



### Programme 1ères JS Numériques



<https://13-is-rfmf-2020.sciencesconf.org/>

jeudi 25 juin 2020	Vendredi 26 Juin 2020
<p><b>Lien pour la session 13h30-15h30</b> <a href="https://global.gotomeeting.com/join/31887725">https://global.gotomeeting.com/join/31887725</a></p> <p>13h30 <b>Floriant Bellvert</b> Introduction du Président du RFMF</p> <p>13h45 <b>Julia Soullier</b> Optimization of robotic lipidic extraction</p> <p>14h00 <b>Hikmat Ghosson</b> In-depth assessment of exhaustive extraction protocols for pesticide-polluted soil meta-metabolomics by LC-HRMS-based untargeted metabolic profiling</p> <p>14h15 <b>Téo Hebra</b> Atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry for the exploration of specialized metabolism</p> <p>14h30 <b>Arnab Dey</b> Hyperpolarized NMR metabolomics at natural <sup>13</sup>C abundance</p> <p>14h45 <b>Katy Dinis</b> Assessment of apple juice authenticity using untargeted UHPLC-HRMS and chemometrics</p> <p>15h00 <b>Oriane Moyné (Prix de Thèse du RFMF 2020)</b> Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose</p> <p>15h30 <b>AG RFMF Junior</b> <a href="https://global.gotomeeting.com/join/663229661">https://global.gotomeeting.com/join/663229661</a></p> <p>17h00</p>	<p><b>Lien pour la session 13h45-15h30</b> <a href="https://global.gotomeeting.com/join/478361621">https://global.gotomeeting.com/join/478361621</a></p> <p>13h45 <b>Nathan Carriot</b> Impact de la carence en phosphates sur la production métabolique d'une bactérie marine cultivée en biofilm</p> <p>14h00 <b>Estelle Deshamps</b> Liquid chromatography - mass spectrometry semi-quantification and tandem mass spectrometry as tools for bacterial lipidomics development</p> <p>14h15 <b>Robin Gauff</b> Diversité et fonctionnement des ports de plaisance - une variabilité multi-échelle, de la communauté au métabolome</p> <p>14h30</p> <p><b>Dr. RuAngelie Edrada-Ebel</b> Conférence Pleinière</p> <p>15h30 <b>AG RFMF</b> <a href="https://global.gotomeeting.com/join/135171997">https://global.gotomeeting.com/join/135171997</a></p> <p>17h00</p>

[Retrouvez ici l'ensemble des résumés des présentations](#)

Liens de connexion 1<sup>ères</sup> JS RFMF Jeudi 25 Juin 2020 :

Session Présentations : 13h30 - 15h30 : <https://global.gotomeeting.com/join/31887725>

Session AG RFMF junior : <https://global.gotomeeting.com/join/663229661>

Liens de connexion 1<sup>ères</sup> JS RFMF Vendredi 26 Juin 2020 :

Session Présentations : <https://global.gotomeeting.com/join/478361621>

Session AG RFMF: <https://global.gotomeeting.com/join/135171997>

## JEUDI 25 13H45 : OPTIMIZATION OF ROBOTIC LIPIDIC EXTRACTION

**Julia SOULLIER**, Aurélie BATUT, Anthony TOURNADRE, Jessica DALLOUX-CHIOCCIOLI, Pauline LE FAOUDER, Justine BERTRAND-MICHEL

*MetaboHUB-MetaToul Lipidomic Core Facility, I2MC, Inserm, Toulouse, France*

Lipids are ubiquitous biomolecules essential to life, found in every cellular type, ranging from the human body and vegetal organisms, down to bacteria. They have many different functions in cell structuration, energy storage and signalling so they are natural biomarkers for different diseases like cancer, cardiovascular, neurodegenerative or lung disease. Their identification and quantification are crucial especially on large clinical cohort. The bottleneck of lipidomic study is the sample preparation which can be long and tedious. Different methods of lipids extraction are described in the literature: such as liquid-liquid extraction (LLE) as Bligh and dyer (B&D) or Methyl-tert-butyl ether (MTBE), protein precipitation or solid phase extraction. They may be the source of many errors, considering the experimenter-dependant possible repeated artefacts. To circumvent these points, and increase the analytical service delivery, MetaboHUB-MetaToul facility decided to automate the sample preparation on a fluent 780 TECAN robot. Since several years, robots are used in pharmaceutical industries, anti-doping, etc. LLE as MTBE is a current robotic extraction, but B&D isn't automatized yet. This development represents different challenges due to the protocol complexity, the presence of organic solvents, and the scale of volume dispensed.

The presentation will show the optimizations done on the robot on three major points: water contamination, accuracy and repeatability of dispensed volume and recovery of extracted lipids. Two systems (with needle or removal tips) have been tried and tested on the robot in order to determine which one was the more appropriate for our uses. We will show the results obtained on mice liver and plasma samples for fatty acid, neutral lipid and phospholipid profiling by liquid or gaz chromatography coupled with mass spectrometry or flame ionization detector. The complete automated sample preparation will be compared to the manual one.

## JEUDI 25 14H00 : IN-DEPTH ASSESSMENT OF EXHAUSTIVE EXTRACTION PROTOCOLS FOR PESTICIDE-POLLUTED SOIL META-METABOLOMICS BY LC-HRMS-BASED UNTARGETED METABOLIC PROFILING

Hikmat Ghosson<sup>1,2</sup>, Yannick Brunato<sup>1,2</sup>, Delphine Raviglione<sup>1,2</sup>, Marie-Virginie Salvia<sup>1,2,3</sup>, Cédric Bertrand<sup>1,2,3,4</sup>

1: PSL Université Paris: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

2: UFR Sciences Exactes et Expérimentales, Université de Perpignan Via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

3: Laboratoire d'Excellence « CORAIL », Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

4: S.A.S. AkiNaO, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

Untargeted metabolomics is an analytical chemistry approach dedicated for the analysis of small biomolecules called “metabolites”. One of its strengths is the ability of covering wide ranges of metabolic information in biological systems. However, exhaustive coverage of information is challenging from a chemical-analytical point of view. In fact, the widely different physical-chemical properties of molecules (e.g. polarity, acidity/basicity) make the study of various types of metabolites complicated. It demands critical methodological optimizations. Nevertheless, for untargeted approaches, “optimal conditions” are also hard to be defined and judged.

The current work is focusing on the crucial step of meta-metabolome extraction. It seeks to develop an “exhaustive” extraction protocol able to extract different types of metabolites by covering a wide range of polarity. This is in the framework of developing the “Environmental Metabolic Footprinting” untargeted metabolomics-based approach<sup>[1,2]</sup>, aiming to assess the environmental fate and impact of complex (bio)pesticides application on soil. Indeed, optimizing a method able to analyze diverse kind of metabolites can assure a wide range of information needed to assess the fate of the pesticide (xenometabolites) and its impact on soil's biodiversity (endometabolites).

In this objective, 5 extraction protocols based on solvents and mixtures with different polarities were developed and applied on 2 different types of soils, with 3 different environmental conditions (control, spiked with a synthetic pesticide, spiked with a natural pesticide). So far, 150 samples were extracted and analyzed with a broadband LC-HRMS method that was set-up for the purpose. The collected data were then handled and analyzed with various types of multivariate statistical analyses that were optimized in order to assess the “optimal” protocol, based on 4 main criteria, respectively: 1) the ability to widen the band of the extracted metabolites (qualitative), 2) the higher extraction yield (quantitative), 3) the repeatability of the extraction, and 4) the reliability in discrimination between spiked and control groups (EMF objective).

The study showed that widening the polarity range for the extraction protocol, using miscible solvents with different properties was applicable and resulted for a significant ability in extracting a wide range of metabolites originating from both pesticide residues and soil endometabolome. It also showed comparable quantitative results and better repeatability comparing to other classical protocols. In addition, the study suggests multivariate analyses as suitable tool not only for data processing for biological studies, but also for developing analytical methods and protocols, as it can give holistic explanations about the large datasets acquired. Hence, in other words, untargeted metabolomics were used in order to improve the analytical method dedicated for an untargeted meta-metabolomics approach.

[1]: Patil et al. 2016. *Sci. Total Environ.* 566–567:552–558

[2]: Salvia et al. 2018. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 5(30):29841–9847

## JEUDI 25 14H15 : ATMOSPHERIC PRESSURE PHOTOIONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE EXPLORATION OF SPECIALIZED METABOLISM

**Téo Hebra**, Véronique Eparvier and David Touboul

*Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France.*

In order to explore the specialized metabolism of a strain or species, the generation of molecular networks based on fragmentation homologies is increasingly employed. In order to construct them, reverse phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (RP-LC-ESI-MS2) is the most widely used analytical strategy. However, other ionization methods compatible with liquid chromatography, such as atmospheric pressure chemical ionization or atmospheric pressure photoionization (APPI), are available. Can these other ionization methods compete with ESI for the exploration and analysis of specialized metabolism?

In this study, we compare the standard analytical workflow using ESI or APPI. For that purpose, we analyzed ethyl acetate extracts from fungus and plants containing azaphilone and flavonoid derivatives, respectively. Then we processed the data and built a molecular network to compare the data associated to each ionization source. Due to the lack of reported analysis of specialized metabolites using APPI, we first optimized several parameters to obtain the best signal-to-noise ratio for several ions in our raw fungus extract. We established our experimental conditions as follows: acetone is used as dopant with a flow rate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , the temperature of the vaporizer is set at 300°C and the optimal capillary voltage is 2000 V. Finally, we acquired and processed data from raw extracts of fungi and plants, and compared ESI and APPI ionization on several aspects: data processing, number of ions, their intensity, signal-to-noise ratio, detection of less abundant ions, analysis and interpretation of the molecular network.

To conclude, ESI and APPI show good complementarity. For example, ESI is a more sensitive whereas APPI shows better signal-to-noise ratio and allows faster data processing and analysis due to the generation of only  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ion.

## JEUDI 25 14H30 : HYPERPOLARIZED NMR METABOLOMICS AT NATURAL <sup>13</sup>C ABUNDANCE

**Arnab Dey**<sup>[a]</sup>, Benoît Charrier<sup>[a]</sup>, Estelle Martineau<sup>[a,b]</sup>, Elodie Gandriau<sup>[a]</sup>, Catherine Deborde<sup>[c,d]</sup>, Annick Moing<sup>[c,d]</sup>, Daniel Jacob<sup>[c,d]</sup>, Dmitry Eshchenko<sup>[e1]</sup>, Marc Schnell<sup>[e1]</sup>, Roberto Melzi<sup>[e2]</sup>, James Kempf<sup>[e3]</sup>, Dennis Kurzbach<sup>[f]</sup>, Morgan Ceillier<sup>[g]</sup>, Quentin Chappuis<sup>[g]</sup>, Samuel Cousin<sup>[g]</sup>, Sami Jannin<sup>[g]</sup>, Jean-Nicolas Dumez<sup>[a]</sup>, Patrick Giraudeau<sup>[a]</sup>

[a] Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, F-44000 Nantes, France [b] SpectroMaitrise, CAPACITES SAS, Nantes, France [c] UMR Biologie du Fruit et Pathologie, INRAE, Univ. Bordeaux, Centre INRAE de Nouvelle Aquitaine-Bordeaux, 33140 Villenave d'Ornon, France [d] Bordeaux Metabolome, INRAE, 2018, MetaboHUB, Centre INRAE de Nouvelle Aquitaine-Bordeaux, 33140 Villenave d'Ornon, France. doi: 10.15454/1.5572412770331912E12 [e] Bruker Biospin [1] Industriestrasse 26, 8117 Fällanden, Switzerland [2] Viale V. Lancetti 43, 20158 Milano, Italy, [3] 15 Fortune Dr., Billerica, MA 01821 USA [f] University of Vienna, Faculty of Chemistry, Institute of Biological Chemistry, Währinger Str. 38, 1090 Vienna, Austria [g] Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Centre de RMN à Très Hauts Champs (CRMN), FRE 2034, 69100 Villeurbanne, France.

Untargeted metabolomics is of particular importance since it brings crucial information on potential biomarkers without any a priori knowledge. NMR profiling plays a pivotal role in this field thanks to its high reproducibility and repeatability. However, for sensitivity reasons this application relies mostly on 1D <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, which is limited by the strong peak overlap characterizing complex biological mixtures. <sup>13</sup>C NMR offers a promising alternative due to its wide spectral range and high resolution compared to the relative crowding of <sup>1</sup>H spectra. However, the poor sensitivity of <sup>13</sup>C NMR, only 1.7×10<sup>-4</sup> that of <sup>1</sup>H due to low natural abundance and weaker magnetic interactions of <sup>13</sup>C, strongly limits its application in metabolomics. Hyperpolarization methods offer an appealing solution for sensitive <sup>13</sup>C NMR metabolomics, especially Dissolution Dynamic Nuclear Polarization<sup>1</sup> (d-DNP), a method that makes it possible to improve the sensitivity of solution-state NMR by factors up to 105. Preliminary d-DNP studies<sup>2</sup> showed the unique ability to detect <sup>13</sup>C signals on plant and cancer cell extracts in a single scan at natural abundance, results that are inaccessible by conventional state-of-the-art high field NMR. Later, similar d-DNP studies reported a repeatability better than 4% for <sup>13</sup>C signals on such biological extracts<sup>3</sup>, as suitable for analytical metabolomics. Here, for the first time, we introduce d-DNP into a complete workflow for untargeted metabolomics. This consists of sequential steps starting from biological extract preparation, d-DNP hyperpolarization, solution-state NMR acquisition, spectra processing to statistical analysis for discriminating metabolic marker identification. We have demonstrated the approach on a model plant system, two groups of tomato fruit extracts of the same variety at two stages of fruit development (mature-green and red-ripe)<sup>4</sup>. A principal component analysis (PCA) applied to hyperpolarized <sup>13</sup>C NMR spectral data resulted in very clear group separation and highlighted several biomarkers in full agreement with previously reported studies<sup>5</sup>. We also describe the optimization of experimental parameters of the underlying d-DNP method. This uses semi-automated systems, where most steps can be performed by a single operator within a time compatible with high-throughput studies. These results pave the way towards future <sup>13</sup>C -based “omics” studies for a variety of samples and diverse applications.

1. J.H. Ardenkjaer-Larsen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, 100 10158. 2. Dumez et al. *Analyst*, **2015**, 140, 5860. 3. Borner et al. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 6179–6183 4. Dey et al. manuscript in preparation 5. Lemaire-Chamley et al., *Metabolites*, **2019**, 9, 93. **Funding:** European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Grant Agreements n° 814747/SUMMIT, n° 801774/DINAMIX and n° 714519/HP4all); MetaboHUB project (ANR-11-INBS-0010), and the French National Research Agency (grant ANR-17-ERC2-0011).

## JEUDI 25 14H45 : ASSESSMENT OF APPLE JUICE AUTHENTICITY USING UNTARGETED UHPLC-HRMS AND CHEMOMETRICS

Katy DINIS<sup>1,2</sup>, Lucie TSAMBA<sup>1</sup>, Freddy THOMAS<sup>1</sup>, Eric JAMIN<sup>1</sup>, Valérie CAMEL<sup>2</sup>

*1 Eurofins Analytics France, 44323 Nantes, France - 2 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, 91300, Massy, France*

Food fraud is a worldwide increasing problem and food authenticity analyses are getting more and more importance. Fruit juice is one of the top ten products at risk of food fraud<sup>[1]</sup>. NMR and mass spectrometry are widely used in food authenticity assessment, particularly in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry<sup>[2-4]</sup>. Metabolomics based approaches appear to be a method of choice for food authenticity<sup>[5-7]</sup>.

**Material & Methods:** Apple juices from different processes were collected (both direct juices and concentrated juices). Samples were centrifuged during 10 min at 4500 rpm and the supernatant was diluted before analysis. Three replicates per samples were prepared. Sample vials were randomized in the analytical sequence. QC samples (pool of samples) and diluted QC samples were also prepared and analyzed every 10 injections. Analyses were performed on a ThermoFisher Vanquish Flex UHPLC system connected to a QExactive Plus mass spectrometer. The UHPLC separation was achieved using a C18 Hypersil Gold column (150 x 2.1 mm, 1.9 $\mu$ m) at a 0.3 ml/min flow. The mobile phases were water (A) and methanol (B), both acidified with 0.1% formic acid. The MS system was operated in positive ion mode with a mass range set at m/z 120-1000 in full scan mode with a resolution of 70,000. Raw data files were analyzed using Workflow4Metabolomics platform. After peaks extraction from the data files, some data filtration steps were used. Then, chemometrics analyses were realized for sample discrimination using Principal Component Analysis (PCA) and for sample classification using Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis (OPLS-DA) (22 samples were used in the calibration data set and 8 samples in the validation data set).

**Results:** The data normalization steps allow reducing the number of features detected by deleting features present in blank samples and features with a high variation coefficient. The use of diluted QC samples also helps to detect useless features in order to delete them. These steps are critical because it selects the features used for the chemometrics analysis. In fact, it is important to remove irrelevant peaks while avoiding or reducing discriminant peaks loss. A trend seems to appear for the discrimination between direct juices and concentrated juices using PCA. The OPLS-DA model allowed the discrimination between the juice processes. It also gives good prediction and classification results for the validation data set. During the chemometrics analysis, variables with statistically relevant differences between groups have been determined using calculated p-values and fold changes. Some of them were tentatively identified using online databases.

**Conclusion:** Untargeted UHPLC-HRMS coupled with chemometrics analyses is a promising method for food fraud detection. Tools will be developed to classify apple juices according to their geographical origin and to discriminate organic and conventional juice samples. Such promising results suggest the capability to detect anomalies (adulteration) with this analytic approach thanks to databases for authentic juices.

*[1] Moore J., Spink J. and Lipkus M., Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010, Journal of Food Science, 77, 118-126, 2012 [2] Medina S., Pereira J.A., Silva P., Perestrelo R. and Câmara J.S., Food fingerprints – a valuable tool to monitor food authenticity and safety, Food Chemistry, 278, 144-162, 2019 [3] Vaclavik L., Schreiber A., Lacina O. and Cajka T., Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices, Metabolomics, 8, 793-803, 2012 [4] Sobolev A. P., Thomas F., Donarski J., Ingallina C., Circi S., Marincola F. C., Capitani D. and Mannina L., Use of NMR applications to tackle future food fraud issues, Trends in Food Science & Technology, 91, 347-353, 2019 [5] Böhme K., Calo-Mata P., Barros-Velazquez J. and Ortea I., Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication, Trends in Analytical Chemistry, 110, 221-232, 2019 [6] Ellis D., Muhamadali H., Allen D.P., Elliot C.T. and Goodacre R., A flavour of omics approaches for the detection of food fraud, Current Opinion in Food Science, 10, 7-15, 2016 [7] Danesaki M.E. & Thomaidis N.S., Quality and authenticity control of fruit juices - A review. Molecules. 24, 1-35, 2019.*



## JEUDI 25 15H00 : APPROCHE METABOLOMIQUE POUR L'ETUDE DE L'EVOLUTION ADAPTATIVE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA AU COURS DES INFECTIONS PULMONAIRES CHRONIQUES DANS LA MUCOVISCIDOSE

**Oriane Moyne** (Lauréate du prix de thèse du RFMF 2020)

*Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, équipes TheREx et EPSP*

La mucoviscidose (cystic fibrosis en anglais) est une maladie génétique grave et incurable, qui touche environ 7000 personnes en France, 100 000 dans le monde. Elle est causée par une mutation du gène codant le canal CFTR (pour Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), qui a pour fonction le transport des ions chlorures à travers la membrane apicale des cellules épithéliales. Les mutations du gène *cftr* à l'origine de la mucoviscidose conduisent à une absence ou une diminution de la fonctionnalité de ce canal, induisant une déshydratation et un épaissement du mucus qui tapisse les voies respiratoires. Ce mucus anormalement visqueux empêche la réalisation du processus de clairance mucociliaire (action de nettoyage réalisée par les cils vibratiles présents à la surface des cellules épithéliales). Ainsi, les patients atteints de mucoviscidose sont particulièrement sensibles aux infections respiratoires, qui constituent la principale cause de mortalité associée à cette maladie.

La prise en charge de la mucoviscidose a considérablement évolué durant ces dernières décennies notamment avec l'apogée des antibiothérapies, et l'espérance de vie des patients est passée de 8 ans en 1974 à près de 50 ans aujourd'hui. Cependant, ces traitements antibiotiques prolongés ont eu pour effet de sélectionner, parmi les différentes espèces présentes dans le microbiote pulmonaire des patients, celles qui avaient la capacité de résister à ces traitements. C'est ainsi que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé comme l'une des plus grandes menaces de santé publique du fait de son haut potentiel de résistance antibiotique, s'est imposée comme un pathogène majeur de la mucoviscidose. On observe aujourd'hui une prévalence de 80% chez les patients adultes, qui s'accompagne d'une exacerbation des symptômes respiratoires et une augmentation significative de la mortalité. Dans la plupart des cas, les infections ponctuelles ou intermittentes caractéristiques du jeune patient évoluent vers une colonisation chronique des voies respiratoires chez l'adulte par des clones de *Pa* ayant résisté aux traitements antibiotiques répétés.

Avec le développement des techniques de séquençage d'ADN à haut débit, de nombreuses études ont porté sur l'évolution génétique de *Pa* par comparaison des génomes d'isolats séquentiels prélevés chez un ou plusieurs patients, afin d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de ces adaptations. Cependant, ces études pionnières se sont heurtées à la difficulté à corréliser les mutations accumulées sur le génome bactérien avec l'expression de phénotypes cliniquement pertinents (résistance aux antibiotiques, virulence), ainsi qu'avec l'impact clinique de l'infection sur le patient.

Plaçant le métabolisme comme une signature fonctionnelle de l'évolution adaptative, l'objectif de ce travail de thèse fut d'offrir un nouvel éclairage sur la patho-évolution de *Pa* au fil des années d'infection chronique en comparant les profils métaboliques d'isolats cliniques représentant différents stades d'adaptation de la bactérie. Dans un premier temps, nous avons constitué une banque d'isolats cliniques de *Pa*, représentatifs de l'évolution clonale de la bactérie au cours de l'infection pulmonaire chronique chez 32 patients adultes atteints de mucoviscidose suivis à Grenoble. Dans un second temps,

nous avons caractérisé les patients de la cohorte au plan clinique, par la construction d'indicateurs de la santé respiratoire, ainsi que isolats bactériens au plan phénotypique (mesure de nombreux phénotypes associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques). Nous avons également défini les profils métaboliques des isolats par métabolomique non ciblée à haute résolution (HPLC-HRMS) sur cultures bactériennes. Finalement, la clé de voûte de ce travail fut d'intégrer l'ensemble des données cliniques, phénotypiques et métabolomiques par des méthodes statistiques multivariées et multi-échelles, afin d'identifier les voies métaboliques susceptibles de signer une évolution adaptative parallèle des souches infectant différents patients, ou associées à l'expression de phénotypes d'intérêt clinique, ou à l'état de santé respiratoire du patient.

Parmi les résultats majeurs de cette étude, nous avons pu mettre en évidence une implication de la voie de synthèse des polyamines (putrescine, spermidine) dans l'expression de phénotypes de virulence. Des analyses complémentaires réalisées après publication de ce manuscrit ont également démontré que le niveau de production de ces molécules était également associé à une augmentation de la fréquence des exacerbations cliniques, phases de crises transitoires particulièrement sévères pour le patient (Moyné et al. 2020, soumis à *Nature Microbiology*). Ces résultats sont discutés en détail au regard de la littérature existante, suggérant ainsi qu'une augmentation importante de la synthèse de polyamines par *Pa* pourrait signer un emballement de la croissance bactérienne, associée à une augmentation de l'inflammation et à la survenue d'exacerbations. Une analyse statistique originale, concentrée sur les différences entre les profils métaboliques et de résistance antibiotique entre des isolats précoces et tardifs prélevés à plusieurs années d'intervalle chez nos 32 patients, a permis également de révéler un unique métabolite (parmi les plus de 2000 pics détectés), statistiquement prédictif de la résistance aux beta-lactamines. De manière intéressante ce métabolite, le L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate, est connu pour être impliqué dans le recyclage du peptidoglycane de la paroi bactérienne, principale cible de cette famille d'antibiotiques.

En résumé, notre travail a permis pour la première fois, la mise en évidence de voies métaboliques impliquées dans l'adaptation de *Pa* à son hôte et corrélées à des manifestations phénotypiques et cliniques, démontrant ainsi l'intérêt de la métabolomique pour l'identification de voies métaboliques d'importance clinique. Ces voies métaboliques constituent des cibles prometteuses pour le développement de futures thérapies anti-virulence ou de restauration de la sensibilité aux antibiotiques. Les métabolites identifiés constituent également des biomarqueurs cliniques potentiels prédictifs de la survenue d'exacerbation ou de la réponse au traitement, accompagnant ainsi une utilisation rationnelle des antibiotiques et une amélioration substantielle de la qualité de soin. Une étude prospective est en cours au CHU Grenoble-Alpes pour valider l'utilisation de ces métabolites comme biomarqueurs mesurés directement dans les expectorations des patients.



## VENDREDI 26 13H45 : IMPACT DE LA CARENCE EN PHOSPHATES SUR LA PRODUCTION METABOLIQUE D'UNE BACTERIE MARINE CULTIVEE EN BIOFILM

Carriot N.\* , Barry-Martinet R., Briand J.-F., Ortalo-Magné A., Culioli G.

\*<sup>1</sup>Université de Toulon, MAPIEM (EA 4323), Toulon, France

Le *biofouling* est un processus naturel de colonisation biologique qui impacte toutes les surfaces naturelles ou artificielles immergées en milieu marin. Le développement des biofilms marins constitue une étape cruciale de ce processus et génère des problèmes économiques majeurs <sup>[1]</sup>. Cette étude vise à déterminer l'effet de la disponibilité en nutriments (phosphates) sur la production métabolique de biofilms formés *in vitro* par la souche bactérienne marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. Des milieux de culture préparés avec différentes concentrations de phosphates, choisies pour être pertinentes d'un point de vue écologique (de 10<sup>-4</sup> à 1,32 mM), ont été utilisés. Les extraits bactériens ainsi obtenus ont été analysés par métabolomique (UPLC-ESI-QToF) puis les données résultantes ont été extraites (MZmine2), filtrées et analysées statistiquement (MétaboAnalyst 4.0). Il apparaît que les différents groupes d'échantillons présentent des différences notables en termes de production métabolique. Une analyse approfondie utilisant l'approche par réseaux moléculaires (GNPS) <sup>[2]</sup> a permis d'identifier une partie des métabolites présents dans ces échantillons, et notamment d'annoter les variables les plus discriminantes.

Grâce à cette approche analytique, 53 métabolites ont été identifiés (principalement des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylglycérols, des ornithine lipides, des peptides et des céramides) dans les biofilms de *P. lipolytica* TC8 grâce à leur schéma de fragmentation MS/MS. Les résultats ont montré qu'une carence en phosphates génère des modifications notables de la composition lipidique de la membrane bactérienne avec une diminution drastique de la biosynthèse des phospholipides (notamment des phosphatidyléthanolamines) en faveur d'aminolipides polaires (notamment des ornithine lipides).

[1] Schultz et al. (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27, 87–98.

[2] Wang M, et al. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34:828-837.

<sup>1</sup>\*Contacts : [nathan-carriot@etud.univ-tln.fr](mailto:nathan-carriot@etud.univ-tln.fr) (Nathan CARRIOT) ; [culioli@univ-tln.fr](mailto:culioli@univ-tln.fr) (Gérald CULIOLI).

## VENDREDI 26 14H00 : LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY SEMI-QUANTIFICATION AND TANDEM MASS SPECTROMETRY AS TOOLS FOR BACTERIAL LIPIDOMICS DEVELOPMENT

**Estelle Deschamps<sup>1,2</sup>, Annick Schaumann<sup>1</sup>, Isabelle Schmitz-Afonso<sup>2</sup>, Emmanuelle Dé<sup>1</sup>, Carlos Afonso<sup>2</sup>, Corinne Loutelier-Bourhis<sup>2</sup>, Stéphane Alexandre<sup>1</sup>**

1. Laboratoire PBS, UMR6270 ; Université de Rouen ; CNRS, CURIB, 25 Rue Lucien Tesnière, 76130 Mont-Saint-Aignan (France)

2. Laboratoire COBRA, UMR6014 ; Université de Rouen, INSA de Rouen ; CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex (France)

When studying bacterial metabolome, bacterial culture in laboratory is often required in order to have enough material for sensitive analyses. However, since bacterial growth in laboratory can impact the metabolic pathway, growth conditions should simulate as close as possible the bacterial natural environment. Therefore, particular caution must be taken when choosing the growth medium since nutrients have direct impact on the produced metabolites.

In this study, we compared the influence of growth media on the lipidome of *Pseudomonas aeruginosa* —a bacterium classified as a critical priority for the R&D of new antibiotics by the World Health Organization. Due to the high pathogenicity of *P. aeruginosa* in cases of cystic fibrosis (CF), this study aimed to find a medium which simulates the CF lung sputum and is compatible with the lipidome analysis.

In order to choose such synthetic medium, *P. aeruginosa* PAK was grown into two CF-like media and one commercial medium —used as reference. Prior to lipid extraction, several lipid standards —one for each of the lipid classes— were spiked. Lipid samples were then analysed by reversed phase liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS). Extracted ion chromatograms were automatically generated for each identified phospholipids. Semi-quantification was then performed using relative areas of phospholipids (area of the sample lipid divided by the area of the standard lipid) in order to determine phospholipid quantity variations depending on the growth medium.

Quantity variations were observed on the proportion of the different classes of phospholipids of *P. aeruginosa* (phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylglycerols (PG) and cardiolipins (CL)). Especially, PC were far less produced in the medium which was lacking choline nutrients. The influence of the medium on the proportion of the several phospholipid fatty acyl lengths was also observed —*e.g.* PE 32:1 and PE 36:1. Therefore, tandem mass spectrometry was performed in order to study the fatty acid composition of phospholipids. Using fatty acid intensity ratios, sn-1 and sn-2 fatty acid positions were determined. We showed that for several phospholipids, the major isomer combination differed depending on the growth medium.

## **VENDREDI 26 14H15 : DIVERSITE ET FONCTIONNEMENT DES PORTS DE PLAISANCE - UNE VARIABILITE MULTI-ECHELLE, DE LA COMMUNAUTE AU METABOLOME**

**Robin Gauff<sup>1c</sup>, Stéphane Greff<sup>2</sup>, Dominique Davoult<sup>1</sup>, Christophe Lejeusne<sup>2</sup>**

*1 Sorbonne université, Station biologique de Roscoff. 2 IMBE Marseille, Station d'Endoume c présenter and corresponding author: gauff.robin@yahoo.de*

L'Urbanisation, en combinaison avec le Changement Climatique, est l'un des facteurs de perturbations anthropiques les plus importants. A l'interface des milieux urbains et marins, les ports cristallisent des enjeux et problèmes littoraux. Tout en détruisant les habitats naturels, les infrastructures portuaires offrent de nouveaux substrats durs à coloniser par une grande variété d'organismes (biofouling). Cependant, elles ne sont pas de simples substituts aux écosystèmes naturels car : (i) les filtres environnementaux et les processus écologiques clés peuvent y différer, (ii) leur composition biotique diffère des habitats naturels, et (iii) elles sont caractérisées par une forte diversité et abondance, voire dominance des espèces introduites. Ces milieux encore mal compris sont profondément impactés par des perturbations humaines qui souvent sont intenses mais localisées, résultant dans des environnements caractérisés par des forts gradients ou des conditions parcellées. En effet, les ports sont caractérisés par une importante pollution chimique des eaux (rejets urbains et activités industrielles) constituant un filtre de sélection drastique. Notre étude a pour but de comprendre comment ces filtres environnementaux impactent les organismes vivants dans les ports sur une très petite échelle spatiale (dizaine de mètres). Pour cela des études sont menées entre autres sur le Port du Château de Brest. Nous cherchons à comprendre quels facteurs abiotiques (pollutions etc.) et biotiques (prédation) varient sur cette petite échelle et comment ces filtres impactent la communauté dans son ensemble ainsi que le métabolisme de certaines espèces clefs. Les observations indiquent une variabilité communautaire forte, impactée par les filtres, mais également des modifications du métabolome chez certaines espèces.

## **VENDREDI 26 14H30 : USING CONCATENATED ANALYTICAL DATA FOR METABOLOMIC GUIDED PRODUCTION AND TARGETED ISOLATION OF BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS**

CONFERENCE INVITE DU DR. RUANGELIE EDRADA-EBEL

High resolution Fourier transform mass spectrometric (HRFTMS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic data were employed as complimentary metabolomic tools to dereplicate chemical profiles of Bioactive Natural Products from their sources. The innovative strategy enhanced targeted cultivation, harvest, and isolation of biologically active compounds. Principal Component (PCA), Hierarchical Clustering (HCA), and Orthogonal Partial Least Square-Discriminant (OPLS-DA) analyses were used to evaluate HRFTMS and NMR spectral data of culture extracts. The results of the statistical analysis identified and validated the best culture conditions and extraction procedure which optimized the isolation of novel bioactive metabolites. Novel secondary metabolites were screened using high resolution mass spectrometry and NMR-based metabolomics approaches. Metabolomic profiling using 2D-NMR and HR-ESIFTMS were done at different stages of the growth phase for both solid and liquid culture media. Multivariate analysis of fused data sets resulted to easier-to-interpret linear trends. The optimised method in terms of media, incubation time, and maximum production bioactive compounds are taken into account for the scale-up. Metabolomic- and bioassay-guided isolation was carried out to target the compound(s) of interest. With the metabolomics approach, it was possible to predict and optimise the production of the target secondary metabolite."