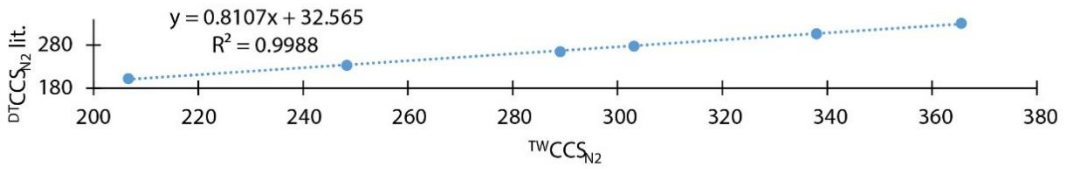
Positive values — Measured with dextran calibration

Lipids	m/z	z	td	td'	CCS' (N2)	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$ lit.	Ω %Δ
PE 6:0/6:0	412.210	1	2.94	2.91	1058.4	206.7	202.1	2.3
PE 10:0/10:0	524.335	1	4.06	4.02	1280.7	248.4	233.0	-6.6
PE 15:0/15:0	664.491	1	5.30	5.26	1498.7	289.1	265.0	-9.1
PE 17:0/17:0	720.554	1	5.76	5.72	1574.0	303.1	277.4	-9.3
PC 20:0/20:0	846.695	1	6.96	6.91	1759.8	337.9	306.4	-10.3
PC 24:0/24:0	958.820	1	7.98	7.93	1907.4	365.6	330.9	-10.5

Equation A: lipid standards positive correction

a	0.8107
b	32.5654
r^2	0.9988

correction curve for dextran calibration in positive mode



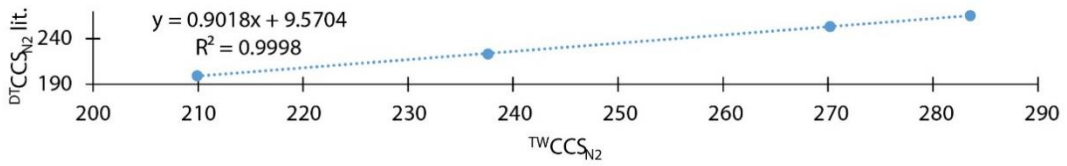
Negative values — Measured with dextran calibration

Lipids	m/z	z	td	td'	CCS' (N2)	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$ lit.	Ω %Δ
PE 6:0/6:0	410.195	1	3.03	3.00	1075.0	209.9	199.3	5.3
PE 10:0/10:0	522.320	1	3.85	3.81	1225.3	237.6	223.2	-6.5
PE 15:0/15:0	662.477	1	4.92	4.88	1400.8	270.2	253.3	-6.7
PE 17:0/17:0	718.539	1	5.39	5.35	1472.4	283.6	265.5	-6.8
PC 20:0/20:0	904.701	1						
PC 24:0/24:0	1016.826	1						

Equation B: lipid standards negative correction

a	0.9018
b	9.5704
r^2	0.9998

correction curve for dextran calibration in negative mode



Positive values

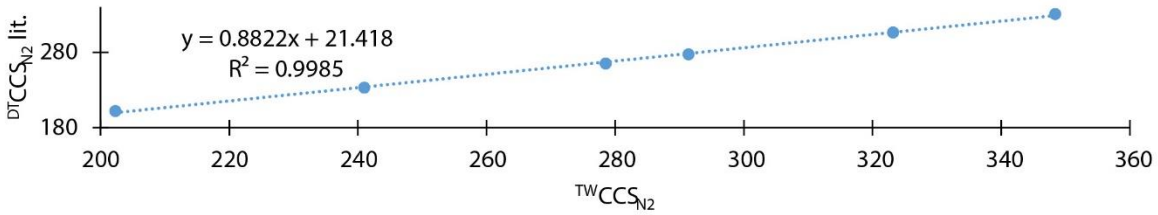
Measured with polyalanine calibration

Lipids	m/z	z	td	td'	CCS' (N_2)	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$ lit.	Ω %Δ
PE 6:0/6:0	412.210	1	2.94	2.91	1036.1	202.3	202.1	2.3
PE 10:0/10:0	524.335	1	4.06	4.02	1242.9	241.0	233.0	-6.6
PE 15:0/15:0	664.491	1	5.30	5.26	1444.0	278.5	265.0	-9.1
PE 17:0/17:0	720.554	1	5.76	5.72	1513.2	291.4	277.4	-9.3
PC 20:0/20:0	846.695	1	6.96	6.91	1683.1	323.2	306.4	-10.3
PC 24:0/24:0	958.820	1	7.98	7.93	1817.5	348.4	330.9	-10.5

Equation C: lipid standards positive correction

a	0.8822
b	21.4179
r^2	0.9985

correction curve for polyalanine calibration in positive mode



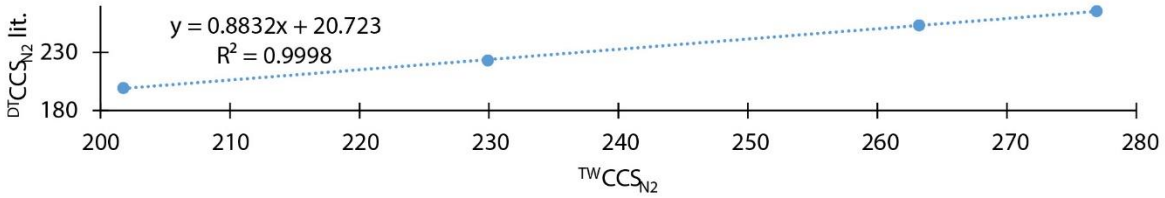
Negative values

Measured with polyalanine calibration

Lipids	m/z	z	td	td'	CCS' (N_2)	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$ lit.	Ω %Δ
PE 6:0/6:0	410.195	1	3.03	3.00	1033.2	201.8	199.3	5.3
PE 10:0/10:0	522.320	1	3.85	3.81	1185.5	229.9	223.2	-6.5
PE 15:0/15:0	662.477	1	4.92	4.88	1364.7	263.2	253.3	-6.7
PE 17:0/17:0	718.539	1	5.39	5.35	1438.1	276.9	265.5	-6.8
PC 20:0/20:0	904.701	1						
PC 24:0/24:0	1016.826	1						

a	0.8832
b	20.7228
r^2	0.9998

correction curve for polyalanine calibration in negative mode



III.2.2 Etude de l'influence du milieu de culture (2nd article)

Membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a cystic fibrosis mucus-mimicking medium

Estelle Deschamps[a,b], Annick Schaumann[a], Isabelle Schmitz-Afonso[b], Carlos Afonso[b], Emmanuelle Dé[a], Corinne Loutelier-Bourhis[b], Stéphane Alexandre[a,*]

a Normandie Univ, PBS, UMR 6270 and FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, CURIB, Bvd De Broglie, 76821 Mont-Saint-Aignan, Cedex, France

b Normandie Univ, COBRA, UMR 6014 and FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan, Cedex, France

Corresponding author: Stéphane Alexandre, stephane.alexandre@univ-rouen.fr

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, CF sputum, membrane lipids, antibiotic resistance, culture medium, mass spectrometry

Abbreviations: CF, cystic fibrosis; MHB, Mueller Hilton broth; SCFM, synthetic cystic fibrosis medium; DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; SCFM-PC, DOPC complemented SCFM; LB, lysogeny broth; ASM, artificial sputum medium; PE, phosphatidylethanolamines; PC, phosphatidylcholines; PG, phosphatidylglycerols; CL, cardiolipins; LC-MS, liquid chromatography - mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; MIC, minimal inhibitory concentration; ESI-MS, electrospray ionisation-mass spectrometry; PAK, *P. aeruginosa* strain PAK; CFU, colony forming units; OD600, optical density at 600 nm; AFM, atomic force microscopy; (n), number of replicates.

Received 3 June 2020; Received in revised form 18 September 2020; Accepted 21 September 2020 Available online 28 September 2020

ABSTRACT

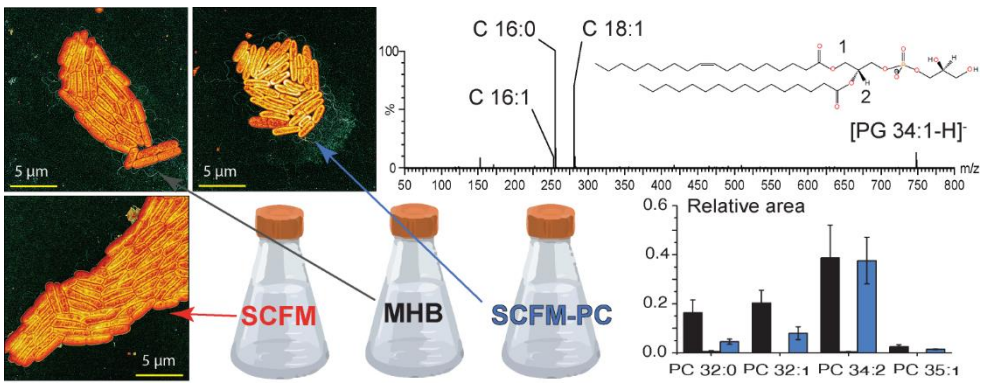
Background: Pseudomonas aeruginosa is a bacterium able to induce serious pulmonary infections in cystic fibrosis (*CF*) patients. This bacterium is very often antibiotic resistant, partly because of its membrane impermeability, which is linked to the membrane lipid composition. This work aims to study the membrane phospholipids of *P. aeruginosa* grown in *CF* sputum-like media.

Methods: Three media were used: Mueller Hilton broth (MHB), synthetic cystic fibrosis medium (SCFM) and 1,2- dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) complemented SCFM (SCFM-PC). Lipids were extracted and LC-MS/MS analyses were performed. Growth curves, atomic force microscopy images and minimal inhibitory concentration determination were performed in order to compare the growth and potentially link lipid modifications to antibiotic resistance.

Results: Semi-quantification showed phospholipid quantity variation depending on the growth medium. Phosphatidylcholines were detected in traces in SCFM. MS/MS experiments showed an increase of phospholipids derived from DOPC in SCFM-PC. We observed no influence of the medium on the bacterial growth and a minor influence on the bacterial shape. MIC values were generally higher in SCFM and SCFM-PC than in MHB.

Conclusions: We defined a *CF* sputum-like media which can be used for the membrane lipid extraction of *P. aeruginosa*. We also showed that the growth medium does have an influence on its membrane lipid composition and antibiotic resistance, especially for SCFM-PC in which *P. aeruginosa* uses DOPC, in order to make its own membrane.

General significance: Our results show that considerable caution must be taken when choosing a medium for lipid identification and antibiotic testing —especially for phospholipids-enriched media.



1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen bacterium which is a major public health concern for its ability to survive on healthcare equipments [1]. This leads to nosocomial infections which are very difficult to eradicate. Due to its high pathogenicity for immunocompromised patients, such as cystic fibrosis (CF) patients [2,3], *P. aeruginosa* is one of the deadliest bacteria in hospitals. Moreover, *P. aeruginosa* can easily develop many mechanisms of resistance against antibiotics [4], leading to most antibiotics becoming useless. For these reasons, *P. aeruginosa* was set priority number one for the research and development of new antibiotics and treatments, by the world health organization (WHO) [5].

In order to develop new antibiotics, new targets and strategies are required. One of the current new drug strategies involves targeting membrane phospholipids (*e.g.* cardiolipins [6]). Such new drugs could, by themselves, allow membrane lysis or could be used in synergy to increase the effectiveness of antibiotics [7,8]. Previous analyses of the membrane lipid composition of *P. aeruginosa* were performed in culture media such as minimal glucose medium (MGM) [9,10], Muller-Hilton broth (MHB) [11,12] or lysogeny broth (LB) [13]. The membrane lipid composition mainly consisted of four lipid chemical classes: phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylglycérols (PG) [13] and cardiolipins (CL) [12]. Moreover, these phospholipids were described to be constituted of saturated, unsaturated or cyclopropylated, fatty acyl chains ranging from C14 to C18 [10].

Since *P. aeruginosa* is known to survive in diverse environments, by adapting its metabolism according to the available energy resources [14], an influence of the culture medium on the membrane lipids should be expected. Due to the high pathogenicity of *P. aeruginosa* in cases of CF lungs chronic infections, the CF lung sputum was chemically analysed with the purpose to reproduce it in laboratories [15]. This sputum was characterized by specific amino acid concentrations, the presence of DNA, lipids and mucin and a high viscosity [16]. Thus, several media mimicking the CF sputum were described in the literature [15–17]. The synthetic cystic fibrosis medium (SCFM) [15], first described, contained amino acids, salts and sugars at adjusted concentrations, but lacked DNA, lipids and mucin. This medium was then improved, as SCFM2, by the addition of DNA, lipids and mucin [16].

The Artificial Sputum medium (ASM) contained amino acids, mucin, DNA and egg yolk as a phospholipid nutrient [17]. However, most of these media are not compatible with membrane lipid extraction, as the high viscosity of such media [16,17] does not allow enough bacterial growth for exploitable quantities of lipid material. For this specific reason, this work uses the commercial MHB as a reference medium and the SCFM one [15]. By adding phosphatidylcholine to SCFM (SCFM-PC), we also analysed the impact of this choline nutrient source on the *P. aeruginosa* lipid composition. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) was chosen in order to simulate the presence of lipids from eukaryote cells, since DOPC is widely used for eukaryote cell modelling [18].

Herein, to our knowledge, this work reported, for the first time, the membrane phospholipid composition of *P. aeruginosa* grown in CF sputum-mimicking media —*e.g.* SCFM and SCFM-PC. The membrane lipids were identified and semi-quantified using liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS). Tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments were performed to determine the fatty acyl composition of phospholipids. With the aim to link membrane lipid modifications and antibiotic resistance, the minimal inhibitory concentration (MIC) of four antibiotics was determined as well.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

All SCFM components, chemicals required for the membrane lipid extraction and antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), and phospholipids internal standards (PC 17:0/17:0, 0.5 µg; PE 17:0/17:0, 2.5 µg; PG 17:0/17:0, 1 µg; LPC 17:0, 1 µg; LPE 13:0, 2.5 µg; CL 14:0/14:0/14:0/14:0, 5 µg) were purchased from Avanti polar lipids (AL, USA). MHB media, brand Difco, was purchased from Fischer Scientific (UK). Milli Q grade water was obtained from an UltraClear TWF system (Evoqua water technologies, Germany).

Methanol, chloroform, acetonitrile and isopropanol were purchased from Fischer Scientific (UK), ammonium formate from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), formic acid from Merck (Germany). Except methanol and chloroform which were HPLC grade, all solvents and buffers used were LC-MS grade.

2.2. SCFM and SCFM-PC media preparation

The SCFM medium was first described by Palmer *et al.* [15]. In order to prepare this chemically defined medium more easily by hand, the number of individual stock solutions was reduced by mixing some of the individual stock solutions together (*e.g.* from 19 individual amino acids stock solutions to 6 individual or mixed amino acids stock solutions). Moreover, part of the medium was autoclaved.

The stock solutions were prepared from powder, using either autoclaved Milli-Q grade water or NaOH solutions (concentrations will be detailed later) and stocked in the dark at 4°C. The bottles used for the stock solutions were autoclaved as well.

A first stock solution was prepared by mixing the following thirteen amino acids, whose final concentrations were: 360 mM alanine, 60 mM arginine –HCl, 40 mM cysteine –HCl, 300 mM glutamate –HCl, 240 mM glycine, 100 mM histidine –HCl, 420 mM lysine–HCl, 120 mM methionine, 140 mM ornithine –HCl, 340 mM proline, 280 mM serine, 200 mM threonine and 220 mM valine. A second stock solution was prepared by mixing isoleucine and phenylalanine at 110 mM and 50 mM, respectively. Leucine was stocked at 100 mM. Aspartate was stocked at 103 mM in 0.5 M NaOH. Tyrosine was stocked at 100 mM in 1 M NaOH. Tryptophan was stocked at 130 mM in 0.2 M NaOH.

The following salts were mixed into a single stock solution at these concentrations: 23 mM NH_4Cl, 153 mM KCl, 511 mM NaCl, 13 mM NaH_2PO_4, 13 mM Na_2HPO_4, 3 mM K_2SO_4, 4 mM $NaNO_3$. Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) was stocked at 100 mM. The mixed salts and the MOPS stock solution were then autoclave sterilised for storage purpose.

CaCl2 and MgCl2 were mixed as a stock solution at 877 mM and 303 mM respectively. FeSO4 was stocked at 4 mM. D-glucose was stocked at 1 M. Sodium L-lactacte was stocked at 10% w/w. CaCl2/MgCl2, Dglucose and Sodium L-lactacte stock solutions were filter sterilised through a 0.22-µm-pore-size filter. Since the FeSO4 stock solution could neither be autoclaved (precipitation) nor filter sterilised (filter blockage), the FeSO4 powder was diluted into an autoclave sterilised bottle using autoclave sterilised Milli-Q water. Fresh FeSO4 stock solution was systematically prepared to prevent precipitation during the storage. The full protocol for the preparation of the stock solutions for SCFM and SCFM-PC medium is given in the Supplementary Information S1.

For 1 L of SCFM, the following volumes of stock solutions were added: 100 mL mixed salts, 25 mL MOPS, 805 mL Milli-Q water, 10 mL mixed amino acids (first solution), 10 mL isoleucine and phenylalanine (second solution), 16 mL leucine, 8 mL aspartate, 8 mL tyrosine, 0.1 mL tryptophan. The solution was then autoclave sterilised. After cooling to room temperature, the pH was adjusted to 6.5 using HCl 33% w/w. Finally, the following volumes of stock solutions were added: 2 mL CaCl2/MgCl2, 1 mL FeSO4, 3 mL D-glucose, 10.5 mL L-lactate.

The SCFM-PC medium preparation was based on the SCFM 2 developed by Turner *et al.* [16]. SCFM 2 is a modification of SCFM in which DOPC (PC 18:1 (9Z) / 18:1 (9Z)), DNA and mucin are added. However, in our study, we had to develop SCFM-PC in which only DOPC was added to SCFM. Indeed, when DNA and mucin are used, the extraction of membrane lipids cannot be performed due to the high viscosity of the medium (unpublished work). The SCFM-PC medium was prepared as the following: aliquots of DOPC stock solutions were prepared in order to make different volumes of SCFM-PC with a final DOPC concentration of 100 µg/mL, (aliquots of 10 mg, or 33 mg, to respectively prepare 100 mL, or 330 mL, of SCFM-PC). The stock solutions of DOPC (250 mg/mL) were prepared in chloroform and were stored under argon, in the dark and at −20 °C. The DOPC stock solution was slowly added to the fresh SCFM medium by making it run along the inside of the Erlenmeyer flask —in order to evaporate the chloroform as much as possible. Then, the solution was stirred until neither traces nor lipid droplets could be seen anymore. Finally, in order to make sure that no traces of chloroform were left, the SCFM-PC medium was left to rest 30 min under a biosafety cabinet.

The full protocol for the preparation of SCFM and SCFM-PC medium are given in the Supplementary Information S1. To verify that the autoclave sterilisation had not degraded the amino acids (at the concentration of the medium and without adding sugars), SCFM medium was checked using electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) before and after sterilisation (for MS parameters, see Section 2.6). No difference was observed suggesting that no degradation occurred. Growth curves of PAK into the autoclave sterilised or filtered sterilised media were performed as well and showed no impact of the sterilisation method on the growth of *P. aeruginosa*. MS spectra and growth curves are given in S2.

2.3. Bacterial strain, growth conditions and MICs determination

The *P. aeruginosa* strain PAK (PAK), used in this study, was obtained from Dr. Lhousseine Touqui (Institut Pasteur, Paris, France). The *P. aeruginosa* PAK strain is known for its high virulence, a high expression of pili and flagella, glycosylations and pathogenicity islands [19] and is commonly used in medical studies. PAK was stocked in Muller-Hinton broth (MHB)/glycerol (70/30) at −80 °C. For growth kinetics, PAK was pre-cultured from this stock solution, overnight at 37 °C in MHB, SCFM or SCFM-PC. This pre-culture was used to inoculate 100 mL of MHB, SCFM or SCFM-PC (in a 250 mL Erlenmeyer flask) with 5.10^5 colony forming units (CFU)/mL. The culture was incubated at 37 °C for 24 h on a rotary shaker (140 rpm). Every hour for 8 h and at a final point of 24 h, OD_{600} (optical density at 600 nm with Cary 100 Bio spectrophotometer, Varian) was monitored and 100 µL of culture were collected for CFU numeration. For the MICs determination of carbenicillin, gentamicin, ciprofloxacin, and colistin, the broth dilution method, in 96-well plates, was performed according to Wiegand *et al.* [20], using an inoculum at OD_{600} = 0.001. All these experiments were performed in biological triplicates for MHB, SCFM and SCFM-PC.

2.4. Atomic force microscopy (AFM) imaging

All glass substrates (glass cover for haemocytometer, 20x26mm, 0.4 mm thick, Hirschmann) were cut in 4 parts, cleaned with ethanol and dried. Using a 6-well plates, one glass substrate was placed into each well and covered with 1 mL of MHB, SCFM or SCFM-PC. A PAK preculture in either MHB, SCFM or SCFM-PC media (see Section 2.3) was used to inoculate each well at 10^7 CFU/mL. In order to have enough attached bacteria, but with as low as possible phenotype changes, the plate was incubated for 6 h at 37 °C, without any mixing, and protected from light. A bacterial monolayer and irreversible attachment of the biofilm could be achieved using this method. Then, the culture medium was removed using a Pasteur pipette. Each glass substrate was rinsed twice using water baths, carefully drained, then dried overnight.

AFM imaging was performed with a Nanoscope 8 Multimode microscope (Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA) equipped with a 100 µm piezoelectric scanner. Imaging was achieved in the air either using the contact mode (for bacteria length measurements) or using the PeakForce® mode (for image presentation). In the contact mode, the cantilevers used were characterized by a low spring constant of about 0.06 N/m and were equipped with classical pyramidal Silicon Nitride tip. All the measurements were performed with the feedback loop on. For the PeakForce® mode imaging, we used a soft Silicon Nitride cantilevers (spring constant of about 0.35 N/m) with sharp Silicon Nitride tip. Images were obtained with a PeakForce Tapping frequency of 2kHz with the auto-amplitude on. Average force applied during scanning was 5 nN.

2.5. Membrane lipid extraction

The membrane lipid extraction of PAK was performed as described by Deschamps *et al.* [12]. Briefly, from a pre-culture overnight (see Section 2.3), PAK was grown for 7 h in MHB, SCFM or SCFM-PC (5.10^5 CFU/mL for initial inoculum) and a pellet was collected by centrifugation.

Then, alginate lysis was performed using alginate lyase in PBS (0.15 mg/mL), followed by sonication, centrifugation and ultracentrifugation. Finally, lipids were extracted using a modified version of the Bligh and Dyer protocol [21]. In the present work, the liquid-liquid extraction was modified with the addition of internal standards as followed:

For a pellet of 20 mg, 500 µL of milli-Q water was added to resuspend the pellet and then vortex-mixed for 5 min. 1.2 mL of methanol was added and then vortex-mixed for 15 min, to degrade proteolipids. Then, the mixture was centrifuged (4000 ×*g*, 10 min, 22 °C) and the liquid phase recovered. After adding 0.6 mL of chloroform spiked with phospholipid standards (PC 17:0/17:0, 0.5 µg; PE 17:0/17:0, 2.5 µg; PG 17:0/17:0, 1 µg; CL 14:0/14:0/14:0/14:0, 5 µg), the solution was vortex mixed for 15 min and sonicated for 15 min. 0.6 mL of chloroform was added, then the solution was vortex mixed for another 15 min. 0.62 mL of 1 M ammonium acetate was added and the solution was vortex-mixed for 15 min. Finally, the mixture was left to rest for 30 min. One milliliter of the organic phase was recovered and 0.94 mL of chloroform was added to the aqueous phase for a second liquid-liquid extraction. After vortex mixing for 15 min, the mixture was left to rest again for 30 min. The aqueous phase was removed and organic phases were pooled together and evaporated under argon. Lipid extracts were conserved under argon at −20 °C. For other samples pellet masses, solvent volumes and standard masses were adjusted proportionally. This extraction was performed in biological triplicate.

2.6. Liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS) analysis

The sample preparation for LC-MS analyses, the MS and LC parameters —including LC gradient— were as described by Deschamps *et al.* [12]. Briefly, the dried lipids extracts were re-constituted into 50 µL of chloroform/methanol (2/1, v/v) and 1/5 diluted into isopropanol/ acetonitrile/water (4/3/1, v/v).

The LC-MS experiments were performed using an UHPLC system (Dionex Ultimate 3000 RSLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight with an ion mobility cell instrument (Q-IMS-TOF, SYNAPT G2 HDMS, Waters MS Technologies, Manchester, UK) equipped with an electrospray ionisation source. LC -MS data were acquired in triplicate in positive and negative ion modes.

The column used was a 1.0 × 100 mm, Acquity UPLC CSH C18 1.7 µm column (Waters, Manchester, UK) equipped with a 0.2 µm prefilter. Mobile phase A consisted of acetonitrile/aqueous 10 mM ammonium formate (60/40) + 0.1% formic acid and mobile phase B consisted of isopropanol/acetonitrile/aqueous 10 mM ammonium formate (88/8/4) + 0.1% formic acid. Data acquisition was performed using MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Data processing, automatic identification and integration of peaks were performed using UNIFI 1.8.2.169 (Waters, Manchester, UK). Relative areas were calculated by dividing the area of the identified phospholipids by the area of the standard from the corresponding class of phospholipids (*e.g.* $relative\ area = \frac{\text{Area of PE 34:1}}{\text{Area of PE 17:0/17:0}}$). Areas were automatically calculated, from the extracted ion chromatograms, using the monoisotopic peak of $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ ions, for positive or negative ionisation respectively. The monoisotopic peak was used, instead of the sum of all isotopes, since not all isotopes could be observed for phospholipids at small concentrations (*e.g.* CL 67:3). We also selected only protonated or deprotonated species, instead of the sum of all detected adducts (*i.e.* $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+CH_3COO]^-$) for similar reasons. The standard deviation and relative standard deviation of the relative area (the number of replicates (n) in which the phospholipids were identified were; 7≤n≤9 for PE, PC and PG, 3≤n≤6 for CL) were calculated to plot error bars and to check the repeatability of the measurements. Anova tests and Turkey mean comparisons were performed using OriginPro 2016 (64-bit) b9.3.226.

MS/MS experiments were performed in biological triplicate, using the parameters previously described [12].

MS/MS experiments were performed in negative ion mode using a collision energy ramp from 25 eV to 45 eV. For PE (*i.e.* PE 32:1, PE 34:1, PE 36:2) and PG species (*i.e.* PG 32:1, PG 34:1, PG 36:2), the ion selected in the quadrupole was the $[M-H]^-$, whereas for PC species (*i.e.* PC 32:1, PC 34:1, PC 36:2), the ion selected was the $[M+HCO_2]^-$. MS/MS spectra were processed using MassLynx 4.1 (Waters).

3. Results

3.1. Impact of the medium composition on the growth and MIC determination

The growth curves of PAK grown in MHB, SCFM or SCFM-PC are given in Fig. 1. Measurements of OD_{600} (Fig. 1.A) or CFU/ mL (Fig. 1.B) as a function of time showed a similar growth of PAK in the three media. This observation included no lag phase time, an exponential phase time of approximately 8 h and a doubling time of 43, 42 or 44 minutes in MHB, SCFM or SCFM-PC, respectively. As a matter of fact, using these growth curves, the growth time for the lipid extraction (7h) was chosen as it corresponds to the end of the exponential phase. Thus, exploitable quantities of bacteria could be collected without risking a lack of nutrients.

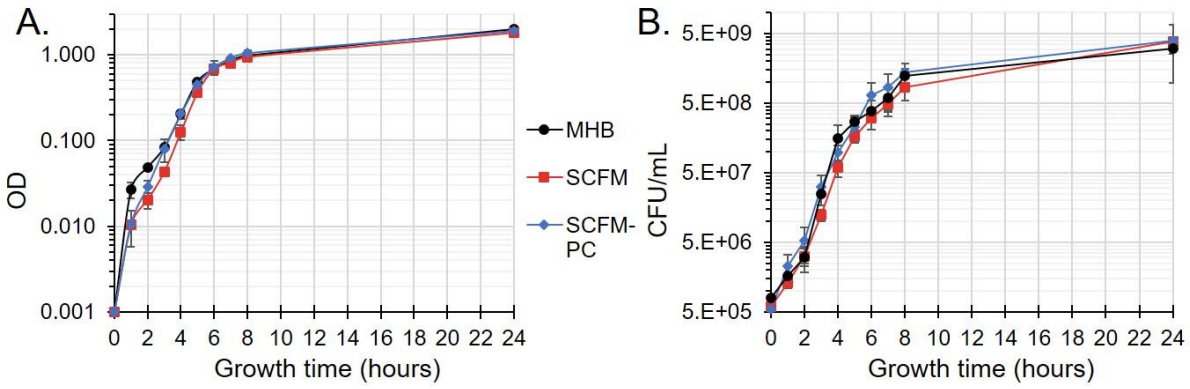


Fig. 1. Growth curves of PAK strain in MHB, SCFM and SCFM-PC. black circles for MHB, red squares for SCFM, blue diamonds for SCFM-PC. **A**. optical density (OD) plotted against time. **B**. Colony Forming Unit (CFU)/ mL plotted against time. Error bars: standard deviation.

AFM images (Fig. 2. A, B, C) show similar bacterial shapes for all media. For MHB and SCFM, the average lengths (2.8 µm ± 0.7 µm) of PAK were equivalent. However, when PAK was grown in SCFM-PC, the average length was a little smaller (2.6 µm ± 0.6 µm), but as a counterpart, the height was higher (Fig.2.C), showing that PAK seemed to spread less on the surface than in the other media. Interestingly, as contrary to the other two media, colonies of PAK grown in SCFM-PC showed bacteria were not glued to each other, probably due to the presence of DOPC in the growth medium.

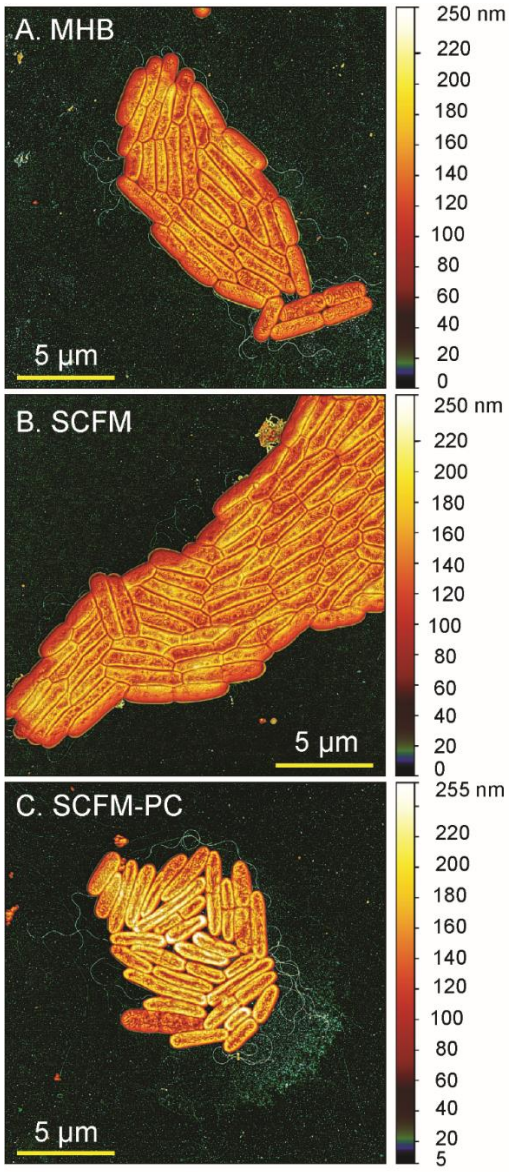


Fig. 1. AFM images of PAK young biofilms grown on glass substrates. Images are shown as topographic images overlaid with a local contrast image (Kernel size: 2; blending depth: 2; weight: 1). Classical filters as flattening and 3-points levelling were applied to the topographic image using the Gwyddion software (http://www.gwyddion.net). **A.** PAK grown in MHB; **B.** PAK grown in SCFM; **C.** PAK grown in SCFM-PC.

The MIC values of four antibiotics (carbenicillin, gentamicin, ciprofloxacin, colistin) for PAK grown in MHB, SCFM or SCFM-PC are given in Table 1. Susceptibility (S) or resistance (R) to the antibiotic were given according to the norm Eucast SFM 2019. In fact, a two-fold MIC difference cannot be considered significant, since the experiment error is of one dilution (for the protocol, see 2.4). Consequently, the influence of the medium on the MIC values could significantly be noted for carbenicillin, gentamicin and colistin, but not for ciprofloxacin. The MIC of gentamicin and colistin were higher when grown in SCFM or SCFM-PC rather than into MHB. Moreover, a switch from susceptibility to resistance could be observed for colistin and gentamicin, depending on the medium of growth. Surprisingly, the MIC of carbenicillin was much smaller when PAK was grown in SCFM rather than in MHB, but was identical between MHB and SCFM-PC media.

Table 1. Minimal inhibitory concentrations (MIC) for PAK strain. (S) for susceptibility of PAK to the antibiotic, (R) for resistance. Both (S) and (R) are given according to the norm Eucast SFM 2019 —apart for carbenicillin for which reference values was not given in the norm.

medium/ antibiotic	**carbenicillin**	**gentamicin**	**ciprofloxacin**	**colistin**
	(MIC in µg/mL)			
MHB	64-128	0.5 (S)	0.125 (S)	0.125-0.25 (S)
SCFM	16	4-8 (R)	0.125 (S)	2-4 (R)
SCFM-PC	64-128	4-8 (R)	0.25 (S)	2 (R)

3.2 Comparison of the membrane phospholipids composition

3.2.1 Semi-quantification

The membrane lipids of PAK were identified using a home-made retention time-*m/z* library, which was previously described for PAK grown in MHB [12]. Lipid annotation was based on the nomenclature of Liebisch *et al.* [22]. Forty-two lipids were identified. Twenty phospholipids were identified using positive ionisation: 7 phosphatidylcholines (PC) and 13 cardiolipins (CL).

Twenty-two were identified using negative ion mode: 13 phosphatidylethanolamines (PE) and 9 phosphatidylglycerols (PG). Please note that PE and CL could be observed in both positive and negative ion modes. However, using our analytical conditions (especially the LC mobile phase with buffers), a higher signal was observed in positive ionisation mode for CL and in negative ionisation mode for PE.

When PAK grown in SCFM or SCFM-PC, no new phospholipids were detected. Therefore, a semi-quantitative approach was used in order to highlight the influence of the medium. Please note that, while PC 34:0, PE 34:0 and PG 34:0 were detected as traces in the membrane of PAK, the relative area of these phospholipids could not be determined. Actually, using our chromatographic conditions, these phospholipids could not be separated from the standards (*i.e.* PC 17:0/17:0, PE 17:0/17:0, PG 17:0/17:0), therefore, the PC 34:0, PE 34:0 and PG 34:0 produced by PAK were excluded from the study.

Fig. 3.A., 3.B. and 3.C. show relative areas of some depictive examples of the membrane phospholipids extracted from PAK grown in MHB, SCFM or SCFM-PC media. The relative areas for all the identified phospholipids are given in S2 (Fig S2.4 to S2.7).

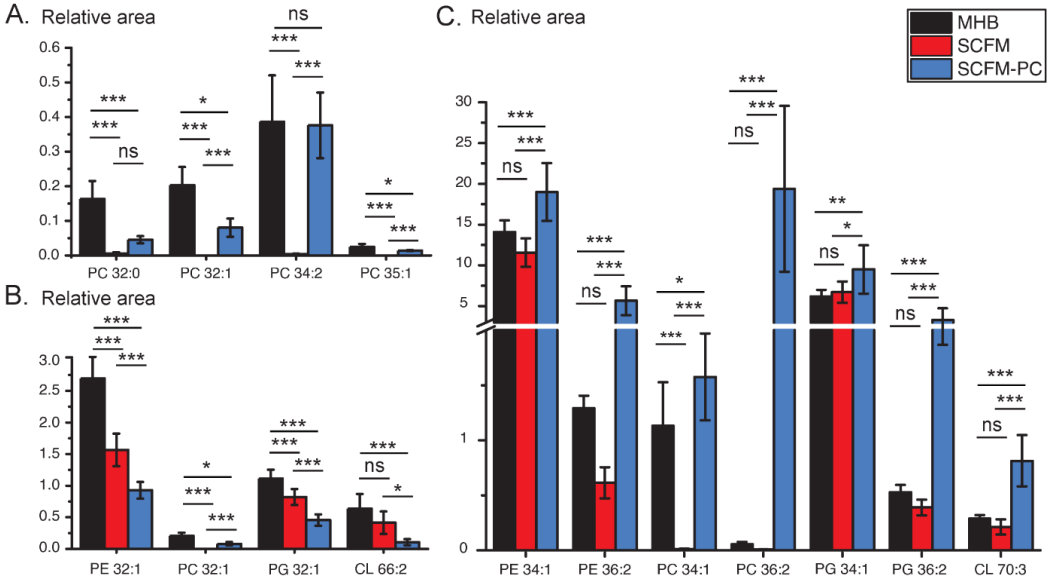


Fig. 2. Relative areas of phospholipids extracted from PAK. $\text{Relative area} = \frac{\text{PAK PL area}}{\text{PL standard area}}$. Black bars: PAK grown in MHB, red bars: PAK grown in SCFM, blue bars: PAK grown in SCFM-PC. Error bars: standard deviation ($7 \leq n \leq 9$ for PE, PC and PG, $3 \leq n \leq 6$ for CL). P-values are reported —between MHB and SCFM, SCFM and SCFM-PC and MHB and SCFM-PC— as: * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$, *** for $p<0.001$, ns for non-significant. **A.** PC less or equally produced in SCFM-PC than MHB and mostly not produced in SCFM; **B.** phospholipids more produced in MHB than SCFM or SCFM-PC; **C.** phospholipids more produced in SCFM-PC than SCFM or MHB.

Depending on the medium of growth, three trends of relative areas could be observed. As shown in Fig. 3.A., apart from PC 34:1 and PC 36:2 (Fig. 3.C.), PC were significantly less produced for PAK grown in SCFM rather than MHB or SCFM-PC. As shown in Fig. 3.B. and S2 (Fig S2.4 to S2.7), most phospholipids (23) were more produced in MHB than SCFM or SCFM-PC. As shown in Fig. 3.C., phospholipids containing oleic acid (C18:1) were greatly over-produced in SCFM-PC, especially for PE 34:1, PC 34:1, PG 34:1 and PE 36:2, PC 36:2, PG 36:2. Caution must be taken regarding the high relative area of PC 36:2 extracted from PAK grown in SCFM-PC. Indeed, this may be due to i) direct incorporation of DOPC inside the bacteria membrane —without any modifications, ii) contamination of our samples with the culture medium DOPC or iii) both of i) and ii). However, it is clear from the over-production of PE 36:2, PG 36:2 and phospholipids containing oleic acid, that DOPC is at least recycled by the bacteria to produce phospholipids. Then, the presence of DOPC directly incorporated into the bacteria membrane would be a very likely hypothesis.

3.2.2 Fatty acid composition

In order to evaluate the influence of the growth medium on the fatty acid composition, MS/MS experiments were performed, on the most intense phospholipids, in biological triplicates and for each medium. Fragment identification was performed using phospholipid fragments described in the literature [23,24]. S3 gives all the fatty acid fragments of interest in negative ion mode —carboxylate anions R_1COO^{-}— for PC/PE/PG 32:1, 34:1 and 36:2. Please note that for SCFM medium, PC species could not be detected in negative ion mode, since they were only produced as traces in this medium (see 3.2.1) and PC are known to not ionize well in negative ion mode, even with the $[M+HCO_2]^-$ adduct.

As previously described by *Hsu et al.* [23], the loss of the fatty acid in the sn-2 position is favoured. Hence, in order to compare the proportion of the two sn-1/2 position isomers (*e.g.* PG 16:0/16:1 and PG 16:1/16:0) between the three media, the following ratio was calculated $ratio\ 1 = \frac{\text{Intensity fatty acid sn}-1}{\text{Intensity fatty acid sn}-2}$. When several isomers of fatty acyl chain length (*e.g.* PE 16:0/16:1 and PE 14:0/18:1) were observed, the following ratio was calculated:

$ratio\ 2 = \frac{\text{Intensity fatty acid sn}-2\text{ of isomer 2}}{\text{Intensity fatty acid sn}-2\text{ of isomer 1}}$. The ratio 2 was calculated using only the sn-2 fatty acid since the sn-1 fatty acid of the second isomer (less abundant) was not detected for all phospholipids. Fig 4. shows the MS/MS spectra obtained for PG 34:1 in the three media (A. MHB, B. SCFM, C. SCFM-PC) and illustrates the determination of the ratio 1. The sn-2 fatty acid of isomer 2 (C16:1) was also given to illustrate the abundance difference between isomer 1 and isomer 2. The sn-1 fatty acid of isomer 2 (C18:0) was not detected. All calculated ratios means, standard deviation and relative standard deviation, are given in S3.

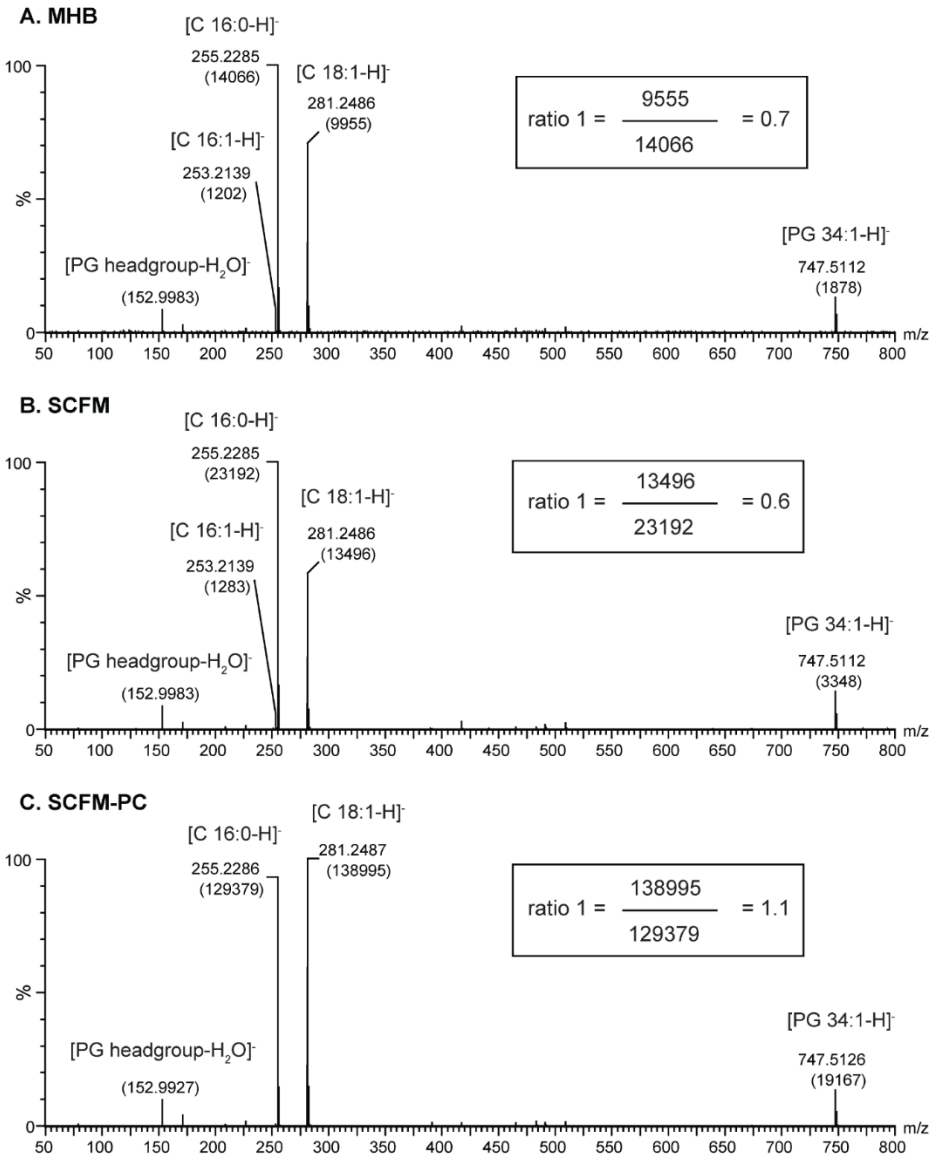


Fig. 4 MSMS Spectra of [PG 34:1-H]⁻ and determination of the ratio 1.Ratio 1 allows to compare the proportion of the two sn-1/2 position isomers $\left(\text{ratio } 1 = \frac{\text{Intensity fatty acid sn}-1}{\text{Intensity fatty acid sn}-2}\right)$ between the three media. Bracket values: ion intensities. **A.** PAK grown in MHB; **B.** PAK grown in SCFM; **C.** PAK grown in SCFM-PC.

Table 2 shows the major isomers identified for PC 32:1, PE 32:1, PG 32:1, PC 34:1, PE 34:1 and PG 34:1. The major isomer was identical in MHB and SCFM media. However, when compared to MHB and SCFM, the SCFM-PC medium shows different isomers for two phospholipids: PC 32:1 and PG 34:1. In SCFM-PC, the major isomer was PC 14:0/18:1 for PC 32:1 (PC 16:0/16:1 in MHB), and PG 16:0/18:1 for PG 34:1 (PG 18:1/16:0 in MHB or SCFM). Regarding sn-1/2 position isomers, for PG 32:1, PC 34:1/ PE 34:1/ PG 34:1, the respective 16:1/16:0 and 16:0/18:1 isomers were significantly more produced in SCFM-PC than in SCFM or in MHB (ratio values in S3).

Table 2. Fatty acid composition of the major isomer for six phospholipids, depending on the medium of growth.

	PC 32:1	**PE 32:1**	**PG 32:1**	**PC 34:1**	**PE 34:1**	**PG 34:1**
MHB	16:0/16:1	16:0/16:1	16:0/16:1	18:1/16:0	18:1/16:0	18:1/16:0
SCFM	nd	16:0/16:1	16:0/16:1	nd	18:1/16:0	18:1/16:0
SCFM-PC	14:0/18:1	16:0/16:1	16:0/16:1*****	18:1/16:0*****	18:1/16:0*	16:0/18:1

nd: not detected; * for PG 32:1, PC 34:1 and PE 34:1, the respective 16:1/16:0, 16:0/18:1 and 16:0/18:1 isomers were significantly more produced in SCFM-PC than in SCFM or in MHB.

Regarding PC/PE/PG 36:2 (see S3), the major isomers were PC/PE/PG 18:1/18:1 for all media. However, whereas no other isomer could be observed for PC 36:2 in any media, other isomers were observed for PE 36:2 and PG 36:2. For PE 36:2, PE 19:1/17:1 was detected, in trace level, in MHB (ratio 2 = 0.07 ± 0.02), SCFM (ratio 2 = 0.05 ± 0.02) and SCFM-PC (ratio 2 = 0.01 ± 0.01). For PG 36:2, PG 20:1/16:1 was observed in MHB (ratio 2 = 0.55 ± 0.09), SCFM (ratio 2 = 0.52 ± 0.19) and in trace level in SCFM-PC (ratio 2 = 0.04 ± 0.01).

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to analyse the membrane lipid composition of *P. aeruginosa* in CF sputum-like media (*e.g.* SCFM and SCFM-PC) and compare it with a classical medium. The three following media were used: the commercial MHB —as a reference medium, SCFM [15] and a modified version of SCFM by the addition of a phosphatidylcholine (SCFM-PC).

When studying the influence of the culture medium on the production of molecules by bacteria, checking that the bacterial growth is not affected by the culture medium is crucial. Here, growth curves (see 3.1) showed that the growth of PAK was identical when grown in MHB, SCFM or SCFM-PC. As detailed in the protocol of the membrane lipid extraction (see 2.5), the culture was stopped at the same time for every medium (end of the exponential phase, see 3.1). Therefore, the following discussion could be made assuming that the membrane lipid composition modifications were not linked to a difference in the bacterium growth phase. This should be noted as a recent work by Le Sénéchal *et al.* [13] showed that the phospholipid content of *P. aeruginosa* PAO1 was closely related to the bacterial growth.

Before going further into the discussion, one should note that a plausible criticism of our methodology is that *P. aeruginosa* was grown in planktonic conditions instead of biofilm conditions, which should better reproduce the CF sputum growth conditions. However, since laboratory biofilm are grown on abiotic sterile surfaces, the adherence of the biofilm is likely to differ from the one in CF sputum, leading to possible lipid modifications. Moreover, many studies on clinical *P. aeruginosa* were performed in shaken flasks since even the sampling of the bacterium would be enough to alter its metabolic phenotype [25]. Despite these limitations, we believe that SCFM-PC is a good compromise medium for rigorous analysis of the membrane lipids of *P. aeruginosa*.

The main focus of this study was to investigate the influence of the medium on the phospholipids composition of the membrane. Using LC-MS in qualitative manner, as a first approach, we could not observe any influence of the medium on the type of identified phospholipids.

Therefore, a semi-quantification approach (comparison of relative intensities, using internal standards) was used (see 3.2.1). The most remarkable result was that most phospholipids were less produced into SCFM, compared to MHB. Knowing that lipids could be found in CF-sputum [26], SCFM-PC was made, by adding DOPC to SCFM, in order to avoid the lack of PC species. When PAK was grown in SCFM-PC, we could see the increase of the phospholipids with the longest fatty acyl chains (see Fig. 3.C). This increase might counterbalance the shortage of other lipids. However, for SCFM, we haven't identified any new phospholipids nor increase of other phospholipids. Ornithine-lipids, which were described to be produced by *P. aeruginosa* when grown in phosphate limiting conditions [27], were not detected. Two hypothesis can be assumed regarding the decrease of phospholipids of PAK grown in SCFM: i) novel phospholipids species were produced, but were neither extracted using our extraction conditions (see 2.6), nor detected using our analytical conditions (see 2.7), ii) the lipid-protein ratio, which is supposed to be around 1/1 (w/w) for bacteria [28], was modified. The hypothesis that PAK grown in SCFM could be smaller than grown in MHB —leading to an overall lighter weight of phospholipids— was also considered. However, as shown by the AFM images in Fig. 2. (see 3.1), no significant influence of the medium on size nor on the shape of PAK was observed, consequently this hypothesis was rejected.

MS/MS experiments were performed, as well, in order to evaluate the influence of the growth medium on the fatty acid composition of phospholipids (see 3.2.2). The most remarkable observation was that the fatty acid C18:1 was strikingly more abundant in phospholipids produced by PAK grown in SCFM-PC than SCFM or MHB. This resulted into an inversion of the most abundant isomer for PC 32:1 and PG 34:1 (from MHB or SCFM to SCFM-PC). Indeed, for PC 32:1, both PC 14:0/18:1 and PC 16:0/16:1 were detected into MHB and SCFM-PC, but for SCFM-PC the major isomer was PC 14:0/18:1, whereas for MHB, the major isomer was PC 16:0/16:1. Also, for PG 34:1, the major isomer was PG 16:0/18:1 in the case of SCFM-PC, whereas for MHB or SCFM, the major isomer was PG 18:1/16:0. Moreover, isomers containing C 18:1 in sn-2 position were favoured when PAK was grown in SCFM-PC. Regarding PG 32:1, PC 34:1 and PE 34:1, the respective 16:1/16:0, 16:0/18:1 and 16:0/18:1 isomers were significantly more produced in SCFM-PC than in SCFM or in MHB.

The most likely explanation for these observations would be that *P. aeruginosa* would take DOPC from the SCFM-PC, and modify it, in order to produce its own phospholipids, as previously described for polyunsaturated fatty acids [29]. As a matter of fact, this hypothesis can also be supported by the overproduction of PE 36:2 and PG 36:2 (see Fig. 3.C. in part 3.2.1) in SCFM-PC. Indeed, in most bacteria, PC are synthesised from PE, while PG are synthesised using another pathway [30]. However, in the case of *P. aeruginosa*, it was demonstrated that PC are synthesised from a phosphatidic acid (PA) and a choline [31]. Therefore, PC, PE and PG are synthesised from three different pathways which uses PA as a common precursor. Thus, PA 36:2, recycled from DOPC, is likely used to synthesise PE 36:2 and PG 36:2. Consequently, these modifications would include: i) change of the polar head group and ii) replacement of the sn-1 fatty acid. Since adding a phospholipid to the growth medium had an influence on the membrane phospholipids of *P. aeruginosa*, we should note that caution must be taken when choosing this phospholipid, in regards to the aim of the study.

Finally, as described in 3.4.1, the other less abundant isomer of PE 36:2 (*i.e.* PE 19:1/17:1) and PG 36:2 (*i.e.* PG 20:1/16:1) were produced for MHB and SCFM, but only in traces for SCFM-PC. Taking into account these observations and the inversion of the major isomer previously described, one should note that caution must be taken when analysing the fatty acid composition of phospholipids. Our results show that for an identical fatty acyl chain length, the fatty acid composition might not be the same for different polar heads (*e.g.* PC 32:1, PE 32:1 and PG 32:1).

In a second approach, the MIC values of four antibiotics were determined (see 3.1) with the aim to link membrane lipids modifications and antibiotic resistance. Indeed, the antibiotic susceptibility of *P. aeruginosa* is related to its ability to guarantee membrane homeostasis —maintenance of the membrane physical properties [32]. This homeostasis can happen by modifying phospholipids in different ways. The stability of the membrane and, accordingly, the decrease of the permeability, can be enhanced by increasing the fatty acyl chain length [33]. Conversely, the fluidity and permeability can be increased by introducing a double bond or a cyclopropyl (more stable to acidic conditions than a double bond), or a terminally branched methyl on the fatty acyl chain [34].

The ratio of negatively charged phospholipids (CL and PG) and neutral (PE) or positively charged phospholipids (PC) can also be modified in order to make the membrane less sensitive to pH or to the medium ion composition [35]. The replacement of PE by PC was also described to enhance the membrane stability due to the ability of PC to form bilayers more easily than PE [33].

As described in 3.4.1., PAK was found to produce less PC species when grown in SCFM than into MHB. MIC values of carbenicillin were also seemingly smaller when PAK was grown in SCFM (MIC_{SCFM} = 16 µg/mL) than in MHB (MIC_{MHB} = 64-128 µg/mL). Carbenicillin mechanism of action consists in inhibiting the synthesis of the bacterial cell-wall peptidoglycan. Also, since carbenicillin is an hydrophobic antibiotic (logP = 1.13 [36]), we may assume that this antibiotic can cross the lipid membrane instead of going through the porins. Hence, we can make the hypothesis that PAK, when grown in SCFM, was more susceptible to carbenicillin because the membrane cell was less stable due to the lack of PC species. Then, when DOPC was added to the SCFM medium, the presence of PC in the membrane restore a susceptibility to carbenicillin similar to the one in MHB ($MIC_{MHB} = MIC_{SCFM\text{-}PC}$).

Regarding the other antibiotics tested, the influence of the growth medium on the MIC values was observed for colistin and gentamicin, but not for ciprofloxacin (see 3.1). It is notable that, MIC values of gentamicin, colistin and ciprofloxacin in SCFM were in agreement with those from Pusic *et al.* [37] SCFM medium). We also observed an increase of MIC values from a rich medium (MHB) to the chemically defined SCFM (see Table 1). This observation was also described by Pusic *et al.* (from LB to SCFM), and for colistin between MHB and ASM, by Diaz Iglesias *et al.* [38]. In SCFM-PC, the MIC values of colistin and gentamicin were equal to the ones in SCFM. Therefore, the link between the membrane stability (decrease of the membrane stability in SCFM but restored in SCFM-PC) and the MIC, described for carbenicillin, might not be suitable for other antibiotics. The membrane permeability changes, induced by the growth medium, may partly explain *P. aeruginosa* antibiotic susceptibility modifications. Actually, it is rather a multi-factor issue since the nutrients present in the growth medium can induce particular resistance mechanisms of *P. aeruginosa* [26].

5. Conclusion

In this study, we reported the membrane lipid composition of *P. aeruginosa* grown into CF sputum-mimicking media (SCFM and SCFM-PC). We showed that the growth medium had an influence on the phospholipid quantities. We observed that PC species were produced in trace level in SCFM. Implementing DOPC to SCFM (SCFM-PC medium), as a choline nutrient, not only had an influence on the quantities of PC species, but also on the length of the fatty acids parts of the phospholipids and phospholipid isomerism. Such modifications may affect the membrane permeability. Actually, MIC variations of the hydrophobic carbenicillin antibiotic support this hypothesis. These results suggest that the membrane lipid composition should be taken into account for antibiotic susceptibility testing. Since we showed that the growth medium can influence the membrane lipid composition, caution must be taken when choosing a medium, especially for clinical studies.

Conflict of interest

The authors declare that they have neither conflict of interest nor competing financial interest.

Funding information

The authors gratefully acknowledge European Regional Development Fund (ERDF, no. HN0001343), Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029) and Région Normandie for their financial support.

REFERENCES

[1] P. Pachori, R. Gothalwal, P. Gandhi, Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review, Genes Dis., 6 (2019) 109-119.

[2] W.D. Smith, E. Bardin, L. Cameron, C.L. Edmondson, K.V. Farrant, I. Martin, R.A. Murphy, O. Soren, A.R. Turnbull, N. Wierre-Gore, E.W. Alton, J.G. Bundy, A. Bush, G.J. Connett, S.N. Faust, A. Filloux, P.S. Freemont, A.L. Jones, Z. Takats, J.S. Webb, H.D. Williams, J.C. Davies, Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis, FEMS microbiology letters, 364 (2017).

[3] R.T. Sadikot, T.S. Blackwell, J.W. Christman, A.S. Prince, Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, American journal of respiratory and critical care medicine, 171 (2005) 1209-1223.

[4] M. Bassetti, A. Vena, A. Croxatto, E. Righi, B. Guery, How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections, Drugs Context, 7 (2018) 212527.

[5] E. Tacconelli, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, The Lancet Infectious Diseases, 18 (2018) 318-327.

[6] M. El Khoury, J. Swain, G. Sautrey, L. Zimmermann, P. Van Der Smissen, J.-L. Décout, M.-P. Mingeot-Leclercq, Targeting Bacterial Cardiolipin Enriched Microdomains: An Antimicrobial Strategy Used by Amphiphilic Aminoglycoside Antibiotics, Sci. Rep., 7 (2017).

[7] P.V. Escriba, Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine, Trends Mol Med, 12 (2006) 34-43.

[8] R.M. Epand, C. Walker, R.F. Epand, N.A. Magarvey, Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics, Biochim Biophys Acta, 1858 (2016) 980-987.

[9] H. Benamara, C. Rihouey, T. Jouenne, S. Alexandre, Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*, Biochim Biophys Acta, 1808 (2011) 98-105.

[10] H. Benamara, C. Rihouey, I. Abbes, M.A. Ben Mlouka, J. Hardouin, T. Jouenne, S. Alexandre, Characterization of membrane lipidome changes in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm growth on glass wool, PLoS One, 9 (2014) 9.

[11] I. Abbes, C. Rihouey, J. Hardouin, T. Jouenne, E. De, S. Alexandre, Identification by mass spectrometry of glucosaminylphosphatidylglycerol, a phosphatidylglycerol derivative, produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Rapid communications in mass spectrometry : RCM, 32 (2018) 2113-2121.

[12] E. Deschamps, I. Schmitz-Afonso, A. Schaumann, E. De, C. Loutelier-Bourhis, S. Alexandre, C. Afonso, Determination of the collision cross sections of cardiolipins and phospholipids from *Pseudomonas aeruginosa* by traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry using a novel correction strategy, Anal. Bioanal. Chem., 411 (2019) 8123-8131.

[13] C. Le Senechal, M. Crouzet, P. Costaglioli, C. Barthe, C. Bure, S. Vilain, Phospholipid Content of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Is Modulated by the Growth Phase Rather Than the Immobilization State, Lipids, 54 (2019) 519-529.

[14] M.A. Oberhardt, J. Puchalka, K.E. Fryer, V.A. Martins dos Santos, J.A. Papin, Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, J Bacteriol, 190 (2008) 2790-2803.

[15] K.L. Palmer, L.M. Aye, M. Whiteley, Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum, Journal of bacteriology, 189 (2007) 8079-8087.

[16] K.H. Turner, A.K. Wessel, G.C. Palmer, J.L. Murray, M. Whiteley, Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 112 (2015) 4110-4115.

[17] S. Kirchner, J.L. Fothergill, E.A. Wright, C.E. James, E. Mowat, C. Winstanley, Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung, Journal of visualized experiments : JoVE, (2012) e3857.

[18] J. Zhao, J. Wu, F.A. Heberle, T.T. Mills, P. Klawitter, G. Huang, G. Costanza, G.W. Feigenson, Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol, Biochim Biophys Acta, 1768 (2007) 2764-2776.

[19] A.K. Cain, L.M. Nolan, G.J. Sullivan, C.B. Whitchurch, A. Filloux, J. Parkhill, Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PAK, Microbiology Resource Announcements, 8 (2019) e00865-00819.

[20] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, Nat Protoc, 3 (2008) 163-175.

[21] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION, Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37 (1959).

[22] G. Liebisch, J.A. Vizcaino, H. Kofeler, M. Trotzmuller, W.J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener, M.J. Wakelam, Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry, Journal of lipid research, 54 (2013) 1523-1530.

[23] F.-F. Hsu, J. Turk, Electrospray Ionization with Low-energy Collisionally Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry of Glycerophospholipids: Mechanisms of Fragmentation and Structural Characterization, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 877 (2009) 22.

[24] B. Colsch, F. Fenaille, A. Warnet, C. Junot, J.C. Tabet, Mechanisms governing the fragmentation of glycerophospholipids containing choline and ethanolamine polar head groups, European journal of mass spectrometry, 23 (2017) 427-444.

[25] W.M. van Gulik, Fast sampling for quantitative microbial metabolomics, Current opinion in biotechnology, 21 (2010) 27-34.

[26] M.S. Son, W.J. Matthews, Jr., Y. Kang, D.T. Nguyen, T.T. Hoang, In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients, Infection and immunity, 75 (2007) 5313-5324.

[27] S. Lewenza, R. Falsafi, M. Bains, P. Rohs, J. Stupak, G.D. Sprott, R.E.W. Hancock, The olsA gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility, FEMS microbiology letters, 320 (2011) 95-102.

[28] I. Barák, K. Muchová, The role of lipid domains in bacterial cell processes, Int. J. Mol. Sci., 14 (2013) 4050-4065.

[29] L.Y. Baker, C.R. Hobby, A.W. Siv, W.C. Bible, M.S. Glennon, D.M. Anderson, S.J. Symes, D.K. Giles, *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence, BMC Microbiol, 18 (2018) 117.

[30] C. Sohlenkamp, O. Geiger, Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways, FEMS Microbiol

Rev, 40 (2016) 133-159.

[31] P.J. Wilderman, A.I. Vasil, W.E. Martin, R.C. Murphy, M.L. Vasil, *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway, Journal of bacteriology, 184 (2002) 4792-4799.

[32] Y.M. Zhang, C.O. Rock, Membrane lipid homeostasis in bacteria, Nat. Rev. Microbiol., 6 (2008) 222-233.

[33] H. Goldfine, Membrane Lipid Biogenesis, in: O. Geiger (Ed.) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 1-14.

[34] T. Romantsov, J.M. Wood, Contributions of Membrane Lipids to Bacterial Cell Homeostasis upon Osmotic Challenge, in: O. Geiger (Ed.) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 1-22.

[35] R.N. Lewis, R.N. McElhaney, Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and (31)P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids, Biophys. J., 79 (2000) 1455-1464.

[36] N.C.f.B.I.P. Database, Carbenicillin, CID=20824 in.

[37] P. Pusic, E. Sonnleitner, B. Krennmayr, D.A. Heitzinger, M.T. Wolfinger, A. Resch, U. Blasi, Harnessing Metabolic Regulation to Increase Hfq-Dependent Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*, Frontiers in microbiology, 9 (2018) 2709.

[38] Y. Diaz Iglesias, F. Van Bambeke, Activity of Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in an In Vitro Model of Biofilms in the Context of Cystic Fibrosis: Influence of the Culture Medium, Antimicrob. Agents Chemother., 64 (2020) e02204-02219.

FICHIERS SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 2

Supplementary Information S1: SCFM and SCFM-PC preparation

Stock solutions preparation for the SCFM medium

Part I: amino acids

Solutions can be kept in the dark at 4 °C for less than two months.

Amino acids stock solution to dilute into 100 mL of Mili-Q water

amino acid	m (g)
Alanine	1.60
Arginine – HCl	0.63
Cysteine – HCl	0.32
Glutamate – HCl	2.75
Glycine	0.90
Histidine – HCl	0.96
Lysine – HCl	3.84
Methionine	0.90
Ornithine – HCl	1.18
Proline	1.96
Serine	1.47
Threonine	1.19
Valine	1.29

Note: a few minutes of mixing at 37°C can help the dissolution of the amino acids.

Isoleucine and phenylalanine stock solution to dilute into 100 mL of Mili-Q water

amino acid	m (g)
Isoleucine	1.44
Phenylalanine	0.83

Leucine stock solution to dilute into 200 mL of Mili-Q water

amino acid	m (g)
Leucine	2.62

Using Mili-Q water, prepare the following NaOH solutions for the last 3 amino acids solutions

C (mol/L)	V (L)	m (g)
1	0.10	4.00
0.5	0.10	2.00
0.2	0.10	0.80

Aspartate stock solution to dilute into <u>50 mL of NaOH 0.5 M</u>

amino acid	m (g)
Aspartate	0.69

Tyrosine stock solution to dilute into <u>50 mL of NaOH 1 M</u>

amino acid	m (g)
Tyrosine	0.91

Tryptophan stock solution to dilute into <u>50 mL of NaOH 0.2 M</u>

amino acid	m (g)
Tryptophan	1.33

Part II: salts and others

Solutions can be kept in the dark at 4 °C for less than two months.

Mixed salts stock solution to dilute into 500 mL of Mili-Q water

This solution can be autoclave sterilised for storage purpose.

Salt	m (g)
NH_4Cl	0.61
KCl	5.70
NaCl	14.92
NaH_2PO_4	0.78
Na_2HPO_4	0.72
K_2SO_4	0.24
$NaNO_3$	0.15

Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) to dilute into 250 mL of Mili-Q water

This solution can be autoclave sterilised for storage purpose.

Buffer	m (g)
MOPS	5.23

$CaCl_2$/ $MgCl_2$ stock solution to dilute into 25 mL of Mili-Q water

Filter sterilise through a 0.22-µm-pore-size filter.

Salt	m (g)
$CaCl_2$	2.43
$MgCl_2$	0.72

FeSO4 stock solution to dilute into an autoclave sterilised bottle using 100 mL of autoclave sterilised Mili-Q water

Regularly check for precipitation; prepare fresh stock solution in case of precipitation.

Salt	m (g)
$FeSO_4$	0.10

D-glucose stock solution to dilute to <u>50 mL using Mili-Q water</u>

Filter sterilise through a 0.22-µm-pore-size filter.

Sugar	m (g)
D-glucose	9.01

60 % (w/w) Sodium L-Lactate to dilute to <u>10 % (w/w) using Mili-Q water</u>

Filter sterilise through a 0.22-µm-pore-size filter.

SCFM preparation

This medium needs to be prepared in sterile conditions.

Stock solution	V for 1 L of SCFM	V for 330 mL of SCFM
Mixed salts	100 mL	33 mL
MOPS	25 mL	8.25 mL
Mili-Q water	805 mL	265 mL
Mixed amino acids	10 mL	3.3 mL
Isoleucine + Phenylalanine	10 mL	3.3 mL
Leucine	16 mL	5.28 mL
Aspartate	8 mL	2.64 mL
Tyrosine	8 mL	2.64 mL
Tryptophan	0.1 mL	33 µL

Autoclave sterilise

Wait for the medium to cool to room temperature

Adjust pH to 6.5 using HCl 33 % w/w (approx. 600 µL for 330 mL)

$CaCl_2$/ $MgCl_2$	2 mL	0.66 mL
$FeSO_4$	1 mL	0.33 mL
D-glucose	3 mL	0.99 mL
Sodium L-lactate	10.5 mL	3.5 mL

Before SCFM-PC preparation

/!\1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) should be Avanti polar Lipids quality.

Make DOPC aliquots of 10mg or 33mg (depends on the required volume of SCFM-PC required; in SCFM-PC, DOPC is at a final concentration of 100µg/mL), in chloroform, at approximately 250 mg/mL.

Stock these aliquots in chloroform, under argon, at −20°C, in the dark.

SCFM-PC preparation

In order to add the aliquot of DOPC to SCFM (SCFM not older than 3 weeks):

/!\ Use an erlenmeyer or a bottle at least 3 times bigger than the volume of required SCFM-PC.

Under a biosafety cabinet:

1 Rince Paster pipette several times with chloroform,

2 Add DOPC slowly 20µL per 20µL, making it run along the inside of the Erlenmeyer flask —in order to evaporate the chloroform,

/!\ Lipid traces and lipid droplets will be visible on the inside of the flask, and in the bottom of the flask, respectively.

3 Gently manually shake to "rinse" the lipids traces,

4 Shake until lipids droplets can't be seen anymore: the medium will appear cloudy.

If lipids drops are hard to dissolve, alternate shaking and resting (5 min) under the biosafety cabinet: This allows to evaporate last traces of chloroform which are trapped in lipid vesicules.

Note: If the lipid droplets are fully dissolved, the medium can be stored a week, at 4°C, in the dark!

Supplementary Information S2

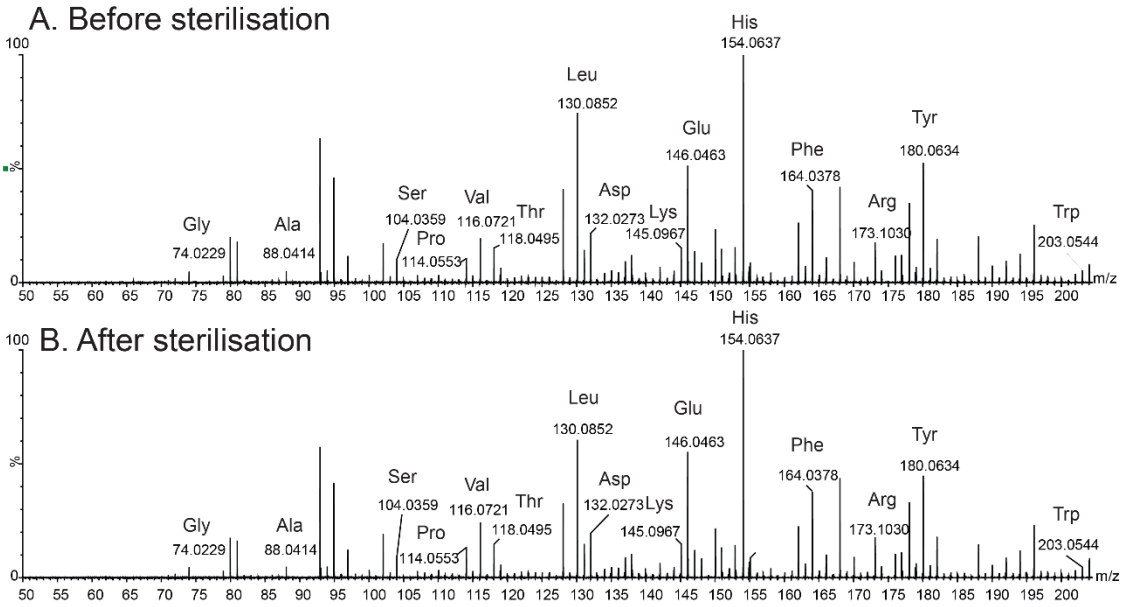


Fig. S2.1. Mass spectra, in ion negative mode, of SCFM media collected during preparation, before (A) or after (B) autoclave sterilisation. The ions detected whose *m/z* are specified correspond to the deprotonated molecules $[M-H]^-$ of the amino acids.

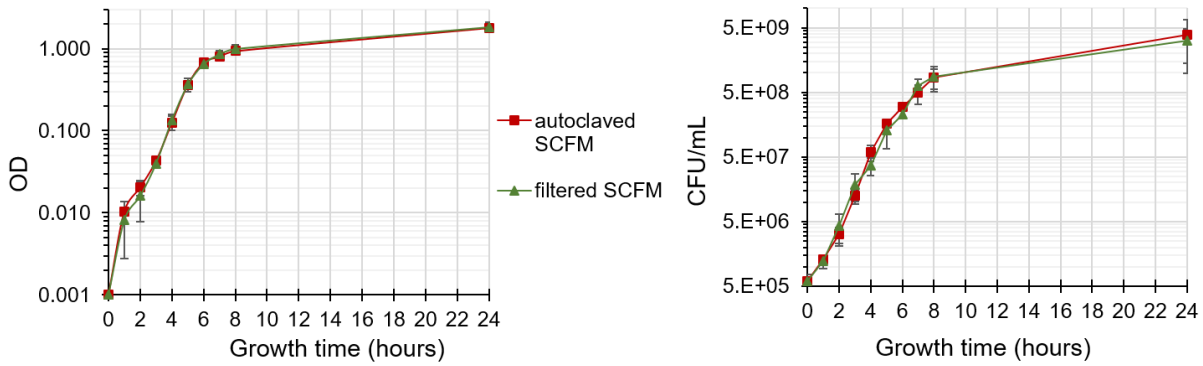


Fig. S2.2. Optical Density (A) or Colony Forming Unit (B) plotted against growth time for PAK grown into SCFM autoclave sterilised (red squares) or filtered sterilised (green triangles). Experiments were made in biological triplicates. Standard deviations are represented by error bars.

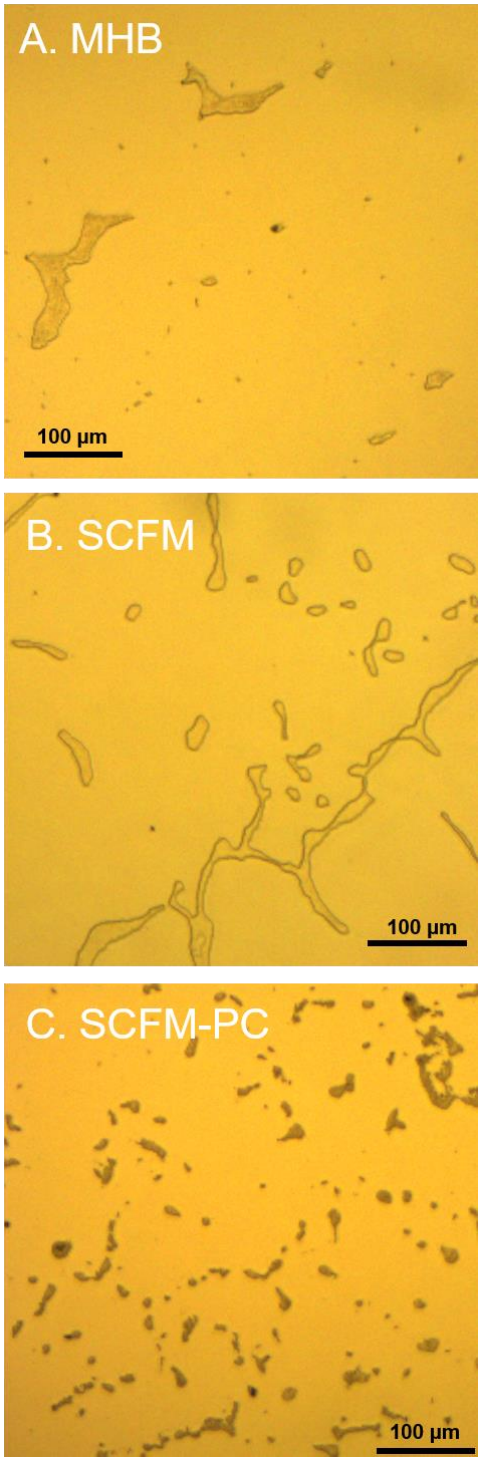


Fig S2.3. Optical images of PAK grown into: A. MHB, B. SCFM, C. SCFM-PC. Influence on the biofilm production depending on the growth medium was observed. Less biofilm were observed for PAK grown into MHB rather than in SCFM or in SCFM-PC. In SCFM-PC, bacterial colonies were smaller and more dispersed than the ones observed in the other two media.

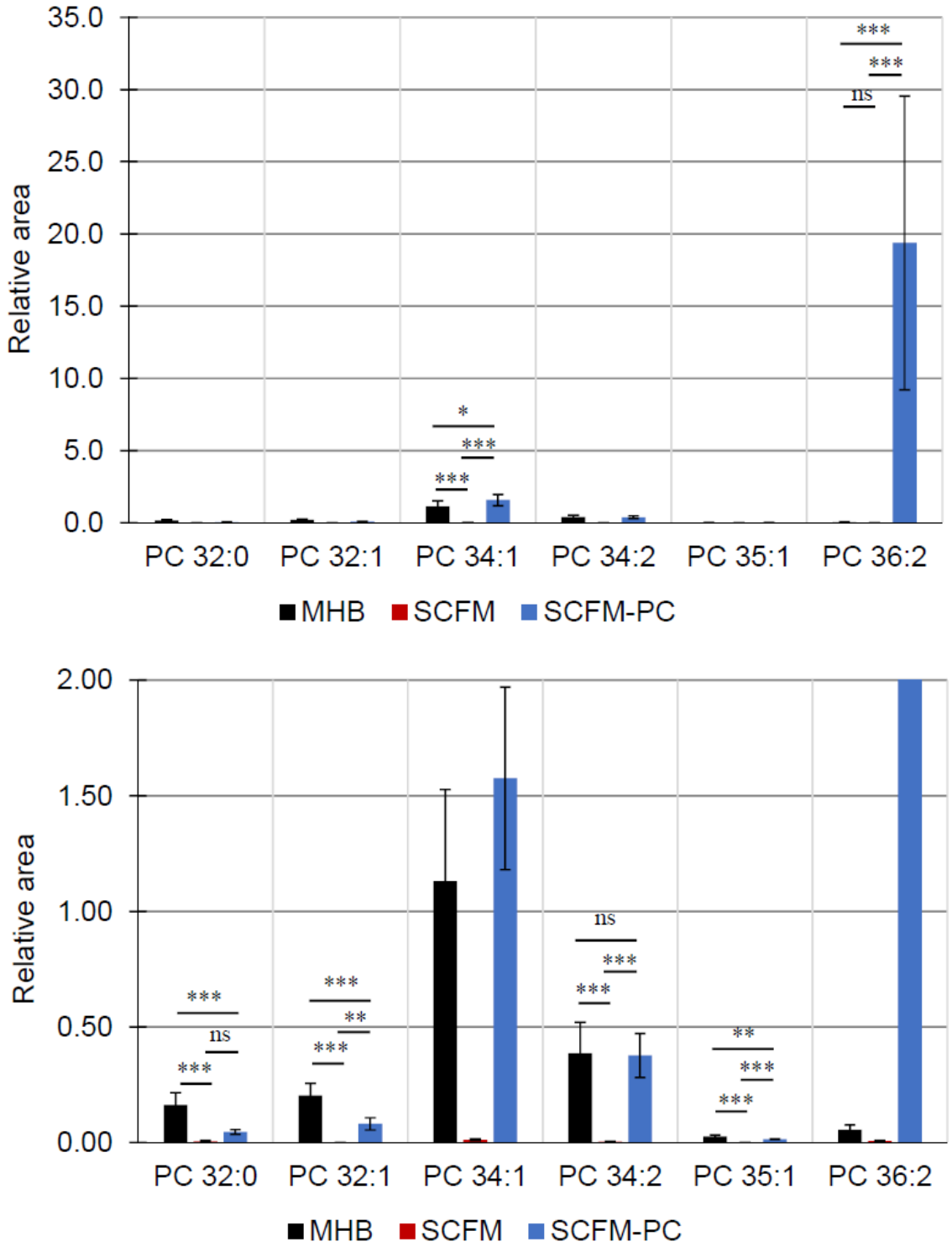


Fig S2.4. Relative areas of phosphatidylcholines extracted from PAK grown into MHB (black), SCFM (red) or SCFM-PC (blue). Error bars: standard deviation (7≤n≤9). P-values are reported —between MHB and SCFM, SCFM and SCFM-PC and MHB and SCFM-PC— as: * for p<0.05, ** for p<0.01, *** for p<0.001, ns for non-significant.

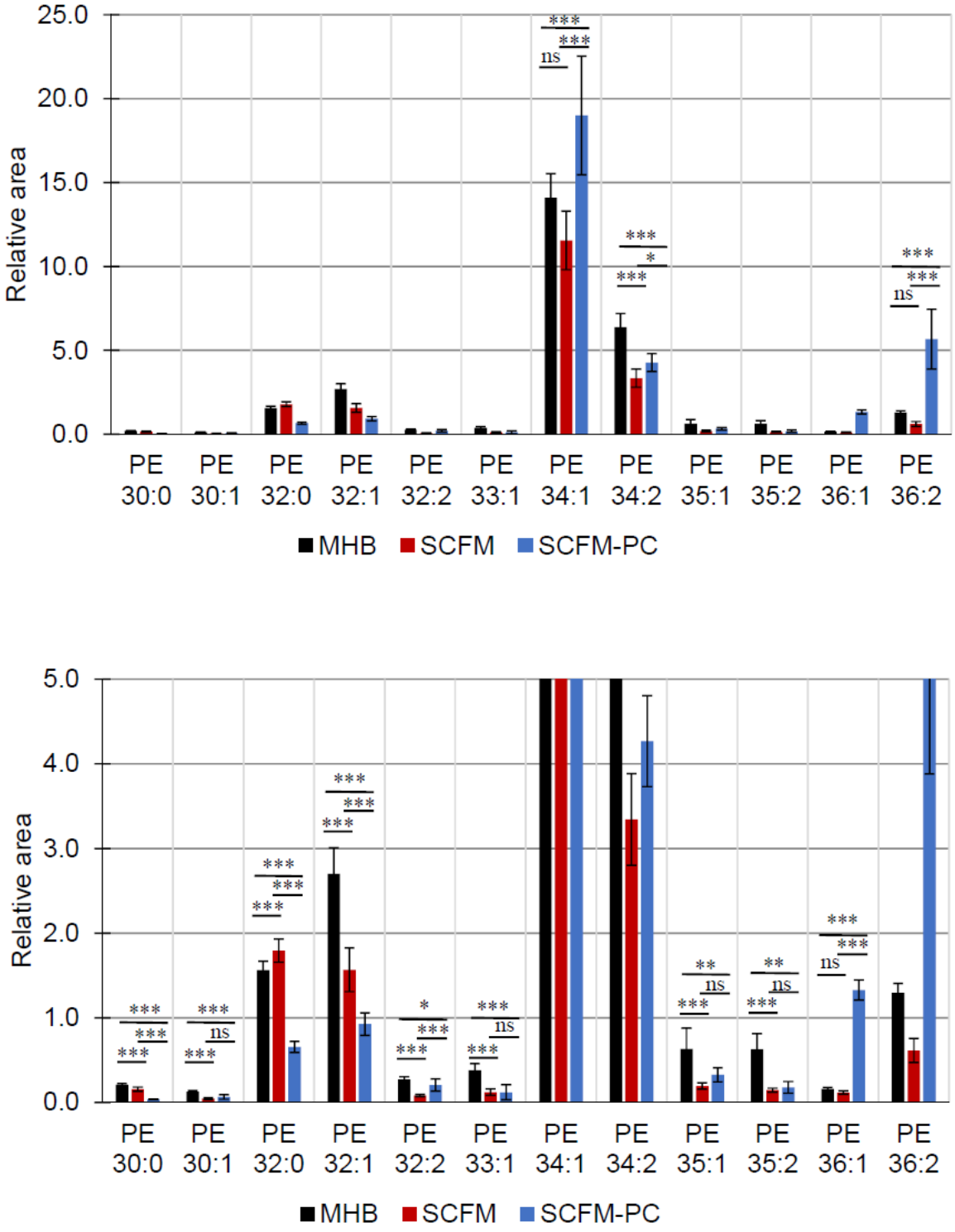


Fig S2.5. Relative areas of phosphatidylethanolamines extracted from PAK grown into MHB (black), SCFM (red) or SCFM-PC (blue). Error bars: standard deviation ($7 \leq n \leq 9$). P-values are reported —between MHB and SCFM, SCFM and SCFM-PC and MHB and SCFM-PC— as: * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$, *** for $p<0.001$, ns for non-significant.

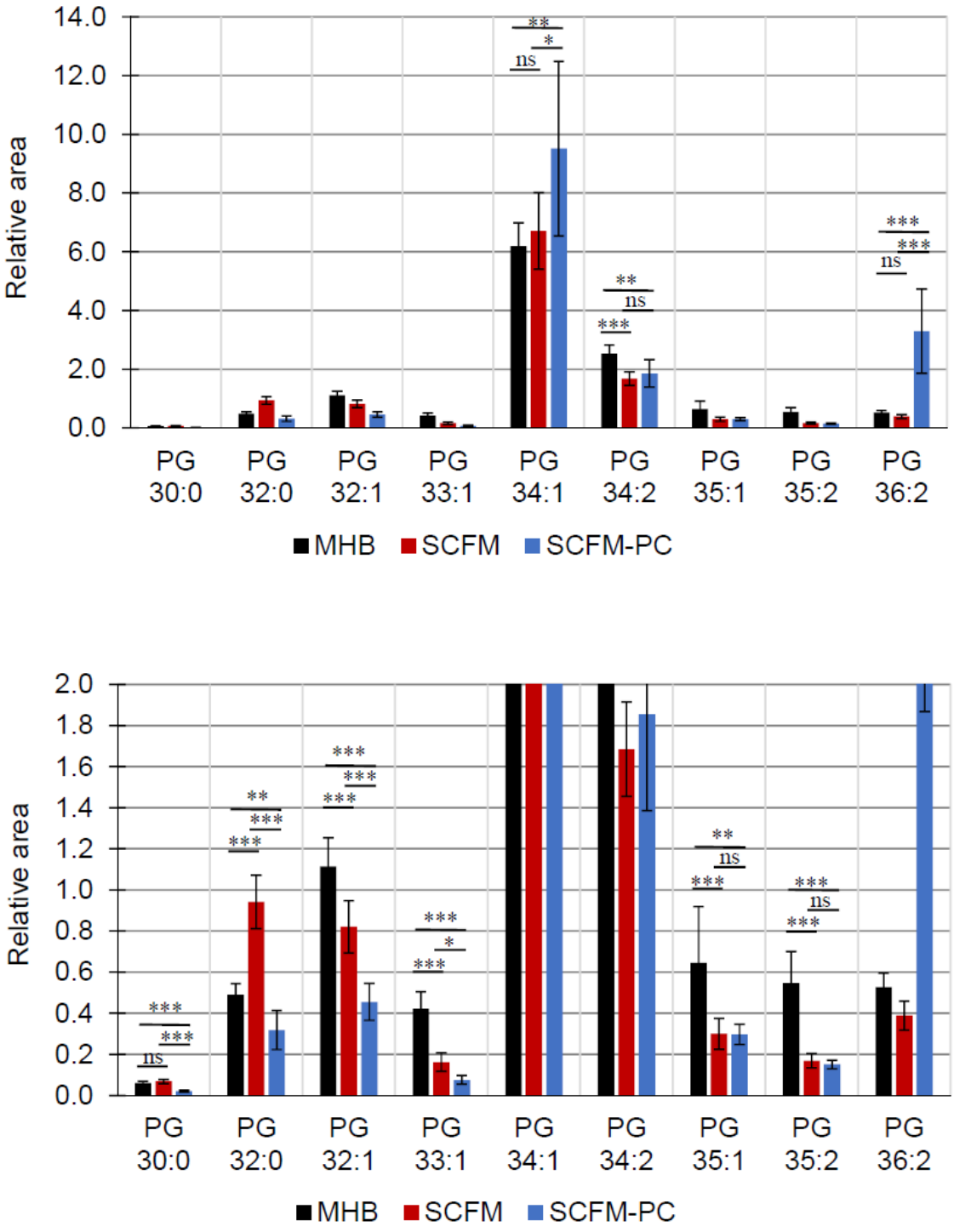


Fig S2.6. Relative areas of phosphatidylglycerols extracted from PAK grown into MHB (black), SCFM (red) or SCFM-PC (blue). Error bars: standard deviation (7≤n≤9). P-values are reported —between MHB and SCFM, SCFM and SCFM-PC and MHB and SCFM-PC— as: * for p<0.05, ** for p<0.01, *** for p<0.001, ns for non-significant.

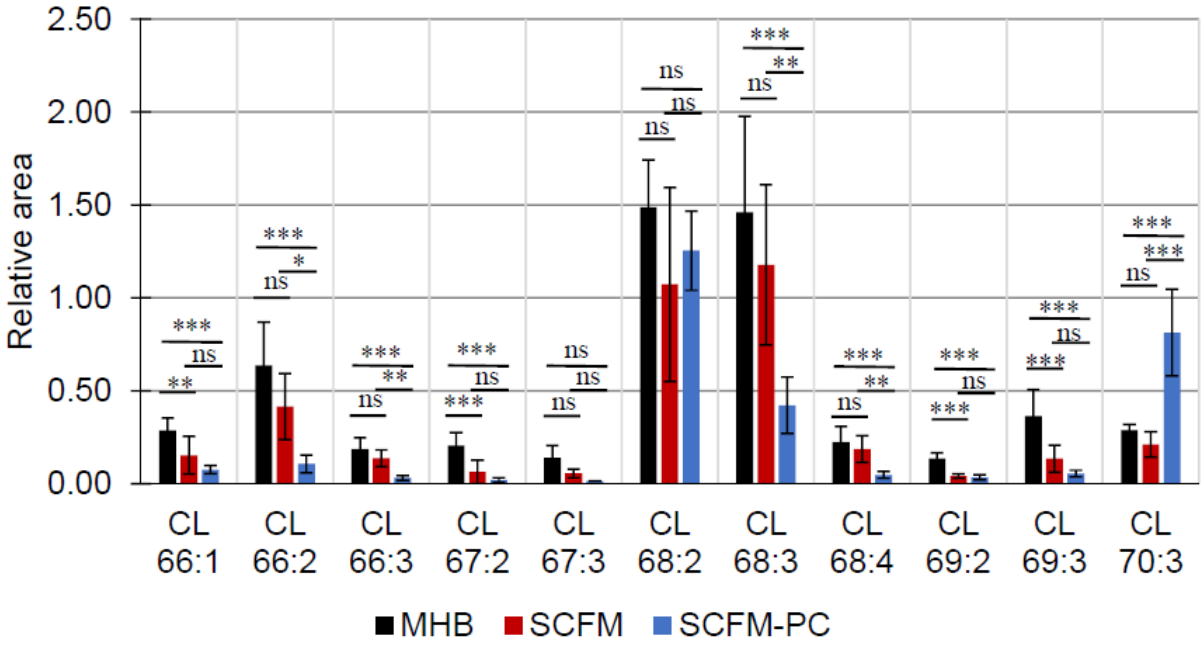


Fig S2.7. Relative areas of cardiolipins extracted from PAK grown into MHB (black), SCFM (red) or SCFM-PC (blue). Error bars: standard deviation (3≤n≤6).). P-values are reported —between MHB and SCFM, SCFM and SCFM-PC and MHB and SCFM-PC— as: * for p<0.05, ** for p<0.01, *** for p<0.001, ns for non-significant.

Supplementary Information S3: MS/MS

Full Excel file downloadable at https://doi. org/10.1016/j.bbamem.2020.183482

FA: Fatty Acid | iso1: most intense isomer | iso2: second most intense isomer | nd: not detected

PC 32:1				PC 16:0/16:1								PC 14:0/18:1									
Growth medium - replicates	Phospholipid fragment			FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio (isomer 1)		FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio		sn-1/sn-2 ratio (isomer 2)	
	m/z	intensity	identification	m/z	intensity	identification	m/z	intensity	identification			m/z	intensity	identification	m/z	intensity	identification				
PAK - MHB1	716.5381	50	PC 32:1-CH3	253.2192	341	16:1	nd	nd	nd			281.2545	157	18:1	227.2069	131	14:0		0.46		0.83
PAK - MHB2		203			4384		nd	nd	nd				1465			440		18:1/16:1	0.33	14:0/18:1	0.30
PAK - MHB3		257			3414		nd	nd	nd				1740			487			0.51		0.28
																		average	0.43	average	0.47
																		std dev	0.09	std dev	0.31
																		RSD %	20.82	RSD %	66.68
PAK - SCFM-PC1	716.5381	25	PC 32:1-CH3	253.2192	573	16:1	255.2407	159	16:0	16:0/16:1	0.28	281.2545	1529	18:1	227.2069	47	14:0		2.67		0.03
PAK - SCFM-PC2		75			953			616			0.65		3719			373		18:1/16:1	3.90	14:0/18:1	0.10
PAK - SCFM-PC3		303			1392			1175			0.84		6302			1286			4.53		0.20
										average	0.59							average	3.70	average	0.11
										std dev	0.29							std dev	0.95	std dev	0.09
										RSD %	48.80							RSD %	25.57	RSD %	78.09

PC 34:1				PC 18:1/16:0								PC 18:0/16:1									
Growth medium - replicates	Phospholipid fragment			FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio (isomer 1)		FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio			
	m/z	intensity	identification	m/z	intensity	identification	m/z	intensity	identification			m/z	intensity	identification	m/z	intensity	identification				
PAK - MHB1	744.5784	700	PC 34:1-CH3	255.2475	2492	16:0	281.2545	2104	18:1		0.84	253.2261	26	16:1	nd	nd	nd		0.01		
PAK - MHB2		2556			12843			7448		18:1/16:0	0.58		216		nd	nd	nd	16:1/16:0	0.02		
PAK - MHB3		2168			13518			7568			0.56		222		nd	nd	nd		0.02		
										average	0.66							average	0.01		
										std dev	0.16							std dev	0.00		
										RSD %	24.00							RSD %	24.57		
PAK - SCFM-PC1	744.5784	1041	PC 34:1-CH3	255.2475	4457	16:0	281.2545	4662	18:1	18:1/16:0	1.05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
PAK - SCFM-PC2		3835			20425	16:0		17718			0.87	253.2261	73	16:1	nd	nd	nd	16:1/16:0	0.00		
PAK - SCFM-PC3		10562			46507	16:0		40921			0.88		43		nd	nd	nd		0.00		
							Note: in SCFM-PC, close abundance of PC 18:1/16:0 & PC 16:0/18:1 (sn-1/sn-2 ratio close to 1)			average	0.93							average	0.00		
										std dev	0.10							std dev	0.00		
										RSD %	10.71							RSD %	83.29		

PC 34:2				PC 18:1/16:0								PC 17:1/17:1				
Growth medium - replicates	Phospholipid fragment			FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio (isomer 1)		FA(iso2) sn2 & sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio	
	m/z	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification			*m/z*	intensity	identification		
PAK - MHB1		157			682			853			1.25	nd	nd	nd	nd	nd
PAK - MHB2	742.5516	545	PC 34:2-CH3	253.2261	4380	16:1	281.2545	1551	18:1	18:1/16:1	0.35	267.2387	295	17:1	17:1/16:1	0.07
PAK - MHB3		465			4299			1435			0.33		262			0.06
										average	0.65				average	0.06
										std dev	0.52				std dev	0.00
										RSD %	81.03				RSD %	7.06
PAK - SCFM-PC1		133			1057			649			0.61	nd	nd	nd	nd	nd
PAK - SCFM-PC2	742.5516	779	PC 34:2-CH3	253.2261	3909	16:1	281.2545	2411	18:1	18:1/16:1	0.62	267.2387	45	17:1	17:1/16:1	0.01
PAK - SCFM-PC3		1660			11447			7830			0.68		31			0.00
										average	0.64				average	0.01
										std dev	0.04				std dev	0.01
										RSD %	6.21				RSD %	87.56

PC 36:2				PC 18:1/18:1		
Growth medium - replicates	Phospholipid fragment			FA sn2 & sn1		
	m/z	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification
PAK - MHB1		8062			57703	
PAK - MHB2	770.6135	3896	PC 36:2-CH3	281.2545	27941	18:1
PAK - MHB3		1291			7516	
PAK - SCFM-PC1		859538			88528	
PAK - SCFM-PC2	770.6135	47975	PC 36:2-CH3	281.2545	6021	18:1
PAK - SCFM-PC3		12052			15605	

FA: Fatty Acid | iso1: most intense isomer | iso2: second most intense isomer | iso3: third most intense isomer | nd: not detected

PE 32:1	PE 16:0/16:1								PE 14:0/18:1									
Growth medium - replicates	FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio (iso1)		FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio		sn-1/sn-2 ratio (iso2)	
	m/z	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification			*m/z*	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification				
PAK - MHB1	253.2192	354	16:1	255.2285	315	16:0	16:0/16:1	0.89	227.2069	154	14:0	281.2412	100	18:1	14:0/16:1	0.44	14:0/18:1	0.32
PAK - MHB2		6739			4093			0.61		1362			1287			0.20		0.31
PAK - MHB3		5783			2986			0.52		1577			1200			0.27		0.40
							average	0.67							average	0.30	average	0.34
							std dev	0.19							std dev	0.12	std dev	0.05
							RSD %	29.02							RSD %	39.38	RSD %	14.40
PAK - SCFM 1	253.2192	4088	16:1	255.2285	2486	16:0	16:0/16:1	0.61	227.2069	1254	14:0	281.2412	635	18:1	14:0/16:1	0.31	14:0/18:1	0.26
PAK - SCFM 2		4450			2364			0.53		938			590			0.21		0.25
PAK - SCFM 3		1855			1307			0.70		493			226			0.27		0.17
							average	0.61							average	0.26	average	0.23
							std dev	0.09							std dev	0.05	std dev	0.05
							RSD %	14.13							RSD %	18.44	RSD %	20.38
PAK - SCFM-PC1	253.2192	45372	16:1	255.2285	25615	16:0	16:0/16:1	0.56	227.2069	18488	14:0	281.2412	11821	18:1	14:0/16:1	0.41	14:0/18:1	0.46
PAK - SCFM-PC2		16987			11413			0.67		7549			5262			0.44		0.46
PAK - SCFM-PC3		12990			10790			0.83		7048			5146			0.54		0.48
							average	0.69							average	0.46	average	0.47
							std dev	0.13							std dev	0.07	std dev	0.01
							RSD %	19.43							RSD %	15.02	RSD %	1.94

PE 34:1	PE 18:1/16:0								PE 18:0/16:1							
Growth medium - replicates	FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio		FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio	
	m/z	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification			*m/z*	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification		
PAK - MHB1	255.2475	4735	16:0	281.2545	2796	18:1	18:1/16:0	0.59	253.2261	202	16:1	nd	nd	nd		0.04
PAK - MHB2		70116			41641			0.59		2199		nd	nd	nd	16:1/16:0	0.03
PAK - MHB3		69139			42671			0.62		2314		nd	nd	nd		0.03
							average	0.60							average	0.04
							std dev	0.01							std dev	0.01
							RSD %	2.42							RSD %	16.77
PAK - SCFM 1	255.2475	77871	16:0	281.2545	38154	18:1	18:1/16:0	0.49	253.2261	2273	16:1	nd	nd	nd		0.03
PAK - SCFM 2		80899			30060			0.37		2128		nd	nd	nd	16:1/16:0	0.03
PAK - SCFM 3		38588			17722			0.46		907		nd	nd	nd		0.02
							average	0.44							average	0.03
							std dev	0.06							std dev	0.00
							RSD %	13.95							RSD %	10.79
PAK - SCFM-PC1	255.2475	732023	16:0	281.2545	535977	18:1	18:1/16:0	0.73	253.2261	7356	16:1	nd	nd	nd		0.01
PAK - SCFM-PC2		421282			401387			0.95		1917		nd	nd	nd	16:1/16:0	0.00
PAK - SCFM-PC3		368937			396739			1.08		1205		nd	nd	nd		0.00
				Note: In SCFM-PC, close abundance of PE 18:1/16:0 & PE 16:0/18:1 (sn-1/sn-2 ratio close to 1)			average	0.92							average	0.01
							std dev	0.17							std dev	0.00
							RSD %	18.90							RSD %	60.50

FA: Fatty Acid | iso1: most intense isomer | iso2: second most intense isomer | iso3: third most intense isomer | nd: not detected

PE 36:2	PE 18:1/18:1			PE 19:1/17:1									PE 20:1/16:1							
Growth medium - replicates	FA(iso2) sn2 & sn1			FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio		sn-1/sn-2 ratio (iso2)		FA(iso3) sn2			FA(iso3) sn1			Isomer 3/ isomer 1 ratio	
	m/z	intensity	identification	*m/z*	intensity	identification	*m/z*	intensity	dentificatior					*m/z*	intensity	dentificatio	*m/z*	intensity	identification		
PAK - MHB1		579		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAK - MHB2	281.2545	8579	18:1	267.2331	733	17:1	295.2615	214	19:1	17:1/18:1	0.09	19:1/17:1	0.29	253.2139	75	16:1	nd	nd	nd	16:1/18:1	0.01
PAK - MHB3		8188			490			299			0.06		0.61		86		nd	nd	nd		0.01
										average	0.07	average	0.45							average	0.01
										std dev	0.02	std dev	0.23							std dev	0.00
										RSD %	24.92	RSD %	49.89							RSD %	12.94
PAK - SCFM 1		5143			251		295.2615	59	19:1		0.05	19:1/17:1	0.24		26		nd	nd	nd		0.01
PAK - SCFM 2	281.2545	4380	18:1	267.2331	324	17:1		56		17:1/18:1	0.07		0.17	253.2139	94	16:1	nd	nd	nd	16:1/18:1	0.02
PAK - SCFM 3		1887			59		nd	nd	nd		0.03	nd	nd		43		nd	nd	nd		0.02
										average	0.05	average	0.20							average	0.02
										std dev	0.02	std dev	0.04							std dev	0.01
										RSD %	41.81	RSD %	21.57							RSD %	60.10
PAK - SCFM-PC1		96226		267.2331	953	17:1	295.2615	370	19:1	17:1/18:1	0.01	19:1/17:1	0.39	253.2139	66	16:1	nd	nd	nd	16:1/18:1	0.00
PAK - SCFM-PC2	281.2545	25714	18:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAK - SCFM-PC3		53411		267.2331	120	17:1	295.2615	51	19:1	17:1/18:1	0.00	19:1/17:1	0.43	253.2139	34	16:1	nd	nd	nd	16:1/18:1	0.00
										average	0.01	average	0.41							average	0.00
										std dev	0.01	std dev	0.03							std dev	0.00
										RSD %	89.12	RSD %	6.39							RSD %	5.27

PG 36:2	PG 18:1/18:1			PG 20:1/16:1									PG 19:1/17:1									
Growth medium - replicates	FA(iso2) sn2 & sn1			FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio		sn-1/sn-2 ratio (iso2)		FA(iso3) sn2			FA(iso3) sn1			Isomer 3/ isomer 1 ratio		sn-1/sn-2 ratio (iso3)	
	m/z	intensité	identification	*m/z*	intensité	identification	*m/z*	intensité	dentificatio					*m/z*	intensité	dentificatio	*m/z*	intensité	identification				
PAK - MHB1		919		253.221	420	16:1	nd	nd	nd	16:1/18:1	0.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAK - MHB2	281.2486	6283	18:1		4004		nd	nd	nd		0.64	nd	nd	267.2331	449	17:1	295.262	65	19:1	17:1/18:1	0.07	19:1/17:1	0.14
PAK - MHB3		5537			3051		309.2767	38	20:1		0.55	20:1/16:1	0.01		647			235			0.12		0.36
										average	0.55									average	0.09	average	0.25
										std dev	0.09									std dev	0.03	std dev	0.15
										RSD %	16.44									RSD %	34.09	RSD %	60.82
PAK - SCFM 1		5032		253.221	1674	16:1	309.2844	45	20:1		0.33	20:1/16:1	0.03		178		295.262	51	19:1		0.04	19:1/17:1	0.29
PAK - SCFM 2	281.2486	4759	18:1		2415		nd	nd	nd	16:1/18:1	0.51	nd	nd	267.2331	193	17:1		52		17:1/18:1	0.04		0.27
PAK - SCFM 3		1782			1277		nd	nd	nd		0.72	nd	nd		82		nd	nd	nd		0.05	nd	nd
										average	0.52									average	0.04	average	0.28
										std dev	0.19									std dev	0.01	std dev	0.01
										RSD %	37.04									RSD %	13.09	RSD %	4.35
PAK - SCFM-PC1		52597		253.221	2907	16:1	nd	nd	nd	16:1/18:1	0.06	nd	nd	267.2331	563	17:1	295.262	239	19:1	17:1/18:1	0.01	19:1/17:1	0.42
PAK - SCFM-PC2	281.2486	17389	18:1		866		nd	nd	nd		0.05	nd	nd		23			46			0.00		2.00
PAK - SCFM-PC3		34011			940		nd	nd	nd		0.03	nd	nd		202			52			0.01		0.26
										average	0.04									average	0.01	average	0.89
										std dev	0.01									std dev	0.00	std dev	0.96
										RSD %	33.08									RSD %	78.33	RSD %	107.55

FA: Fatty Acid | iso1: most intense isomer | iso2: second most intense isomer | iso3: third most intense isomer | nd: not detected

PG 32:1	PG 16:0/16:1								PG 14:0/18:1									
Growth medium - replicates	FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio (iso1)		FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio		sn-1/sn-2 ratio (iso2)	
	m/z	intensité	identification	*m/z*	intensité	identification			*m/z*	intensité	identification	*m/z*	intensité	identification				
PAK - MHB1		595			215			0.36		124			56			0.21		0.45
PAK - MHB2	253.2192	6459	16:1	255.229	2606	16:0	16:0/16:1	0.40	227.2069	1820	14:0	281.2412	944	18:1	14:0/16:1	0.28	18:1/14:0	0.52
PAK - MHB3		5617			2592			0.46		1500			832			0.27		0.55
							average	0.41							average	0.25	average	0.51
							std dev	0.05							std dev	0.04	std dev	0.05
							RSD %	12.30							RSD %	15.38	RSD %	10.29
PAK - SCFM 1		7023			3336			0.48		2313			887			0.33		0.38
PAK - SCFM 2	253.2192	8701	16:1	255.229	3123	16:0	16:0/16:1	0.36	227.2069	1924	14:0	281.2412	872	18:1	14:0/16:1	0.22	18:1/14:0	0.45
PAK - SCFM 3		2263			1125			0.50		764			276			0.34		0.36
							average	0.44							average	0.30	average	0.40
							std dev	0.07							std dev	0.06	std dev	0.05
							RSD %	16.73							RSD %	21.96	RSD %	12.02
PAK - SCFM-PC1		12412			5964			0.48		4368			2852			0.35		0.65
PAK - SCFM-PC2	253.2192	708	16:1	255.229	503	16:0	16:0/16:1	0.71	227.2069	601	14:0	281.2412	603	18:1	14:0/16:1	0.85	18:1/14:0	1.00
PAK - SCFM-PC3		1706			1172			0.69		1198			1068			0.70		0.89
							average	0.63							average	0.63	average	0.85
							std dev	0.13							std dev	0.26	std dev	0.18
							RSD %	20.21							RSD %	40.25	RSD %	21.07

PG 34:1	PG 18:1/16:0								PG 18:0/16:1							
Growth medium - replicates	FA(iso1) sn2			FA(iso1) sn1			sn-1/sn-2 ratio (iso1)		FA(iso2) sn2			FA(iso2) sn1			isomer 2/ isomer 1 ratio	
	m/z	intensité	identification	*m/z*	intensité	identification			*m/z*	intensité	identification	*m/z*	intensité	identification		
PAK - MHB1		1175			660			0.56		115		nd	nd	nd		0.10
PAK - MHB2	255.2475	14066	16:0	281.255	9955	18:1	18:1/16:0	0.71	253.2261	1202	16:1	nd	nd	nd	16:1/16:0	0.09
PAK - MHB3		14509			10167			0.70		828		nd	nd	nd		0.06
							average	0.66							average	0.08
							std dev	0.08							std dev	0.02
							RSD %	12.54							RSD %	26.10
PAK - SCFM 1		23192			13486			0.58		1283		nd	nd	nd		0.06
PAK - SCFM 2	255.2475	23202	16:0	281.255	11623	18:1	18:1/16:0	0.50	253.2261	1012	16:1	nd	nd	nd	16:1/16:0	0.04
PAK - SCFM 3		8496			4613			0.54		601		nd	nd	nd		0.07
							average	0.54							average	0.06
							std dev	0.04							std dev	0.01
							RSD %	7.44							RSD %	24.05
PAK - SCFM-PC1		31396			32177			1.02		413		nd	nd	nd		0.01
PAK - SCFM-PC2	255.2475	129379	16:0	281.255	138995	18:1	18:1/16:0	1.07	253.2261	1312	16:1	nd	nd	nd	16:1/16:0	0.01
PAK - SCFM-PC3		171763			184963			1.08		1427		nd	nd	nd		0.01
				Note: In SCFM-PC, close abundance of PG 18:1/16:0 & PG 16:0/18:1 (sn-1/sn-2 ratio close to 1)			average	1.06							average	0.01
							std dev	0.03							std dev	0.00
							RSD %	2.77							RSD %	23.23

III.3 CONCLUSION

Lors de la première étude, nous avons identifié les phospholipides membranaires de *P. aeruginosa* : 8 PG, 13 PE, 7 PC et 13 CL.

Nous avons mesuré leurs $^{TW}CCS_{N2}$ expérimentales avec trois étalons : la polyalanine, le dextran et un mélange de phospholipides. Nous avons utilisé plusieurs étalons, car aucun étalon de mobilité ionique permettant la mesure des CCS des CL (gamme *m/z* 1300 – 1500, et gamme CCS : $^{TW}CCS_{N2}$ ($[M+2K]^{2+}$ et $[M-2H]^{2-}$ entre 380 et 425 Å² selon Hines *et al.*[2] [1]) n'était décrit dans la littérature.

En comparant les $^{TW}CCS_{N2}$, obtenues avec les trois étalonnages, avec les $^{DT}CCS_{N2}$ publiées par Hines *et al.* [2], Zhou *et al.* [3] et Leaptrot *et al.*[4], nous avons observé des disparités souvent supérieures à 5% ($\Delta CCS > 5$ %)[3] pour les étalonnages dextran et polyalanine. Cependant, les $^{TW}CCS_{N2}$ obtenues par étalonnage polyalanine ou lipides sont reproductibles ($\Delta CCS \leq 2$ %) avec, respectivement, les $^{TW}CCS_{N2}$ de *Paglia et al.* [5] (étalonnage polyalanine) ou les $^{DT}CCS_{N2}$ de *Hines et al.* [2], *Zhou et al.* [3] et *Leaptrot et al.* [4].

Afin de diminuer les écarts de CCS obtenus avec l'étalonnage dextran (étalon permettant la mesure de $^{TW}CCS_{N2}$ sur la plus grande gamme de *m/z* et CCS), nous avons développé une méthode utilisant une correction après calcul des CCS par étalonnage « classique » avec le dextran. Comme preuve de concept, cette correction a été appliquée après étalonnage avec la polyalanine. Que ce soit avec un étalonnage dextran ou polyalanine, la correction des $^{TW}CCS_{N2}$ a permis de réduire l'écart avec les valeurs trouvées dans la littérature à moins de 2%. Cela nous a permis de valider la méthode.

Nous avons ensuite utilisé l'étalonnage dextran suivi de la correction pour mesurer les $^{TW}CCS_{N2}$ des autres phospholipides de *P. aeruginosa*. Au total, nous avons donc mesuré 32 $^{TW}CCS_{N2}$ en mode d'ionisation positive et 24 en mode négatif, avec une bonne répétabilité (RSD ≤ 0,4%).

[2] CL provenant de *Escherichia coli.*

[3] Le seuil de reproductibilité communément accepté est de 5%.

Nous avons décrit 18 nouvelles valeurs expérimentales de $^{TW}CCS_{N2}$ pour les CL, dont les valeurs de CCS étaient absentes dans la littérature tant pour les molécules protonées que déprotonées.

Lors de la seconde étude, nous avons comparé deux milieux mimant le mucus pulmonaire mucoviscidosique —le milieu SCFM et une version modifiée du SCFM par l'ajout d'une PC (SCFM-PC) — à un milieu de référence : le MHB. L'objectif de cette étude était d'observer l'influence du milieu sur les lipides membranaires, ainsi que dans un second temps, sur la croissance et la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*.

Nous avons identifié les mêmes espèces de phospholipides dans chaque milieu (aspect qualitatif), mais observé que les ratios de ces espèces variaient en fonction des milieux (aspect quantitatif). L'observation la plus intrigante était la forte diminution de la production des PC lorsque que *P. aeruginosa* était cultivée dans le milieu SCFM. Cet aspect nous a incités à ajouter la DOPC au milieu SCFM en tant que source de choline. En effet, alors que les PC étaient détectées en tant que traces dans le milieu SCFM, elles l'étaient en quantités significatives dans le milieu SCFM-PC.

En complément de l'analyse semi-quantitative, nous avons comparé, par MS/MS, les acides gras produits selon les milieux. Nous avons observé une grande production de phospholipides dérivés de la DOPC, quand PAK était cultivée dans le milieu SCFM-PC, illustrant la métabolisation des phospholipides du milieu par *P. aeruginosa*.

Nous n'avons observé aucune influence du milieu de culture sur les courbes croissance ou sur la forme des bactéries, par contre, l'adhésion sur plaques de verre de ces dernières semble légèrement affectée par les conditions de culture (observation AFM).

Concernant la résistance aux antibiotiques, nous avons observé que les valeurs de CMI étaient généralement plus élevées dans les milieux SCFM et SCFM-PC que dans le milieu MHB, montrant bien l'adaptation de *P. aeruginosa* au milieu de culture. L'observation la plus frappante portait sur la carbenicilline, un antibiotique hydrophobe passant probablement la membrane bactérienne.

Lorsque les PC étaient produites en plus faible quantité (milieu SCFM), la résistance à la carbenicilline diminuait significativement ; à l'inverse les bactéries cultivées dans le milieu SCFM-PC développaient une plus grande résistance à cet antibiotique.

Dans cet article, nous avons discuté le lien entre cette variation de la résistance et la composition membranaire. En effet, l'augmentation de la quantité de PC, dans la membrane, est décrite comme permettant une augmentation de la stabilité de celle-ci [6]. De ce fait, il est probable que la membrane de *P. aeruginosa,* cultivée dans le milieu SCFM, soit moins stable que lorsqu'elle est cultivée dans les milieux MHB et SCFM-PC. Ceci induirait une augmentation du passage de la carbenicilline au travers de la membrane et de ce fait, une diminution de la résistance à cet antibiotique. Cet exemple souligne, d'une part, le rôle fondamental des lipides constitutifs de la membrane bactérienne dans la résistance aux antibiotiques et, d'autre part, l'importance de la composition des milieux de culture utilisés pour ces études.

Pour finir ce troisième chapitre, lors de la seconde partie, nos limites techniques ont été mises en évidence. A ce propos, nous souhaitons souligner que ces travaux de thèse doivent être considérés comme une première approche pour comparer la composition des phospholipides de souches cliniques de *P. aeruginosa* (chapitre IV). En effet, ces travaux n'ont pas l'envergure d'une étude clinique, que ce soit en moyens techniques comme humains.

REFERENCES CHAPITRE III (HORS ARTICLES)

1. Hines KM, Xu L (2019) Lipidomic consequences of phospholipid synthesis defects in Escherichia coli revealed by HILIC-ion mobility-mass spectrometry. Chem Phys Lipids 219:15-22. doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.01.007

2. Hines KM, May JC, McLean JA, Xu L (2016) Evaluation of Collision Cross Section Calibrants for Structural Analysis of Lipids by Traveling Wave Ion Mobility-Mass Spectrometry. Anal Chem 88 (14):7329-7336. doi:10.1021/acs.analchem.6b01728

3. Zhou Z, Tu J, Xiong X, Shen X, Zhu ZJ (2017) LipidCCS: Prediction of Collision Cross-Section Values for Lipids with High Precision To Support Ion Mobility-Mass Spectrometry-Based Lipidomics. Anal Chem 89 (17):9559-9566. doi:10.1021/acs.analchem.7b02625

4. Leaptrot KL, May JC, Dodds JN, McLean JA (2019) Ion mobility conformational lipid atlas for high confidence lipidomics. Nat Commun 10 (1):985. doi:10.1038/s41467-019-08897-5

5. Paglia G, Williams JP, Menikarachchi L, Thompson JW, Tyldesley-Worster R, Halldorsson S, Rolfsson O, Moseley A, Grant D, Langridge J, Palsson BO, Astarita G (2014) Ion mobility derived collision cross sections to support metabolomics applications. Anal Chem 86 (8):3985-3993. doi:10.1021/ac500405x

6. Goldfine H (2016) Membrane Lipid Biogenesis. In: Geiger O (ed) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Springer International Publishing, Cham, pp 1-14. doi:10.1007/978-3-319-43676-0_34-1

CHAPITRE IV ETUDES DE SOUCHES CLINIQUES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

IV.1 PRESENTATION ET OBJECTIFS

Après avoir mis au point et développé la préparation biologique des échantillons, ainsi que les outils analytiques (paramètres instrumentaux LC-(IMS)-MS et traitement des données) sur la souche de laboratoire *P. aeruginosa* PAK, nous avons réalisé l'étude des lipides d'isolats de *P. aeruginosa* prélevées sur un patient atteint de la mucoviscidose et d'une infection pulmonaire chronique.

Cinq isolats, provenant d'un même patient et sélectionnés selon leurs phénotypes, nous ont été fournis par le Dr. Philippe Morand (Hôpital Cochin, Paris, France. Sur ces cinq isolats, trois ont été isolés en 2008 et deux en 2018 (*cf.* II.1.1.2). Une ERIC-PCR effectuée sur ces cinq isolats a montré qu'ils été tous liés phylogénétiquement et donc provenait de la même souche (*cf* Annexe 1).

Dans un premier temps, des courbes de croissance ont été réalisées afin de déterminer le temps de culture nécessaire pour que chaque isolat puisse atteindre la fin de la phase exponentielle. Cette étape est indispensable pour comparer les isolats cliniques entre eux, mais aussi avec la souche PAK. En effet, comme décrit dans la partie bibliographie (I.1.4.3), la phase de la croissance bactérienne a un impact considérable sur la composition des lipides membranaires de *P. aeruginosa*.

Parallèlement, des mesures de CMI pour plusieurs antibiotiques (carbenicilline, gentamycine, ciprofloxacine, colistine et doxycycline) ont été réalisées pour chacun des isolats, et dans les trois milieux de culture utilisés lors de cette thèse (MHB, SCFM, SCFM-PC), pour vérifier un éventuel lien entre le lipidome bactérien et la sensibilité à ces antibiotiques. Les résultats de ces mesures de CMI sur les isolats cliniques sont exposés dans l'annexe 2.

Dans un second temps, une première étude lipidomique a été réalisée sur les cinq isolats. Initialement, l'objectif de cette analyse était d'identifier et d'étudier l'évolution des lipides au cours du temps, durant l'infection.

Nous n'avons pas pu poursuivre cette étude pour des raisons pratiques liées au temps nécessaire à l'extraction d'un grand nombre d'échantillon. La réflexion et les leçons autour de cet essai seront détaillées dans la première partie de ce chapitre.

Toutefois, cette expérience « préliminaire » a permis de sélectionner deux isolats, un pour l'année 2008 (PA08B) et un autre pour l'année 2018 (PA18B) afin de réaliser une étude mieux construite et prendre le temps d'effectuer une analyse plus fine des lipides (structurale et quantitative). Cette seconde étude lipidomique sur les deux isolats selectionnés, PA08B et PA18B constitue le sujet d'un article intitulé : « UHPLC-MS(/MS) investigation of the membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the lungs of a cystic fibrosis patient with a bronchial infection. ». Celle-ci est soumise pour publication dans l'édition spéciale « Bioactive lipids and lipidomics 2020 » du journal *International Journal of Molecular Science*.

Ces travaux ont permis, *via* une analyse lipidomique non-ciblée, de mettre en évidence la présence de deux classes de phospholipides, non décelées dans les travaux précédents. L'analyse structurale par MS/MS de ces deux classes a permis leur identification : il s'agit d'acylphosphatidylglycérols et de lysocardiolipines. Jusqu'ici, elles n'avaient pas été décrites chez *P. aeruginosa,* quelles que soient les conditions de culture utilisées, soit parce qu'elles n'étaient pas produites dans ces conditions, soit parce que leur abondance était très faible.

De plus, une semi-quantification, par approche ciblée, a révélé une répartition différente des phospholipides selon la souche ou l'isolat clinique étudié. En comparaison avec les lipides membranaires de la souche PAK, l'isolat clinique PA08 contenait plus de phospholipides avec des petites chaînes d'acides gras saturées, alors que l'isolat clinique PA18 contenait plus de LPC 18:1_0:0, mais globalement moins de phospholipides.

IV.2 RESULTATS

IV.2.1 Etude préliminaire et sélection des souches

IV.2.1.1 Etude microbiologique

Dès réception, les cinq isolats ont été conservés tel que décrit précédemment (II.1.1.2). Par la suite, chacun d'entre eux a été cultivé en triplicata biologiques dans le milieu SCFM afin de déterminer le temps de culture nécessaire pour atteindre la fin de la phase exponentielle (**Figure *1***).

Les courbes de croissance de ces souches cliniques ont été réalisées dans le milieu SCFM, avant la mise au point du milieu SCFM-PC.

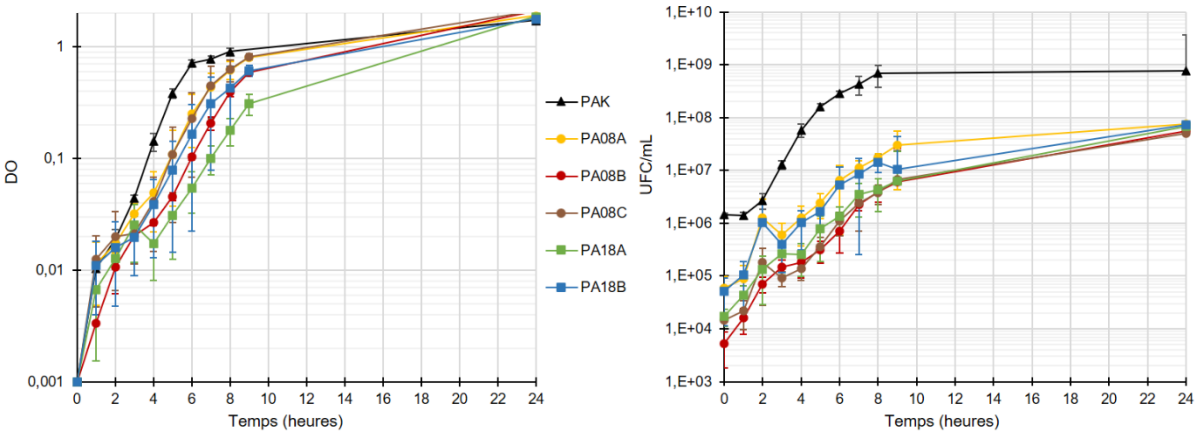


Figure 1 Courbes de croissance des 5 isolats cliniques et PAK dans le milieu SCFM : Densité Optique (DO) ou nombre d'Unités Formant Colonies (UFC)/mL en fonction du temps de culture (heures).

Ces expériences fournissent des données sur la physiologie des différents isolats comme le calcul du temps de génération (temps nécessaire pour le doublement de la population bactérienne), et l'aspect des colonies après étalement sur boîtes de Pétri. Les résultats obtenus à partir des courbes de croissance sont résumées dans le **Tableau 1**. Il est à noter que les données concernant la souche PAK proviennent des expériences réalisées pour le 2nd article (III.2.2).

Tableau 1 Résumé des résultats obtenus à partir des courbes de croissance des cinq isolats cliniques et de la souche de laboratoire PAK, dans le milieu SCFM.

Isolat ou souche	PA08A	PA08B	PA08C	PA18A	PA18B	PAK
UFC/mL (fin de phase exponentielle)	$6x10^6$	$5x10^6$	$4x10^6$	$4x10^6$	$4x10^6$	$4x10^8$
DO (fin de phase exponentielle)	0.25	0.40	0.60	0.20	0.30	0.7
Temps de culture en h (Fin de phase exponentielle)	6	8	8	8	7	7
Temps de génération (min)	59 ± 10	54 ± 4	61 ± 10	61 ± 8	62 ± 4	42 ± 2

L'aspect des colonies diffère selon les isolats ou la souche bactérienne étudiée[1] :

_ PAK : mélange de petites colonies (<½ mm de diamètre) blanches et de colonies plus larges (jusqu'à 1,5 mm de diamètre) mucoïdes et jaunes ; plus les colonies sont larges, plus elles sont mucoïdes et d'un jaune intense ;

_PA08A : mélange de petites colonies transparentes et de colonies de taille moyenne (entre ½ et 1 mm de diamètre) blanches et mucoïdes ;

_PA08B : mélange de colonies de taille moyenne à grande (≈ 1 mm de diamètre), blanches et très mucoïdes;

_PA08C : similaire à la souche PAK ;

_PA18A : colonies de taille moyenne, blanches et très mucoïdes ;

_PA18B : petites colonies transparentes non-mucoïdes.

Le temps de culture, nécessaire pour atteindre la même phase de croissance, a été déterminé à partir des courbes de croissances exprimées en UFC/mL en fonction du temps. La valeur à atteindre pour les souches cliniques était d'environ $5x10^6$ UFC/mL.

IV.2.1.2 Etude lipidomique

Cette première étude lipidomique sur les cinq isolats cliniques et la souche PAK a été réalisée, dans le milieu SCFM, en utilisant des triplicatas biologiques. L'objectif de cette étude était de savoir si les isolats pouvaient être séparés en fonction de l'année d'isolement (c'est-à-dire 2008 et 2018), et de relier cette séparation à des lipides particuliers.

Par rapport aux études précédentes décrites dans le chapitre III, une approche métabolomique a été utilisée pour l'acquisition et le traitement des données.

[1] La description ici concerne les étalements sur boîtes de pétri très sèches. En effet, ces souches étant très mucoïdes, il est nécessaire de beaucoup sécher les boîtes de pétri (par rapport à d'autres souches de laboratoire telles que PAO1 par exemple) afin de pouvoir effectuer le dénombrement des UFC.

Cette approche implique de définir les groupes (ou conditions) biologiques à comparer (habituellement : patients sain *vs* patients malades) au début de l'étude. Cette première étape est nécessaire pour établir la liste d'injection des échantillons (II.2.3), ce qui est indispensable pour obtenir des tests statistiques cohérents (lesquels cherchent à répondre à la question : le phénomène observé est-il dû au hasard ou à une condition donnée ?).

Les 5 isolats étant phylogénétiquement lié, nous avions tout d'abord pensé que nous pourrions étudier les différences du lipidome entre les années 2008 et 2018 en considérant les trois isolats de 2008 comme des « réplicats de 2008 » et de même manière, les deux isolats de 2018 comme des « réplicats de 2018 ». Ainsi, cette étude a été construite sur la base de 15 échantillons biologiques répartis en deux conditions biologiques : « condition 2008 » avec 9 réplicats (3 isolats en triplicata) et « condition 2018 » avec 6 réplicats (2 isolats en triplicata).

Les cinq isolats cliniques et la souche PAK ont été cultivés dans le milieu SCFM jusqu'à atteindre la même phase de croissance (IV.2.1.1.1), puis leurs lipides ont été extraits tels que décrits en II.1. Les lipides extraits ont été analysés par LC-MS à la fois en ionisation positive et en ionisation négative en respectant les précautions et les paramètres décrits en II.2. Les données ont été par la suite traitées en utilisant la plateforme Worfkflow4Metabolomics (voir II.3.4). Brièvement, lors de ce traitement, les variables *m/z*-t_R des échantillons sont détectées automatiquement, puis une matrice de données (intensité des variables dans chaque échantillon) représentant la totalité des échantillons est créée. Ensuite, les contaminants sont exclus, la déviation analytique corrigée et la matrice de données normalisée. Enfin, elle est utilisée pour réaliser différents tests statistiques.

Lors de ce traitement des données, de nombreux paramètres de *preprocessing* et de normalisation ont été testés afin i) d'adapter au mieux les paramètres du *process* automatique aux données acquises (erreur instrumentale, bruit de fond, largeur des pics chromatographiques…), ii) de détecter le maximum de lipides identifiés précédemment (notamment les CL ont un rapport signal / bruit très faible et des pics chromatographiques mal résolus, ce qui implique des paramètres de détection automatique adaptés), iii) de réduire au maximum l'identification de contaminants et iv) de réduire la variabilité intra-groupe (isolat ou souche PAK).

Tout en se basant sur ces paramètres, des adaptations ont dû être effectuées pour l'étude suivante (3ème article, IV.2.2).[2] Cela illustre que ce type d'étude n'est jamais complètement automatique et un temps conséquent doit être consacré à la mise au point minutieuse des paramètres, lesquels ont un impact direct sur les résultats obtenus.

La **Figure 2** montre l'analyse en composantes principales (PCA) obtenue à partir des données en ionisations positive et négative. Les extraits lipidiques des cinq isolats et de la souche PAK sont représentés par des ellipses (PAK : en noir, PA08A : en orange, PA08B : en rouge, PA08C : en marron, PA18A : en vert et PA18B : en bleu) et chaque réplicat est représenté par un point sur la PCA.

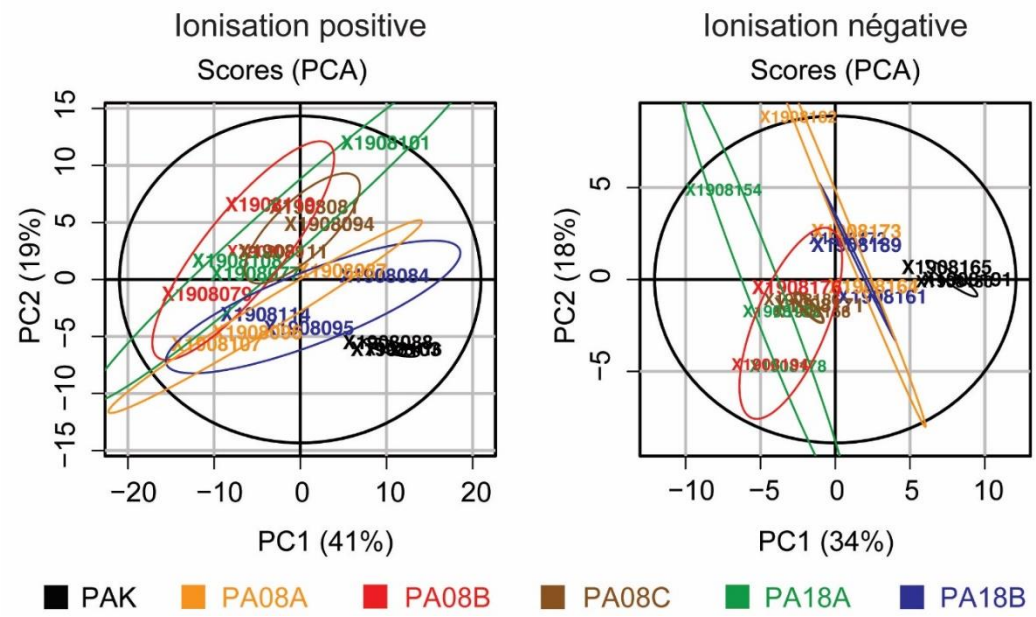


Figure 2 PCA obtenues pour les 5 isolats cliniques et la souche PAK en ionisation positive et négative. Noir : PAK, orange : PA08A, rouge : PA08B, marron : PA08C, vert : PA18A, bleu : PA18B.

Nous pouvons observer que la souche de laboratoire PAK est clairement séparée des 5 isolats cliniques. Parmi ces dernières, les souches PA08A et PA18B forment un premier groupe, alors que PA08B, PA08C et PA18A constituent un second groupe. Les isolats cliniques ne se répartissent donc pas en fonction de l'année de leur prélèvement. Ces observations sont valables, tant pour l'ionisation positive que négative. Par la suite, chaque isolat sera considéré de façon indépendante pour les autres tests statistiques.

[2] Les paramètres décrits dans le chapitre II sont ceux utilisés pour le 3ème article.

Nous pouvons également noter une grande variabilité biologique pour chaque isolat clinique. L'analyse de « carte de chaleur » (*heatmap)* et l'analyse partielle des données des moindres carrés (PLS-DA) ont montré des modèles avec une très faible prédictivité, ce qui a remis en question la validité statistique de l'expérience (données non exposées ici).

Les tests univariés n'ont permis de souligner que quelques variables significativement différentes entre les isolats cliniques et la souche PAK, mais pas entre les isolats cliniques eux-mêmes, comme illustré pour PE 34:1 (**Figure 3**).

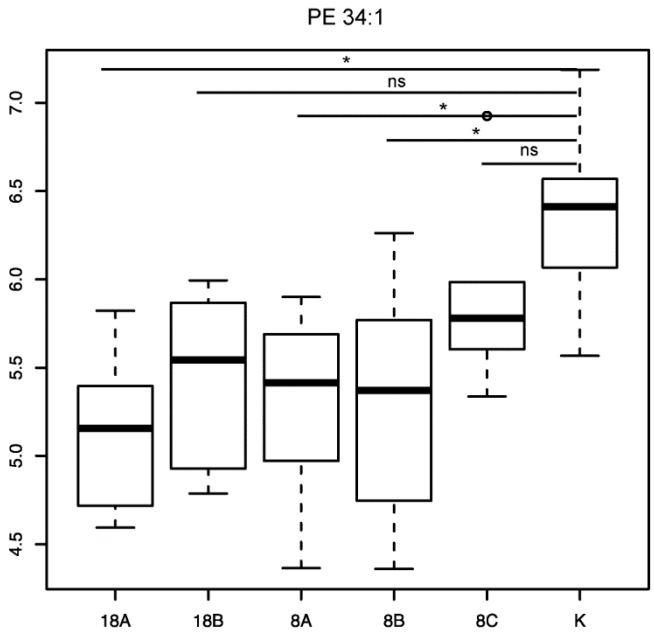


Figure 3 Boîtes à moustaches obtenues après un test ANOVA sur les cinq isolats cliniques et PAK pour PE 34 :1. Axe Y : aires des pics normalisées. Suite au test anova, les moyennes ont été comparées deux à deux avec un test de Turkey, * : différence significative (p-value < 0,05) ; ns : différences non significatives (p-value > 0,05). Les moyennes entre les isolats n'étaient pas significativement différentes (p-value > 0,05).

Enfin, comme le nombre de réplicats était faible (3), les valeurs aberrantes n'ont pas pu être exclues de l'étude.

En conclusion, cette étude n'a pas permis de déterminer de lipides caractéristiques de chaque isolat. Il est fort probable que le manque de significativité des résultats soit dû au nombre de réplicats trop faible par rapport au nombre de conditions (5 isolats et PAK, soit 6).

Bien que les sciences « omiques » soient décrites comme permettant de réaliser une analyse sans *a priori* (I.2.1), il reste difficile d'obtenir des résultats pertinents sans connaître le contexte biologique des échantillons. L'obtention d'un maximum d'informations sur les échantillons biologiques/ isolats, de façon à pouvoir poser les bases de l'étude, s'avère donc indispensable.

Toutefois, cette étude aura permis de mettre au point la préparation des échantillons, l'acquisition et les outils de traitement des données spécifiques aux analyses métabolomiques/ lipidomiques.

IV.2.1.3 Sélection de deux isolats

Après avoir réalisé l'étude du lipidome dans le milieu SCFM, nous avons conclu que nous devions répéter l'expérience avec un nombre restreint d'isolats (1 isolat par année) et un nombre de réplicats plus important (5 réplicats de culture et 2 réplicats d'extraction pour chacun) afin d'obtenir des analyses statistiques plus robustes et une analyse structurelle plus approfondie du lipidome de ces isolats.

Sur la base de la PCA (**Figure *2***) et des observations effectuées lors de la préparation des échantillons biologiques (IV.2.1.1), les souches PA08B et PA18B sont les plus différentes et donc les plus pertinentes pour représenter les années 2008 et 2018. Au niveau microbiologique, les isolats cliniques ont des temps de génération plus lents que celui de PAK. Cependant les 5 isolats cliniques ont des temps de génération similaires même si PA08B présente le temps de génération le plus rapide par rapport aux 4 autres. De plus cet isolat est celui qui présente l'aspect le plus mucoïde. Enfin, la souche PA18B présente un phénotype très différent, non mucoïde. Ces différences phénotypiques confortent donc le choix des souches défini sur la base de la PCA.

Nous avons donc sélectionné les isolats PA08B et PA18B, prélevés en 2008 et 2018 respectivement, pour la seconde étude lipidomique (IV.2.2) qui fait l'objet de l'article intitulé :

« UHPLC-MS(/MS) investigation of the membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the lungs of a cystic fibrosis patient with a bronchial infection » présenté ci-après, l'étude des courbes de croissance dans le milieu SCFM-PC étant préalablement présentée

IV.2.1.3.1 Courbes de croissance de PA08B et PA18B dans le milieu SCFM-PC

Cette étude a été effectuée dans le milieu SCFM-PC qui s'est montré plus approprié que le milieu SCFM (*cf* III.2.2) pour l'étude du lipidome. De ce fait, de nouvelles courbes de croissance pour les deux isolats sélectionnés (PA08B et PA18B) ont été réalisées. Comme précédemment, les données de PAK proviennent des expériences du 2nd article (III.2.2).

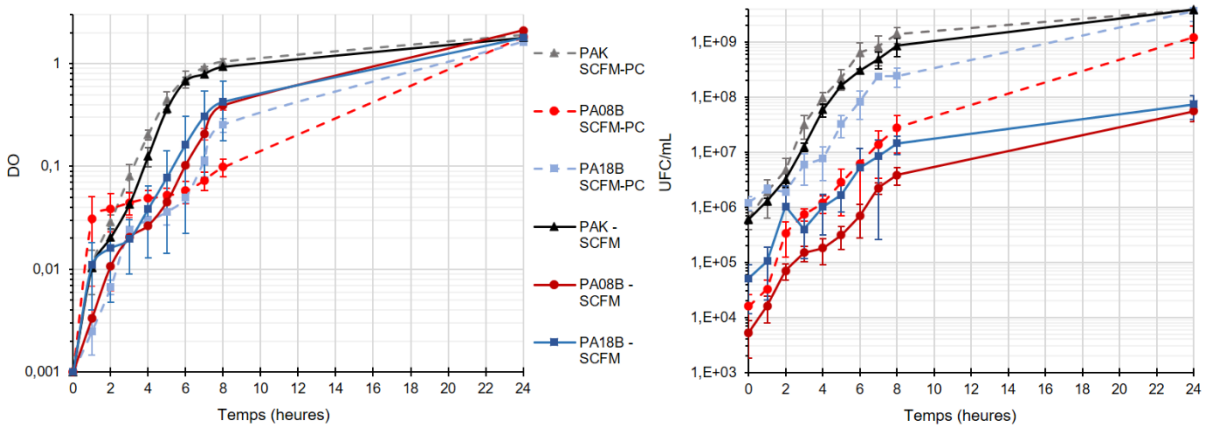


Figure 4 Courbes de croissance des deux isolats cliniques sélectionnés (PA08B et PA18B) et PAK dans les milieux SCFM et SCFM-PC : Densité Optique (DO) ou nombre d'Unités Formant Colonies (UFC)/mL en fonction du temps de culture (heures).

Les observations liées à ces courbes de croissance figurent dans le **Tableau *2***.

Tableau 2 Résumé des résultats obtenus à partir des courbes de croissance des isolats cliniques PA08B et PA18B ainsi que de la souche de laboratoire PAK, dans le milieu SCFM-PC.

Isolat ou souche	PA08B	PA18B	PAK
UFC/mL (fin de phase exponentielle)	$3x10^7$	$3x10^8$	$5x10^8$
DO (fin de phase exponentielle)	0.1	0.1	0.7
Temps de culture (fin de phase exponentielle)	8	7	7
Temps de génération (min)	46 ± 8	58 ± 3	43 ± 3

L'aspect des colonies de PA08B, PA18B et PAK après culture dans le milieu SCFM-PC était identique à celui décrit, précédemment, dans le milieu SCFM.

Il convient de noter que le fait de n'étudier que ces deux isolats ne permet pas de conclure sur l'évolution des lipides au cours du temps (variation des quantités de phospholipides, modification des chaînes d'acides gras…). De plus, ces isolats ne provenant que d'un unique patient, nous ne pouvons pas savoir si le temps d'infection aurait eu une plus grande influence sur *P. aeruginosa* que l'hôte lui-même (ses éventuels traitements médicamenteux par exemple …). Cependant, le choix d'étudier seulement deux isolats, était nécessaire pour éprouver la méthodologie avant de réaliser une étude sur une cohorte beaucoup plus large.

IV.2.2 Etude des lipides membranaires extraits d'une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un patient atteint d'une infection pulmonaire chronique (3ème article)

UHPLC-MS(/MS) investigation of the membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the lungs of a cystic fibrosis patient with a bronchial infection

Estelle Deschamps[1,2]*, Isabelle Schmitz-Afonso[2]*, Annick Schaumann[1], Carlos Afonso[2], Emmanuelle Dé[1], Philippe Morand[3,4], Lhousseine Touqui[5,6], Corinne Loutelier-Bourhis[2], Stéphane Alexandre[1]

1 Normandie Univ, PBS, UMR 6270 and FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, CURIB, Bvd De Broglie, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, FR

2 Normandie Univ, COBRA, UMR 6014 and FR 3038, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, FR

3 Université de Paris, Faculté de Médecine Paris Centre, 75006 Paris, France

4 Laboratoire de bactériologie, GH APHP. CUP, site Cochin, 75014 Paris, France

5 Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, département Santé Globale; Pasteur Institute, Paris, France

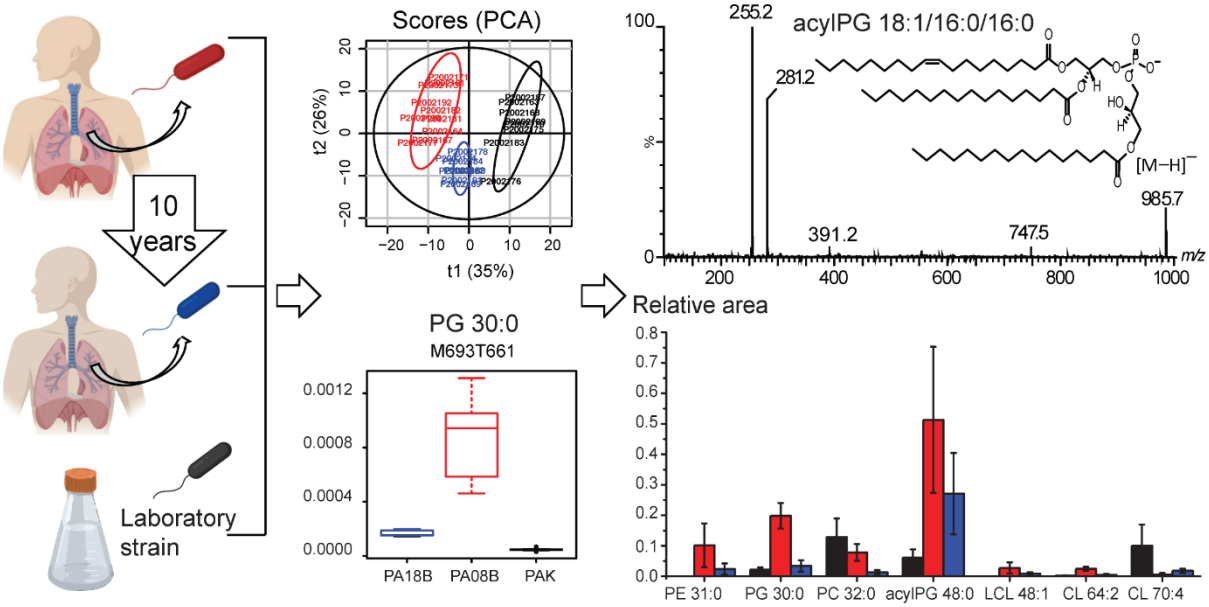
6 Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Paris, France.

* Correspondence: estelle.deschamps@etu.univ-rouen.fr; isabelle.schmitz-afonso@univ-rouen.fr

Keywords: lipidomics; *Pseudomonas aeruginosa*; CF sputum; membrane lipids; phospholipids; LC-MS; high resolution mass spectrometry; acylphosphatidylglycerol; lysocardiolipin; semi-quantification.

Version soumise au journal *International Journal of Molecular Science* (08 Octobre 2020).

Abstract: The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is a highly pathogenic bacterium, in particular for immunocompromised patients such as cystic fibrosis (CF) patients. Moreover, some strains were found to be resistant to almost every antibiotic available. Thus, new treatments are required and research on clinical strains of *P. aeruginosa* is a necessity. A powerful barrier of *P. aeruginosa* against antibiotics is its lipid membrane. In this study, we examined the lipid composition of a *P. aeruginosa* clinical strain isolated from a single CF-patient, at two different times, in 2008 and in 2018. The two isolates were compared to the laboratory strain PAK, used as a reference. Bacteria were grown in a CF sputum-like medium and membrane lipids were extracted and analysed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Tandem mass spectrometry was used to identify unknown lipids such as acylphosphatidylglycerols and lysocardiolipins in all strains. A semi-quantification analysis highlighted some differences in lipid amounts between strains. Phospholipids with small and saturated fatty acyl chains were more produced by the isolate of 2008, whereas lysophosphatidylcholine 18:1/0:0 was more produced by the isolate of 2018.



1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a highly pathogenic bacterium for immunocompromised patients such as cystic fibrosis (CF) patients or in severe-condition hospitalised patients [1]. Due to its high adaptability, and thus high ability to develop resistance against antibiotics, drugs against *P. aeruginosa* infections are currently less and less effective [2]. A powerful barrier of *P. aeruginosa* against antibiotics is its lipidic membrane —which can be modulated in order to adapt to the environment [3]. The membrane lipids observed in *P. aeruginosa* are phospholipids made from one (lysophospholipids) to four (cardiolipins) fatty acyl chains and a polar head (*i.e.* choline, ethanolamine and glycerol) [4,5]. The presence of different polar heads, and in different quantities, allows *P. aeruginosa* to modulate its membrane polarity and stability (*e.g.* phosphatidylcholine increase allows to stabilize the lipid bilayer and to increase the membrane charge) [6]. Several fatty acyl chain lengths (*i.e.* from 14 to 18 carbons) and unsaturation (*e.g.* mono-unsaturation, end of the chain methyl or mid-chain cyclopropylation) can also be found [7]. Fatty acyl chain modifications also allow *P. aeruginosa* to modulate its membrane stability/ fluidity (*e.g.* the addition of an unsaturation leads to the increase of the membrane fluidity) [8]. Membrane and phospholipid alterations due to the medium have been described. Buyck *et al.* showed that the membrane permeability of *P. aeruginosa* was higher when grown in a bronchoalveolar lavage fluid than in a bacterial culture medium. Also, this higher membrane permeability was linked to a higher susceptibility of *P. aeruginosa* to macrolides [9]. Baker *et al.* demonstrated that exogenous polyunsaturated fatty acids which were added in the culture medium, were included into the membrane leading to a membrane permeability increase [10]. Moreover, Han *et al.* showed that, in the case of polymyxin resistant *P. aeruginosa* strain PAK mutants, a decrease of membrane phospholipid quantities was associated with the increase of the resistance to polymyxin [11]. Therefore, regarding clinical *P. aeruginosa* strains, phospholipid modifications in response to antibiotics and/or in order to adapt to the host should be considered. However, lipid-focused studies were only performed on laboratory strains, but not on clinical strains. Studies on clinical strains were performed on genes [12,13], proteins [14,15] or metabolites [16,17]. Moreover, although several lipidomic studies were performed on other gram-negative bacteria [18], there are only few on *P. aeruginosa* [7,11,19].

Herein, we analysed the membrane phospholipids composition of clinical *P. aeruginosa* isolates from a single CF patient, in 2008 (labelled PA08) and 2018 (PA18). As a comparison, the laboratory strain *P. aeruginosa* PAK was studied as well. The strains were grown in a CF sputum-like medium, which has previously been described [20]. The membrane lipids were extracted and analysed by liquid chromatography - mass spectrometry (UHPLC-MS) using a metabolomic approach. Unknown lipids were identified using tandem mass spectrometry (MS/MS). A semi-quantitative analysis allowed to compare phospholipid amounts between strains.

2. Results and Discussion

This work was conducted on a limited number of biological samples to evaluate the applicability of our approach, prior to performing a large-scale study. Five biological replicates (cultures) were performed for each strain, *i.e.* PAK, PA08 and PA18, and each biological replicate was halved for extraction yielding two technical replicates. Thus, a total of ten replicates per strain (see Material and methods) was obtained. Note that the three strains PAK, PA08 and PA18 were grown in SCFM-PC, as we showed in a recent work on CF-like growth media that SCFM-PC was more appropriate than SCFM for lipidomic analysis [20].

2.1. Untargeted analysis: outliers removal

In order to highlight outliers, Principal Component Analysis (PCA) was performed on the thirty sample acquisitions, for both positive and negative ion modes. For such purpose, the data were pre-processed according to the metabolomics approach to yield two data matrices, the first for positive ion mode and the second for negative ion mode (see Material and methods). These data matrices contained the features (*m/z*_ retention time (t_R)) and their corresponding peak area in each sample.

Figure 1 shows the PCA in positive (A) and negative ionisation (B). As shown in Figure 1.A and B, one of the PA18 samples was mismatched in the PA08 group, for both positive (A) and negative (B) ionisations. Using the observation diagnostics (orthogonal distance plotted against score distance), 3 more outliers, common to both ionisations, could be observed: two for PAK samples and one for PA18 samples. After the removal of the three outliers from the negative data, one more PAK sample outlier was observed. In total, 4 or 5 outliers, on a total of 30 samples, were described for positive or negative ionisations, respectively. Despite the exclusion of these outliers, at least one of the extraction duplicates could be kept for each strain/isolate. Therefore, the 5 biological replicates were all taken into account for the following analysis.

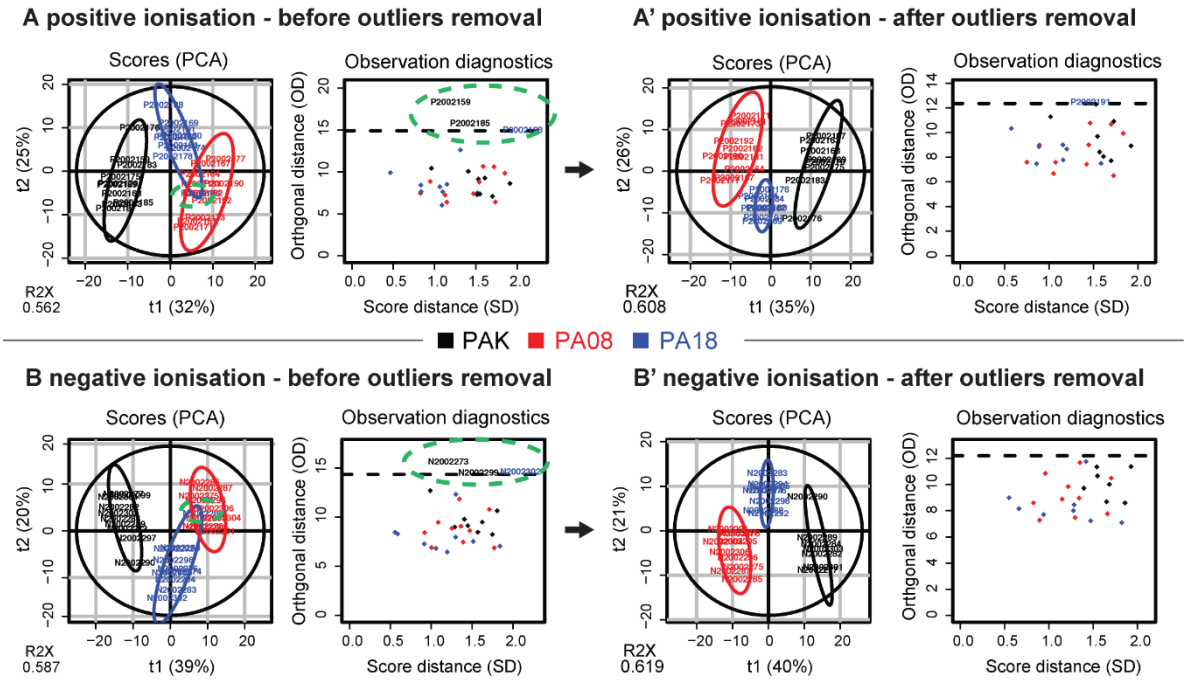


Figure 1. Outliers filtering: PCA and observation diagnostic for both positive (A and A') and negative (B and B') ionisations. A and B: figures obtained after the normalisation to total intensity; A' and B': figures obtained after filtration of outliers. Black: PAK, red: PA08, blue: PA18. Outliers are highlighted by dash line green circles.

2.2. Untargeted analysis: statistically significant features

After outlier removal, heatmaps were generated in order to ensure that samples were clustered in 3 groups corresponding to PAK, PA08 or PA18 (see Supplementary Information S1). This was observed in both positive and negative ion modes. Moreover, partial least square –data analysis (PLS-DA) confirmed such findings with good R and Q model scores (Q2>0.67 [21], see S1).

Then, statistically significant features were retrieved using an ANOVA test (p-value < 0.05, examples are given in S2). For positive ionisation, 182 features (82%) were found significant at the 0.05 level, and 197 features (83%) for negative ionisation. Since phospholipids can give many adducts and in-source fragments, a manual review of the raw data was necessary in order to check the relevance of each feature and retain only the significant ones. Whereupon, 10 phospholipids were identified in positive ionisation (1 LPC, 2 PC, 1 PG, 4 PE, 2 CL) and 26 in negative ionisation (3 LPE, 1 LPC, 1 LPG, 10 PE, 6 PG, 5 CL), with 6 lipids identified in both ionisation modes. These lipids were observed for all samples from the strain/ isolates. In addition to these 36 identifications, 9 unknown ions, only detected in negative ionisation mode, were found significant and particularly relevant for clinical isolates.

This untargeted analysis allowed to highlight 5 additional compounds which were included after a careful and manual examination of the raw data (see S2). These 5 ions could not be automatically detected, during the automatic pre-process, due to their low intensity, broad peak shape and the high presence of contaminant signals. All these 14 unknown ions had not yet been described for PAK [5-20] since they were very low-abundant species. Their detection was unmistakably obtained after the analyses of the two clinical isolates, for which these species are more abundant. Then, using accurate *m/z*, t_R and MS/MS spectra, two PE (PE 33:0 and PE 31:0) and two PG (PG 32:0 and PG 32:2) could be identified. The ten remaining unknown features were also identified using accurate *m/z*, t_R and more particularly MS/MS since they belonged to lipid classes that had not yet been described for *P. aeruginosa*. Their identification, using MS/MS, will be described in the following paragraph.

In total, 39 lipids were found significantly different based on the ANOVA test and 5 additional lipids were manually identified, which allowed us to implement the list of identified lipids in *P. aeruginosa* (see S2).

2.3. Lipid identification using MS/MS

We then focused on the ten unknown lipids that had not yet been described in *P. aeruginosa*. By examining the extracted ion chromatograms, the ten unknown ions were separated into two groups: four unknown ions were eluted in a first t_R zone —between 12 and 14 min, while the other six unknown ions were eluted in a second t_R zone —between 16 and 17.5 min. In the first t_R zone, two ion groups were observed: i) *m/z* 1109.7 and *m/z* 1135.7 corresponding to two lipids eluted at 12.7 min and ii) *m/z* 1111.7 and *m/z* 1137.7 corresponding to lipids eluted at 13.7 min. In the second t_R zone, two ion groups were also observed: i) *m/z* 957.7, *m/z* 983.7 and *m/z* 1009.7 at 16.2 min, ii) *m/z* 959.7, *m/z* 985.7 and *m/z* 1011.7 at 17.0 min. In each co-eluting peak, the unknown ions exhibit a mass shift of 26 u between each other. In the case of glycerolipids, this mass shift corresponds usually to the addition (or deletion) of an ethylene group on a fatty acyl chain. To identify these ten unknown ions (4 from (i) and 6 from (ii)), UHPLC-MS/MS experiments were performed.

Figure 2 shows one example of each of the two lipid classes described as groups (i) and (ii). The first one is the acylphosphatidylglycerol (acylPG) class, which was identified in PAK, PA08 and PA18. Figure 2.A shows the MS/MS spectrum of the deprotonated molecule $[M–H]^-$ of acylPG 50:1 (*m/z* 985.7479, Δ*m/z* = -0.5 ppm). The fragment ion *m/z* 153.0 corresponding to (PG headgroup – H2O) is observed and confirms a PG head group. The fragment ion *m/z* 747.5, results from the neutral loss of palmitic acid as ketene ($[M – H – C_{14}H_{29}\text{-}CH=C=O]^-$) which is consistent with an acylPG structure containing a C16:0 fatty acid. According to the acylPG fragmentation rules developed by Hsu *et al.* [22], sn positions could be determined. Actually, the loss of the acyl ketene in *sn*-2 position was described to be favoured over the loss in *sn*-3' and the one in *sn*-1. Thus, ketene losses arise in the following order of preference, *sn*-2 > *sn*-3' > *sn*-1.

Then the preferential loss of palmitic ketene ($C_{14}H_{29}$-CH=C=O) indicates that a C16:0 acid is preferentially the *sn*-2 substituent. The fragment ion *m/z* 391.2 arises from further fragmentation of the *m/z* 747.5 which can lose the fatty acid moiety at *sn*-1 (or *sn*-3' even less probable) and a dehydrated glycerol moiety ($C_3H_6O_2$, 74 u) [23]. As *m/z* 391.2 arises from 74u and 282 u losses, the sn-1 (or *sn*-3') substituent is a C18:1 free fatty acid (282 u) and the *m/z* 391.2 corresponds to [M – H – $C_{14}H_{29}$-CH=C=O – $C_{17}H_{33}$-CO_2H –74]$^-$.

Then the MS/MS spectrum shows very abundant fragment ions corresponding to the carboxylate anions of constitutive fatty acids of the acylPG which were detected at *m/z* 255 ($C_{15}H_{31}$-CO_2^-) and *m/z* 281 ($C_{17}H_{33}$-CO_2^-) reflecting the presence of palmitoyl (C16:0) and oleoyl (C18:1) substituents, respectively. Therefore, acylPG 50:1 could be identified as acylPG 18:1/16:0/16:0. In the same way, the other acylPG species were identified: acylPG 16:0/16:1/16:0 and 14:0/18:1/16:0 (*m/z* 957.7165), acylPG 16:0/16:0/16:0 (*m/z* 959.7322), acylPG 16:0/16:1/18:1 (*m/z* 983.7322), acylPG 18:1/16:0/18:1 (*m/z* 1011.7635) and acylPG 18:1_16:1_18:1 (*m/z* 1009.7478).

The second unknown class was identified as lysocardiolipin (LCL). They were detected in PAK, PA08 and PA18 samples. These lipids are more polar than CL, therefore their retention times are smaller (between 12 and 14.5 min) than those of CL (between 17 and 21 min) in reversed-phase (C18 column) chromatography. Thus, the UHPLC-MS coupling permits to eliminate any assumption of in-source fragmentation of cardiolipins. Figure 2.B shows the MS/MS spectrum of the deprotonated LCL 50:2 (*m/z* 1137.7353, Δ*m/z* = 4.6 ppm). This LCL was chosen because it illustrates the complex isomerism possibilities (configuration and position isomers) which can be encountered within phospholipids of *P. aeruginosa*. The fragment ions *m/z* 673.5, *m/z* 671.5 and *m/z* 645.5 are equivalent to the deprotonated PA 16:0_18:1, PA 16:1_18:1 and PA 16:0_16:1, respectively. These ions result from the loss of a molecule (labelled as gLPA in Figure .B) corresponding to a lysophosphatidic acid (LPA) bearing a glycerol moiety, where the LPA moiety can be either LPA 16:1_0:0 (408 u), LPA 16:0_0:0 (410 u) or LPA 18:1_0:0 (436 u), respectively. A fragmentation pattern is proposed (see S3) which depicts, as an example, the elimination of gLPA 16:1_0:0 from [M–H]$^-$ ion of LCL 50:2. Then, the complementary fragment ions *m/z* 407.2 (LPA 16:1_0:0), *m/z* 409.2 (LPA 16:0_0:0) and *m/z* 435.3 (LPA 18:1_0:0) confirm LCL class and highlight the presence of several LCL isomers (including regioisomers).

These ions can also arise from further fragmentation of *m/z* 673.5, *m/z* 671.5 and *m/z* 645.5 with the elimination of an acyl ketene, as depicted in Figure 2.B and S3. They can finally yield fragment ion *m/z* 153 by free fatty acid elimination (see S3). All fragmentation patterns described were consistent with the literature [24-26]. Note that in the specific case of LCL 50:2, since at least three isomers were present, the sn position could not be determined, but as the constitutive fatty acid were identified, we could annotate LCL 50:2 as LCL 16:0_18:1_16:1_0:0.

In the same manner, we could annotate the other LCL present in PAK and in the clinical isolates as: LCL 16:1_16:1_16:0_0:0 (*m/z* 1109.7040), LCL 16:1_16:0_16:0_0:0 (*m/z* 1111.7196) and LCL 16:1_18:1_16:1_0:0 (*m/z* 1135.7196).

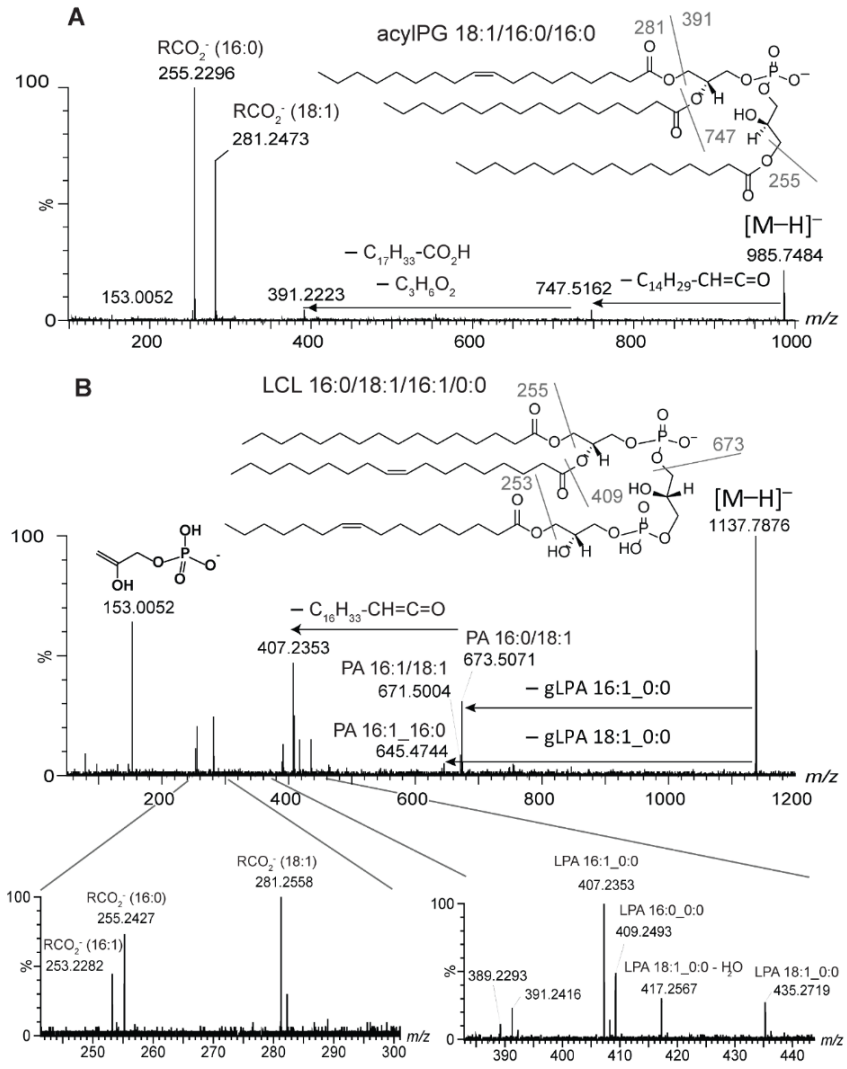


Figure 2. MS/MS spectra of acylPG 50:2 (A) and lysoCL 50:2 (B) in negative ion mode. Two possible structures for acylPG 18:1/16:0/16:0 and LCL 16:0/18:1/16:0/0:0 (one of the isomers of LCL 50:2) are given.

2.4. Targeted analysis: relative-quantification

In order to estimate and compare the relative abundances of the phospholipids from PAK and the two isolates, a semi-quantitative analysis, with a triple quadrupole mass spectrometer using multiple reaction monitoring (MRM), was performed. This choice of instrument was motivated by the fact that (i) the MRM mode yields higher selectivity and sensitivity and (ii) the triple quadrupole used was more recent and therefore more sensitive than the time-of-flight used for the untargeted analysis (see the material and methods part). MRM transitions were carried out for all the phospholipids, i.e. those identified in our previous work [5] and the 14 "unknowns" identified in this work (see S2). Six biological replicates of PAK, PA08 and PA18 were analysed (see Material and methods). Relative areas $\left(\frac{Area\ sample\ phospholipid}{Area\ standard\ phospholipid}\right)$ were calculated for each phospholipid using the internal standard of each corresponding class. Since internal standards for LPG, acylPG and LCL were not spiked, PG 34:0 was used to calculate the relative areas of LPG and acylPG while CL 54:0 was used for LCL. Means, standard deviations and p-values were calculated using an ANOVA test.

Table 1 shows all the lipids identified regardless of the differences observed in amount depending on the strain. These results were classified in five groups depending on the strain/isolate in which the phospholipid had the highest relative area mean: PAK; PA08; PA18; highest in both PA08B and PA18B; or non-significant differences between PAK, PA08 and PA18 (p-value > $5x10^{-2}$).

Table 1. **Relative areas of significantly and non-significantly different phospholipids (p-value < $5x10^{-2}$).** sd: standard deviation; nd: not detected. ANOVA test was performed using OriginPro.

Highest in	Identification	major isomer	Relative area Mean ± sd PAK	Relative area Mean ± sd PA08	Relative area Mean ± sd PA18	p-value (ANOVA test)
PAK	PE 34:1	PE 18:1/16:0	34.9 ± 7.5	9.6 ± 2.1	11.2 ± 2.8	$5.6x10^{-5}$
	PE 34:2	PE 18:1/16:1	6.3 ± 2.7	2.5 ± 1.9	2.7 ± 1.0	$3.8x10^{-2}$
	PE 35:1	PE 19:1/16:0	0.5 ± 0.2	$(4.4 \pm 1.7)10^{-2}$	$(5.9 \pm 1.9)10^{-2}$	$8.9x10^{-4}$
	PE 35:2	PE 18:1/17:1	0.2 ± 0.1	$(2.0 \pm 1.6)10^{-2}$	$(2.3 \pm 1.4)10^{-2}$	$9.6x10^{-3}$
	PE 36:1	PE 18:0/18:1	1.5 ± 0.4	$(5.9 \pm 3.0)10^{-2}$	$(20 \pm 1.9)10^{-2}$	$1.2x10^{-5}$
	PE 36:2	PE 18:1/18:1	7.2 ± 3.0	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.2	$4.7x10^{-2}$
	PG 34:1	PG 18:1/16:0	12.6 ± 3.5	2.8 ± 0.9	3.5 ± 1.2	$2.2x10^{-4}$
	PG 36:2	PG 18:1/18:1	3.4 ± 1.5	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	$5.1x10^{-4}$
	PC 32:0	PC 16:0/16:0	$(10.0 \pm 6.7)10^{-2}$	$(7.8 \pm 2.7)10^{-2}$	$(1.3 \pm 0.7)10^{-2}$	$7.7x10^{-3}$
	PC 32:1	PC 16:0/16:1	$(0.1 \pm 8.7)10^{-2}$	$(4.4 \pm 0.9)10^{-2}$	$(2.7 \pm 1.7)10^{-2}$	$2.8x10^{-2}$
	PC 34:1	PC 18:1/16:0	4.5 ± 3.4	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	$2.1x10^{-2}$
	PC 34:2	PC 18:1/16:1	0.7 ± 0.5	$(6.1 \pm 2.7)10^{-2}$	0.2 ± 0.1	$3.4x10^{-2}$
	PC 35:1	PC 19:1/16:0	$(4.4 \pm 3.0)10^{-2}$	$(1.4 \pm 0.4)10^{-3}$	$(3.5 \pm 1.6)10^{-3}$	$1.9x10^{-2}$
	PC 36:2	PC 18:1/18:1	61.4 ± 30.9	19.7 ± 14.1	64.8 ± 16.7	$3.1x10^{-2}$
	CL 68:2	CL 18:1/16:0/18:1/16:0	$(20 \pm 4.9)10^{-2}$	$(5.5 \pm 1.5)10^{-2}$	$(10 \pm 7.0)10^{-2}$	$4.9x10^{-3}$
	CL 69:2	CL 19:1_16:0_18:1_16:0	$(9.2 \pm 6.5)10^{-3}$	$(7.6 \pm 4.4)10^{-4}$	$(2.1 \pm 1.2)10^{-3}$	$2.5x10^{-2}$
	CL 70:3	CL 18:1_18:1_18:1_16:0	$(9.9 \pm 6.9)10^{-2}$	$(5.4 \pm 5.1)10^{-3}$	$(1.8 \pm 0.7)10^{-2}$	$1.8x10^{-2}$
	CL 70:4	CL 18:1_18:1_18:1_16:1	$(5.3 \pm 2.3)10^{-2}$	$(5.6 \pm 4.6)10^{-3}$	$(1.3 \pm 7.3)10^{-2}$	$1.9x10^{-3}$
PA08	PE 30:0	PE 16:0/14:0	$(7.9 \pm 3.6)10^{-2}$	0.9 ± 0.2	0.2 ± 0.1	$2.9x10^{-5}$
	PE 31:0	PE 15:0/16:0	nd	0.1 ± 0.7	$(2.4 \pm 1.9)10^{-2}$	$2.0x10^{-2}$
	PE 32:0	PE 16:0/16:0	1.4 ± 0.2	8.7 ± 2.5	2.2 ± 0.8	$1.3x10^{-4}$
	PE 32:1	PE 16:0/16:1	1.7 ± 0.6	3.1 ± 1.1	1.3 ± 0.6	$3.2x10^{-2}$
	PG 30:0	PG 16:0/14:0	$(2.2 \pm 0.8)10^{-2}$	$(20 \pm 4.2)10^{-2}$	$(3.4 \pm 1.8)10^{-2}$	$4.3x10^{-5}$
	PG 32:0	PG 16:0/16:0	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.5	0.3 ± 0.2	$6.6x10^{-4}$
	PG 32:1	PG 16:0/16:1	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.5	0.4 ± 0.2	$1x10^{-2}$
	CL 64:1	CL 16:0_16:1_16:0_16:0	$(1.2 \pm 0.3)10^{-3}$	$(1.5 \pm 0.4)10^{-2}$	$(3.3 \pm 2.6)10^{-3}$	$1.8x10^{-4}$
	CL 64:2	CL 16:0_16:1_16:0_16:1	$(1.7 \pm 1.1)10^{-3}$	$(2.5 \pm 0.7)10^{-2}$	$(4.6 \pm 3.2)10^{-3}$	$5.7x10^{-5}$
	CL 66:3	CL 18:1_16:1_16:0_16:1	$(1.4 \pm 1.0)10^{-2}$	$(6.0 \pm 2.2)10^{-2}$	$(2.4 \pm 1.4)10^{-2}$	$7.8\ x10^{-3}$
	acylPG 48:0	acylPG 16:0/16:0/16:0	$(6.1 \pm 2.7)10^{-2}$	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	$9.8\ x10^{-3}$

Highest in	Identification	major isomer	Relative area Mean ± sd	Relative area Mean ± sd	Relative area Mean ± sd	p-value (ANOVA test)
PA08B	acylPG 48:1	acylPG 16:0/16:1/16:0	$(8.2 \pm 2.4)10^{-2}$	0.9 ± 0.4	0.4 ± 0.1	$4.6x10^{-3}$
	LCL 48:1	LCL 16:1/16:0/16:0/0:0	nd	$(2.7 \pm 1.9)10^{-2}$	$(9.0 \pm 4.8)10^{-3}$	$1.9x10^{-2}$
	LCL 48:2	LCL 16:1/16:1/16:0/0:0	nd	$(5.1 \pm 4.4)10^{-2}$	$(7.3 \pm 4.4)10^{-3}$	$3.9x10^{-2}$
PA18	LPC 18:1_0:0	LPC 18:1_0:0	0.5 ± 0.3	2.3 ± 1.6	40.3 ± 28.8	$1.3x10^{-2}$
PA08 = PA18	LPC 16:0_0:0	LPE 16:0_0:0	2.4 ± 1.1	27.4 ± 15.3	30.1 ± 16.1	$2.5x10^{-2}$
	acylPG 50:2	acylPG 16:0/16:1/18:1	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.6	1.3 ± 0.6	$2.9x10^{-2}$
PAK = PA08B = PA18B	LPE 16:1_0:0	LPE 16:1_0:0	0.3 ± 0.1	8.6 ± 6.5	6.5 ± 4.1	> $5x10^{-2}$
	LPE 18:1_0:0	LPE 18:1_0:0	4.7 ± 1.8	25.1 ± 14.2	42.6 ± 30.1	
	LPG 18:1_0:0	LPG 18:1_0:0	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.8	2.4 ± 2.0	
	PE 30:1	PE 15:0/16:0	$(6.9 \pm 3.7)10^{-2}$	$(1.4 \pm 0.8)10^{-1}$	$(4.2 \pm 3.2)10^{-2}$	
	PE 32:2	PE 16:1/16:1	$(1.3 \pm 0.8)10^{-1}$	$(1.4 \pm 0.7)10^{-1}$	$(1.3 \pm 0.8)10^{-1}$	
	PE 33:1	PE 16:0/17:1	$(1.5 \pm 1.5)10^{-1}$	$(5.0 \pm 1.5)10^{-2}$	$(9.6 \pm 5.4)10^{-2}$	
	PG 32:2	PG 16:1/16:1	$(4.2 \pm 2.4)10^{-2}$	$(1.3 \pm 0.9)10^{-1}$	$(5.1 \pm 3.0)10^{-2}$	
	PG 33:1	PE 16:0/17:1	$(6.7 \pm 4.8)10^{-2}$	$(5.6 \pm 2.3)10^{-2}$	$(3.9 \pm 1.9)10^{-2}$	
	PG 34:2	PE 18:1/16:1	2.5 ± 1.2	1.3 ± 0.9	1.2 ± 0.6	
	PG 35:2	PE 18:1/17:1	$(1.9 \pm 1.6)10^{-1}$	$(2.7 \pm 2.1)10^{-2}$	$(3.5 \pm 1.5)10^{-2}$	
	acylPG50:1	acylPG 16:0/16:0/18:1	1.3 ± 0.3	2.4 ± 1.1	4.0 ± 2.2	
	acylPG52:2	acylPG 18:1/16:0/18:1	2.3 ± 0.8	1.3 ± 0.6	2.0 ± 0.6	
	acylPG52:3	acylPG 18:1/16:1/18:1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	
	LCL 50:2	mix	$(11.4 \pm 4.0)10^{-3}$	$(9.2 \pm 7.8)10^{-2}$	$(1.5 \pm 1.2)10^{-2}$	
	LCL 50:3	LCL 16:1/18:1/16:1/0:0	nd	$(5.1\ 4.3)10^{-2}$	$(3.5\ 2.5)10^{-2}$	
	CL 66:1	CL 16:0_16:1_18:1_16:0	$(6.7 \pm 2.4)10^{-3}$	$(2.0 \pm 1.1)10^{-2}$	$(1.4 \pm 1.2)10^{-2}$	
	CL 67:2	CL 16:0_17:1_18:1_16:0	$(6.1 \pm 3.3)10^{-4}$	$(20.1 \pm 8.1)10^{-4}$	$(3.5 \pm 2.0)10^{-3}$	
	CL 67:3	CL 16:0_17:1_18:1_16:1	$(6.7 \pm 3.8)10^{-4}$	$(2.7 \pm 2.1)10^{-3}$	$(2.2 \pm 1.7)10^{-3}$	
	CL 68:3	CL 18:1/16:0/18:1/16:1	$(1.8 \pm 0.8)10^{-1}$	$(9.7 \pm 4.2)10^{-2}$	$(12.1 \pm 6.3)10^{-2}$	
	CL 68:4	CL 18:1_16:1_18:1_16:1	$(3.5 \pm 2.5)10^{-2}$	$(5.0 \pm 2.2)10^{-2}$	$(3.7 \pm 2.2)10^{-2}$	
	CL 69:3	CL 18:1_17:1_18:1_16:0	$(1.5 \pm 1.3)10^{-2}$	$(1.5 \pm 1.0)10^{-3}$	$(3.1 \pm 2.0)10^{-3}$	
	CL 69:4	CL 18:1_17:1_18:1_16:1	$(11.6 \pm 9.1)10^{-4}$	$(8.7 \pm 6.0)10^{-4}$	$(7.7 \pm 6.0)10^{-4}$	

Apart for CL 68:2 and CL 68:3, the fatty acid composition of CL could not be determined (signal too low). The given structures were hypothesised from PG structures, since CL are biosynthesised from PG [28].

Regarding the first group, all PC were more produced by PAK than by PA08 or PA18, apart for PC 36:2 which was equally produced by PAK and PA18. For PE, PG and CL, phospholipids with the longest fatty acyl chain were more produced by PAK. For these reasons, the membrane of PAK might be more rigid than the ones of PA08 and PA18. Indeed, long fatty acyl chains and the presence of PC were described to reduce the fluidity and stabilize the membrane, respectively [27].

Regarding the second group, PE, PG, CL and acylPG with the smallest fatty acyl chain were more produced by PA08. Also, saturated PE, PG and acylPG were more produced by PA08. Since saturated fatty acyl chains were described to be more rigid than unsaturated fatty acyl chains [6], the increase of saturated phospholipids might allow PA08 to regulate the membrane fluidity.

Regarding the third group, only LPC 18:1_0:0 was more produced by PA18 than by PAK or PA08. Even if, the relative areas cannot be used in an absolute quantitative manner, the high disparity between the relative area of LPG 18:1_0:0 produced by PAK (0.5 ± 0.3), or PA08 (2.3 ± 1.6), and the one produced by PA18 (40.3 ± 28.8) should be noted. Moreover, as previously mentioned, PC 36:2 was more present in PA18 than in PA08. In fact, PC 36:2 might be 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, from the SCFM-PC medium) directly included into the membrane. Then, DOPC might have been hydrolysed in order to synthesise LPC 18:1_0:0. The decrease of the other phospholipid quantities might have been carried out in order to control the membrane fluidity since PC increase the membrane rigidness.

Regarding the last group of significantly different phospholipids, LPE 16:0_0:0 and acylPG 50:2 were equally produced by PA08 and PA18 but less produced by PAK.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), and phospholipids for internal standard use (PC 17:0/17:0; PE 17:0/17:0; PG 17:0/17:0; LPC 17:0/0:0; LPE 13:0/0:0; CL 14:0/14:0/14:0/14:0) were purchased from Avanti Polar Lipids (AL, USA).

All the other components of synthetic cystic fibrosis medium – DOPC (SCFM-PC) and the chemicals required for the membrane lipid extraction were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Methanol, chloroform, acetonitrile and isopropanol were purchased from Fischer Scientific (UK), ammonium formate from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), formic acid from Merck (Germany). Except methanol and chloroform which were HPLC grade, all solvents and buffers used were LC-MS grade.

4.2. Bacteria collection, storage and selection

The *P. aeruginosa* strain PAK (PAK), used in this study, was obtained from Dr. Lhousseine Touqui (Institut Pasteur, Paris, France). Two *P. aeruginosa* clinical isolates, from one patient, were obtained from Dr. Philippe Morand (Hôpital Cochin, Paris, France). One was isolated in 2008 (referred as PA08) and the other in 2018 (PA18). Analysis of clonality, using either ERIC-PCR or RAPD, showed that these two isolates were phylogenetically related (data not shown).

4.3. Biological sample preparation

4.3.1 Bacteria culture

Bacteria culture was performed according to Deschamps *et al.* [20]. In order to mimick at best the CF sputum, while taking into account the lipid analysis compatibility, the SCFM-PC medium, described in our previous work, was used. Briefly, from a pre-culture overnight in SCFM-PC, *P. aeruginosa* PAK, PA08 and PA18 were grown in SCFM-PC and the culture was stopped one hour before the end of the exponential phase. Then a pellet was collected by centrifugation for extraction. The culture was performed 5 times for PAK, PA08 and PA18.

4.3.2 Lipid extraction

The membrane lipid extraction of PAK and clinical *P. aeruginosa* isolates was performed as described previously [29]. Alginate lysis was performed using alginate lyase in PBS (0.15 mg/mL), followed by sonication, centrifugation and ultra-centrifugation. The pellet was then split in two before extraction. Internal standards (IS) of phospholipids were spiked in each half-pellet. The volume of the IS solution mix was adjusted to their weight. For a pellet of 20 mg, 50 µL of chloroform containing the IS (PC 17:0/17:0, 0.01 µg/µL; PE 17:0/17:0, 0.05 µg/µL; PG 17:0/17:0, 0.02 µg/µL and CL 14:0/14:0/14:0/14:0, 0.1 µg/µL) were spiked. Finally, lipids were extracted using a modified version of the Bligh and Dyer protocol [21]. Lipid extracts were dried and conserved under argon at −20 °C. Ten replicates were obtained using this protocol: 5 biological replicates and two technical (liquid-liquid extraction) replicates per biological replicate.

4.4. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (UHPLC-MS) analysis

The sample preparation for UHPLC-MS analyses, the MS and LC parameters —including LC gradient— were as described by Deschamps *et al.* [5,20]. Briefly, the dried lipids extracts were re-constituted into 50 µL of chloroform/methanol (2/1, v/v) and 1/5 diluted into isopropanol/acetonitrile/water (4/3/1, v/v).

The LC-MS experiments were performed using an UHPLC system (Dionex Ultimate 3000 RSLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-IMS-TOF, SYNAPT G2 HDMS, Waters MS Technologies, Manchester, UK) using electrospray ionisation (ESI). All samples were analysed in two batches (in positive and negative ion modes). The source parameters were, in positive mode: capillary, extraction cone and cone voltages set at 3 kV, 6 V and 50 V respectively, the cone gas and desolvation gas flows were 40 L/h and 600 L/h respectively, the desolvation temperature was 400 °C.

For negative ion mode, the capillary, extraction cone and cone voltage were -2.4 kV, 5 V and 45 V respectively, the cone gas and desolvation gas flows were 60 L/h and 900 L/h, respectively, the desolvation temperature was 500 °C. Mass spectra were recorded over a *m/z* 50 - 2000 range in resolution mode (resolution 20 000 FWHM). External *m/z* calibration was performed with a sodium formate solution. Lockmass correction was performed by infusing leucine enkephalin (2 ng/µL, 3 µL/min) and automatically applied after the acquisition (lock spray capillary and cone voltage of 10 s, 3.5 kV and 40 V respectively in positive mode and 10 s, 2.5 kV, 30 V respectively in negative mode). The column was a 1.0 x 100 mm, Acquity UPLC CSH C18 1.7 µm column (Waters, Manchester, UK) equipped with a 0.2 µm prefilter. The samples tray and column oven temperatures were set at 4°C and 50 °C, respectively. The injection volume was set at 1 µL. A flow rate of 100 µL/min was used. Mobile phase A consisted of acetonitrile/aqueous 10 mM ammonium formate (60/40) + 0.1 % formic acid and mobile phase B of isopropanol/acetonitrile/aqueous 10 mM ammonium formate (88/8/4) + 0.1 % formic acid. Data acquisition was performed using MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Before each batch, the column was rinsed, the ESI source cleaned and the mass spectrometer calibration performed. Before and after each batch, an experimental blank (corresponding to liquid-liquid extraction of solvent without sample) was injected in order to define contaminants. The column was equilibrated with four injection of the quality control (QC, prepared with an aliquot of every sample), then the QC was injected regularly throughout the runs after every six samples. Samples were randomly injected as recommended for metabolomics experiments [22]. LC-MS/MS experiments were performed in negative ion mode. Precursor ions were selected in the quadrupole, at a resolution of 1 *m/z* unit, using retention time (t_R) windows in the acquisition method. Several injections were performed to obtain the MS/MS spectra for all co-eluting lipids. The collisional activation was performed in the trap cell using argon as target gas (6.10^{-3} mbar) and a ramp collision energy from 25 to 55 eV for LCL or from 35 to 45 eV for acylPG. MS/MS spectra were processed using MassLynx 4.1 (Waters).

For the semi-quantification experiment, the previously described LC-system (including identical column and mobile phases) was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (XEVO-TQSmicro, Waters MS Technologies, Manchester, UK).

The source parameters were, in positive mode: capillary and cone voltages set at 2.3 kV and 30 V, the cone gas and desolvation gas flows were 40 L/h and 600 L/h respectively, the desolvation temperature was 400 °C.

For negative ion mode, the capillary and cone voltage were -2.1 kV and 35 V respectively, the cone gas and desolvation gas flows were 40 L/h and 700 L/h, respectively, the desolvation temperature was 500 °C. Acquisitions were performed using the multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode using argon as the target gas. Retention time windows were set ± 1 min of the expected retention time. Dwell time was set automatically. The MRM transitions are described in Table 2.

Table 2 MRM transition parameters for every phospholipid class.

Lipid class	Ion mode	MS^1 (*m/z*)	MS^2 (*m/z*)	Collision Energy (eV)
LPE	ESI −	$[M-H]^-$	$[FA-H]^-$	28
LPG	ESI −	$[M-H]^-$	$[FA-H]^-$	28
LPC	ESI −	$[M-CH_3+OAc]^-$	$[M-CH_3-H]^-$	28
			$[FA-H]^-$	28
PE	ESI −	$[M-H]^-$	153.0	35
			171.0	35
PG	ESI −	$[M-H]^-$	153.0	35
			171.0	35
PC	ESI +	$[M+H]^+$	184.1	35
acylPG	ESI −	$[M-H]^-$	$[FA(sn\text{-}3')-H]^-$	40
LCL	ESI −	$[M-H]^-$	153.0	72
			171.0	72
CL	ESI −	$[M-H]^-$	153.0	72
			171.0	72

FA : fatty acid

Data acquisition was performed using MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK). Data treatment was performed using the TargetLynx module of MassLynx.

Peak areas were automatically calculated, from the extracted ion chromatograms, using the monoisotopic peak for $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ ions. Relative area were then calculated by dividing the area of a sample phospholipid by the area of the internal standard of the corresponding phospholipid class (*e.g.* $relative\ area = \frac{\text{Area of PE 34:1}}{\text{Area of PE 17:0/17:0}}$). ANOVA tests were performed using OriginPro 2016 (64-bit) b9.3.226.

4.5. Data processing for untargeted analysis

The whole data processing for statistical analyses was performed for positive and negative ionisations. Data were first converted to centroid mode using MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK). Then, in order to avoid the overlay of the lockmass trace on the chromatographic trace, the _FUNC002.DAT of each .raw file were modified by the addition of a ".old" extension. Waters format data were converted to mzXML data using ProteoWizard (3.0.9992). Data were imported into the Workflow4Metabolomics (W4M, https://workflow4metabolomics.usegalaxy.fr/) platform [23].

Pre-processing was performed using the following steps and parameters: chromatographic peak detection (centWave algorithm, max tolerated *m/z* deviation: 25 ppm, min/max peak width in seconds: 20,80, S/N cutoff: 1, prefilter: 0,0, integration method: peak limits based on real data), grouping of chromatographic peaks (PeakDensity, bandwidth: 5, min fraction of samples: 0.3, min number of samples: 1, width of overlapping *m/z* slices: 0.01), t_R alignment (Obiwarp, bin size: 1) and missing peaks area integration (fillChromPeaks, W4M parameters). Two data matrices were obtained (for positive and negative ionisations) containing the features (*m/z*_t_R) and their corresponding peak area in each sample.

The following data filtering and normalisation were performed on these data matrices: blank contaminant filtering (blankMean_over_sampleMean filtrated when higher than 0.5), batch correction based on QC (loess, span: 1, factor of interest: strain), filtration of features with a QC coefficient of variation (CV) higher than 30% and normalisation to total intensity.

4.6. Lipid nomenclature

The lipid nomenclature used in this work is based on the one described by Liebisch *et al.* [31] (on the basis of the LIPID MAPS website, http://www.lipidmaps.org [32]). This shorthand nomenclature provides a standard methodology for reporting fatty acids position and their bond type. In this work, phosphatidylethanolamines, phosphatidylglycerols, phosphatidylcholines and cardiolipines will be noted as PE, PG, PC and CL, respectively. Lysophospholipids will be noted using the L prefix on the corresponding lipid class. When several isomers were identified, the fatty acyl chains will be noted as the sum of the constituting fatty acyl chains (*e.g.* PE 32:1). When a precise isomer will be mentioned, the following detailed notation will be used — with "/" for known or "_" for unknown s*n* position. For PE, PC and PG: PE, PC, PG s*n-1*:x/ s*n-2*:y (with x and y the number of unsaturation). For CL: CL s*n-1*:x/ s*n-2*:y/ s*n-1'*:x'/ s*n-2'*:y'. For acylphosphatidylglycerols (acylPG), this class of lipids was not included in the work of Liebisch and coworkers, therefore based on literature [33] the following nomenclature will be used: acylPG *sn*-1:x/ *sn*-2:y/ *sn*-3':z (the *sn*-3' corresponds to the acyl positioned on the glycerol headgroup of the PG).

5. Conclusions

In this study, the membrane lipids of clinical and PAK strains of *P. aeruginosa* were studied using a LC-MS lipidomic approach followed by a targeted MS/MS and semi-quantitative approach. The clinical isolates belonged to the same strain from a patient at a 10-year gap (PA08 in 2008 and PA18 in 2018). Based on the analysis of both laboratory and clinical strains, this work allowed the identification of lysocardiolipins and acylphosphatidylglycerols, compounds that were not yet identified in *P. aeruginosa* grown in classical conditions. These lipids were not identified in our previous work on *P. aeruginosa* PAK since their signal was very low. Depending on the strain or isolate, different repartition of phospholipids could be highlighted.

When compared to the membrane of PAK, PA08 had more phospholipids with small and saturated fatty acyl chains; PA18 had more LPC 18:1_0:0 but globally less phospholipids. Probably, modifications of the membrane lipids from the environment induced regulation of other phospholipids in order to maintain the fluidity of the membrane.

Such differences between the isolates might illustrate a metabolism adaptation which is preserved in spite of the culture in laboratory conditions. In conclusion, the analysis of 2 isolates of the same clinical strain of *P. aeruginosa* showed striking differences in their lipidome. Since this study was based on only 2 isolates, a conclusion on lipid shift over time cannot be drawn. However, it highlights the lipidomic plasticity that takes place during *P. aeruginosa* chronic infections in CF patients. Our study validates our approach and paves the way to further work, based on a large panel of patients.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1.

Author Contributions: All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Formal analysis, Estelle Deschamps; Investigation, Estelle Deschamps; Methodology, Estelle Deschamps and Isabelle Schmitz-Afonso; Project administration, Corinne Loutelier-Bourhis and Stéphane Alexandre; Resources, Philippe Morand and Lhousseine Touqui; Supervision, Carlos Afonso, Emmanuelle Dé, Corinne Loutelier-Bourhis and Stéphane Alexandre; Validation, Estelle Deschamps, Isabelle Schmitz-Afonso, Corinne Loutelier-Bourhis and Stéphane Alexandre; Writing – original draft, Estelle Deschamps and Corinne Loutelier-Bourhis; Writing – review & editing, Estelle Deschamps, Isabelle Schmitz-Afonso, Annick Schaumann, Carlos Afonso, Emmanuelle Dé, Philippe Morand, Lhousseine Touqui, Corinne Loutelier-Bourhis and Stéphane Alexandre.

Funding: The authors gratefully acknowledge European Regional Development Fund (ERDF, no. HN0001343), Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029) and Région Normandie for their financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have neither conflict of interest nor competing financial interest.

Abbreviations

CF	cystic fibrosis
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
PAK	*Pseudomonas aeruginosa* strain PAK
PA08B	*Pseudomonas aeruginosa* isolate from 2008
PA18B	*Pseudomonas aeruginosa* isolate from 2018
SCFM	synthetic cystic fibrosis medium
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
SCFM-PC	SCFM modified by DOPC
PCA	principal component analysis
t_R	retention time
PLS-DA	partial least square –data analysis
LPC	lysophosphatidylcholin
LPE	lysophosphatidylethanolamine
LPG	lysophosphatidylglycerol
PC	phosphatidylcholin
PE	phosphatidylethanlamine
PG	phosphatidylglycerol
acylPG	acylphosphatidylglycerol
LCL	lysocardiolipin
CL	cardiolipin
LPA	lysophosphatidic acid
MRM	multiple reaction monitoring

References

1. Smith, W.D.; Bardin, E.; Cameron, L.; Edmondson, C.L.; Farrant, K.V.; Martin, I.; Murphy, R.A.; Soren, O.; Turnbull, A.R.; Wierre-Gore, N., et al. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. FEMS Microbiol Lett 2017, 364, doi:10.1093/femsle/fnx121.

2. Bassetti, M.; Vena, A.; Croxatto, A.; Righi, E.; Guery, B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context 2018, 7, 212527, doi:10.7573/dic.212527.

3. Curran, C.S.; Bolig, T.; Torabi-Parizi, P. Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. American journal of respiratory and critical care medicine 2018, 197, 708-727, doi:10.1164/rccm.201705-1043SO.

4. Le Senechal, C.; Crouzet, M.; Costaglioli, P.; Barthe, C.; Bure, C.; Vilain, S. Phospholipid Content of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Is Modulated by the Growth Phase Rather Than the Immobilization State. Lipids 2019, 54, 519-529, doi:10.1002/lipd.12184.

5. Deschamps, E.; Schmitz-Afonso, I.; Schaumann, A.; De, E.; Loutelier-Bourhis, C.; Alexandre, S.; Afonso, C. Determination of the collision cross sections of cardiolipins and phospholipids from *Pseudomonas aeruginosa* by traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry using a novel correction strategy. Anal Bioanal Chem 2019, 411, 8123-8131, doi:10.1007/s00216-019-02194-2.

6. Romantsov, T.; Wood, J.M. Contributions of Membrane Lipids to Bacterial Cell Homeostasis upon Osmotic Challenge. In Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Geiger, O., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2016; 10.1007/978-3-319-43676-0_58-1pp. 1-22.

7. Benamara, H.; Rihouey, C.; Abbes, I.; Ben Mlouka, M.A.; Hardouin, J.; Jouenne, T.; Alexandre, S. Characterization of membrane lipidome changes in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm growth on glass wool. PLoS One 2014, 9, 9, doi:10.1371/journal.pone.0108478.g001.

8. Zhang, Y.M.; Rock, C.O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat Rev Microbiol 2008, 6, 222-233, doi:10.1038/nrmicro1839.

9. Buyck, J.M.; Plesiat, P.; Traore, H.; Vanderbist, F.; Tulkens, P.M.; Van Bambeke, F. Increased susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to macrolides and ketolides in eukaryotic cell culture media and biological fluids due to decreased expression of oprM and increased outer-membrane permeability. Clin Infect Dis 2012, 55, 534-542, doi:10.1093/cid/cis473.

10. Baker, L.Y.; Hobby, C.R.; Siv, A.W.; Bible, W.C.; Glennon, M.S.; Anderson, D.M.; Symes, S.J.; Giles, D.K. *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. BMC Microbiol 2018, 18, 117, doi:10.1186/s12866-018-1259-8.

11. Han, M.L.; Zhu, Y.; Creek, D.J.; Lin, Y.W.; Anderson, D.; Shen, H.H.; Tsuji, B.; Gutu, A.D.; Moskowitz, S.M.; Velkov, T., et al. Alterations of Metabolic and Lipid Profiles in Polymyxin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2018, 62, doi:10.1128/AAC.02656-17.

12. Hornischer, K.; Khaledi, A.; Pohl, S.; Schniederjans, M.; Pezoldt, L.; Casilag, F.; Muthukumarasamy, U.; Bruchmann, S.; Thoming, J.; Kordes, A., et al. BACTOME-a reference database to explore the sequence- and gene expression-variation landscape of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Nucleic Acids Res 2019, 47, D716-D720, doi:10.1093/nar/gky895.

13. Varga, J.J.; Barbier, M.; Mulet, X.; Bielecki, P.; Bartell, J.A.; Owings, J.P.; Martinez-Ramos, I.; Hittle, L.E.; Davis, M.R., Jr.; Damron, F.H., et al. Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. BMC genomics 2015, 16, 883, doi:10.1186/s12864-015-2069-0.

14. Erdmann, J.; Thoming, J.G.; Pohl, S.; Pich, A.; Lenz, C.; Haussler, S. The Core Proteome of Biofilm-Grown Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. Cells 2019, 8, doi:10.3390/cells8101129.

15. Rao, J.; Damron, F.H.; Basler, M.; Digiandomenico, A.; Sherman, N.E.; Fox, J.W.; Mekalanos, J.J.; Goldberg, J.B. Comparisons of Two Proteomic Analyses of Non-Mucoid and Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Cystic Fibrosis Patient. Frontiers in microbiology 2011, 2, 162, doi:10.3389/fmicb.2011.00162.

16. Behrends, V.; Ryall, B.; Zlosnik, J.E.A.; Speert, D.P.; Bundy, J.G.; Williams, H.D. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. Environ. Microbiol. 2013, 15, 398-408, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02840.x.

17. Kozlowska, J.; Rivett, D.W.; Vermeer, L.S.; Carroll, M.P.; Bruce, K.D.; Mason, A.J.; Rogers, G.B. A relationship between Pseudomonal growth behaviour and cystic fibrosis patient lung function identified in a metabolomic investigation. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society 2013, 9, doi:10.1007/s11306-013-0538-5.

18. Appala, K.; Bimpeh, K.; Freeman, C.; Hines, K.M. Recent applications of mass spectrometry in bacterial lipidomics. Anal Bioanal Chem 2020, 412, 5935-5943, doi:10.1007/s00216-020-02541-8.

19. Benamara, H.; Rihouey, C.; Jouenne, T.; Alexandre, S. Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta 2011, 1808, 98-105, doi:10.1016/j.bbamem.2010.09.004.

20. Deschamps, E.; Schaumann, A.; Schmitz-Afonso, I.; Afonso, C.; De, E.; Loutelier-Bourhis, C.; Alexandre, S. Membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a cystic fibrosis mucus-mimicking medium. Biochim Biophys Acta Biomembr 2020, 1863, 183482, doi:10.1016/j.bbamem.2020.183482.

21. Henseler, J.; Fassott, G. Testing Moderating Effects in PLS Path Models: An Illustration of Available Procedures. In Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications, Esposito Vinzi, V., Chin, W.W., Henseler, J., Wang, H., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; 10.1007/978-3-540-32827-8_31pp. 713-735.

22. Hsu, F. Characterization of acylphosphatidylglycerols from salmonella typhimurium by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom 2003, 15, 1-11, doi:10.1016/s1044-0305(03)00627-5.

23. Hsu, F.-F.; Turk, J. Studies on phosphatidylglycerol with triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Fragmentation processes and structural characterization. J Am Soc Mass Spectrom 2001, 12, 1036-1043, doi:10.1021/jasms.8b01671.

24. Hsu, F.F.; Turk, J.; Rhoades, E.R.; Russell, D.G.; Shi, Y.; Groisman, E.A. Structural characterization of cardiolipin by tandem quadrupole and multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom 2005, 16, 491-504, doi:10.1016/j.jasms.2004.12.015.

25. Murphy, R.C.; Axelsen, P.H. Mass spectrometric analysis of long-chain lipids. Mass Spectrom Rev 2011, 30, 579-599, doi:10.1002/mas.20284.

26. Hsu, F.-F.; Turk, J. Electrospray Ionization with Low-energy Collisionally Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry of Glycerophospholipids: Mechanisms of Fragmentation and Structural Characterization. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009, 877, 22, doi:10.1016/.

27. Goldfine, H. Membrane Lipid Biogenesis. In Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Geiger, O., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2016; 10.1007/978-3-319-43676-0_34-1pp. 1-14.

28. Sohlenkamp, C.; Geiger, O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. FEMS Microbiol Rev 2016, 40, 133-159, doi:10.1093/femsre/fuv008.

29. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1959, 37.

30. Giacomoni, F.; Le Corguille, G.; Monsoor, M.; Landi, M.; Pericard, P.; Petera, M.; Duperier, C.; Tremblay-Franco, M.; Martin, J.F.; Jacob, D., et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 2015, 31, 1493-1495, doi:10.1093/bioinformatics/btu813.

31. Liebisch, G.; Vizcaino, J.A.; Kofeler, H.; Trotzmuller, M.; Griffiths, W.J.; Schmitz, G.; Spener, F.; Wakelam, M.J. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. J Lipid Res 2013, 54, 1523-1530, doi:10.1194/jlr.M033506.

32. Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S. LIPID MAPS online tools for lipid research. Nucleic Acids Res 2007, 35, W606-612, doi:10.1093/nar/gkm324.

33. Coulon, D.; Bure, C. Acylphosphatidylglycerol (acyl-PG) or N-acylphosphatidylethanolamine (NAPE)? J Mass Spectrom 2015, 50, 1318-1320, doi:10.1002/jms.3701.

FICHIERS SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 3

Supplementary Information S1

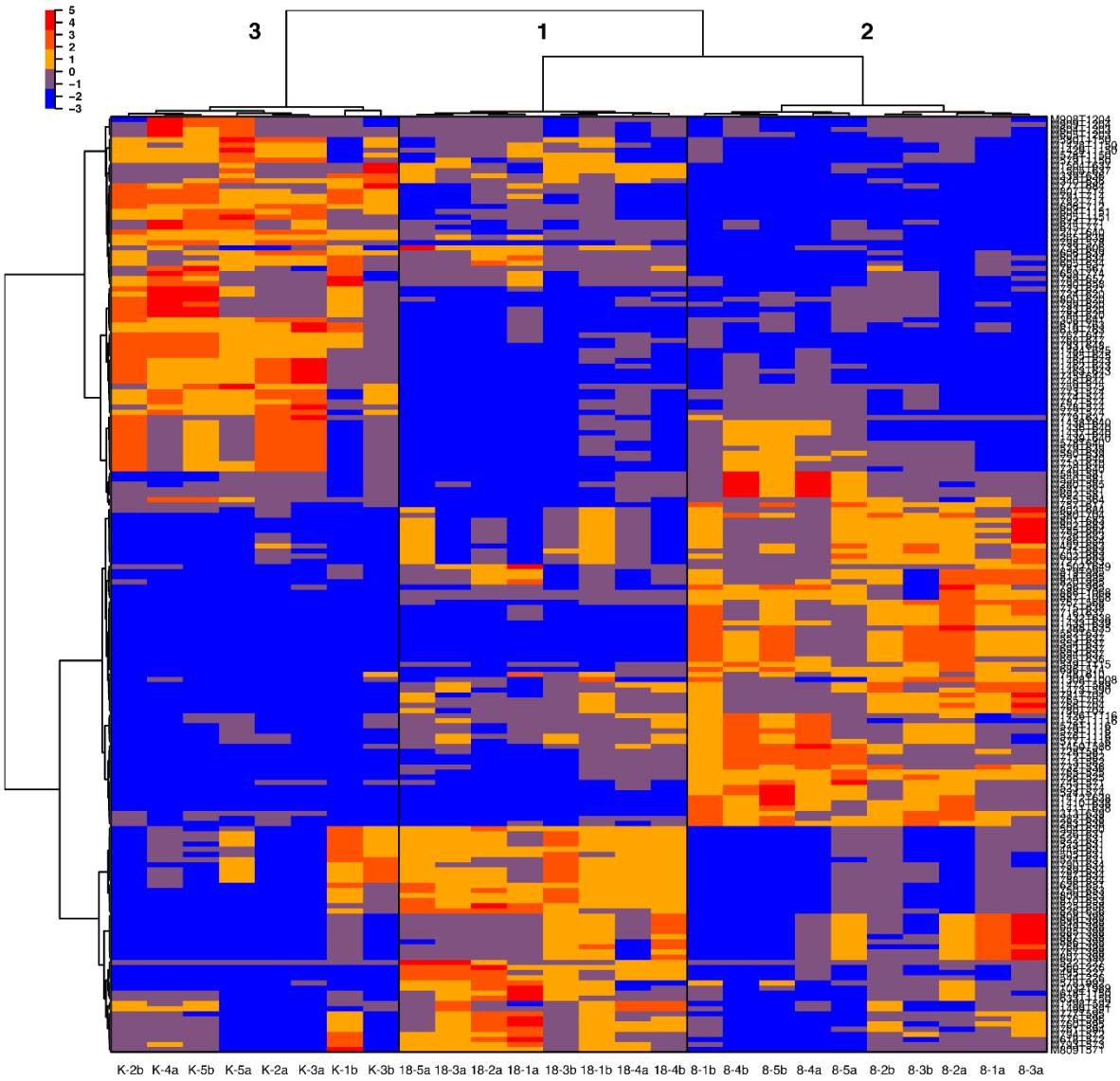


Figure S1.1 Heatmap for positive ionisation data. K, 8 and 18: PAK, PA08 and PA18 samples, respectively. Biological replicates (5) are represented by numbers. Technical replicates (2) are represented by a or b. Samples were separated in three groups corresponding to each of the strains.

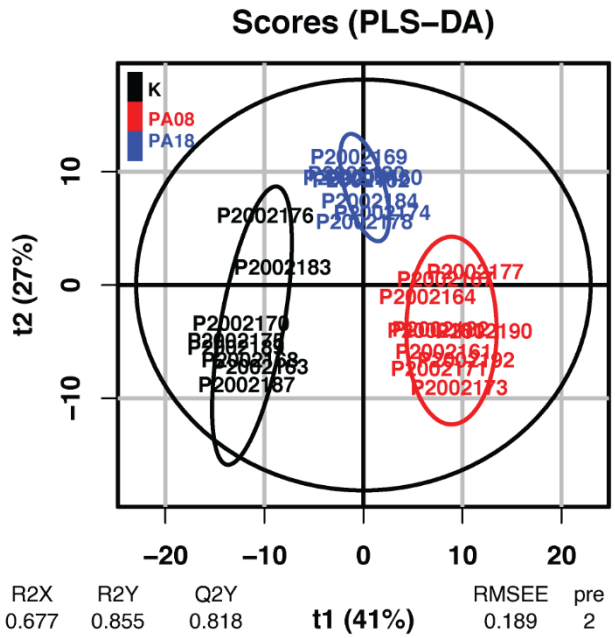


Figure S1.2 PLS-DA plot for positive ionisation data. Samples of PAK, PA08, PA18 are represented in black, blue and red, respectively. R2X and R2Y > 0.67 scores show a high precision of the predictive model (Henseler, J. and G. Fassott (2010). Testing Moderating Effects in PLS Path Models: An Illustration of Available Procedures. Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications. V. Esposito Vinzi, W. W. Chin, J. Henseler and H. Wang. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 713-735).

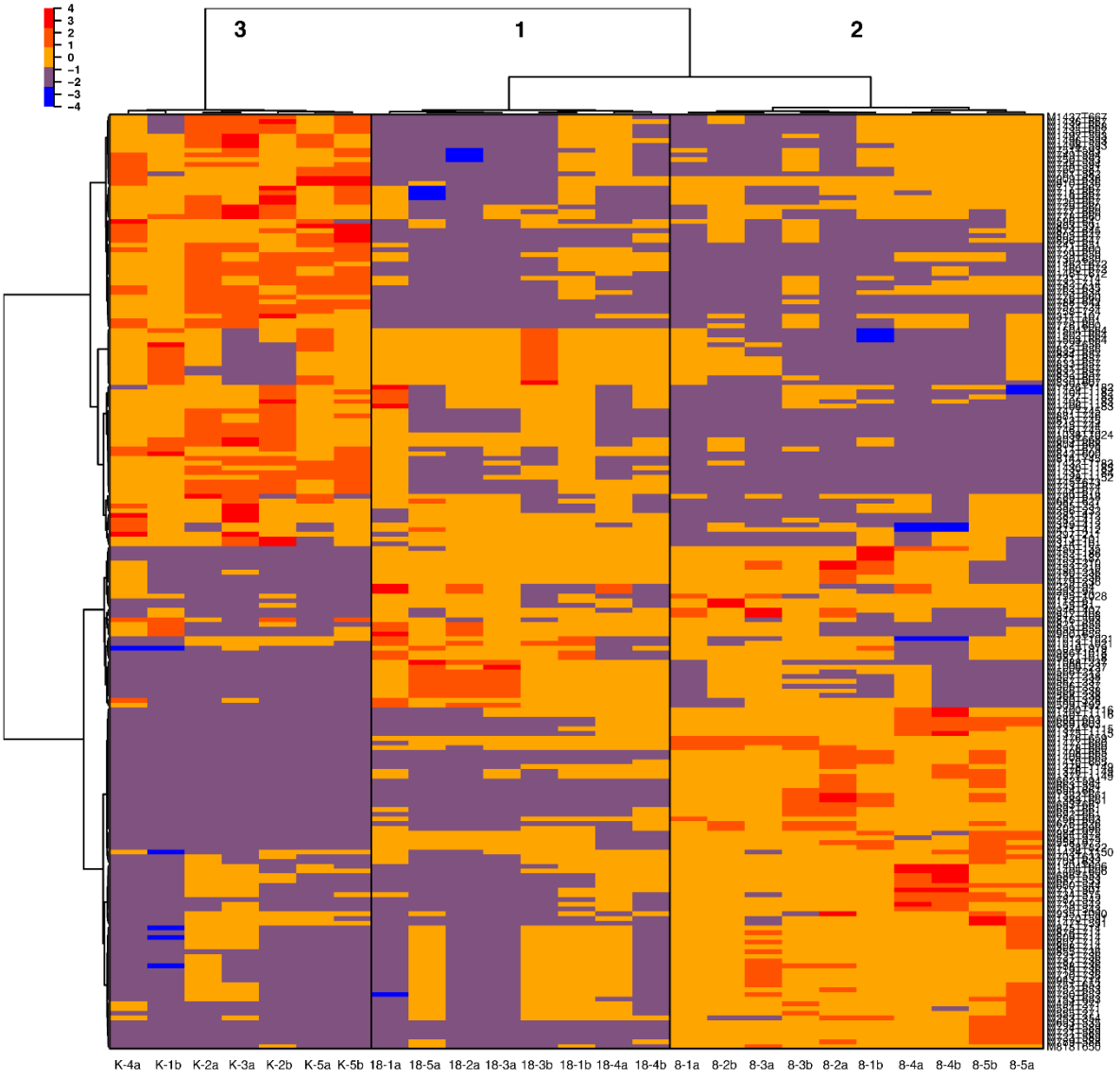


Figure S1.3 Heatmap for negative ionisation data. K, 8 and 18: PAK, PA08 and PA18 samples, respectively. Biological replicates (5) are represented by numbers. Technical replicates (2) are represented by a or b. Samples were separated in three groups corresponding to each of the strains.

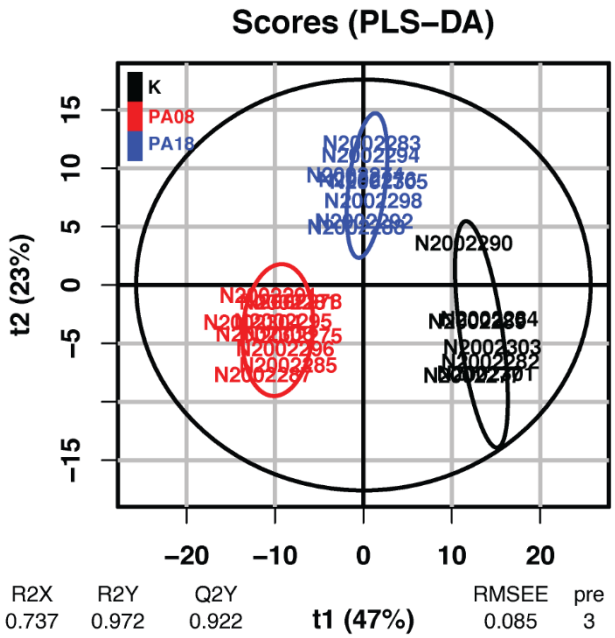


Figure S1.4 PLS-DA plot for negative ionisation data. Samples of PAK, PA08, PA18 are represented in black, blue and red, respectively. R2X and R2Y > 0.67 scores show a high precision of the predictive model (Henseler, J. and G. Fassott (2010). Testing Moderating Effects in PLS Path Models: An Illustration of Available Procedures. Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications. V. Esposito Vinzi, W. W. Chin, J. Henseler and H. Wang. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 713-735).

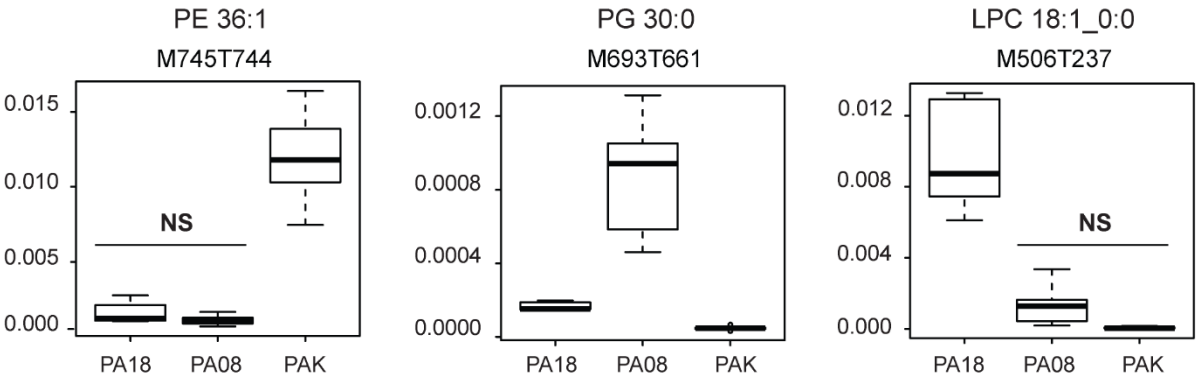


Figure S1.5 Box plots of 3 significant lipids obtained after an ANOVA test. Y axis: normalised peak areas. NS: non-significant differences (p-value > 0.05). When not mentioned, the p-value was below 0.0001.

Supplementary Information S2

Previous work: Deschamps, E., *et al.* (2019). "Determination of the collision cross sections of cardiolipins and phospholipids from *Pseudomonas aeruginosa* by traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry using a novel correction strategy." Anal Bioanal Chem 411: 8123-8131.

				Positive ions		Negative ions		identified in/ with
Lipid	**Formula**	**major isomer**	**RT (min)**	**ion**	***m/z***	**ion**	***m/z***	
LPE 16:1	$C_{21}H_{42}NO_7P$	16:1_0:0	2.4			$[M-H]^-$	450.2626	non-targeted analysis - neg
LPE 16:0	$C_{21}H_{44}NO_7P$	16:0_0:0	3.7			$[M-H]^-$	452.2783	non-targeted analysis - neg
LPE 18:1	$C_{23}H_{46}NO_7P$	18:1_0:0	4.2			$[M-H]^-$	478.2939	non-targeted analysis - neg
LPG 18:1	$C_{24}H_{47}O_9P$	18:1_0:0	3.6			$[M-H]^-$	509.2885	non-targeted analysis - neg
LPC 18:1	$C_{26}H_{52}NO_7P$	18:1_0:0	4.3	$[M+H]^+$	522.3554	$[M-CH_3+OAc]^-$	566.3463	non-targeted analysis - pos & neg
PC 32:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	16:0/16:1	9.7	$[M+H]^+$	732.5538			previous work
PC 32:0	$C_{40}H_{80}NO_8P$	16:0/16:0	10.7	$[M+H]^+$	734.5694			previous work
PC 34:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	18:1/16:1	10.1	$[M+H]^+$	758.5694			previous work
PC 34:1	$C_{42}H_{82}NO_8P$	18:1/16:0	10.8	$[M+H]^+$	760.5851			previous work
PC 35:1	$C_{43}H_{84}NO_8P$	19:1/16:0	11.5	[M+H]+	774.6007			previous work
PC 36:2	$C_{42}H_{82}NO_8P$	18:1/16:1	10.8	$[M+H]^+$	786.6007			previous work
PE 30:1	$C_{35}H_{68}NO_8P$	15:0/16:0	9.2	$[M+H]^+$	662.4755	$[M-H]^-$	660.4610	previous work
PE 30:0	$C_{35}H_{70}NO_8P$	16:0/14:0	10			$[M-H]^-$	662.4766	previous work
PE 31:0	$C_{36}H_{72}NO_8P$	15:0/16:0	10.4			$[M-H]^-$	676.4923	non-targeted analysis - neg
PE 32:2	$C_{37}H_{70}NO_8P$	16:1/16:1	9.3	$[M+H]^+$	688.4912	$[M-H]^-$	686.4766	previous work
PE 32:1	$C_{37}H_{72}NO_8P$	16:0/16:1	10.3	$[M+H]^+$	690.5068	$[M-H]^-$	688.4923	previous work
PE 32:0	$C_{37}H_{74}NO_8P$	16:0/16:0	11	$[M+H]^+$	692.5225	$[M-H]^-$	690.5079	previous work

				Positive ions		Negative ions		identified in/ with
Lipid	**Formula**	**major isomer**	**RT (min)**	**ion**	***m/z***	**ion**	***m/z***	
PE 33:1	$C_{38}H_{74}NO_8P$	16:0/17:1	10.6	$[M+H]^+$	704.5225	$[M-H]^-$	702.5079	previous work
PE 33:0	$C_{39}H_{77}NO_8P$	17:0/16:0	11.6			$[M-H]^-$	704.5236	non-targeted analysis - neg
PE 34:2	$C_{39}H_{73}NO_8P$	18:1/16:1	10.2	$[M+H]^+$	716.5225	$[M-H]^-$	714.5079	previous work
PE 34:1	$C_{37}H_{76}NO_8P$	18:1/16:0	11.1	$[M+H]^+$	718.5381	$[M-H]^-$	716.5236	previous work
PE 35:2	$C_{40}H_{76}NO_8P$	18:1/17:1	10.8	$[M+H]^+$	730.5381	$[M-H]^-$	728.5236	previous work
PE 35:1	$C_{40}H_{78}NO_8P$	19:1/16:0	11.9	[M+H]+	732.5538	[M-H]-	730.5392	previous work
PE 36:2	$C_{41}H_{78}NO_8P$	18:1/18:1	11.2	$[M+H]^+$	744.5538	$[M-H]^-$	742.5392	previous work
PE 36:1	$C_{41}H_{80}NO_8P$	18:0/18:1	12.2	[M+H]+	746.5694	[M-H]-	744.5549	previous work
PG 30:0	$C_{36}H_{71}O_{10}P$	16:0/14:0	9.1			[M-H]-	693.4712	previous work
PG 32:2	$C_{38}H_{71}O_{10}P$	16:1/16:1	8.3			$[M-H]^-$	717.4712	non-targeted analysis - neg
PG 32:1	$C_{38}H_{73}O_{10}P$	16:0/16:1	9.2			$[M-H]^-$	719.4869	previous work
PG 32:0	$C_{38}H_{75}O_{10}P$	16:0/16:0	9.8			$[M-H]^-$	721.5025	non-targeted analysis - neg
PG 33:1	$C_{39}H_{75}O_{10}P$	16:0/17:1	9.7			$[M-H]^-$	733.5025	previous work
PG 34:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$	18:1/16:1	9.3			$[M-H]^-$	745.5025	previous work
PG 34:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$	18:1/16:0	10			$[M-H]^-$	747.5182	previous work
PG 35:2	$C_{40}H_{75}O_{10}P$	18:1/17:1	9.8			$[M-H]^-$	759.5182	previous work
PG 35:1	$C_{40}H_{77}O_{10}P$	19:1/16:0	10.7			$[M-H]^-$	761.5338	previous work
PG 36:2	$C_{42}H_{79}O_{10}P$	18:1/18:1	10.1			$[M-H]^-$	773.5338	previous work
acylPG 48:1	$C_{54}H_{103}O_{11}P$	16:0/16:1/16:0	16.2			$[M-H]^-$	957.7165	non-targeted analysis - neg
acylPG 48:0	$C_{54}H_{105}O_{11}P$	16:0/16:0/16:0	16.8			$[M-H]^-$	959.7322	manually
acylPG 50:2	$C_{56}H_{105}O_{11}P$	16:0/16:1/18:1	16.2			$[M-H]^-$	983.7322	non-targeted analysis - neg
acylPG 50:1	$C_{56}H_{107}O_{11}P$	16:0/16:0/18:1	16.8			$[M-H]^-$	985.7478	manually

				Positive ions		Negative ions		identified in/ with
Lipid	**Formula**	**major isomer**	**RT (min)**	**ion**	***m/z***	**ion**	***m/z***	
acylPG 52:3	$C_{58}H_{107}O_{11}P$	18:1/16:1/18:1	16.3			$[M-H]^-$	1009.7478	non-targeted analysis - neg
acylPG 52:2	$C_{58}H_{109}O_{11}P$	18:1/16:0/18:1	17			$[M-H]^-$	1011.7635	non-targeted analysis - neg
LCL 48:2	$C_{57}H_{108}O_{16}P_2$	16:1/16:1/16:0_0:0	12.3			$[M-H]^-$	1109.704	manually
LCL 48:1	$C_{57}H_{110}O_{16}P_2$	16:1/16:0/16:0_0:0	13.4			$[M-H]^-$	1111.7196	manually
LCL 50:3	$C_{59}H_{110}O_{16}P_2$	16:1/18:1/16:1_0:0	12.4			$[M-H]^-$	1135.7196	manually
LCL 50:2	$C_{59}H_{112}O_{16}P_2$	mix	13.7			$[M-H]^-$	1137.7353	non-targeted analysis - neg
CL 64:2	$C_{73}H_{138}O_{17}P_2$		18.6			$[M-H]^-$	1347.9337	previous work
CL 64:1	$C_{73}H_{140}O_{17}P_2$		19.1			$[M-H]^-$	1349.9493	previous work
CL 66:3	$C_{75}H_{140}O_{17}P_2$		18.6	$[M+H]^+$	1375.9639	$[M-H]^-$	1373.9493	previous work
CL 66:2	$C_{75}H_{142}O_{17}P_2$	16:0/16:1/18:1/16:0	19.2	$[M+H]^+$	1377.9795	$[M-H]^-$	1375.9650	previous work
CL 66:1	$C_{75}H_{144}O_{17}P_2$		19.6	$[M+H]^+$	1379.9952	$[M-H]^-$	1377.9806	previous work
CL 67:3	$C_{76}H_{142}O_{17}P_2$		19.2	$[M+H]^+$	1389.9795	$[M-H]^-$	1387.965	previous work
CL 67:2	$C_{76}H_{144}O_{17}P_2$		19.9	$[M+H]^+$	1391.9952	$[M-H]^-$	1389.9806	previous work
CL 68:4	$C_{77}H_{142}O_{17}P_2$		18.6	$[M+H]^+$	1401.9795	$[M-H]^-$	1399.9650	previous work
CL 68:3	$C_{77}H_{144}O_{17}P_2$	18:1/16:0/18:1/16:1	19.2	$[M+H]^+$	1403.9952	$[M-H]^-$	1401.9806	previous work
CL 68:2	$C_{77}H_{146}O_{17}P_2$	18:1/16:0/18:1/16:0	19.6	$[M+H]^+$	1406.0108	$[M-H]^-$	1403.9963	previous work
CL 69:4	$C_{78}H_{144}O_{17}P_2$		19.2	[M+H]+	1415.9952	$[M-H]^-$	1413.9806	previous work
CL 69:3	$C_{78}H_{146}O_{17}P_2$		19.9	$[M+H]^+$	1418.0108	$[M-H]^-$	1415.9963	previous work
CL 69:2	$C_{78}H_{148}O_{17}P_2$		19.2	$[M+H]^+$	1420.0265	$[M-H]^-$	1418.0119	previous work
CL 70:4	$C_{79}H_{146}O_{17}P_2$		19.2	[M+H]+	1430.0108	$[M-H]^-$	1427.9963	previous work
CL 70:3	$C_{79}H_{148}O_{17}P_2$		19.6	[M+H]+	1432.0265	$[M-H]^-$	1430.0119	previous work

Supplementary Information S3

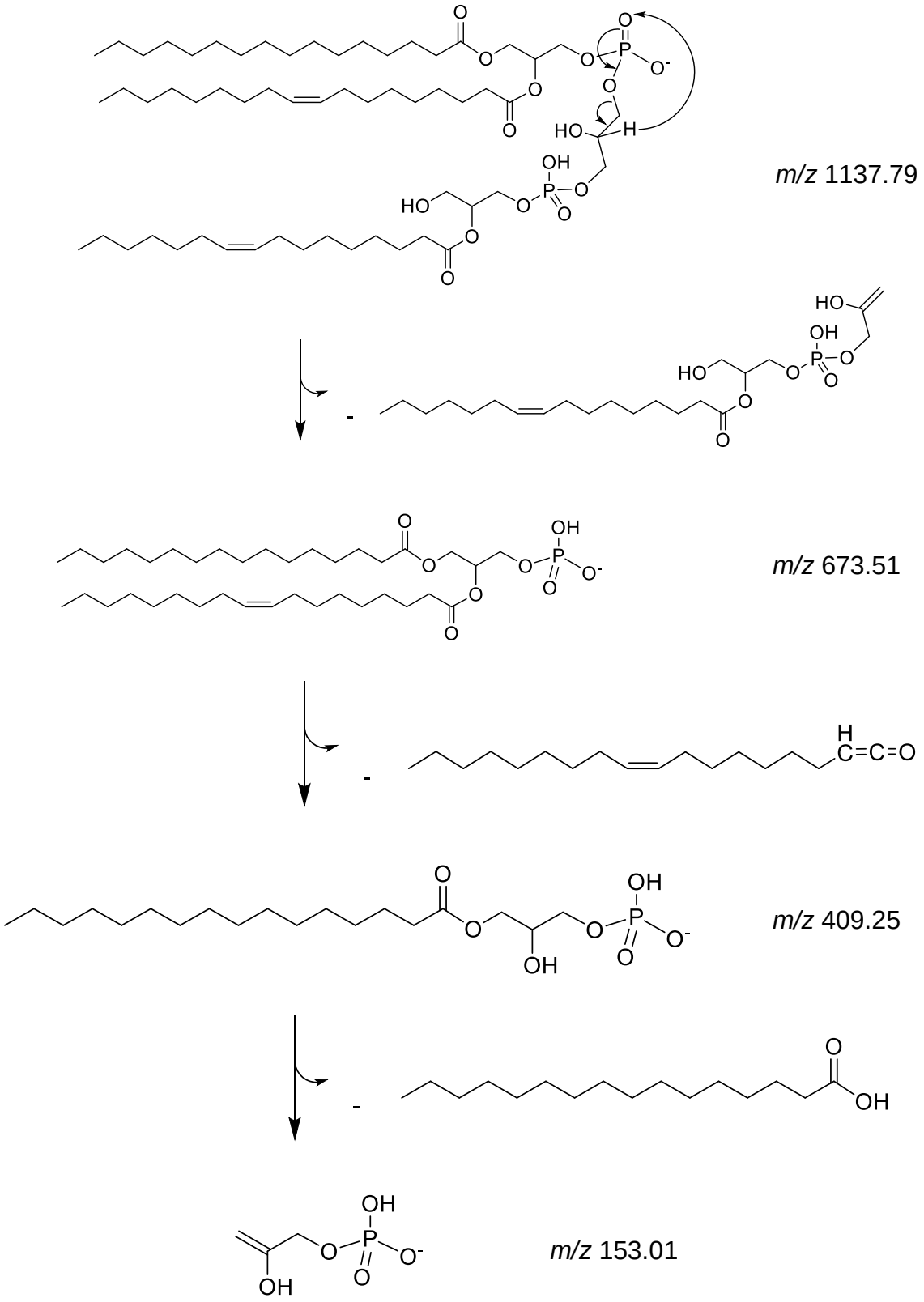


Figure S3: Proposed fragmentation pattern for $[M-H]^-$ ion of one of the possible isomer for LCL 50:2 (*m/z* 1137.79)

IV.3 CONCLUSION

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons travaillé sur cinq isolats de *P. aeruginosa*, trois isolés en 2008 et deux en 2018, prélevés sur un patient atteint de la mucoviscidose et d'une infection pulmonaire chronique

Initialement, malgré leurs différences phénotypiques, nous avons considéré les 3 isolats de 2008 comme des « réplicats » de 2008, et de même pour les 2 isolats de 2018 (par analogie avec les études métabolomique « patients sains » *vs* « patients malades »). La première étude des lipides de ces isolats de *P. aeruginosa* a été construite sur cette base.

Après la réalisation de courbes de croissance et l'étude des phénotypes, une étude des lipides des isolats cliniques et de la souche PAK a été réalisée par approche non-ciblée (en employant une approche de type métabolomique). Pour cela, les cinq isolats et la souche PAK ont été cultivés en triplicata dans le milieu SCFM, puis leurs lipides ont été extraits. Après acquisition par LC-MS, les variables *m/z*-t_R ont été détectées automatiquement, puis traitées par des outils statistiques. Par utilisation d'un outil non-supervisé (PCA), nous avons pu observer qu'il n'y avait pas de différence significative selon l'année d'isolement (c'est-à-dire, selon 2008 ou 2018).

Cette étude n'a donc pas permis de déterminer de lipides caractéristiques de chaque isolat, car la base de l'étude avait été mal définie et, de fait, le nombre de réplicats était bien trop faible par rapport au nombre de conditions à comparer (5 isolats et PAK, soit 6). Cependant, elle a permis de prendre en main les outils d'analyse, ainsi que de sélectionner un isolat de 2008 (PA08B) et un autre de 2018 (PA18B).

Une seconde étude lipidomique sur les isolats cliniques PA08B et PA18B a été effectuée cette fois-ci dans le milieu SCFM-PC qui s'est avéré plus adapté que le milieu SCFM pour les études lipidomiques. De ce fait, PA08B, PA18B et la souche PAK ont été cultivées dans le milieu SCFM-PC. Nous avons vu précédemment, que le nombre de réplicats devait être augmenté afin d'obtenir des résultats cohérents, celui-ci a donc été augmenté à 10 (5 réplicats de culture et 2 réplicats d'extraction par réplicat de culture).

Le but de cette étude était de déterminer les lipides produits par les isolats mais non produits par PAK, par une approche non-ciblée, puis d'effectuer une semi-quantification, par approche ciblée, de la totalité des lipides identifiés (lors de ces travaux et des précédents du chapitre II). Comme pour la première étude, l'acquisition des données a été effectuée par LC-MS (à la fois en modes positif et négatif) et le traitement des données méthodologie métabolomique. Ensuite, des expériences MS/MS ont permis de déterminer la structure de lipides non identifiés précédemment. Enfin, une semi-quantification sur tous les lipides identifiés a permis de relever les lipides davantage produits par PA08B, PA18B ou PAK.

L'analyse non-ciblée a permis de souligner la présence de deux classes de phospholipides non décrites jusqu'ici chez *P. aeruginosa* cultivée en conditions classiques, ou mimant l'environnement de son hôte. En vérifiant manuellement les données de PAK (dans les milieux MHB, SCFM et SCFM-PC), nous avons observé que quelques lipides de ces deux classes étaient produits. Cependant, puisqu'ils l'avaient été à l'état de trace, nous ne les avions pas identifiés manuellement. Bien que le traitement des données par analyse non-ciblée ne permette pas une bonne détection des cardiolipines, du fait de son approche sans *a priori*, un recul peut être pris sur les données. Le traitement des données d'une analyse non-ciblée (par analyses statistiques) n'est donc pas contraire à un traitement des données manuel, mais est plutôt complémentaire.

L'identification et la détermination des structures chimiques des lipides de ces deux classes par MS/MS, a permis de montrer que ces deux classes étaient les acylphosphatidylglycérols (acylPG 18:1/16:0/16:0 (*m/z* 985,7479), acylPG 16:0/16:1/16:0 et 14:0/18:1/16:0 (*m/z* 957,7165), acylPG 16:0/16:0/16:0 (*m/z* 959,7322), acylPG 16:0/16:1/18:1 (*m/z* 983,7322), acylPG 18:1/16:0/18:1 (*m/z* 1011,7635), acylPG 18:1_16:1_18:1 (*m/z* 1009,7478)) et lysocardiolipines (LCL 16:1_16:1_16:0_0:0 (*m/z* 1109,7040), LCL 16:1_16:0_16:0_0:0 (*m/z* 1111,7196), LCL 16:0_18:1_16:1_0:0 (*m/z* 1137,7353), LCL 16:1_18:1_16:1_0:0 (*m/z* 1135,7196)).

La semi-quantification, par approche ciblée, a permis de mettre en évidence une répartition différente des phospholipides selon la souche ou l'isolat clinique.

En comparaison avec les lipides membranaires de PAK, PA08 contenait plus de phospholipides avec des petites chaînes acides gras saturées (ex PE 31:0, PG 30:0, CL 64:1) et PA18 contenait plus de LPC 18:1_0:0, mais globalement moins de phospholipides. Par rapport aux deux isolats, PAK contenait plus de PC et phospholipides avec les chaînes acides gras les plus longues (ex : PE 34:1, PG 36:2, CL 70:4).

Ces résultats ont montré qu'il était possible d'observer de différences lipidiques flagrantes entre des isolats de *P. aeruginosa*. Ces différences ont été observées malgré une étape de culture en laboratoire, de ce fait une partie du métabolisme (par rapport à la vie dans le milieu originel) est conservé malgré tout.

En dernière note, ces travaux constituent une première étape avant une étude clinique des lipides extraits d'isolats de *P. aeruginosa*. Cependant, plusieurs étapes pourraient être encore améliorées afin de réduire le temps de préparation de l'échantillon biologique.

Bien qu'elle ait été adaptée au mieux possible, la préparation du milieu SCFM-PC est particulièrement fastidieuse et prend beaucoup de temps. Durant cette thèse, chaque culture a été cultivée dans un volume de 330 mL afin d'obtenir un duplicata d'extraction et plusieurs aliquots d'extraits lipidiques, car chaque échantillon a été analysé plusieurs fois. Dans le cadre d'une étude clinique à large cohorte, à condition de vérifier que la quantité d'extraits lipidiques obtenue soit suffisante pour une analyse sensible, le volume de culture pourrait être diminué (80 mL de culture dans un erlen de 250 mL par exemple, ou peut-être moins). Cela permettrait de réduire la quantité de milieu SCFM-PC à préparer et de lancer davantage de cultures simultanément. Afin de gagner en praticité, la congélation d'aliquots de milieu, pourrait également être envisagée.

La méthodologie analytique, avec les précautions et paramètres instrumentaux, pourra être utilisée à condition d'adapter les différents paramètres selon l'instrumentation utilisée. En effet, les paramètres de source, et d'énergie de collision pour la MS/MS, ont été adaptés pour les échantillons lipidique selon le spectromètre de masse que nous avons utilisé (Synapt G2). Le gradient chromatographique a aussi été adapté selon la colonne utilisée (CSH C18). Pour la semi-quantification par MRM, les paramètres de source et d'énergies de collision ont été adaptés pour le triple quadripôle utilisé (Xevo TQs).

De même manière, les nombreux paramètres de *preprocess* du W4M ont été adapté pour nos conditions analytiques précises (système chromatographique, spectromètre de masse), donc ceux-ci ne fonctionneront pas idéalement dans le cas d'une étude avec d'autres instruments.

Enfin, il est toujours difficile d'identifier les lipides bactériens, notamment parce que les bases de données ont été créées essentiellement à partir du lipidome de cellules eucaryotes. Un travail sur l'identification automatique permettrait un gain de temps et l'obtention de meilleures attributions.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de mettre au point une méthodologie, par analyse non-ciblée, permettant l'étude du lipidome de souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de la mucoviscidose et d'une infection pulmonaire chronique.

Cette thèse est divisée en deux grandes parties.

Durant la première partie de la thèse, le développement de méthodologies analytiques et biologiques a été réalisé sur la souche de laboratoire *P. aeruginosa* PAK, utilisée comme référence pour l'étude des isolats cliniques.

Dans un premier temps, le lipidome de *P. aeruginosa* PAK, cultivée dans le milieu commercial MHB, a été déterminé par analyse LC-MS/MS. Nous avons identifié 8 PG, 13 PE, 7 PC et 13 CL. Ensuite, les $^{TW}CCS_{N2}$ des ions $[M+H]^+$ et/ou $[M-H]^-$ de ces lipides ont été mesurées par couplage LC-IMS-MS. Pour cela, nous avons développé une méthodologie, basée sur une correction des $^{TW}CCS_{N2}$ après étalonnage, afin de déterminer les $^{TW}CCS_{N2}$ des CL, car il n'y avait pas d'étalons CCS pour cette classe de lipides. Nous avons décrit 18 nouvelles valeurs expérimentales de $^{TW}CCS_{N2}$ pour les CL, dont les valeurs de CCS étaient absentes dans la littérature tant pour les molécules protonées que déprotonées. Ces valeurs de CCS sont complémentaires des descripteurs *m/z*, t_R et spectres MS/MS pour aider à l'identification des lipides. Ce travail a été le sujet d'un premier article, publié dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* sous la référence :

Deschamps, E., *et al.* Determination of the collision cross sections of cardiolipins and phospholipids from *Pseudomonas aeruginosa* by traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry using a novel correction strategy. *Anal Bioanal Chem* 411, 8123–8131 (2019).

Dans un second temps, nous avons travaillé sur la mise au point de la composition du milieu de culture afin de reproduire au mieux la composition chimique du mucus pulmonaire d'un patient atteint de la mucoviscidose. De plus, ce milieu devait aussi permettre l'obtention d'une quantité de matière suffisante pour l'extraction et la détection des lipides membranaires.

Nous avons étudié les lipides de PAK cultivée dans le milieu SCFM et observé une production de PC bien plus faible dans le milieu SCFM que dans le milieu MHB. Or, puisque les PC sont décrites comme étant présentes dans le mucus pulmonaire, nous avons développé une version modifiée du SCFM par l'ajout d'une PC : le milieu SCFM-PC. Constatant une influence significative du milieu de culture sur la composition en phospholipides des membranes bactériennes, nous nous sommes alors interrogés sur l'influence des milieux de culture sur la modification de la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* et son lien éventuel avec la modification de la composition lipidique membranaire. Cette étude est décrite dans un second article, publié dans le journal *Biochemica et Biophysica Acta*, sous la référence :

Deschamps, E., et al. (2020). "Membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a cystic fibrosis mucus-mimicking medium." Biochimica et biophysica acta. Biomembranes 1863(1): 183482.

Durant la seconde partie de la thèse, nous avons étudié les lipides d'une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un patient atteint de la mucoviscidose et d'une infection pulmonaire chronique. Cette souche a été isolée deux fois à 10 ans d'intervalle, en 2008, présentant 3 phénotypes distincts, et en 2018, présentant deux phénotypes distincts. Ces extraits ont été analysés en utilisant une approche lipidomique non-ciblée par LC-MS, d'une part et une approche ciblée par LCMS/MS en mode MRM, d'autre part.

Dans un premier temps, une étude non ciblée a été réalisée sur les cinq isolats cliniques et PAK, cultivés dans le milieu SCFM. Cette étude n'a pas permis de déterminer les éventuels lipides caractéristiques des isolats ou des souches, car elle avait été initialement mal définie et le nombre de réplicats n'était pas suffisant.

Toutefois, sur la base de ces résultats, nous avons été amenés à sélectionner un isolat par année (PA08B et PA18B), afin de réaliser une seconde étude mieux construite et de prendre le temps d'effectuer une analyse détaillée et robuste des lipides (structurale et quantitative).

Dans un second temps, une étude lipidomique sur les isolats PA08B et PA18B, cultivés dans le milieu SFCM-PC —plus adapté à l'analyse lipidomique, a été réalisée. Une analyse non-ciblée, par approche lipidomique, a permis de mettre en évidence la présence de deux classes de phospholipides non identifiées dans les travaux précédents car à l'état de traces chez PAK : les acylphosphatidylglycérols (acylPG) et lysocardiolipines (LCL). En tout, 14 nouveaux phospholipides (2 PE, 2 PG, 6 acylPG et 4 LCL) ont été identifiés. Ensuite, une semi-quantification, par approche ciblée, a montré une répartition différente des phospholipides selon la souche ou l'isolat clinique. En comparaison avec les lipides membranaires de PAK, PA08 contenait plus de phospholipides avec des petites chaînes d'acides gras saturées et PA18 contenait plus de LPC 18:1_0:0, mais globalement moins de phospholipides. Ce travail est le sujet d'une troisième publication, en cours de soumission à l'édition spéciale « Bioactive lipids and lipidomics 2020 » du journal *International Journal of Molecular Science* :

« UHPLC-MS(/MS) investigation of the membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the lungs of a cystic fibrosis patient with a bronchial infection. »

****

Avoir un point de vue global des modifications du lipidome de *P. aeruginosa,* selon l'évolution de la bactérie lors d'une infection chronique, apporterait une aide conséquente pour le développement d'antibiotiques adaptés à la sévérité de l'infection. Pour cela, une étude sur un large panel de patients serait nécessaire afin de déterminer i) l'influence de l'hôte et ii) l'influence de l'évolution de la maladie, sur le lipidome de *P. aeruginosa*.

Pour réaliser cette étude, le milieu SCFM-PC est un bon compromis pour mimer le mucus pulmonaire de patients atteints de la mucoviscidose et permettre l'extraction des lipides. Cependant, les méthodologies présentées dans ce manuscrit doivent être modifiées pour réduire le temps de préparation des extraits lipidiques. La réduction du volume de culture, et l'adaptation conséquente du protocole de préparation de l'échantillon, permettrait de réduire le temps de préparation du milieu SCFM-PC et la préparation simultanée d'un plus grand nombre d'échantillons.

Nous recommandons d'effectuer une étude non-ciblée, pour la découverte de nouveaux lipides, suivie d'une étude ciblée par semi-quantification, afin de déterminer les variations quantitatives de tous les lipides (notamment pour les CL). De plus, le développement des bases de données de lipidomique étant en plein essor, des identifications automatiques adaptées aux lipides bactériens (à partir de bases de données de lipides bactériens et non eucaryotes) devraient être bientôt développées. Elles permettraient de gagner un temps considérable pour l'analyse des données.

La méthodologie analytique développée, incluant les précautions et paramètres instrumentaux, pourra être utilisée à condition d'adapter les différents paramètres à l'instrumentation utilisée, c'est-à-dire : gradient de chromatographie liquide dans le cas de l'utilisation d'une colonne différente, paramètres d'ionisation et de fragmentation du spectromètre de masse ainsi que les paramètres de création de la matrice de données (étapes de détection des pics, alignement, correction et filtration des données, normalisation).

L'ajout de la mobilité ionique au couplage LC-MS permettrait d'ajouter une troisième séparation de dimension et une aide à l'identification par les CCS en complément du *m/z*, du t_R et des spectres MS/MS.

Cette technique peut permettre la séparation d'isomères, notamment les isomères cis/trans ou de position de la double-liaison, mais pour cela un pouvoir de résolution supérieur à 200 doit être utilisé (résolution du TWIMS ≈ 40) [1]. Certaines cellules de mobilité ionique commerciales récentes permettent d'atteindre et de dépasser cette limite : la cellule *Trapped Ion Mobility Spectrometry* (TIMS, de Brucker [2]) et la cellule *cyclic Ion Mobility Spectrometry* (cIMS, de Waters [3]).

Le couplage LC-IMS-MS n'est pas encore beaucoup utilisé pour les études de type métabolomique/lipidomique non-ciblée, car le traitement de ces données n'est pas encore assuré par les plateformes telles que le W4M. Ces données peuvent être traitées par le logiciel gratuit Skyline [4], ou le logiciel commercial Progenesis QI (Waters).

A ce propos, pour la seconde analyse lipidomique, sur PAK, PA08B et PA18B cultivées dans le milieu SCFM-PC, les échantillons ont aussi été analysés par couplage LC-IMS-MS, à la fois en mode positif et négatif. Cependant, elles ne pouvaient pas être traitées par le logiciel Skyline,

car la conversion des données en mzXML est réalisée par le logiciel Proteowizard, lequel ne peut pas traiter les données IMS-MS acquises avec la correction *lockmass*. Le logiciel Progenesis QI n'a pu être testé que lors la fin de thèse. Nous avons alors remarqué que ce logiciel ne permettait pas de réaliser le même traitement des données de *preprocess* et normalisation que celui utilisé avec le W4M (en particulier, il n'est pas possible de réaliser une correction de la déviation analytique, puis de faire une normalisation des données). De ce fait, nous ne pouvions pas comparer le traitement des données des acquisitions LC-IMS-MS avec celui des acquisitions LC-MS, à moins de refaire celui des données LC-MS avec Progenesis QI. Manquant de temps, nous avons décidé de nous focaliser sur les données LC-MS.

Un travail de recherche complémentaire est encore nécessaire afin de pouvoir utiliser les données LC-IMS-MS pour des analyses de métabolomique/lipidomique non-ciblées. En plus des contraintes précédemment énoncées, les problématiques d'étalonnage en CCS, abordées dans cette thèse, sont cruciales pour assurer une réelle utilisation des CCS en annotation, en particulier pour des études avec des technologies de mobilité ionique différentes. Ce développement est le sujet d'une thèse commencée en Octobre 2020 au sein du laboratoire COBRA.

Lors de cette thèse, nous avons utilisé une seule colonne chromatographique C18 CSH. D'autres types de colonnes pourrait être envisagés afin d'obtenir des séparations différentes (autres greffages) ou une meilleure semi-quantification avec la HILIC.

L'utilisation d'autres techniques séparatives, comme le couplage de la chromatographie en phase fluide supercritique (SFC) avec la spectrométrie de masse pourrait permettre la séparation des isomères.

Par ailleurs, le couplage GC-MS (pour les acides gras après hydrolyse des lipides), pourrait apporter de nouvelles informations structurales sur les acides gras constitutifs.

Enfin, dans un futur plus lointain car cela demandera plusieurs collaborations entre laboratoires, il serait intéressant de réaliser l'étude de la membrane complète d'isolats cliniques de *P. aeruginosa*.

En prenant en compte à la fois les lipides et les protéines membranaires, elle permettrait d'obtenir une vue d'ensemble sur les modifications de la membrane de *P. aeruginosa* liée à l'évolution de la bactérie et notamment les modifications de sa fluidité. S'il est possible de relier ces données au phénotype/génotype de l'isolat, nous pourrions envisager qu'à partir de prélèvements de *P. aeruginosa*, un traitement adapté à l'infection pourrait être administré au patient.

RÉFÉRENCES CONCLUSION

1. Groessl M, Graf S, Knochenmuss R (2015) High resolution ion mobility-mass spectrometry for separation and identification of isomeric lipids. Analyst 140. doi:10.1039/x0xx00000x

2. Hernandez DR, Debord JD, Ridgeway ME, Kaplan DA, Park MA, Fernandez-Lima F (2014) Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer. The Analyst 139 (8):1913-1921. doi:10.1039/c3an02174b

3. Giles K, Ujma J, Wildgoose J, Pringle S, Richardson K, Langridge D, Green M (2019) A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. Anal Chem 91 (13):8564-8573. doi:10.1021/acs.analchem.9b01838

4. MacLean BX, Pratt BS, Egertson JD, MacCoss MJ, Smith RD, Baker ES (2018) Using Skyline to Analyze Data-Containing Liquid Chromatography, Ion Mobility Spectrometry, and Mass Spectrometry Dimensions. J Am Soc Mass Spectrom 29 (11):2182-2188. doi:10.1007/s13361-018-2028-5

ANNEXES

ANNEXE 1

VERIFICATION DU LIEN PHYLOGENETIQUE ENTRE LES ISOLATS CLINIQUES

Les tests du lien phylogénétique entre les isolats cliniques de *P. aeruginosa* ont été réalisé au sein du Service de Bactériologie, AP-HP.Centre – Université de Paris, site Cochin.

La clonalité des isolats *P. aeruginosa* a été déterminée en utilisant à la fois le consensus intergénique répétitif entérobactérien (ERIC)-PCR (oligo nucléotide ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGGTGAGCG- 3') et la méthode de l'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD) (oligonucléotides B1/amorce2 5'-GTTTCGCTCC-3' ou RAPD2/1290 5'-GTGGATGCGA-3') (réf. AKOPYANZ-1992, CHANSIRIPORNCHAI-2000, VERSALOVIC-1991).

L'ADN amplifié a été visualisé par coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et les motifs ont été comparés visuellement. Des motifs identiques ont été observés pour les cinq isolats, tandis que des motifs différents (deux bandes) ont été obtenus pour des isolats cliniques de *P. aeruginosa* non apparentés, montrant ainsi la parenté génétique entre les cinq isolats (**Figure 1**).

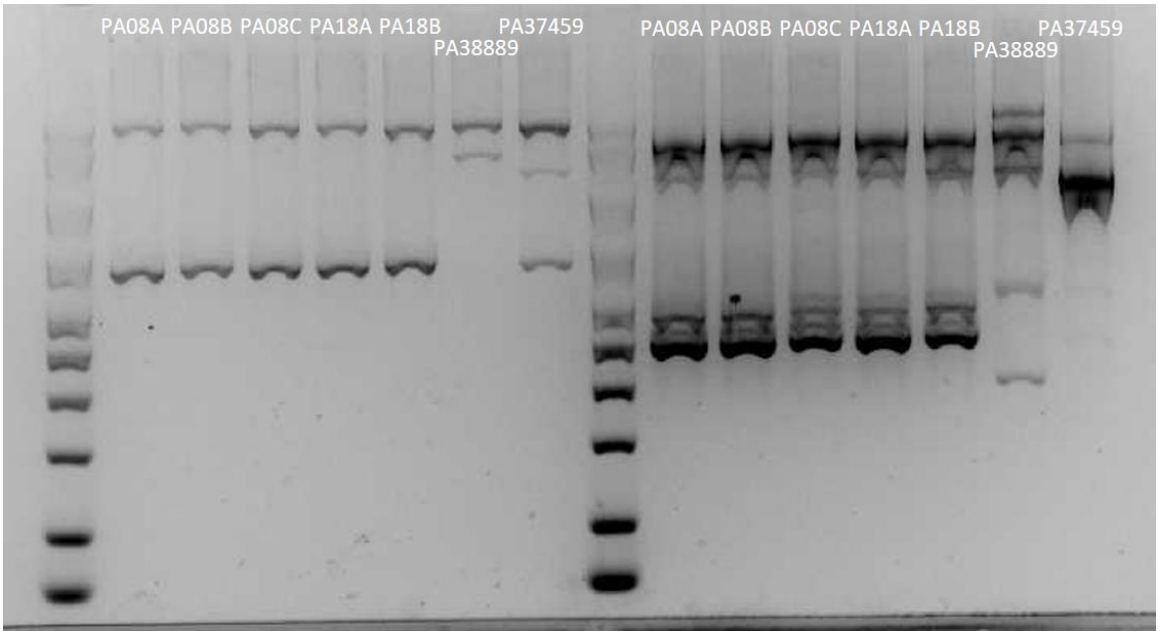


Figure 1 Gels d'électrophorèse de l'ADN amplifié par le test RAPD pour les cinq isolats (PA08A/B/C, PA18A/B) et deux souches de *P. aeruginosa* (PA38889 et PA37459) non liées.

ANNEXE 2

DETERMINATION DES CMI DE PLUSIEURS ANTIBIOTIQUES POUR LES 5 ISOLATS DANS LES MILIEUX MHB, SCFM ET SCFM-PC

L'activité antibactérienne de cinq antibiotiques a été estimée par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), pour les isolats cliniques de *P.aeruginosa* et la souche PAK, dans les milieux de culture MHB, SCFM et SCFM-PC (**Tableau 1**). Ces antibiotiques (carbénicilline, gentamicine, ciprofloxacine, colistine, doxycycline) sont fréquemment utilisés pour soigner les infections à *P. aeruginosa* et appartiennent chacun à une famille différente.

Les valeurs de CMI inférieures (sensibilité de *P. aeruginosa* pour l'antibiotique étudié) ou supérieures (résistance à l'antibiotique) au seuil défini par la norme Eucast SFM 2019 sont indiquées, respectivement, en italique ou en gras. Ces résultats sont issus du travail du Dr. Annick Schaumann.

Une précaution est à prendre pour la lecture de ce tableau : une différence de CMI d'un facteur 2 ne peut pas être considérée comme significative, puisque l'erreur expérimentale est elle-même d'une dilution par 2 (pour le protocole, voir la partie 2.4 de la seconde publication).

D'un point de vue global, nous pouvons observer que le milieu de culture a une influence sur les CMI des antibiotiques pour tous les isolats et PAK. En effet, les CMI déterminées dans le milieu SCFM-PC sont généralement plus élevées que dans les milieux MHB et SCFM. Cette observation est primordiale puisque les protocoles officiels de détermination des CMI préconisent l'utilisation du milieu MHB ou d'autres milieux commerciaux.

Nous pouvons aussi observer que les CMI sont généralement plus élevées pour les isolats cliniques que pour PAK, sauf dans le cas de la colistine. Ce résultat était prévisible puisque les isolats proviennent d'un patient atteint de la mucoviscidose, donc très sensible aux infections bactériennes et ayant reçu des traitements antibiotiques tout au long de sa vie.

Cependant, nous constatons qu'il n'y a pas d'augmentation des CMI entre les isolats de 2008 et 2018 contrairement à ce que nous pouvions attendre.

En ce qui concerne la carbénicilline, le phénomène observé pour PAK décrit dans l'article 2 (CMI plus faible dans le milieu SCFM que dans le milieu MHB ou SCFM-PC) n'a pas été observé pour les isolats cliniques. Cela illustre l'importance de déterminer les CMI sur des isolats cliniques plutôt que sur des souches modèles de laboratoire.

Tableau 1 Valeurs des CMI en µg/mL de 5 antibiotiques pour les 5 isolats cliniques et PAK, cultivées dans le milieu MHB, SCFM et SCFM-PC.

Antibiotique (classe)	**Milieu**	**PA08A**	**PA08B**	**PA08C**	**PA18A**	**PA18B**	**PAK**
Carbénicilline (pénicillines)	MHB	128	32-64	128	128	128	64-128
	SCFM	≥ 128	256	128	64-128	128	16
	SCFM-PC	256	256	512	512	256	64-128
Gentamicine (aminoglycosides)	MHB	**8**	*0.5*	*0.5*	*1*	**4-8**	*0.5*
	SCFM	**32**	**4**	*2-4*	**8-16**	**≥16**	**4-8**
	SCFM-PC	**32**	**8**	**8**	**16**	**16**	**4-8**
Ciprofloxacine (fluoroquinolones)	MHB	**4**	*0.25*	**2**	**2**	**2**	*0.125*
	SCFM	**4-8**	**1**	**8**	**1-2**	**2-4**	*0.125*
	SCFM-PC	**4-8**	**2-4**	**8-16**	**2**	**2-4**	*0.25*
Colistine (polymixines)	MHB	*0.5*	*0.0625*	*0.25*	*0.03125*	*1-2*	*0.125-0.25*
	SCFM	**2-4**	*1-2*	*1-2*	*1*	**4**	*2-4*
	SCFM-PC	*1-2*	*1*	*1*	*1*	*1-2*	*2*
Doxycycline (cyclines)	MHB	64	8	32	2-64	32-64	16
	SCFM	64	16	32	16	32	16-32
	SCFM-PC	128-256	32	64-128	16	64	64

Selon les données Eucast SFM 2019, les valeurs pour lesquelles *P. aeruginosa* est résistante ou sensible à l'antibiotique testé sont écrites respectivement en gras ou en italique.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ASSOCIEES AUX TRAVAUX DE THESE

COMMUNICATIONS ORALES

- "Study of the bacterial membrane lipids of *Pseudomonas aeruginosa* by UHPLC-IMS-MS/MS", Rencontres du Club Jeune de Spectrométrie de Masse (RCJSM), Saint-Martin-de-Londres, 29 Mars 2018

- "Ion mobility coupled to liquid chromatography and mass spectrometry as a new tool for thecharacterization of the membrane lipids of *Pseudomonas aeruginosa*", Rencontres du Club Jeune de Spectrométrie de Masse (RCJSM), Quiberon, 22 Mars 2019

- "Analysis of the membrane phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa* by Ion Mobility Spectrometry associated to Liquid Chromatography – Mass Spectrometry", Journée de l'Ecole Doctorale Normandie de Chimie (JEDNC), Caen, 5 Juillet 2019

- "Liquid chromatography – mass spectrometry semi-quantification and tandem mass spectrometry as tools for bacterial lipidomics development", Journées scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), congrès en ligne, 26 Juin 2020

POSTERS

- "Study of the bacterial membrane lipids of Pseudomonas aeruginosa by UHPLC-IMSMS/MS", Journée de l'Ecole Doctorale Normandie de Chimie (JEDNC) Le Havre, 21 Juin 2018, poster

- "Ion Mobility Spectrometry associated to Liquid Chromatography – Mass Spectrometry applied to lipidomics workflow: Application to the membrane phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*", congrès du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique (RFMF) Clermont-Ferrand, 21/23 Mai 2019

- "Ion mobility coupled to liquid chromatography and mass spectrometry as a new tool for the characterization of the membrane lipids of Pseudomonas aeruginosa", congrès de la American Society of Mass Spectrometry (ASMS) Atlanta (Etats-Unis), 6 Juin 2019

- "Membrane lipidome of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with chronic lung infections", journée de l'Institut Normand de Chimie Moléculaire, Médicinale et Macromoléculaire (INC3M) Mont-Saint-Aignan, 24 Juin 2019

- "Membrane lipids of Pseudomonas aeruginosa change depending on the growth medium: a bacterial response to its environment", congrès du Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique (GERLI) Compiègne, 30 Septembre/02 Octobre 2019

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie très pathogène pour les patients atteints de la mucoviscidose. De plus, certaines souches sont multi-résistante aux antibiotiques. Peu d'antibiotiques actuels ciblent ses lipides membranaires, alors qu'il s'agit d'une barrière de protection très efficace pour *P. aeruginosa*. L'objectif de cette thèse est de mettre au point une méthodologie permettant l'analyse du lipidome de souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteint de la mucoviscidose. Dans un premier temps, les méthodes d'analyse ont été développées et appliquées sur la souche de laboratoire *P. aeruginosa* PAK, nous permettant i) d'établir le lipidome de référence par LC-MS, ii) de déterminer les sections efficaces de collision (descripteurs physiques) des lipides de PAK par spectrométrie de mobilité ionique et iii) de mettre au point un milieu de culture (SCFM-PC) mimant le mucus pulmonaire et compatible avec l'extraction des lipides. Dans un second temps, nous avons travaillé sur 5 isolats d'une souche de *P. aeruginosa* prélevés sur un patient atteint de la mucoviscidose et souffrant d'une infection pulmonaire chronique (3 isolats en 2008 et 2 en 2018). Une première étude LC-MS non-ciblée n'a pas permis de déterminer les lipides discriminants de chaque isolat, mais a permis de sélectionner deux isolats différentiés pour 2008 et 2018, respectivement. Une seconde étude par analyse LC-MS non-ciblée, sur ces deux isolats, a permis de souligner la présence de deux classes de phospholipides non identifiées chez PAK et de mettre en évidence, par semi-quantification, une répartition différente des phospholipides selon l'isolat clinique. Ces méthodologies et résultats constituent une première étape pour une étude clinique sur une large cohorte de patients.

Mots clefs : *Pseudomonas aeruginosa*, lipidomique, phospholipides, mucoviscidose, LC-MS, IMS, analyse non-ciblée, semi-quantification

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a highly pathogenic bacterium for cystic fibrosis (CF) patients. Moreover, several strains are multidrug resistant. Currently, few antibiotics target its membrane lipids, although it is a very effective protective barrier for *P. aeruginosa*. The objective of this thesis is to develop a methodology for the lipid analysis of *P. aeruginosa* strains isolated from patients with chronic lung infections. In a first step, the analytical methods were developed and applied to the laboratory strain *P. aeruginosa* PAK, allowing us to i) establish the reference lipidome by LC-MS, ii) determine the collision cross sections (physical descriptors) of PAK lipids by ion mobility spectrometry and iii) develop a culture medium (SCFM-PC) mimicking pulmonary mucus and compatible with lipid extraction. In a second step, we worked on 5 isolates of a *P. aeruginosa* strain isolated from a CF patient suffering from a chronic pulmonary infection (3 isolates in 2008 and 2 in 2018). A first study by non-targeted LC-MS analysis did not allow the determination of the characteristic lipids of each isolate. A second study by non-targeted LC-MS analysis, on two isolates, highlighted the presence of two classes of phospholipids not previously identified and highlighted, by semi-quantification, a different distribution of phospholipids according to the clinical isolate. These methodologies and results constitute a first step for a clinical study on a large cohort of patients.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, lipidomics, phospholipids, cystic fibrosis, LC-MS, IMS, non-targeted analysis, semi-quantification