



HAL
open science

Développement d'outils chimiométriques pour l'étude des traitements antileishmaniens

Laurent Imbert

► **To cite this version:**

Laurent Imbert. Développement d'outils chimiométriques pour l'étude des traitements antileishmaniens. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA112010. tel-00685887

HAL Id: tel-00685887

<https://theses.hal.science/tel-00685887>

Submitted on 6 Apr 2012

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.

**UNIVERSITE PARIS 11
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
ECOLE DOCTORALE :
CHIMIE DE PARIS-SUD
PÔLE : CHIMIE**

ANNEE : 2012

SERIE DOCTORAT N°

THESE

**Présentée
A L'UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTE DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

par

M. Laurent IMBERT

**Développement d'outils chimiométriques pour l'étude des
traitements antileishmaniens**

Soutenue le 30 janvier 2012

Dirigée par le Professeur Pierre CHAMINADE

JURY :

**Professeur Laurence LE MOYEC (Rapporteur)
Professeur Philippe CARDOT (Rapporteur)
Professeur Olivier LAPRÉVOTE (Examineur)
Professeur Philippe M. LOISEAU (Examineur)
Docteur Danielle LIBONG (Examineur)
Professeur Pierre CHAMINADE (Directeur)**

REMERCIEMENTS

Au Professeur Laurence LE MOYEC et au Professeur Philippe CARDOT, pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Professeur Olivier LAPRÉVOTE, pour avoir accepté de juger ce travail, pour avoir rendu possible une collaboration avec son équipe qui m'a beaucoup appris tant sur le plan professionnel que personnel.

Au Professeur Pierre CHAMINADE, pour avoir dirigé mes travaux durant ces années de doctorat, pour m'avoir appris à « raconter une histoire », et à coupler à peu près n'importe quel système HPLC avec n'importe quel spectromètre de masse.

Au Professeur Philippe M. LOISEAU, pour ses conseils et son expertise biologique sur les résultats bruts, pour les pour ses encouragements et sa bonne humeur contagieuse.

Au Docteur Danielle LIBONG, pour m'avoir encadré au quotidien pendant ces travaux, pour m'avoir remotivé pendant les périodes difficiles, pour m'avoir forcé à avancer coûte que coûte, pour une passion partagée.

Au Professeur Patrice PROGNON, que je ne cesserai de remercier, pour ses conseils et le partage de son expérience, dont je commence à saisir l'intérêt aujourd'hui.

Au Professeur Arlette BAILLET-GUFFROY, pour avoir accepté un futur interne désorienté dans son parcours de Master, pour avoir été arrangeante et compréhensive.

Au Docteur Audrey SOLGADI, pour sa sympathie, pour son aide en spectrométrie de masse et en outillages, pour le stockage des données que nous n'avons toujours pas récupéré.

Au Docteur David TOUBOUL, pour la collaboration réalisée sur une partie des travaux, pour ses relectures impartiales et son expertise en spectrométrie de masse.

A Mathieu GAUDIN, pour les expériences réalisées en collaboration, pour les informations techniques concernant le TSQ Vantage.

Au Docteur Rime MICHAEL-JUBELI, pour l'ambiance de travail décontractée

mais studieuse, les bières et/ou verres de champagne partagés.

A Sonia ABREU, pour son aide depuis le commencement de mes travaux de recherche, pour ses conseils de rédaction, pour les crêpes et les raclettes organisées.

A Raoul, Nicaise, Benoît, Elsa, Ali, pour les moments partagés.

A Aurélie(s), Emilie, Coach, Papy, Tonton, Piou-Piou, Thierry, Manfred, Fred, Jean-Antoine, Laurent, Olivier, John, pour les foots du midi et les bonnes rigolades, pour leur accueil chaleureux.

A Luje, Vinz et Clé-man, pour leur amitié inaltérable depuis le lycée.

A Muriel, Stéphanie, Guillaume, Thomas, Patrick, pour les bons moments PGVesques, les soirées au Molly et au Rosa, c'est toujours un plaisir de les revoir.

A Stéphane, Claudine, Sandrine, Jean-Pouêt, Michel(s), Vincent, Christophe, Philippe, Yves et Marc, pour les expériences musicales partagées, surtout en « milieu hostile », pour l'évolution de FAZ, qui ne court pas les rues.

A mes parents, à Flo et JC.

A Chrysanthi, pour m'avoir supporté et soutenu pendant cette épreuve (et les prochaines ?).

RÉSUMÉ

Les leishmanioses sont des parasitoses en constante évolution, et l'accroissement d'apparitions de résistances vis-à-vis des traitements disponibles en fait une des préoccupations majeures des organismes de santé publique dans le monde. La miltefosine est actuellement le seul antileishmanien actif par voie orale. Son mécanisme d'action implique les lipides et notamment les phospholipides membranaires du parasite.

Afin d'évaluer les effets de la miltefosine sur le parasite ainsi que les mécanismes de résistances, une étude lipidomique d'un clone de *Leishmania donovani* cultivé sous différentes conditions (traité, résistant, résistant-traité) a été réalisée dans le présent travail. Des analyses couplant une séparation des phospholipides en Chromatographie Liquide Haute-Performance à polarité de Phase Normale (NP-HPLC) avec un Spectromètre de Masse (MS) équipé d'une source d'Ionisation ElectroSpray (ESI) ont été traitées par chimiométrie, à l'aide d'une Correction Orthogonale du Signal suivie d'une Analyse Discriminante par Moindre Carrés Partiels (OSC-PLS-DA). Les principales espèces moléculaires permettant de distinguer les différentes cultures ont ensuite fait l'objet d'une identification structurale par spectrométrie de masse en tandem. Des hypothèses métaboliques ont pu être posées.

Puis l'étude a été étendue à une plus grande variété de lipides, séparés par NP-HPLC. Pour cela une comparaison des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique et PhotoIonisation à Pression Atmosphérique) a été nécessaire afin de sélectionner la mieux adaptée pour un tel couplage. Les mécanismes d'action de la miltefosine et de l'amphotéricine B ont alors fait l'objet d'une étude lipidomique.

DEVELOPMENT OF CHEMOMETRIC TOOLS FOR THE STUDY OF ANTILEISHMANIAL DRUGS

ABSTRACT

Leishmaniasis is a more and more spreading disease, and resistance of parasites toward antileishmanial drugs is a concern for public safety organizations throughout the world. Miltefosine is the only oral drug, and its mechanism of action implies membrane lipids, and phospholipids, of parasite cells.

In order to assess this mechanism of action, and resistance mechanisms developed, a lipidomic study of *Leishmania donovani* strains (treated, resistant, treated-resistant) was performed in the present work. A Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography (NP-HPLC) was coupled to an ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometer (ESI-MS) to analyze phospholipids, and data were computed using an Orthogonal Signal Correction-Partial Least Squares-Discriminant Analysis (OSC-PLS-DA). Molecular species responsible for the differentiation of strains were then structurally identified using tandem mass spectrometry. Hypotheses on metabolic pathways implied were then proposed.

The study was then extended to a broader range of lipids, also analyzed through NP-HPLC-MS. A comparison of Atmospheric Pressure Ion sources (ESI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Atmospheric Pressure PhotoIonization) was thus necessary in order to select the most suitable source. A lipidomic study was then performed to assess mechanisms of action and mechanisms of resistance concerning miltefosine and Amphotericin B.

Mots clés : Phospholipides, Lipides, Spectrométrie de Masse, Lipidomique, Leishmanioses, Electrospray, Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique, Photoionisation à Pression Atmosphérique.

Key words: Phospholipids, Lipids, Mass Spectrometry, Lipidomics, Leishmaniasis, Electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Atmospheric Pressure PhotoIonization.

Adresse du laboratoire d'accueil :

EA 4041, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud 11

Faculté de Pharmacie, tour D2 3^{ème} étage

5 rue Jean-Baptiste Clément

92296 Châtenay-Malabry Cedex.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
<i>I^{ERE} PARTIE : PROBLEMATIQUE BIOLOGIQUE ET METHODOLOGIE</i>	
<i>D'EXPLORATION.....</i>	3
I. LE PARASITE : GENRE <i>LEISHMANIA</i>.....	4
A. Données épidémiologiques.....	4
B. Le parasite : cycle de vie et aspects immunologiques.....	5
1. Cycle de développement et formes cliniques.....	5
2. Mécanisme infectieux chez l'hôte.....	8
II. TRAITEMENTS ACTUELS.....	9
A. Lutte contre le phlébotome.....	9
B. Traitements antileishmaniens.....	10
1. Traitements médicamenteux.....	11
a) Sels d'antimoine pentavalents.....	11
a.1) Définition.....	11
a.2) Posologies.....	11
a.3) Mécanisme d'action.....	12
a.4) Effets indésirables.....	12
a.5) Résistances.....	12
b) Amphotéricine B liposomale.....	13
b.1) Définition.....	13
b.2) Mécanisme d'action.....	13
b.3) Posologies.....	14
b.4) Effets indésirables.....	14
b.5) Résistances.....	14
c) Pentamidine.....	14
c.1) Définition.....	14
c.2) Posologies.....	15
c.3) Mécanisme d'action.....	15
c.4) Effets indésirables.....	15
c.5) Résistances.....	15
d) Paromomycine.....	15
d.1) Définition.....	15
d.2) Posologies.....	16

d.3) Mécanisme d'action.....	16
d.4) Effets indésirables.....	16
d.5) Résistance.....	17
e) Miltefosine.....	17
e.1) Définition.....	17
e.2) Posologies.....	17
e.3) Mécanisme d'action.....	17
e.4) Effets indésirables.....	18
e.5) Résistance.....	18
f) Sitamaquine.....	19
f.1) Définition.....	19
f.2) Mécanisme d'action.....	19
f.3) Effets indésirables.....	19
g) Azithromycine.....	20
h) Dérivés azolés.....	20
h.1) Définition.....	20
h.2) Mécanisme d'action.....	21
h.3) Résistance.....	21
i) Allopurinol.....	21
i.1) Définition.....	21
i.2) Posologies.....	22
i.3) Mécanisme d'action.....	22
i.4) Effets indésirables.....	22
j) Sulfate de zinc.....	22
j.1) Aperçu.....	22
j.2) Posologies.....	23
j.3) Mécanisme d'action.....	23
j.4) Résistance.....	23
2. <i>Traitements non médicamenteux</i>	23
a) Cryothérapie.....	23
b) Thermothérapie.....	24
c) Laser au dioxyde de carbone.....	24

III. UN DOMAINE EMERGENT D'ETUDE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES : LA LIPIDOMIQUE..... 25

A. De l'analyse des lipides vers la lipidomique.....	25
--	----

1.	<i>Définition des lipides.</i>	25
2.	<i>Extraction des lipides.</i>	26
3.	<i>Méthodes analytiques utilisées.</i>	27
a)	Chromatographie liquide.	27
b)	Méthodes spectroscopiques.	30
c)	Spectrométrie de masse.	31
c.1)	Source Electrospray.	32
c.2)	Source d'ionisation chimique à pression atmosphérique.	35
c.3)	Source de photoionisation à pression atmosphérique.	36
c.4)	Analyseurs utilisés.	38
B.	Les « -omiques ».	46
1.	<i>Définition de la lipidomique.</i>	47
2.	<i>Stratégies d'investigations.</i>	47
C.	Chimiométrie : Méthodes statistiques multivariées.	49
1.	<i>Définition.</i>	49
2.	<i>Analyse en Composante Principale (PCA).</i>	50
a)	Principe.	50
b)	Calcul.	50
c)	Exemple.	52
3.	<i>Analyse discriminante en Moindres Carrés Partiels (PLS).</i>	53
a)	Définition.	53
b)	Calcul.	53
c)	Exemple.	54
4.	<i>Plans d'expériences.</i>	55
a)	Définition.	55
b)	Plan factoriel complet.	58
c)	Plan d'analyse d'effets : Plackett-Burman.	58
D.	Applications à <i>Leishmania donovani</i> .	59
2^{EME} PARTIE : ETUDE DE L'ACTION DE LA MILTEFOSINE SUR LEISHMANIA DONOVANI PAR UNE APPROCHE LIPIDOMIQUE		65
I. INTRODUCTION		70
II. EXPERIMENTAL		72
A.	Sample preparation.	72
B.	Standards.	72
C.	Solvents.	73

D.	Lipid extraction.	73
E.	Liquid chromatography.	73
F.	Mass spectrometry.	74
G.	Orthogonal Signal Correction-Partial Least Squares-Discriminant Analysis.	75
III.	RESULTS AND DISCUSSION.....	76
A.	Separation of phospholipid classes by LC-ELSD and LC-ESI/IT-MS.	76
B.	Quantitation of phospholipid classes of Leishmania by LC-ESI/IT-MS.	78
C.	Identification of potential biomarkers by LC-ESI/TQ-MS and OSC-PLS-DA.	79
IV.	CONCLUSION.....	83
V.	ACKNOWLEDGEMENTS.....	84
VI.	TABLES AND FIGURES.....	85
3^{EME} PARTIE : ETUDE DES SOURCES A PRESSION ATMOSPHERIQUE POUR L'ANALYSE DE L'ENSEMBLE DES LIPIDES.....		97
I.	INTRODUCTION.....	100
II.	MATERIAL AND METHODS.	102
A.	Chemical compounds.	102
B.	Parasite strains and culture.	102
C.	Lipid extraction.	103
D.	Apparatus.	103
E.	Chromatographic method.	103
F.	Mass spectrometry method.....	104
III.	RESULTS AND DISCUSSION.....	105
A.	Full-scan analysis in the positive ion mode.	105
B.	Full-scan analysis in the negative ion mode.....	106
C.	Comparison of the ion sources using standard lipid mixtures.	107
D.	Evaluation of linearity, precision, limits of detection and quantification.	108
E.	Biological samples.	110
1.	<i>Comparison of LC-MS profiles obtained with the three ion sources.</i>	<i>110</i>
2.	<i>Comparison of differently treated parasites.....</i>	<i>111</i>
IV.	CONCLUSION.....	112
V.	ACKNOWLEDGEMENTS.....	112
VI.	TABLES AND FIGURES.....	113

4^{EME} PARTIE : EXTENSION DE L'ETUDE LIPIDOMIQUE A L'ENSEMBLE DES LIPIDES DE LEISHMANIA DONOVANI : IMPACT DE L'ACTION DE LA MILTEFOSINE ET DE L'AMPHOTERICINE B SUR LE LIPIDOME	127
I. INTRODUCTION.....	129
II. MATERIEL ET METHODES.	130
A. Produits chimiques.	130
B. Souches de parasites et culture.	131
C. Extraction des lipides.....	131
D. Appareillage.....	131
E. Séparation chromatographique.....	132
F. Spectrométrie de masse.	132
G. Correction orthogonale du signal-Moindre carrés partiels.	133
III. RESULTATS.	134
A. Miltefosine.....	134
B. Amphotericine B.....	135
IV. DISCUSSION.....	135
V. CONCLUSION.....	137
CONCLUSION GENERALE.	143
BIBLIOGRAPHIE.	146
ANNEXES	158
A. Taxonomie des Leishmanies.....	158
B. Voies métaboliques impliquées lors de l'infection du macrophage par la forme promastigote de Leishmania.....	159
C. Taxonomie des phlébotomes.	160
D. Exemple de structure moléculaire des principales classes de lipides définies par LIPID MAPS [61].	161
E. (a) Schéma de la source Turbo Ion Spray utilisée au cours de ces travaux sur le triple quadripôle API 3000 (AB Sciex) et (b) son principe de fonctionnement.	162
F. Schéma (a) de l'interface entre les sources et l'analyseur utilisés sur le TSQ Vantage EMR (Thermo Fisher Scientific) utilisé au cours de ces travaux ; (b) module supportant les sondes propres à chaque type de source ESI/APCI/APPI.....	163
G. Schéma d'un analyseur à triple quadripôles utilisé au cours de ces travaux (TSQ Vantage EMR).....	164

H. Principe de fonctionnement d'analyseurs de masse non utilisés au cours de ces travaux.....	165
I. Schéma du spectromètre de masse Orbitrap couplé à une source Electrospray.....	170
J. Exemple de plan factoriel complet pour l'optimisation de paramètres de source ESI en MS.....	171
K. Plan d'expérience de Plackett-Burman pour l'analyse d'effets des paramètres de sources sur la source ESI de l'API 3000.....	172
L. Structure générale des phospholipides [64].	173
M. Manuscrit de la publication rédigée par l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN, actuellement en révisions.....	Erreur ! Signet non défini.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principales espèces responsables de leishmanioses.....	4
Tableau 2 : Résolution et gamme de rapport m/z analysable par les principaux analyseurs.....	39
Tableau 3 : Exemple de plan d'expérience factoriel à 2 facteurs.....	56
Tableau 4 : Exemple de plan d'expérience à deux facteurs, tenant compte de l'interaction entre température et pression.....	57
Table 1 : Solvent program gradient.	85
Table 2 : Intermediate precision ^(a) , limit of detection (LOD) ^(b) and limit of quantitation (LOQ) ^(c) study with ion trap mass spectrometer and triple quadrupole mass spectrometer (PA: glycerophosphatidic acid ; PG: glycerophosphatidylglycerol ; CL: cardioline ; PI: glycerophosphatidylinositol ; PE: glycerophosphatidylethanolamine ; PS: phosphatidylserine ; LPE: lysophosphatidylethanolamine ; PC: phosphatidylcholine ; SM: sphingomyelin ; LPC: lysophosphatidylcholine).....	86
Table 3 : Gradient table used for chromatographic separation. Flow rate: 1mL/min. Phase A: n-heptane/ethyl acetate (99.8:0/2, v/v), phase B: acetone/ethyl acetate (2:1, v/v) + 0.02% acetic acid, phase C: 2-propanol/water (85:15, v/v) + 0.05% acetic acid and ethanolamine.	113
Table 4 : Mean parameters used for each ionization source.....	114
Table 5 : Characteristic m/z of the standard mixture in each ionization mode: ESI, APCI and APPI. Underlined m/z corresponds to the base peak (nominal masses are presented here).	115
Table 6 : Comparison of ESI, APPI and APCI on their ability to fit a linear model (except LPE for APPI), their sensitivity, LOD and LOQ for each lipid class.....	116
Table 7 : Repeatability and intermediate precision of ESI, APCI and APPI for each lipid class.	117
Table 8 : Lipid molecular species (nominal mass) recensed in a sample of <i>Leishmania donovani</i> HePC-RT, using either ESI, APCI or APPI.	118

Liste des figures

Figure 1 : Répartition mondiale des cas de Leishmanioses viscérales [1].	5
Figure 2 : Phlébotome, vecteur des leishmanioses.	5
Figure 3: Cycle de développement des leishmanies.	6
Figure 4 : Formes cliniques des leishmanioses. (a) Leishmaniose viscérale, (b) leishmaniose cutanée, (c) leishmaniose cutanéomuqueuse, "nez de tapir".	8
Figure 5 : Formule chimique des dérivés d'antimoine pentavalent. (a) stibogluconate sodique. (b) antimoniate de meglumine.	11
Figure 6 : Formule chimique de l'amphotéricine B.	13
Figure 7 : Formule chimique de la pentamidine.	14
Figure 8 : Formule chimique de la paromomycine.	16
Figure 9 : Formule chimique de la miltefosine.	17
Figure 10 : Formule chimique de la sitamaquine.	19
Figure 11 : Formule chimique de l'azithromycine (Azadose [®]).	20
Figure 12 : Formule chimique des dérivés azolés antileishmaniens.	20
Figure 13 : Formule chimique de l'allopurinol.	21
Figure 14 : Schéma et principe de fonctionnement des détecteurs (a) évaporatifs à diffusion de la lumière, et (b) à aérosol chargé.	29
Figure 15 : Schéma d'un spectromètre à résonance magnétique nucléaire.	30
Figure 16 : Domaine d'utilisation des sources à pression atmosphérique utilisées en couplage LC/MS [100].	32
Figure 17 : Expression de la limite de Rayleigh, exprimant la charge q en fonction du rayon R de la gouttelette, de la permittivité du vide ϵ_0 et de la tension de surface γ .	33
Figure 18 : Schéma de fonctionnement de la source electrospray.	34
Figure 19 : Principe de fonctionnement de la source APCI.	35
Figure 20 : Réactions intermédiaires impliquées dans l'ionisation des molécules en APCI [100].	

.....	36
Figure 21 : Principe de fonctionnement de la source APPI (source Syagen).....	37
Figure 22 : Mécanismes possibles de formation d'ions en APPI en mode positif [112–114]. <i>M</i> est l'analyte, <i>D</i> le dopant.....	37
Figure 23 : Mécanismes possibles de formation d'ions en APPI en mode négatif [114–116]. <i>M</i> est l'analyte, <i>D</i> le dopant et <i>S</i> le solvant.....	38
Figure 24 : Schéma d'un quadripôle.....	39
Figure 25 : Création du champ électrique au sein d'un quadripôle linéaire.....	40
Figure 26 : Première région de stabilité obtenue sur le diagramme de solutions des équations de Mathieu, sur un plan (<i>q</i> , <i>a</i>) [117]. La zone grisée correspond à la région de stabilité pour un ion donné, et la droite correspondant à un balayage en masse d'un spectromètre est représentée...	41
Figure 27 : Schéma d'une trappe ionique.....	42
Figure 28 : Schéma de la trajectoire décrite par les ions isolés au sein d'une trappe ionique....	42
Figure 29 : Diagramme de stabilité obtenu pour une trappe ionique. La première région est représentée par la zone blanche [118].	43
Figure 30 : Schéma d'une trappe linéaire ou trappe 2-D [119].....	43
Figure 31 : Schéma de la complexité des différentes stratégies lipidomiques associée à la quantité de biomarqueurs potentiellement mis en évidence [125].	49
Figure 32 : Scores plots des vins analysés par Bellomario <i>et coll.</i> , (a) sur PC1 et PC2 (74% de variance expliquée), (b) sur PC1 et PC3 (67,5% de variance expliquée). Erreur ! Signet non défini.	
Figure 33 : Représentation (a) de la comparaison de prédiction de l'âge des vins par le modèle PLS calculé, et (b) le poids des variables utilisées pour le calcul. Erreur ! Signet non défini.	
Figure 34 : Schéma d'un plan d'expérience à deux facteurs (température et pression ici), avec un point central.....	56
Figure 35 : Exemple de surface de réponse pour un plan d'expérience à deux facteurs	

(température et pression).....	57
Figure 36 : Résultats obtenus pour l'analyse d'effets des paramètres de source ESI de l'API 3000 sur le PC et le PG.....	68
Figure 37 : Phospholipid classes separation obtained with optimized conditions on a standard mixture. (a) ELSD detection. (b) ESI/IT-MS detection in negative (from 0 to 12.25 min), and positive (from 12.25 to 18 min) ion mode. (c) Glycerophosphatidic acid ESI/MS spectra obtained in negative ion mode.	87
Figure 38 : Quantitation of phospholipid classes from Leishmania samples with LC-ESI/MS detection. Brackets represent the standard deviation.	88
Figure 39 : Scores plot obtained by PLS-DA with OSC pre-processing for NT (a), T (b) and R (c) Leishmania extracts. Each sample was duplicated.	89
Figure 40: (a) (X,t) covariance vs (X,t) correlation for the first component of the OSC-PLS model comparing NT versus T clones. Figures at the right side of the plot show line plots of X variables (ions/retention times surrounded by a circle) with either (c) high positive covariance and correlation or (d) high negative covariance and correlation.	90
Figure 41 : Percentage of over – or under – expression of molecular species highlighted by OSC-PLS on LC-ESI/MS data (negative ion mode for PI and PE, positive ion mode for PC, SM and LPC), when comparing a) T versus NT; b) R versus NT and c) T versus R. Molecular structures are proposed whenever possible by using <i>lipidmaps.org</i> and need further MS/MS studies.....	91
Figure 42 : Comparison of mean PE spectra between Leishmania donovani clones in negative ion mode: non-treated (NT), treated (T), and resistant (R) to miltefosine.....	93
Figure 43 : MS/MS spectra of the PE [M-H] ⁻ of m/z 728.7.	94
Figure 44 : MS/MS spectra of the IPC [M-H] ⁻ of m/z 780.7, firstly attributed to a PE due to its retention time.	95
Figure 45 : Mass spectra of PC on each source. a) ESI; b) APCI; c) APPI.	120

Figure 46 : Comparison of ESI, APPI and APCI on signal to noise ratio of lipids in a 100µg/ml mixture of lipids standards (n = 3).	121
Figure 47 : Comparison of the signal-to-noise ration of lipid ion peaks from ESI, APCI and APPI analyses of a <i>Leishmania donovani</i> strain resistant to Amphotericin B (n = 3).	122
Figure 48 : Chromatograms obtained with ESI (a), APCI (b) and APPI (c) in positive (left) and negative (right) ion mode on a <i>Leishmania donovani</i> HePC-RT sample.	123
Figure 49 : Comparison of HePC-treated, HePC-resistant, and treated HePC-resistant parasites to HePC, using ESI (a), APPI (b) and APCI (c) sources.	124
Figure 50 : Espèces moléculaires de lipides influencées par la miltefosine.	139
Figure 51 : Espèces moléculaires de lipides influencées par l'amphotéricine B.	140
Figure 52 : Schéma d'un analyseur à temps de vol linéaire et à réflectron, avec leurs caractéristiques principales.....	166
Figure 53 : Schéma de la trajectoire orbitale suivie par un ion dans l'analyseur ICR, (a) excitation des ions vers (b) une trajectoire stable détectable. (c) représente schématiquement l'appareillage [241].	167
Figure 54 : Schéma de la trappe d'ion constituant l'Orbitrap, où les ions présentent une trajectoire oscillante sur l'axe z.....	168

INTRODUCTION GENERALE

Les travaux faisant l'objet de la présente thèse ont été réalisés au sein du Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA 4041. Une collaboration avec le Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire, UMR CNRS 8076, a pour objectif d'analyser les lipides, et plus précisément les phospholipides membranaires de parasites du genre *Leishmania*, responsables d'ulcérations cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales. Cette parasitose est en constante évolution et devient une préoccupation des organismes de santé du fait de son impact en santé publique.

Les médicaments actuellement disponibles contre cette parasitose sont peu nombreux, et leur large utilisation favorise l'apparition croissante de clones résistants. Leur action est principalement liée aux lipides membranaires du parasite. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'actions des drogues actuelles sur le parasite, ainsi que les mécanismes de résistances développés par celui-ci, afin de faciliter le développement de nouvelles thérapeutiques. Il en découle la nécessité de développer des méthodes analytiques pour analyser les lipides des membranes parasitaires. Une approche métabolomique, et plus précisément lipidomique, a été choisie dans le cadre de cette collaboration, car elle offre l'avantage d'une exploration sans *a priori* des échantillons. Ainsi, le risque de manquer un élément important à la compréhension de phénomènes biologiques est réduit par rapport à une approche plus classique, dans laquelle une hypothèse est posée puis vérifiée expérimentalement.

Les travaux présentés ici constituent la mise en place de cette approche lipidomique sur l'étude de l'action de la miltefosine (HePC) sur les phospholipides de clones de *Leishmania donovani*. Puis cette étude a été étendue à l'exploration à l'ensemble des lipides membranaires, afin de mieux comprendre l'action de la HePC et de l'amphotéricine B contre ce parasite.

**1^{ère} PARTIE : PROBLEMATIQUE BIOLOGIQUE ET
METHODOLOGIE D'EXPLORATION**

I. Le parasite : genre *Leishmania*.

A. Données épidémiologiques.

Les Leishmanioses sont des parasitoses dues à des protistes de l'embranchement des Sarcomastigophores, sous-embranchement des Mastigophores, classe des Zoomastigophores, ordre des *Kinétoplastidés*, famille des *Trypanosomatidés*, genre *Leishmania*. Le Tableau 1 présente les principales espèces référencées actuellement (Voir annexe A pour leur taxonomie).

Sous-genre <i>Leishmania</i>	Sous-genre <i>Viannia</i>
<i>L. donovani</i>	<i>L. braziliensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>L. peruviana</i>
<i>L. archibaldi</i>	<i>L. guyanensis</i>
<i>L. chagasi</i>	<i>L. panamensis</i>
<i>L. tropica</i>	<i>L. naiffi</i>
<i>L. killicki</i>	<i>L. lainsoni</i>
<i>L. aethiopica</i>	
<i>L. major</i>	
<i>L. turanica</i>	
<i>L. gerbilli</i>	
<i>L. arabica</i>	
<i>L. mexicana</i>	
<i>L. amazonensis</i>	
<i>L. enriettii</i>	
<i>L. hertigi</i>	

Tableau 1 : Principales espèces responsables de leishmanioses.

Elles sont principalement localisées au niveau de l'Europe du Sud, de l'Afrique, du Moyen-Orient, de l'Asie, de l'Amérique centrale et du Sud (Figure 1). La prévalence de cette maladie, toutes formes confondues, est estimée à 12 millions de cas, et elle menace 350 millions de personnes à travers 88 pays dans le monde. L'incidence des leishmanioses est d'environ 1 à 2 millions de nouveaux cas par an, dont 500 000 pour la leishmaniose viscérale, forme la plus grave de la maladie [1]. Cette parasitose est un motif de préoccupation pour les organismes internationaux de santé, étant donné son expansion régulière liée au réchauffement climatique et au déplacement des populations, mais également à cause de l'augmentation de la résistance des parasites aux traitements disponibles tandis que peu de nouveaux médicaments sont développés. A cela s'ajoute le nombre croissant de co-infections avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), rendant difficile la prise en charge des patients.

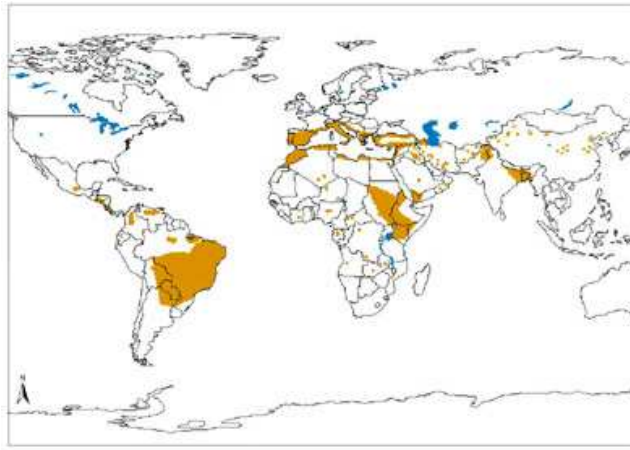


Figure 1 : Répartition mondiale des cas de Leishmanioses viscérales [1].

Le vecteur de cette parasitose est le phlébotome (embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des *Diptera*, sous-ordre des *Nematocera*, famille des *Psychodidae*, sous famille des *Phlebotominae* ; la taxonomie est présentée en annexe C), petit diptère de 2 à 3 mm, ressemblant à une petite mouche, dont la femelle est hématoophage. Il pique aussi bien l'homme que les animaux afin de nourrir ses œufs, généralement durant la nuit [2]. Une partie de la lutte contre les leishmanioses repose sur l'éviction de la piqûre.



Figure 2 : Phlébotome, vecteur des leishmanioses.

B. Le parasite : cycle de vie et aspects immunologiques.

1. Cycle de développement et formes cliniques.

Les parasites sont unicellulaires, flagellés chez l'insecte vecteur donc mobiles, et les différentes espèces présentent une morphologie identique. Le cycle dure entre 4 et 18 jours en fonction de l'espèce impliquée. Deux stades évolutifs du parasite sont à noter (Figure 3) :

- Le stade promastigote : forme flagellée présente dans le tube digestif du phlébotome.
- Le stade amastigote : forme intracellulaire présente chez l'hôte vertébré.

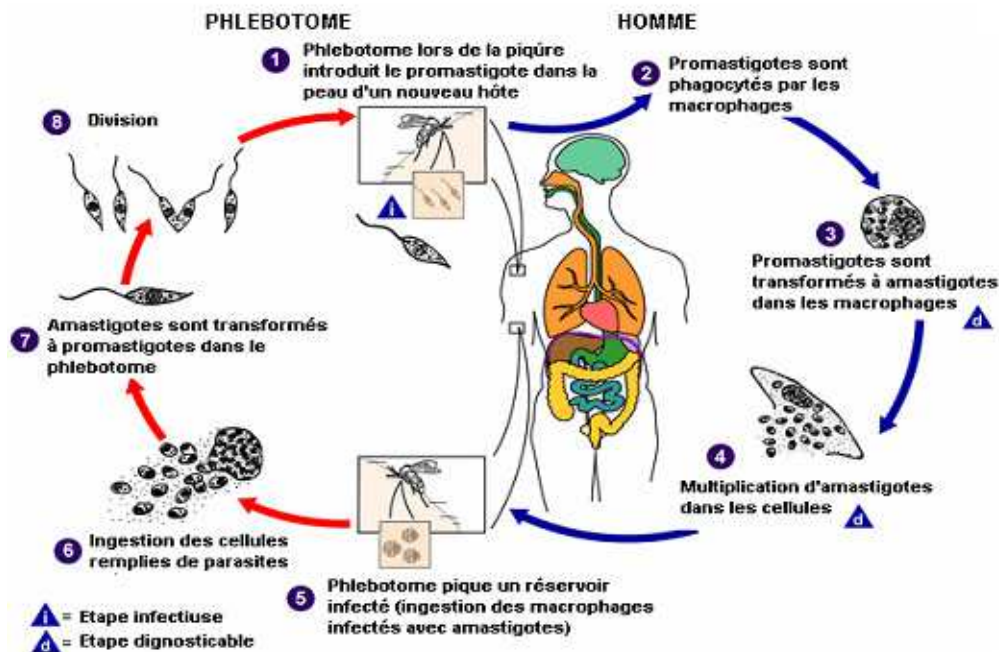


Figure 3: Cycle de développement des leishmanies.

Le phlébotome transmet une forme promastigote métacyclique infectieuse lors de la piqûre. Une fois phagocytée par les macrophages de l'hôte, elle se transforme en amastigote capable de se multiplier au sein des cellules infectées, dans différents tissus. La nature du tissu préférentiellement atteint conditionne la forme clinique de la maladie. Lors d'une nouvelle piqûre, le phlébotome ingère des macrophages contenant des amastigotes. Après rupture de la membrane cellulaire de ces macrophages, les amastigotes sont libérés dans l'intestin du vecteur où ils sont enveloppés dans une membrane péritrophique sécrétée par les cellules intestinales. Durant les 24-48 heures suivant la piqûre, les amastigotes se multiplient une ou deux fois, puis se transforment en forme promastigote et continuent leur multiplication. Enfin, après rupture de la membrane péritrophique, ils continuent de se multiplier dans l'intestin du vecteur, d'abord en promastigotes, puis en promastigotes métacycliques. Ces derniers migrent au niveau du pharynx, du cibarium et de la trompe pour infecter un nouvel hôte lors d'une prochaine piqûre [3].

Le stade amastigote du cycle s'effectue soit chez l'homme (hôte), soit chez un

canidé (chien, loup, renard, chacal, etc.). Ce dernier constitue un réservoir de parasites. Les leishmanioses cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales sont les trois formes cliniques observables lors d'une infection. Elles dépendent de l'espèce mise en jeu : *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi* sont généralement à l'origine d'une leishmaniose viscérale ; *L. tropica*, *L. major* et les complexes *L. mexicana* ainsi que *L. braziliensis* entraînent une leishmaniose cutanée ou parfois cutanéomuqueuse. Les aspects cliniques diffèrent suivant les formes [4] :

- Leishmaniose viscérale, ou Kala-azar (Figure 4(a)) : incubation de 2 à 8 mois, une fièvre irrégulière de 37,8-38,5°C est observée, ainsi qu'une splénomégalie, hépatomégalie, une polyadénopathie, anémie, avec altération de l'état général et perte de poids. La majorité des cas recensés se situent au Bangladesh, Brésil, Inde, Népal et Soudan. Le pronostic est fatal si cette forme n'est pas traitée.
- Leishmaniose cutanée (Figure 4(b)) : incubation de 1 à 4 mois, les amastigotes se développent dans les macrophages cutanés présents dans le derme à proximité de la piqûre du vecteur. Puis apparaît une ou plusieurs lésions ulcérées ou ulcéro-croûteuses dites humides, de 2 à 5 cm en moyenne. Les lésions sont parfois squameuses et sèches. Elles peuvent guérir spontanément, en 5 mois à 1 an en fonction de l'espèce impliquée (*L. major* et *L. braziliensis* ou *L. tropica* respectivement), et laissent des cicatrices. Cette forme clinique est principalement rencontrée en Afghanistan, Brésil, Iran, Pérou, Arabie Saoudite et en Syrie. Une forme cutanée diffuse chronique peut apparaître, par accumulation d'amastigotes sur d'importantes surfaces, et est souvent observée chez les patients immunodéprimés [5].
- Leishmaniose cutanéomuqueuse (Figure 4(c)) : l'incubation est similaire à la leishmaniose cutanée, et lui succède généralement. Des métastases muqueuses se développent quelques mois à plusieurs années plus tard au niveau de la sphère ORL : dans le nez, la bouche, le nasopharynx, le larynx et les voies aériennes supérieures. Elles provoquent une destruction massive des tissus, à l'origine d'une

perforation et d'un affaissement de la cloison nasale et réalisant le « nez de tapir ». La plupart des cas sont retrouvés en Bolivie, Brésil et au Pérou.

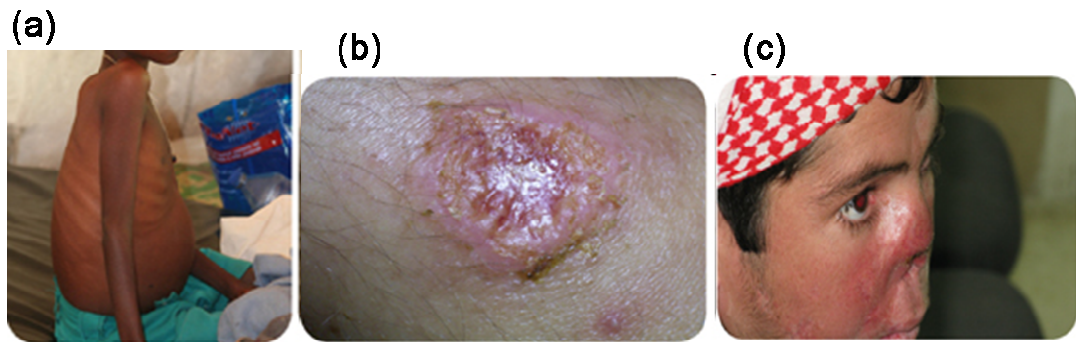


Figure 4 : Formes cliniques des leishmanioses. (a) Leishmaniose viscérale, (b) leishmaniose cutanée, (c) leishmaniose cutanéomuqueuse, "nez de tapir".

2. Mécanisme infectieux chez l'hôte.

Le parasite, une fois inoculé chez l'hôte, pénètre dans les macrophages, par le biais de récepteurs de type lectine, récepteurs de la fibronectine, de l'intégrine, du complément (CR1 et CR3). L'interaction avec le lysophosphoglycane membranaire, la glycoprotéine 63 ou Promastigote Surface Protease, la fibronectine ou les composants C3b et C3bi serait responsable de l'internalisation des promastigotes dans les macrophages [6, 7]. Ceux-ci ne produisent alors plus de monoxyde d'azote (NO) nocif pour le parasite et lui permettent de se développer. Les parasites se multiplient à l'intérieur de phagolysosomes et après un certain nombre de divisions cellulaires, les macrophages explosent et libèrent les parasites dans la circulation générale. Ceux-ci peuvent alors infecter d'autres macrophages, affaiblissant ainsi le système immunitaire de l'hôte. Au cours de la réponse immunitaire, les macrophages ainsi que les cellules dendritiques présentent des antigènes de Leishmanies aux lymphocytes T, et suivant qu'une réponse de type $T_{\text{helper}1}$ (réponse immunitaire cellulaire) ou $T_{\text{helper}2}$ (réponse immunitaire humorale) est enclenchée, une guérison spontanée ou l'apparition des symptômes sont observées respectivement [4, 8]. Un schéma plus précis des différentes voies de signalisation est présenté en annexe B.

II. Traitements actuels.

A. Lutte contre le phlébotome.

Plusieurs approches concernant la lutte contre le vecteur des leishmanioses existent et sont pratiquées avec plus ou moins de succès.

Des méthodes biologiques ont été décrites par plusieurs groupes de recherches, et consistent à infecter l'insecte avec des nématodes [9], des bacilles [10], des virus ou des champignons [11, 12]. Cela permet de tuer ou de réduire la mobilité des phlébotomes. Cependant, bien que les résultats soient prometteurs à l'échelle du laboratoire, aucun test en situation réelle n'a été effectué, car les sites de prolifération de l'insecte sont difficiles à repérer. Cela soulève également la possibilité de transmission de ces agents infectieux à l'homme.

Des approches environnementales ont été également étudiées. Le principe est alors d'empêcher le phlébotome de se développer dans les lieux propices à sa nidification [12]. En effet, une plus grande quantité de phlébotomes a été reportée dans les habitations situées près d'étables, comportant une certaine quantité d'humus, mais également dans les habitations ayant des murs fissurés et crevassés où les larves peuvent se développer. Une étude a montré la diminution de densité des phlébotomes lorsque ces fissures et crevasses sont comblées avec de la boue et de la chaux [13]. Un entretien est alors nécessaire afin d'éviter la réapparition des fissures sous quelques mois. D'autres études ont montré inversement que la présence d'étables serait bénéfique pour la lutte contre le phlébotome car les animaux présents seraient préférentiellement piqués par rapport aux hommes des habitations environnantes [14].

Des approches chimiques de lutte contre le phlébotome semblent être les plus utilisées et les plus efficaces. Deux techniques sont actuellement décrites : l'imprégnation des habitations par des insecticides à effet rémanent, et l'utilisation de moustiquaires également imprégnées d'insecticides [12]. Dans les deux cas, l'insecticide le plus utilisé est le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), mais d'autres types sont également utilisés, comme notamment les pyréthroides (perméthrine, deltaméthrine) ou le malathion. L'imprégnation des habitations est efficace pendant plusieurs semaines à quelques mois, il est donc nécessaire de renouveler l'application

plusieurs fois par an, plutôt avant les périodes de forte transmission des leishmanies (septembre/novembre avant l'hiver, et mars/mai avant l'été). D'une part, ce mode de lutte est surtout efficace contre les espèces endophiles, piquant en intérieur, tandis qu'il est relativement inefficace contre les espèces exophiles, piquant en extérieur, et ayant par conséquent peu de contact avec les insecticides. D'autre part, l'imprégnation des habitations dépend de la fréquence des campagnes menées par les pays concernés, de l'intervalle entre deux campagnes, de la compliance des populations aux diffusions d'insecticides non exempts de toxicité pour l'homme et l'environnement, et enfin du coût engendré par de telles opérations. L'utilisation de moustiquaires imprégnées est le mode de lutte le plus efficace contre le phlébotome, par une action de barrière physique associée à l'effet de l'insecticide. Elles sont également bien acceptées par les populations concernées [12]. Leurs caractéristiques sont différentes de celles utilisées notamment pour la lutte contre l'anophèle, vecteur du paludisme, car les mailles doivent être plus fines avec plus de 80 trous par cm² contre environ 20 trous par cm² pour les moustiquaires habituelles.

B. Traitements antileishmaniens.

Le diagnostic repose principalement sur le bilan clinique (lésions ulcéreuses, fièvre, hépato ou splénomégalie). Il peut être complété par un test sérologique, tel que l'agglutination directe ou l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), un frottis sanguin sur lequel sont mises en évidence des formes amastigotes du parasite, ainsi que par une mise en culture à partir de prélèvement sanguins, de biopsies de peau ou de lésions muqueuses [4, 15].

Les traitements médicamenteux disponibles actuellement possèdent une indication pour chaque forme clinique de leishmaniose. Les posologies et voies d'administration peuvent varier en fonction de l'atteinte diagnostiquée. Les schémas thérapeutiques comportent des monothérapies, ainsi que des associations entre les différentes molécules décrites ici.

1. Traitements médicamenteux.

a) Sels d'antimoine pentavalents.

a.1) Définition.

Ces molécules sont utilisées depuis les années 1940. Le stibogluconate sodique (Pentostam®) et l'antimoniote de méglumine (Glucantime®) sont les deux spécialités disponibles, administrables par voie intraveineuse (IV), intramusculaire (IM), ou intralésionnelle (IL) (Figure 5). Elles possèdent toutes deux l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement des trois principales formes cliniques de leishmanioses.

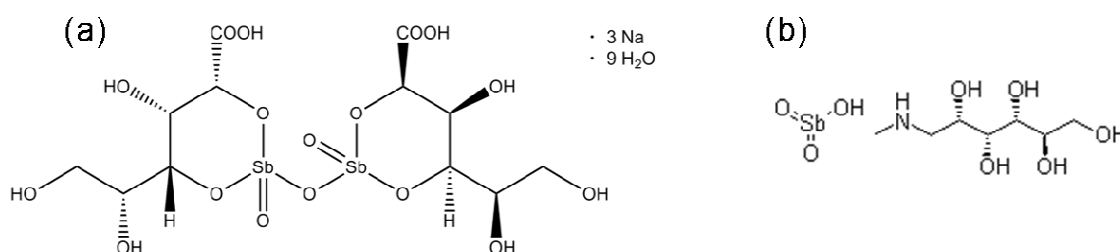


Figure 5 : Formule chimique des dérivés d'antimoine pentavalent. (a) stibogluconate sodique. (b) antimoniote de meglumine.

a.2) Posologies.

Les posologies sont les suivantes [15, 16] :

- Stibogluconate sodique : 15-20 mg/kg/j pendant 21 à 28 jours ou jusqu'à 40 jours dans les zones de chimiorésistance, par voie IV ou IM. Le traitement est prolongé quelques jours après guérison afin de prévenir les récurrences.
- Antimoniote de méglumine : de 37 à 75 mg/kg/j par voie IM, sans dépasser 850 mg par jour, pendant au moins 20 jours et jusqu'à guérison, et de 1 à 3 mL (solution à 300 mg/mL d'antimoniote de méglumine) par voie IL, tous les un ou deux jours avec un maximum de 3 injections au total afin d'obtenir un blanchiment total à la base de la lésion.

a.3) Mécanisme d'action.

Ces dérivés doivent être réduits en antimoine trivalent, forme active contre le parasite. Leur mécanisme d'action est encore peu connu actuellement, il semblerait que les dérivés d'antimoine stimulent la réponse immunitaire des patients traités [17], des hypothèses sur l'inhibition de la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) et l'oxydation des glucides et des acides gras ont été décrites [15, 18–20]. Des actions sur l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) parasitaire et sur les mécanismes de signalisation intracellulaires liés à la phosphatidylsérine ont également été rapportées [21, 22]. La mort cellulaire par un mécanisme de type « apoptose » serait alors induite par activation de caspases, entraînant l'activation d'une endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN parasitaire, mais également par l'action d'espèces réactives de l'oxygène dont la production serait induite par les dérivés actifs d'antimoine.

a.4) Effets indésirables.

Le principal effet indésirable est une pancréatite, symptomatique ou non, pouvant affecter le pronostic vital surtout chez les patients co-infectés avec le VIH [4, 15, 16]. Un allongement de l'espace QT peut être observé sur l'électrocardiogramme, ainsi qu'une augmentation des enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase ASAT et alanine aminotransférase ALAT), des nausées, des vomissements, des arthralgies, des myalgies, une insuffisance rénale aiguë, une thrombocytopénie et une leucopénie.

a.5) Résistances.

Du fait de leur utilisation courante, avec un respect approximatif des posologies et des recommandations de l'OMS, les souches de *Leishmania* résistantes aux dérivés d'antimoine sont de plus en plus courantes, et peuvent atteindre jusqu'à 70% des patients, notamment en Inde [4]. Les mécanismes de résistances impliqués seraient une diminution de leur réduction en antimoine trivalent, une diminution de la formation de complexes actifs avec des thiols, ou encore une augmentation de leur efflux extracellulaire par des transporteurs de la famille des ATP-binding cassette (ABC) [23].

b) Amphotéricine B liposomale.

b.1) Définition.

L'amphotéricine B (AmB) (Figure 6), antibiotique antifongique de la famille des polyènes macrocycliques, a d'abord été commercialisée sous forme désoxycholate, dans les années 1950. Elle est un antifongique possédant l'AMM contre les candidoses, cryptococcoses ou aspergilloses, et a montré une bonne efficacité contre les leishmanioses viscérales, notamment résistantes aux dérivés d'antimoine, par voie intraveineuse [16].

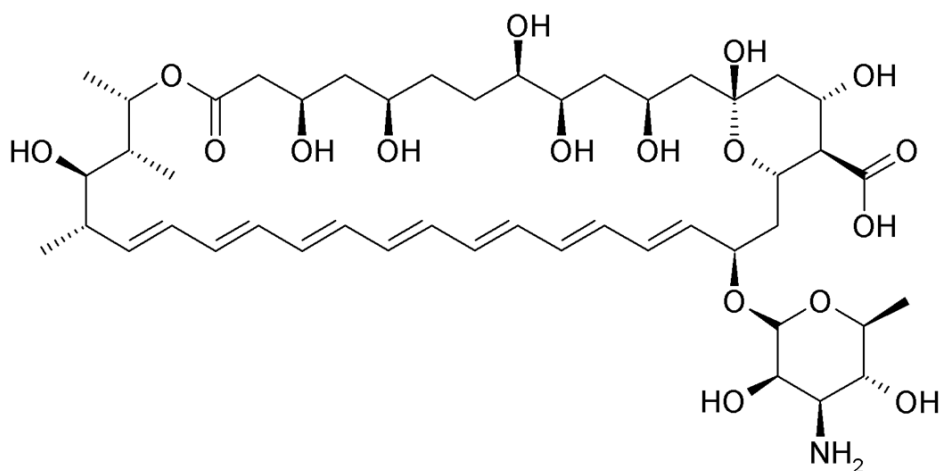


Figure 6 : Formule chimique de l'amphotéricine B.

Cependant, cette formulation entraîne des effets indésirables graves, et c'est grâce à la formulation liposomale (Ambisome®), dans les années 1980, qu'il a été possible de réduire significativement sa toxicité. Cette formulation en vésicules lipidiques favorise l'action de l'AmB directement sur la membrane de l'agent fongique ou parasitaire visé, en diminuant de manière concomitante son action sur les organes non-cibles.

b.2) Mécanisme d'action.

Son mécanisme d'action serait dû à une association de la molécule d'AmB avec l'ergostérol présent dans les membranes fongiques et parasitaires. Il y aurait alors une formation de canaux transmembranaires permettant la fuite des composants intracellulaires, aboutissant à la mort du pathogène [8, 24]. Des hypothèses sur une augmentation de production des macrophages ainsi qu'une stimulation de leur activité phagocytaire ont également été proposées [15].

b.3) Posologies.

Dans le traitement de la leishmaniose viscérale, l'AmB liposomale est utilisée en seconde intention, en cas de résistance probable ou prouvée aux dérivés d'antimoine [5, 15, 16]. La posologie utilisée est alors de 3 à 4 mg/kg/j pendant les 5 premiers jours de traitement, puis au 10^{ème} jour, sans dépasser une dose cumulative de 18 à 24 mg/kg durant le traitement [4, 15, 16].

b.4) Effets indésirables.

La toxicité de l'AmB est plus marquée avec la spécialité non liposomale, avec des risques d'agranulocytose, d'insuffisance rénale, de choc anaphylactique ou d'arrêt cardiaque. De plus, une irritation au point d'injection, céphalées, hypotensions, vertiges, paresthésies ou vomissements sont couramment observés.

b.5) Résistances.

La résistance à l'AmB n'a pas encore été signalée sur le terrain. Elle a par contre pu être obtenue en laboratoire et serait due à une absence de synthèse d'ergostérol par le parasite, avec remplacement de celui-ci par un autre stérol, modifiant ainsi la fluidité membranaire. A cela pourrait s'ajouter une légère augmentation de l'efflux d'AmB favorisant l'expulsion des molécules d'AmB de la cellule parasitaire [25, 26].

c) Pentamidine.

c.1) Définition.

La pentamidine (Pentacarinat[®]) est une amine aromatique antiparasitaire (Figure 7). Elle possède l'AMM contre la pneumocystose, la maladie du sommeil, et les leishmanioses viscérale, cutanée et cutanéomuqueuse, par voie IM ou IV [16].

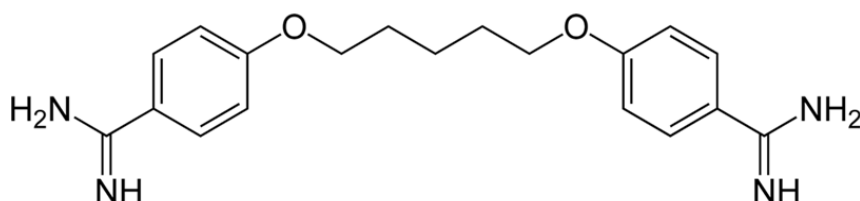


Figure 7 : Formule chimique de la pentamidine.

c.2) Posologies.

Les posologies utilisées sont les suivantes [5, 8, 15, 16] :

- Leishmaniose viscérale : 3 à 4 mg/kg un jour sur deux, au maximum 10 fois, à potentiellement renouveler en fonction de la réponse au traitement.
- Leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse : 3 à 4 mg/kg un jour sur deux, trois ou quatre fois.

c.3) Mécanisme d'action.

Son mécanisme d'action s'expliquerait par une inhibition de la synthèse d'ADN parasitaire par blocage de la thymidine-synthétase ou par fixation sur les ARN de transfert, et également par perturbation de l'activité mitochondriale [15, 16, 20, 27, 28].

c.4) Effets indésirables.

La toxicité de cette molécule est caractérisée par des atteintes hépatiques, rénales, ou pancréatiques avec parfois induction de diabète de type 1, en plus de réactions allergiques systémiques ou locales au point d'injection [15, 16]. Pour cette raison, elle n'est pratiquement plus employée pour traiter les leishmanioses.

c.5) Résistances.

Les résistances décrites à la pentamidine seraient dues à une modification de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse des polyamines [25], ainsi qu'à des protéines d'efflux diminuant le séjour de la molécule dans la cellule parasitaire [27, 29]. Une diminution de son accumulation dans la mitochondrie a également été rapportée dans les cas de résistances [30].

d) Paromomycine.

d.1) Définition.

La paromomycine (Humatin®) est un antibiotique de la famille des aminoglycosides (Figure 8). Elle ne possède l'indication que dans le traitement de l'amibiase intestinale par voie orale [16], mais elle a présenté une certaine efficacité

contre les leishmanioses, cutanée par voie locale, et viscérale par voie orale.

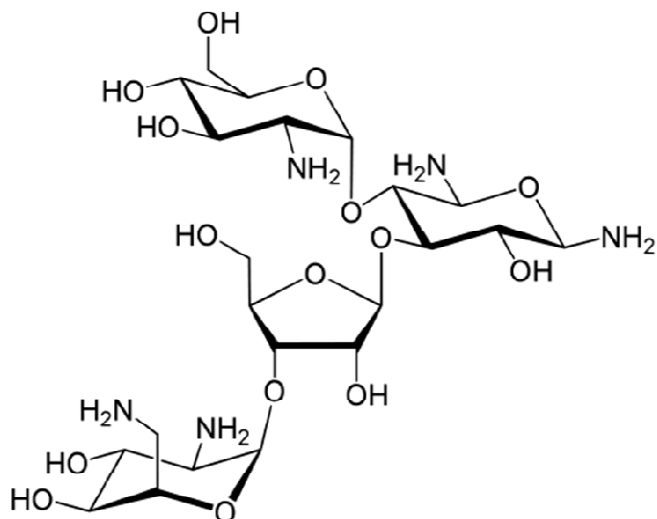


Figure 8 : Formule chimique de la paromomycine.

Les agences européenne et américaine du médicament (EMEA et FDA) ont accordé le statut de produit orphelin à cette molécule en 2005, et ont autorisé son utilisation contre les leishmanioses. Cette autorisation a été retirée en mars 2011 [31].

d.2) Posologies.

La posologie utilisée par voie orale était de 15 à 20 mg/kg/j pendant 21 jours en monothérapie, ou pendant 17 jours en association aux dérivés d'antimoine [4, 15, 32].

d.3) Mécanisme d'action.

Du fait de son statut de produit orphelin, son mécanisme d'action a été peu étudié, mais il semblerait qu'il résulte d'une interaction avec les ribosomes cytoplasmiques et mitochondriaux du parasite [17, 20, 33], de la même manière que chez les bactéries, où la synthèse protéique est inhibée par interaction avec la sous-unité 30S des ribosomes. La paromomycine serait internalisée dans les cellules parasitaires par interaction avec le lipophosphoglycane présent à leur surface [34, 35].

d.4) Effets indésirables.

Peu d'effets indésirables ont été décrits, les plus notables étant une hypoacousie transitoire et des troubles gastro-intestinaux.

d.5) Résistance.

Les mécanismes de résistances des parasites à la paromomycine sont encore peu étudiés. Bien que chez les bactéries des mutations de l'ARN ribosomal soient décrites, aucune mutation n'a été encore observée chez *Leishmania*. Des hypothèses sur la synthèse d'ARN et des modifications de la membrane lipidique seraient à approfondir [25]. Des travaux récents ont montré une augmentation de la quantité de protéines ribosomales présentes chez des parasites rendus résistants *in vitro* [35].

e) Miltefosine.

e.1) Définition.

La miltefosine ou hexadécylphosphocholine (Figure 9) a dans un premier temps été développée dans le domaine oncologique, et a obtenu une première AMM en France en 1997 pour le traitement curatif des métastases cutanées du cancer du sein par voie locale (Miltex®) [16]. Son activité par voie orale contre les leishmanioses est connue depuis les années 1980, et elle a été mise sur le marché pour la première fois en Inde en 2002 [15, 36]. Elle est disponible en France (Impavido®) en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) depuis 2007 [16], après avoir obtenu le statut de produit orphelin par l'AMA en 2003 [37].

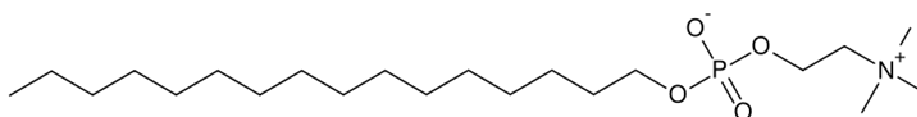


Figure 9 : Formule chimique de la miltefosine.

e.2) Posologies.

Elle est indiquée dans le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée. La posologie utilisée est de 2,5 mg/kg/j sans dépasser 150 mg/j, pendant 28 jours [15, 16]. La durée de traitement peut être prolongée en fonction de la réponse au traitement [16, 38].

e.3) Mécanisme d'action.

Son mécanisme d'action a fait l'objet de plusieurs études, mais il n'est pas encore pleinement élucidé. Une forte interaction de la miltefosine avec les stérols

membranaires a été mise en évidence au laboratoire de Parasitologie Paris-Sud [39]. Du fait de sa structure d'éther-lipide proche de celle des phospholipides, elle agirait en inhibant leur synthèse, via la phosphatidylethanolamine-*N*-methyltransferase et la phospholipase A2, ou encore la phosphocholine citidyltransferase, ainsi que la synthèse des stérols [5, 40-42], modifiant ainsi la signalisation intracellulaire. Elle influencerait le potentiel membranaire des mitochondries, favorisant ainsi une augmentation du taux cytosolique de cytochrome C [17, 20, 43]. Une activation de caspases, protéines impliquées dans l'apoptose cellulaire, en résulterait et induirait la mort du parasite. L'apoptose serait également déclenchée par une augmentation de la biosynthèse des di- et triacylglycerols, ainsi que des céramides intracellulaires [42]. Une dégradation de l'ADN parasitaire par le biais de DNases a également été décrite [43, 44]. D'autres travaux montrent une activation des macrophages par l'augmentation de production d'interferon- γ (INF- γ) dans les lymphocytes T, ainsi que par une action synergique avec les facteurs de croissances des différentes lignées cellulaires immunitaires [45].

e.4) Effets indésirables.

Les effets indésirables reportés lors de l'utilisation de l'HePC sont principalement un risque tératogène et fœtotoxique, des nausées et vomissements, diarrhée, cytolysé hépatique et insuffisance rénale [4, 15, 17].

e.5) Résistance.

Cette molécule étant administrée facilement par voie orale et, étant moins onéreuse que d'autres molécules, comme l'AmB liposomale notamment, elle est largement utilisée dans les pays situés en zone endémique. Cela tend à favoriser l'apparition de souches de *Leishmania* résistantes à l'HePC. Son long temps de demi-vie, d'environ 7 jours [20], favorise également l'apparition de résistances et de rechutes [15]. Les mécanismes de résistance impliqueraient principalement les transporteurs responsables de son internalisation dans les cellules parasitaires. Une mutation du LdMT (*Leishmania donovani* putative Miltefosine Transporter) entraînerait une diminution de l'influx d'HePC, un transporteur P-glycoprotéine-like ou encore un transporteur de la famille des ABC favoriseraient un efflux de la molécule hors de la

cellule [46–48].

f) Sitamaquine.

f.1) Définition.

La sitamaquine est une 8-aminoquinoline (Figure 10) actuellement en développement pour le traitement par voie orale de la leishmaniose viscérale. Les essais de phase I et II, ont montré des résultats mitigés pour le traitement contre les leishmanioses, avec des taux de guérison allant de 50% jusqu'à 87% suivant les études [15, 20].

f.2) Mécanisme d'action.

Son mécanisme d'action est encore peu connu, elle interagirait avec les lipides membranaires et mitochondriaux, entraînant entre autre une modification morphologique du parasite et des macrophages infectés. Les résistances décrites seraient dues à une surexpression de transporteurs ABC responsables de l'efflux du médicament [48].

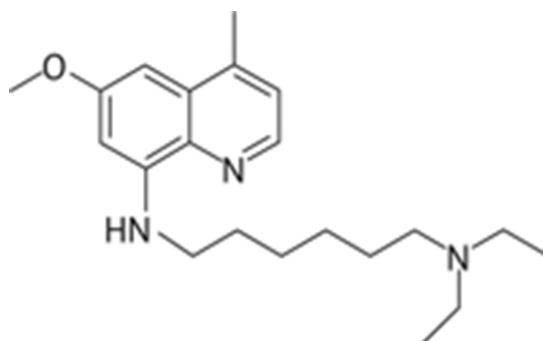


Figure 10 : Formule chimique de la sitamaquine.

f.3) Effets indésirables.

Les effets indésirables rencontrés sont principalement douleurs abdominales, céphalées, dyspepsie, vomissements, cyanoses et parfois méthémoglobinémie [20]. Du fait de ses résultats variables en études cliniques combinés aux effets indésirables parfois graves rencontrés, des réserves sont émises quant à sa future commercialisation.

g) **Azithromycine.**

L'azithromycine est un antibiotique de la famille des macrolides (Figure 11). Elle est encore peu décrite dans le traitement des leishmanioses, par voie orale [5]. Sa pharmacocinétique ainsi que sa bonne tolérance en font un bon candidat pour s'ajouter à l'arsenal thérapeutique disponible.

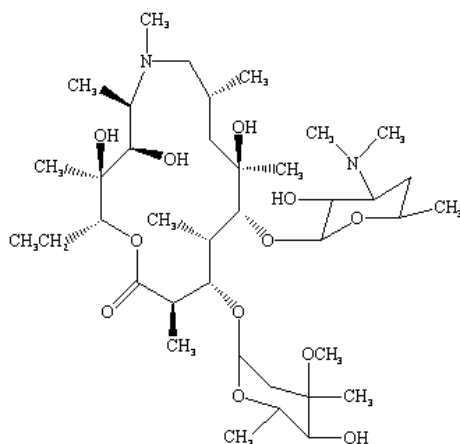


Figure 11 : Formule chimique de l'azithromycine (Azadose®).

Les posologies décrites actuellement sont de 0,5 à 1 g/j pendant 2 à 10 jours par mois, en renouvelant le traitement jusqu'à 4 mois, et offrent un taux de guérison de 85% [5].

h) **Dérivés azolés.**

h.1) Définition.

Les dérivés azolés (ketoconazole, fluconazole et itraconazole) sont habituellement indiqués comme antifongiques, par voie orale comme par voie locale.

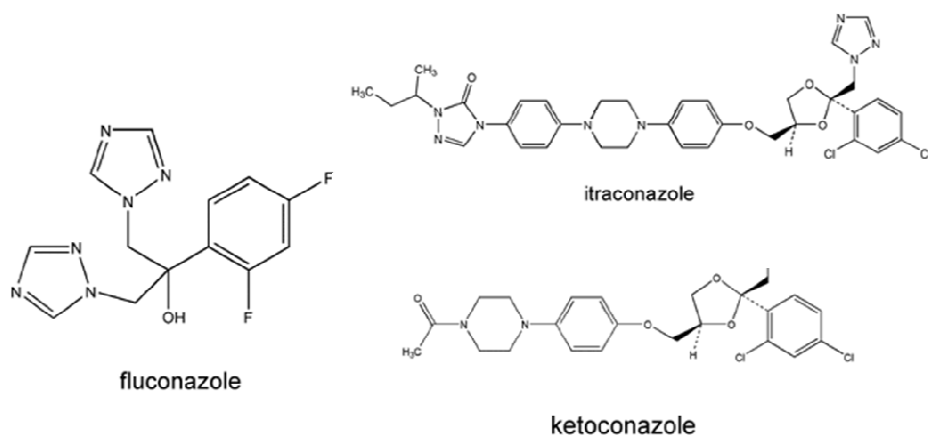


Figure 12 : Formule chimique des dérivés azolés antileishmaniens.

h.2) Mécanisme d'action.

Leur action contre les leishmanies serait similaire à leur action antifongique, c'est-à-dire qu'ils inhiberaient la 14 α -déméthylase responsable de la formation de stérols membranaires, et notamment de l'ergostérol. Une fragilisation de la membrane parasitaire en résulte, favorisant ainsi la destruction du parasite par les macrophages de l'hôte [5, 4, 15, 24]. Leur efficacité dépend de la molécule utilisée ainsi que de la souche de *Leishmania* impliquée. Ainsi, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* et *L. braziliensis* ont montré une sensibilité modeste aux azolés [5], tandis que des infections à *L. mexicana* ont été traitées avec succès [4, 15].

h.3) Résistance.

L'utilisation de ces molécules est encore peu décrite à ce jour, ainsi aucune résistance n'a été rapportée. Cela peut être dû également à leur faible utilisation, réduisant le risque de sélection de souches résistantes.

i) Allopurinol.

i.1) Définition.

L'allopurinol est un antigoutteux (Zyloric®), analogue de l'hypoxanthine, utilisé dans le traitement de fond de la goutte ainsi que dans le traitement de la lithiase urinaire calcique [16]. Son principal intérêt contre les leishmanioses réside dans une amélioration d'efficacité des autres antileishmaniens. Plusieurs études ont montré une augmentation du taux de guérison ainsi qu'une diminution des doses de dérivés d'antimoine lors d'une association avec l'allopurinol [5, 49, 50]. Une telle association permettrait également de traiter avec succès des souches résistantes aux dérivés d'antimoinés [51, 52].

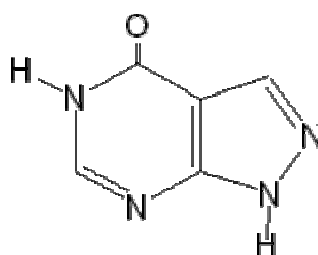


Figure 13 : Formule chimique de l'allopurinol.

i.2) Posologies.

La posologie utilisée est de 20 mg/kg/j, par voie orale. Son utilisation a été décrite autant contre la leishmaniose viscérale que dans la leishmaniose cutanée.

i.3) Mécanisme d'action.

Son action vis-à-vis du parasite serait essentiellement due à une interférence avec la synthèse de l'acide ribonucléique (ARN) parasitaire [53, 54]. Il interviendrait alors dans le métabolisme des purines, que le parasite ne synthétise pas. Le parasite affaibli serait alors plus susceptible à l'action des antileishmaniens. Des hypothèses concernant une action sur l'adénylosuccinate synthétase et l'adénine phosphoribosyltransférase ont également été décrites. L'allopurinol interférerait alors avec la formation d'adénosine monophosphate (AMP) ainsi qu'avec la synthèse des protéines [55]. Le principal mécanisme de résistance serait lié à une modification des transporteurs de purines, diminuant leur accumulation ainsi que l'impact du médicament sur le métabolisme parasitaire [25].

i.4) Effets indésirables.

L'allopurinol est généralement bien toléré, les effets indésirables se manifestant essentiellement par des gastralgies, céphalées, nausées, diarrhées, ou allergies.

j) Sulfate de zinc.

j.1) Aperçu.

Le sulfate de zinc a récemment montré une efficacité non négligeable dans le traitement des leishmanioses viscérales et cutanées, soit par injection intralésionnelle, soit par voie orale [5, 56]. Des études ont comparé l'efficacité du sulfate de zinc avec celle des dérivés d'antimoine [5, 57], tandis que d'autres ont cherché la dose efficace chez l'homme [56]. Il a également été reporté que des carences en zinc sont à l'origine d'une certaine susceptibilité de contracter une leishmaniose, ce qui expliquerait une atteinte particulière de la population du Bihar [58], dont la malnutrition est plus importante par rapport aux populations indiennes environnantes. Une faible quantité de zinc sérique favoriserait une réponse immunitaire humorale (activée par les lymphocytes T_{H2}) peu efficace contre le parasite par rapport à une réponse immunitaire

cellulaire (activée par les lymphocytes T_{H1}) efficace.

j.2) Posologies.

Les doses efficaces de sulfate de zinc sont entre 2,5 et 10 mg/kg par jour pendant 4 semaines, pouvant être prolongées pendant plus de 6 semaines en fonction de la réponse au traitement. Son efficacité semble comparable à celle des dérivés d'antimoine, notamment sur *L. major* et *L. tropica*.

j.3) Mécanisme d'action.

Le mécanisme d'action de ces sels comprend une action antileishmanienne directe associée à une action stimulatrice sur les macrophages et les lymphocytes T de l'hôte. L'apport de zinc permet de favoriser la réponse immunitaire cellulaire, par le biais de messagers cellulaires tels que l'interleukine-2 (IL-2) ou l'INF- γ , et de désactiver la réponse immunitaire humorale par le biais de l'IL-1 β , l'IL-8 et du facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α) [58]. Par ailleurs, l'élimination des formes amastigotes intramacrophagiques du parasite serait favorisée. Le zinc possède également des propriétés cicatrisantes adaptées dans le cas des leishmanioses cutanées [5, 56], mais également couramment utilisées dans le domaine cosmétique.

j.4) Résistance.

Aucune résistance du parasite vis-à-vis du sulfate de zinc n'est documentée à ce jour, car il doit être encore relativement peu utilisé par rapport aux dérivés d'antimoine, à l'AmB ou à l'HePC. Cependant, sa très bonne tolérance ainsi que son faible coût par rapport à ces derniers permettent de prévoir une forte augmentation de son utilisation dans les années à venir.

2. Traitements non médicamenteux.

Les molécules précédemment décrites constituent la majorité des traitements antileishmaniens utilisés. Il existe des alternatives non médicamenteuses décrites ci-dessous.

a) Cryothérapie.

Cette méthode consiste en l'application d'azote liquide sur les lésions cutanées,

dans le cadre de la leishmaniose cutanée [5]. Une à trois applications de 10 à 30 secondes, séparées d'1 minute, peuvent suffire pour obtenir une guérison. Des applications bi-mensuelles ont été décrites, avec succès après six sessions [59]. Lors d'une utilisation seule de cette technique, le taux de guérison est supérieur à 50%, tandis qu'en association avec un dérivé d'antimoine, ce taux dépasse les 90%. Des associations avec l'AmB ou la paromomycine sont également possibles. Cette méthode de traitement est bien tolérée et favorise la cicatrisation des lésions. Une hypopigmentation est souvent observée après traitement, mais elle est réversible en 2 à 3 mois.

b) *Thermothérapie.*

A l'inverse de la cryothérapie, il est possible de traiter les lésions des leishmanioses cutanées par un chauffage local, directement au niveau des ulcérations. Pour cela, une sonde délivrant la chaleur par radiofréquences est appliquée pendant 30 secondes, à 50°C.

Cette méthode est particulièrement douloureuse et nécessite généralement le recours à une anesthésie locale. Toutefois, son efficacité est comparable à celle des dérivés d'antimoine [5]. Elle permet également de réduire les durées de traitements lorsqu'elle est associée à un traitement médicamenteux.

c) *Laser au dioxyde de carbone.*

Le but du laser au CO₂ est de vaporiser les lésions, dans le cas de la leishmaniose cutanée, grâce à l'application d'un rayonnement de 30 W pendant 0,5-5 secondes ou 6-8 W en continu, entre 3 et 5 fois, en fonction des protocoles [5, 60]. Le traitement s'effectue sur une surface dépassant de 2 à 3 mm les bords des lésions ulcéreuses, en une session.

L'objectif est de faire brunir la base de l'ulcère et de déclencher l'hémostase. Ce procédé étant très douloureux, le recours à une anesthésie locale avant traitement est ici systématique. Une étude comparant cette méthode seule à une cryothérapie associée à des injections d'antimoniote de méglumine a montré une meilleure efficacité du traitement au laser (93% de guérison contre 78% pour la cryothérapie associée), avec une guérison plus rapide [60].

Les effets indésirables sont rares, et se manifestent sous forme d'hyperpigmentation, de rougeur persistante, de cicatrice atrophiée ou hypertrophiée [5, 60].

III. Un domaine émergent d'étude des systèmes biologiques : la lipidomique.

A. De l'analyse des lipides vers la lipidomique.

1. Définition des lipides.

Il convient dans un premier temps de définir les lipides, même si il n'y a pas actuellement une seule et unique définition établie.

Pendant longtemps, les lipides ont été définis comme des molécules hydrophobes non solubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques et les graisses. Cependant, certaines classes de lipides, les isoprénoïdes et les sucres acylaminés, sont solubles dans l'eau [61, 62]. Une définition plus complète serait possible en prenant en compte l'aspect structural et biosynthétique des lipides. Ainsi, Fahy *et coll.* [62] ont proposé de définir les lipides comme des petites molécules hydrophobes ou amphiphiles provenant de la condensation de thioesters ou d'unités isopréniques à partir de carbanions ou de carbocations respectivement. La classification en lipides simples et complexes a alors été proposée. Ainsi, les lipides simples s'hydrolysent en au maximum deux produits (acides gras, stérols ou encore acylglycérols), tandis que les lipides complexes s'hydrolysent en plus de trois produits (tels que les glycérophospholipides ou les glycosphingolipides) [62]. Le consortium LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) a proposé une classification plus précise des différents lipides en 2005 [62], mise à jour en 2009 [63, 64], tenant compte des voies de biosynthèse des lipides (des exemples de structures moléculaires sont présentés en annexe D).

Une classification plus générale a également été décrite [61, 65], conditionnée par l'aspect analytique des lipides. Ainsi, trois grandes classes de lipides regroupent les espèces anioniques, portant une charge négative en milieu légèrement acide (cardiolipides, phosphatidylglycerols, phosphatidylinositols), les espèces anioniques

faibles, neutres en milieu légèrement acide et chargées négativement en milieu alcalin (céramides, phosphatidylethanolamines), et enfin les espèces neutres, regroupant les lipides électriquement neutres mais potentiellement polarisables (cérébrosides, sphingomyélines, cholestérol et esters de cholestérol). Lors d'analyses en spectrométrie de masse, les lipides anioniques et anioniques faibles seront préférentiellement détectés en ionisation négative tandis que l'ionisation positive, en milieu plutôt basique, sera plutôt adaptée pour les lipides neutres.

2. Extraction des lipides.

Les techniques utilisées lors d'analyses de lipides sont sensibles aux effets de matrice, il convient donc de les extraire afin de réduire autant que possible les pertes de sensibilités dues aux composés de la matrice [66].

Les deux extractions les plus utilisées et les plus connues sont celle de Folch *et coll.* [67, 68] décrite au début des années 1950, et celle de Bligh et Dyer [69] décrite en 1959. Ce sont des extractions liquide-liquide permettant d'obtenir un extrait lipidique total. La méthode initiale de Folch *et coll.* fait intervenir un mélange chloroforme/méthanol (2:1), ainsi qu'une solution saline pour les étapes de lavage. Cette méthode a fait l'objet de plusieurs modifications et améliorations, dont celle décrite par Bligh et Dyer. Celle-ci fait intervenir un mélange chloroforme/méthanol (1:2), puis une dilution par du chloroforme et de l'eau permet de récupérer les lipides dans le chloroforme tandis que les composés matriciels et hydrophiles, tels que les gangliosides, sont récupérés dans la phase eau/méthanol. Ces méthodes sont rapides et offrent des rendements d'extractions proches de 100%.

Ces méthodes liquide-liquide sont toujours largement utilisées aujourd'hui, même si des extractions en phase solide (SPE) peuvent également être mises au point [61]. L'avantage de ces techniques est la réduction du temps de préparation de l'échantillon, surtout lors de l'analyse d'une grande quantité d'échantillons, par une élution rapide des lipides et une diminution du nombre d'étapes d'extraction. Cependant, les méthodes SPE nécessitent un temps de développement non négligeable. En effet, il faut sélectionner la phase stationnaire des colonnes en fonction des classes lipidiques à analyser, puis optimiser la nature et le volume des solvants à utiliser pour le conditionnement, la charge, le lavage et l'élution des colonnes. Dans le

cas d'études lipidomiques ciblées ou concentrées, la SPE présente un intérêt pour supprimer ou raccourcir l'étape de séparation en chromatographie liquide haute performance (HPLC) avant l'analyse en MS par exemple, en purifiant une première fois le ou les analytes d'intérêt. Dans le cas d'une étude lipidomique non ciblée, où l'analyse de la totalité des lipides est souhaitée, l'expérimentateur choisira préférentiellement l'une des deux méthodes décrites précédemment, modifiée ou non en fonction de la nature des échantillons. Le temps de développement de la méthode analytique globale sera alors plus court.

3. Méthodes analytiques utilisées.

a) Chromatographie liquide.

Dans un premier temps, l'analyse des lipides a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur à ionisation de flamme, puis à un spectromètre de masse [61, 70, 71] (impact électronique ou ionisation chimique). Il est alors nécessaire que les analytes soient thermiquement stables, tout en étant volatilisables au moment de l'injection. Une étape de dérivatisation ou d'hydrolyse des molécules est souvent incluse dans la préparation d'échantillon à cette fin, cela allonge donc le temps total d'analyse [72]. L'analyse de lipides appartenant à une gamme étendue de polarité est donc difficilement réalisable en GC, de plus, toutes les classes lipidiques ne sont pas analysables par ce moyen, contrairement à la chromatographie liquide.

Les premières analyses de lipides en chromatographie liquide (LC) ont été réalisées en chromatographie sur couche mince (CCM), encore utilisée actuellement [61]. Puis l'HPLC, la chromatographie ultra haute performance (UHPLC) ou la nano-LC plus récemment ont montré un avantage pour l'analyse des lipides totaux. Dans ces cas, il est possible de choisir entre des phases stationnaires apolaires, dans le cadre d'analyses en LC à polarité de phases inversée (RP-LC) [73-77], et des phases stationnaires polaires, dans le cadre d'analyses en LC à polarité de phases normale (NP-LC) [40, 78-85]. Les solvants sont utilisés soit en isocratique, soit en gradient, de solvants polaires vers des solvants apolaires en RP-LC, et de solvants apolaires vers des solvants polaires en NP-LC.

L'analyse en RP-LC sépare les molécules en fonction de leur volume hydrocarboné, par des interactions apolaires entre les analytes et la phase stationnaire. Dans le cas des lipides, les interactions se font principalement avec les chaînes d'acides gras, alkyl ou alkenyl, responsables de leur hydrophobicité. Au sein d'une classe lipidique, les temps de rétentions peuvent être prévus en fonction de leur indice d'équivalent carbone $EC=NC-2n$, déterminé par la longueur de chaîne carbonée NC et le nombre d'insaturations n présentes. Lors de l'analyse d'un échantillon complexe, les lipides sont alors séparés indépendamment de leur classe, et il est possible de discriminer des espèces moléculaires à cette étape du processus analytique. Il est cependant possible d'observer la co-élution d'espèces moléculaires, de classes différentes ou non, présentant un même EC. Dans ce cas, le couplage LC-MS permet d'identifier les molécules présentes sous un même pic chromatographique. En fonction des phases stationnaires disponibles, il n'est pas forcément possible d'analyser l'ensemble du lipidome en une seule fois.

En NP-LC, les molécules sont séparées par interactions entre leur partie polaire et la phase stationnaire, ou tête polaire pour certaines classes (phospholipides, sphingolipides, céramides, glycérolipides ou saccharolipides). Les lipides sont alors séparés par classe de polarité. L'analyse des espèces moléculaires présentes au sein de chaque classe est également réalisable en LC-MS. Il est possible de parler « d'analyse bidimensionnelle », car la MS permet d'accéder à des informations non fournies par la LC seule. L'analyse de l'ensemble du lipidome n'est pas non plus toujours réalisable en une fois, même si plusieurs études décrivent la séparation de la quasi-totalité des lipides présents dans un échantillon.

Le recours à de la LC-2D couplant successivement deux colonnes chromatographiques ayant des propriétés de rétention orthogonales, aussi bien en phase inverse qu'en phase normale, pourrait permettre d'éclater les classes et les espèces moléculaires de lipides avant de les détecter. En pratique, la séparation développée sur la seconde dimension doit être beaucoup plus rapide que celle de la première dimension. Le temps séparant deux injections sur la seconde dimension doit être suffisamment court afin de pouvoir analyser deux pics successifs séparés lors de la première dimension. Les couplages LC-MS, plus souvent décrits, permettent d'atteindre la répartition des espèces moléculaires ainsi que des informations

structurales moyennant un développement moins lourd que dans le cas de la LC-2D. Des études ont été effectuées par couplage de méthodes à deux dimensions avec un spectromètre de masse afin de tirer parti des avantages de chaque technique [86, 87]. En effet, la MS permet d'accéder à structure des molécules, tandis que la LC-2D permet d'éclater les classes lipidiques facilitant l'interprétation des spectres de masse.

Du fait de l'absence de groupements chromophores sur les lipides, la détection par spectrométrie UV/Visible n'est pas possible. Une première avancée dans l'analyse des lipides a été effectuée avec l'apparition de détecteurs universels (voir Figure 14), tels que le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) ou le détecteur Corona CAD (détecteur par charge d'aérosol) [88-92]. Le principe de fonctionnement de ces deux détecteurs est proche. Les deux premières étapes communes constituent la nébulisation de l'effluent en gouttelettes à l'aide d'un gaz inerte tel que l'azote, puis l'évaporation du solvant par passage dans un tube chauffé afin d'obtenir des particules de solutés. L'étape de détection diffère selon l'appareil. Dans le cas du DEDL, les particules de soluté passent dans une cellule d'écoulement éclairée par une source lumineuse. Un photomultiplicateur placé selon un angle de 120° par rapport à la source quantifie la lumière diffusée par le soluté et transforme cette lumière en signal électrique mesurable. Dans le cas du CAD, les particules de soluté sont chargées par transfert de charge depuis des molécules de diazote chargées par décharge corona. Puis les charges sont comptées.

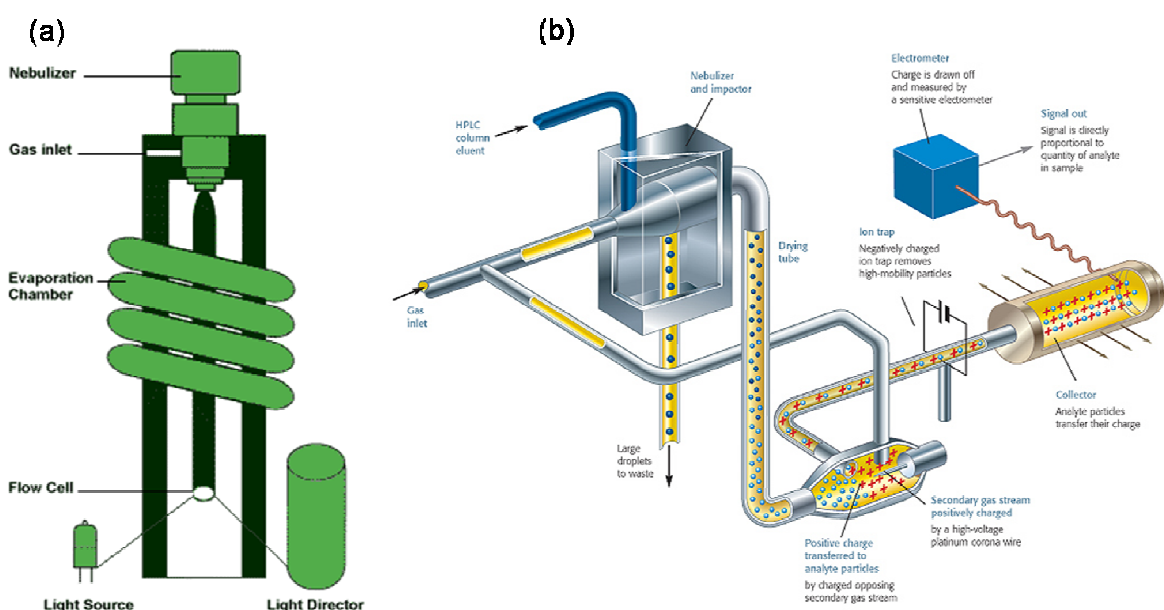


Figure 14 : Schéma et principe de fonctionnement des détecteurs (a) évaporatifs à diffusion de la lumière, et (b) à aérosol chargé.

L'identification structurale des lipides est alors difficile, car elle n'est possible qu'à partir du temps de rétention et dépend donc de la disponibilité de standards. Les progrès techniques de la MS ainsi que sa diffusion de plus en plus large ont ensuite permis l'étude structurale des molécules, et de diminuer considérablement les limites de détections.

D'autres techniques chromatographiques moins représentées dans la littérature peuvent également être utilisées pour l'analyse des lipides, telles que la chromatographie supercritique, la chromatographie à contre-courant ou encore la chromatographie d'exclusion stérique [93, 94].

b) Méthodes spectroscopiques.

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Figure 15) est couramment utilisée pour l'analyse des lipides. Elle permet l'étude structurale des molécules, ainsi que leur quantification [61]. Les RMN de l'hydrogène (^1H), du carbone (^{13}C) et du phosphore (^{31}P) sont utilisables pour l'étude des lipides et leurs rôles dans les membranes biologiques et les voies de signalisations cellulaires [95].

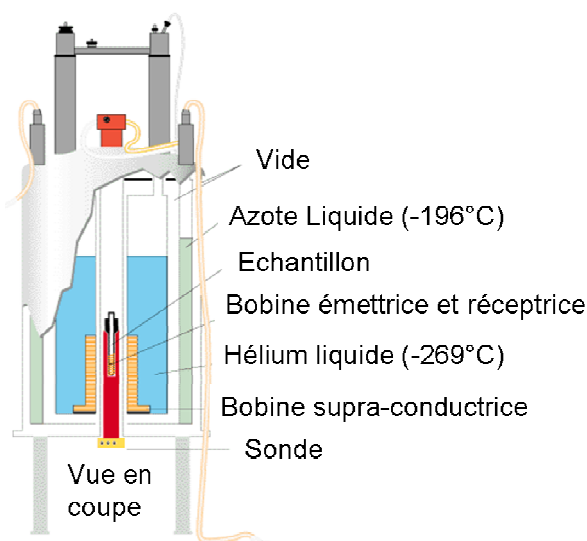


Figure 15 : Schéma d'un spectromètre à résonance magnétique nucléaire.

C'est une technique non destructive ne nécessitant pas de standard interne lorsqu'une quantification est nécessaire, et son couplage à une HPLC permet la séparation et l'identification de molécules inconnues dans un mélange complexe. Cependant, du fait de sa sensibilité modérée, et de son coût élevé, la spectrométrie de masse lui est généralement préférée. Ces deux techniques sont complémentaires, et

leur utilisation au cours d'une même étude lipidomique pourrait améliorer l'investigation de processus biologiques.

La spectroscopie vibrationnelle, dans proche infra-rouge, en Raman ou par infra-rouge à transformée de Fourier, présente quant à elle l'avantage d'une préparation d'échantillon réduite, voire nulle, ainsi que la possibilité de réaliser des analyses directement *in vivo* [61]. Elle est largement utilisée en imagerie dans l'analyse des tissus, biologiques ou non. C'est également un bon candidat pour le traitement des données par statistiques multivariées [96–99]. Cette technique permet d'analyser seulement certains acides gras et stérols, les phospholipides et sphingolipides [61]. De plus, elle n'offre pas la possibilité d'explorer la structure fine des molécules, ni d'effectuer un couplage avec la LC.

c) Spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est un outil de choix pour l'analyse des lipides, en raison de la grande sensibilité et de la sélectivité des appareils, du couplage possible avec la LC, de l'accès aux structures moléculaires fines mais aussi de la gamme étendue de polarité analysable.

Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur, ainsi que d'un détecteur. La source produit des ions gazeux à partir des molécules introduites. Celles-ci sont ensuite séparées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dans l'analyseur, avant d'être acheminées vers le détecteur [100].

La nature de la source d'ionisation utilisée dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées [100]. La source d'ionisation est une chambre externe, dans laquelle les ions sont formés avant d'être séparés par l'analyseur. Les sources d'ions peuvent se classer en source d'ionisation dure ou d'ionisation douce. Les ionisations dures, utilisées notamment lors de couplages à la chromatographie en phase gazeuse (impact électronique), fragmentent les molécules avant leur sortie de la source. Le nombre d'ions non fragmentés détectés sont donc bien inférieurs au nombre de fragments. Ce type de source fournit des informations structurales sur les molécules. Les ionisations douces, quant à elles, engendrent peu de fragmentations, il est donc possible d'analyser les ions sous leur forme initiale. Ce type de source fournit alors peu d'informations structurales.

Les sources les plus couramment utilisées en couplage LC-MS sont les sources à pression atmosphérique. La Figure 16 présente l'utilisation de ces sources en fonction de la polarité et de la masse moléculaire des analytes, elles permettent de détecter une grande variété de molécules.

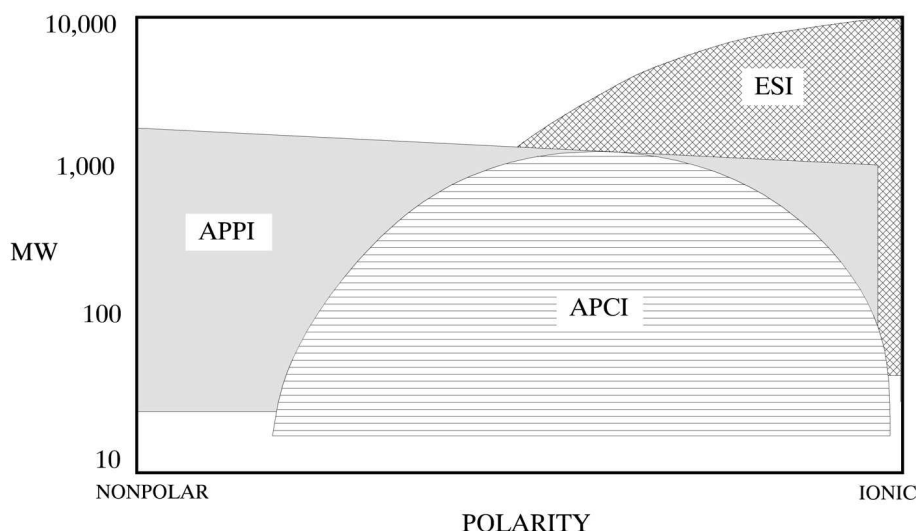


Figure 16 : Domaine d'utilisation des sources à pression atmosphérique utilisées en couplage LC/MS [100].

L'analyseur quadripolaire et la trappe ionique sont parmi les plus répandus, car ils sont relativement bien connus et il est actuellement possible de s'en équiper pour un prix raisonnable. Les sources d'ionisation douces les plus couramment utilisées en LC-MS sont des sources à pression atmosphériques (API), comprenant l'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). La source MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) présente également un intérêt dans l'analyse des lipides, mais ne peut pas faire l'objet d'un couplage avec un système de chromatographie liquide. Les technologies utilisées au cours de ces travaux sont décrites plus précisément ci-dessous.

c.1) Source Electrospray.

L'ionisation par électronébulisation ou ESI est une méthode d'ionisation douce, produisant des ions en phase gazeuse à partir d'ions préformés en solution. Elle est utilisable en couplage avec la chromatographie liquide, et produit peu ou pas de fragments. Elle est surtout utilisée pour analyser des molécules de haut poids moléculaire, polaires, dans des matrices biologiques.

Cette source permet la formation des ions par un processus de désolvatation-ionisation sous l'action d'un champ électrique intense [101–103]. Lors d'un couplage LC-MS, l'ESI est utilisée comme source d'ionisation externe. Le principe de fonctionnement est le suivant (voir Figure 18) :

- **Production de gouttelettes chargées.**

L'application d'un champ électrique entre le capillaire et la contre-électrode (de 3 à 5 kV) permet la formation de fines gouttelettes chargées en surface par éclatement du cône de Taylor, formé en sortie du capillaire par répulsion des charges de même signe présentes en surface du solvant. Ce potentiel appliqué peut être positif ou négatif selon la polarité des ions étudiés. Lors du couplage LC-MS, la formation du nébulisat est assistée par un gaz de nébulisation (azote).

- **Fission des gouttelettes chargées en gouttelettes filles.**

Durant le trajet vers la contre électrode, le solvant est évaporé, soit par la présence d'un gaz de séchage, soit par une augmentation de température. Deux théories ont été émises afin d'expliquer le phénomène responsable de la formation de gouttelettes filles, jusqu'à l'émission d'ions indépendants.

Dole *et coll.* [104] ont proposé le modèle de résidus chargés, dans lequel le solvant contenu dans les gouttelettes est progressivement évaporé, augmentant ainsi la densité de charge à leur surface. Lorsque le rayon de la gouttelette diminue sous la limite de stabilité de Rayleigh (voir Figure 17), elle explose en gouttelettes filles. Ces gouttelettes exploseront ensuite à leur tour, jusqu'à l'évaporation complète du solvant et l'obtention d'ions individualisés.

$$q_{Ry} = 8 \pi \sqrt{\epsilon_0 \gamma R^3_{Ry}}$$

Figure 17 : Expression de la limite de Rayleigh, exprimant la charge q en fonction du rayon R de la gouttelette, de la permittivité du vide ϵ_0 et de la tension de surface γ .

La seconde théorie, le modèle d'évaporation d'ions, a été décrite par Iribarne et Thomson [105, 106]. Ici, les gouttelettes n'exploseraient pas lorsque la limite de Rayleigh est atteinte, mais expulseraient une molécule de soluté directement à l'état gazeux, jusqu'à évaporation complète du solvant.

Les deux théories ne sont actuellement pas départagées, il semblerait que l'un

ou l'autre des phénomènes soit prépondérant en fonction de la taille des gouttelettes et du nombre de charges présentes [101].

- **Emission d'ions désolvatés en phase gazeuse.**

A la suite de la cascade d'explosions coulombiennes, le solvant est évaporé, et des ions en phase gazeuse sont formés puis acheminés vers l'analyseur.

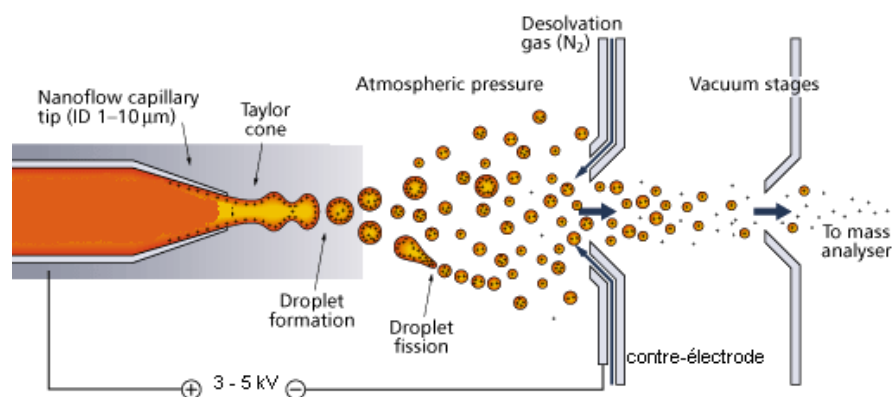


Figure 18 : Schéma de fonctionnement de la source electrospray.

Les avantages de la source ESI sont les suivants :

- ✓ La possibilité d'introduire les analytes en solution, permettant le couplage avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire.
- ✓ Une ionisation très douce, permettant d'analyser des molécules intactes, et d'étudier des interactions non covalentes.
- ✓ Une bonne sensibilité.
- ✓ La possibilité de former des ions multichargés, permettant l'analyse de molécules de très haut poids moléculaire.
- ✓ C'est la meilleure méthode pour analyser les molécules contenant des groupements polaires.

Le principal inconvénient de la source ESI est la suppression de signal pouvant survenir lors de la présence d'autres composés, tels que des sels, en solution. Une baisse significative de sensibilité est alors observée. Elle présente également des difficultés à ioniser des molécules peu polaires, telles que les lipides non polaires.

c.2) Source d'ionisation chimique à pression atmosphérique.

Le concept de l'APCI a existé avant celui de l'ESI [107], et est resté peu utilisé, essentiellement en couplage avec la GC, jusqu'aux années 1990, où son intérêt pour les analyses biologiques en LC/MS a été remarqué. L'APCI est une source d'ionisation moins douce que l'ESI, car elle peut conduire à une fragmentation des analytes. Elle permet d'analyser des molécules moins polaires qu'en ESI (Figure 16).

Contrairement à l'ESI, où l'ionisation des molécules s'effectue en solution, l'APCI conduit à la formation d'ions en phase gazeuse. Les solutés présents dans la phase mobile sont nébulisés à la sortie de la sonde APCI à l'aide d'un gaz, généralement de l'azote, et chauffés à haute température pendant leur trajet (entre 300 et 600°C). Le soluté est alors en phase gazeuse, voire dans un plasma, et une décharge corona est appliquée par une aiguille. L'azote présent forme alors des cations ($N_2^{+\bullet}$) par libération d'un électron, puis réagit avec des molécules d'eau présentes dans l'environnement de la réaction pour former des ions H_3O^+ et des radicaux $HO\bullet$, conduisant respectivement à la formation d'analytes ionisés positivement ou négativement [100, 107].

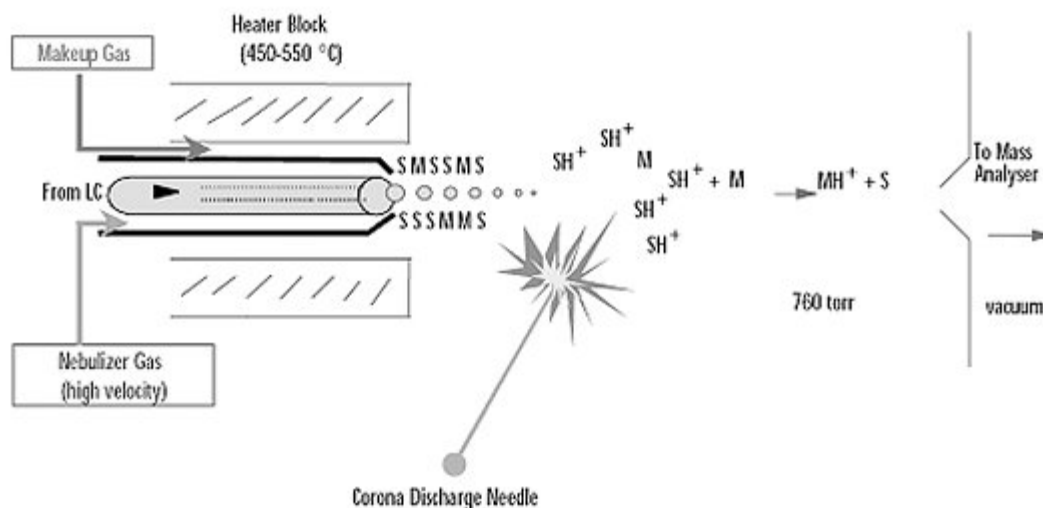


Figure 19 : Principe de fonctionnement de la source APCI.

La proportion d'ions négatifs ou positifs formés dépend de l'acidité ou de la basicité de la phase gazeuse présente au moment de la décharge corona. Puis, les ions négatifs ou positifs sont analysés en fonction du potentiel appliqué en sortie de source [107].

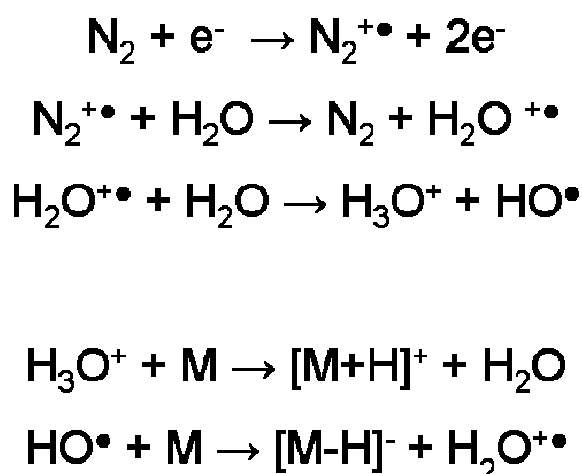


Figure 20 : Réactions intermédiaires impliquées dans l'ionisation des molécules en APCI [100].

Cette source présente l'avantage de mieux ioniser les molécules peu polaires, et donc les lipides neutres, ainsi que d'offrir une interface aisée avec la LC par bonne désolvatation des analytes. Cependant, l'énergie apportée par l'aiguille corona entraîne un apport d'énergie supérieur à celui observé en ESI, et il est possible d'observer des fragmentations en source, bien que les ions intacts soient également détectés [108-110].

c.3) Source de photoionisation à pression atmosphérique.

L'APPI est la source d'ionisation à pression atmosphérique la plus récente. Elle complète la gamme de solutés analysables par ESI ou APCI (Figure 16). Les premières techniques de photoionisation ont été décrites dans les années 1980-1990, d'abord comme détecteur en GC puis en couplage en MS, mais c'est au début des années 2000 que les premières sources APPI-MS couplées à l'HPLC sont apparues [111, 112].

Le principe d'ionisation est comparable à celui de l'APCI, le mécanisme de nébulisation étant le même, par contre l'ionisation est ici réalisée à l'aide d'une lampe, le plus souvent au krypton, délivrant des photons d'énergie comprise entre 9 et 11 eV (10,0 et 10,6 eV dans le cas des lampes au krypton). La plupart des solvants, ainsi que les composants de l'air, possèdent des énergies d'ionisation supérieures à ces valeurs, ils ne produisent donc pas de bruit de fond aux énergies utilisées dans la source. La plupart des analytes possèdent quant à eux des énergies d'ionisation plus faibles [112].

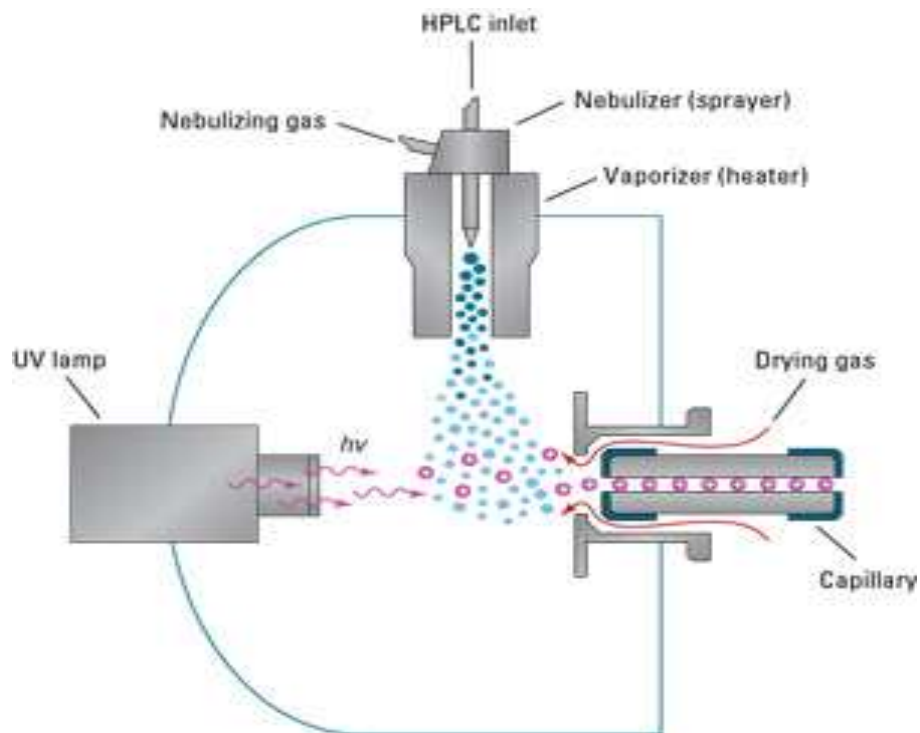
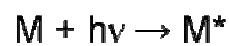


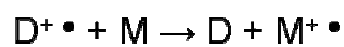
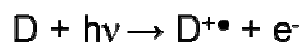
Figure 21 : Principe de fonctionnement de la source APPI (source Syagen).

Le mécanisme de formation des ions en mode positif peut s'expliquer comme suit :

Photoionisation directe :



Utilisation d'un dopant :



Ou

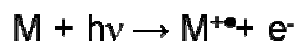
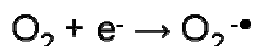


Figure 22 : Mécanismes possibles de formation d'ions en APPI en mode positif [112–114]. *M* est l'analyte, *D* le dopant.

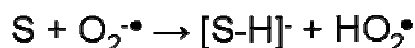
En mode négatif les principaux modes de formations d'ions sont les suivants :



Puis



Ou



Et

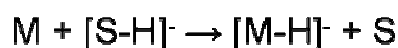


Figure 23 : Mécanismes possibles de formation d'ions en APPI en mode négatif [114–116]. *M* est l'analyte, *D* le dopant et *S* le solvant.

La photoionisation directe des analytes possède un faible rendement, notamment à cause de la présence du solvant dans lequel ils sont solubilisés. Les solvants utilisés en HPLC possédant des propriétés de photoionisation variées, un dopant est systématiquement ajouté, soit directement dans les phases mobiles, soit par un ajout post-colonne. Les solvants les plus utilisés sont le toluène et l'acétone, leur rôle est d'améliorer le rendement d'ionisation des analytes.

c.4) Analyseurs utilisés.

L'analyseur est la partie du spectromètre séparant les molécules selon leur rapport m/z . Les paramètres caractérisant un analyseur sont sa résolution, la gamme de rapports m/z qu'il peut analyser et sa vitesse de balayage. Le Tableau 2 indique les résolutions ainsi que les gammes de travail m/z des principaux analyseurs disponibles.

La résolution est définie comme la capacité par le spectromètre de fournir deux pics m/z distinguables pour deux ions de masses voisines. On admet que deux pics sont résolus lorsque l'intensité de la vallée entre les pics est égale à 10% de l'intensité du pic le plus faible. Pour un pic isolé, la résolution peut se déterminer de deux façons : par calcul du rapport entre la largeur du pic à 10% de sa hauteur et la masse étudiée, ou par calcul du rapport entre la largeur du pic à mi-hauteur et la masse étudiée. La résolution traduit donc la précision sur la mesure des rapports m/z des ions.

Analyseur	Résolution	Gamme m/z
Quadripôle	2 000	8 000
Magnétique	60 000	20 000
Temps de Vol (TOF)	20 000	500 000
Piège à ions (IT)	5 000	6 000
Orbitrap	100 000	4 000
Résonnance cyclotronique (FT-ICR)	1 000 000	4 000

Tableau 2 : Résolution et gamme de rapport m/z analysable par les principaux analyseurs [100].

Dans le cas d'un quadripôle, la résolution est dépendante de la vitesse de balayage, ainsi plus cette vitesse est élevée, moins la résolution est bonne. Les vitesses de balayage couramment utilisées permettent d'obtenir une résolution unitaire, c'est-à-dire que les m/z mesurées n'ont pas de chiffres significatifs après la virgule. Il est possible de réduire la vitesse de balayage afin d'obtenir jusqu'à 2 chiffres après la virgule, mais cela présente peu d'intérêt en couplage LC/MS. En effet, la diminution de la vitesse de balayage diminue le nombre de points décrivant les pics chromatographiques, et entraîne une baisse de sensibilité ainsi qu'une baisse de la résolution des pics. Les analyseurs à temps de vol ou orbitrap font partie d'une génération plus récente d'analyseurs à haute résolution, permettant d'obtenir des valeurs de m/z exactes.

Les analyseurs quadripolaires, utilisés au cours de ces travaux, sont décrits ci-après. Les autres principaux analyseurs rencontrés en spectrométrie de masse sont décrits en annexe H.

- L'ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE LINEAIRE OU FILTRE QUADRIPOLAIRE :

Un quadripôle linéaire est constitué de quatre électrodes, de section hyperbolique (voir Figure 24).

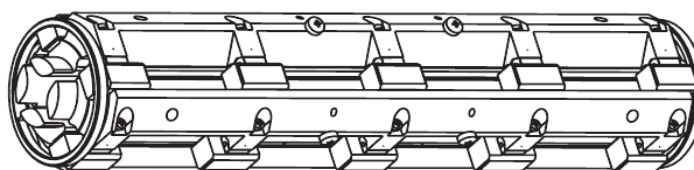


Figure 24 : Schéma d'un quadripôle.

Au cours d'une analyse, pour un quadripôle linéaire, les tensions U (continue) et $V\cos\omega t$ (alternative ou radiofréquence, ω représente la fréquence angulaire du courant et t le temps) des électrodes sont modulées (potentiel $U+V\cos\omega t$ pour deux électrodes opposées, et $-U-V\cos\omega t$ pour les deux autres, où ω représente la fréquence angulaire du potentiel radiofréquence, voir Figure 25), créant un champ électrique qui guide les ions vers le détecteur.

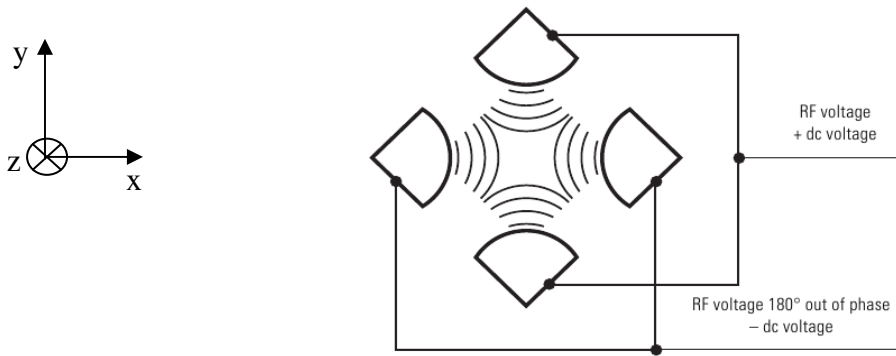


Figure 25 : Création du champ électrique au sein d'un quadripôle linéaire.

Il y règne un vide poussé (entre 10^{-5} et 10^{-7} mbar) afin d'éviter de dévier les ions de leur trajectoire. Ces derniers ont une trajectoire hélicoïdale, dont le rayon dépend des tensions appliquées et du rapport m/z . Un ion traversant un quadripôle possède une trajectoire stable, et son mouvement correspond à une solution des équations de Mathieu [117] :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + [a_u - 2q_u \cos(2\xi)]u = 0$$

Où $\xi = \omega t/2$, et $u = x$ ou y représente le déplacement de l'ion selon l'axe x ou l'axe y . Un changement de variable permet de faire intervenir les potentiels U et V :

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8eU}{m r_0^2 \omega^2}$$

$$q_u = q_x = -q_y = \frac{4eV}{m r_0^2 \omega^2}$$

Où m est la masse de l'ion, e la charge élémentaire, et r_0 est le rayon du cercle tangent aux quatre électrodes hyperboliques correspondant au rayon de champ libre. Un diagramme de stabilité des ions est réalisable à partir des solutions des équations de Mathieu. Plusieurs zones de stabilité sont ainsi décrites, la Figure 26 en représente

la première. La zone de stabilité est représentée dans un plan (q, a) . Pour des valeurs de q et a , et par conséquent des valeurs de U et V , comprises entre l'intersection de la ligne de balayage en masse et la zone de stabilité, un ion de masse m aura une trajectoire stable sur les axes x et y . Il sera alors acheminé selon l'axe z jusqu'au bout de l'analyseur. Lors d'un balayage m/z pendant une acquisition en Full Scan, la zone de stabilité de chaque ion appartenant à la gamme de travail est successivement balayée. Tous les ions sont alors successivement acheminés vers le détecteur présent après l'analyseur. Enfin, plus le sommet de la zone de stabilité des ions est fin, plus la résolution de l'analyseur est grande.

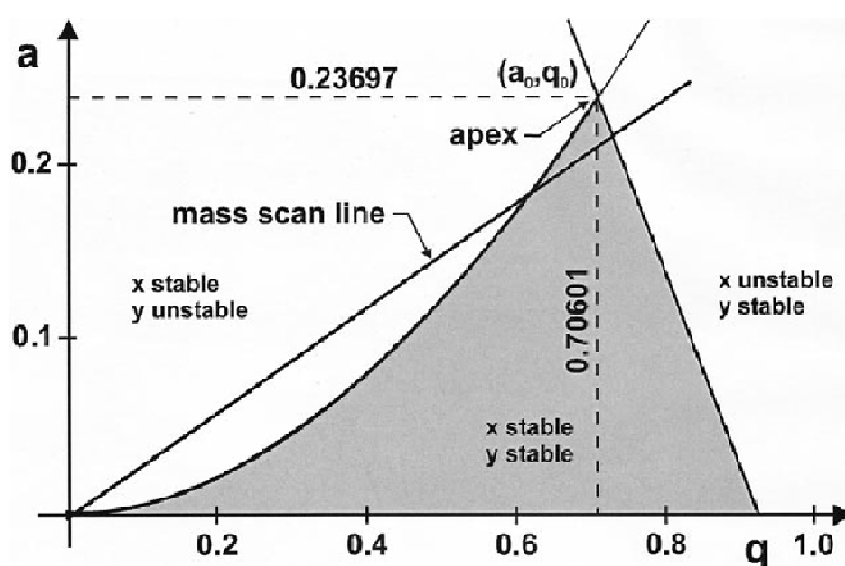


Figure 26 : Première région de stabilité obtenue sur le diagramme de solutions des équations de Mathieu, sur un plan (q, a) [117]. La zone grisée correspond à la région de stabilité pour un ion donné, et la droite correspondant à un balayage en masse d'un spectromètre est représentée.

- LA TRAPPE D'IONS :

Une trappe ionique est constituée d'une électrode annulaire et de deux électrodes « chapeau » (Figure 27). Dans le cas d'une trappe ionique, les ions sont introduits à travers l'une des électrodes « chapeaux ». Un courant électrique appliqué à l'électrode annulaire produit un champ magnétique homogène au centre de la trappe où sont piégés les ions.

Ils ont alors un mouvement oscillant et cyclique dont l'amplitude et la fréquence dépendent de leur rapport m/z et de la valeur du courant électrique (Figure 28).

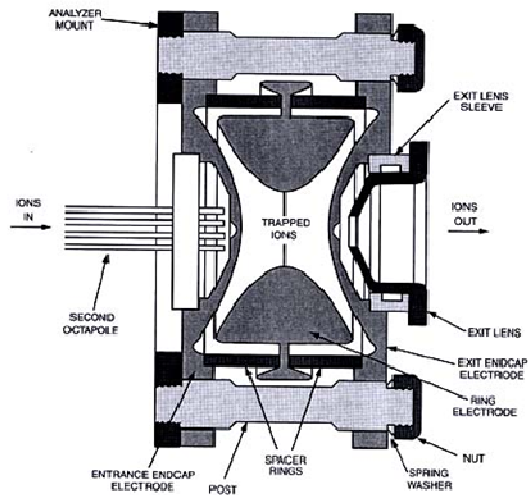


Figure 27 : Schéma d'une trappe ionique.

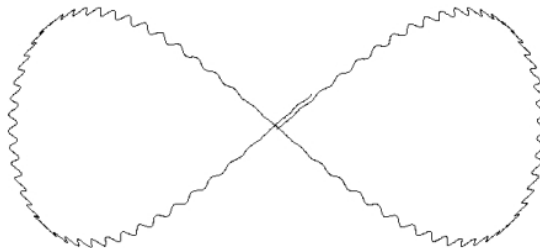


Figure 28 : Schéma de la trajectoire décrite par les ions isolés au sein d'une trappe ionique.

De l'hélium est présent dans la trappe afin de provoquer des collisions avec les ions, ceci diminue l'amplitude de leur trajectoire et évite qu'ils ne s'échappent du champ magnétique. Un balayage de la tension appliquée à l'électrode annulaire, pour une fréquence donnée des électrodes « chapeaux », induit la résonance des ions de rapport m/z croissant. L'amplitude de leur trajectoire augmente alors brutalement et ils sont éjectés de la trappe : une moitié est éjectée vers l'électrode d'entrée, et l'autre moitié est éjectée vers l'électrode de sortie où se situe le détecteur.

La stabilité des ions au sein de la trappe est également décrite par les équations de Mathieu décrites plus haut [118]. Le diagramme de stabilité alors obtenu est présenté en Figure 29. La région en blanc correspond à la zone de stabilité des ions dans la trappe.

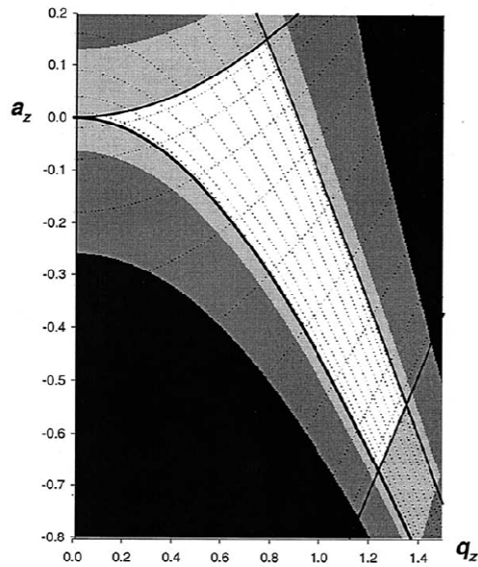


Figure 29 : Diagramme de stabilité obtenu pour une trappe ionique. La première région est représentée par la zone blanche [118].

Le type de trappe ionique décrit jusqu'à présent correspond aux premières trappes, dites trappes 3-D, largement diffusées, mais progressivement supplantées par des trappes linéaires, dites trappes 2-D. La Figure 30 présente schématiquement un tel analyseur.

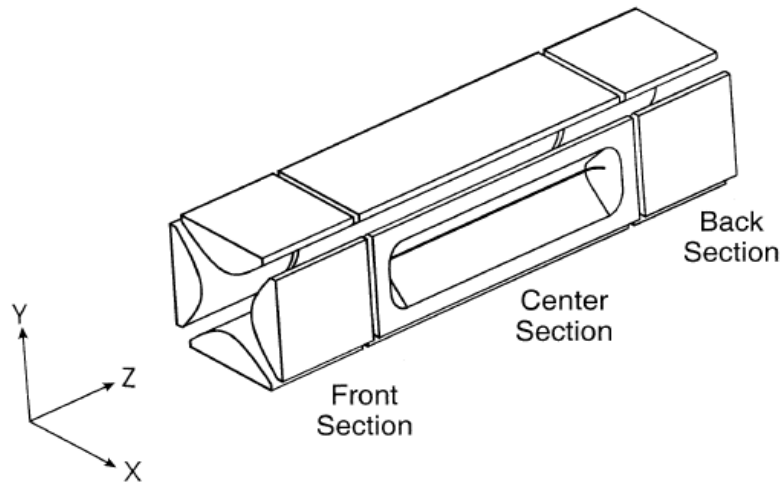


Figure 30 : Schéma d'une trappe linéaire ou trappe 2-D [119].

De la même manière qu'un filtre quadripolaire décrit plus haut, les tensions appliquées aux électrodes deux à deux permettent de stabiliser les ions. Ceux-ci sont capturés dans la trappe selon l'axe z grâce à des potentiels appliqués aux extrémités de la trappe linéaire [119-121]. Les ions peuvent subir plusieurs fragmentations avant d'être éjectés vers le détecteur. Il existe alors deux façons de libérer les ions : soit axialement selon l'axe z , soit radialement, c'est-à-dire perpendiculairement à l'axe z

entre les électrodes. L'éjection axiale des ions offre une vitesse élevée d'analyse, mais une faible résolution, tandis que l'éjection radiale offre une vitesse d'analyse plus faible pour une bien meilleure résolution [119]. Le principal avantage de ce type de trappe par rapport aux trappes 3D est le gain en sensibilité, dû à une plus grande capacité de stockage des ions.

La source est généralement reliée à l'analyseur par l'intermédiaire d'une interface. Celle-ci est composée de champs électrostatiques (lentilles et multipôles) qui permettent d'extraire les ions de la source et de les focaliser vers l'entrée de l'analyseur. Les champs électrostatiques appliqués peuvent être de l'ordre de quelques volts. Le rôle des lentilles est également de créer un gradient de vide entre les différentes parties du spectromètre.

Les deux types d'analyseurs quadripolaires offrent les modes d'acquisition suivants :

➤ Le mode Full Scan.

Ce mode est utilisé afin d'analyser tous les ions produits dans la source. On parle de balayage en « full scan », car les valeurs des tensions U et V des quadripôles sont balayées afin de laisser passer tous les ions. En LC/MS, ce mode d'acquisition fournit la masse de chaque composé d'un mélange inconnu. Cette information, en plus du temps de rétention en LC, aide à l'identification des composés. Le full scan est également le mode utilisé lors d'infusion d'analytes directement dans la source afin d'en optimiser les réglages. Enfin, c'est dans ce mode que les analytes sont détectables dans un premier temps, avant de réaliser de la MS^n . Ce mode d'acquisition est peu sensible par rapport aux autres modes, il est utile pour explorer un échantillon avant d'effectuer des analyses plus spécifiques.

➤ Le mode Selected Ion Monitoring (SIM).

Ce mode consiste à ne détecter qu'un seul ou un faible nombre d'ions. Dans ce cas, le spectromètre de masse fonctionne comme un filtre, programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés à des tensions U et V données. Pour une trappe ionique, le ou les ions d'intérêts sont isolés dans la trappe par balayage de toutes les fréquences sauf leur fréquence de résonance. Le gain de sensibilité est très important, car cette technique augmente le signal associé aux

analytes en diminuant le bruit de fond. En effet, pour un quadripôle, sachant que la durée de balayage des ions dépend de la gamme de m/z à balayer, si peu d'ions sont analysés, alors le temps consacré à la détection de ces ions est allongé par rapport au mode full scan. D'autre part, les ions générant du bruit de fond ou des pics chromatographique interférents ne sont plus détectés, d'où une baisse du bruit de fond.

Ce mode est plus sensible que le full scan, il est peu informatif et n'est utilisable que lorsque le produit recherché est connu. Le SIM est très utile pour l'analyse de traces en milieux complexes. Il est utilisé entre autres pour des analyses environnementales ainsi qu'en toxicologie.

➤ La spectrométrie de masse en tandem :

○ **Recherche d'ions fragments.**

Dans ce cas, le premier quadripôle (Q1) sélectionne un ion précurseur, ou ion parent. Celui-ci est fragmenté dans le deuxième quadripôle (Q2), également nommé « cellule de collision », puis le troisième quadripôle (Q3) guide les ions fragments vers le détecteur. Deux façons d'utiliser le Q3 existent alors : soit il fonctionne en full scan, soit il fonctionne en SIM. L'intérêt du full scan réside dans l'obtention d'un spectre d'ions issus d'une molécule sélectionnée dans le Q1, pour des études structurales. Lorsque le Q3 est utilisé en SIM, cela correspond à effectuer du Selected Reaction Monitoring (SRM) ou Multiple Reaction Monitoring (MRM), selon les constructeurs de spectromètres. Le but est d'associer la grande sensibilité du mode SIM à la spécificité de la fragmentation pour rechercher et doser un analyte. Cette technique est utilisée pour le dosage de médicaments, ou encore dans le contrôle anti-dopage.

Dans le cas de la trappe ionique, c'est en se plaçant à la fréquence de résonance de l'ion isolé par SIM, mais à une tension ne l'éjectant pas de la trappe, que son énergie cinétique augmente, permettant ainsi l'augmentation de son énergie interne par collisions avec les atomes d'hélium. La fragmentation se produit après une élévation suffisante de son énergie interne. Ces opérations peuvent être renouvelées plusieurs fois, on parle alors de MS^n . Cela représente un outil très puissant pour des études structurales. Les trois étapes sont séparées dans le temps tandis qu'elles sont séparées dans l'espace dans le cas du triple quadripôle. Les énergies de collision mises en

œuvre lors d'analyses en MSⁿ dépendent du type d'analyseur utilisé, et les schémas de fragmentation dépendent de l'énergie appliquée.

- **Recherche d'ions précurseurs (triple quadripôle uniquement).**

Ici, le Q1 fonctionne en full scan, tandis que le Q3 n'isole qu'un seul ion fragment. Il est alors possible de mettre en évidence les ions conduisant à un fragment déterminé. Ce mode est utile lors d'études structurales. Par exemple, la recherche de phosphatidylcholines dans un échantillon peut ainsi être réalisée en recherchant les molécules conduisant à la formation d'un fragment m/z 184 (ion phosphocholine) en ionisation positive.

- **Perte de neutres (triple quadripôle uniquement).**

Les Q1 et Q3 balayent simultanément la gamme de m/z définie, mais avec un décalage défini par l'utilisateur. Ce décalage de m/z correspond à un fragment caractéristique, neutre, qu'une ou plusieurs molécules sont susceptibles de perdre lors du passage dans le Q2. Ce mode peut être utilisé afin de rechercher les ions possédant des voies de fragmentation communes.

Ces trois derniers modes d'acquisitions offrent une grande sensibilité, ils permettent également d'obtenir des informations structurales sur les molécules étudiées.

B. Les « -omiques ».

Les disciplines en « -omique » ont commencé à apparaître à la fin des années 1990, avec dans un premier temps la génomique. Celle-ci peut être définie comme l'étude des modifications dans l'ensemble du génome d'un organisme, c'est-à-dire l'intégralité des gènes de cet organisme [122-124]. Suivant le même principe sont alors apparus la protéomique, constituant l'étude de l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'un organisme, la transcriptomique, constituant en l'étude des ARN exprimés par un organisme biologique, la métabolomique, constituant en l'étude de l'ensemble des métabolites présents dans un organisme, la lipidomique, constituant en l'étude de l'ensemble des lipides d'un organisme [122-125]. D'autres catégories moins connues sont la phéno-mique, l'épigénomique ou la ligandomique, s'attachant respectivement à l'étude des phénotypes, des méthylations du génome, et des petites

molécules organiques [122].

L'objectif principal de ces différents domaines est de faire le lien entre différentes voies métaboliques, et idéalement entre toutes les voies métaboliques, afin de comprendre le fonctionnement d'un système biologique dans son ensemble [123, 125, 126]. Il serait alors possible de prévoir le comportement d'un organisme biologique [127, 128].

1. Définition de la lipidomique.

La lipidomique a été définie comme « la caractérisation complète des espèces moléculaires constituant les lipides et de leur rôle biologique en lien avec l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme et le fonctionnement des lipides, cela incluant la régulation des gènes » [125]. Ainsi, le rôle d'une étude lipidomique est de quantifier les lipides en un lieu donné de l'organisme ou de la cellule étudiée, à un moment donné de son cycle de vie. L'organisme, ou la cellule, est généralement soumis à un stress ou a des variations du milieu extérieur afin de mesurer l'impact d'un traitement médicamenteux, des apports nutritionnels ou de variations de température par exemple. Ce domaine des « -omiques » a bénéficié, au même titre que les autres domaines, des avancées technologiques récentes autant du point de vue du matériel d'analyse, de plus en plus sensible et résolutif, que du point de vue du traitement de données, avec l'essor des méthodes de traitements statistiques multivariées (chimométriques) indispensables au traitement de la quantité considérable de données acquises [129]. Dans la pratique, une étude lipidomique se découpe en trois grandes étapes : d'abord la préparation d'échantillon, puis l'analyse, et enfin le traitement de données conduisant à la mise en évidence de signaux (lipides) d'intérêt, l'identification et la quantification étant réalisées par la suite si nécessaire.

2. Stratégies d'investigations.

Plusieurs approches sont possibles lors de la conduite d'une analyse lipidomique [124, 125] (voir Figure 31) :

- Analyse non-ciblée :

Cette méthode ne tient compte d'aucun *a priori* concernant l'échantillon étudié.

L'objectif est d'analyser la totalité des lipides, ou une fraction des lipides, qu'il contient. Le traitement des données nécessite alors un ou plusieurs outils chimométriques afin de faire ressortir la ou les espèces moléculaires d'intérêt.

Les systèmes analytiques couramment utilisés font intervenir un couplage LC-MS, avec des triples quadripôles (TQ) ou des trappes ioniques (IT), et des spectromètres de masse à haute résolution tels que des MS à Transformée de Fourier (FT-MS), MS quadripolaire à temps de vol (Q-TOF), MS Orbitrap, ou encore en TOF équipé d'une source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

- Analyse en « mise au point » (ou *focused lipidomics*) :

L'objectif est ici d'étudier une catégorie ou une classe de lipides déterminée, par utilisation de techniques analytiques permettant de détecter toutes les espèces moléculaires appartenant à cette catégorie.

Pour cela, les mêmes outils analytiques précédemment cités sont applicables. Les modes d'acquisitions MS permettant de répondre à cette problématique sont la perte de neutre ou scan d'ion précurseur, lorsqu'un fragment spécifique de la classe de lipide étudiée est connu. Le développement d'une séparation en chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse peut s'avérer utile pour séparer les espèces moléculaires de la classe d'intérêt en amont du spectromètre de masse.

- Analyse ciblée :

Dans ce cas, seules des molécules bien précises sont analysées. Les expériences sont le plus souvent réalisées en spectrométrie de masse en tandem (MS²) ou en fragmentation à plusieurs étapes (MSⁿ), afin de détecter les ions parents recherchés avec leurs ions fragments spécifiques. Cette stratégie est couramment utilisée dans l'étude des voies de signalisations impliquant les lipides, ou pour la recherche de substances dopantes ou illicites.

- Analyse « shotgun » [125, 130-132] :

Cette stratégie expérimentale propose un important gain de temps par la suppression de l'étape de séparation en LC précédant l'analyse par MS.

L'échantillon préalablement extrait est directement injecté dans la source du spectromètre de masse. Les ions sont alors séparés au sein de la source par leurs propriétés d'ionisation différentes en fonction de la classe lipidique à laquelle ils appartiennent. Puis ils sont séparés selon leur rapport masse sur charge (m/z) soit nativement, soit après formation d'adduits avec des anions ou des cations ajoutés à l'échantillon.

La technique « shotgun » peut être utilisée dans le cadre d'une analyse ciblée, non-ciblée ou « mise au point », car il est tout à fait possible de paramétrer l'appareillage dans le but d'analyser tout ou partie du lipidome.

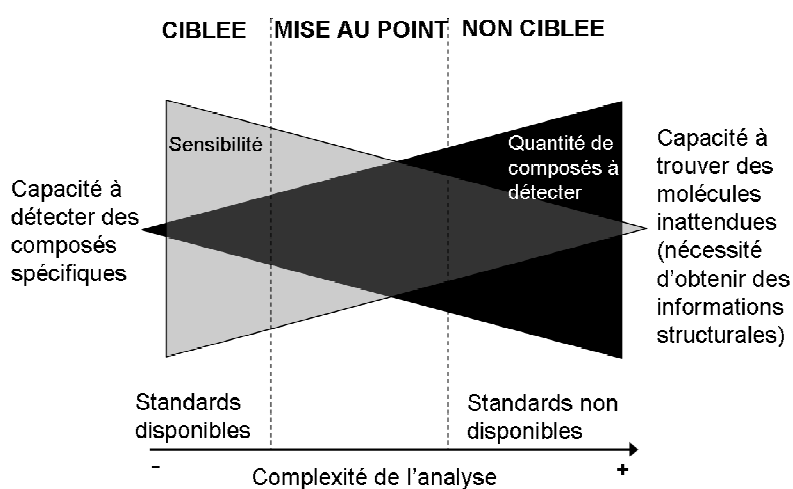


Figure 31 : Schéma de la complexité des différentes stratégies lipidomiques associée à la quantité de biomarqueurs potentiellement mis en évidence [125].

Il serait alors idéalement possible de conduire une analyse non-ciblée des lipides, mais en raison de suppressions de signaux pouvant survenir entre les différents lipides, une telle stratégie est généralement décrite dans le cadre d'analyses en « mise au point » ou ciblées.

C. Chimométrie : Méthodes statistiques multivariées.

1. Définition.

Le terme « chimométrie » a été utilisé pour la première fois en 1972, et peut être défini comme « la discipline utilisant les mathématiques, les statistiques, ainsi que d'autres méthodes de logique formelle pour définir ou sélectionner des expériences et procédés de mesures optimaux, et pour fournir un maximum d'informations

pertinentes par l'analyse de données chimiques » [133]. Cette discipline regroupe plusieurs aspects de traitements de données, dont les méthodes statistiques multivariées (analyse en composante principale PCA, méthode des moindres carrés partiels PLS, et leurs variantes), les méthodes de classification (data clustering), ou encore les plans d'expériences. Les deux premiers cas sont plutôt utilisés dans la recherche d'informations pertinentes à partir de données expérimentales, tandis que les plans d'expériences sont généralement utilisés pour optimiser ou évaluer l'importance des paramètres expérimentaux.

Nous commencerons ici par décrire le principe de la PCA, permettant de comprendre ensuite le principe de la PLS utilisée, puis nous décrirons le principe général des plans d'expériences avant d'explorer les spécificités de ceux cités au cours des présents travaux.

2. Analyse en Composante Principale (PCA).

a) Principe.

Le principe de la PCA est de réduire le nombre de dimensions dans lequel sont représentées les données d'une expérience. Cela permet de mettre en évidence des tendances au sein des données, et de pouvoir détecter des similitudes ou des différences entre différents échantillons par exemple [134-138]. Dans la pratique, le calcul d'une PCA permet de trouver la ou les directions de l'espace sur lesquelles la variance au sein des données est maximale. Ces directions, ou composantes principales, définissent un nouveau référentiel sur lequel des groupes séparés de données peuvent être mis en évidence. Il est alors possible de retrouver le ou les paramètres causant ces séparations.

En résumé, l'objectif est de diminuer le nombre de dimensions dans lesquelles sont représentées les données expérimentales afin de faciliter leur interprétation.

b) Calcul.

Dans un premier temps, il est nécessaire de centrer les données. Ainsi, les variables sont soustraites à leur moyenne. Supposons qu'une expérience fournisse i observations (i acquisitions en couplage LC-MS) constituées de z variables ou attributs (z intensités durant tout un chromatogramme par exemple). La matrice des données a

donc la forme suivante :

$$X_{i z} = \begin{pmatrix} a_1 & b_1 & \dots & z_1 \\ a_2 & b_2 & \dots & z_2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_i & b_i & \dots & z_i \end{pmatrix}$$

Les valeurs sont alors centrées sur la moyenne, en calculant : $X = X_{i z} - \bar{X}_z$.

Puis la matrice des covariances des données est calculée, comme ci-dessous :

$$C = \frac{1}{z} X X^T$$

Où C dans un espace à z dimensions, correspond à la matrice suivante :

$$C = \begin{pmatrix} cov(a, a) & cov(a, b) & \dots & cov(a, z) \\ cov(b, a) & cov(b, b) & \dots & cov(b, z) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ cov(z, a) & cov(z, b) & \dots & cov(z, z) \end{pmatrix}$$

Les aspects remarquables de cette matrice sont la présence des variances de chaque dimension sur la diagonale, en effet $cov(a,a)=var(a)$, ainsi qu'une symétrie des valeurs par rapport à cette même diagonale, car $cov(a,b)=cov(b,a)$.

Puis vient la détermination des *eigenvectors* (vecteurs propres) et *eigenvalues* (valeurs propres) qui permettront de déterminer les composantes principales du modèle, selon l'égalité suivante :

$$C v = \lambda v$$

Où v correspond à l'*eigenvector*, et λ correspond à l'*eigenvalue* associée. Chaque couple (λ, v) détermine une composante principale (PC) du modèle calculé par rapport au référentiel initial [134, 139-141]. Il faut noter que la première composante calculée explique toujours la plus grande part de variance au sein des données, de plus chaque nouvelle composante principale calculée sera perpendiculaire aux précédentes.

Une fois les composantes principales calculées, il est nécessaire de connaître les coordonnées des observations dans le nouvel espace défini. Pour cela, les *loadings*,

correspondant à la contribution ou au poids de chaque variable ou attribut dans le calcul, et les *scores*, correspondant aux coordonnées des observations sur les composantes, peuvent être déterminés. Les *loadings* sont les coefficients appliqués aux variables initiales pour obtenir leurs *scores* sur les composantes principales.

Voici comment la matrice des variables peut être décomposée, pour un calcul de deux composantes principales :

$$\begin{array}{c} X \\ \square \end{array} = \begin{array}{c} t_1 \\ \square \end{array} \begin{array}{c} p_1 \\ \square \end{array} + \begin{array}{c} t_2 \\ \square \end{array} \begin{array}{c} p_2 \\ \square \end{array} + \dots + \begin{array}{c} E \\ \square \end{array}$$

Les vecteurs t_i représentent les scores, les vecteurs p_i représentent les loadings, et E est la matrice résiduelle comportant du bruit de fond et une part de données non modélisées avec les composantes calculées [140, 141].

c) **Exemple.**

A titre d'exemple, Bellomarino *et coll.* [142] ont analysé les composés phénoliques de différentes cuvées de vins australiens, entre 1971 et 2003. Les données ont été acquises par LC-MS, puis traitées avec une PCA et une PLS. Les scores des différents vins peuvent être représentés sur les trois premières composantes principales (PC). Sur PC1 et PC2, 74% de variance sont expliqués, tandis que sur PC1 et PC3, 67,5% de variance sont expliqués.

La représentation selon les PC 1 et 2 montre une séparation des vins en quatre groupes distincts, tandis que la représentation selon les PC 1 et 3 montre une séparation de deux années par rapport aux autres.

Les auteurs ont ensuite pu identifier les composés responsables de ces discriminations entre groupes (acide tartarique, catéchine et acide sinaptique, plus présents dans les vins jeunes).

3. Analyse discriminante en Moindres Carrés Partiels (PLS).

a) Définition.

Cet algorithme a été développé par Wold *et coll.* dans les années 1980 [143, 144], et est une variante de la PCA. Le principe est de relier deux matrices de variables X (les données) et Y (les réponses, Y dépend donc de X) dans un premier temps, afin de pouvoir prédire des Y_2 à partir d'un set de données X_2 dans un deuxième temps. Le traitement statistique est donc orienté, contrairement à la PCA qui est réalisée *a priori*, car la matrice des Y est connue pour le calcul initial.

b) Calcul.

Pour cela l'algorithme NIPALS (moindres carrés partiels non-itératifs) est appliqué. Pour une matrice de variables X_i , le vecteur t_i est sélectionné à partir de n'importe quelle colonne de X_i . Puis le calcul des *loadings* p_j est réalisé comme suit :

$$p_j = \frac{X_j^T t_j}{t_j^T t_j}$$

Puis suit une étape de normalisation :

$$p_j = \frac{p_j}{|p_j|}$$

Le vecteur colonne est alors vérifié par le calcul suivant :

$$t_j = \frac{X_j p_j}{p_j^T p_j}$$

A cette étape, la convergence du modèle est vérifiée. Si la différence entre le vecteur colonne calculé et le vecteur choisi initialement est supérieure à un seuil défini, alors les *loadings* sont recalculés jusqu'à ce que la convergence soit acceptable. La composante principale ainsi déterminée est enfin retirée de la matrice de données X_i de départ, et donne une matrice résiduelle E , similaire à celle obtenue précédemment dans le calcul de PCA :

$$E_j = X_j - t_j p_j^T$$

Le calcul de la composante principale suivante s'effectue en appliquant le même algorithme en utilisant la matrice E_j comme matrice de données de départ, et ainsi de suite.

Cet algorithme de base a été modulé par la suite afin de proposer des variantes de la PLS, telles que la régression linéaire multiple (MLR), la régression de variables latentes (LVR) ou encore la régression ridge (RR) [145, 146]. Par ailleurs, des algorithmes de prétraitement des données ont été développés afin de réduire autant que possible la part de bruit de fond présente dans la matrice de données X [146–150]. Ce sont des filtres de correction orthogonale du signal (OSC), dont l'objectif est de supprimer de la matrice des X la part d'information non corrélée à la matrice des Y . Ce principe peut être simplement décrit par :

$$X = t_{osc} p_{osc}^T + E$$

Dans ce cas, la matrice E , contenant les données filtrées, est utilisée par la suite dans le traitement PLS.

c) Exemple.

A titre d'exemple, reprenons l'étude des vins réalisée par Bellomarinno *et coll.*[142]. L'âge peut être prédit par le modèle PLS calculé par rapport à l'âge réel des vins. La droite décrite est directement proportionnelle et témoigne de la bonne adéquation du modèle, et donc de son bon pouvoir prédictif. A l'observation du poids des variables utilisées pour le calcul du modèle, la valeur négative observée pour l'acide tartrique, la catéchine et l'acide sinaptique montre que ces dérivés phénoliques sont présents en plus grande quantités dans les vins jeunes que dans les vins plus âgés.

D'un point de vue pratique, que ce soit pour la PCA ou la PLS, les données acquises en couplage LC-MS doivent subir un pré traitement avant d'être injectées dans les algorithmes. Contrairement à des spectres IR ou RAMAN, toujours parfaitement alignés sur l'axe des abscisses (longueurs d'ondes), des séparations obtenues en HPLC présentent toujours de légères variations de temps de rétentions, et ne sont donc pas superposables sans corrections préalables. Pour cela plusieurs prétraitements, tels qu'une détection de pics pour diminuer le bruit de fond et la lourdeur des fichiers informatiques générés, et un alignement des chromatogrammes,

sont réalisables à l'aide de logiciels dédiés (MZmine ou MetAlign par exemple) ou de modules développés sous MatLab[®] ou SciLab[®].

4. Plans d'expériences.

a) Définition.

Les plans d'expériences permettent de récolter un maximum d'informations sur une expérience en un minimum de tests [151, 152]. Il est ainsi possible d'étudier l'impact de paramètres expérimentaux (phase mobile, débit ou température en HPLC ; paramètres de sources en MS) sur les mesures réalisées, ou encore d'optimiser ces paramètres, mais également d'étudier les variations d'un paramètre biologique.

Il existe plusieurs types de plans d'expériences (factoriels, fractionnaires, Plackett Burman, D-optimaux, etc), en fonction de l'information ou de l'objectif recherché par l'expérimentateur. Cependant tous reposent sur une même base de départ. Plaçons-nous dans le cas d'un plan factoriel à deux niveaux.

Il faut tout d'abord définir le nombre de paramètres, ou facteurs, *a priori* indépendants, à étudier. Par exemple, pour l'optimisation de paramètres de source en MS, une dizaine de paramètres peuvent être choisis : températures, gaz de nébulisation, gaz auxiliaire, énergie de collision, etc. Puis une valeur basse (-1) et une valeur haute (+1) sont définies arbitrairement pour chaque facteur. Enfin, il est nécessaire de choisir le signal, ou réponse, mesuré afin de suivre l'influence des facteurs sur l'expérience. La réponse peut être une intensité de signal, une aire de pic, un facteur de réponse, etc. Dans ce type de plan, le nombre d'essais à réaliser est de 2^n , où n est le nombre de facteurs étudiés. Le Tableau 3 présente un exemple de plan factoriel à 2 facteurs (température et pression), avec la répétition du point central, les réponses Y de chaque essais, ainsi que les effets de chaque facteur. Les signes « + » et « - » désignent respectivement la valeur haute et la valeur basse du paramètre pour l'essai observé.

Essais	T°	P	Réponse Y
E1	+	+	Y1
E2	+	-	Y2
E3	-	+	Y3
E4	-	-	Y4
C1	0	0	Y _{C1}
C2	0	0	Y _{C2}
C3	0	0	Y _{C3}
C4	0	0	Y _{C4}
C5	0	0	Y _{C5}
Effets	a_T	a_P	

Tableau 3 : Exemple de plan d'expérience factoriel à 2 facteurs.

La Figure 32 représente sur un graphe le plan d'expérience réalisé. Les points E1,..., E4 représentent chacun un test expérimental avec les conditions opératoires correspondantes, le point C est le point central répété. Les réponses mesurées pour chaque test permettent de décrire une surface de réponse, facilement représentable lors de l'étude de deux facteurs, mais plus abstraite sur un nombre supérieur de facteurs.

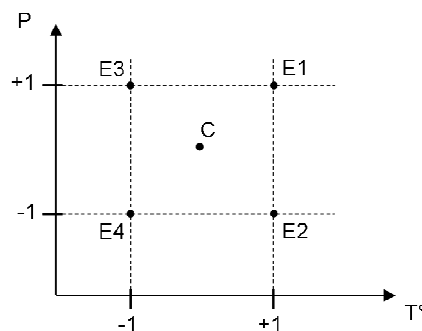


Figure 32 : Schéma d'un plan d'expérience à deux facteurs (température et pression ici), avec un point central.

Dans le cas de l'exemple Figure 32, les valeurs de réponse obtenues pour chaque test pourraient être reportées sur la troisième dimension. La Figure 33 schématise le type de surface obtenue pour cet exemple. Ici, nous pourrions conclure sur le bénéfice de fixer la température du système à une valeur basse, tandis que la pression devrait être plutôt réglée sur une valeur haute.

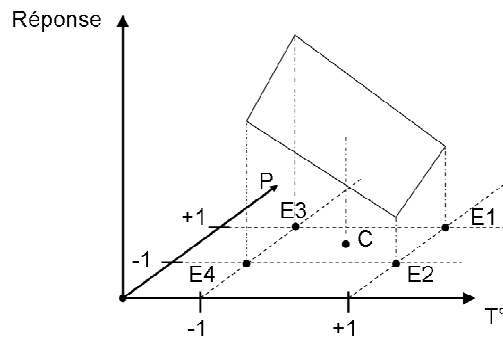


Figure 33 : Exemple de surface de réponse pour un plan d'expérience à deux facteurs (température et pression).

Dans ce type de plan, seule une partie de la surface de réponse est explorée, délimitée par les paramètres haut et bas des facteurs définis par l'expérimentateur. Si une optimisation fine des paramètres est souhaitée, des plans d'optimisations effectuent une translation de la surface de réponse à étudier, et par conséquent une translation des valeurs des paramètres à tester, dans le sens où la meilleure réponse a été obtenue dans le cas initial. Un nouveau plan est alors généré, de nouveaux test expérimentaux effectués, et une nouvelle surface de réponse modélisée. Une surface plus étendue peut être explorée ainsi de proche en proche, jusqu'à ce que l'optimisation soit jugée suffisante. De même, les facteurs étudiés ne sont pas forcément indépendants, et il est possible de prendre en compte leurs interactions dans le calcul. Le Tableau 4 présente la prise en compte des interactions entre les facteurs de l'exemple du Tableau 3.

Essais	T°	P	T°P	Réponse Y
E1	+	+	+	Y1
E2	+	-	-	Y2
E3	-	+	-	Y3
E4	-	-	+	Y4
C1	0	0		Y _{C1}
C2	0	0		Y _{C2}
C3	0	0		Y _{C3}
C4	0	0		Y _{C4}
C5	0	0		Y _{C5}
Effets	a _T	a _P	a _{TP}	

Tableau 4 : Exemple de plan d'expérience à deux facteurs, tenant compte de l'interaction entre température et pression.

Les signes de la colonne d'interaction entre les deux facteurs sont obtenus à partir des signes des facteurs, et suivent la règle des signes d'un produit. D'un point de vue mathématique, la formule générale d'un plan peut s'exprimer ainsi [151, 152] :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e$$

Où y correspond à la réponse obtenue à chaque test $i, j, etc.$ sont les différents facteurs étudiés, $a_{i,j,etc}$ sont les coefficients du modèle mathématique à déterminer à partir du plan d'expérience et représentent les effets de chaque facteur sur la réponse, $x_{i,j,etc}$ sont les valeurs hautes ou basses attribuées à chaque facteur, et e regroupe l'erreur et le manque d'ajustement entre le modèle calculé et le modèle réel. Il est possible de représenter cette écriture sous forme matricielle :

$$y = X a + e$$

Où y est un vecteur colonne contenant les réponses, X est la matrice du modèle comportant les valeurs choisies pour les facteurs, a est le vecteur colonne des coefficients du modèle à déterminer, et e est le vecteur des écarts du modèle.

b) Plan factoriel complet.

L'annexe J présente un exemple de plan factoriel complet pour l'optimisation des paramètres de source en couplage LC-ESI/MS sur la trappe ionique Esquire (Bruker) utilisée dans une partie des travaux réalisés. Les résultats sont présentés en préambule de la première publication présentée, en partie II.

c) Plan d'analyse d'effets : Plackett-Burman.

Le plan de Plackett-Burman [153] permet d'obtenir un aperçu de l'importance des facteurs étudiés en un minimum d'essais expérimentaux. Moins nombreux encore que pour un plan factoriel complet, qui diminue déjà considérablement le nombre de tests à réaliser par rapport à une approche empirique, où chaque nouveau test est réalisé en fonction des résultats du test précédent. Pour un plan factoriel complet, le nombre d'expériences à réaliser peut être déterminé par le calcul de V^n , où V correspond au nombre de valeurs testées pour chaque facteur ou paramètre ($V=2$ dans les exemples présentés plus haut) et n correspond au nombre de facteurs étudiés. Pour un nombre assez limité de facteurs, le plan factoriel complet reste envisageable, mais

dès lors que 10, 15 ou 20 paramètres sont explorés et que plus de deux valeurs sont souhaitées pour chacun, le nombre de tests augmente considérablement (par exemple 1024 tests pour 2 valeurs de 10 paramètres explorés). Un plan de Plackett-Burman propose d'évaluer les effets de x facteurs voulus en $x+1$ expériences [154, 155].

D. Applications à *Leishmania donovani*.

Les analyses de lipides se sont développées durant les années 1950 avec la description des premières méthodes d'extractions des lipides totaux par Foch *et coll.* ou Bligh et Dyer [67–69]. C'est pendant les années 1980 que les premières études des lipides de *leishmania* seront décrites [156].

Bien que le terme de « lipidomique » ou d'étude « lipidomique » n'existe pas encore à l'époque, nous pouvons rétrospectivement classer ce type d'études. En 1989, McConville *et coll.* [156] ont purifié et analysé les glycosylphosphatidylinositols (GPIs) membranaires chez *L. major* par CCM, puis par GC-MS en impact électronique. Les glycolipides contenant de l'inositol constituent le point de fixation de certaines glycoprotéines de surface et du lipophosphoglycane sur la membrane lipidique du parasite. Après identification structurale, certains de ces GPIs ont montré une homologie de structure avec des glycolipidiques d'encrage rencontrés dans les cellules eucaryotes, tandis que d'autres ont montré une homologie structurale avec le lipophosphoglycane présent à la surface du parasite. Une telle étude peut être considérée comme une étude lipidomique, mais elle suit une approche « classique » de recherche. En effet, elle part d'une hypothèse pour constater un résultat qui infirme ou confirme cette hypothèse.

Sur les mêmes lipides, Hilley *et coll.* [157] ont étudié en 2000 les transamidases responsables de l'incorporation des GPIs aux protéines de surface du réticulum endoplasmique chez *L. mexicana*. Les auteurs ont étudié l'impact de l'absence du gène codant pour ces enzymes sur la biosynthèse des GPIs et sur le comportement du parasite. Les analyses ont été effectuées par western-blot, et par différentes étapes de CCM haute performance. Cette étude a montré que ces protéines ne sont pas indispensables au pouvoir infectieux du parasite, ni pour son développement intra-macrophagique chez l'hôte. L'absence d'intérêt de cette voie métabolique pour l'éventuel développement de médicament anti-leishmaniens a alors été conclue. Ici

également, nous pouvons estimer que ces travaux constituent une étude lipidomique ciblée.

En 2003, Zufferey *et coll.* [158] ont étudié le même système en plus des éther-phospholipides dans la virulence de clones de *L. major*. Des mutants knock-out pour le gène codant l'alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, intervenant dans les étapes précoces de la biosynthèse des éther-lipides chez le parasite, ont été utilisés afin de comparer leur pouvoir infectieux à celui de souches sauvages, chez des souris. Des analyses par western blot, afin de vérifier l'expression de l'enzyme chez les différents clones utilisés, ainsi que par ESI/MS, afin d'analyser les GPIs et le lypophosphoglycane, en infusion directe sont décrites. La plupart des clones ont alors montré une forte susceptibilité à l'action du complément et à la digestion macrophagique, mais les parasites survivants ont induit une inhibition de signalisation cellulaire ainsi qu'une inhibition de synthèse de NO par les macrophages et ont même pu se développer en amastigotes. La conclusion des auteurs a donc été similaire à celles indiquées plus haut, c'est-à-dire que les GPIs et les éther-lipides ne joueraient pas un rôle majeur dans le développement du parasite, ni un rôle prépondérant dans son pouvoir infectieux. Du fait de l'étude des éther-lipides dans leur globalité, nous pourrions parler d'étude lipidomique ciblée dans ce cas.

En 2008, une étude plutôt métabolomique que lipidomique décrite par De Oliveira *et coll.* [159] comprend une optimisation de paramètres par plan d'expériences ainsi qu'un traitement des données générées au cours des expériences par chimométrie. L'objectif de ces travaux était d'analyser les composés organiques volatils contenus dans les poils de chiens atteints de leishmaniose. Pour cela, une micro-extraction en phase solide a été développée, puis optimisée à l'aide d'un plan d'expérience factoriel fractionné sur cinq facteurs pouvant influencer l'extraction (température, temps de contact, temps de désorption, masse de poils et temps d'équilibre). La réponse mesurée était la somme des aires des pics chromatographiques obtenus par la suite, par GC-MS à impact électronique. Une PCA a été appliquée aux données générées par l'analyse d'échantillons provenant de chiens malades et sains. Une séparation claire des deux groupes a ainsi été obtenue, et les auteurs ont également déterminé le taux de faux positifs et de faux négatifs générés par le modèle. Ces travaux constituent un exemple type de démarche expérimentale et

analytique dans un contexte de « -omique », pouvant tout à fait être appliqué dans le cadre d'une étude lipidomique.

Plus récemment, la régression linéaire multiple (MLR) a permis de sélectionner et d'évaluer des descripteurs moléculaires, étudiés par la suite par des réseaux neuronaux afin d'explorer les relations structure/activité de dérivés de la benzyl hydrazine contre les leishmanioses [160].

Enfin, en 2010, l'équipe de Coombs et Watson a publié deux études lipidomiques concernant *Leishmania donovani*. La première est une étude plutôt ciblée (ou *focused*) sur certaines classes de phospholipides (phosphatidylinositol, PI ; phosphatidylcholine, PC ; phosphatidylethanolamine, PE ; phosphatidylserine, PS, et leurs éther-lipides), sur les triglycérides (TG), sur des inositolphosphocéramides, et sur des lipides à base sphingosine [85]. Les travaux ont d'abord comparé trois phases stationnaires (silice greffée ou non, et HILIC : chromaographie d'interactions hydrophiliques), avant de rechercher les espèces moléculaires de chaque classe par HPLC-Orbitrap MS et HPLC-IT/MS. La seconde est une étude métabolomique non-ciblée [41], au cours de laquelle des souches de *L. donovani* sensibles et résistantes aux dérivés d'antimoine ont été analysées par HPLC-Orbitrap, puis comparées par deux outils chimiométries : soit par classification hiérarchique, soit par PCA. De nombreuses classes chimiques ont été analysées de cette manière dans chaque parasite, et les informations les plus discriminantes entre clones ont été retrouvées au niveau des acides aminés, et des lipides, plus particulièrement des phospholipides (PC, PE et sphingolipides). Les espèces de ces derniers ont été également comparées entre les clones sensibles et résistants aux antimonies. Cette seconde étude montre le potentiel représenté par une étude non ciblée sur l'appréhension et la compréhension de phénomènes biologiques.

Ces différents exemples, appliqués ou non aux lipides, montrent l'évolution des démarches d'études des lipides, et plus généralement du métabolisme, chez différentes espèces de *Leishmania*. Les stratégies actuelles ont l'avantage de partir d'un grand nombre de données, englobant des parts de plus en plus grandes des métabolismes biologiques, pour détecter un nombre plus restreint de composés d'intérêt, étudiés plus précisément dans un deuxième temps, à la manière d'un zoom optique.

Les mécanismes d'action et de résistances des traitements médicamenteux antileishmaniens sont encore relativement peu connus et explorés. Les résistances se développent d'autant plus rapidement que les produits sont diffusés et utilisés à travers le monde, et il est important de pouvoir prévoir et minimiser leur apparition, afin de pouvoir développer à temps de nouvelles molécules et stratégies de lutte contre les leishmanioses. Notre groupe c'est ainsi intéressé à la miltefosine, seul médicament administrable par voie orale, dont le temps de demi-vie long est un facteur favorisant l'apparition de résistances. Des études antérieures ont montré l'influence de cette molécule sur les phospholipides membranaires [40, 84], par des études lipidomiques en « mise au point » sur toutes les classes de phospholipides. Ainsi, nous avons voulu expérimenter dans un premier temps une approche plus précise, associant des acquisitions en LC-MS suivies de traitements de données chimiométriques, afin d'explorer les espèces moléculaires de phospholipides permettant de comprendre les voies métaboliques influencées chez *Leishmania donovani* par la miltefosine. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les trois sources d'ionisation à pression atmosphérique disponibles en spectrométrie de masse, afin de conduire au mieux une démarche non ciblée. L'objectif est alors d'évaluer l'impact de la miltefosine sur l'ensemble des lipides membranaires de *Leishmania donovani*.

**2^{EME} PARTIE : ETUDE DE L'ACTION DE LA
MILTEFOSINE SUR LEISHMANIA DONOVANI PAR UNE
APPROCHE LIPIDOMIQUE**

Travaux acceptés dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (facteur d'impact : 3,841) en octobre 2011, publiés en ligne en novembre 2011, DOI : 10.1007/s00216-011-5520-3.

L'application des concepts et outils de séparation des lipides sont applicables à la lipidomique. Un développement analytique est toutefois nécessaire afin d'analyser les phospholipides dans un premier temps, puis une plus grande variété de classes lipidiques dans un second temps.

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux engagés antérieurement au sein du Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud. Une évaluation quantitative de l'impact de la miltefosine sur les classes de phospholipides membranaires de clones de *Leishmania donovani* a été effectuée en LC-DEDL [40], et a montré une diminution des phosphatidylcholines conjointement à une augmentation des phosphatidylethanolamines et des lysophosphatidylcholines. Une seconde étude a comparé les performances du DEDL et du CAD pour la quantification des classes de phospholipides chez ce même parasite [84]. Afin d'accéder à la distribution des espèces moléculaires au sein de chacune des classes, la méthode séparative utilisée lors de ces travaux a fait l'objet d'un couplage à la spectrométrie de masse. Bien que l'analyse des lipides soit décrite depuis les années 90, l'utilisation de la spectrométrie de masse est encore délicate. En effet, elle est le plus souvent couplée à des séparations en RP-LC, et le couplage avec des séparations en NP-LC représente un défi analytique, car les solvants utilisés rendent l'ionisation des molécules plus difficile. Différentes cultures de *Leishmania donovani* traitées ou non ainsi que résistantes à la HePC ont été analysées puis comparées par chimiométrie antérieurement au présent travail. Des modifications de distribution des phospholipides entre les cultures ont été mises en évidence mais ont nécessité un approfondissement avant d'être publiées.

Dans un premier temps, les paramètres de source d'ionisation utilisés lors des analyses ont fait l'objet d'une optimisation par l'application de plans d'expériences. Dans un deuxième temps, une comparaison du DEDL à la MS a été réalisée en termes de performances quantitatives. Dans un troisième temps, un analyseur de type trappe ionique a été comparé à un analyseur de type triple quadripôle afin de vérifier l'absence d'influence de l'appareillage analytique sur les variations observées dans les échantillons biologiques. Puis dans un quatrième temps, une comparaison de clones de parasites non traités, traités et résistants à la miltefosine est effectuée par traitement chimiométrique d'acquisitions LC-MS en full scan. Enfin, les principales espèces moléculaires mises en évidence sont identifiées par spectrométrie de masse en

tandem. La démarche présentée ici illustre le schéma type d'une étude lipidomique.

- *PREAMBULE : OPTIMISATION DES PARAMETRES DE SOURCE.*

- **Trappe d'ions : plan factoriel complet.**

Cinq paramètres ont été étudiés : pression de gaz, débit de gaz, température de source, tension du capillaire et débit de phase mobile (annexe J) ; la réponse mesurée a été l'aire de pic de l'ion m/z 760,4 d'un standard de phosphatidylcholine (PC) sur le signal extrait (extracted ion chromatogram ou XIC), en ionisation positive. 10 μ L d'une solution de PC à 100 μ g/mL ont été analysés en couplage LC-MS pour chaque test (les aspects expérimentaux seront décrits plus loin). 32 tests (2⁵) ont été nécessaires afin d'évaluer toutes les combinaisons possibles entre les différents paramètres, auxquels 5 répétitions d'un point central sont ajoutées afin d'évaluer la précision du modèle. Le point central correspond au réglage de chaque paramètre sur la valeur médiane aux valeurs basse et haute choisies au départ.

- **Triple quadripôle : plan de Plackett-Burman.**

Nous avons évalué les paramètres de source ESI du triple quadripôle API 3000 (ABSciex[®]) utilisé au cours de ces travaux afin de vérifier l'optimisation préliminairement réalisée. Tous les paramètres de source ont été pris en compte, 7 facteurs ont ainsi été testés : pression du gaz de nébulisation, pression du gaz rideau, tension du spray, température de source, potentiel de focalisation, potentiel d'entrée et potentiel de declustering. Ainsi, 8 tests, complétés d'un point central tripliqué, ont été nécessaires pour réaliser le plan. La méthode analytique LC-ESI/MS étant une séparation des classes de phospholipides, trois standards ont été utilisés séparément : acide phosphatidique (m/z 673,8), phosphatidylglycerol (m/z 748,2) et phosphatidylcholine (m/z 761,5) ; ils correspondent à des classes éluées en début, milieu et fin de chromatogramme respectivement.

Les tests expérimentaux ont été effectués par infusion de solutions à 100 μ g/mL à 20 μ L/min. La réponse mesurée dans ce cas a été l'intensité relative de l'ion d'intérêt par rapport à l'ensemble des ions détectés dans un spectre de masse moyen enregistré sur 2 minutes.

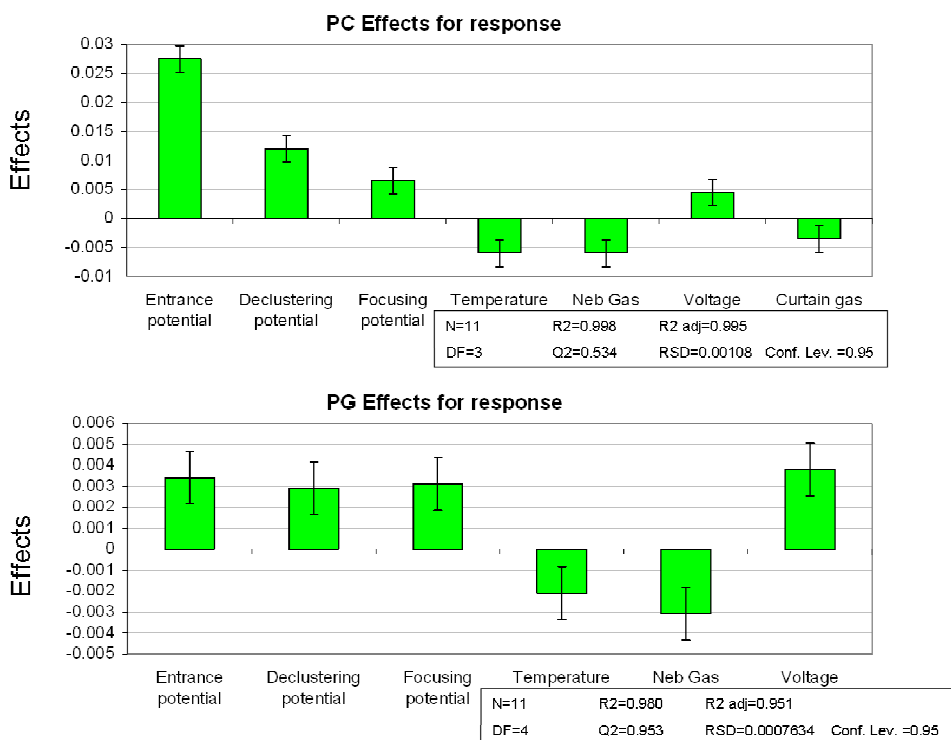


Figure 34 : Résultats obtenus pour l'analyse d'effets des paramètres de source ESI de l'API 3000 sur le PC et le PG.

Les résultats sont présentés Figure 34. Tous les paramètres de source ont une importance significative sur la détection des phospholipides. L'ensemble des paramètres améliorent l'intensité relative des ions lorsqu'on augmente leur valeur, sauf pour la température de source et la pression de gaz de nébulisation, pour lesquels une augmentation de valeur entrainerait une diminution de signal. Il semble par ailleurs que les paramètres directement liés aux analytes (potentiel d'entrée, potentiel de focalisation et potentiel de declustering) aient un effet plus important que les autres sur l'intensité du signal, et doivent donc être optimisés avec davantage de soin.

Les résultats obtenus à l'aide de ce plan d'expérience de Plackett-Burman nous ont alors permis de vérifier l'impact des différents paramètres de source d'ionisation, et nous ont guidés afin de finaliser leur optimisation avant d'utiliser le système analytique.

Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS and multivariate data analysis.

L. Imbert¹, R.G. Ramos^{1,3}, D. Libong¹, S. Abreu¹, P.M. Loiseau², P. Chaminade¹.

¹Univ Paris-Sud, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA4041, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

²Univ Paris-Sud, Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire, UMR CNRS 8076, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

³Universidad de Concepción, Facultad de Farmacia, Concepción, Chile.

Leishmaniasis is a widespread parasitic disease principally treated by intravenous drugs. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has recently proved its efficacy by oral route. Although its mechanism of action has been investigated, and principally relies on perturbations of the metabolism of lipids and especially phospholipids, further studies need to be conducted to detect precisely which metabolic pathways are impacted. For this purpose, the present work proposes a complete lipidomic study focused on membrane phospholipids of clones of *Leishmania donovani* non-treated (NT), treated (T) and resistant (R) to miltefosine.

Firstly, a separation of phospholipids in normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC) was coupled to a mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray (ESI) ion source, and response was compared to evaporative light scattering detection (ELSD). Secondly, a quantification of phospholipid classes was performed using NP-HPLC/ESI/MS on NT, T and R clones of *Leishmania donovani*. Thirdly, full scan acquisitions of analyzed samples were compared using orthogonal signal correction-partial least square-discriminant analysis (OSC-PLS-DA) to highlight phospholipid molecular species of interest between the three types of clones. Structural determination of the most relevant species has finally been performed using tandem mass spectrometry. A first hypothesis on the effect of miltefosine on lipid metabolic pathways is then proposed.

Keywords: Phospholipids, Mass Spectrometry, Electrospray, Lipidomic, Liquid Chromatography, Leishmaniasis.

I. Introduction.

Leishmaniasis is a parasitic disease widespread in South America, Europe, Asia and Africa [161]. Leishmaniasis consists of cutaneous, muco-cutaneous, visceral (kala-azar) and post-kala-azar dermal leishmaniasis [162]. Visceral Leishmaniasis (VL) is fatal if untreated. Until recently, treating VL was difficult due to toxic (antimonials) or high cost (liposomal Amphotericin B) drugs, but miltefosine (hexadecylphosphocholine or HePC) was shown to be a very effective drug, although some cases of drug resistance have been reported [163].

HePC is active against visceral infection as proven in animal models [45, 164, 165] and by oral administration [166, 167] in human subjects. These studies have shown that HePC interfere with cell processes involved in parasite's death (macrophages and cytokines activation and others cell mediators) [164]. In addition, a relation between the action of HePC and the cytotoxic effects on the parasitic membranes [39] has been established since the compound is a phospholipid-like molecule and then could impact the phospholipid biosynthesis in the parasite [40].

Phospholipids (PLs) are major components of biological membranes and a variation of PLs composition can affect both physical and chemical properties of the membrane bilayer. It is thus possible that HePC-treated (T) and HePC-resistant (R) parasites present a particular PL metabolism and/or a particular PL composition of their membranes.

As recently reviewed [168], PLs account for about 70% of total cellular lipids extracted from *Leishmania* and major PL classes (classified by their headgroup) are glycerophosphatidylcholine (PC \approx 30-40%), glycerophosphatidylethanolamine (PE \approx 10%) and glycerophosphatidylinositol (PI \approx 10%). PL classes contain a variety of molecular species: 1,2-diacyl, 1-alkyl-2 acyl or 1 alkenyl-2-acyl and lyso-alkyl or lyso-acyl.

Normal Phase High Performance Liquid Chromatography (NP-HPLC) with aerosol based detectors is a convenient method for PLs analysis [73]. Either Evaporative Light Scattering Detection [79, 82, 169-172] (ELSD) or, more recently, Charged Aerosol Detection (CAD) [84, 89, 91] are routinely used. Aerosol based detectors allow to overcome the absence of exploitable chromophore groups in PL

structure that restricts the use of conventional UV detectors in lipid analysis. PL class analysis, using polar stationary phases, allows PLs quantification, and comparison of the relative distribution of PLs in chromatographic profiles of lipid extracts.

In addition to the PLs class separation, molecular species distribution within each class can be studied by coupling HPLC with mass spectrometry (MS). Electrospray Ionization (ESI), a soft ionization technique, is a well established method for PL species detection [65]. Depending on the nature of the polar head, PLs are detected as $[M+H]^+$ (or alkali metal adducts) or $[M-H]^-$ ions.

Lipid analysis is evolving toward “omics” approaches [61]. Lipidomics can be defined as “the full characterization of lipid molecular species and their biological roles with respect to expression of proteins involved in lipid metabolism and function, including gene regulation” [125]. Like the other “-omics”, i.e. genomics, proteomics, metabolomics or transcriptomics, it is aimed at unveiling the connections between metabolic pathways in order to understand the functioning of a whole biological system, and eventually predict its behavior [122–126]. This field has taken advantage of technological and mathematical advances. As more and more quantities of data are gathered during a lipidomic study, multivariate data analysis is highly required to allow an interpretation in a reasonable amount of time [129, 173–176]. Thus comparing the PL composition of *Leishmania* membranes by mean of NP-HPLC/ESI-MS has been performed with the use of statistical tools to handle the huge amount of information embedded in the LC/MS profiles. The lipidomic approach [177] uses multivariate statistics to extract the pertinent information and to highlight the molecular species that differentiate *Leishmania* strains.

In this work, a previously developed NP-HPLC method with ELSD [84] was optimized and coupled to ESI-MS, to compare both ELSD and MS on quantitative parameters. Lipid classes in differently cultivated *Leishmania donovani* strains were then quantified to assess the changes in PLs composition of *Leishmania* membranes. Finally, the changes in PLs molecular species were investigated, by lipidomic analysis based on Orthogonal Signal Correction-Partial Least Square-Discriminant Analysis (OSC-PLS-DA) computing of NP-HPLC/ESI-MS profiles of Non-Treated, HePC-treated and HePC-resistant strains of *Leishmania donovani*.

II. Experimental.

A. Sample preparation.

Promastigote forms of *L. donovani* LV9 (MHOM/ET/67/L82) wild-type (WT) were kindly provided by Prof. S.L. Croft (Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK).

L. donovani clones were cultivated *in vitro* at 26°C in M199 medium (Sigma, St Quentin Fallavier, France) which 10% heat inactivated foetal calf serum, adenosine 100 µM (Sigma, St Quentin Fallavier, France), Hepes 40 mM (VWR, Paisley, Scotland), and hemin (0.2% of 250 µg/mL stock) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) in the presence of 50 µg/mL gentamycine were added. After three centrifugation-washing cycles, promastigotes were harvested during the late logarithmic phase of growth. After the first centrifugation at 4000 g during 10 min at 4°C, the old medium was eliminated and parasites were washed three times using cold Tris-buffered saline (10 mM Tris-HCl, 145 mM NaCl, pH 7). These parasites were called non-treated (NT) parasites. Treated (T) parasites were samples treated with 10 µM of HePC for a 48h period. HePC-resistant (R) parasites were selected from NT parasites by stepwise drug pressure of a 40 µM HePC concentration. Phospholipids were quantitated relatively to proteins. A determination of soluble proteins has been performed for each sample for this purpose, by using the method of Sedmak and Grossberg [178].

B. Standards.

L- α -glycerophosphatidic acid (GPA), L- α -glycerophosphatidylglycerol (PG), L- α -phosphatidylcholine (PC), L- α -glycerophosphatidylethanolamine (PE), L- α -lysophosphatidylcholine (LPC), L- α -lysophosphatidylethanolamine (LPE) were from egg yolk, L- α -phosphatidyl-L-serine (PS), sphingomyelin (SM) were from bovine brain, diphosphatidylglycerol or cardiolipine (CL) was from bovine heart, L- α -glycerophosphatidylinositol (PI) was from bovine liver. All standards were purchased with a purity of approximately 98% from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Standards were dissolved in chloroform/methanol (2:1) mixture to a known concentration of 2.0 mg/mL and then diluted according to their distribution into biological membranes. HePC was supplied by Zentaris (Frankfurt, Germany).

C. Solvents.

n-heptane, 2-propanol, chloroform and methanol were HPLC-grade from VWR International (Strasbourg, France). Triethylamine 99% and acetic acid 99-100% were analytical reagent grade purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France).

D. Lipid extraction.

Extraction of lipids was inspired from Folch *et al.* [67]. The parasite pellet previously obtained was resuspended in 1 mL of Tris-buffered saline solution. A 2.50 mL of chloroform and 1.25 mL of methanol mixture were added to extract the total lipids from the parasite suspension. This mixture was sonicated five times for 30 seconds at 4°C using a sonifier cell disruptor after a previous incubation time of at least one hour. Centrifugation at 3000 g for 5 minutes was then made and the lower phase containing total lipids was collected and evaporated to dryness under nitrogen gas at room temperature. The residual lipids were resuspended in 300 µL of a chloroform/methanol (2:1) mixture and analyzed subsequently.

E. Liquid chromatography.

Chromatographic system included a Hewlett-Packard® HP 1050 isocratic pump and autosampler (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Germany). The separation was carried out on a 5-µm YMC PVA-Sil (YMC, Kyoto, Japan) column of 150 x 2 mm with a 10 x 2 mm guard column packed with the same material both supplied by Interchim (Montluçon, France). The column temperature was thermostatically controlled at 35°C with a column oven CrocoCil®.

Detection system consisted of an Evaporative Light-Scattering Detector Chromachem ELSD (ESA Inc., CHELMSFORD, MA, USA) supplied by Eurosep® (Cergy, France). The analog signal was acquired with Kroma System 2000 software provided by Kontron Instruments (St Quentin en Yvelines, France) and the obtained data was processed for its interpretation.

The total flow was 0.4 mL/min, and 10 µL of sample was injected. The solvent gradient program is shown in Table 1. Solvent A was a n-heptan/2-propanol (98:2 v/v) mixture; solvent B was a chloroform/2-propanol (65:35 v/v) mixture and solvent

C was a methanol/water (95:5 v/v) mixture. 1% acetic acid and 0.08% triethylamine (TEA) were added in all mobile phases to modify the ionization of lipids and their retention.

During the first step of this study, the LC effluent was splitted after the analytical column with aid of a mixing tee, thus 0.13 mL/min entered to the ELS detector and the remaining stream was directed to the mass spectrometer. ELSD nebulizer and evaporation temperature were fixed to 35°C and 45°C respectively. Nebulizer gas pressure was kept at 1 bar. And the signal filter was fixed in medium position.

The total run time was 17 minutes for the entire separation and 15 minutes for the column re-equilibration.

F. Mass spectrometry.

The HPLC system was coupled on-line either to an Esquire-LC ion trap mass spectrometer (IT-MS) (Bruker Daltonics, Germany) and an ELSD for the quantitative part of the study, or to an API3000 triple quadrupole mass spectrometer (TQ-MS) (ABSciex, Germany) for the lipidomic study, both equipped with an ESI source.

For the ion trap mass spectrometer, the HPLC effluent entered the interface through a steel ionization needle set at ± 4000 V (in positive or negative ion mode) and a heated capillary set at 350°C. The nitrogen drying gas pressure was 25 psi. The ion source and ion optic parameters were optimized with respect to the positive or negative molecular related ions of the PLs standards. Mass resolution was 0.2 uma. The effects of source parameters (gas pressure, gas flow, capillary voltage, source temperature and mobile phase flow) were investigated using a full factorial experimental design, with 5 replicated center points. Standards of GPA, PG and PC were used for this purpose, and peak areas of major molecular species were monitored to perform the computation.

For the triple quadrupole mass spectrometer, spray voltage was set at ± 4000 V (in positive or negative ion mode) and the temperature was set at 280°C and at 270°C in positive and in negative ion mode respectively. Nebulization gas was set at 9 (arbitrary unit) for both ion mode, and curtain gas was set at 8 (a.u.) in positive ion

mode and at 7 (a.u.) in negative ion mode, declustering potential was set at ± 40 , focusing potential at ± 400 and entrance potential at ± 10 . Optimized parameters (nebulization gas, curtain gas, spray voltage, temperature, entrance potential, focusing potential and declustering potential) were also set by using a Plackett-Burmann design, with 3 replicated center points. GPA, PG and PC were again used.

The $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ peaks from the HPLC system were detected by using both negative and positive ion full-scan analysis in order to obtain the best sensitivity for each PL class. Each sample was thus analyzed twice, in both positive and negative ion mode, and injections were duplicated.

Fragmentation studies were performed in tandem mass spectrometry, using the triple quadrupole. Collision activated dissociation gas was set at 10.0 (a.u.), collision energy was set at -50 and 35 (a.u.) for the study of PE and LPC molecular species respectively, and the collision cell exit potential was set at -20 and 15 (a.u.) for PE and LPC molecular species respectively.

G. Orthogonal Signal Correction-Partial Least Squares-Discriminant Analysis.

The data files from the API3000 were converted to the mzData format using the Wiff to mzData converter (v 1.0.0.4) supplied by ABSciex. Data were then submitted to peak alignment using the MzMine 2.2 LC/MS toolbox [179]. The data files from 11 *Leishmania* samples resulted in a 22x935 matrix for data acquired in negative ion mode, and a 22x2030 matrix for data acquired in positive ion mode. The objects were 4 samples of NT *Leishmania*, 4 samples of T *Leishmania* and 3 samples of R *Leishmania*. The 935 and 2030 variables were ion intensities recorded at different retention times.

The data matrix was imported in the Simca-P 11 software (Umetrics AB, Umeå, Sweden) and submitted to OSC before classification using PLS-DA. OSC was proposed by Wold [148] as a signal processing method able to remove noise in spectra (X) without affecting the spectral information related to Y, the class information associated to spectra. In other terms, OSC removes from X the part of information unrelated to Y. A class variable was added to the data matrix to indicate which sample is associated with NT, T or R class. Five components were used to extract the X information uncorrelated with the class information.

The resulting data matrix was then submitted to PLS-DA. PLS-DA is a multivariate classification method based on partial least squares, the regression extension of Principal Component Analysis (PCA) [180] and uses the class information to attempt to maximize the differences between groups of observations. This statistical analysis allows using data obtained from the samples to build an appropriate model for classification and to determine key factors leading to differences among the samples. The relevant variables were selected using simultaneously a Variable Importance Plot (VIP) and a covariance-correlation plot of the t-scores and X variables. This latter graph was obtained as the plot of $p(\text{corr})$ vs p in Simca-P 11 as described in the supplementary information of ref [181].

The m/z values of relevant variables were entered in the Lipid Search Database (lipidmaps.org) to propose possible molecular structures, before determining them in further MS² analyzes.

III. Results and discussion.

A. Separation of phospholipid classes by LC-ELSD and LC-ESI/IT-MS.

The identification of relevant lipid species by statistical techniques requires selective and resolute chromatographic methods, and also technologies that allow obtaining structural information. In this context, liquid chromatography coupled with ESI/MS is appropriate. However, some considerations need to be taken into account, such as the nature and composition of solvents entering in the mobile phase composition, the optimization of different ionization parameters which enables a better detection of analytes, and finally, the application of statistical procedures like OSC-PLS-DA applied to the MS data set.

In a previous study [84], a method for the separation of PL classes on a PVA-Sil column with a gradient program shown in Table 1 was developed. PLs extracted from *Leishmania donovani* were quantified using ELDS or CAD, which provided a universal response. Although CAD was found to be more sensitive than ESLD for minor peaks, both detectors were able to quantify the main PL classes. In order to ensure the comparison with previous work from our group, ELSD was selected for this study. In

addition, the present study is aimed at identifying the PL molecular species present in NT, T and R parasites. For this purpose the liquid chromatographic system was connected to an ESI ion trap mass spectrometer (ESI/MS). ESI/MS is described as a soft ionization technique and is adapted to characterize amphiphilic molecules like PLs [65]. ESI/MS is known to be sensitive to the nature of solvents employed in liquid chromatography. As explained in *Experimental*, the effluent after the analytical column was splitted and directed to the mass spectrometer and the other fraction to the ELS detector to monitor the separation and verify the retention time of PLs with their m/z . The initial solvent program presented in Table 1 allowed a separation of all phospholipids in about 40 min. GPA, corresponding to the first peak of the chromatogram, was poorly detected and an important background noise was visible in its mass spectrum. GPA eluted at about 10 minutes in a solvent composition corresponding to n-heptane/chloroform/2-propanol 64:23:13. This first chromatographic step is important when using universal detectors such as ELSD or Corona-CAD to separate the PLs from the solvent front. The important amount of n-heptane induced a difficult ionization of GPA in the ESI source and its detection was not well achieved by LC-ESI/MS. Thereby, to increase the GPA ionization the solvents composition and the gradient program were optimized by shortening the initial step of the gradient. The solvent composition at the retention time of GPA was modified to 9.8 % of n-heptane, 55.2 % of chloroform, 30.0 % of 2-propanol, 4.8 % of methanol and 0.2 % of water. Figure 35(a) shows the LC-ELSD profiles obtained with optimized conditions (Table 1). Under these conditions GPA was reliably detected by LC-ESI/MS (Figure 35(b) and (c)). The intensities of the GPA ions shown in Figure 35(c) are more than 100 fold more important than in the previous conditions and the signal-to-noise ratio much more favorable.

From a chromatographic point of view, the shortening of the first step of the solvent program had an effect on the whole separation by decreasing the analysis time. The PLs classes are now separated in about 20 minutes as shown on both the ELSD and ESI/MS trace.

Both negative and positive ionization were tested. As expected [65], a better sensitivity was achieved with negative ionization for the first eluting PLs (from GPA to LPE) whereas positive ionization led to superior results for PC, SM and LPC. It was

thus possible to use negative ionization for the first 12.5 minutes of the gradient run and then switch to positive ionization until the end of the chromatogram (Figure 35). Major molecular species of GPA, PG, CL, PI, PE, PS and LPE gave $[M+C_6H_{15}N]^+$ due to TEA in positive ion mode, $[M-H]^-$ and $[M+CH_3COO]^-$ ions in negative ion mode, whereas for PC, SM and LPC molecular species, the major ions encountered were $[M+H]^+$ and $[M+Na]^+$ in positive ion mode and $[M-15]^-$ in negative ion mode [182].

B. Quantitation of phospholipid classes of *Leishmania* by LC-ESI/IT-MS.

Although full scan is not the preferred acquisition mode for quantitation, the Total Ionic Current (TIC) was used to build calibration curves for each PL in order to assess the performances of the analytical method in term of precision, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The objective was to compare the results obtained in our previous study using ELSD and Corona-CAD, and also to validate the OSC-PLS-DA findings at the lipid class level.

A calibration curve of the ESI/MS response versus injected amount for each PL class was prepared. The calibration range of 0.13 to 8.00 μg of injected mass was investigated and the response model was in accordance with a linear model. Also, precision and limits of detection and quantitation were evaluated. For the precision study (Table 2), the obtained values were lower than 10.0 % of relative standard deviation (RSD), and ranged from 4.9 to 9.7 % of RSD. Moreover, for CL, LPE and PC the precision reached 5.0 %.

The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined by measurement of a 3:1 and 10:1 signal-to-noise ratio to establish the minimum concentration at which the analyte can be suitably detected and quantified. Results obtained for LOD and LOQ study are also shown in Table 2. The values obtained for LOD were between 0.4 to 93.4 ng of injected mass and 1.4 to 311.3 ng for LOQ.

Based on these results, the method was applied to the analysis of *Leishmania donovani* extracts. Figure 36 displays the quantitative analysis of *Leishmania* samples and presents the PL classes distribution for each *Leishmania* culture. There are five main classes (PI, PE, PS, PC and LPC) in the PL distribution of NT extracts. In addition, these classes seem to be modified by the exposition to the drug. In fact, both PI and PC

amounts encountered in T (exposed to HePC) and R (selected by exposure to HePC) samples showed a diminution. In contrast, an increase in PE, PS and LPC quantities was found when comparing T and NT. The increase in LPC levels and the concomitant decrease of PC could suggest the likely degradation of this one due to a 10 μ M treatment of HePC for a short period, or could be due to the presence of HePC at the same retention time.

For NT *Leishmania donovani* clones, these results are consistent with a recent review [168] where PC is supposed to be the major PL with an average amount of 33% followed by PI and PE which account for 10% each. Other minor PLs such as GPA, PG, PS, and CL have been reported for a total of about 7%. Resistant clones of *Leishmania* show a different profile with a dramatic decrease of PC and a relative increase of minor PL classes.

These preliminary results have allowed observing the variation in PL classes of *Leishmania* extracts. These results are completed by the subsequent application of PLS statistical analysis to identify the molecular species involved in the classification between NT, T and R samples. The API 3000 triple quadrupole mass spectrometer was used for this purpose, as it appeared to provide a better sensitivity than the ion trap (see Table 2), at the pg level, and thus could better detect minor PLs species. Furthermore, negative and positive ion modes were performed separately to facilitate chemometric treatments.

C. Identification of potential biomarkers by LC-ESI/TQ-MS and OSC-PLS-DA.

The full scan MS chromatograms from the 11 parasite cultures (4 NT, 4 T and 3 R) acquired on an API 3000 triple quadrupole were subjected to data preprocessing using the MzMine Toolbox. This package allows matching peaks across samples after a retention time correction. This correction is critical with regard to PLS since shift in retention times can affect the data clustering.

The MS-Data were then subjected to OSC preprocessing in order to diminish the amount of information not correlated with the class information (NT, T and R). Four components were used to remove this orthogonal information. Then the OSC transformed MS-Data were subjected to PLS-DA. Four principal components were

computed, which explained 97% of the class information ($R^2Y=0.97$) and about 63% of the X variables ($R^2X=0.63$). The prediction ability of this model was good as expressed by the cumulative Q2 value of 0.81. The clustering of the three types of parasite culture is shown in the score plot of the two first components, Figure 37. The first component allows a clear distinction between T clones and the other two groups, while the second component allowed the distinction between NT and R clones.

Clones of parasites were then compared one-to-one (NT versus T, NT versus R and T versus R) by computing an OSC-PLS-DA for each case. The score plot showed then in all cases a clear distinction of both clones on the first component. In order to detect the X variables responsible for this discrimination a plot of the contribution of the X variable to the model was built. A covariance-correlation plot [181] for the two first components and a VIP are presented in Figure 38. The former plot combines the modeled covariance ($cov(t,X)$) with the modeled correlation ($corr(t,X)$) where t are the principal component scores and X the OSC corrected MS variables. Thus, significant X variables are supposed to cluster at the extremes of the plot, either for high negative values or for high positive values of covariance and correlation. The VIP plot summarizes the contribution of each variable to the model represented with its standard deviation.

Figure 38 displays the graph obtained for the opposition of NT versus T samples (first component). The variables having correlation values near to 1.0 or -1.0 on vertical axe (X,t correlation) could better describe the differences between NT and T *Leishmania* samples. The line plot at the right side of the graph shows the trend of two selected variables located at the extreme of the covariance-correlation plot. The positively correlating variable shows a high intensity for T and negatively correlating variables for NT. These X variables could thus be a good predictor to know which PL classes and molecular species are different between NT and T. A list of potential biomarkers leading to the differentiation between the clones of *Leishmania* was created by simultaneously using the VIP and selecting variables displaying values above 1 and a standard deviation excluding zero. Comparisons of NT versus R and T versus R were computed using the same approach.

As ESI/MS is a soft ionization technique, no *in-source* fragmentation was observed. Due to the high number of molecular species obtained in the original

chromatogram, no additional fragmentation was done to further identify the molecular species. A fragmentation study will be further performed on critical molecular species highlighted here.

Figure 39 shows the ion profile of each comparison performed: (a) T versus NT, (b) R versus NT and (c) T versus R. Charts display over-expression and under-expression of molecular species in the first clones named in each comparison, i.e. within the T clones versus the NT clones in (a). Relative quantity of molecular species within each comparison is represented with its standard deviation. The mass values are consistent with a recent study [85] of *Leishmania donovani* PLs profiling using a high resolution mass spectrometer. LPC and PE are the main PL classes influenced by HePC. Presence of HePC (m/z 408.5) at the retention time of LPC allows further separation of T versus NT (Figure 39 (a)) and T versus R (Figure 39(c)). T clones display a decrease in PE m/z 728.7 toward NT clones while other species are over-expressed, explaining the quantitative increase of PE class observed previously. Information gathered on the PC class shows principally a decrease of the m/z 936.3 species in the T clones, and a slight increase of the m/z 914.9, consistent with the simultaneous decrease in PC and increase in LPC previously observed.

R versus NT displays an overall decrease of the quantities of PLs in R clones. Only PE m/z 728.3 appears to be increased in R clones. A similar observation is made when looking at the comparison of T versus R where all PLs are over-expressed in T clones and only m/z 728.2 is increased in R clones. The PI of m/z 863.8 might also be of interest between T and NT or T and R clones as it is the only one of this PL class to be highlighted.

Figure 40 illustrates the average mass spectra of the PE class affected by HePC action. Spectra of PE show the over expressed ion at m/z 780.7 in T cultures. The m/z 408.4 ion of HePC was also clearly visible in the spectrum of T strains, together with the m/z 508.9 ion of the over expressed LPC species. The other LPC species showed more subtle variation that hinders their observation from a direct examination of mass spectra.

From a biological point of view, a 10 μ M HePC treatment for 48h on *L. donovani* promastigotes induced significant modifications in phospholipid expression (Figure

39). Thus, the polar head groups (Choline, Ethanolamine, and Inositol) were all over-expressed suggesting a stimulation of their biosynthesis or uptake. This result is in relation to an increase of the total PL content into HePC treated parasites. Curiously, PS was not highlighted by this method. PS was also not detected in a recent metabolomic study comparing wild-type and antimonial-resistant *L. donovani* [41].

LPC species exhibited the highest over-expression level suggesting an activation of phospholipase A2 by HePC that confirms our previously described data [40]; three PE species on four were over-expressed whereas PC species were less affected. It was not possible to structurally distinguish both the PC species. These results seem to be contradictory with those previously published by us indicating that the PE over-expression was strongly associated with a decrease of PC [40]. However, in this study we did not get quantitative data. Thus, the first PC species (m/z 936.3) probably is the major component with a reduction of about 25% expression in the HePC treated parasites. In these conditions, the present data are compatible with the previous ones [40]. PI was over-expressed by 150% but inositol was globally the polar head group the less affected, relatively to the others.

When comparing resistant parasites versus non-treated ones, the phospholipids were globally under-expressed with the lowest level expression for one PE (m/z 780.2). These data show that a long in vitro HePC pressure necessary to obtain HePC resistant parasites has a reverse effect on PL metabolism than a short HePC pressure (10 μ M for 48 h). The mechanisms involved in this metabolism switch have now to be elucidated using a proteomic approach to study the expression of the enzyme systems responsible for these PL variations. HePC resistance involves different mechanisms regarding PL metabolism than antimonial resistance for which phospholipids species were found to be over-expressed [41]. When comparing treated versus resistant, the data confirm that a HePC treatment is responsible for a PL over-expression.

Interestingly, this study pointed out that the level of PE (39:4) or PE (40:4) could be a marker of HePC sensitivity in clinical isolates since the level of this compound decreases of 2600% in HePC-resistant parasites.

The most affected ions highlighted here have been finally studied using tandem mass spectrometry. Thus, PE [M-H]⁻ of m/z 728.7, 700.4, 780.7 and 806.8, and LPC

$[M+H]^+$ of m/z 408.5 (HePC) and 508.9 were fragmented. Figure 41 represents the MS/MS spectra of the ion m/z 728.7. The fragmentation pattern is similar to those previously described [182]. The m/z 281.2 and 267.5 ions correspond to the fatty acids substituent C18:1 and C17:1 in the $C_xH_yCOO^-$ form. Due to the relative intensity of the two ions, the *sn-1* is the C17:1 fatty acid and the *sn-2* is the C18:1 fatty acid. Ions of m/z 464.3 and 446.3 correspond respectively to the loss of the C18:1 fatty acid as ketene ($[M-H-C_{18}H_{33}CH=C=O]^-$) and as acid ($[M-H-C_{18}H_{33}COOH]^-$). Therefore, the ion at m/z 728.7 corresponds to a PE(35:2), and more precisely to a 17:1/18:1-PE (with the notation *sn-1/sn-2*-PE). Using the same process, the m/z 700.4 ion corresponds to a 15:1/18:1-PE. By contrast, the m/z 780.7 firstly attributed to a PE because of its retention time did not provide a similar typical MS² spectra (see Figure 42). It would correspond to an inositolphosphoceramide (IPC), as previously described in *Leishmania major* [183]. Thus ions of m/z 241.0 and 259.0 correspond respectively to a inositol-1,2-cyclic phosphate anion and a inositol monophosphate anion. Then ions of m/z 619.0 and 601.0 correspond to loss of a dehydrated inositol residue and an inositol residue respectively. The ion of m/z 514.7 corresponds to the loss of a C18:0 fatty acid as ketene. Thus a d16:0/18:0-IPC is one of the most important molecular species to be influenced by HePC when comparing T clones to NT clones. The ion of m/z 806.8 displayed a similar fragmentation pattern, therefore it corresponds to a d18:1/18:0-IPC.

Looking at LPC of m/z 408.5, the MS² spectra allows the identification of HePC, as previously reported [184]. The ion of m/z 508.9 displays an intense ion of m/z 184.1 representing the phosphocholine ion. This molecular species was suspected to be a TEA adduct of HePC (408.5+101.2), but no fragment ion of m/z 408.5 are present on the spectra. Therefore, this molecular species corresponds to a 17:1-LPC.

IV. Conclusion.

This work proposes a study by HPLC-ELSD and ESI/MS detection and statistical analysis for the simultaneous identification and quantitation of ten phospholipid classes extracted from *Leishmania* parasite membranes and the identification of potential biomarkers of the HePC action on the parasite. The proposed method gave suitable results for the validation parameters assessed, precision was

lower than 10%, with limits of detection between 0.4 and 93.4 ng of injected mass, and limits of quantification between 1.4 and 311.3 ng. Therefore the LC-ESI/MS method demonstrated a suitable sensitivity and may be applied to the analysis of *Leishmania* membrane extracts.

The quantitative LC-ESI/MS analysis of *Leishmania* membrane PLs enables the evaluation of HePC action on each PL class (*inter-class analysis*). Results show that the main classes concerned by the HePC action were PI, PS, PE, PC and LPC which presented a different distribution according to the type of culture (NT, T or R).

The application of OSC-PLS-DA to the MS-data opened several ways for understanding the mechanisms of HePC action and resistance and also for identifying markers of HePC susceptibility. Experimental results were in accordance with those obtained by the quantitative LC-ESI/MS analysis and gave additional information related to the different *Leishmania* extracts. The molecular structures of the most relevant molecular species highlighted in this work (especially on PE class) were further explored using MS/MS to precisely assess which metabolic pathways are influenced by HePC.

V. Acknowledgements.

Françoise Huteau and Sandrine Cojean are acknowledged for their kindly technical assistance in *L. donovani* cultures. Cynthia Mongongu (Analysis Department of the French Agency for Doping Control) is acknowledged for her technical support on fragmentation studies.

This work was supported by The ALBAN Program of European Union Program of High Level Scholarships for Latin America through scholarship N°E04D044940CL. Also by MECESUP Project UCO 0202 of Ministry of Education and University of Concepción, Chile.

VI. Tables and figures.

Table 1 : Solvent program gradient.

Mobile Phases							
Initial conditions				Optimized conditions			
Time	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	C ⁽³⁾	Time	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	C ⁽³⁾
min	%	%	%	min	%	%	%
0	100	0	0	0	98	2	0
22	12	88	0	3	12	88	0
42	0	60	40	16	0	60	40
44	0	100	0	17	98	2	0
46	0	100	0	28	98	2	0
48	100	0	0				
68	100	0	0				

(1) *n*-heptane / 2-propanol (98:2)

(2) chloroform / 2-propanol (65:35)

(3) methanol / water (95:5)

All mobile phases containing 0.08% TEA and 1.00% CH₃COOH

Table 2 : Intermediate precision^(a), limit of detection (LOD)^(b) and limit of quantitation (LOQ)^(c) study with ion trap mass spectrometer and triple quadrupole mass spectrometer (PA: glycerophosphatidic acid ; PG: glycerophosphatidylglycerol ; CL: cardiolipine ; PI: glycerophosphatidylinositol ; PE: glycerophosphatidylethanolamine ; PS: phosphatidylserine ; LPE: lysophosphatidylethanolamine ; PC: phosphatidylcholine ; SM: sphingomyelin ; LPC: lysophosphatidylcholine).

PLs	ESI/IT-MS			ESI/TQ-MS		
	RSD	LOD	LOQ	RSD	LOD	LOQ
	(%)	(ng)	(ng)	(%)	(pg)	(pg)
PA	7.9	4.1	13.8	8.4	10.7	32.4
PG	9.7	2.8	9.4	10.2	39.7	120.3
CL	5.7	59.9	176.3	12.4	55.3	167.5
PI	9.2	4.8	16.1	3.2	1.6	4.8
PE	8.0	93.4	311.3	4.0	31.0	93.9
PS	6.7	9.8	32.7	8.1	13.6	41.3
LPE	5.3	4.3	14.4	5.5	4.8	14.5
PC	4.9	0.4	1.4	4.6	3.0	9.2
SM	6.6	1.4	4.7	1.3	1.6	4.9
LPC	7.5	1.7	5.6	0.3	1.8	5.5

(a) calculated over three days

(b) calculated on 3:1 signal-to-noise ratio

(c) calculated on 10:1 signal-to-noise ratio

Figure 35 : Phospholipid classes separation obtained with optimized conditions on a standard mixture. (a) ELSD detection. (b) ESI/IT-MS detection in negative (from 0 to 12.25 min), and positive (from 12.25 to 18 min) ion mode. (c) Glycerophosphatidic acid ESI/MS spectra obtained in negative ion mode.

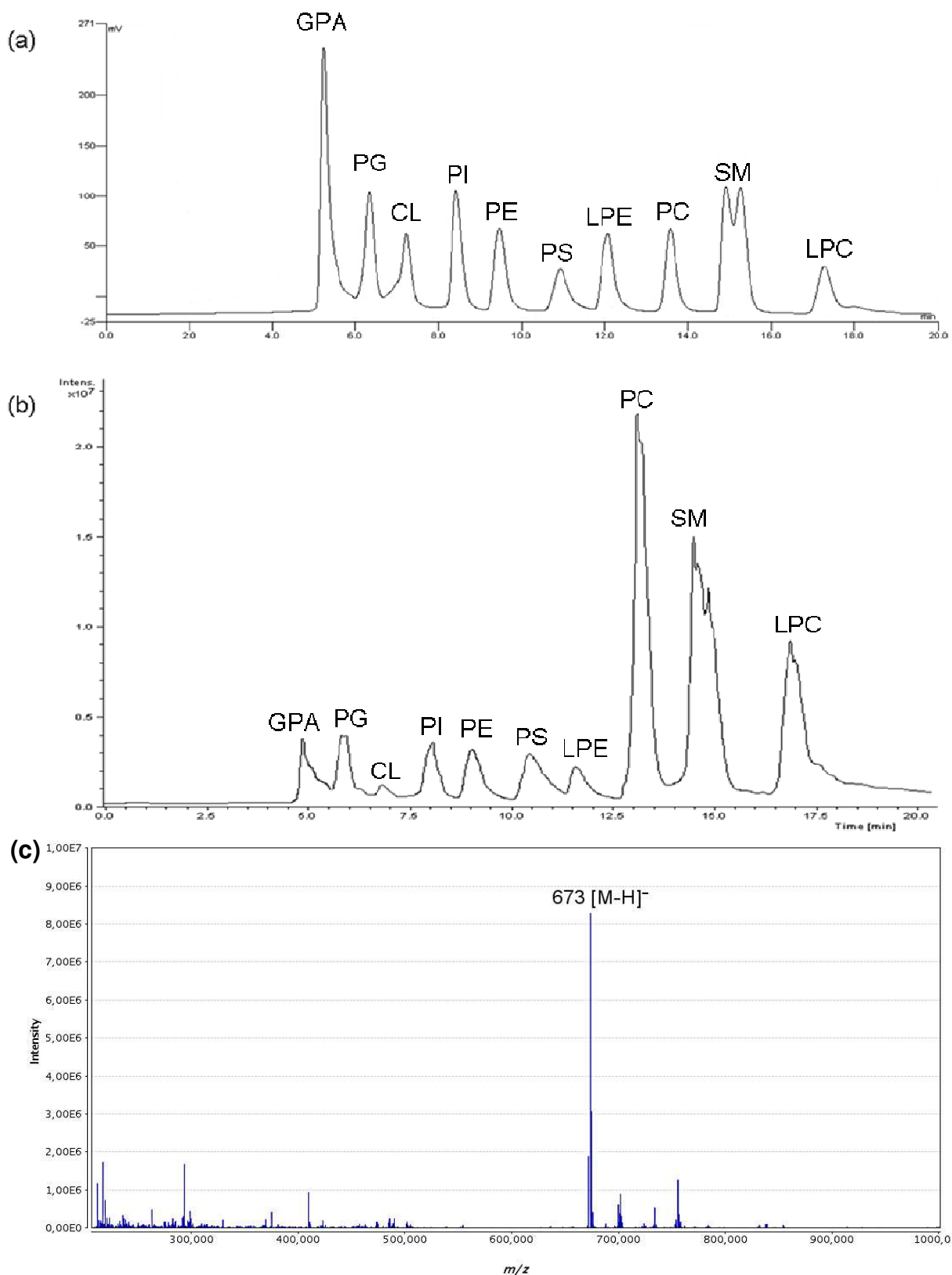


Figure 36 : Quantitation of phospholipid classes from Leishmania samples with LC-ESI/MS detection. Brackets represent the standard deviation.

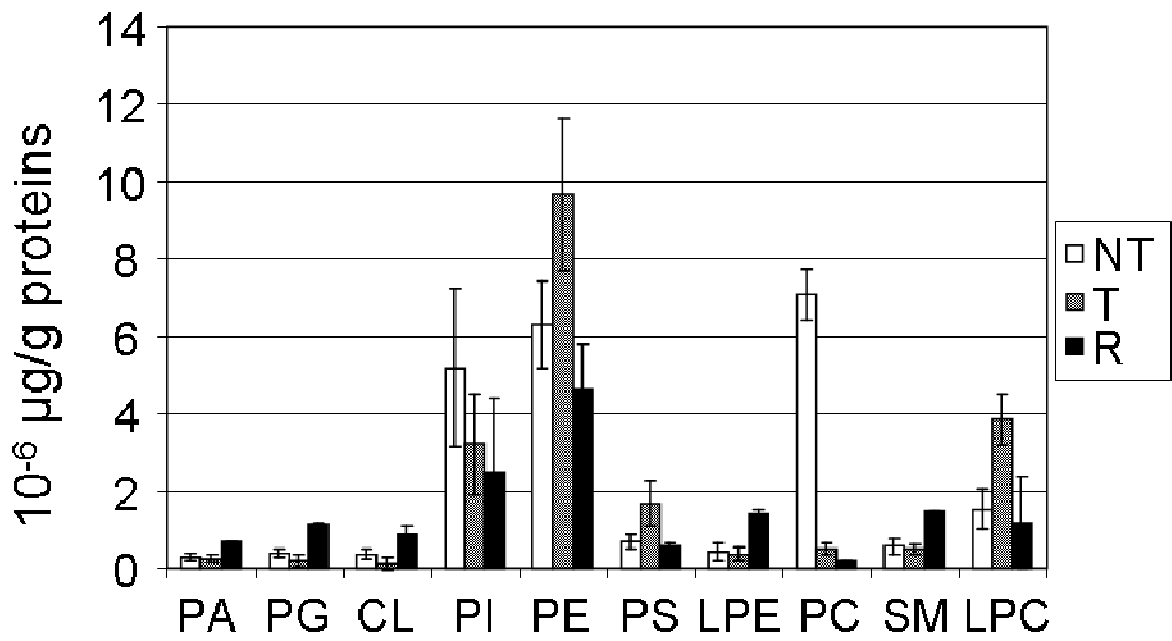


Figure 37 : Scores plot obtained by PLS-DA with OSC pre-processing for NT (a), T (b) and R (c) Leishmania extracts. Each sample was duplicated.

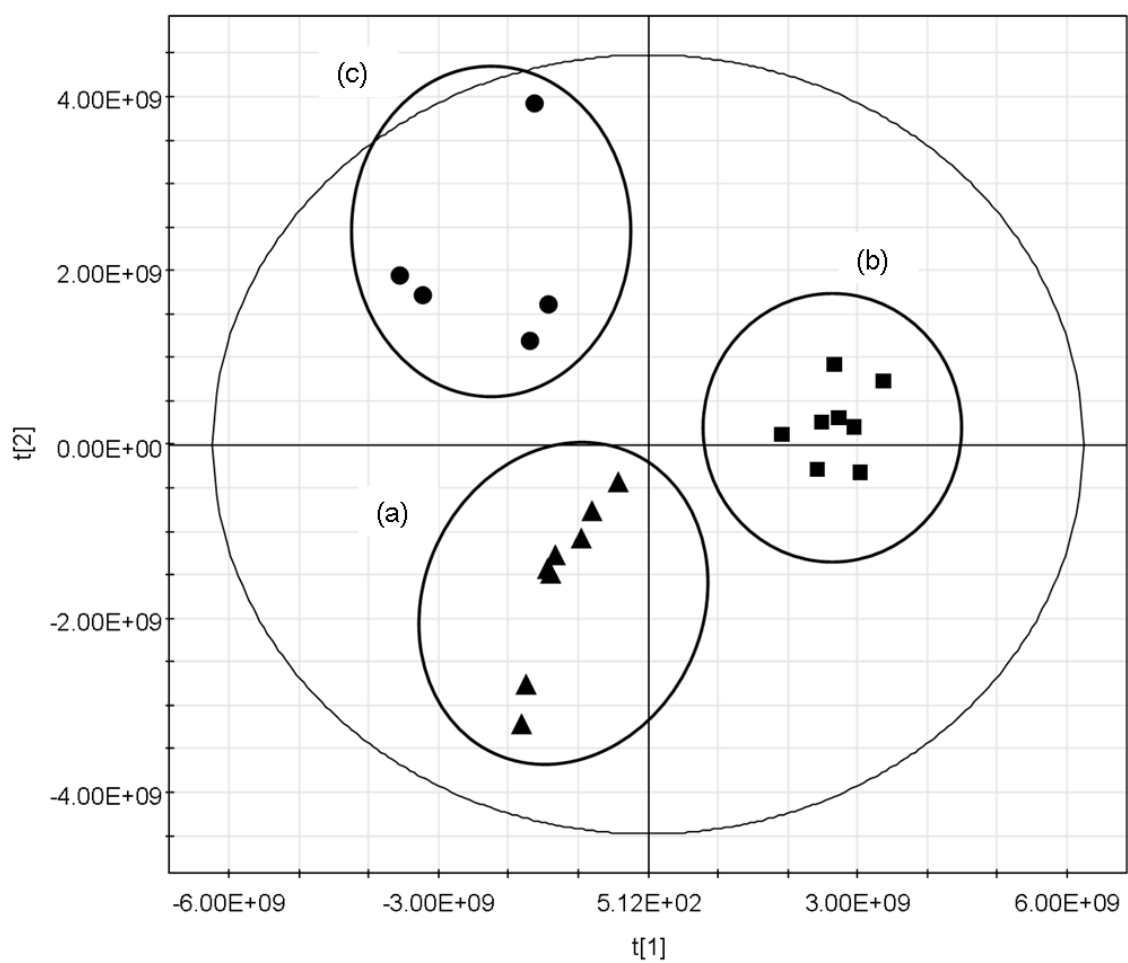
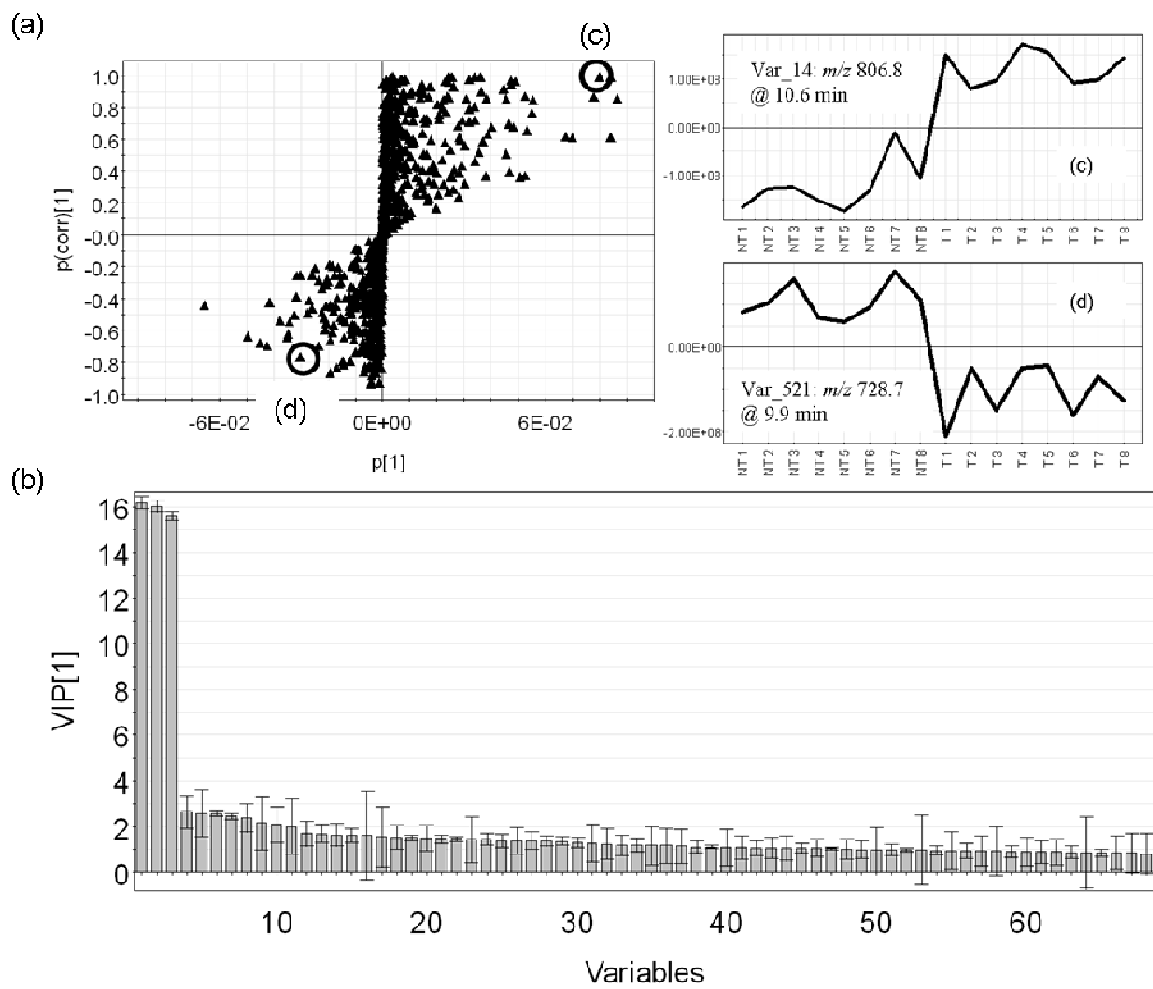


Figure 38: (a) (X,t) covariance vs (X,t) correlation for the first component of the OSC-PLS model comparing NT versus T clones. Figures at the right side of the plot show line plots of X variables (ions/retention times surrounded by a circle) with either (c) high positive covariance and correlation or (d) high negative covariance and correlation.

(b) Variable Importance Plot used for variable selection prior to verification on initial spectra. Each variable is presented with its importance in the computation of the model, with its standard deviation

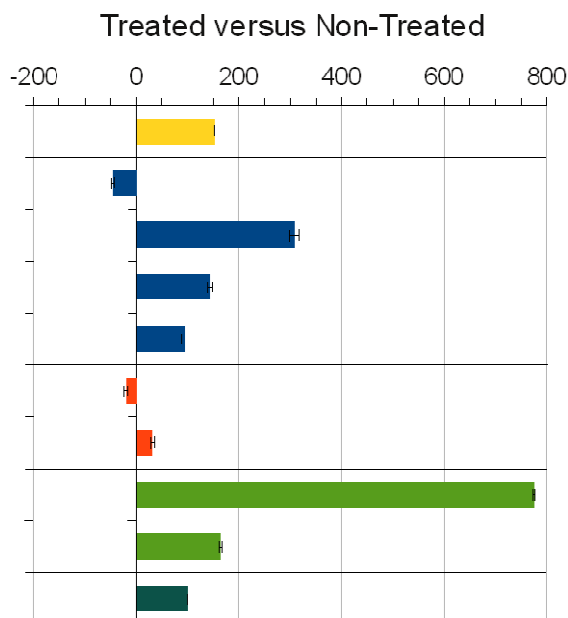


SIMCA-P 11 - 05/07/2011 17:16:05

Figure 39 : Percentage of over – or under – expression of molecular species highlighted by OSC-PLS on LC-ESI/MS data (negative ion mode for PI and PE, positive ion mode for PC, SM and LPC), when comparing a) T versus NT; b) R versus NT and c) T versus R. Molecular structures are proposed whenever possible by using *lipidmaps.org* and need further MS/MS studies.

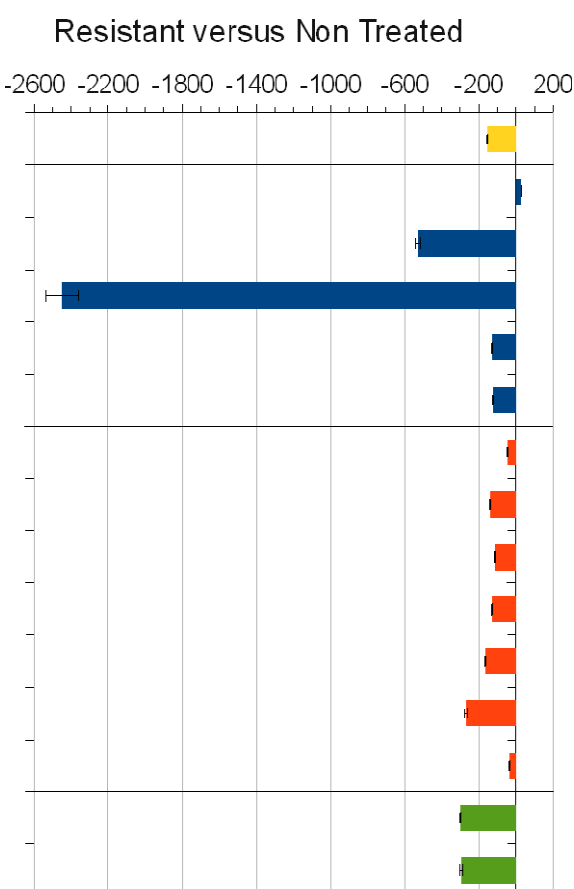
a)

Structure proposition	<i>m/z</i>
PI (36:1)	863
PE (35:2) or ether-lipid PE (36:2)	728
PE (39:4) or ether-lipid PE (40:4)	780
PE (41:5) or ether-lipid PE (42:5)	806
PE (39:5) or ether-lipid PE (40:5)	778
PC	936
PC	914
LPC (17:1)	508
LPC (15:0)	480
Miltefosine	408



b)

Structure proposition	<i>m/z</i>
PI (35:1) or ether-lipid PI (36:1)	849
PE (35:2) or ether-lipid PE (36:2)	728
PE (33:2) or ether-lipid PE (34:2)	700
PE (39:4) or ether-lipid PE (40:4)	780
PE (40:3)	796
PE (39:5) or ether-lipid PE (40:5)	778
PC	936
PC	912
PC (36:2) or ether-lipid PC (37:2)	786
PC (44:6)	890
PC (42:6)	862
PC (34:1) or ether-lipid PC (35:1)	760
PC (40:6)	834
LPC (22:5)	570
LPC (18:2)	520



c)

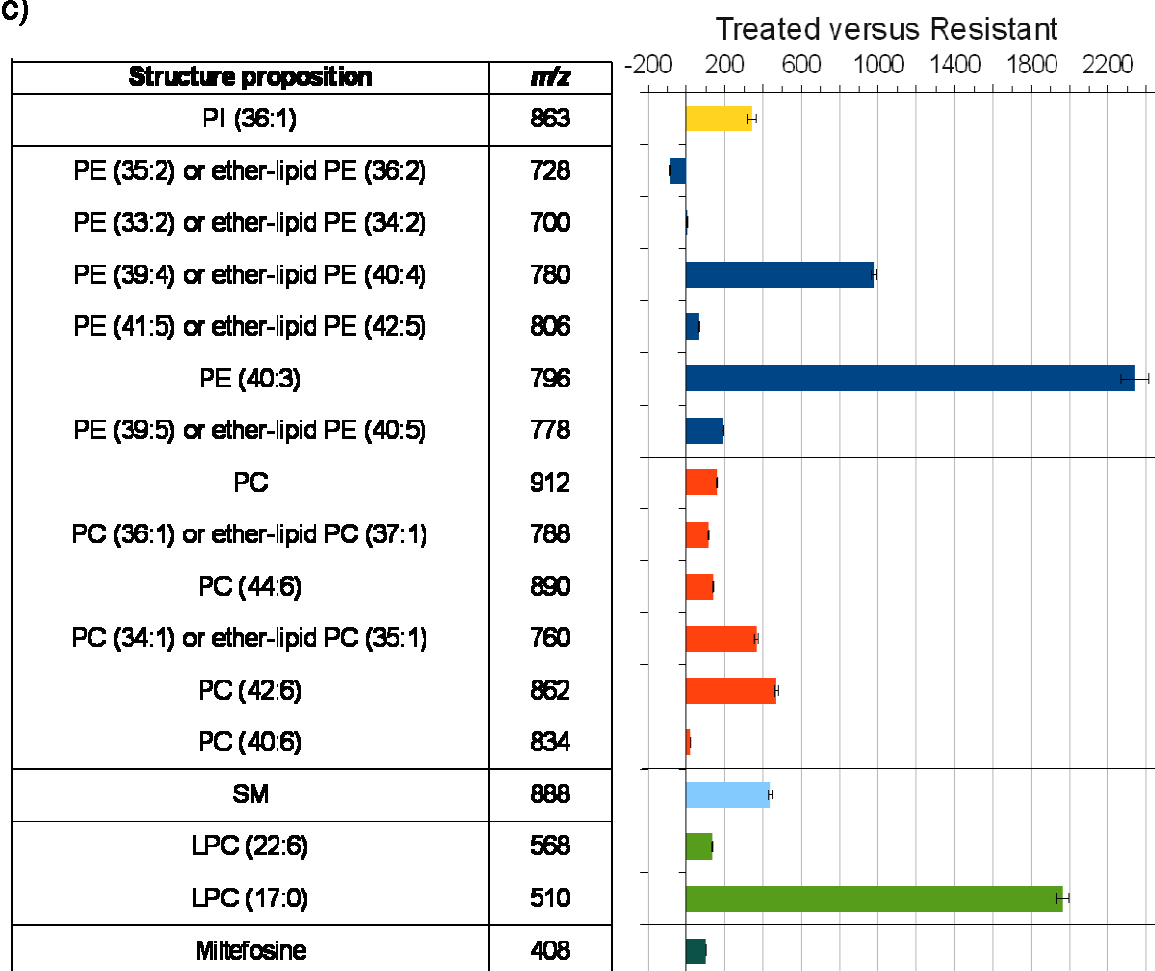


Figure 40 : Comparison of mean PE spectra between *Leishmania donovani* clones in negative ion mode: non-treated (NT), treated (T), and resistant (R) to miltefosine.

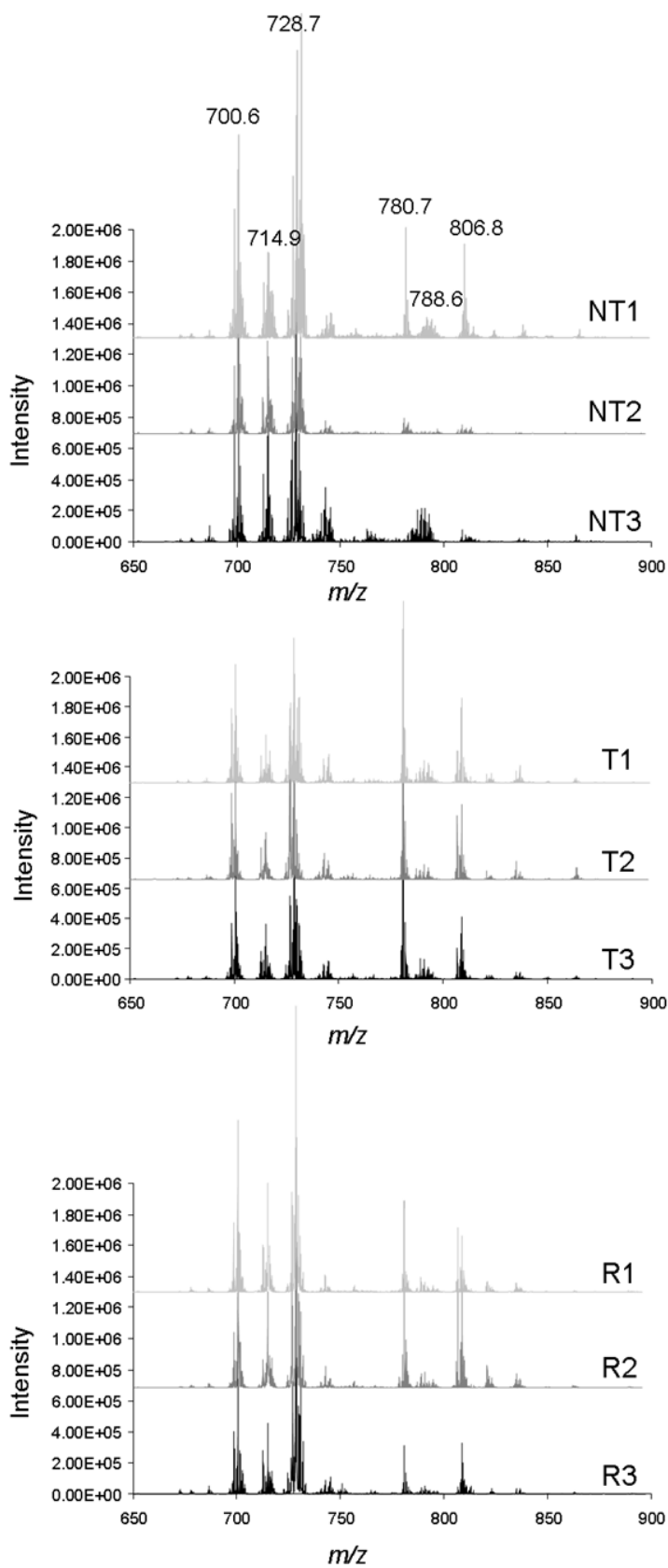


Figure 41 : MS/MS spectra of the PE [M-H]⁻ of m/z 728.7.

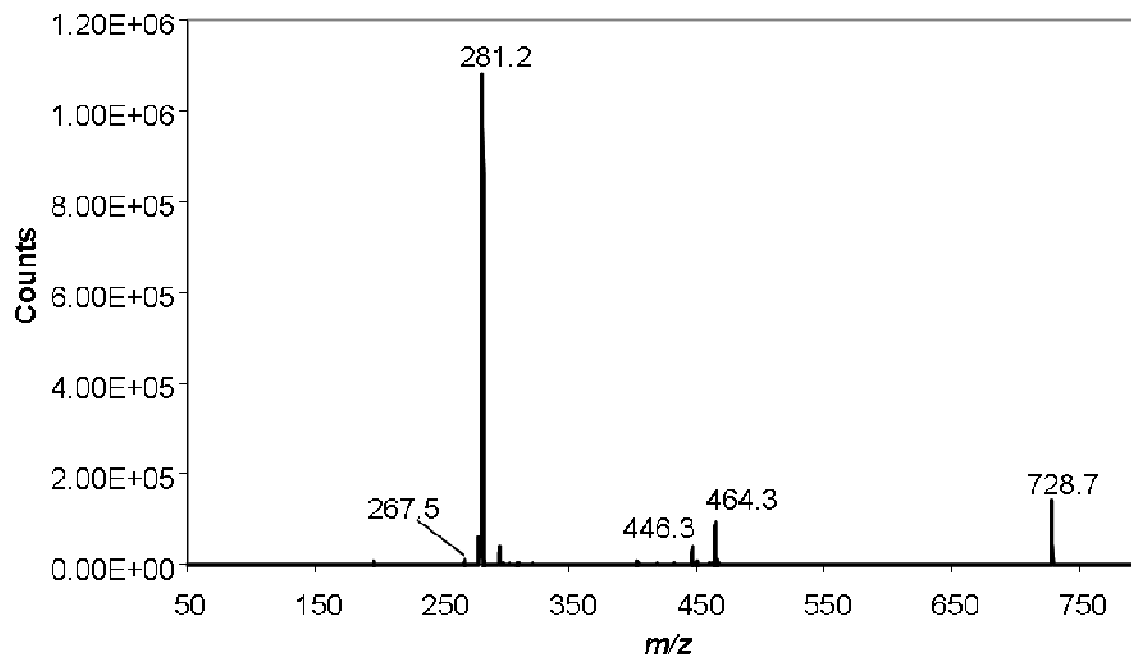
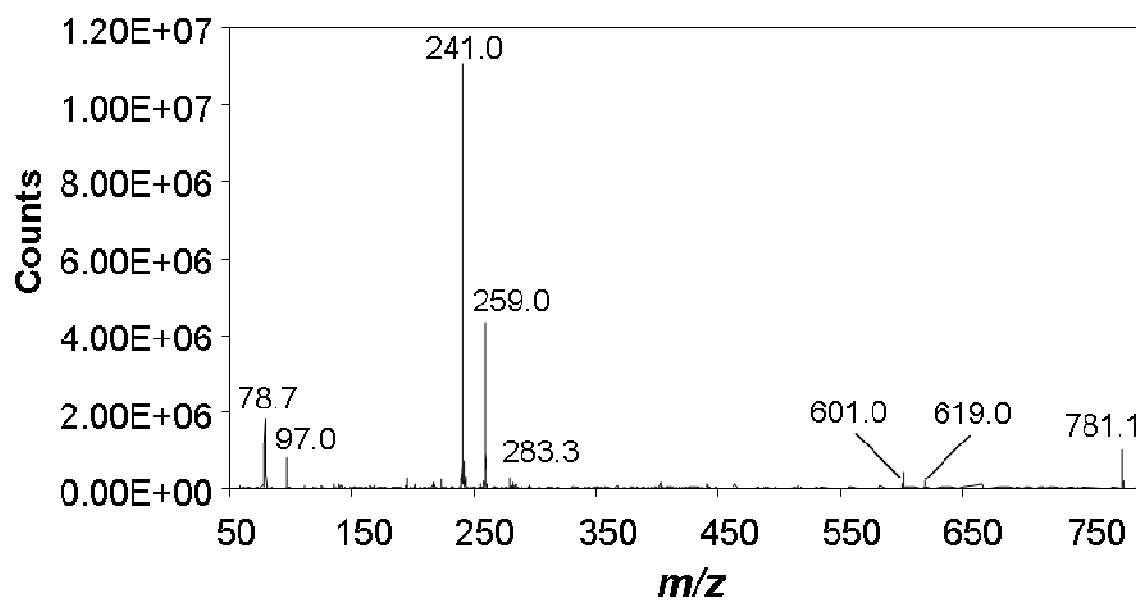


Figure 42 : MS/MS spectra of the IPC [M-H]⁻ of m/z 780.7, firstly attributed to a PE due to its retention time.



**3^{EME} PARTIE : ETUDE DES SOURCES A PRESSION
ATMOSPHERIQUE POUR L'ANALYSE DE L'ENSEMBLE
DES LIPIDES**

Travaux en cours de publication, soumis dans *Journal of Chromatography A*.

Le travail engagé sur les phospholipides que nous venons de présenter a conduit à s'intéresser à la comparaison des sources d'ionisation en spectrométrie de masse afin d'étendre le nombre de classes de lipides étudiées. Un projet « Jeune Chercheur » présenté à l'IFR 141 a débouché sur une collaboration avec l'équipe de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif-sur-Yvette. Les travaux réalisés constituent les deuxième et troisième parties de cette thèse. Dans un premier temps, les sources à pression atmosphérique disponibles (ESI, APCI et APPI) ont été comparées afin de rechercher celle présentant les meilleures performances pour l'analyse de lipides apolaires tels que le squalène, les triglycérides ou le cholestérol, comme pour les lipides plus polaires tels que les phospholipides. Ainsi, une séparation chromatographique en phase normale utilisant une phase monolithique a été adaptée puis couplée à la spectrométrie de masse [81]. La finalité du travail est de réaliser une étude lipidomique selon une démarche similaire à celle précédemment exposée, sur les lipides totaux cette fois. Dans un second temps, des cultures de *Leishmania donovani* cultivées sous différentes conditions permettant d'explorer l'action de la miltefosine et de l'amphotéricine B ont été analysées. Les données acquises ont fait l'objet d'un traitement chimiométrique, et les résultats sont présentés sous forme de projet de publication dans la troisième partie de cette thèse.

Lors de cette collaboration, une publication sur l'étude des mécanismes de fragmentation en source en APPI a été rédigée par l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN [185].

Comparison of Electrospray Ionization, Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Atmospheric Pressure PhotoIonization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*.

Laurent Imbert¹, Mathieu Gaudin^{3,4,5}, Danielle Libong^{1*}, David Touboul³,
Abreu¹, Philippe M. Loiseau², Olivier Lapr evote^{3,4}, Pierre Chaminade¹.

¹
Univ Paris-Sud, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA4041, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

²
Univ Paris-Sud, Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire, UMR CNRS 8076, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

³
Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Bâtiment 27, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

⁴
Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

⁵
Technologie Servier, 25/27 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France.

A comparison of ElectroSpray Ionization (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) and Atmospheric Pressure PhotoIonization (APPI) for the analysis of a wide range of lipids has been performed on standard mixtures and extracts of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to Amphotericin B (AmB). Calibration model, precision, limits of detection and quantification (LOD and LOQ) were assessed for each source. APPI provided the highest signal, signal-to-noise (*S/N*), and sensitivity for non-polar and low-polarity lipids, while ESI and APCI gave better results for the most polar ones. The linear model was valid for all lipids, except for one class with APPI, six classes with ESI, and eleven classes with APCI. LODs ranged from 0.2 to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ESI, from 0.1 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for APCI, and from 0.02 to 9.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for APPI. LOQs ranged from 0.2 to 61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ESI, from 0.4 to 31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for APCI, and from 0.1 to 29 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for APPI. Each source provided similar lipid composition and variations in a comparison of three different *Leishmania donovani* samples: miltefosine-treated, miltefosine-resistant and treated miltefosine-resistant parasites. A treated

miltefosine-resistant sample was finally analyzed with each ion source in order to verify that the same lipid molecular species are detected.

Keywords: Phospholipids, Triglycerides, Fatty Acids, Sterols, Lipidomics, Leishmania donovani, Electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Atmospheric Pressure Photoionization.

I. Introduction.

Lipids are a heterogeneous category of biomolecules that may be defined as hydrophobic or amphipathic molecules produced by carbanion-based condensations of thioesters and/or by carbocation-based condensations of isoprene units [186, 61]. Lipids are essential cellular constituents that have multiple critical roles in cellular functions: membrane structure [187], interactions with proteins [188], energy storage [189], and source of second messengers [190].

Separations of intact, underivatized lipids by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) became a common practice with the use of the Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) introduced in the late 70's [88]. Since then, Mass Spectrometry (MS) has been more and more used in lipidomics and is now the most widely employed technique. Numerous analytical platforms have been already described using either Normal-Phase (NP) [78–80] or Reversed-Phase (RP) Liquid Chromatography [73–77].

In RP-HPLC, retention of lipid molecular species is mainly governed by the extent of interaction between the hydrocarbonaceous moiety of the molecule and the alkyl chain of the grafted silica stationary phase whereas the nature of the polar group, when existing, is playing a minor role. Coelutions between molecular species of different lipid classes may thus occur resulting in possible ion suppression and complicate interpretation of full-scan mass spectra when fragmentation is taking place in the ion source.

When NP-HPLC is employed [40, 81–85], molecular species of a given class elute in the same elution window and, ideally, as a single peak. Chromatograms are thus simplified, and the mass spectrum of a given peak reflects the relative abundances of the molecular species within the corresponding lipid class. NP-

HPLC/MS is therefore an interesting tool to handle the high complexity of lipid extracts. This implies however, that the ionization source is compatible with the organic solvents used in NP-HPLC and is able to provide an efficient ionization of all lipid classes. The method recently published by Graeve *et al.* [81], which allowed the separation of a broad range of lipid classes on a monolithic silica column using common normal phase solvents, was selected to be coupled to mass spectrometry in the present work.

ElectroSpray Ionization (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) are currently the most widely used Atmospheric Pressure Ionization (API) modes [73, 191]. ESI is particularly suitable for the analysis of polar molecules, such as phospholipids [175, 192–195] and ceramides [196–199], while APCI allows the ionization of less polar compounds [200–203]. On the contrary, Atmospheric Pressure PhotoIonization (APPI) remains underused for lipid analysis [204–206]. Recently, Cai and Syage [207] compared the quantitative accuracy and sensitivity of LC coupled to APPI, APCI or ESI for the analysis of free fatty acids and their esters as well as di- and triacylglycerols. They demonstrated the benefits of LC/APPI-MS for the quantitative analysis of these neutral lipids.

The aim of the present study is to compare API sources (ESI, APCI and APPI) in the context of an untargeted full-scan approach of a wide range of lipid classes by NP-HPLC. In a first step, a comparative study in terms of sensitivity and structural information provided by full-scan acquisition was performed for 15 lipid classes from the less polar squalene to the most polar lysophosphatidylcholine. Lipid extracts from various *Leishmania donovani* parasites (wild-type, resistant to Amphotericin B (AmB), resistant or treated by HexadecylPhosphoCholine (miltefosine, HePC)) were then analyzed using the three ion sources in order to evaluate possible matrix effects. AmB is an intravenous drug that has already proven its effect against leishmaniasis. HePC is the first orally active treatment against this parasite [36, 208] and is known to cause both qualitative and quantitative changes in membrane lipid composition [40, 84].

II. Material and methods.

A. Chemical compounds.

L- α glycerophosphatidic acid (PA), L- α glycerophosphatidylglycerol (PG), L- α glycerophosphatidylcholine (PC), L- α glycerophosphatidylethanolamine (PE), LysoPhosphatidylCholine (LPC), LysoPhosphatidylEthanolamine (LPE) were from egg yolk, L- α glycerophosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SM), galactocerebrosides (CB) were from bovine brain, diphosphatidylglycerol or cardiolipine (CL) was from bovine heart, L- α glycerophosphatidylinositol (PI) was from bovine liver, glyceryl trioleate (OOO), Stearic Acid (SA), cholesterol (Chol), squalene (Sq) with approximately 98% purity were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Standards were prepared in a chloroform/methanol (2:1) mixture, at a concentration of 5.0 mg.mL⁻¹ and were then diluted for further experiments.

Propan-2-ol, n-heptane, ethyl acetate and acetone were HPLC-grade and purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Acetic acid 99-100% and ethanolamine 99% were analytical reagent grade purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). HePC (HexadecylPhosphoCholine = miltefosine) was supplied by Zentaris (Frankfurt, Germany).

B. Parasite strains and culture.

Culture of promastigote forms of *Leishmania donovani* has been previously described [40, 84]. The pellet obtained was considered to contain the total membrane fraction of parasites used for lipids determination. Wild-Type (WT) parasites were called Non-Treated (NT) parasites. Treated (T) parasites were samples for which a WT parasite culture was treated with 10 μ M of HePC for a 48 h period. HePC-Resistant (R) parasites were selected from WT parasites by stepwise drug pressure of a 40 μ M HePC concentration. Finally, Resistant-Treated (RT) parasites were R parasites treated with 20 μ M HePC for a 48h period. An Amphotericin B-Resistant (AmB-R) strain was also used for the development of the method.

C. Lipid extraction.

Extraction of lipids was based on the method of Folch *et al.* [67], and has been previously used by Ramos *et al.* [84]. The parasite pellets were re-suspended in 1 mL of Tris-buffered saline solution. A mixture of 2.50 mL of chloroform and 1.25 mL of methanol was added to extract the total lipids from the parasite suspension. This mixture was sonicated five times for 30 seconds at 4°C using a sonifier cell disruptor after a previous incubation time of at least one hour. Centrifugation at 3000 g for 5 minutes was then made and the lower phase containing total lipids was collected and evaporated to dryness under nitrogen gas at room temperature. 300 µL of a mixture chloroform/ methanol (2:1, v/v) was added, and samples were diluted 1/5 before injection.

D. Apparatus.

The HPLC instrumentation consisted of an Agilent HPLC 1050 system (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Germany). The separation of lipids was performed with two Chromolith® Performance-Si (100 × 4.6 mm I.D) (Merck, Fontenay-sous-Bois, France), thermostated at 40°C. A triple quadrupole mass spectrometer TSQ Vantage EMR (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) was used for these experiments. This instrument was equipped with a Heated ElectroSpray Ionization (HESI-II) probe (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) and a combined APCI/APPI ion source. APPI source was fitted with a krypton PKS 100 lamp (Cathodeon, Cambridge, England) that generates a continuous flow of 10.0 and 10.6 eV photons. The signal was acquired with Xcalibur System software provided by Thermo Fisher Scientific.

E. Chromatographic method.

The flow rate was set at 1 mL/min and a sample volume of 10µL was injected. Separation of lipids was based on the method developed by Graeve *et al.* [81]. Isooctane was replaced by n-heptane for economic reasons. Phase A consisted of n-heptane/ethyl acetate (99.8:0.2, v/v), phase B consisted of acetone/ethyl acetate (2:1; v/v) containing 0.02% acetic acid, and phase C was a mixture of propan-2-ol/water (85:15, v/v) containing 0.05% acetic acid and ethanolamine. The solvent program was

almost identical [81] (Table 3), 3 minutes were added to the 100% phase B period in the second half of the gradient to enhance column cleanup, and 2 minutes were added to the equilibration step. The total duration of the method was 40.0 minutes and the elution order was as follows: Sq, TG, Chol, SA, CB, PA, PG, CL, PE, PI, PS, LPE, PC, SM, and LPC.

F. Mass spectrometry method.

Source parameters were optimized by infusing standards at the concentration of 1 μ g/mL (Table 4). For each experiment, the sample was injected in the LC flow with the composition of eluent corresponding to the composition present at the retention time of the lipid class infused. During APPI experiments, acetone was used as a dopant and was introduced using a Kontron Instruments[®] HPLC pump 422, at a flow rate of 50 μ L/min.

Both negative and positive ionization methods were employed to collect the maximum information from biological samples [209]. As standards were from natural origin and contained multiple species, each parameter was determined from the most abundant ion peak. Then, mean parameters were fixed for each ionization source in both polarities during the full length of the chromatographic analysis or during segmented parts, depending on the best signal intensity achieved. S-lens was automatically fixed between 76 and 182 (arbitrary units) depending on the m/z value. Mass spectra were acquired in the full scan mode. The m/z range was fixed at 250-1500 for both polarities because APPI mass spectra displayed an excessive noise below m/z 200. Full scan acquisition was performed with the first quadrupole (Q1), which peak width was set at 0.70 Th. Scan time was set at 0.358 seconds.

ESI. During LC-MS experiments, three segments of parameters (0-13 min, 13-30 min, 30-40 min) were defined for the negative ion mode in ESI. The first two segments allowed detection of non-polar lipids and polar lipids respectively. Gas pressure was higher in the second segment in order to increase desolvation when solvents of low volatility, *i.e.* propan-2-ol and water, are present in the mobile phase at the end of the gradient. The last segment was set to allow the source temperature to equilibrate before the next run. Only one segment was sufficient for the positive ion mode.

APCI. Only one segment was necessary in both positive and negative ion modes.

APPI. Three segments were set for the positive ion mode (0-22 min, 22-30 min, 30-40 min) because of the difference between optimized parameters for non-polar lipids (Sq, GTO, Chol) and polar lipids (PC and SM), while only one segment was needed for the negative mode.

A mixture containing 100 μ g/mL of each lipid class was firstly analyzed in order to compare the response and the structural information provided by each ion source. Signal was integrated on the extracted ion chromatogram of the most abundant ion. Noise was determined by integrating signal just before the LC peak. As ESI provided no *in-source* fragmentation, the most abundant ion was $[M-H]^-$ or $[M+H]^+$. When *in-source* fragmentation occurred in the case of APCI and APPI, choice was made to sum the signals of fragment and parent ions, as *in-source* fragmentation may lead to different relative intensities of the fragment ion peaks, depending on the ion source and the concentration of the sample. If an adduct ion was formed, the signals of the protonated and adduct ions were summed.

For the analysis of *Leishmania* samples, a qualitative comparison was done based on the integrated area and *S/N* of the most abundant ion of each lipid class.

III. Results and discussion.

A. Full-scan analysis in the positive ion mode.

For APPI, response factors with either toluene or acetone as dopant [210] were evaluated and did not exhibit significant differences. Acetone was finally chosen as it was also present in the mobile phase. Propan-2-ol is a protic solvent expected to enhance the sensitivity of ESI [211], and has a self-doping effect for APPI leading to direct photoionization of analytes. Table 5 shows the nominal masses of the characteristic ions of each lipid class in ESI, APCI and APPI. Six lipid classes: Sq, Chol, TG, PC, SM and LPC were analyzed in the positive ion mode.

ESI spectra displayed the protonated molecules ($[M+H]^+$) for: Sq at m/z 411, PC (34:1) at m/z 760, SM (36:1) at m/z 731 and LPC (20:2) at m/z 548[182, 212–218]. Chol led

to the formation of an intense fragment ion peak at m/z 369 ($[M+H-H_2O]^+$) [203, 219, 220]. The mass spectrum of glyceryl trioleate presented two ion peaks: one at m/z 885.5 ($[M+H]^+$) and one major fragment ion peak at m/z 603 corresponding to the loss of oleic acid ($[M+H-C_{18}O_2H_{34}]^+$) [202].

APCI and APPI spectra also displayed an intense ion peak corresponding to the protonated molecules for Sq and LPC [213, 214, 185]. PC and SM $[M+H]^+$ ions led to intense fragment ions $[M+H-C_5H_{14}NO_4P]^+$ at m/z 577 for PC and m/z 548 for SM which were assigned to the loss of the phosphocholine headgroup (Figure 43) [191, 206, 218, 185, 221]. Chol and OOO mass spectra displayed the same ion peaks as with ESI [219, 222–224].

B. Full-scan analysis in the negative ion mode.

Nine lipid classes displayed higher intensities in the negative ion mode: SA, galactocerebroside, PG, CL, PI, PE, PS and LPE. PA was detected neither in the negative ion mode nor in the positive ion mode. Previous works using a normal phase separation combined with ESI detection showed that ionization of PA was enhanced by decreasing the amount of heptane [225]. In our present experiment, proportion of heptane is thus thought to be unfavorable to PA ionization.

The negative ion mass spectra displayed intense ion peaks corresponding to the $[M-H]^-$ species with each source for the following series of lipids: SA (m/z 283), Galactosylcerebrosides (m/z 826), PG (34:1) (m/z 747) and PE (38:4) (m/z 766). Only PG exhibited slight *in-source* fragmentation leading to the formation of the stearate anion (m/z 283) [194, 215–218, 221].

PI (34:2) led to the $[M-H]^-$ ion at m/z 833 under both ESI and APPI conditions [199, 226]. By contrast, the APCI mass spectrum of this lipid showed an intense fragment ion peak at m/z 673 which was attributed to the loss of the inositol headgroup from the deprotonated molecule. Only ESI allowed detecting the $[M-H]^-$ ion peak for CL (m/z 1448) and PS (36:1) (m/z 788) [199]. With APPI and APCI, the mass spectrum of CL showed a signal at m/z 1430 corresponding to the dehydration of the $[M-H]^-$ ion, and an intense signal at m/z 831 corresponding to the loss of a diacyl glycerol $[M-H-C_{39}H_{68}O_5]^-$. PS showed a similar mass spectrum for APCI and APPI with a major

fragment ion at m/z 281 (oleate anion $[C_{18}H_{33}O_2]^-$) and a minor one at m/z 701 corresponding to the loss of the serine headgroup ($C_3H_7NO_3$) which was also observed for ESI [194, 215].

LPE (18:0) was detected as a deprotonated molecule at m/z 480 which undergone further *in-source* fragmentations, the relative intensities of the ion peaks differing for each ion source. The major ion species was observed at m/z 419 for APCI, corresponding to the loss of the ethanolamine headgroup, at m/z 480 for APPI ($[M-H]^-$), and at m/z 283 for ESI (stearate anion $[C_{18}H_{35}O_2]^-$) [227, 228]. The latter result is surprising inasmuch as ESI is considered as the softest ion source. Major molecular species arising from PG, CL, PI, PE, PS and LPE were deprotonated molecules $[M-H]^-$, deprotonated fatty acids $[RCOO]^-$, or $[M-H-RCOOH]^-$ fragment ions.

Because ESI led to the preferential formation of intact molecular species in the gas phase ($[M-H]^-$ or $[M+H]^+$ depending on the ionization polarity), the ionization mode could be a good candidate for the screening of lipids by chemometrics, and for their quantitation. The situation is more complex with APPI and APCI since *in-source* fragmentations occur from both protonated and deprotonated species. Nevertheless these two ionization techniques can be very useful in order to confirm the identity of the lipid classes owing to the formation of diagnostic fragment ions. Moreover introduction of data redundancy is of great interest for chemometric interpretation using autocorrelation matrix.

C. Comparison of the ion sources using standard lipid mixtures.

Comparison of ion sources was made using extracted ion chromatograms in the polarity giving the best sensitivity for each lipid class. Sq, TG, Chol, PC, SM and LPC were studied in the positive ion mode, while SA, CB, PG, CL, PE, PI, PS and LPE were studied in the negative ion mode. When comparing peak areas, APPI appeared to give a higher response than ESI and APCI for low-polarity lipids, from Sq to PI and LPE. APPI ranked last for polar lipids: PS, PC, SM and LPC. ESI displayed a higher signal than APPI and APCI for PS and PC, while ESI and APCI were similar for SM and LPC.

Similar trends were observed when taking into account the noise by calculating S/N for each lipid class (Figure 44). APPI displayed a S/N more than 8 times higher

than ESI and APCI for Chol, SA, PG, CL, PE and PI. A S/N more than three times higher than ESI and APCI was also obtained for Sq, TG and LPE. CB appeared to be a specific case as APPI performed only slightly better than ESI but with a 32 times higher S/N than APCI. In the case of most polar lipids (PC, SM and LPC) ESI and APCI performed better than APPI with a 4 fold higher S/N . From these results, APPI appeared to be more appropriate to analyze lipids of low polarity while ESI and APCI proved more efficient for polar lipids.

The superiority of APPI for the analysis of non-polar lipids was expected [207] as well as the poor performances of ESI for such lipids (Sq, TG, Chol and SA). ESI relies on the production of charged droplets, subsequently evaporated until individual ions are obtained and directed through the analyzer [101]. Therefore good ionization conditions are met with the use of protic solvents while analyzing compounds that have a sufficient proton affinity. A NPLC separation was used here, using essentially aprotic solvents, i.e. n-heptane. The lower ionization yield of non polar lipids (Sq, TG, Chol) eluted with a high proportion of n-heptane (from 100% to 40%) could be also explained by the low proton affinity of these analytes [229].

A lower influence of the mobile phase composition on ion formation could explain a better ionization of non-polar lipids with APCI and APPI compared to ESI, due to their differences in ionization mechanism [107, 112]. Although ESI has been widely used for lipids studies [74, 130, 131] for its better sensitivity compared to APCI when using RPLC, notably on polar lipids, results here showed that both ion sources provided similar performances on polar lipids when using NPLC. Furthermore, ESI needs an optimal source tuning (voltage, gas pressure) for each lipid class. In the case of a non targeted analysis like the one presented here, such conditions were not achieved as mean source parameters were used for the analysis in order to detect all fourteen lipid classes in a single chromatographic run.

D. Evaluation of linearity, precision, limits of detection and quantification.

A calibration range of six levels from 0.05 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, replicated three times, was used to evaluate the response linearity of each source. Except for the LPE/APPI couple, which is better fitted by a power model, all calibration curves were calculated

according to a linear model. Table 6 shows the coefficient of determination and the slope (sensitivity) of the linear model. The model was validated with values of coefficient of determination above 0.95. The highest coefficients of determination were found with APPI with values above 0.95 except for PI, followed by ESI with 6 lipids under 0.95. APCI displayed modest r^2 as only 3 values are above 0.95. A Student t-test showed that the intercept of the linear model was statistically not different from zero ($p < 0.001$) and it is thus demonstrated that a direct proportionality exists between the injected quantity and the analytical system response when the linear model is statistically valid.

Sensitivity was also determined for each lipid class (see Table 6), using IUPAC definitions [230]. As a linear model was used for all lipids except LPE/APPI, sensitivity corresponds to the slope of the calibration curve. For LPE/APPI, sensitivity was calculated as the derivative of the power model at the half of the calibration range. APPI offered the best sensitivity, especially for non-polar lipids (Sq, TG, Chol, SA and CG) and on PG, CL, PE and PI, displaying values between 1.47×10^5 and 2.35×10^6 . ESI was more appropriate for PS, PC and LPC with values between 6.23×10^4 and 2.25×10^5 , and APCI was more sensitive for LPE and SM, showing values of 3.69×10^4 and 1.02×10^5 , respectively. APPI is 10 times less sensitive than the two other sources for polar lipids. These results confirm data shown in Figure 44. In the case of an untargeted study of lipids, APPI could be sensitive enough to properly detect all lipid classes, while ESI would be preferred in a targeted study of polar lipids.

Precision of the technique was assessed by determining the repeatability and intermediate precision (Table 7). Repeatability was calculated with three replicated injections at three concentration levels adapted to the linearity range of each source for each lipid class, whereas intermediate precision was determined on a triplicate of an intermediate concentration three different days.

Both parameters were in the range of 5 to 16% depending on the lipid class for the APPI source. For all classes, ESI showed slightly higher values, especially for Sq. Finally APCI showed high RSD values ranging from 16.6 to 80%. Ionization in APCI occurs in the gas phase with a corona discharge, therefore aqueous solvents that are less volatile than organic solvents could affect the signal stability, as well as the properties of solvent vapors present in the source [231]. During APCI experiments, an

organic deposit was observed on the corona needle that could have affected the discharge current during ionization. Solvent vapors present *in-source* could also have caused suppression of ionization, especially for low polarity compounds [231], and would explain the lack of repeatability observed here.

LOD and LOQ were calculated using the following formulas: $LOD = (3.3 \sigma)/S$ and $LOQ = (10 \sigma)/S$; where σ is the standard deviation of the response, and S the slope of the calibration curve. LOD were the lowest for APPI source for non-polar lipids (Table 6) from Sq to PG, then for PE, PI and LPC with values between 0.02 and 2.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. For APCI, LOD were between 0.1 and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for these lipids, and between 0.2 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for ESI. APCI provided the lowest LOD for CL and LPE, while ESI was better for PS, PC and SM. The LOQ followed the same trends between ionization sources.

These results confirmed the findings of Cai *et al.* [232], who reported a superior response of APPI over APCI for the analysis of pharmaceuticals covering a wide range of polarity. From our results, APPI is superior to APCI and ESI from the point of view of response, precision and direct proportionality when non polar to medium polarity lipids are of interest. The first step of APPI, *i.e.* nebulization by a thermospray, is the same than the one of APCI whereas the ionization is occurring by a photon beam. The use of a dopant throughout the separation may be responsible for the lower influence of the nature of solvents on ionization and the performances observed for this source [111, 231]. These characteristics are important in the scope of untargeted lipidomic studies where samples from two groups are compared. This ensures that over or under expressed molecular species that differentiate the two groups will be detected with an appropriate sensitivity and precision.

E. Biological samples.

1. Comparison of LC-MS profiles obtained with the three ion sources.

An extract of a *Leishmania donovani* strain resistant to Amphotericin B was injected in triplicate using each ionization source. Here, sources were compared according to the S/N ratio only (Figure 45). All molecular species contained in the

sample were analyzed, as the method of Folch *et al.* [67] allows obtaining a total lipid extract.

SM could not be detected in this full scan mode, as it is present in very low amounts in membranes of this parasite [40, 84]. As described above, APPI was still far better than ESI and APCI on TG, and CL, providing a *S/N* more than 21 times higher and more than 12 times higher than ESI and APCI, respectively. Then it exhibited a *S/N* 2 times higher than the two other sources for Chol. It appeared that APPI and APCI seemed rather equivalent for SA, PG, PE and PI, with a slightly higher response of APPI for PE and PI. ESI and APCI were still more efficient than APPI on PC and LPC, which showed a *S/N* more than 3 times lower, while ESI provided a signal more than 4 times higher than the other sources for PS. Differences between the ionization sources were confirmed here, with a biological sample containing a lower quantity of lipids than the mixtures of standard compounds used above. The difference of sensitivity and response curves explains the less important variations observed for PI, PE, PG or CL between ion sources on the biological sample.

These results are confirmed when looking at the total ionic current (TIC) in Figure 46. ESI chromatogram displays a weaker signal than the two other sources with maximal intensity around 0.6×10^8 and 0.2×10^8 in the positive and negative ion modes respectively, while APPI and APCI provided a signal higher than 1×10^8 with both ion modes.

To conclude, APPI provided the highest responses concerning non-polar lipids, while ESI ranked first for polar lipids (PS, PC and LPC). Thus, APPI and ESI would be complementary to analyze the 14 lipid classes sought in a parasite sample.

2. Comparison of differently treated parasites.

Three strains of *Leishmania donovani* were cultured in different conditions: one was treated (T) with AmB, one was resistant (R) to AmB and one was resistant and treated (RT). Folch's extracts were analyzed with each ionization source, in order to compare their lipid profile (Figure 47). The study was focused on the major molecular species in each lipid class, in order to detect modifications of lipid composition between the three samples. The profiles were similar Lipid evolution within each class was similar, taking into account the particularities of each ion source. FFAs were

barely detected on ESI, and polar lipids (PS, PC and LPC) are better detected with APCI and ESI than APPI. RT sample presents a decrease of PC and an increase of LPC compared to the R sample. This finding was expected as it was previously reported using a targeted phospholipid class analysis with either ELSD or MS [40, 225]. At this stage, the comparison was restricted to the lipid class level since more samples are necessary to collect statistically relevant data.

The three chromatograms obtained for a RT sample were carefully analyzed in order to verify that each ion source was able to detect the same lipid molecular species in a biological sample. Ions are listed for each ion source in Table 8. Identical molecular species are gathered with few minor differences. Especially, APPI allows the detection of more TG and FFA species than ESI and APCI. Furthermore, some molecular species would correspond to lipids containing odd acyl chains or ether-lipids, i.e. TG m/z 839 and 865, or PE m/z 700, 728, 754, 784, and is consistent with previously reported work in *Leishania donovani* [85].

IV. Conclusion.

Lipidomic profiling heavily relies on the overall performances of the interface used in coupling the LC separation to the mass spectrometer. When NP-HPLC is used, lipids with important differences in polarity are analyzed. By offering the highest S/N , sensitivity, repeatability and the lowest LOD and LOQ for non-polar and low polarity lipids, APPI is of great interest. In the solvent conditions tested in our study, ESI and APCI are both more suited than APPI to analyze polar lipids; however, APCI suffers from a weaker repeatability when compared to ESI. Thus, considering a lipidomic study when normal phase LC is coupled to MS, analyzing samples through APPI and ESI source appear to be an interesting method to gather as much information as possible on the wide polarity range of lipids present in samples.

V. Acknowledgements.

We thank the Federative Research Institute IFR 141 for financing this study through the “Young Scientist Grant”. Françoise Huteau and Sandrine Cojean are acknowledged for their kind technical assistance in *L. donovani* cultures. M. Gaudin acknowledges Technologie Servier for funding.

VI. Tables and figures.

Table 3 : Gradient table used for chromatographic separation. Flow rate: 1mL/min. Phase A: n-heptane/ethyl acetate (99.8:0/2, v/v), phase B: acetone/ethyl acetate (2:1, v/v) + 0.02% acetic acid, phase C: 2-propanol/water (85:15, v/v) + 0.05% acetic acid and ethanolamine.

Time (min)	%A	%B	%C
0.0	100	0	0
1.5	100	0	0
1.6	97	3	0
6.0	94	6	0
8.0	50	50	0
8.1	46	39	15
14.0	43	30	27
14.1	43	30	27
18.0	40	0	60
23.0	40	0	60
23.1	0	100	0
28.0	0	100	0
28.1	100	0	0
40.0	100	0	0

Table 4 : Mean parameters used for each ionization source.

ESI	Segments	Spray Voltage (V)	Vaporizer Temp (°C)	Sheath gas (a.u.)	Auxiliary gas (a.u.)	Capillary Temp (°C)	S-Lens (a.u.)
Negative mode	0-13 min	2750	270	30	15	350	235
	13-30 min	2750	300	50	25	350	235
	30-40 min	2750	270	30	15	350	235
Positive mode	0-40 min	2500	280	60	25	270	130
APCI	Segments	Discharge current (mA)	Vaporizer Temp (°C)	Sheath gas (a.u.)	Auxiliary gas (a.u.)	Capillary Temp (°C)	S-Lens (a.u.)
Negative mode	0-40 min	3	450	50	5	350	160
Positive mode	0-40 min	3	400	40	5	300	135
APPI	Segments	Dopant	Vaporizer Temp (°C)	Sheath gas (a.u.)	Auxiliary gas (a.u.)	Capillary Temp (°C)	S-Lens (a.u.)
Negative mode	0-40 min	Acetone 50 µL/min	350	50	30	325	145
Positive mode	0-22 min	Acetone 50 µL/min	350	50	30	325	145
	22-30 min		300	20	30	350	140
	30-40 min		350	50	30	325	145

Table 5 : Characteristic m/z of the standard mixture in each ionization mode: ESI, APCI and APPI. Underlined m/z corresponds to the base peak (nominal masses are presented here).

Ionization mode	Lipid class	Rt. (min)	Characteristic Ions m/z for ESI	Characteristic Ions m/z for APCI	Characteristic Ions m/z for APPI
+	Sq	3.21	<u>411</u> [M+H] ⁺		
	OOO	7.30	885 [M+H] ⁺ ; <u>603</u> [M-C ₁₈ O ₂ H ₃₄] ⁺		
	Chol	10.41	<u>369</u> [M+H-H ₂ O] ⁺		
	PC	23.21	810 [M+H] ⁺ 786 [M+H] ⁺ <u>760</u> [M+H] ⁺	<u>577</u> [M+H-C ₅ H ₁₄ NO ₄ P] ⁺	
	SM	24.26	753 [M+Na] ⁺ <u>731</u> [M+H] ⁺	<u>630</u> [M+H-C ₅ H ₁₄ NO ₄ P] ⁺	
	LPC	25.09	<u>548</u> [M+H] ⁺		
-	SA	12.17	<u>283</u> [M-H] ⁻		
	CB	14.16	852 [M-H] ⁻ ; 840 [M-H] ⁻ ; <u>826</u> [M-H] ⁻ ; 812 [M-H] ⁻ ; 798 [M-H] ⁻		
	PG	17.05	843 [M-H] ⁻ ; 815 [M-H] ⁻ ; 775 [M-H] ⁻ ; <u>747</u> [M-H] ⁻ ; 773 [M-H] ⁻ ; 283; 281	<u>815</u> [M-H] ⁻ ; 773 [M-H] ⁻ ; 339; 281	<u>747</u> [M-H] ⁻ ; 773 [M-H] ⁻ ; 281
	CL	17.35	<u>1448</u> [M-H] ⁻	1448 [M-H] ⁻ ; 1430 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; <u>831</u> [M-H-C ₃₉ H ₆₈ O ₅] ⁻ ; 751; 339, 297; 279	1448 [M-H] ⁻ ; 1430 [M-H] ⁻ ; 853; <u>831</u> [M-H-C ₃₉ H ₆₈ O ₅] ⁻ ; 769; 695; 415; 279
	PE	18.22	806 [M-H] ⁻ ; <u>766</u> [M-H] ⁻ ; 744 [M-H] ⁻ ; 716	<u>766</u> [M-H] ⁻ ; 744 [M-H] ⁻ ; 716; 339	<u>766</u> [M-H] ⁻ ; 744 [M-H] ⁻ ; 716; 339
	PI	19.25	859 [M-H] ⁻ <u>833</u> [M-H] ⁻	887; 701; <u>673</u> [M-H-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁻	859 [M-H] ⁻ <u>833</u> [M-H] ⁻
	PS	21.09	788 [M-H] ⁻ ; 701 [M-H-C ₃ H ₇ NO ₃] ⁻	788 [M-H] ⁻ ; 701 [M-H-C ₃ H ₇ NO ₃] ⁻ ; <u>283</u>	788 [M-H] ⁻ ; 701 [M-H-C ₃ H ₇ NO ₃] ⁻ ; <u>283</u>
	LPE	21.40	480 [M-H] ⁻ ; 466 [M-H] ⁻ ; <u>283</u>	<u>480</u> [M-H] ⁻ ; 419 [M-H-C ₂ H ₇ NO] ⁻ ; 283	

Table 6 : Comparison of ESI, APPI and APCI on their ability to fit a linear model (except LPE for APPI), their sensitivity, LOD and LOQ for each lipid class.

<i>Lipid Class</i>	<i>Coefficient of determination r²</i>			<i>Sensitivity (Area.mL/μg)</i>			<i>LOD (μg.mL⁻¹)</i>			<i>LOQ (μg.mL⁻¹)</i>		
	ESI	APCI	APPI	ESI	APCI	APPI	ESI	APCI	APPI	ESI	APCI	APPI
Sq	0.77	0.98	1.00	1.14 x 10 ⁴	2.70 x 10 ⁵	1.47 x 10 ⁵	20	0.7	0.1	61	2.0	0.4
OOO	0.96	0.99	0.99	4.62 x 10 ⁴	1.31 x 10 ⁶	2.35 x 10 ⁶	0.2	1.6	0.04	0.6	4.9	0.1
Chol	0.92	0.91	0.95	5.65 x 10 ³	2.43 x 10 ⁴	3.98 x 10 ⁵	1.3	1.4	0.1	4.0	4.3	0.4
SA		0.89	0.98		1.00 x 10 ³	1.63 x 10 ⁶		0.7	0.4		2.2	1.3
GC	0.91	0.86	0.96	2.71 x 10 ⁵	2.82 x 10 ²	5.87 x 10 ⁵	0.3	10	0.1	0.9	31	0.3
PG	0.86	0.77	0.95	3.70 x 10 ⁵	4.09 x 10 ⁴	1.03 x 10 ⁶	0.4	0.2	0.02	0.2	0.5	0.07
CL	0.96	0.83	0.96	5.75 x 10 ⁴	2.61 x 10 ⁴	3.44 x 10 ⁵	0.7	0.3	0.5	2.3	1	1.6
PE	0.99	0.83	0.98	6.30 x 10 ⁴	9.65 x 10 ⁴	2.18 x 10 ⁶	1.4	0.1	0.02	4.2	0.4	0.1
PI	0.99	0.74	0.90	1.85 x 10 ⁵	1.47 x 10 ⁵	7.33 x 10 ⁵	1.9	1.9	0.03	5.6	5.9	0.1
PS	0.98	0.83	0.98	6.23 x 10 ⁴	1.95 x 10 ⁴	7.04 x 10 ³	0.9	2.4	6.0	2.6	7.3	18
LPE	0.98	0.74	0.95	1.51 x 10 ⁴	3.69 x 10 ⁴	1.54 x 10 ⁴	1.7	0.4	3.1	5.2	1.1	9.3
PC	0.98	0.97	0.99	2.25 x 10 ⁵	6.40 x 10 ⁴	3.11 x 10 ³	0.2	4.7	9.5	1.5	14	29
SM	0.87	0.93	0.98	4.70 x 10 ⁴	1.02 x 10 ⁵	6.97 x 10 ³	1.6	2.3	3.4	4.9	7.0	10
LPC	0.91	0.92	0.98	9.24 x 10 ⁴	7.97 x 10 ⁴	2.03 x 10 ⁴	2.7	3.6	2.2	8.0	11	6.6

Table 7 : Repeatability and intermediate precision of ESI, APCI and APPI for each lipid class.

Lipid class	ESI							APCI							APPI						
	Level N° (µg/mL)			Repeatability (%)			Intermetiate Precision (%)	Level N° (µg/mL)			Repeatability (%)			Intermetiate Precision (%)	Level N° (µg/mL)			Repeatability (%)			Intermetiate Precision (%)
	1	2	3	1	2	3		1	2	3	1	2	3		1	2	3	1	2	3	
Sq	6.25	50.0	100	76.6	48.2	36.2	53.7	6.25	12.5	50.0	14.3	15.5	22.1	17.3	6.25	12.5	25.0	13.1	17.4	12.1	14.2
TAG	1.56	6.25	50.0	8.40	24.3	16.0	16.2	6.25	12.5	50.0	17.4	14.3	18.1	16.6	6.25	12.5	25.0	6.0	2.20	7.40	5.2
Chol	1.56	6.25	50.0	15.1	26.0	39.4	26.8	6.25	12.5	50.0	34.2	44.0	16.0	31.4	6.25	12.5	25.0	7.4	10.2	8.90	8.8
FFA								6.25	12.5	50.0	43.2	96.6	101	80.4	6.25	12.5	25.0	1.7	11.6	1.30	4.9
GC	1.56	6.25	50.0	12.8	14.2	15.0	14.0	6.25	12.5	50.0	66.2	29.3	56.5	50.7	6.25	12.5	25.0	9.5	9.50	8.00	9.0
PG	1.56	6.25	50.0	12.0	10.0	12.1	11.4	6.25	12.5	50.0	12.7	44.9	68.7	42.1	6.25	12.5	25.0	8.0	8.30	19.8	12.0
CL	1.56	6.25	50.0	6.20	9.10	6.20	7.20	6.25	12.5	50.0	7.70	43.0	52.5	34.4	6.25	12.5	25.0	5.7	11.0	8.30	8.3
PE	1.56	6.25	50.0	8.80	13.1	10.2	10.7	6.25	12.5	50.0	27.4	70.6	37.4	45.1	6.25	12.5	25.0	9.0	11.0	0.90	7.0
PI	1.56	6.25	50.0	22.8	13.4	7.10	14.4	6.25	12.5	50.0	49.2	67.4	49.6	55.4	6.25	12.5	25.0	9.80	18.3	13.8	14.0
PS	1.56	6.25	50.00	9.20	29.4	15.0	17.9	6.25	12.5	50.0	52.4	56.6	71.3	60.1	50.0	100		10.1	7.60		8.9
LPE	1.56	6.25	50.00	11.2	14.6	3.20	9.70	6.25	12.5	50.0	49.4	58.9	63.7	57.3	6.25	12.5	25.0	6.3	6.00	5.90	6.1
PC	1.56	6.25	50.00	9.00	8.30	9.80	9.00	6.25	12.5	50.0	40.1	39.2	14.3	31.2	6.25	12.5	25.0	18.6	17.8	12.4	16.3
SM	1.56	6.25	50.00	7.10	9.80	11.6	9.60	6.25	12.5	50.0	36.5	32.5	17.9	29.0	6.25	12.5	25.0	18.0	6.30	5.70	10.0
LPC	1.56	6.25	50.00	22.7	7.90	4.8	11.8	6.25	12.5	50.0	37.2	34.1	17.5	29.6	6.25	12.5	25.0	19.0	10.6	11.3	13.6

Table 8 : Lipid molecular species (nominal mass) recensed in a sample of Leishmania donovani HePC-RT, using either ESI, APCI or APPI.

Lipid class	<i>m/z</i>		
	ESI	APCI	APPI
Sq	411	411	411
TG	801	829	829
	827	839	841
	855	855	855
	881	865	865
	883	883	883
	907	907	885
	933	919	907
	957	933	909
	979	935	919
		961	933
		979	935
			979
Chol	369	369	369
	379	379	379
	393	393	393
FFA		255	255
		267	267
		277	277
		279	279
		281	281
		283	283
		293	293
		305	305
		329	307
		331	327
			329
			331
PG	731	801	819
	745	819	821
	775	867	867
	798	883	869
	821		881
	847		883
	869		
CL	1402	1358	1358
	1415	1372	1372
	1430	1386	1386
	1444	1402	1402
	1458	1430	1430
	1472	1452	1442
	1484	1480	1458
	1498	1494	1498

Lipid class	<i>m/z</i>		
	ESI	APCI	APPI
PE	700	686	686
	714	700	700
	728	714	714
	740	728	728
	754	740	740
	768	754	754
	784	768	768
	798		
PI	821	821	821
	835	835	835
	849	849	849
	863	863	863
PS	780	762	762
	794	780	780
	806	798	788
	808	806	806
	820	808	808
	834	820	820
LPE	436	436	416
	450	450	452
	464	464	464
		478	478
PC	730	730	730
	744	744	744
	758	758	758
	788	774	772
	810	788	788
	832	820	820
	856	834	834
	880	880	880
LPC	496	490	490
	522	508	508
	544	522	522
	570	538	548
	592	570	570

Figure 43 : Mass spectra of PC on each source. a) ESI; b) APCI; c) APPI.

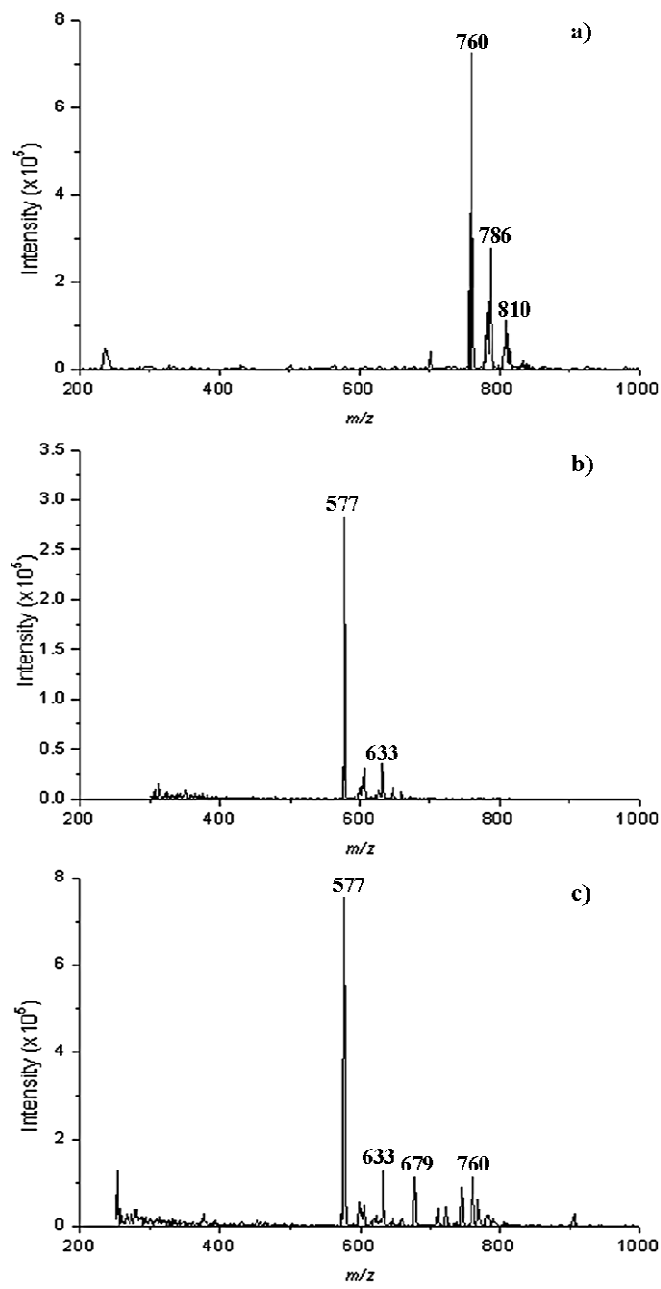


Figure 44 : Comparison of ESI, APPI and APCI on signal to noise ratio of lipids in a 100µg/ml mixture of lipids standards (n = 3).

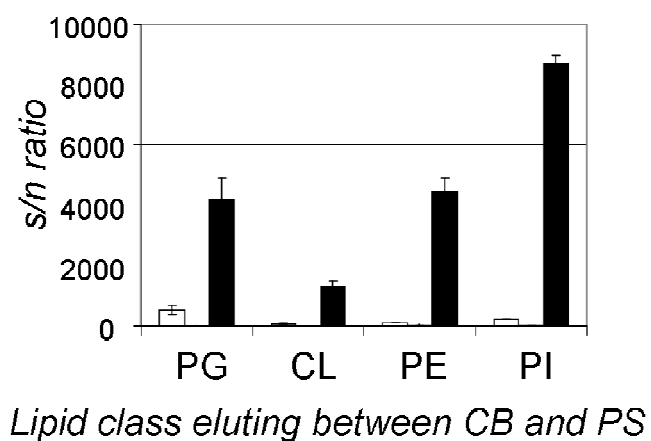
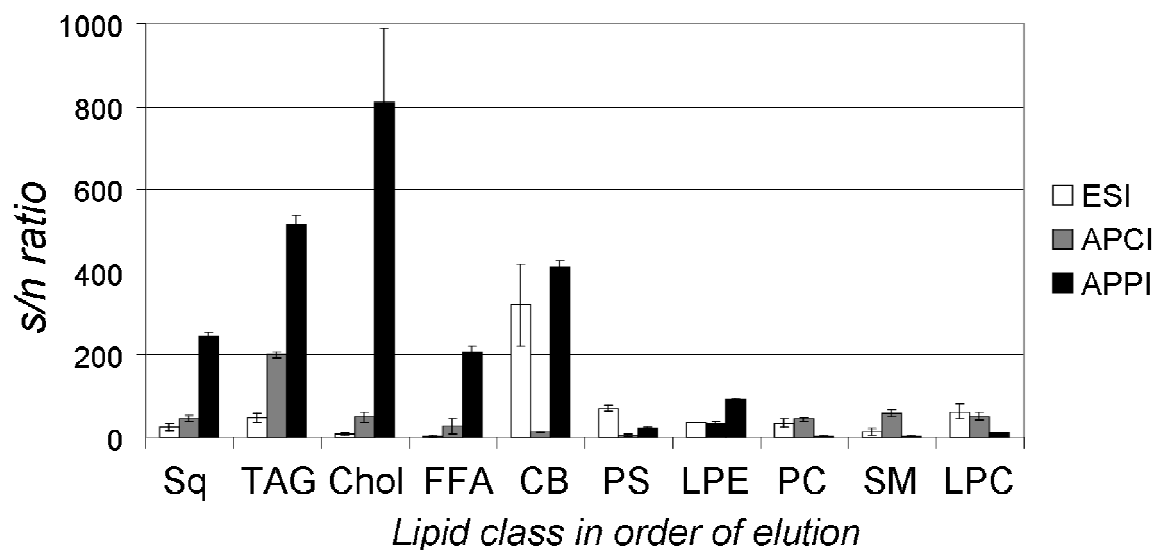


Figure 45 : Comparison of the signal-to-noise ration of lipid ion peaks from ESI, APCI and APPI analyses of a *Leishmania donovani* strain resistant to Amphotericin B (n = 3).

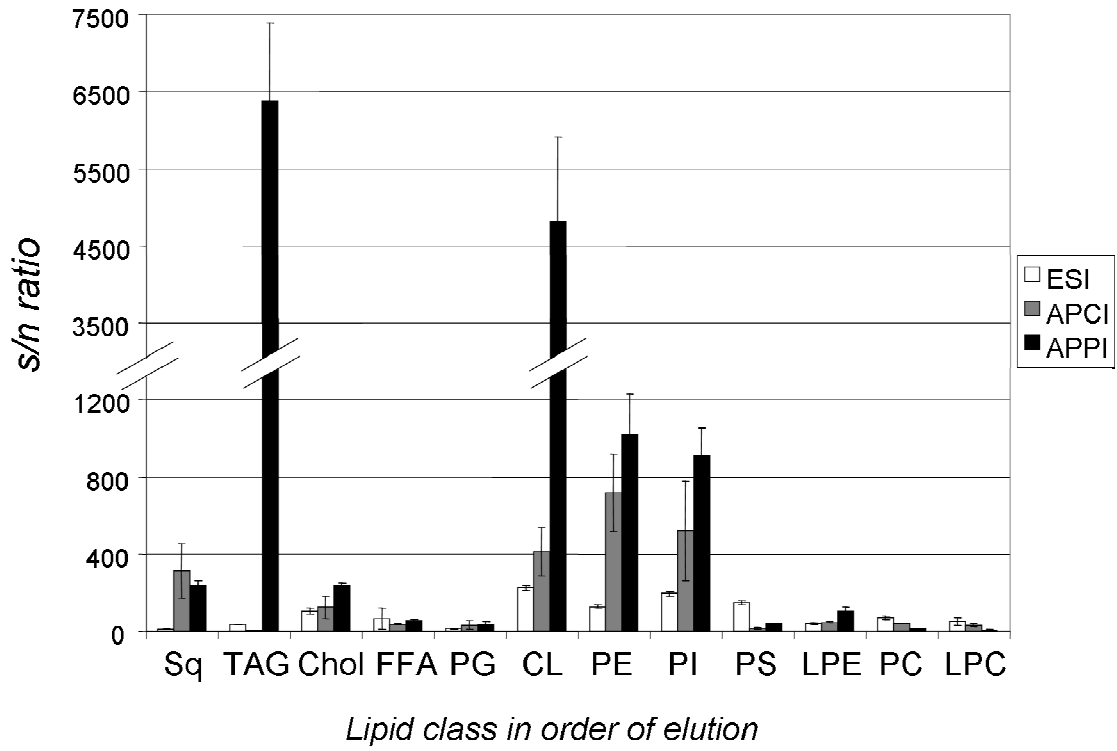


Figure 46 : Chromatograms obtained with ESI (a), APCI (b) and APPI (c) in positive (left) and negative (right) ion mode on a *Leishmania donovani* HePC-RT sample.

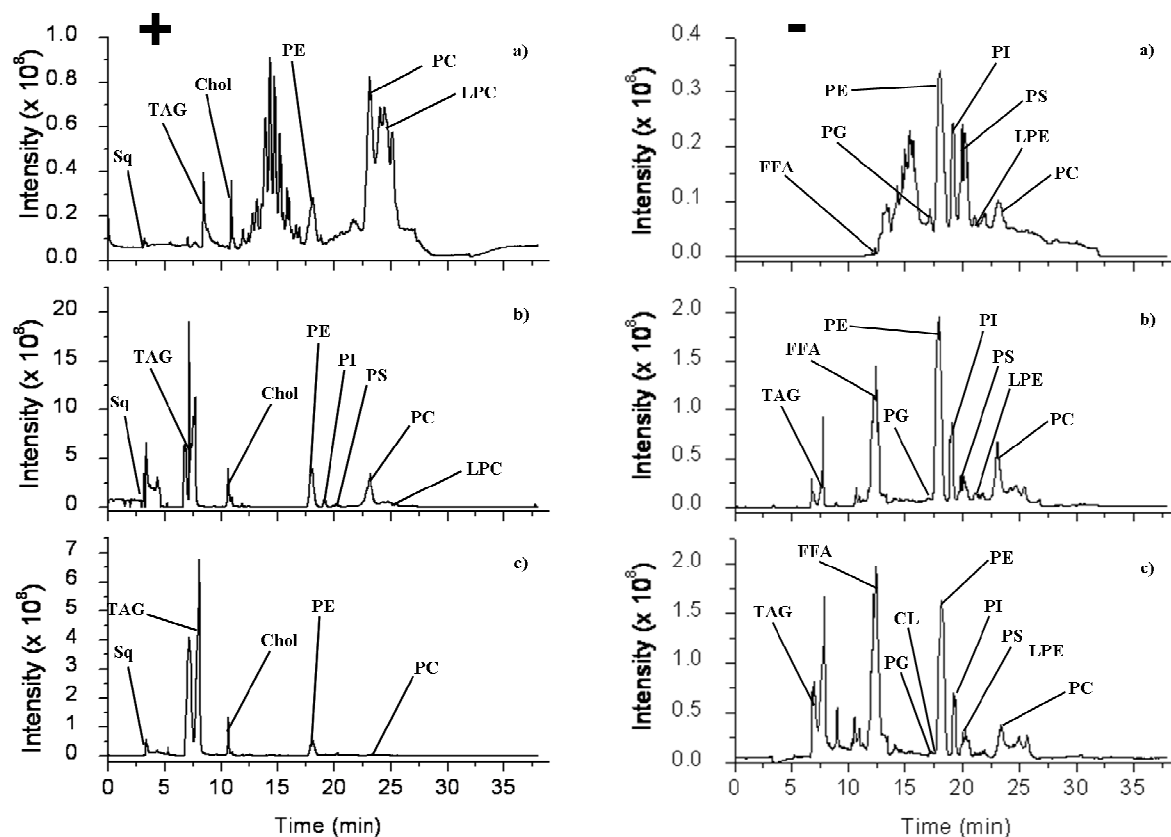
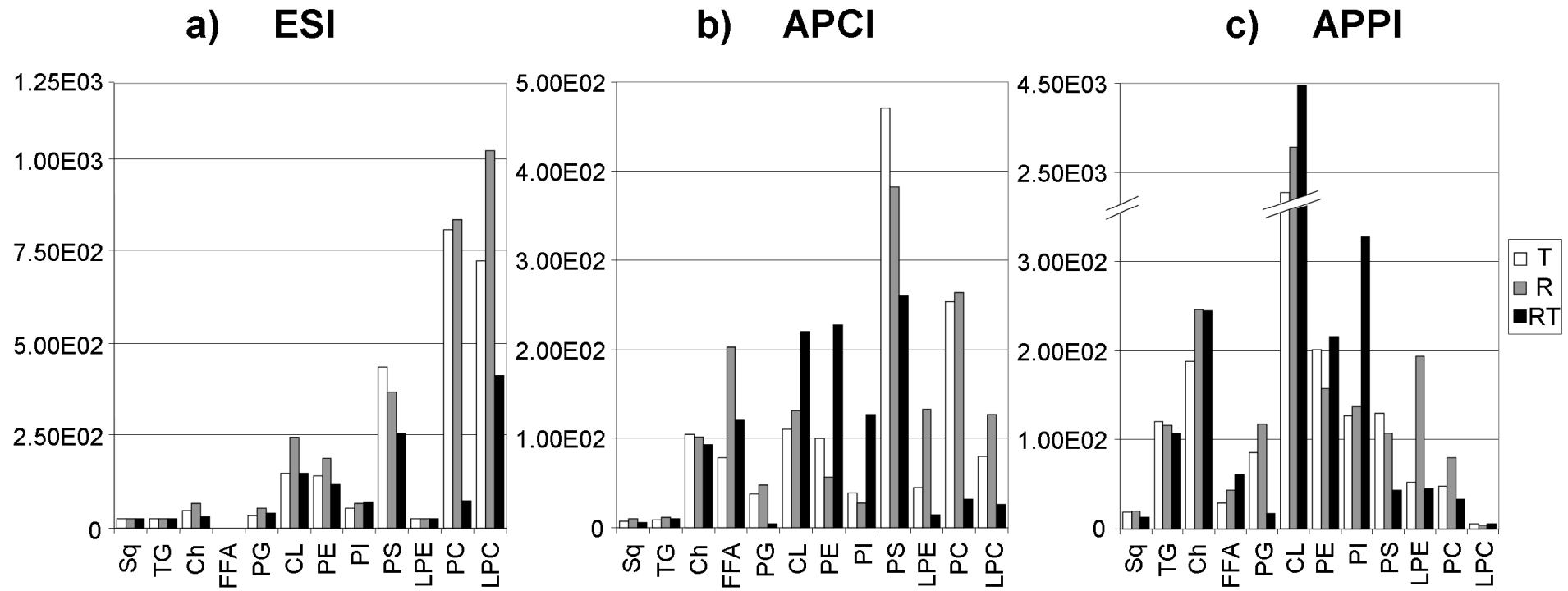


Figure 47 : Comparison of HePC-treated, HePC-resistant, and treated HePC-resistant parasites to HePC, using ESI (a), APPI (b) and APCI (c) sources.



4^{EME} PARTIE : EXTENSION DE L'ETUDE LIPIDOMIQUE
A L'ENSEMBLE DES LIPIDES DE LEISHMANIA
DONOVANI : IMPACT DE L'ACTION DE LA
MILTEFOSINE ET DE L'AMPHOTERICINE B SUR LE
LIPIDOME

En tirant parti des études précédentes, nous avons analysé des échantillons biologiques avec un spectromètre équipé d'une source APPI. Ainsi, des clones de *L. donovani* sauvages, traités, résistants et résistants-traités à la miltefosine ou à l'amphotéricine B ont été analysés à l'aide de la méthode analytique développée dans la 3^{ème} partie. Les signaux acquis ont fait l'objet d'un traitement chimiométrique afin de repérer les espèces moléculaires dont l'expression varie en fonction des conditions de cultures, avant de réaliser l'étape d'identification structurale. Ces résultats préliminaires sont présentés ici sous forme de projet de publication, car des expériences complémentaires sont à réaliser afin de finaliser l'étude.

A lipidomic study of the action of miltefosine and amphotericin B on promastigotes of *Leishmania donovani*.

Laurent Imbert¹, Mathieu Gaudin^{3,4,5}, Danielle Libong^{1*}, David Touboul³,
Abreu¹, Philippe M. Loiseau², Olivier Laprèvote^{3,4}, Pierre Chaminade¹.

¹
Univ Paris-Sud, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA4041, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

²
Univ Paris-Sud, Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire, UMR CNRS 8076, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

³
Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Bâtiment 27, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

⁴
Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

⁵
Technologie Servier, 25/27 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France.

I. Introduction.

Les leishmanioses constituent des infections parasitaires de plus en plus répandues, avec une prévalence de 12 millions de cas dans le monde, et une évolution de 1 à 2 millions de nouveaux cas par an [8]. Elles sont transmises par piqûre d'un phlébotome, et les formes cliniques sont cutanées, cutanées diffuses, muco-cutanées, et viscérales par ordre de gravité [4].

Les dérivés d'antimoine constituent la première ligne de traitement, par injections intraveineuses (IV) ou intralésionnelles [5]. De plus en plus de résistances à ces dérivés sont observées, il a donc été nécessaire de trouver des alternatives thérapeutiques, surtout pour traiter les leishmanioses viscérales, mortelles si aucun traitement n'est entrepris. L'amphotéricine B (AmB), ainsi que sa formulation liposomale, est un médicament administré par IV efficace notamment dans le cas de résistances aux dérivés d'antimoine [5, 8, 233]. Elle induit la mort du parasite en interagissant avec l'ergostérol. Une augmentation de la perméabilité membranaire induit alors un influx d'ions dans la cellule parasitaire conduisant à sa mort.

Récemment, la miltefosine (HePC) s'est montrée efficace contre les

leishmanioses par voie orale. Elle induirait la mort des cellules parasitaires par une action sur les lipides membranaires, et plus particulièrement les phospholipides, grâce à une structure proche de ces derniers [5, 8, 40].

Le but de ce travail est d'étudier l'impact de ces deux médicaments (AmB et HePC) sur l'ensemble des lipides du parasite, et d'étudier l'évolution du lipidome chez des parasites résistants. Afin de réaliser une telle étude, il a été nécessaire de développer une méthode analytique capable de séparer et de détecter la majorité des lipides présents dans la membrane des cellules parasitaires. Graeve *et coll.* [81] ont récemment développé la séparation d'une large gamme de classes de lipides sur une colonne monolithique de silice, en NP-LC, avec un DEDL. Cette séparation a été couplée à la spectrométrie de masse afin d'accéder aux espèces moléculaires présentes au sein de chaque classe [225]. Un triple quadripôle a été utilisé et une comparaison des sources d'ionisation à pression atmosphérique a permis de sélectionner la plus intéressante pour le présent travail. Pour cela, des acquisitions en « full scan » ont été utilisées, afin de prévoir le traitement des données LC-MS par chimiométrie [181]. L'APPI a montré un meilleur rapport signal-sur-bruit, une meilleure répétabilité, une meilleure sensibilité, ainsi que de meilleures limites de détection et de quantification que l'ESI et l'APCI.

Cette méthode NP-LC-APPI/MS a été utilisée dans le présent travail afin de réaliser une étude lipidomique de clones de *Leishmania donovani* cultivés dans diverses conditions, impliquant soit l'AmB, soit l'HePC. Les acquisitions « full scan » ont été traitées par outil chimiométrique, une analyse discriminante par moindres carrés partiels précédée d'une correction de signal orthogonal (OSC-PLS-DA). Cela a permis de détecter les espèces moléculaires de lipides dont la quantité varie en fonction d'un traitement médicamenteux ou d'une résistance à l'un des médicaments testés.

II. Matériel et méthodes.

A. Produits chimiques.

Le N-heptane, l'acétate d'éthyle, le propan-2-ol et l'acetone étaient de grade HPLC et fournis par VWR[®] International (Fontenay-sous-Bois, France). L'aide acétique 99-100% et l'éthanolamine 99% étaient de grade « réactif analytique » et fournis par

Sigma-Aldrich® (Saint-Quentin Fallavier, France). HePC (hexadecylphosphocholine = miltefosine) était fournie par Zentaris (Francfort, Allemagne). L'AmB était fournie par Bristol-Myers Squibb, Paris, France.

B. Souches de parasites et culture.

La culture des formes promastigotes de *Leishmania donovani* a été précédemment décrite [40, 84]. Il était considéré que le culot obtenu contenait la fraction membranaire totale des parasites utilisée pour l'étude des lipides. Les parasites sauvages étaient nommés parasites Non-Traités (NT). Les parasites traités par la miltefosine (HePC-T) étaient cultivés avec 10 μM d'HePC pendant 48h. Les parasites résistants à la miltefosine (HePC-R) étaient sélectionnés à partir des parasites sauvages par une pression médicamenteuse de 40 μM d'HePC. Enfin, les parasites résistants et traités à la miltefosine (HePC-RT) étaient des parasites résistants, traités par 20 μM d'HePC pendant 48h.

Les parasites traités par l'amphotéricine B (AmB-T) étaient cultivés avec 0,1 μM d'AmB pendant 48h. Les parasites résistants à l'amphotéricine B (AmB-R) étaient sélectionnés à partir des parasites sauvages par une pression médicamenteuse de 2 μM d'AmB pendant 48h.

C. Extraction des lipides.

L'extraction des lipides était inspirée de la méthode décrite par Folch *et coll.* [67] et a été précédemment décrite par Ramos *et coll.* [84].

D. Appareillage.

L'instrumentation HPLC regroupait un système HP1050 (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Allemagne). La séparation des lipides était réalisée sur deux colonnes Chromolith® Performance-Si (100 x 4,6 mm I.D.) (Merck, Fontenay-sous-Bois, France), thermostatées à 40°C. Un spectromètre de masse TSQ Vantage EMR (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Etats-Unis) était utilisé. Cet appareil était équipé de la source APPI, comportant une lampe au krypton PKS 100 (Cathodeon, Cambridge, Angleterre) générant un flux continu de photons à 10,0 et 10,6 eV. Le signal était

enregistré avec le logiciel Xcalibur System fourni par Thermo Fisher Scientific.

E. Séparation chromatographique.

Le débit était fixé à 1 mL/min et le volume d'échantillon injecté était de 10 µL. La séparation des lipides était inspirée de celle décrite par Graeve *et coll.* [81]. L'isooctane a été remplacé par le n-heptane pour des raisons économiques. La phase A comportait un mélange n-heptane/acétate d'éthyle (99,8:0,2 ; v/v), la phase B comportait un mélange acétone/acétate d'éthyle (2:1 ; v/v) et 0,02% d'acide acétique, et la phase C comportait un mélange propan-2-ol/eau (85:15 ; v/v) et 0,05% d'acide acétique et d'éthanolamine. Le gradient était similaire à celui décrit par Graeve *et coll.* [81] (Table 3). 3 minutes ont été ajoutées à l'étape de 100% de phase B dans la seconde partie du gradient afin d'améliorer le rinçage de la colonne, puis 2 minutes ont été ajoutées à l'étape d'équilibrage. La durée totale de la méthode était donc de 40 minutes, et l'ordre d'élution des classes lipidiques était le suivant : squalène (Sq), esters de cholestérols (ECO), triglycérides (TG), cholestérol (Chol), acides gras libres (FFA), cérébrosides (CB), phosphatidylglycérol (PG), cardioline (CL), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS), lysophosphatidyléthanolamine (LPE), phosphatidylcholine (PC), sphingomyéline (SM) et lysophosphatidylcholine (LPC).

F. Spectrométrie de masse.

Le dopant utilisé avec l'APPI était de l'acétone, introduit en post-colonne avec une pompe HPLC 422 Kontron Instruments® à un débit de 50 µL/min. Une méthode d'acquisition « full scan » en ionisation négative ainsi qu'une méthode en ionisation positive ont été utilisées afin de récolter le maximum d'informations depuis les échantillons biologiques [181]. Les paramètres de source sont indiqués dans la Table 4. La gamme de m/z analysée était fixée à 250-1500 pour les deux polarités. L'acquisition était effectuée sur le premier quadripôle, pour lequel la largeur de pic était réglée à 0,70 et le temps de scan à 0,358 secondes.

Trois segments de paramètres étaient utilisés pour l'acquisition en ionisation positive (0-22 min, 22-30 min, 30-40 min) tandis qu'un seul segment était nécessaire

pour l'ionisation négative.

G. Correction orthogonale du signal-Moindre carrés partiels.

Les fichiers enregistrés par le spectromètre de masse ont été convertis au format netCDF en utilisant le module Xconverter inclus dans Xcalibur. Les chromatogrammes ont ensuite été soumis à une détection de pics, un alignement ainsi qu'un remplissage des lacunes à l'aide du logiciel MZmine [234]. Les paramètres de calculs ont été sélectionnés à l'aide de l'aperçu disponible dans le logiciel. L'algorithme RANSAC a été utilisé pour l'alignement et le remplissage des lacunes. Afin d'étudier les effets de l'HePC, les objets étaient 4 échantillons de NT, 4 échantillons d'HePC-T, 3 échantillons d'HePC-R et 5 échantillons d'HePC-RT. Les effets de l'AmB étaient étudiés à l'aide de 4 échantillons de NT, 2 échantillons d'AmB-T, 4 échantillons d'AmB-R et deux échantillons d'AmB-RT. Chaque échantillon était analysé deux fois en ionisation négative et en ionisation positive. Les variables X étaient les aires de pics enregistrées à différents temps de rétentions.

Les matrices de données étaient importées dans le logiciel Simca-P11 (Umetrics AB, Umeå, Suède) et une OSC était effectuée avant la PLS-DA afin de retirer le bruit structurant des données [147]. Pour les échantillons HePC et AmB, un modèle a été calculé pour comparer les NT aux T, les NT aux R, les R aux T, et les R aux RT. Une composante était nécessaire pour établir le modèle dans chaque cas.

Les variables d'intérêt, dont la quantité était statistiquement différente entre les échantillons, étaient sélectionnées de la même manière que précédemment décrite [181, 225]. Une liste de couples m/z et temps de rétention a ainsi pu être établie, et confrontée aux chromatogrammes initiaux (avant traitements de données). Une première proposition de structure moléculaire a été réalisée en utilisant la base de données *lipidmaps.org*, ainsi que les travaux de Rezanka *et coll.* [224] et de Zheng *et coll.* [85]. Ces structures moléculaires nécessitent une identification structurale par spectrométrie de masse en tandem au moins. Cette identification n'a pas encore pu être réalisée au moment de la rédaction de ces travaux, mais est prévue par la suite.

III. Résultats.

A. Miltefosine.

Les résultats concernant l'HePC sont présentés en Figure 48. Concernant la comparaison des profils lipidiques obtenus sur parasites sauvages traités à 10 μ M de HePC pendant 48h (T) avec les parasites sauvages non traités (NT), une surexpression est observée pour des espèces moléculaires d'ECO, de FFA, de PE, de PI et de PC dans les T. L'ECO de m/z 369 et le FFA de m/z 303 sont quantitativement les plus perturbés. Plus précisément, une augmentation de 430% est observée pour l'ECO, qui posséderait une chaîne C18 et une insaturation, alors que l'ensemble des stérols ne semble pas être influencé par un traitement à la HePC, et une augmentation de presque 300% est observée pour le FFA en C20:4. Trois espèces de triacylglycérols sont quantitativement augmentées d'au moins 50%, et 6 acides gras libres sont également significativement surexprimés. Quant aux PE et aux PC, ceux possédant des chaînes acyles longues (> 32 carbones) sont surexprimés. Un PI à longue chaîne (36 carbones) et avec une insaturation présente un taux augmenté chez les parasites traités d'environ 75%.

La comparaison des R aux NT montre une forte sous-expression de l'ECO de m/z 369 chez les R, ainsi qu'une sous-expression plus modeste d'un TAG de m/z 831 et d'un PI de m/z 849. Les parasites R présentent quant à eux une surexpression des autres espèces moléculaires, dont surtout deux FFA de m/z 281 et 329.

Ces espèces moléculaires apparaissent également lors de la comparaison des échantillons T aux R, où ils sont sous-exprimés chez les T. L'ECO de m/z 369 est plus de 10 fois plus présent dans les T par rapport aux R que par rapport aux NT. Ainsi le mécanisme de résistance des parasites impliquerait des voies métaboliques liées à certains esters de cholestérols, mais également à certains acides gras et aux phosphatidyléthanolamines.

Enfin, la comparaison des échantillons R aux RT met également en évidence l'ECO de m/z 369, surexprimé chez les souches RT mais plus modestement que dans les autres cas (environ 200%). La plupart des autres espèces moléculaires mises en évidence sont sous-exprimées dans les parasites RT.

B. Amphotericine B.

La Figure 49 montre les résultats obtenus pour l'AmB. Dans ce cas, un traitement à l'AmB entraîne une augmentation quantitative d'espèces moléculaires de TAG et PE, dans les membranes totales du parasite. Une forte diminution des espèces moléculaires de FFA est observée simultanément, le FFA à chaîne C19:1 étant le plus influencé quantitativement.

La résistance à l'AmB est caractérisée par une diminution quantitative des espèces moléculaires au sein des mêmes classes lipidiques ainsi que pour les PI. Une diminution d'ergostérol confirme l'influence de l'AmB sur la fluidité membranaire comme précédemment décrit [8, 24, 26]. Les acides gras libres sont également fortement moins présents chez les R par rapport aux NT.

La comparaison des échantillons R aux T met en évidence une surexpression d'espèces moléculaires également retrouvées dans les deux précédentes comparaisons. Les espèces moléculaires de PS présentes dans les échantillons T pourraient être un élément supplémentaire à la compréhension du mécanisme de résistance des parasites contre l'AmB.

Enfin, la comparaison des échantillons R aux RT montre une surexpression globale des lipides dans les échantillons RT. L'action de l'AmB sur des parasites R est comparable à l'action de la HePC sur les parasites sauvages. Des espèces moléculaires de PG sont présentes dans cette comparaison seulement. Ils nécessiteraient une identification structurale, car ils pourraient représenter un rôle clé dans la compréhension de l'action de l'AmB sur les parasites.

IV. Discussion.

Les membranes totales de leishmanies contiennent 10-20% de PE et 40% de PC [40, 168]. PC et PE sont ainsi les composants majeurs de tous les types de membranes avec des proportions relatives modulées en fonction du type de membranes ; ainsi, les membranes plasmiques contiennent 35% de PE et 15% de PC alors que les membranes mitochondriales contiennent 10% de PE et 25% de PC [168, 235].

Une approche métabolomique a récemment été réalisée sur des isolats de *L. donovani* sensibles et résistants à l'antimoniote de glucamine (Glucantime®), un

composé antimonié utilisé sur le terrain depuis environ 60 ans [41]. Il ressort de cette étude que, parmi tous les métabolites détectés, les lipides constituent la classe de métabolites la plus largement identifiée avec 116 glycérophospholipides, 18 sphingolipides, 9 glycérolipides et 9 stérols/lipides prénoïques. Les phospholipides et les sphingolipides constituent plus particulièrement les classes de molécules les plus affectées par la résistance aux antimoniés [41]. Il est remarquable de noter que cette étude signale la présence de sphingomyéline chez les leishmanies alors qu'il était admis que cette molécule n'y était pas présente [168]. Rakotomanga *et coll.*[40] avaient pourtant été les premiers auteurs à décrire la présence de sphingomyéline chez *L. donovani*. Les sphingolipides ont été montrés comme 4 fois moins abondants dans les parasites résistants aux antimoniés que dans les parasites sensibles. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de variation de sphingolipides significatives entre parasites sensibles et résistants à la HePC et à l'amphotéricine B. Les sphingolipides pourraient ainsi être étudiés comme biomarqueurs de résistance aux antimoniés alors qu'ils ne présenteraient pas d'intérêt comme marqueurs d'une chimiorésistance à la HePC et à l'amphotéricine B, d'après les résultats de notre étude.

Les leishmanies utilisent à la fois l'absorption du milieu extérieur et la synthèse *de novo* de sphingolipides comme source de phosphoryléthanolamine pour la biosynthèse des phospholipides et en particulier de PE [168, 236]. Les sphingolipides et les sphingomyélines sont moins abondants chez les parasites résistants aux antimoniés [41], cela est compatible avec une biosynthèse accrue de PE chez les parasites résistants.

La situation est plus complexe concernant les phospholipides. En effet, 19 PC et 2 PE se sont montrés 5 fois moins abondants chez les parasites résistants aux antimoniés tandis que 10 PC et 12 PE se sont montrés 5 fois plus abondants chez les mêmes parasites. Après analyse de la structure des chaînes acyles, seuls les diacyl PC ayant des chaînes acyles hautement insaturées sont surexprimés chez les parasites résistants aux antimoniés. Nous confirmons un résultat analogue chez les parasites résistants à l'AmB avec une sur-expression de 6500 fois de PC (43:4) alors que ce résultat n'est pas retrouvé chez les parasites résistants à la HePC. Il est à noter que l'ensemble des diacyl-PE sont plus abondants chez les parasites résistants aux antimoniés, à la HePC et à l'AmB. On retrouve donc un comportement identique des

parasites chimiorésistants vis à vis de l'expression de PE, à savoir une surexpression.

Les taux de PS n'ont pas montré de variation entre parasites sensibles et résistants aux antimoniés. De façon générale, l'intensité globale de tous les phospholipides détectés est quasiment identique dans les deux phénotypes [41].

Dans l'étude de t'Kindt *et coll.* [41] réalisée sur les membranes totales, il n'est pas possible d'analyser les subtilités de composition entre les différentes membranes de leishmanies. Néanmoins, l'augmentation des taux de chaînes acyles insaturées chez les parasites résistants aux antimoniés est en faveur d'une plus grande fluidité des membranes de ces parasites résistants comme suggéré par Mbongo *et coll.* [26] pour la résistance à l'AmB et par Rakotomanga *et coll.* [237] pour la résistance à la HePC. La fluidification des membranes des parasites résistants peut influencer la pénétration des antimoniés en agissant sur les transporteurs, donc l'efflux, et la séquestration de ces dérivés.

Par ailleurs, concernant l'action des molécules, la surexpression de triacylglycérols, connus comme favorisant l'apoptose [238] est observée aussi bien après un traitement à la HePC qu'après un traitement à l'AmB. Ceci suggère des voies d'action intracellulaire communes à ces deux molécules en plus de leur affinité respective pour les stérols membranaires [39, 239].

Les résultats présentés dans cette étude lipidomique ont pour but l'identification de biomarqueurs de chimiosensibilité à l'HePC et à l'AmB. Notre étude a permis d'identifier un ester de cholestérol très sous-exprimé chez les parasites résistants à la HePC, ainsi que deux acides gras libres très sur-exprimés. Ces pistes doivent maintenant être validées sur des isolats plus nombreux afin d'en déduire un réel potentiel de marquage. En effet, la variabilité d'expression des leishmanies sur le terrain rend la mise au point de marqueurs de chimiorésistance difficile à mettre en place.

V. Conclusion.

Ce travail présenté nécessite une identification structurale des principales espèces moléculaires mises en évidence, telles que l'ECO de m/z 369, certains FFA, PE et PI, ainsi que les PG mis en évidence entre les échantillons de parasites AmB-RT et

AmB-R. Des hypothèses métaboliques pourront ainsi être approfondies ultérieurement afin de mieux comprendre les mécanismes d'action et de résistances à l'HePC et à l'AmB.

Par ailleurs, une mise en regard de ces résultats avec une analyse protéomique devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules sur les leishmanies et leur mécanisme de chimiorésistance.

Figure 48 : Espèces moléculaires de lipides influencées par la miltefosine.

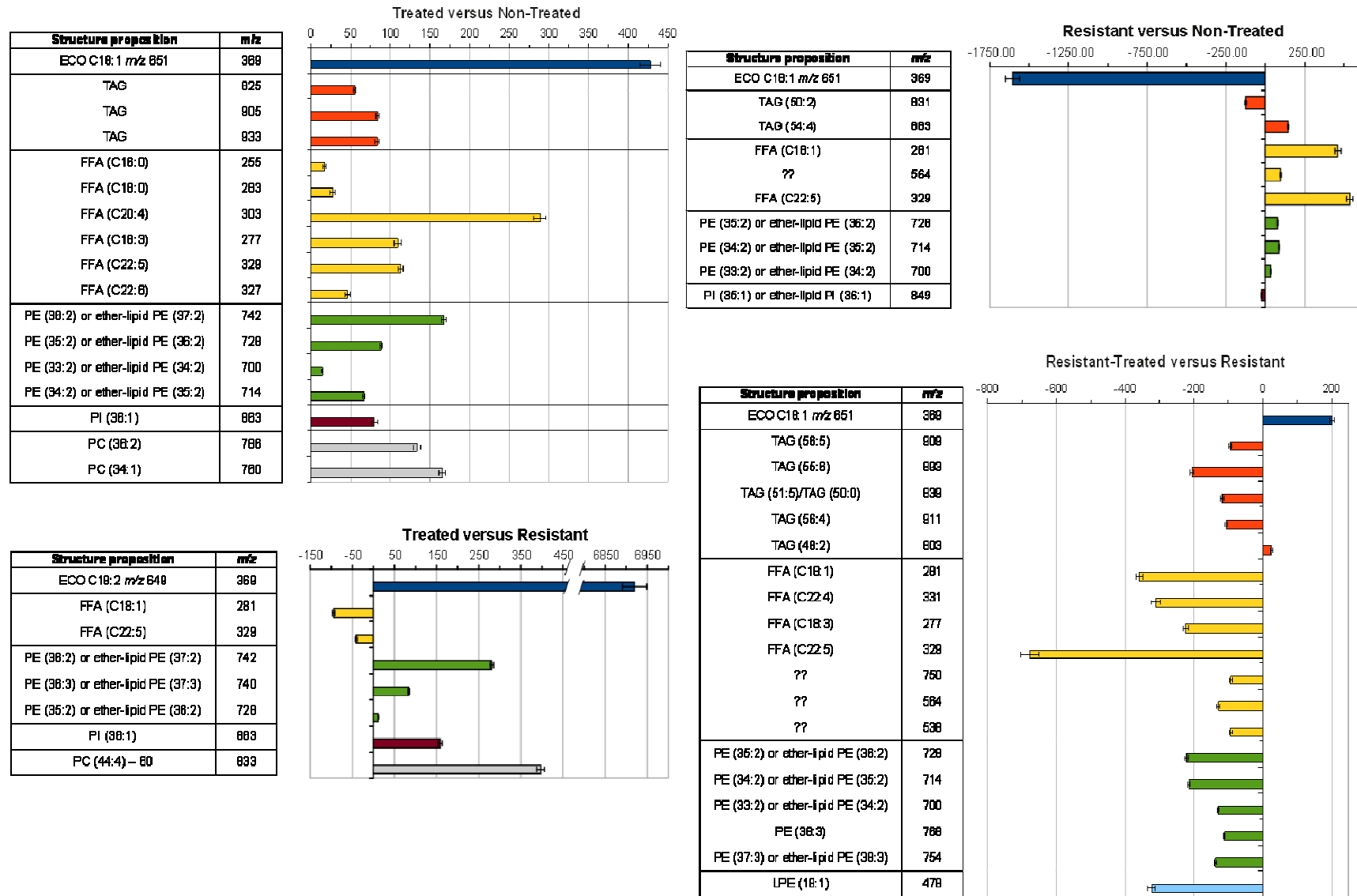
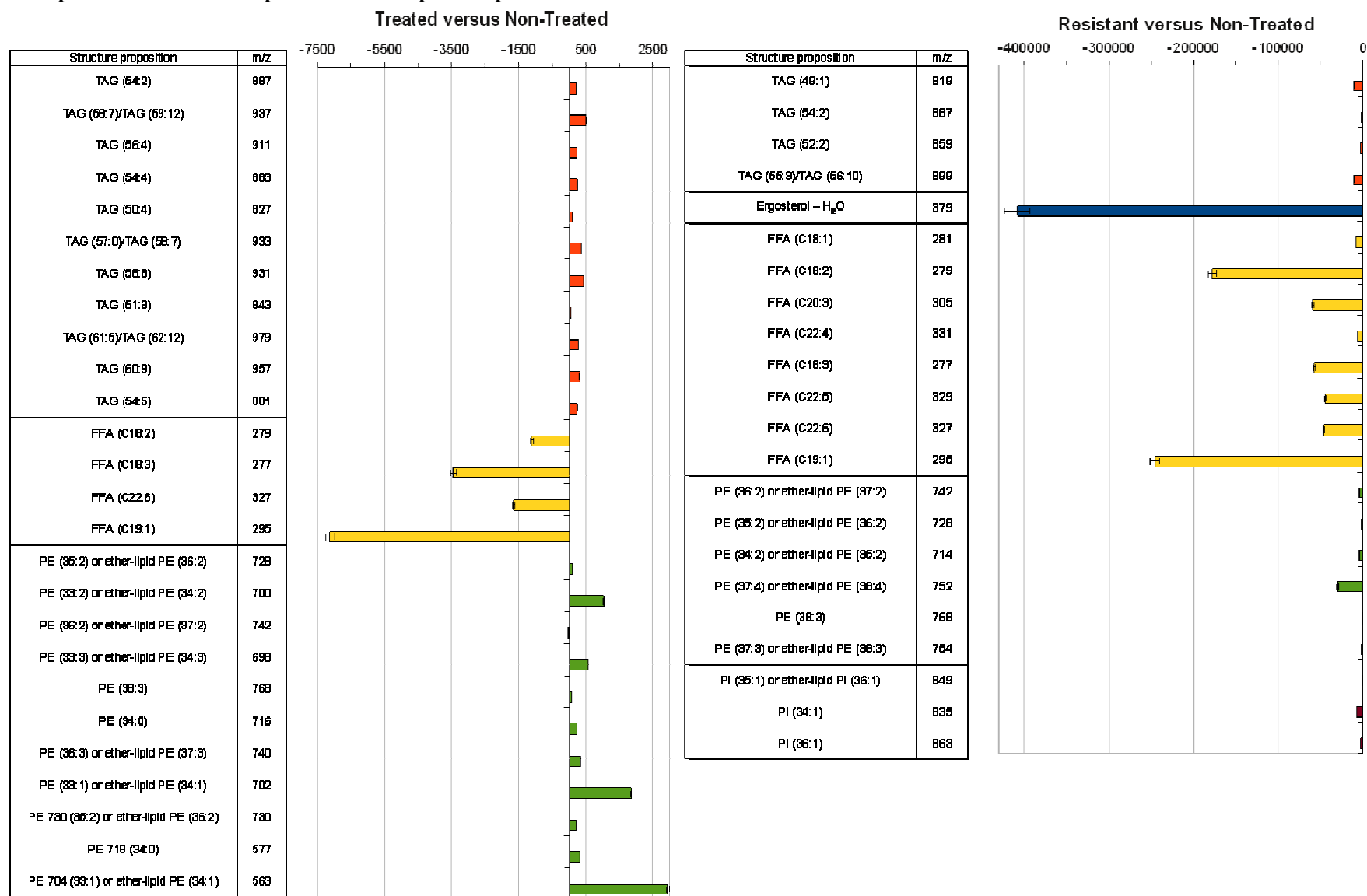
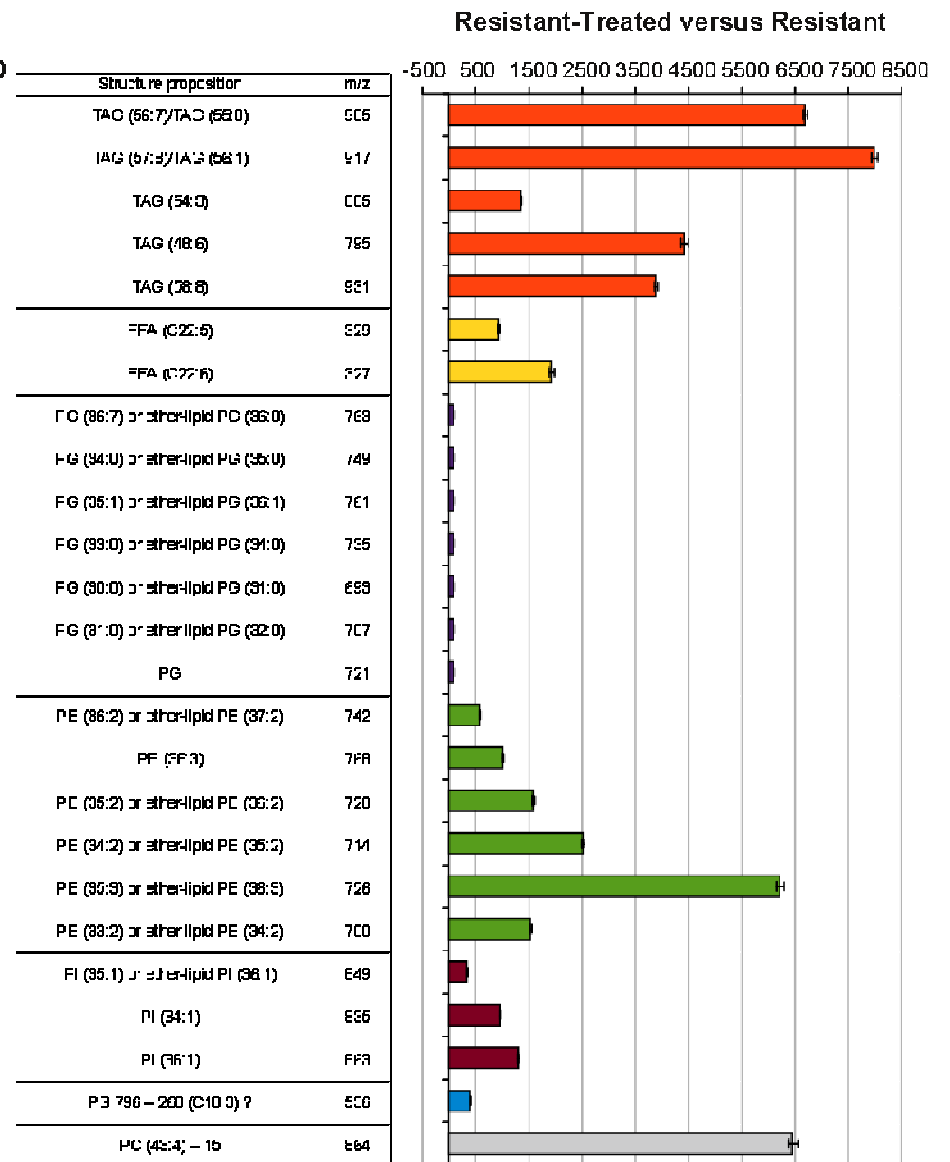
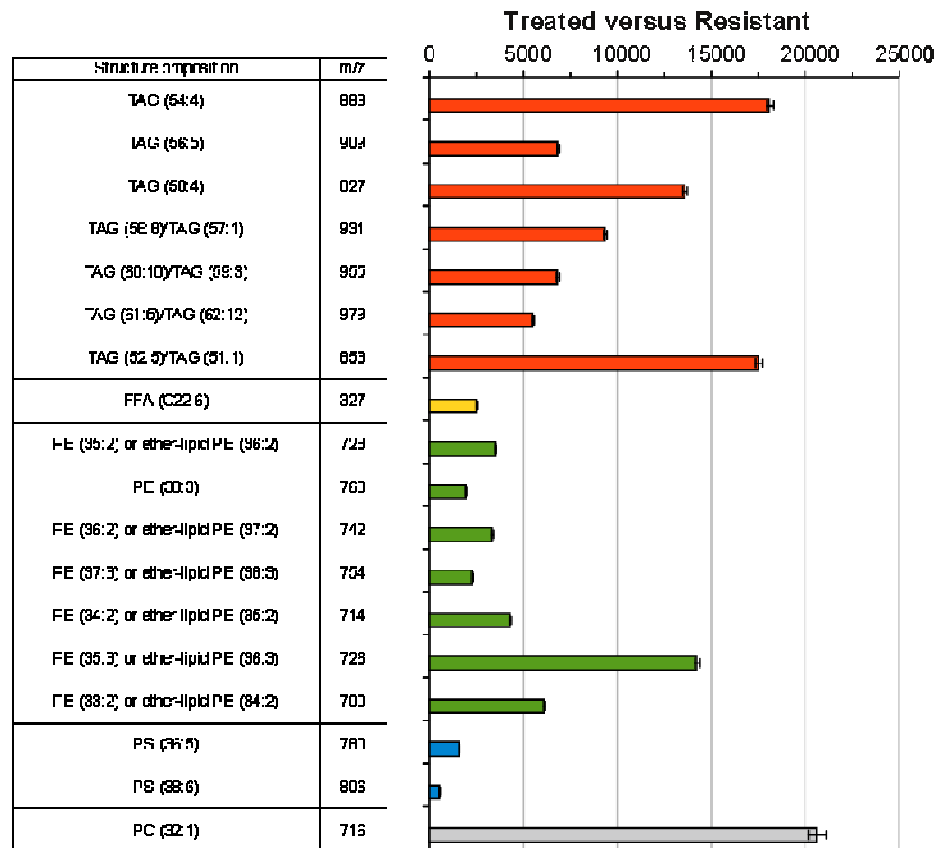


Figure 49 : Espèces moléculaires de lipides influencées par l'amphotéricine B.





CONCLUSION GENERALE.

Ces travaux s'inscrivent dans un contexte de santé publique, les leishmanioses représentant une menace grandissante, du fait du réchauffement climatique associé aux mouvements de populations facilités par l'évolution des moyens de transports. L'arsenal thérapeutique existant contre ces parasitoses est encore relativement restreint, et est principalement composé de molécules administrées par voie parentérale, à l'exception de la miltefosine administrée par voie orale. L'administration par injection ne favorise pas la bonne observance aux traitements d'une part, ainsi que l'utilisation trop systématique de médicaments par voie orale d'autre part favorisent la sélection de clones résistants. La proportion grandissante de résistances aux traitements est actuellement alarmante, il est donc nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques responsables de l'infection et de la sensibilité ou résistance d'un clone parasitaire à un traitement.

A mon arrivée sur ces travaux, une étude de phospholipidomique était débutée en couplage ESI-MS et nécessitait une vérification du système analytique mis en place avant d'approfondir les analyses. Cette étape a été effectuée et a permis de publier des résultats encourageants pour la compréhension des mécanismes d'action et de résistances liés à la miltefosine. Une collaboration avec l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN nous a permis d'élargir nos explorations à l'ensemble des classes lipidiques contenues dans la membrane des parasites. D'une part, il en ressort que l'APPI est une source d'ionisation très intéressante pour l'analyse des lipides, notamment apolaires. Cependant ses faiblesses par rapport aux lipides les plus polaires (certains phospholipides) nécessitent une compensation par l'ESI. L'APCI est quant à elle peu recommandée dans une telle application en NP-LC. D'autre part, il a été possible d'étudier l'impact de l'HePC et de l'AmB sur l'ensemble des lipides de *Leishmania donovani*. Cette partie du projet est encore à terminer et devrait conduire à une meilleure compréhension des voies métaboliques impliquées dans l'action de ces deux médicaments.

Les études présentées au cours de ce présent travail constituent un exemple de démarche suivie au cours d'une étude métabolomique, et plus précisément lipidomique. Cette démarche offre la possibilité d'explorer toute une partie des processus biologiques liés au pouvoir infectieux des parasites. Nous espérons étendre à l'application de ces travaux à d'autres anti-leishmaniens ou candidats anti-

leishmaniens. Deux objectifs majeurs sont visés : d'une part une meilleure compréhension de l'action des molécules actuelles sur le métabolisme du parasite faciliterait la recherche et le développement de nouvelles thérapeutiques, d'autre part le screening de biomarqueurs à l'aide des outils chimométriques pourrait permettre la mise en place de tests parasitologiques en milieu hospitalier. En effet, à la manière des antibiogrammes réalisés en routines, des tests rapides de chimiosensibilité effectués sur un isolat de *Leishmania* provenant d'un patient amélioreraient l'efficacité de la prise en charge thérapeutique.

D'un point de vue expérimental, cette problématique nous a conduit à développer et mettre en place des méthodes analytiques s'inscrivant dans la dynamique des « -omiques » de plus en plus décrites. La comparaison des sources à pression atmosphériques, dans le cadre d'un couplage LC-MS en polarité de phases normale nous a permis d'appréhender le domaine d'étude adapté pour chacune des trois sources disponibles actuellement, ainsi que les particularités liées à leur fonctionnement.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] OMS | Organisation mondiale de la Santé <http://www.who.int/fr/>, (2011).
- [2] D.S. Dinesh, A. Ranjan, A. Palit, K. Kishore, S.K. Kar, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 95 (2001) 197-202.
- [3] R. Killick-Kendrick, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65 Suppl 1 (1990) 37-42.
- [4] R.N. Davidson, *Medicine*, 33 (2005) 43-46.
- [5] P. Minodier, P. Parola, *Travel Med. Infect. Dis.*, 5 (2007) 150-158.
- [6] J. Antoine, T. Lang, E. Prina, in: *Les Leishmanioses*, J.P. Dedet, 1992, pp. 41-58.
- [7] J.P. Dedet, *Presse Med.*, 29 (2000) 1019-1026.
- [8] V.S. Amato, F.F. Tuon, H.A. Bacha, V.A. Neto, A.C. Nicodemo, *Acta Trop.*, 105 (2008) 1-9.
- [9] N.F.C. Secundino, M.S.S. Araújo, G.H.B. Oliveira, C.L. Massara, O.S. Carvalho, R.M. Lanfredi, P.F.P. Pimenta, *J. Invertebr. Pathol.*, 80 (2002) 35-40.
- [10] H. De Barjac, I. Larget, R. Killick-Kendrick, *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 74 (1981) 485-489.
- [11] A. Warburg, *J. Invertebr. Pathol.*, 58 (1991) 189-202.
- [12] B. Ostyn, V. Vanlerberghe, A. Picado, D.S. Dinesh, S. Sundar, F. Chappuis, S. Rijal, J.-C. Dujardin, M. Coosemans, M. Boelaert, C. Davies, *Trop. Med. Int. Health*, 13 (2008) 1073-1085.
- [13] V. Kumar, S.K. Kesari, N.K. Sinha, A. Palit, A. Ranjan, K. Kishore, R. Saran, S.K. Kar, *Indian J. Med. Res.*, 101 (1995) 154-156.
- [14] C. Bern, R. Chowdhury, *Indian J. Med. Res.*, 123 (2006) 275-288.
- [15] F. Janvier, M. Morillon, P. Olliaro, *Med. Trop.*, 68 (2008) 89-101.
- [16] Thériaque | <http://www.theriaque.org/>.
- [17] O.L.S. Almeida, J.B. Santos, *An. Bras. Dermatol.*, 86 (2011) 497-506.
- [18] J.D. Berman, D. Waddell, B.D. Hanson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 (1985) 916-920.
- [19] J.D. Berman, J.V. Gallalee, J.M. Best, *Biochem. Pharmacol.*, 36 (1987) 197-201.
- [20] K. Seifert, *Open Med. Chem. J.*, 5 (2011) 31-39.

- [21] D. Sereno, P. Holzmüller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouaisi, J.L. Lemesre, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 2064-2069.
- [22] G. Sudhandiran, C. Shaha, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 25120-25132.
- [23] N. Singh, R.T. Singh, S. Sundar, *J. Infect. Dis.*, 188 (2003) 600-607.
- [24] W.J. Steinbach, *Ped. Clin. North Am.*, 52 (2005) 895-915.
- [25] B. Papadopoulou, C. Kündig, A. Singh, M. Ouellette, *Drug Resist. Updat.*, 1 (1998) 266-278.
- [26] N. Mbongo, P.M. Loiseau, M.A. Billion, M. Robert-Gero, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (1998) 352-357.
- [27] P.G. Bray, M.P. Barrett, S.A. Ward, H.P. de Koning, *Trends Parasitol.*, 19 (2003) 232-239.
- [28] J.P. Dedet, *Mal. Inf.*, 8-506-A-10 (2009).
- [29] M. Basselin, H. Denise, G.H. Coombs, M.P. Barrett, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 (2002) 3731-3738.
- [30] S.L. Croft, S. Sundar, A.H. Fairlamb, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19 (2006) 111-126.
- [31] EMEA, EMA/COMP/131770/2005 Rev.2, (2011).
- [32] C.P. Thakur, T.P. Kanyok, A.K. Pandey, G.P. Sinha, C. Messick, P. Olliaro, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94 (2000) 432-433.
- [33] M. Maarouf, F. Lawrence, S.L. Croft, M. Robert-Gero, *Parasitol. Res.*, 81 (1995) 421-425.
- [34] S.N. Hobbie, M. Kaiser, S. Schmidt, D. Shcherbakov, T. Janusic, R. Brun, E.C. Böttger, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5 (2011) e1161.
- [35] B. Chawla, A. Jhingran, A. Panigrahi, K.D. Stuart, R. Madhubala, *PLoS One*, 6 (2011) e26660.
- [36] S.L. Croft, J. Engel, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100 Suppl 1 (2006) S4-8.
- [37] EMEA, EMA/COMP/965/02 Rev.3, (2003).
- [38] S. Sundar, K. Kumar, J. Chakravarty, D. Agrawal, S. Agrawal, A. Chhabra, V. Singh, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100 (2006) 698-700.
- [39] M. Rakotomanga, P.M. Loiseau, M. Saint-Pierre-Chazalet, *Biochim. Biophys. Acta*, 1661 (2004) 212-218.
- [40] M. Rakotomanga, S. Blanc, K. Gaudin, P. Chaminade, P.M. Loiseau, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (2007) 1425-1430.

- [41] R. t' Kindt, R.A. Scheltema, A. Jankevics, K. Brunker, S. Rijal, J.-C. Dujardin, R. Breitling, D.G. Watson, G.H. Coombs, S. Decuypere, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 4 (2010) e904.
- [42] J.A. Urbina, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100 Suppl 1 (2006) S9-S16.
- [43] N.K. Verma, G. Singh, C.S. Dey, *Exp. Parasitol.*, 116 (2007) 1-13.
- [44] C. Paris, P.M. Loiseau, C. Bories, J. Bréard, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (2004) 852-859.
- [45] A. Kuhlencord, T. Maniera, H. Eibl, C. Unger, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (1992) 1630-1634.
- [46] J.M. Pérez-Victoria, F.J. Pérez-Victoria, A. Parodi-Talice, I.A. Jiménez, A.G. Ravelo, S. Castanys, F. Gamarro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 2468-2474.
- [47] F.J. Pérez-Victoria, F. Gamarro, M. Ouellette, S. Castanys, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 49965-49971.
- [48] E. Castanys-Muñoz, J.M. Pérez-Victoria, F. Gamarro, S. Castanys, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 (2008) 3573-3579.
- [49] P.A. Kager, P.H. Rees, B.T. Wellde, W.T. Hockmeyer, W.H. Lyerly, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75 (1981) 556-559.
- [50] A.Z. Momeni, M.R. Reiszadae, M. Aminjavaheri, *Int. J. Dermatol.*, 41 (2002) 441-443.
- [51] C.N. Chunge, G. Gachihi, R. Muigai, K. Wasunna, J.R. Rashid, J.D. Chulay, G. Anabwani, C.N. Oster, A.D. Bryceson, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79 (1985) 715-718.
- [52] A.Z. Momeni, M. Aminjavaheri, *Eur. J. Dermatol.*, 13 (2003) 40-43.
- [53] C. Leandro, L. Campino, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22 (2003) 352-357.
- [54] P.L. Olliaro, A.D. Bryceson, *Parasitol. Today*, 9 (1993) 323-328.
- [55] J. Mishra, A. Saxena, S. Singh, *Curr. Med. Chem.*, 14 (2007) 1153-1169.
- [56] K.E. Sharquie, R.A. Najim, I.B. Farjou, D.J. Al-Timimi, *Clin. Exp. Dermatol.*, 26 (2001) 21-26.
- [57] M.J. Yazdanpanah, M. Banihashemi, F. Pezeshkpoor, M. Khajedaluae, S. Famili, I. Tavakoli Rodi, H. Yousefzadeh, *Dermatol. Res. Pract.*, 2011 (2011) 269515.
- [58] J. Mishra, S. Carpenter, S. Singh, *Indian J. Med. Res.*, 131 (2010) 793-798.
- [59] R. Benmously Mlika, H. Hammami, A. Sioud, I. Mokhtar, S. Fenniche, *Dermatol. Ther.*, 24 (2011) 378-379.

- [60] S. Shamsi Meymandi, S. Zandi, H. Aghaie, A. Heshmatkhah, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 25 (2011) 587-591.
- [61] A. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, L. Cuadros-Rodríguez, Trends Anal. Chem., 28 (2009) 263-278.
- [62] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis, J. Lipid Res., 46 (2005) 839-862.
- [63] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis, J. Lipid Res., 50 Suppl (2009) S9-14.
- [64] M. Bou Khalil, W. Hou, H. Zhou, F. Elisma, L.A. Swayne, A.P. Blanchard, Z. Yao, S.A.L. Bennett, D. Figeys, Mass Spectrom. Rev., 29 (2010) 877-929.
- [65] M. Pulfer, R.C. Murphy, Mass Spectrom. Rev., 22 (2003) 332-364.
- [66] W.W. Christie, in: Advances in lipid methodology, 1993, p. 81.
- [67] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem., 226 (1957) 497-509.
- [68] J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J.A. Meath, N. LeBaron, J. Biol. Chem., 191 (1951) 833-841.
- [69] E.G. Bligh, W.J. Dyer, Can. J. Biochem. Physiol., 37 (1959) 911-917.
- [70] R. Baranowski, K. Pacha, Mini Rev. Med. Chem., 2 (2002) 135-144.
- [71] J. Blomberg, P.J. Schoenmakers, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A, 972 (2002) 137-173.
- [72] Y. Wang, I.S. Krull, C. Liu, J.D. Orr, J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci, 793 (2003) 3-14.
- [73] B.L. Peterson, B.S. Cummings, Biomed. Chromatogr., 20 (2006) 227-243.
- [74] H. Ogiso, T. Suzuki, R. Taguchi, Anal. Biochem., 375 (2008) 124-131.
- [75] L. Zhang, S. Hu, L. Cook, N.J. Dovichi, Electrophoresis, 23 (2002) 3071-3077.
- [76] J.S. Perona, V. Ruiz-Gutierrez, J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci, 785 (2003) 89-99.
- [77] D. Oursel, C. Loutelier-Bourhis, N. Orange, S. Chevalier, V. Norris, C.M. Lange, Rapid Commun. Mass Spectrom., 21 (2007) 1721-1728.
- [78] H. Bünger, U. Pison, J. Chromatogr. B: Biomed. Appl, 672 (1995) 25-31.
- [79] W.W. Christie, J. Chromatogr., 361 (1986) 396-399.

- [80] F.S. Deschamps, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, *J. Chromatogr. A*, 928 (2001) 127-137.
- [81] M. Graeve, D. Janssen, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 877 (2009) 1815-1819.
- [82] W.W. Christie, *J. Lipid Res.*, 26 (1985) 507-512.
- [83] E. Hvattum, S. Uran, A.G. Sandbaek, A.A. Karlsson, T. Skotland, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 42 (2006) 506-512.
- [84] R.G. Ramos, D. Libong, M. Rakotomanga, K. Gaudin, P.M. Loiseau, P. Chaminade, *J. Chromatogr. A*, 1209 (2008) 88-94.
- [85] L. Zheng, R. t' Kind, S. Decuypere, S.J. von Freyend, G.H. Coombs, D.G. Watson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010) 2074-2082.
- [86] M. Gaspari, K.C.M. Verhoeckx, E.R. Verheij, J. van der Greef, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2286-2296.
- [87] Y. Sato, T. Nakamura, K. Aoshima, Y. Oda, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 9858-9864.
- [88] J.M. Charlesworth, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1414-1420.
- [89] L.M. Nair, J.O. Werling, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (2009) 95-99.
- [90] A. Cascone, S. Eerola, A. Ritieni, A. Rizzo, *J. Chromatogr. A*, 1120 (2006) 211-220.
- [91] R. Díaz-López, D. Libong, N. Tsapis, E. Fattal, P. Chaminade, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48 (2008) 702-707.
- [92] C. Schönherr, S. Touchene, G. Wilser, R. Peschka-Süss, G. Francese, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 781-786.
- [93] E. Lesellier, *J. Chromatogr. A*, 936 (2001) 201-214.
- [94] R.E. McDonald, M.M. Mossoba, *New techniques and applications in lipid analysis*, Amer Oil Chemists Society, 1997.
- [95] K. Gawrisch, N.V. Eldho, I.V. Polozov, *Chem. Phys. Lipids*, 116 (2002) 135-151.
- [96] L.E. Rodriguez-Saona, F.M. Khambaty, F.S. Fry, E.M. Calvey, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 574-579.
- [97] L.E. Rodriguez-Saona, F.M. Khambaty, F.S. Fry, J. Dubois, E.M. Calvey, *J. Food Prot.*, 67 (2004) 2555-2559.
- [98] A.C. McGovern, D. Broadhurst, J. Taylor, N. Kaderbhai, M.K. Winson, D.A. Small, J.J. Rowland, D.B. Kell, R. Goodacre, *Biotechnol. Bioeng.*, 78 (2002) 527-538.
- [99] J.R. Schoonover, R. Marx, S.L. Zhang, *Appl. Spectrosc.*, 57 (2003) 154A-170A.

- [100] C. Colas, Mémoire de thèse, *Développement de Méthodes Physico-Chimiques pour le contrôle de la médication par l'harpagophytum et l'eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine*, (2006).
- [101] P. Kebarle, M. Peschke, *Anal. Chim. Acta*, 406 (2000) 11-35.
- [102] P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 804-817.
- [103] I. Hayati, A.I. Bailey, T.F. Tadros, *J. Coll. Int. Sci.*, 117 (1987) 205-221.
- [104] M. Dole, *J. Chem. Phys.*, 49 (1968) 2240.
- [105] J.V. Iribarne, B.A. Thomson, *J. Chem. Phys.*, 64 (1976) 2287.
- [106] B.A. Thomson, J.V. Iribarne, *J. Chem. Phys.*, 71 (1979) 4451.
- [107] T.R. Covey, B.A. Thomson, B.B. Schneider, *Mass Spectrom. Rev.*, 28 (2009) 870-897.
- [108] J.L. Wu, J. Liu, Z. Cai, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010) 1828-1834.
- [109] D.J. Carrier, C. Eckers, J.C. Wolff, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47 (2008) 731-737.
- [110] Q. Tian, C.J.G. Duncan, S.J. Schwartz, *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003) 990-995.
- [111] D. Robb, T. Covey, A. Bruins, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3653-3659.
- [112] A. Raffaelli, A. Saba, *Mass Spectrom. Rev.*, 22 (2003) 318-331.
- [113] J.A. Syage, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15 (2004) 1521-1533.
- [114] D.B. Robb, M.W. Blades, *Anal. Chim. Acta*, 627 (2008) 34-49.
- [115] T.J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostianen, A.P. Bruins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15 (2004) 203-211.
- [116] E. Basso, E. Marotta, R. Seraglia, M. Tubaro, P. Traldi, *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003) 1113-1115.
- [117] K. Blaum, C. Geppert, P. Müller, W. Nörtershäuser, E.W. Otten, A. Schmitt, N. Trautmann, K. Wendt, B.A. Bushaw, *Int. J. Mass. Spectrom.*, 181 (1998) 67-87.
- [118] N.V. Konenkov, M. Sudakov, D.J. Douglas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13 (2002) 597-613.
- [119] J.C. Schwartz, M.W. Senko, J.E.P. Syka, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13 (2002) 659-669.
- [120] M. Sugiyama, H. Hasegawa, Y. Hashimoto, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23 (2009) 2917-2922.
- [121] D. Douglas, A. Frank, D. Mao, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 1-29.

- [122] G.A. Evans, *Nat. Biotechnol.*, 18 (2000) 127.
- [123] R. Romero, J. Espinoza, F. Gotsch, J.P. Kusanovic, L.A. Friel, O. Erez, S. Mazaki-Tovi, N.G. Than, S. Hassan, G. Tromp, *BJOG*, 113 Suppl 3 (2006) 118-135.
- [124] M. Oldiges, S. Lütz, S. Pflug, K. Schroer, N. Stein, C. Wiendahl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76 (2007) 495-511.
- [125] N. Navas-Iglesias, A. Carrasco-Pancorbo, L. Cuadros-Rodríguez, *Trends Anal. Chem.*, 28 (2009) 393-403.
- [126] X. Lu, G. Xu, in: F. Wang (Ed.), *Biomarker Methods in Drug Discovery and Development*, Humana Press, Totowa, NJ, 2008, pp. 291-315.
- [127] L. Hood, J.R. Heath, M.E. Phelps, B. Lin, *Science*, 306 (2004) 640-643.
- [128] H. Kitano, *Science*, 295 (2002) 1662-1664.
- [129] L. Eriksson, H. Antti, J. Gottfries, E. Holmes, E. Johansson, F. Lindgren, I. Long, T. Lundstedt, J. Trygg, S. Wold, *Anal. Bioanal. Chem.*, 380 (2004) 419-429.
- [130] C. Hu, R. van der Heijden, M. Wang, J. van der Greef, T. Hankemeier, G. Xu, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 877 (2009) 2836-2846.
- [131] X. Han, R.W. Gross, *Mass. Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 367-412.
- [132] X. Han, R.W. Gross, *Expert Rev. Proteomics*, 2 (2005) 253-264.
- [133] D.L. Massart, *Chemometrics: a textbook*, Elsevier Science, 1988.
- [134] L.I. Smith,
www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf.
- [135] S. Wold, M. Sjöström, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 44 (1998) 3-14.
- [136] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 2 (1987) 37-52.
- [137] P. Geladi, H. Isaksson, L. Lindqvist, S. Wold, K. Esbensen, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 5 (1989) 209-220.
- [138] R.N. Carey, S. Wold, J.O. Westgard, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1824-1829.
- [139] Principal Component Analysis,
support.sas.com/publishing/pubcat/chaps/55129.pdf, .
- [140] H. Risvik, folk.uio.no/henninri/pca_module/pca_nipals.pdf.
- [141] B. Schölkopf, A. Smola, K.-R. Müller, in: W. Gerstner, A. Germond, M. Hasler, J.D. Nicoud (Eds.), *Artificial Neural Networks – ICANN'97*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1997, pp. 583-588.

- [142] S.A. Bellomarino, R.M. Parker, X.A. Conlan, N.W. Barnett, M.J. Adams, *Anal. Chim. Acta*, 678 (2010) 34-38.
- [143] H. Wold, *Systems under indirect observation*, 2 (1982) 589-591.
- [144] S. Wold, S. Hellberg, M. Sjostrom, H. Wold, *PLS modeling with latent variables in two or more dimensions*, (1987).
- [145] S. Wold, J. Trygg, A. Berglund, H. Antti, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 58 (2001) 131-150.
- [146] S. Wold, J. Trygg, *J. Chemometr.*, 17 (2003) 53-64.
- [147] J. Trygg, S. Wold, *J. Chemometr.*, 16 (2002) 119-128.
- [148] S. Wold, H. Antti, F. Lindgren, J. Öhman, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 44 (1998) 175-185.
- [149] T. Fearn, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 50 (2000) 47-52.
- [150] J.A. Westerhuis, S. de Jong, A.K. Smilde, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 56 (2001) 13-25.
- [151] J. Goupy, www-rocq.inria.fr/axis/modulad/archives/numero-34/...34/goupy-34.pdf, .
- [152] F. Gillon, *Mémoire de thèse, Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur à commutations électroniques*, (1997).
- [153] R. Plackett, J. Burman, *Biometrika*, 33 (1946) 305-325.
- [154] X. Yu, S.G. Hallett, J. Sheppard, A.K. Watson, *App. Microbiol. Biotech.*, 47 (1997) 301-305.
- [155] M.M. Rogan, K.D. Altria, D.M. Goodall, *Chromatographia*, 38 (1994) 723-729.
- [156] M.J. McConville, A. Bacic, *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 757-766.
- [157] J.D. Hilley, J.L. Zawadzki, M.J. McConville, G.H. Coombs, J.C. Mottram, *Mol. Biol. Cell*, 11 (2000) 1183-1195.
- [158] R. Zufferey, S. Allen, T. Barron, D.R. Sullivan, P.W. Denny, I.C. Almeida, D.F. Smith, S.J. Turco, M.A.J. Ferguson, S.M. Beverley, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 44708-44718.
- [159] L.S. de Oliveira, F. de M. Rodrigues, F.S. de Oliveira, P.R.R. Mesquita, D.C. Leal, A.C. Alcântara, B.M. Souza, C.R. Franke, P.A. de P. Pereira, J.B. de Andrade, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 875 (2008) 392-398.
- [160] Z. Garkani-Nejad, B. Ahmadi-Roudi, *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (2010) 719-726.
- [161] WHO | Leishmaniasis: Background information, <http://www.who.int/>.

- [162] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Alvar, M. Boelaert, *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 (2007) 873-882.
- [163] H.C. Maltezos, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010 (2010) 617521.
- [164] S.L. Croft, R.A. Neal, W. Pendergast, J.H. Chan, *Biochem. Pharmacol.*, 36 (1987) 2633-2636.
- [165] S.L. Croft, D. Snowdon, V. Yardley, *J. Antimicrob. Chemother.*, 38 (1996) 1041-1047.
- [166] S. Sundar, F. Rosenkaimer, M.K. Makharia, A.K. Goyal, A.K. Mandal, A. Voss, P. Hilgard, H.W. Murray, *Lancet*, 352 (1998) 1821-1823.
- [167] T.K. Jha, S. Sundar, C.P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss, J. Berman, *N. Engl. J. Med.*, 341 (1999) 1795-1800.
- [168] K. Zhang, S.M. Beverley, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 170 (2010) 55-64.
- [169] A. Stolywho, M. Martin, G. Guiochon, *J. Liq. Chromatogr.*, (1987) 1237-1253.
- [170] P. Vandermeeren, J. Vanderdeelen, M. Huys, L. Baert, *J. Chromatogr.*, 447 (1988) 436-442.
- [171] L. Breton, B. Serkiz, J. Volland, J. Lepagnol, *J. Chromatogr.*, 497 (1989) 243-249.
- [172] J. Becart, C. Chevalier, J. Biesse, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13 (1990) 126-129.
- [173] L. Yetukuri, K. Ekroos, A. Vidal-Puig, M. Oresic, *Mol. Biosyst.*, 4 (2008) 121-127.
- [174] D. Balgoma, O. Montero, M.A. Balboa, J. Balsinde, *Biochimie*, 92 (2010) 645-650.
- [175] A.D. Postle, D.C. Wilton, A.N. Hunt, G.S. Attard, *Prog. Lipid Res.*, 46 (2007) 200-224.
- [176] E. Maréchal, M. Riou, D. Kerboeuf, F. Beugnet, P. Chaminade, P.M. Loiseau, *Trends Parasitol.*, (2011).
- [177] S. Milne, P. Ivanova, J. Forrester, H. Alex Brown, *Methods*, 39 (2006) 92-103.
- [178] J.J. Sedmak, S.E. Grossberg, *Anal. Biochem.*, 79 (1977) 544-552.
- [179] M. Katajamaa, J. Miettinen, M. Oresic, *Bioinformatics*, 22 (2006) 634-636.
- [180] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold, Umea, Sweden, 2006, pp. 267-296.
- [181] S. Wiklund, E. Johansson, L. Sjöström, E.J. Mellerowicz, U. Edlund, J.P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz, J. Trygg, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 115-122.
- [182] F.F. Hsu, J. Turk, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 877 (2009) 2673-2695.

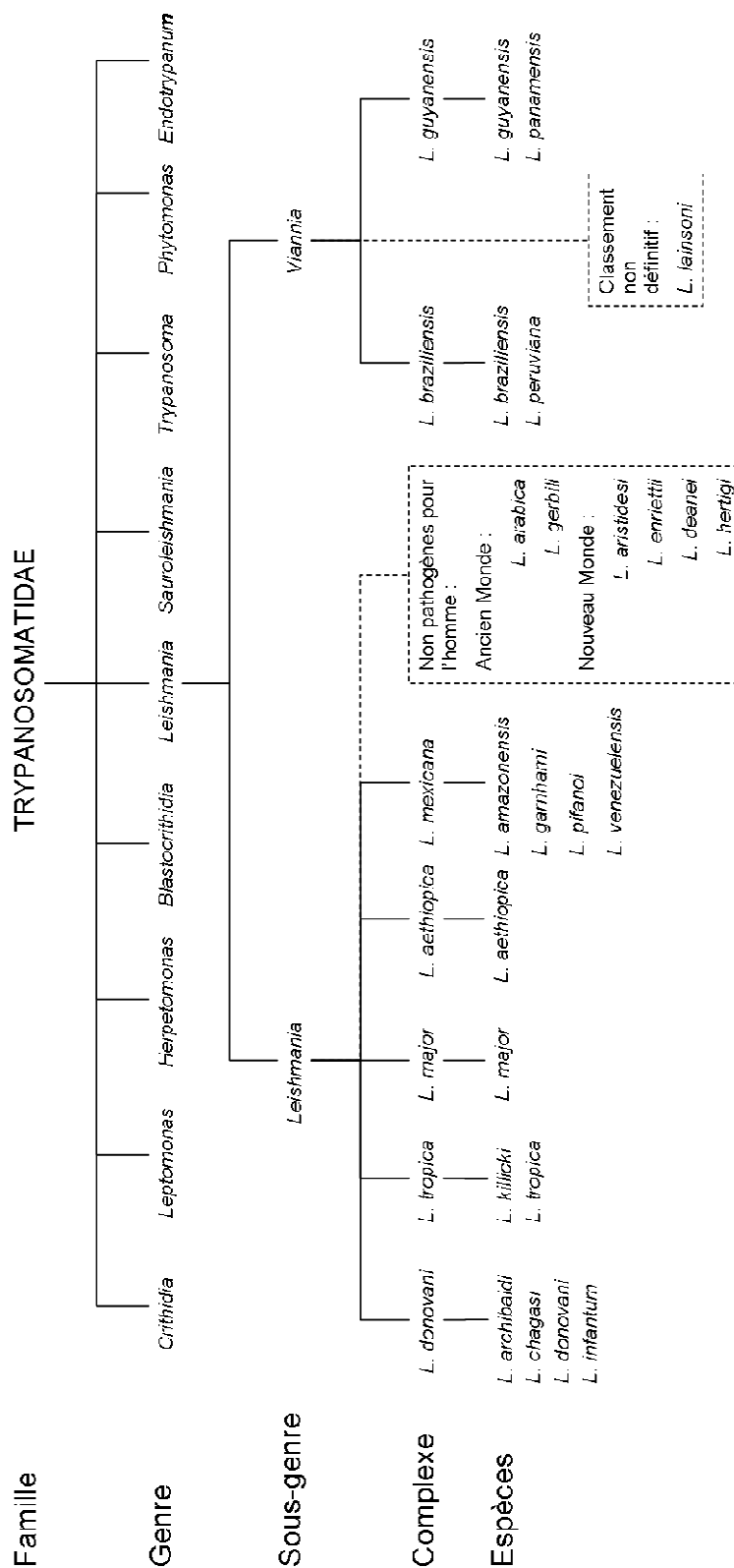
- [183] F.F. Hsu, J. Turk, K. Zhang, S.M. Beverley, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18 (2007) 1591-1604.
- [184] T.P.C. Dorlo, M.J.X. Hillebrand, H. Rosing, T.A. Eggelte, P.J. de Vries, J.H. Beijnen, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 865 (2008) 55-62.
- [185] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis, *Journal of Lipid Research*, 46 (2005) 839 -862.
- [186] H.D. Le, J.A. Meisel, V.E. de Meijer, K.M. Gura, M. Puder, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 81 (2009) 165-170.
- [187] A.A. Farooqui, W.Y. Ong, T. Farooqui, *Biochim. Biophys. Acta*, 1801 (2010) 906-916.
- [188] M. Beller, K. Thiel, P.J. Thul, H. Jäckle, *FEBS Letters*, 584 (2010) 2176-2182.
- [189] Y.A. Hannun, in: *Membranes and Cell Signaling*, E.E. Bittar, N. Bittar, 1997, p. 487.
- [190] W.C. Byrdwell, *Lipids*, 36 (2001) 327-346.
- [191] A. Postle, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111 (2009) 2-13.
- [192] H. Kim, H.K. Min, G. Kong, M.H. Moon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2009) 1649-1656.
- [193] H.K. Min, G. Kong, M.H. Moon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 1273-1280.
- [194] A.N. Hunt, A.D. Postle, *Methods*, 39 (2006) 104-111.
- [195] A. Hazotte, D. Libong, M. Matoga, P. Chaminade, *J. Chromatogr. A*, 1170 (2007) 52-61.
- [196] T. Kasumov, H. Huang, Y.M. Chung, R. Zhang, A.J. McCullough, J.P. Kirwan, *Anal. Biochem.*, 401 (2010) 154-161.
- [197] A. Napolitano, A. Benavides, C. Pizza, S. Piacente, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55 (2011) 23-30.
- [198] X. Han, R.W. Gross, *J. Lipid Res.*, 44 (2003) 1071-1079.
- [199] H. Farwanah, J. Wirtz, T. Kolter, K. Raith, R.H.H. Neubert, K. Sandhoff, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 2976-2982.
- [200] Y. Xu, J.T. Brenna, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2525-2536.
- [201] W.C. Byrdwell, E.A. Emken, *Lipids*, 30 (1995) 173-175.
- [202] R.C. Murphy, T.J. Leiker, R.M. Barkley, *Biochim. Biophys. Acta*, (2011).

- [203] I. Marchi, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *Talanta*, 78 (2009) 1-18.
- [204] A. Delobel, S. Roy, D. Touboul, K. Gaudin, D.P. Germain, A. Baillet, F. Brion, P. Prognon, P. Chaminade, O. Laprévotte, *J. Mass Spectrom.*, 41 (2006) 50-58.
- [205] A. Delobel, D. Touboul, O. Laprévotte, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 11 (2005) 409-417.
- [206] S.S. Cai, J.A. Syage, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 1191-1199.
- [207] J. Soto, J.T. Toledo, *Lancet Infect. Dis.*, 7 (2007) 7.
- [208] W. Guan, M. Zhou, C. Hampton, B. Benigno, L.D. Walker, A. Gray, J. McDonald, F. Fernandez, *BMC Bioinf.*, 10 (2009) 259.
- [209] S.S. Cai, L.C. Short, J.A. Syage, M. Potvin, J.M. Curtis, *J. Chromatogr. A*, 1173 (2007) 88-97.
- [210] M. Lu, P. Tong, H. Xiao, S. Xia, X. Zheng, W. Liu, L. Zhang, G. Chen, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1461-1471.
- [211] N.E. Manicke, J.M. Wiseman, D.R. Ifa, R.G. Cooks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19 (2008) 531-543.
- [212] K.A. Mountfort, H. Bronstein, N. Archer, S.M. Jickells, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2650-2657.
- [213] Y. Xiao, Y. Chen, A.W. Kennedy, J. Belinson, Y. Xu, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 905 (2000) 242-259.
- [214] R.C. Murphy, P.H. Axelsen, *Mass Spectrom. Rev.*, 30 (2011) 579-599.
- [215] R. Käkälä, P. Somerharju, J. Tyynelä, *J. Neurochem.*, 84 (2003) 1051-1065.
- [216] P. Donato, F. Cacciola, F. Cichello, M. Russo, P. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6476-6482.
- [217] J.F. Brouwers, *Biochim. Biophys. Acta*, (2011).
- [218] I.A. Butovich, E. Uchiyama, J.P. McCulley, *J. Lipid Res.*, 48 (2007) 2220-2235.
- [219] J.A. Bowden, C.J. Albert, O.S. Barnaby, D.A. Ford, *Anal. Biochem.*, 417 (2011) 202-210.
- [220] M. Gaudin, L. Imbert, D. Libong, P. Chaminade, A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévotte, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2011).
- [221] W.C. Byrdwell, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12 (1998) 256-272.
- [222] S.S. Cai, J.A. Syage, *J. Chromatogr. A*, 1110 (2006) 15-26.
- [223] E. Kofronová, J. Cvacka, V. Vrkoslav, R. Hanus, P. Jiros, J. Kindl, O. Hovorka, I. Valterová, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 877 (2009) 3878-3884.

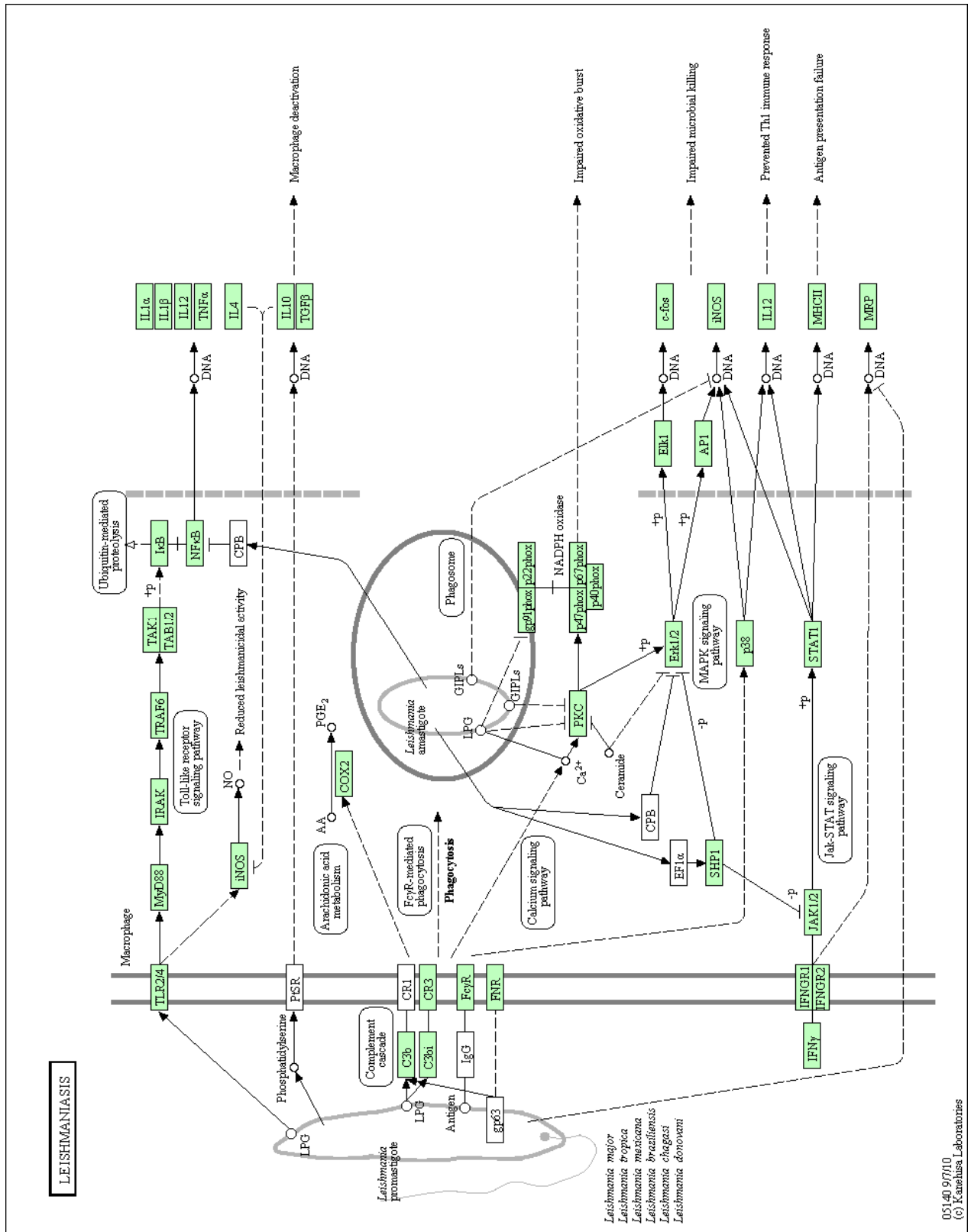
- [224] T. Rezanka, O. Schreiberová, T. Krulikovská, J. Masák, K. Sigler, *Chem. Phys. Lipids*, 163 (2010) 373-380.
- [225] L. Imbert, R. Ramos, D. Libong, S. Abreu, P. Loiseau, P. Chaminade, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011.
- [226] F.F. Hsu, J. Turk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11 (2000) 986-999.
- [227] S.P. Devaiah, M.R. Roth, E. Baughman, M. Li, P. Tamura, R. Jeannotte, R. Welti, X. Wang, *Phytochemistry*, 67 (2006) 1907-1924.
- [228] Y.Q. Xia, M. Jemal, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23 (2009) 2125-2138.
- [229] A. Bruins, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 345-357.
- [230] IUPAC Compendium of Chemical Terminology, <http://goldbook.iupac.org/S05605.htm>.
- [231] C. McEwen, B. Larsen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20 (2009) 1518-1521.
- [232] S.S. Cai, K.A. Hanold, J.A. Syage, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 2491-2498.
- [233] G. Barratt, S. Bretagne, *Int. J. Nanomedicine*, 2 (2007) 301-313.
- [234] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Oresic, *Bioinformatics*, 11 (2010) 395.
- [235] M.K. Wassef, T.F. Fioretti, D.M. Dwyer, *Lipids*, 20 (1985) 108-115.
- [236] K. Zhang, J.M. Pompey, F.F. Hsu, P. Key, P. Bandhuvula, J.D. Saba, J. Turk, S. Beverley, *EMBO J.*, 26 (2007) 1094-1104.
- [237] M. Rakotomanga, M. Saint-Pierre-Chazalet, P.M. Loiseau, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (2005) 2677-2686.
- [238] E. Aflaki, B. Radovic, P.G. Chandak, D. Kolb, T. Eisenberg, J. Ring, I. Ferschai, A. Uellen, H. Wolinski, S.D. Kohlwein, R. Zechner, S. Levak-Frank, W. Sattler, W.F. Graier, R. Malli, F. Madeo, D. Kratky, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 7418-7428.
- [239] B.E. Cohen, H. Ramos, M. Gamargo, J. Urbina, *Biochim. Biophys. Acta*, 860 (1986) 57-65.
- [240] A.L. Banuls, M. Hide, F. Prugnonle, in: *Advances In Parasitology*, Elsevier, 2007.
- [241] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, G.S. Jackson, *Mass Spectrom. Rev.*, 17 (1998) 1-35.
- [242] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks, *J. Mass Spectrom.*, 40 (2005) 430-443.
- [243] A. Makarov, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1156-1162.

ANNEXES

A. Taxonomie des Leishmanies [240].



B. Voies métaboliques impliquées lors de l'infection du macrophage par la forme promastigote de Leishmania.



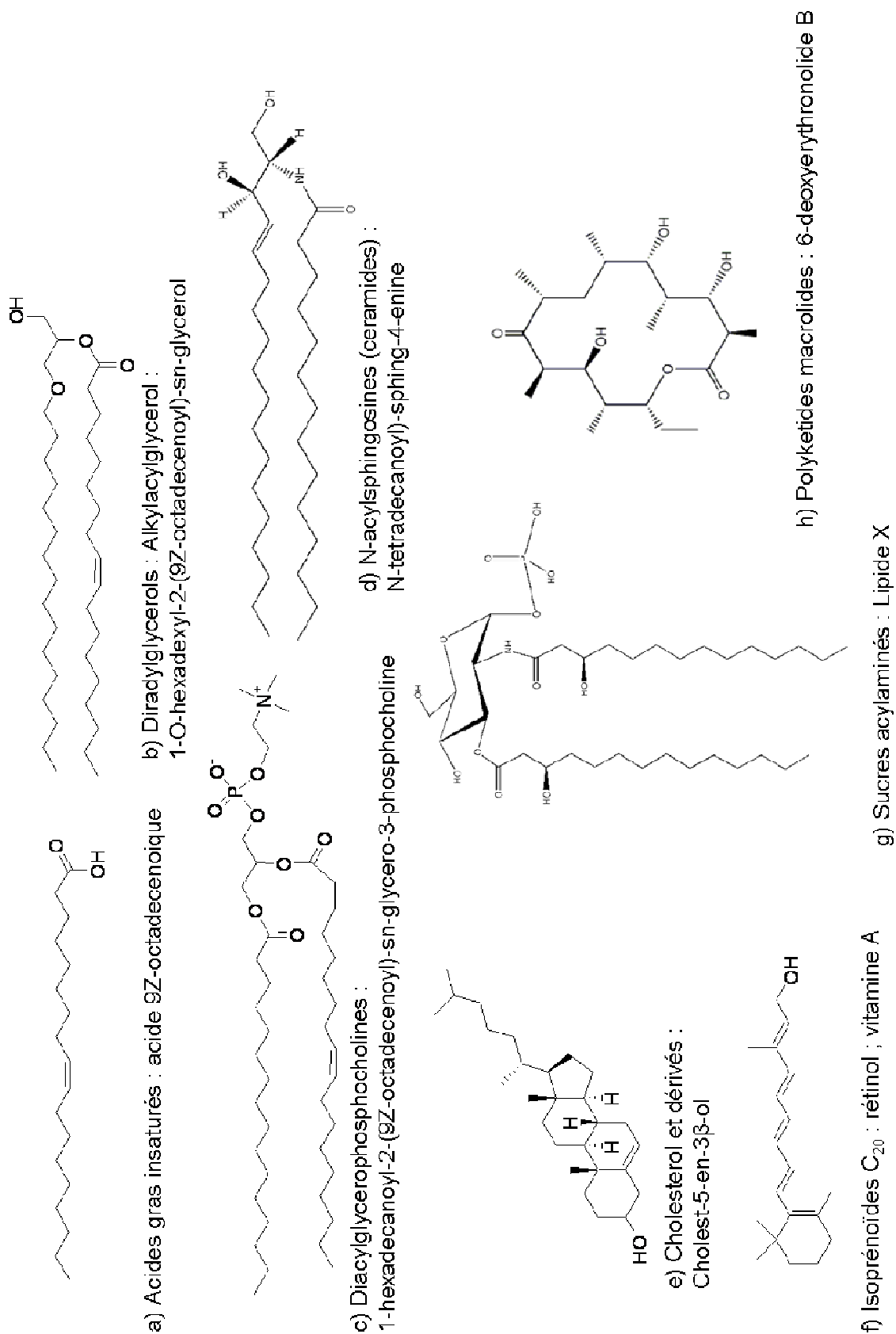
05140 9/7/10
 (c) Kanehisa Laboratories

C. Taxonomie des phlébotomes.

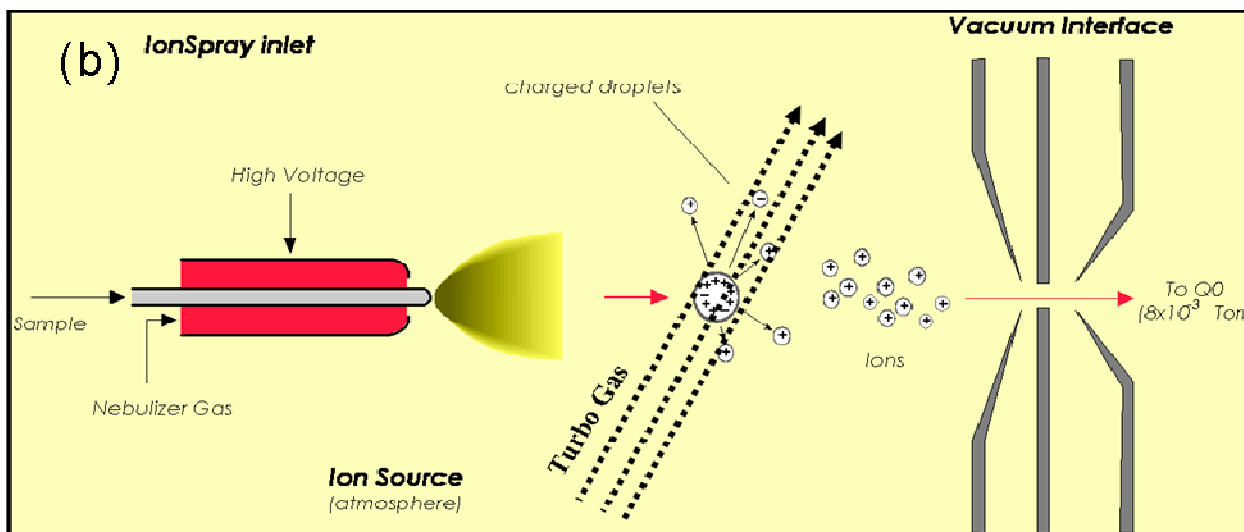
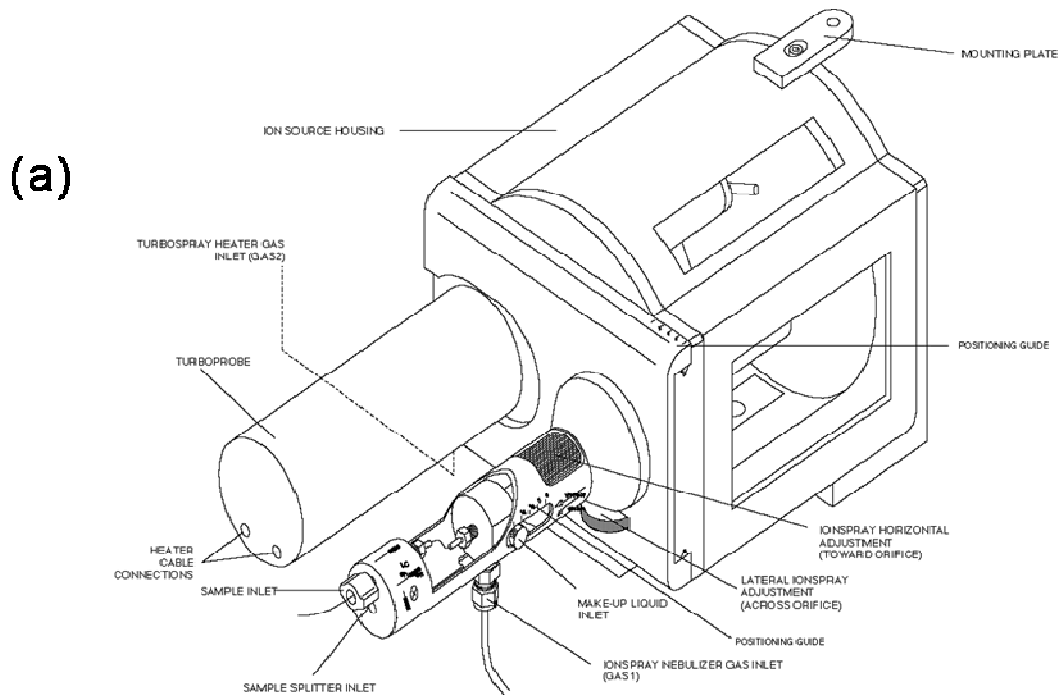
Genre : <i>Phlebotomus</i>			
Sous-genre	Espèce	Parasite transmis	Principales régions à foyers d'endémie
<i>Phlebotomus</i>	<i>duboscqi</i>	<i>L. major</i>	Kenya, Sénégal
	<i>papatasi</i>	<i>L. major</i>	Arabie Saoudite, Israël, Iran, Jordanie, Maroc, Tunisie, Russie
	<i>salehi</i>	<i>L. major</i>	Inde
<i>Paraphlebotomus</i>	<i>alexandri</i>	<i>L. infantum</i>	Chine
	<i>sergenti</i>	<i>L. tropica</i>	Maroc, Arabie Saoudite, Russie
<i>Larroussius</i>	<i>ariasii</i>	<i>L. infantum</i>	France, Espagne
	<i>major neglectus</i>	<i>L. infantum</i>	Grèce
	<i>perfilliewi</i>	<i>L. infantum</i>	Italie
	<i>perniciosus</i>	<i>L. infantum</i>	Algérie, Espagne, France, Italie, Malte
	<i>tobbi</i>	<i>L. infantum</i>	Chypre
	<i>longipes</i>	<i>L. aethiopica</i>	Ethiopie
	<i>pedifer</i>	<i>L. aethiopica</i>	Ethiopie, Kenya
<i>Synphlebotomus</i>	<i>martini</i>	<i>L. donovani</i>	Kenya
	<i>rossi</i>	<i>L. tropica</i>	Namibie
<i>Adlerius</i>	<i>chinensis</i>	<i>L. infantum</i>	Chine
	<i>longiductus</i>	<i>L. infantum</i>	Russie
<i>Euphlebotomus</i>	<i>argentipes</i>	<i>L. donovani</i>	Inde

Genre : <i>Lutzomyia</i>			
Sous-genre	Espèce	Parasite transmis	Principales régions à foyers d'endémie
<i>Nyssomyia</i>	<i>anduzei</i>	<i>L. guyanensis</i>	Brésil
	<i>flaviscutellata</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brésil, Colombie, Guyane française
	<i>olmecca olmecca</i>	<i>L. mexicana</i>	Belize, Mexique,
	<i>trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	Colombie, Costa Rica, Panama
	<i>umbratilis</i>	<i>L. guyanensis</i>	Brésil, Colombie, Guyane française
	<i>whitmani</i>	<i>L. guyanensis</i>	Brésil
		<i>L. braziliensis</i>	Brésil
	<i>ylephiletor</i>	<i>L. panamensis</i>	Costa Rica, Panama
<i>Psychodopygus</i>	<i>carrerae carrerae</i>	<i>L. braziliensis</i>	Bolivie
	<i>ilanos martinsi</i>	<i>L. braziliensis</i>	Bolivie
	<i>panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	Panama
	<i>yucumensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Bolivie
	<i>wellcomei</i>	<i>L. braziliensis</i>	Brésil
<i>Verrucarum</i>	<i>spinicrassa</i>	<i>L. braziliensis</i>	Colombie
<i>Lutzomyia</i>	<i>gomezi</i>	<i>L. panamensis</i>	Panama
	<i>longipalpis</i>	<i>L. chagasi</i>	Bolivie, Brésil, Colombie

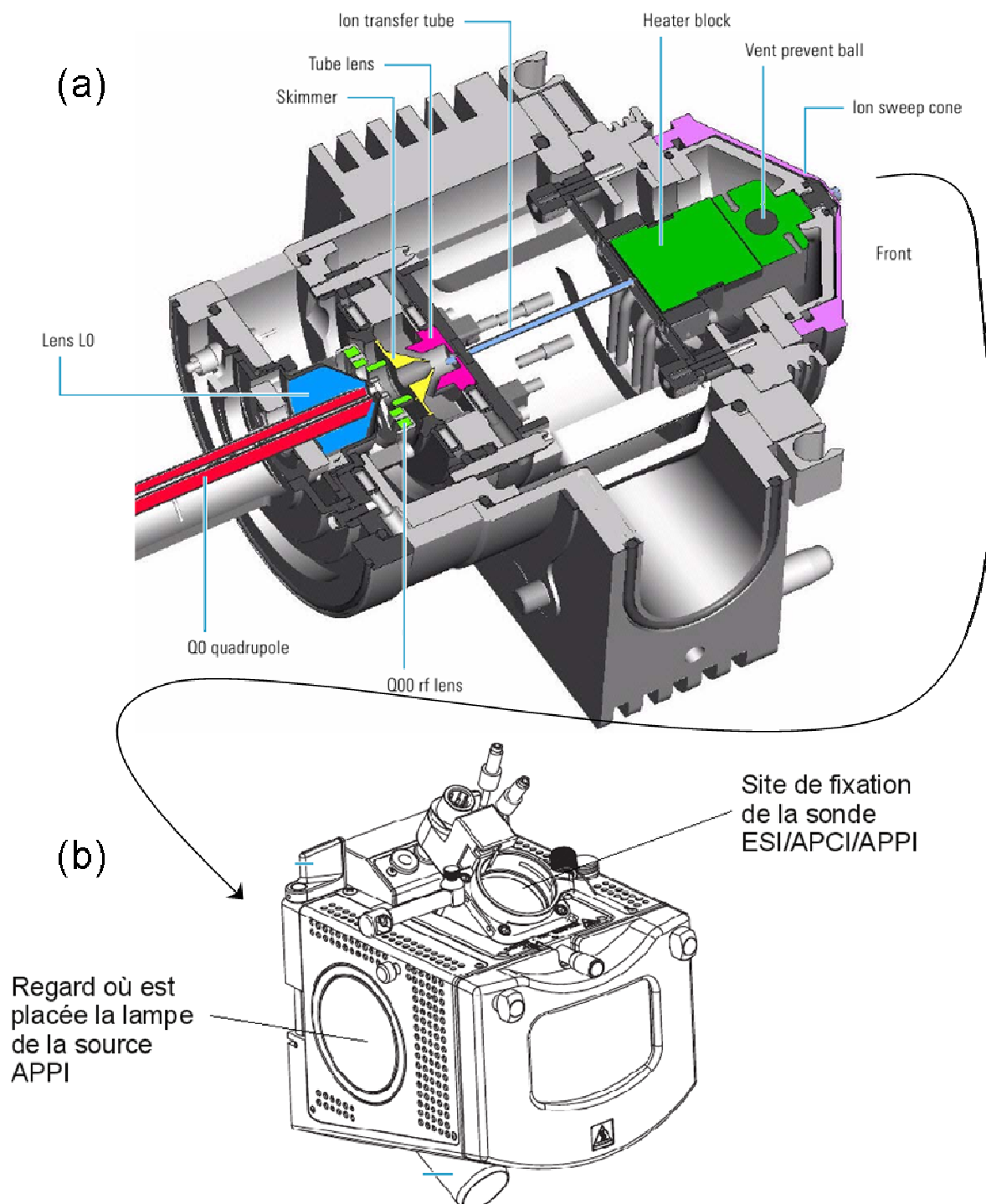
D. Exemple de structure moléculaire des principales classes de lipides définies par LIPID MAPS [61].



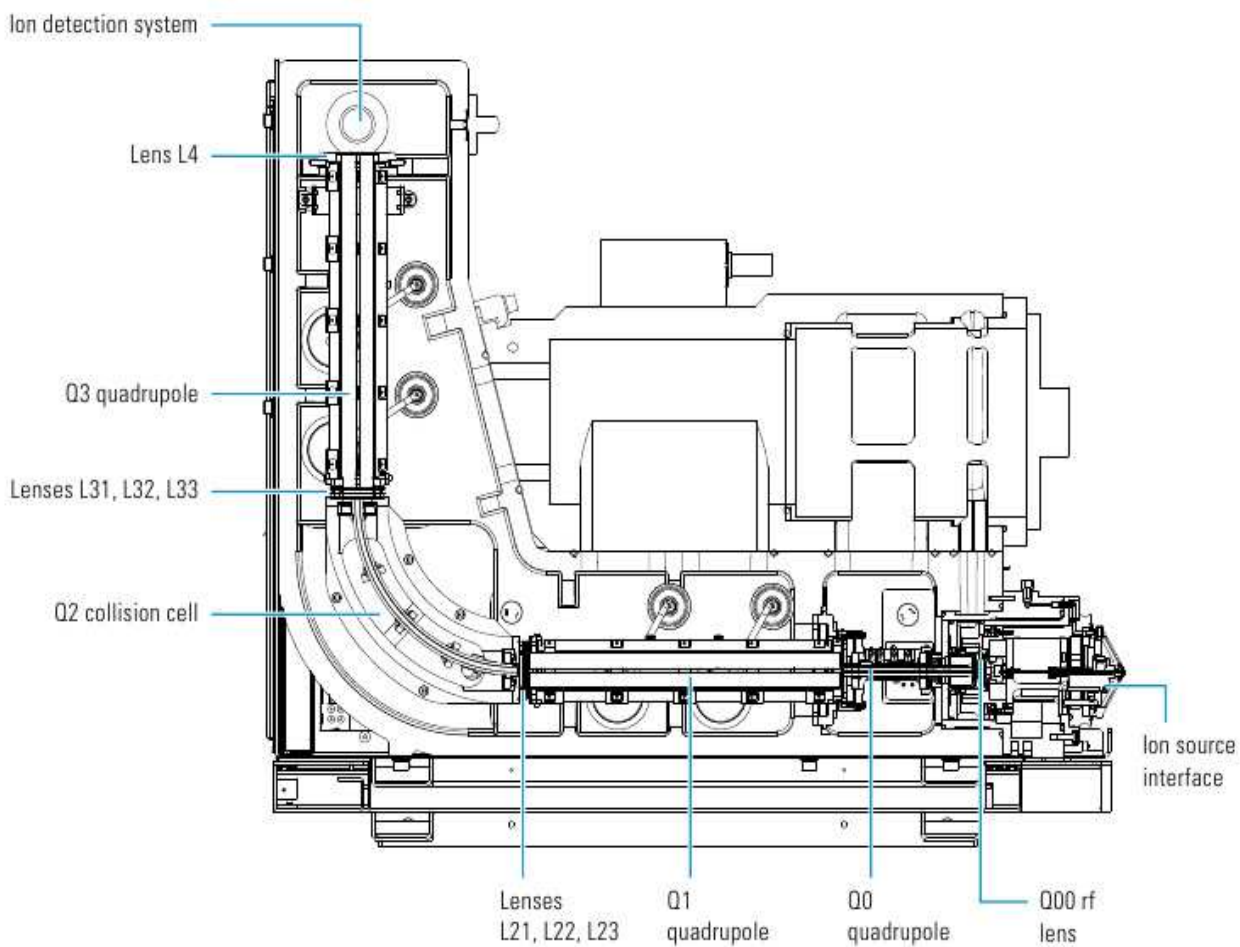
E. (a) Schéma de la source Turbo Ion Spray utilisée au cours de ces travaux sur le triple quadripôle API 3000 (AB Sciex) et (b) son principe de fonctionnement.



F. Schéma (a) de l'interface entre les sources et l'analyseur utilisés sur le TSQ Vantage EMR (Thermo Fisher Scientific) utilisé au cours de ces travaux ; (b) module supportant les sondes propres à chaque type de source ESI/APCI/APPI.



G. Schéma d'un analyseur à triple quadripôles utilisé au cours de ces travaux (TSQ Vantage EMR).



H. Principe de fonctionnement d'analyseurs de masse non utilisés au cours de ces travaux.

- L'ANALYSEUR A TEMPS DE VOL (TOF):

Le principe de fonctionnement de ce type d'analyseur est séquentiel. Les ions produits au niveau de la source d'ionisation sont envoyés par paquets dans l'analyseur. Celui-ci mesure le temps que mettent les ions de chaque « paquet » pour parcourir une distance fixée par les caractéristiques de la machine. Il en déduit le rapport m/z de chaque ion et peut générer un spectre de masse.

La formule du temps de vol exprime l'énergie cinétique des ions pulsés en fonction du potentiel V_0 appliqué à l'entrée de l'analyseur, et permet de comprendre aisément l'analyse des ions :

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV_0$$

Qui conduit donc à :

$$\frac{m}{z} = \frac{2V_0}{v^2} \quad \text{où} \quad v = \frac{d}{t}$$

Ainsi :

$$\frac{m}{z} = 2V_0 \frac{t^2}{d^2}$$

Le rapport masse/charge m/z dépend donc du temps t que mettent les ions pour parcourir la distance d de la cellule de l'analyseur. Les ToF actuels ont la possibilité d'homogénéiser l'énergie cinétique des paquets d'ions successivement analysés, garantissant ainsi une résolution meilleure et plus répétable que les premiers modèles. La Figure 50 présente les deux types d'analyseurs utilisés, linéaires ou à réflectrons. Ces derniers possèdent une meilleure résolution car la distance à parcourir par les ions est plus longue.

D'une part, les ions les plus légers atteignent la cellule de détection plus rapidement que les ions les plus lourds. D'autre part, une distance à parcourir plus longue permet de mieux différencier deux ions de masse proche, et explique le gain de résolution sur les analyseurs à réflectrons. Ces derniers corrigent également les différences de vitesses pouvant survenir entre des ions de même m/z , en augmentant le

temps de trajet des ions les plus rapides. Il en résulte un alignement des ions en sortie du réflectron, avant d'atteindre le détecteur. De même les espèces neutres pouvant altérer le signal formées en sources ne sont pas déviées par le réflectron, améliorant également la résolution ainsi que la sensibilité. L'un des avantages majeurs du ToF et la gamme de masse considérable qu'il peut analyser par rapport aux autres analyseurs disponibles.

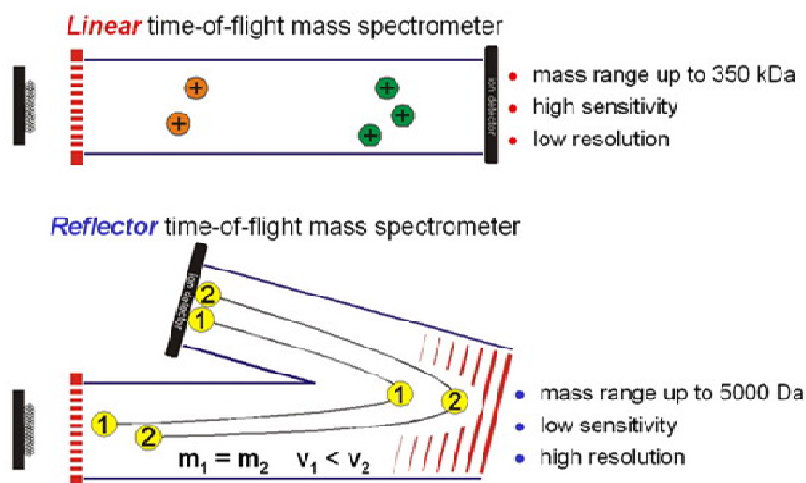


Figure 50 : Schéma d'un analyseur à temps de vol linéaire et à réflectron, avec leurs caractéristiques principales.

Depuis les années 2000, des analyseurs couplant deux ToF permettent de réaliser de la MS². Le principe est similaire à celui décrit précédemment pour les analyseurs quadripôlaire, cependant le ToF ne réalise pas de balayage des m/z , il analyse tous les ions entrants. Les modes SIM ou SRM ne sont donc pas réalisables. Il existe des couplages quadripôle/ToF permettant d'effectuer ce type d'acquisition, notamment l'acquisition en ion précurseur.

- **L'ANALYSEUR A RESONNANCE CYCLOTRONIQUE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FT-ICR) :**

L'analyseur FT-ICR existe depuis le milieu des années 1970 et est devenu couramment utilisé vers la fin des années 1990. Son principe repose sur la relation existant entre la fréquence, le rayon et la vitesse cyclotronique et la masse et la charge d'un ion au sein d'un champ magnétique uniforme. La Figure 51 présente schématiquement une trappe à ICR ainsi que la trajectoire suivie par les ions dans le champ magnétique.

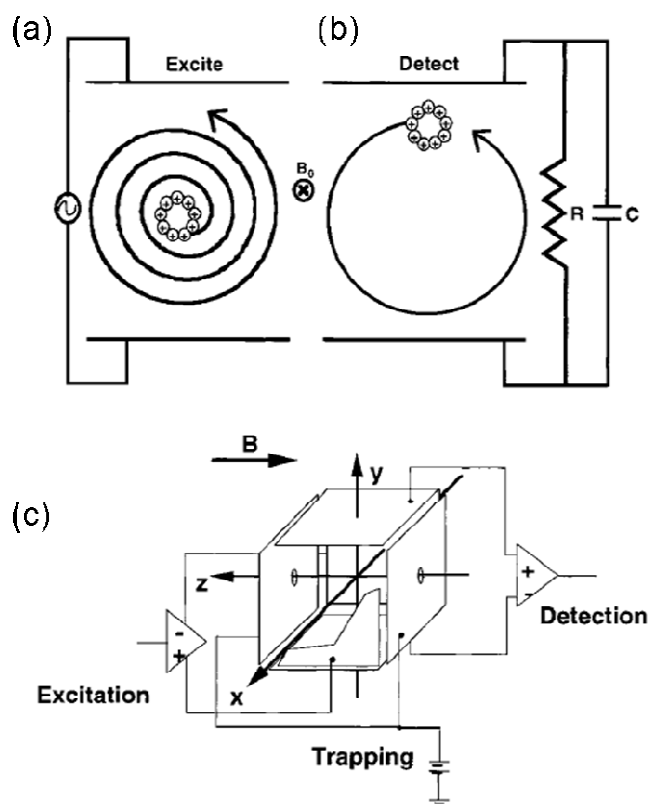


Figure 51 : Schéma de la trajectoire orbitale suivie par un ion dans l'analyseur ICR, (a) excitation des ions vers (b) une trajectoire stable détectable. (c) représente schématiquement l'appareillage [241].

Les ions sont dans un premier temps excités par application d'une fréquence égale à leur fréquence de résonance cyclotronique. Lorsqu'une trajectoire stable circulaire est atteinte, il est alors possible de détecter l'oscillation des ions, et un spectre de fréquences convertible en spectre de m/z est obtenu par transformée de Fourier du signal enregistré [241].

Voici l'équation liant la fréquence cyclotronique au rapport m/z des ions :

$$v_c = \frac{\omega_c}{2\pi} = \frac{1,535611 \times 10^7 B_0}{m/z} \quad \text{où} \quad \omega_c = \frac{q B_0}{m}$$

B_0 correspond au champ

magnétique en Teslas régnant dans la cellule cyclotronique, m est la masse d'un ion en unités internationales, z est le nombre de charges élémentaires, ω_c est la pulsation cyclotronique non perturbée, et v_c est la fréquence de résonance cyclotronique de l'ion étudié. Différents ions de même rapport m/z auront donc la même fréquence de résonance cyclotronique, alors que leur vitesse peut être différente. De plus, le rayon de la trajectoire des ions est lié à leur masse [241].

Les analyseurs FT-ICR constituent les premiers analyseurs de spectrométrie de

masse à haute résolution, car les fréquences de résonances des ions acheminés depuis la source d'ionisation peuvent être mesurées avec grande précision. Il est alors possible de mesurer les masses exactes des ions analysés.

- **ORBITRAP :**

L'Orbitrap est un nouvel analyseur à haute résolution, disponible depuis les années 2000 [242]. Elle a été développée par Makarov *et coll.* [243]. D'un point de vue structural, elle se situe à mi-chemin entre la trappe ionique conventionnelle et le FT-ICR, dans le sens où elle capture des ions, qui décrivent une trajectoire circulaire, mais oscillante latéralement. La Figure 52 schématise leur trajectoire au sein de la trappe. Celle-ci est constituée d'une électrode centrale, d'une électrode cylindrique englobant l'électrode centrale, et de deux électrodes chapeaux aux extrémités.

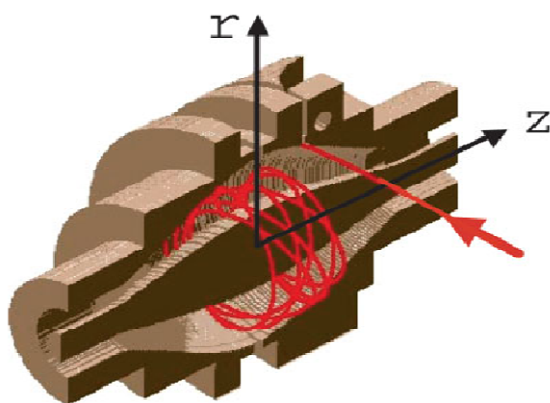


Figure 52 : Schéma de la trappe d'ion constituant l'Orbitrap, où les ions présentent une trajectoire oscillante sur l'axe z.

Le rapport m/z des ions est relié à leur fréquence d'oscillation selon l'axe z, par l'équation suivante [242] :

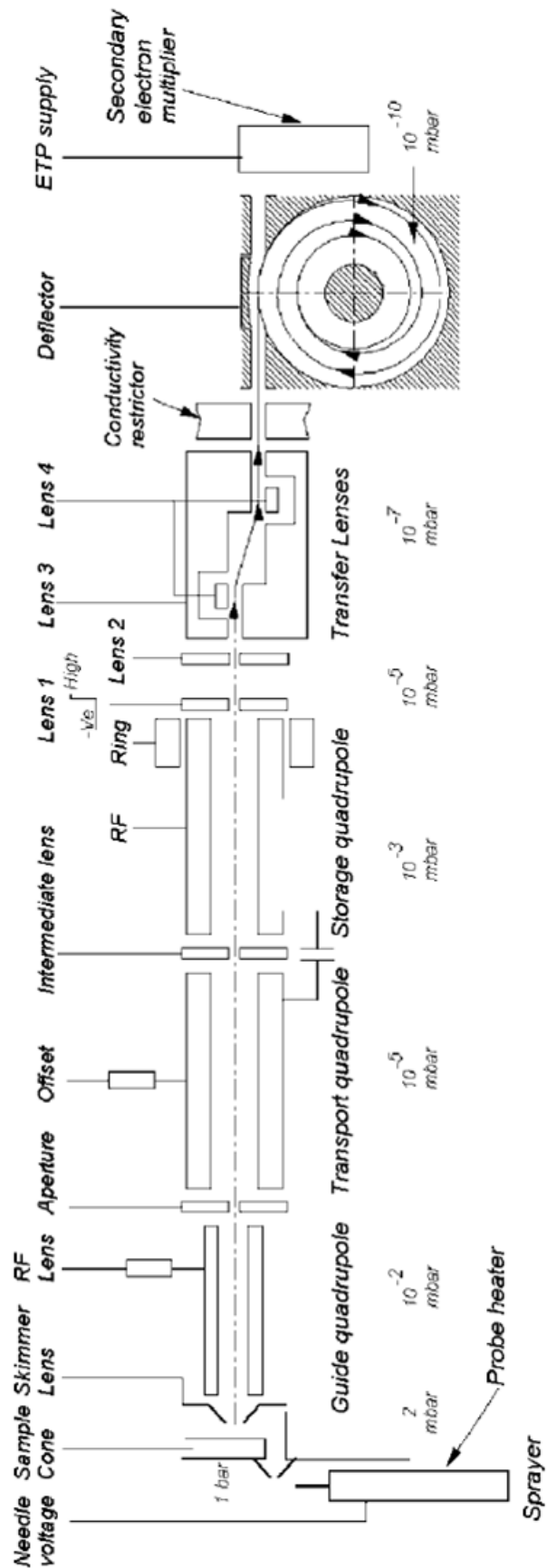
$$\nu = \sqrt{(z/m)k}$$

Où ν est la fréquence d'oscillation et k est une constante. Le signal enregistré correspond donc à une fréquence, qui est convertie par transformée de Fourier en spectre de masse, similairement à un FT-ICR. Le schéma de l'instrument complet est présenté en annexe I.

Les ions sont dans un premier temps focalisés dans un quadripôle de stockage, où ils perdent leur énergie par collision avec le gaz présent, avant d'être envoyés dans l'Orbitrap même. Les ions de même rapport m/z forment des « paquets » séparés les

uns des autres par quelques nanosecondes et pénètrent par la périphérie de la trappe. Le champ électrique généré dans l'Orbitrap tend alors à focaliser les différents paquets sur leur « orbite » stable entre l'électrode centrale et l'électrode périphérique. L'acquisition du signal, et donc des spectres de masses, peut alors avoir lieu. Le rayon des orbites décrites par les ions dépend de leur m/z . Les ions de faible m/z présentent alors un rayon plus faible que les ions de fort m/z [242].

I. Schéma du spectromètre de masse Orbitrap couplé à une source Electrospray.



J. Exemple de plan factoriel complet pour l'optimisation de paramètres de source ESI en MS.

	A	B	C	D	E
Paramètres étudiés	Pression de gaz	Débit de gaz	Température de la source	Tension du capillaire	Débit de phase mobile
Valeur haute	50	7	365	4500	0.4
Valeur basse	20	4	355	3500	0.2

Plan d'expérience

	A	B	C	D	E
E1	+	+	+	+	+
E2	-	+	+	+	+
E3	+	-	+	+	+
E4	-	-	+	+	+
E5	+	+	-	+	+
E6	-	+	-	+	+
E7	+	-	-	+	+
E8	-	-	-	+	+
E9	+	+	+	-	+
E10	-	+	+	-	+
E11	+	-	+	-	+
E12	-	-	+	-	+
E13	+	+	-	-	+
E14	-	+	-	-	+
E15	+	-	-	-	+
E16	-	-	-	-	+
E17	+	+	+	+	-
E18	-	+	+	+	-
E19	+	-	+	+	-
E20	-	-	+	+	-
E21	+	+	-	+	-
E22	-	+	-	+	-
E23	+	-	-	+	-
E24	-	-	-	+	-
E25	+	+	+	-	-
E26	-	+	+	-	-
E27	+	-	+	-	-
E28	-	-	+	-	-
E29	+	+	-	-	-
E30	-	+	-	-	-
E31	+	-	-	-	-
E32	-	-	-	-	-
E33	0	0	0	0	0
E34	0	0	0	0	0
E35	0	0	0	0	0
E36	0	0	0	0	0
E37	0	0	0	0	0

K. Plan d'expérience de Plackett-Burman pour l'analyse d'effets des paramètres de sources sur la source ESI de l'API 3000.

Paramètres étudiés	neb Gas	Curt Gas	Voltage	Temp	Dec. P.	Foc. P.	Ent.P
Valeur haute	13	13	4500	350	50	400	15
Valeur basse	5	7	3000	200	30	200	5

Acide phosphatidique

Exp No	Run Order	neb Gaz	Curtain Gaz	Ion Spray Voltage	Temp	Declustering	Focussing P	Entrance P
5	1	+	-	+	+	+	-	-
3	2	+	+	+	-	-	+	-
2	3	+	+	-	-	+	-	+
1	4	+	-	-	+	-	+	+
10	5	0	0	0	0	0	0	0
9	6	0	0	0	0	0	0	0
4	7	-	+	+	+	-	-	+
6	8	-	+	-	+	+	+	-
8	9	-	-	-	+	-	-	-
11	10	0	0	0	0	0	0	0
7	11	-	-	+	-	+	+	+

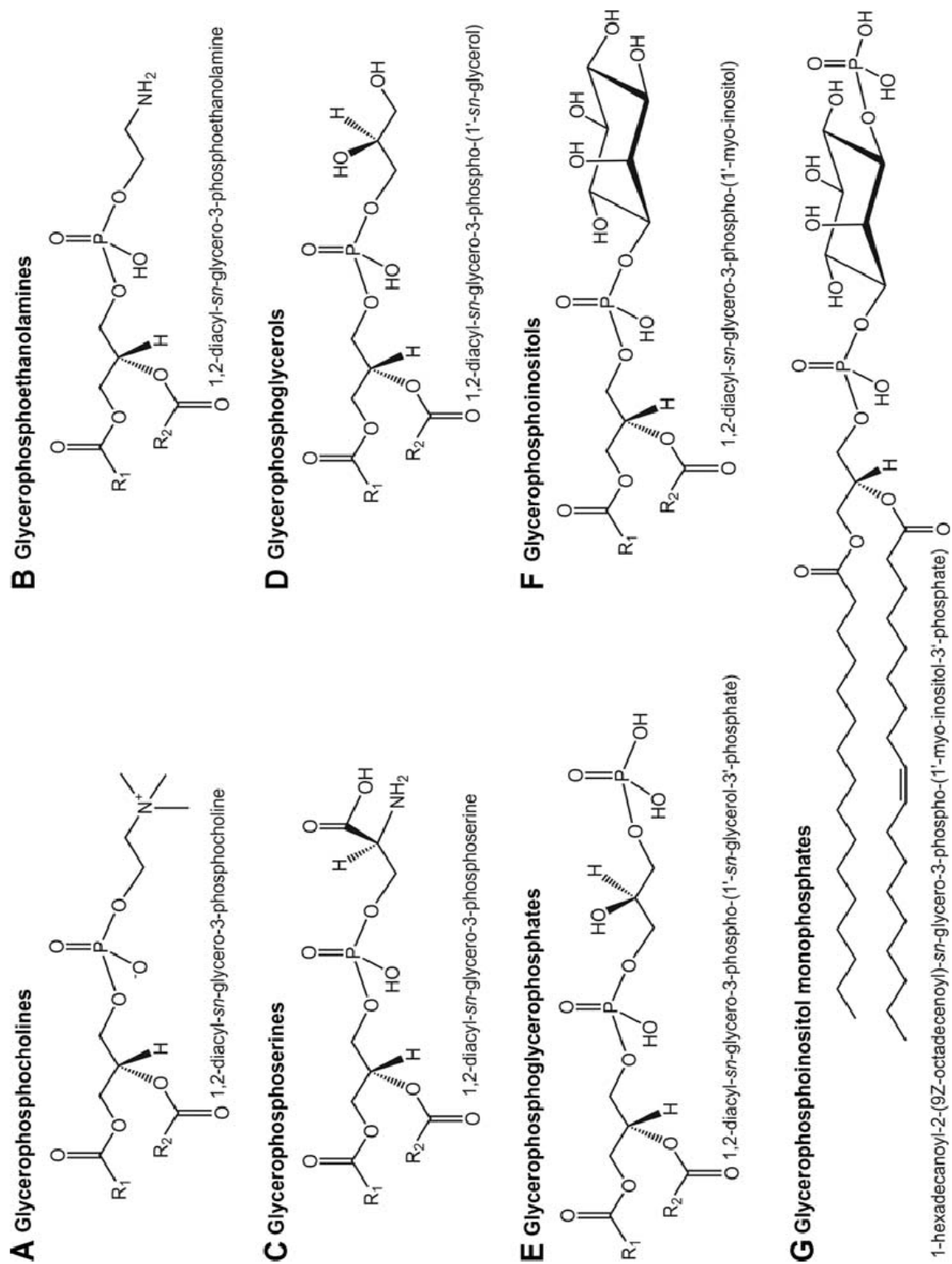
Phosphatidylglycerol

Exp No	Run Order	neb Gaz	Curtain Gaz	Ion Spray Voltage	Temp	Declustering	Focussing P	Entrance P
5	1	+	-	+	+	+	-	-
3	2	+	+	+	-	-	+	-
2	3	+	+	-	-	+	-	+
1	4	+	-	-	+	-	+	+
10	5	0	0	0	0	0	0	0
9	6	0	0	0	0	0	0	0
4	7	-	+	+	+	-	-	+
6	8	-	+	-	+	+	+	-
8	9	-	-	-	-	-	-	-
11	10	0	0	0	0	0	0	0
7	11	-	-	+	-	+	+	+

Phosphatidylcholine

Exp No	Run Order	neb Gaz	Curtain Gaz	Ion Spray Voltage	Temp	Declustering	Focussing P	Entrance P
1	4	+	-	-	+	-	+	+
2	3	+	+	-	-	+	-	+
3	2	+	+	+	-	-	+	-
4	7	-	+	+	+	-	-	+
5	1	+	-	+	+	+	-	-
6	8	-	+	-	+	+	+	-
7	11	-	-	+	-	+	+	+
8	9	-	-	-	-	-	-	-
9	6	0	0	0	0	0	0	0
10	5	0	0	0	0	0	0	0
11	10	0	0	0	0	0	0	0

L. Structure générale des phospholipides [64].



RÉSUMÉ :

Les leishmanioses sont des parasitoses en constante évolution, et l'accroissement d'apparitions de résistances vis-à-vis des traitements disponibles en fait une des préoccupations majeures des organismes de santé publique dans le monde. La miltefosine est actuellement le seul antileishmanien actif par voie orale. Son mécanisme d'action implique les lipides et notamment les phospholipides membranaires du parasite.

Afin d'évaluer les effets de la miltefosine sur le parasite ainsi que les mécanismes de résistances, une étude lipidomique d'un clone de *Leishmania donovani* cultivé sous différentes conditions (traité, résistant, résistant-traité) a été réalisée dans le présent travail. Des analyses couplant une séparation des phospholipides en Chromatographie Liquide Haute-Performance à polarité de Phase Normale (NP-HPLC) avec un Spectromètre de Masse (MS) équipé d'une source d'Ionisation ElectroSpray (ESI) ont été traitées par chimométrie, à l'aide d'une Correction Orthogonale du Signal suivie d'une Analyse Discriminante par Moindre Carrés Partiels (OSC-PLS-DA). Les principales espèces moléculaires permettant de distinguer les différentes cultures ont ensuite fait l'objet d'une identification structurale par spectrométrie de masse en tandem. Des hypothèses métaboliques ont pu être posées.

Puis l'étude a été étendue à une plus grande variété de lipides, séparés par NP-HPLC. Pour cela une comparaison des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique et PhotoIonisation à Pression Atmosphérique) a été nécessaire afin de sélectionner la mieux adaptée pour un tel couplage. Les mécanismes d'action de la miltefosine et de l'amphotéricine B ont alors fait l'objet d'une étude lipidomique.

MOTS CLÉS : Phospholipides, Lipides, Spectrométrie de Masse, Lipidomique, Leishmanioses, ElectroSpray, Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique, Photoionisation à Pression Atmosphérique.

ADRESSE DU LABORATOIRE D'ACCUEIL :

EA 4041, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud 11

Faculté de Pharmacie, tour D2 3^{ème} étage

5 rue Jean-Baptiste Clément

92296 Châtenay-Malabry Cedex.