

Profilage et élucidation structurale de produits naturels par chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse tandem haute résolution

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 15 novembre 2017, par

Laurent Laboureur

Composition du Jury :

Myriam Taverna	
Professeure, Université Paris-Sud (– UMR 8812)	Présidente
Catherine Vonthron-Sénécheau	
Maître de conférences, Université de Strasbourg (– UMR 7200)	Rapporteur
Didier Thiébaud	
Directeur de Recherche, CNRS (– UMR 8231)	Rapporteur
Laurent Debrauwer	
Ingénieur de Recherche, INRA (– UMR 1331)	Examineur
Thierry Hennebelle	
Professeur, Université de Lille (– EA 4481)	Examineur
David Touboul	
Chargé de Recherche, CNRS (– UPR 2301).....	Directeur de thèse
Alain Brunelle	
Directeur de Recherche, CNRS (– UPR2301).....	Invité
Pierre Champy	
Professeur, Université Paris-Sud (– UMR 8076)	Invité

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le **Dr Catherine Vonthron-Sénéchaux** et le **Dr Didier Thiébaud** qui ont accepté d'examiner mon manuscrit de thèse en détails. Merci également au **Pr Myriam Taverna**, au **Pr Thierry Hennebelle** et au **Dr Laurent Debrauwer** d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse et avec qui j'ai pu avoir des échanges constructifs lors de la soutenance de thèse.

Je remercie également le **Dr Alain Brunelle** de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et de m'avoir fourni toutes les ressources nécessaires à mon travail. Je te remercie également pour les qualités humaines dont tu fais preuve envers tes étudiants et ta sympathie au quotidien.

Un grand merci au **Dr David Touboul** pour m'avoir fait confiance et pour avoir dirigé ces travaux. Merci pour ta patience inébranlable, ta disponibilité et tes qualités humaines. C'était un réel plaisir de travailler à tes côtés et d'être ton premier thésard officiel!

Je souhaite également remercier les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer : le **Pr Pierre Champy**, le **Dr Natacha Bonneau**, le **Dr Benoit Colsch**, le **Dr Sylvie Auxilien**, le **Dr Sakato Yoshizawa** et **Vincent Guérineau**.

Merci également aux stagiaires, **Stéphanie Boutet-Mercey**, **Charlos Rincon** et **Céline Chollet**, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et qui ont chacun apporté leur pierre à l'édifice.

Merci aux autres membres de l'équipe de spectrométrie de masse, **Vincent**, **Nicolas**, **Jean-Pierre**, **Tingting**, **Sebastian**, qui ont chacun contribué à la bonne ambiance permanente.

Merci aux sportifs de l'ICSN : **Pascal**, **Hristo**, **Philippe**, **Eugénie**, et à nouveau **Vincent** et **Nicolas**. J'ai découvert des parcours insoupçonnés à vélo ou à pieds auxquels je ne m'attendais pas du tout en arrivant en région parisienne. Nos sorties et autres cross/Paris-Versailles/semi-marathon, m'ont permis de m'aérer l'esprit et de me dépasser. J'espère que vous me trouverez un remplaçant pour apporter un peu de sang jeune dans ce groupe de vétérans. On reste en contact car je dois encore me mesurer à **Hristo** sur un half-Ironman, faire un concours de traction avec **Nicolas**, de gainage avec **Vincent** et quelques sorties vélo avec **Pascal**. À vos baskets!

Je remercie également les étudiants de l'institut, notamment celles et ceux avec qui j'ai tissé des liens d'amitié au fil de ces trois années : ceux qui m'ont souvent vu passer avec ma bouteille d'eau, ceux avec qui j'ai mangé tous les lundis, ceux avec qui j'ai ri et pleuré. Vous vous reconnaîtrez les copains!

J'ai également une pensée pour les copains du master, **Hugo**, **Marie**, **Margaux**, **Aline**, **Laurianne**, c'était super d'avoir de vos nouvelles et de vous revoir pour certains à nos thèses respectives. We keep in touch!

Merci aussi à **mes amis de longues dates**. Des amis de la fac pour la plupart. Les années nous ont éparpillés dans toute la France : Hirson, Aix, Drancy, Toulouse, Charmes, Paris, Metz, Cergy, Thionville et même Tucquegnieux (cherchez pas ce n'est pas sur la carte !). Mais nous avons la chance être un groupe soudé sur lequel j'ai pu m'appuyer quand j'en ai eu besoin. Vivement notre prochain week-end !

Enfin, je voudrais remercier **ma famille**, **mes parents**, **ma grand-mère**, **mes oncles et tantes**, dont j'ai dû m'éloigner pour des raisons professionnelles. Merci à **ma Mère** et à **mon Père** qui m'ont transmis

les valeurs du travail et qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes études. Je souhaite bon courage à **mon Frère** pour sa thèse déjà bien entamée.

Je finis par remercier celle que j'ai eu l'occasion d'entraîner et à qui j'ai transmis le virus du triathlon, avant d'avoir la fierté de la voir monter sur la première marche d'un podium. **Eugénie**, le vrai coach c'est toi ! Tu as su me remobiliser quand il le fallait. Cette thèse c'est un peu la tienne aussi, tu l'as relue, corrigée et critiquée. Tu partages ma vie depuis un petit moment maintenant, malgré la distance. J'espère que nos projets se concrétiseront rapidement. Merci d'être toi, merci d'être là !

PLAN

CHAPITRE I : Introduction générale

La chromatographie en phase supercritique, la spectrométrie de masse et leur couplage

Page 5

CHAPITRE II : Étude des acétogénines d'Annonaceae

A : Étude structurale par spectrométrie de masse tandem

B : Étude de la conformation des adduits d'acétogénines et des voies de fragmentation induites par la nature du cation métallique

Page 53

CHAPITRE III : Étude des modifications post-transcriptionnelles des ARN par SFC-HRMS

Mise au point d'une méthode de chromatographie en phase supercritique et application à deux échantillons biologiques

Page 135

CHAPITRE IV : Analyse d'extraits lipidiques par SFC-HRMS

Mise en place d'une méthode de séparation par classe lipidique

Page 181

CHAPITRE V : Conclusion générale

Page 225

Liste des abréviations

AA	Aminoanthracène	LPA	Lyso-phosphatidic Acid
ACN	Acétonitrile	LPC	Lyso-phosphatidylcholine
ADC	Analog-Digital Converter	LPE	Lyso-phosphatidyléthanolamine
ADN	Acide 2'-désoxyribonucléique	LPG	Lyso-phosphatidylglycérol
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	LPI	Lyso-phosphatididylinositol
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization	LPS	Lyso-phosphatidylsérine
ARN	Acide 2'-ribonucléique	MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
ARNm	ARN messenger	MCP	MicroChannel Plates
ARNr	ARN ribosomal	MeOH	Méthanol
ARNt	ARN de transfert	MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
BPC	Base Peak Chromatogram	MS	Mass Spectrometry
BPR	Back Pressure Regulator	MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
CB	Cérébroside	NPLC	Nomal Phase Liquid Chromatography
CE	Cholesterol Ester	PA	Phosphatidic Acid
Cer	Céramide	Pc	Pression Critique
CI	Chemical Ionization	PC	Phosphatidylcholine
CID	Collision-Induced Dissociation	PE	Phosphatidyléthanolamine
CRM	Charged residue model	PG	Phosphatidylglycérol
cSFC	Capillary column Supercritical Fluid Chromatography	PI	Phosphatididylinositol
DEA	Diéthylamine	PIC	Picolylamine
DG	Diglycéride	ppm	Partie Par Million
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol	PS	Phosphoidylsérine
dt	drift time	pSFC	Pack column Supercritical Fluid Chromatography
DTIMS	Drift Tube Ion Mobility Spectrometry	Q-TOF	Quadrupole-Time Of Flight
EI	Electronical Ionization	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
EIC	Extract Ion Chromatogram	RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	SFC	Supercritical Fluid Chromatography
ESI	ElectroSpray Ionization	SM	Sphingomyéline
ESI JS	ElectroSpray Ionization Jet Stream	SM	Sphingomyéline
FID	Flame Ionization Detector	Su	Sulfatide
FTICR	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance	Tc	Température Critique
GalCer	Galactocéramide	TDC	Time-to-Digital Converter
GC	Gas Chromatography	TG	Triglycéride
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	THF	TétraHydroFurane
IEM	Ion Evaporation Model	TLC	Thin Layer Chromatography
IMS	Ion Mobility Spectrometry	TOF	Time Of Flight
LacCer	Lactosylcéramide	Tr	Temps de rétention
LC	Liquid Chromatography	TWINS	Travel Wave Ion Mobility Spectrometry
LOD	Limit of Detection	UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
LOQ	Limit of Quantification	UV	Ultra-Violet

CHAPITRE I

Introduction générale

La chromatographie en phase supercritique, la spectrométrie de masse et leur couplage

Plan du chapitre

1	Introduction.....	11
2	La chromatographie en phase supercritique	12
2.1	La notion de fluide supercritique	12
2.2	L'intérêt des fluides supercritiques en chromatographie	13
2.3	Les propriétés du dioxyde de carbone	14
2.4	Historique de la SFC.....	16
2.4.1	Utilisation de colonnes capillaires.....	16
2.4.2	Utilisation de colonnes remplies	16
2.5	La SFC analytique de nos jours	17
2.5.1	L'injection	17
2.5.2	La phase mobile.....	18
2.5.3	La phase stationnaire	22
2.5.4	La régulation de la température en SFC.....	25
2.5.5	Régulation de la contre-pression	27
2.5.6	La détection.....	27
3	La spectrométrie de masse	28
3.1	Principe général.....	28
3.2	Les sources d'ionisation	30
3.2.1	Les sources à pression réduite	31
3.2.2	Les sources à pression atmosphérique	31
3.3	Les analyseurs en spectrométrie de masse.....	35
3.3.1	L'analyseur quadripolaire.....	35
3.3.2	L'analyseur à temps de vol.....	36
3.3.3	L'analyseur Orbitrap.....	38
3.3.4	L'analyseur hybride Q-TOF	39
3.3.5	La cellule de mobilité ionique.....	40
3.4	Les détecteurs	42
3.4.1	Le multiplicateur d'électron à dynodes discrètes	42
3.4.2	Les galettes de microcanaux	43
3.5	Le traitement du signal.....	44
3.5.1	Mode comptage	44
3.5.2	Mode analogique.....	44
4	Le couplage de la SFC à la spectrométrie de masse	45
4.1	Les couplages avec des sources à pression réduite	45

4.2	Les couplages avec des sources à pression atmosphériques.....	46
4.2.1	Couplage <i>post</i> passage dans le régulateur de contre-pression.....	46
4.2.2	Couplage avec split en amont du régulateur de contre-pression.....	47
4.3	Le système présent au laboratoire.....	47
5	Références.....	49

Table des Figures

Figure 1 : Diagramme de phase (T,P) du dioxyde de carbone.....	13
Figure 2 : Influence de la composition de la phase mobile sur le coefficient de diffusion de la malvidin-3,5-diglucoside.	14
Figure 3 : Influence de la pression sur la masse volumique du dioxyde de carbone supercritique.....	14
Figure 4 : Influence du volume d'injection et de la nature du solvant d'injection sur la géométrie du pic de l'ibuprofène.....	18
Figure 5 : Type de phases mobiles à utiliser en fonction de la polarité des analytes ciblés.	19
Figure 6 : Effet de la concentration en co-solvant sur la force d'éluion de la phase mobile.	20
Figure 7 : Effet d'un additif sur le chromatogramme de composés polaires.	20
Figure 8 : Comparaison des courbes de van Deemter obtenues pour le butylparabène en UHPLC et en SFC.	21
Figure 9 : Phases stationnaires classiquement rencontrées dans la littérature et/ou à disposition au laboratoire.....	22
Figure 10 : Diagramme araignée représentant la classification proposée par West <i>et al.</i>	24
Figure 11 : Conservation de l'efficacité en fonction de la variance extra-colonne des systèmes.	25
Figure 12 : Effet de la température sur la sélectivité de 2 sulfonamides.....	26
Figure 13 : Différences de bruit généré dans le signal UV pour une même séparation à deux températures de détection (31 et 41°C).	28
Figure 14 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse.	29
Figure 15 : Représentation schématique de la spectrométrie de masse tandem dans l'espace.....	29
Figure 16 : Représentation schématique de la spectrométrie de masse tandem dans le temps.....	30
Figure 17 : Domaine d'utilisation des sources à pression atmosphérique.....	32
Figure 18 : Illustration du fonctionnement de la source <i>electrospray</i>	32
Figure 19 : Représentation schématique des modèles proposés par Dole et Iribarne.....	33
Figure 20 : Représentation schématique de la source APCI.	34
Figure 21 : Principe de fonctionnement de l'analyseur quadripolaire.	35
Figure 22 : Type de trajectoires possibles pour les ions dans l'analyseur quadripolaire.....	36
Figure 23 : Principe du miroir électrostatique.	38
Figure 24 : Exemple de l'interférogramme obtenu (en noir) pour un signal correspondant à 3 <i>m/z</i> (bleu, rouge et vert).	39
Figure 25 : Courant image généré par l'oscillation des ions d'un même rapport <i>m/z</i> . Source : Cours de Guillaume Van Der Rest.....	39
Figure 26 : Présentation d'un Q-TOF.	40
Figure 27 : Principe de fonctionnement de la cellule de mobilité ionique.	40
Figure 28 : Représentation du Synapt G2 de la société Waters.....	42
Figure 29 : Principe de fonctionnement du multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes.	42
Figure 30 : Empilement des MCP dans l'objectif d'augmenter le gain en sensibilité.	44
Figure 31 : Interface SFC-MS à introduction directe.	45
Figure 32 : Interface SFC-MS obtenue à partir d'un GC-MS.....	45
Figure 33 : Couplage SFC-MS avec une détente assurée par le BPR.....	46
Figure 34 : Couplage SFC-MS utilisant un splitter en amont du BPR.	47
Figure 35 : Représentation schématique du système présent au laboratoire.	48
Figure 36 : Représentation schématique du QTOF 6540.	48

1 Introduction

La chromatographie est une méthode séparative très répandue visant à séparer les constituants d'un mélange afin de les analyser individuellement. Bien qu'elle se décline sous plusieurs formes, le principe général est toujours le même. Il dépend des interactions mises en jeu entre les analytes, une phase stationnaire (qui a tendance à retenir les analytes) et une phase mobile (qui a tendance à les entraîner). Ainsi, les analytes ayant une forte affinité avec la phase stationnaire seront peu entraînés par la phase mobile et inversement.

Les techniques chromatographiques sont aujourd'hui indispensables au corps scientifique (synthèse organiques, phytochimie, pétrochimie, etc.). Ces notions essentielles sont d'ailleurs abordées dès le lycée avec l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC^1) où les composés d'un mélange sont d'une part retenus par des particules de silice (conditionnées sous la forme de plaque) et d'autre part entraînés par la phase mobile (solvant organique qui migre par capillarité). Simple et efficace, la CCM est un outil quotidiennement utilisé au sein des laboratoires de synthèse organique pour assurer le suivi des réactions organiques.

Bien que très répandue, la CCM reste une méthode le plus souvent manuelle et qui ne présente pas un pouvoir de séparation très élevé. C'est pourquoi d'autres outils sont disponibles. C'est notamment le cas de la chromatographie sur colonne qui nous intéresse lors de ce travail. La phase stationnaire y est conditionnée dans un tube appelé colonne et est parcourue par un flux continu de phase mobile. La nature de la phase mobile donne son nom à la technique. Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC^2) utilise une phase mobile gazeuse, appelée gaz vecteur, et la chromatographie en phase liquide (CPL ou LC^3) utilise une phase mobile liquide. C'est de nos jours la technique la plus répandue pour la séparation de composés non volatils. En fonction des colonnes chromatographiques et des pressions mises en jeu, deux terminologies existent : la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC⁴) et la chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance (UHPLC⁵). Quel que soit le mode utilisé (phase normale, phase inverse, etc.), la LC nécessite l'emploi de solvants souvent toxiques et polluants. Ainsi, l'hexane, le dichlorométhane et l'acétonitrile sont très souvent utilisés dans des proportions non négligeables.

L'essentiel de ce travail de thèse porte sur une technique qui utilise un fluide ayant des propriétés intermédiaires à celles d'un gaz et celles d'un liquide : la chromatographie en phase supercritique (CPS ou SFC^6). Cette technique paraît bien plus adaptée dans un contexte de diminution de l'empreinte environnementale de l'industrie chimique. En effet, cette technique utilise une phase mobile principalement constituée de dioxyde de carbone (CO_2). Bien que ce gaz soit connu comme étant l'un des principaux responsables du réchauffement climatique, son utilisation en chromatographie est très positive d'un point de vue environnemental pour plusieurs raisons :

- Il remplace des solvants toxiques pour l'Homme et l'environnement ;
- Il provient de rejet de l'industrie : c'est un moyen de valoriser ces déchets industriels ;

¹ Thin Layer Chromatography

² Gas Chromatography

³ Liquid Chromatography

⁴ High Performance Liquid Chromatography

⁵ Ultra-High Performance Liquid Chromatography

⁶ Supercritical Fluid Chromatography

- Les quantités mises en jeu sont infimes en comparaison de l'émission industrielle ou automobile⁷.

Outre l'intérêt écologique, la SFC présente également un intérêt économique puisqu'une bouteille de CO₂ (34 kg) coûte environ 40 €. Elle permet des analyses au laboratoire durant de 3 à 6 mois en fonction de la sollicitation de l'instrument soit environ 15 €/mois. Cette valeur est à comparer à la consommation d'un système HPLC pour laquelle un litre d'acétonitrile (30 €) ne permet que quelques jours de fonctionnement.

La chromatographie permet uniquement la séparation des composés d'un mélange. En outre, elle ne permet pas leur détection et encore moins leur identification. Le détecteur le moins onéreux disponible aussi bien en LC qu'en SFC est le détecteur UV/Visible. Ce type de détecteur permet la détection des composés porteurs de chromophores et donc l'attribution d'un temps de rétention correspondant à une méthode chromatographique donnée. Il est particulièrement adapté pour la détection et la quantification de composés connus dans des mélanges simples. Cependant, la pauvreté des informations structurales fournies d'une part, et l'absolue nécessité de la présence d'un chromophore d'autre part, rendent ces détecteurs inappropriés pour l'étude de composés inconnus ou de mélanges complexes.

Pour ce type d'études, la spectrométrie de masse (SM ou MS⁸) est l'outil le plus adapté. En effet, elle est capable de détecter les analytes mais également de fournir des informations sur leur formule brute grâce à la mesure de masse exacte et leur structure *via* des expériences de spectrométrie de masse tandem. Cependant, une condition *sine qua non* à l'obtention de ces informations est l'ionisation des composés à l'entrée du spectromètre de masse.

Ce chapitre présentera d'une part la SFC et d'autre part la spectrométrie de masse en insistant particulièrement sur les points nécessaires à la bonne compréhension des chapitres suivants.

2 La chromatographie en phase supercritique

De nos jours, la chromatographie en phase supercritique est aussi bien utilisée à l'échelle analytique que préparative, que ce soit pour des séparations chirales ou non. Bien qu'elle soit très répandue dans le monde de la séparation chirale, seules les séparations achirales à l'échelle analytique seront traitées dans ce manuscrit.

2.1 La notion de fluide supercritique

La thermodynamique prévoit trois états possibles de la matière : solide, liquide ou vapeur. À volume constant, l'état dans lequel se trouve le corps pur dépend de sa température (T) et de sa pression (P). La transition d'un état à un autre est matérialisée par une courbe appelée courbe d'équilibre sur le diagramme de phase (P, T). Ainsi, 3 courbes d'équilibre sont présentes sur ce type de diagramme: l'équilibre solide-gaz, l'équilibre solide-liquide et l'équilibre liquide-gaz (Figure 1). La traversée d'une de ces courbes correspond à un changement brutal des propriétés physiques (ex : la masse volumique). La courbe d'équilibre liquide-gaz présente une particularité : c'est la seule courbe à être finie en un point, appelé point critique. Les coordonnées du point critique sont la température critique (T_c) et la pression critique (P_c). Par définition, T_c est la température maximale pour laquelle un gaz peut être converti en liquide par une seule augmentation de la pression (à V et T constants) et P_c est la pression maximale pour laquelle le liquide peut être converti en gaz par la seule

⁷ Lors de ces travaux nous avons utilisé environ 9 bouteilles de CO₂ soit 306 kg, c'est-à-dire 300 g/jour, ce qui correspond à l'émission moyenne d'une voiture parcourant 3 km.

⁸ Mass Spectrometry

augmentation de la température (à P et V constants). Lorsque T et P sont toutes deux supérieures aux coordonnées du point critique, le corps pur se trouve dans un état intermédiaire ou pseudo-état de la matière appelé fluide supercritique.

Le terme d'état subcritique est utilisé lorsque seulement une de deux grandeurs (T ou P) est supérieure au point critique.

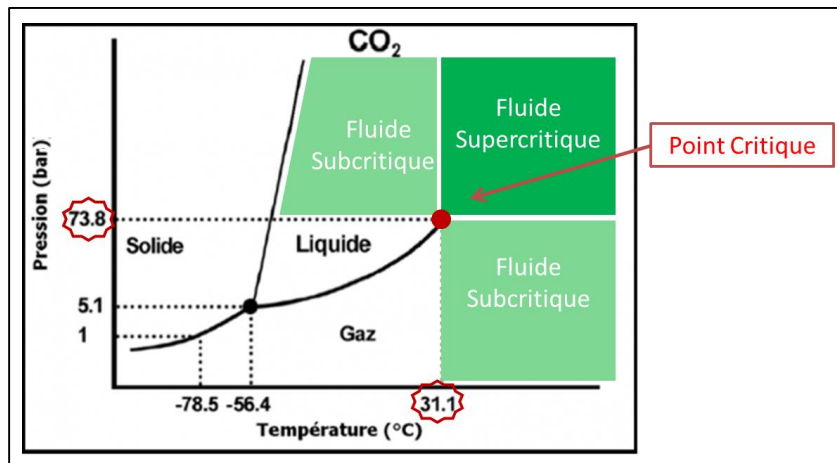


Figure 1 : Diagramme de phase (T,P) du dioxyde de carbone.

2.2 L'intérêt des fluides supercritiques en chromatographie

L'absence de courbe d'équilibre dans la zone supercritique se traduit par l'absence de changement brutal des propriétés physiques du corps pur dans cette zone. Le passage d'un liquide à un gaz se fait alors de manière continue et le fluide possède des propriétés intermédiaires à celles d'un gaz et à celles d'un liquide.

La viscosité, le coefficient de diffusion et la masse volumique sont trois propriétés importantes lorsqu'un fluide est utilisé comme phase mobile en chromatographie. Les ordres de grandeur de ces propriétés dépendent de l'état du fluide considéré (Tableau 1).

Fluide considéré	Masse volumique (g.mL ⁻¹)	Viscosité (Pa.s)	Coefficient de diffusion (m ² .s ⁻¹)
Vapeur	6.10 ⁻² à 20.10 ⁻²	1 à 5.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁵ à 4.10 ⁻⁵
Supercritique	0,4 à 0,9	3.10 ⁻⁵ à 9.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁸
Liquide	0,6 à 1,6	0,2.10 ⁻³ à 3,0.10 ⁻³	0,2.10 ⁻⁹ à 3,0.10 ⁻⁹

Tableau 1 : Comparaison des propriétés physiques des fluides à l'état liquide, gazeux ou supercritique [Thiébaud D. 2016].

- La viscosité d'un fluide supercritique est de 5 à 20 fois inférieure à celle d'un liquide. De ce fait, pour une colonne identique, les pertes de charges sont significativement inférieures en SFC par rapport à celles obtenues en LC. Cette propriété offre donc la possibilité technique d'atteindre des débits de phase mobile bien plus élevés en SFC par rapport à l'HPLC ou l'UHPLC.
- Le coefficient de diffusion régit le processus de transfert de masse entre la phase stationnaire et la phase mobile. Plus il est élevé et plus les échanges peuvent se faire rapidement. Il devient donc possible d'augmenter le débit de la phase mobile sans perdre en efficacité de séparation. À titre d'exemple, le coefficient de diffusion de la malvidin-3,5-diglycoside est multiplié par 5 lorsque que l'on passe du MeOH pur à un mélange CO₂/MeOH à 200 bar (Figure 2).

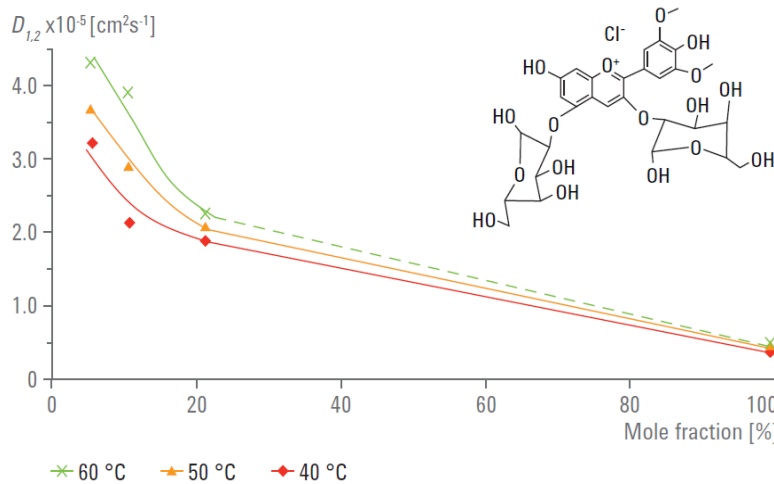


Figure 2 : Influence de la composition de la phase mobile sur le coefficient de diffusion de la malvidin-3,5-diglucoside. Les données pour les mélanges CO_2/MeOH sont obtenues à 200 bar. Celles pour le MeOH pur le sont à pression atmosphérique. (Agilent)

- Contrairement à la viscosité, la masse volumique d'un fluide supercritique est proche de la valeur obtenue pour un liquide. Il en résulte un bon pouvoir de solvation des fluides supercritiques. De plus, la masse volumique est directement reliée à la notion de compressibilité (plus un fluide est comprimé, plus sa masse volumique est importante). Au voisinage du point critique, la compressibilité d'un fluide est très élevée (de l'ordre de 500 fois celle d'un liquide). Il en découle qu'un faible changement de pression provoque une importante variation de masse volumique (Figure 3), et donc des changements sur le pouvoir de solvation, ce qui n'est pas le cas en LC où la pression a peu d'influence sur le pouvoir de solvation (puisque le liquide est très faiblement compressible).

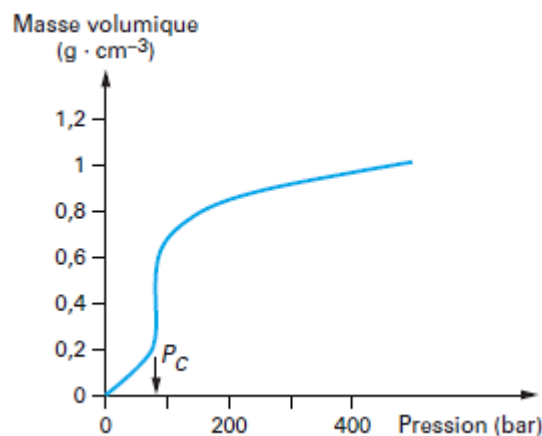


Figure 3 : Influence de la pression sur la masse volumique du dioxyde de carbone supercritique à 40 °C [Thiébaud D. 2016]

Ces trois propriétés illustrent l'intérêt que peuvent avoir les fluides supercritiques pour les sciences séparatives.

2.3 Les propriétés du dioxyde de carbone

De nos jours, le dioxyde de carbone est de loin le fluide supercritique le plus utilisé comme phase mobile en SFC. C'est d'ailleurs le seul fluide pour lequel des systèmes commerciaux existent aujourd'hui. Différents composés pourraient être utilisés pour, par exemple, obtenir des polarités différentes, mais tous possèdent au moins une propriété limitante telles que des valeurs de P_c et T_c .

trop élevées ou une dangerosité d'utilisation. Les coordonnées du point critique de plusieurs composés sont listées dans le Tableau 2.

Composé	Pression critique (bar)	Température critique (°C)	Contrainte d'utilisation
Dioxyde de carbone	74	31	Faiblement polaire
Protoxyde d'azote	71	37	Oxydant
Ammoniac	110	133	Corrosif
Éthane	48	32	Inflammable
Propane	42	97	Inflammable
Butane	38	152	Inflammable
n-pentane	33	197	Inflammable
Hexafluorure de soufre	37	46	Puissant gaz à effet de serre ⁹
Méthanol	80	240	T _c très élevée
Éthanol	61	241	T _c très élevée
Isopropanol	54	236	T _c très élevée
Eau	215	374	P _c et T _c très élevées

Tableau 2 : Coordonnées du point critique pour différents composés [Turner C. 2001;Thiébaud D. 2016]

Les composés de la famille des alcanes ont des T_c et P_c facilement accessibles, néanmoins ils sont d'une part tous inflammables et explosifs (limite inférieure d'explosivité du butane : 1,8 %) et ne présentent aucun caractère polaire d'autre part. Ces deux principales limitations expliquent la très rare utilisation des alcanes en SFC.

D'autres composés, tels que l'ammoniac, le protoxyde d'azote et l'hexafluorure de soufre, présentent également des risques pour l'utilisateur et/ou l'environnement. Enfin, certains composés comme les alcools ou l'eau pourraient être très intéressants en SFC compte tenu de leur polarité. Cependant, la principale limitation est la forte valeur de T_c. De telles températures nécessiteraient l'utilisation d'équipements plus performants et par conséquent plus coûteux. De plus, ces hautes valeurs ne sont pas compatibles avec les phases stationnaires classiques. Pour finir, l'étude de composés thermolabiles serait également compromise.

La découverte du CO₂ supercritique est attribuée au Baron Charles Cagniard de la Tour au début du XIXe siècle. La détermination des valeurs de T_c et P_c a été réalisée un demi-siècle plus tard [Andrews T. 1869]. Ces deux valeurs (31°C et 74 bar) sont tout à fait compatibles avec des pompes et un four à colonne classiquement utilisés en LC. Il présente également l'avantage de ne pas être toxique pour l'Homme à faible concentration, d'être inerte chimiquement avec la majorité des composés chimiques, d'être non-inflammable, inodore et peu coûteux. Il est également transparent aux UV en-dessous de 190 nm ce qui permet l'utilisation de détecteur UV moyennant l'emploi de cellule haute-pression. La seule limitation pourrait être son faible pouvoir de solvatation, comparable à l'hexane [Novakova L. 2014]. Néanmoins, l'effet de cette limitation est atténué grâce à la miscibilité du CO₂ supercritique avec la majorité des solvants organiques (alcools, acétonitrile). Il est donc possible de modifier le pouvoir de solvatation en constituant des mélanges binaires CO₂/solvant (voir section 2.5.2).

⁹ 1 kg de SF₆ a le même impact que 22800 kg de CO₂ sur l'effet de serre.

2.4 Historique de la SFC

La première séparation chromatographique utilisant un fluide supercritique en tant que phase mobile est attribuée à Klesper *et al.* en 1962 [Klesper E. 1962]. La phase mobile était alors constituée d'un alcane halogéné et la phase stationnaire de polyéthylène glycol.

À ses débuts, la SFC a été considérée comme étant une extension de la chromatographie en phase gazeuse (GC¹⁰). Les auteurs la décrivent comme étant une chromatographie utilisant une phase gazeuse dense qui permet l'étude de composés thermolabiles. L'utilisation d'un restricteur¹¹ permettait d'obtenir les pressions nécessaires dans les colonnes chromatographiques. Dès lors, deux types de colonnes chromatographiques ont coexisté jusqu'à la fin des années 90 : les colonnes capillaires et les colonnes remplies.

2.4.1 Utilisation de colonnes capillaires

La *capillary SFC* (cSFC¹²) utilisait des colonnes capillaires ou « open tubular » dérivant directement des colonnes de GC [Peaden P. A. 1982, 1983]. Elles étaient constituées d'un capillaire de silice fondue de 50 µm de diamètre interne dont la paroi était recouverte de phase stationnaire. La pression était maintenue dans le système à l'aide d'un restricteur à la sortie de la colonne chromatographique. L'instrumentation rappelait celle utilisée en GC, notamment au travers du four à colonnes et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le FID était tout à fait adapté lors de l'utilisation de CO₂ pur puisqu'il ne fournit pas de signal FID. Cependant, le FID est incompatible avec des phases mobiles constituées d'un mélange binaire (CO₂/modificateur polaire) puisque le modificateur polaire fournit un fort signal FID. Jusqu'au début des années 90, la cSFC était la technique SFC la plus répandue. L'utilisation de CO₂ à de faibles débits (quelques mL/min) permettait également le couplage à la spectrométrie de masse [Kallio H. 1989]. La cSFC présentait cependant des temps d'analyse élevés et de faibles capacités de colonne [Morrissay M.A. .1991]. Ce type de colonne est aujourd'hui très peu répandu en SFC puisque les principaux systèmes commerciaux utilisent tous des colonnes remplies.

2.4.2 Utilisation de colonnes remplies

La *packed SFC* consiste en l'utilisation de colonnes remplies et traduit le fait que la SFC peut également être considérée comme étant l'extension de la chromatographie en phase liquide. En 1983, Hewlett-Packard lance le premier système SFC commercial. Ce système s'inspire directement de système HPLC. L'utilisation de colonnes remplies permet d'augmenter les surfaces d'interaction avec la phase stationnaire et de diminuer les volumes morts [Taylor L.T. 2009]. Tout comme en LC, la phase mobile peut être constituée d'un mélange binaire : un co-solvant (ou modificateur polaire) est ajouté au CO₂ de manière à moduler le pouvoir éluant de la phase mobile [Crowther J.B. 1985 ; Schwartz H.E. 1987]. Cette stratégie permet l'étude de composés plus polaires et élargit le champ d'application de la SFC, notamment vers celui des composés pharmaceutiques [Pinkston J.D. 2006].

Compte tenu de la faible viscosité des fluides supercritiques, les pertes de charge dans le système sont moins élevées qu'en LC. Il est donc techniquement possible d'augmenter le débit de la phase mobile sans risque d'atteindre les limites instrumentales. De plus, considérant la grande valeur de coefficient de diffusion, cette augmentation de débit n'aura aucune incidence sur la qualité des

¹⁰ Gas Chromatography

¹¹ Le restricteur permet de générer des hautes pressions à l'intérieur des colonnes chromatographiques tout en appliquant passer un flux de phase mobile. Concrètement, il s'agit soit d'un long tube de petit diamètre (restricteur linéaire), soit d'un orifice de faible diamètre (restricteur ponctuel)

¹² Capillary SFC

séparations observées. Ces propriétés conduisent à des débits souvent 3 fois plus élevés en SFC par rapport à la LC, mais dans le même temps, une consommation moindre de solvant puisque la majeure partie de la phase mobile est constituée de CO₂.

2.5 La SFC analytique de nos jours

Actuellement, la gamme d'appareillages commerciaux est assez restreinte. En effet, la quasi-totalité des auteurs de la littérature utilisent le système UPC² de la société Waters ou le système Infinity 1260 SFC de la société Agilent Technologies. Il est à noter que d'autres industriels commercialisent des systèmes de SFC analytique (Shimadzu, Pic Solution ou encore Jasco). Ceux-ci semblent encore peu répandus dans le monde académique à la vue de leur faible présence dans la littérature. L'ensemble de ces systèmes utilise des colonnes chromatographiques de géométries similaires à la chromatographie liquide. Il s'agit donc de pSFC bien que le « p » ne soit aujourd'hui plus utilisé, tant la cSFC est rare. Ces systèmes sont basés sur les connaissances et l'expérience des fabricants de chromatographie liquide à très haute performance (UHPLC) puisqu'ils fonctionnent à des pressions comparables à la SFC. La commercialisation de ces systèmes fiables et robustes a permis à la SFC de trouver sa place aux côtés de la LC et de la GC, dans le monde de la chimie analytique.

Cette section vise à décrire le fonctionnement des systèmes SFC commerciaux actuels.

2.5.1 L'injection

Le système de la société Agilent Technologie présent au laboratoire utilise une vanne d'injection identique à celles utilisées en UHPLC. La boucle d'injection peut être facilement changée de manière à pouvoir faire varier le volume d'injection.

Le système Waters utilise quant à lui une double vanne pour l'injection. Le but est de pressuriser le contenu de la boucle d'injection avec du CO₂ comprimé avant l'injection afin de se rapprocher au maximum de la composition de la phase mobile et d'éviter les déformations de pic liées à la nature du solvant d'injection. De plus, Waters et Agilent Technologies semblent s'accorder sur les meilleurs résultats obtenus, en termes de reproductibilité, pour ce type d'injecteurs puisque la nouvelle version du système d'Agilent Technologies utilise elle aussi un système de pressurisation avant injection (1260 Infinity II SFC Multisampler).

Au cours de nos travaux, une boucle d'injection de 1,2 µL a été utilisée pour les colonnes de 2,1 mm de diamètre interne. La littérature montre que la nature du solvant utilisé n'a pas une grande influence sur la géométrie des pics obtenus pour des volumes d'injection inférieurs à 2 µL (Figure 4) [Desfontaine V. 2017 ; Novakova L. 2014 ; Fairchild J.N. 2013]. Cependant, l'ensemble des études publiées utilise le système Waters incluant une pressurisation avant injection. Il sera donc nécessaire de vérifier la transposition de ces résultats à notre système en cas de nécessité.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons pu visualiser qu'il était effectivement possible d'injecter des petits volumes d'eau sans aucun impact négatif sur les résultats obtenus. Cette constatation est particulièrement importante pour l'étude d'échantillons biologiques.

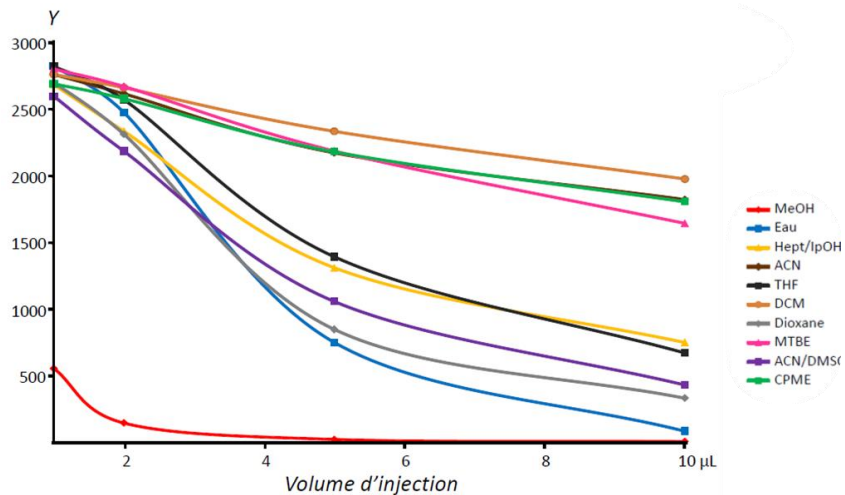


Figure 4 : Influence du volume d'injection et de la nature du solvant d'injection sur la géométrie du pic de l'ibuprofène (100 µg/mL). $Y = (\text{largeur à mi-hauteur} \times \text{largeur à 10 \% de la hauteur})^{-1}$. Conditions SFC : BEH 100 x 3 mm, 2-40 % MeOH/H₂O 98/2 + hydroxyde d'ammonium, 1,5 mL/min, 40°C, 150 bar. [Desfontaine V. 2017]

Conditions : Colonne BEH 100 x 3,0 mm, 2-40% MeOH/H₂O (98/2, v/v) + 0,1% hydroxyde d'ammonium en 6 min, 1,5 mL/min, 40°C, 150 bar.

2.5.2 La phase mobile

Les applications utilisant du CO₂ pur comme phase mobile sont aujourd'hui relativement rares compte tenu de la gamme restreinte de composés accessibles en terme de polarité. L'utilisation d'un autre solvant en mélange avec le CO₂ rend accessible l'étude de composés moyennement polaires. La SFC est donc considérée comme une méthode de phase normale puisque la polarité de la phase mobile augmente au cours du temps.

L'ajout de sel dans les co-solvants permet quant à lui l'étude de composés polaires voir ionisables. Berger propose une représentation du type de phases mobiles à utiliser en fonction de la polarité des analytes ciblés. Il compare également ces configurations de phase mobile aux modes de la chromatographie en phase liquide. Il montre ainsi que la SFC est une technique versatile lorsqu'elle est utilisée au maximum de ces capacités (Figure 5).

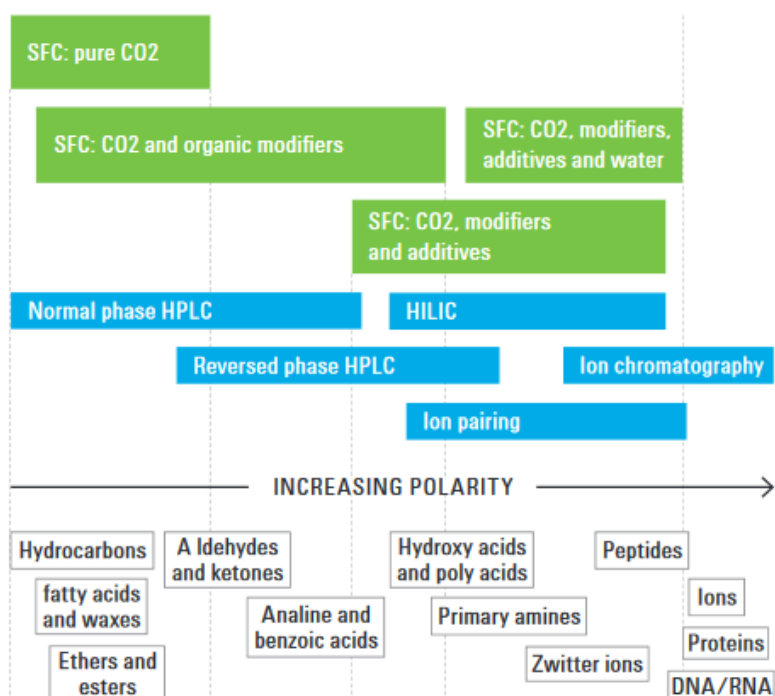


Figure 5 : Type de phases mobiles à utiliser en fonction de la polarité des analytes ciblés [Berger T.A. 2015].

2.5.2.1 Les modificateurs polaires

Les systèmes de chromatographie en phase supercritique actuels utilisent, à l'instar des systèmes de chromatographie en phase liquide, une pompe binaire pour créer le flux de phase mobile. Cette pompe permet le mélange de deux voies de solvants différentes dans une chambre de mélange. L'une des voies est constituée du CO₂ comprimé et l'autre d'un solvant organique qui a pour rôle de moduler la force d'éluion de la phase mobile. Ce solvant est appelé modificateur polaire ou co-solvant.

Afin d'être utilisé en tant que modificateur polaire, le solvant doit notamment être miscible avec le CO₂ comprimé et être disponible en qualité HPLC.

Dans la pratique, le co-solvant le plus rencontré est le méthanol puisqu'il permet de moduler fortement la force d'éluion, qu'il est disponible en qualité analytique, qu'il est peu coûteux et relativement peu toxique¹³. D'autres solvants tels que l'éthanol, l'isopropanol et moins fréquemment l'acétonitrile sont également utilisés.

La polarité (P') des modificateurs polaires a été évaluée par Snyder *et al.* [Snyder L.R. 1974, 1978]. Les valeurs obtenues pour les 4 modificateurs les plus utilisés sont reportées dans le Tableau 3. En fonction du co-solvant choisi, la force d'éluion et la sélectivité seront donc différentes.

Solvant	Polarité (P')
Méthanol	6,6
Acétonitrile	6,2
Éthanol	5,2
Isopropanol	3,9

Tableau 3 : Polarité des principaux co-solvants utilisés en SFC [Snyder L.R. 1974].

Il est admis que lorsqu'un co-solvant est utilisé dans la phase mobile, les analytes se retrouvent au sein d'un agrégat constitué par des molécules de co-solvant. Cette théorie est en accord avec

¹³ En comparaison des solvants habituellement utilisés en NPLC.

l'augmentation du coefficient de diffusion des analytes lorsqu'un co-solvant est ajouté (Figure 2). En effet, la formation d'agrégats entraînerait une augmentation de la section efficace de collision et donc une diminution de la diffusivité [Smith S.A. 1990].

La formation de ces agrégats permet aussi d'expliquer qu'un faible ajout de co-solvant permet un fort déplacement de la polarité de la phase mobile (vers la polarité du co-solvant). Deye *et al.* ont quantifié les changements de polarité à l'aide d'une sonde solvatochromique [Deye J.F. 1990]. La Figure 6 reprend leurs résultats et intègre également les résultats de Snyder *et al.* afin de faire correspondre une valeur de polarité à chaque valeur d'énergie¹⁴ obtenue par Deye [Snyder L.R. 1974]. Les résultats mettent en évidence la non linéarité de la concentration du co-solvant avec la polarité. La polarité médiane est atteinte à seulement 10 % de MeOH et non à 50 % comme ce pourrait être le cas sans formation d'agrégats de solvant autour des analytes polaires.

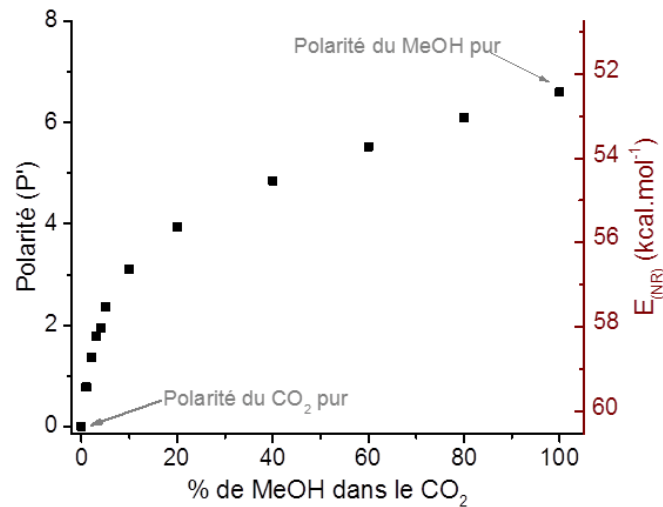


Figure 6 : Effet de la concentration en co-solvant sur la force d'éluion de la phase mobile [Deye J.F. 1990 ; Snyder L.R. 1974]

2.5.2.2 Les additifs

Lorsque les composés étudiés sont polaires, la phase mobile constituée d'un mélange binaire ne permet plus l'obtention de pics chromatographiques satisfaisants. Les pics obtenus sont alors extrêmement déformés. La Figure 7 présente un exemple tiré du chapitre III de ce manuscrit. L'ajout d'acétate d'ammonium à une concentration de 15 mmol/L dans le co-solvant a permis d'améliorer significativement la géométrie de pic.

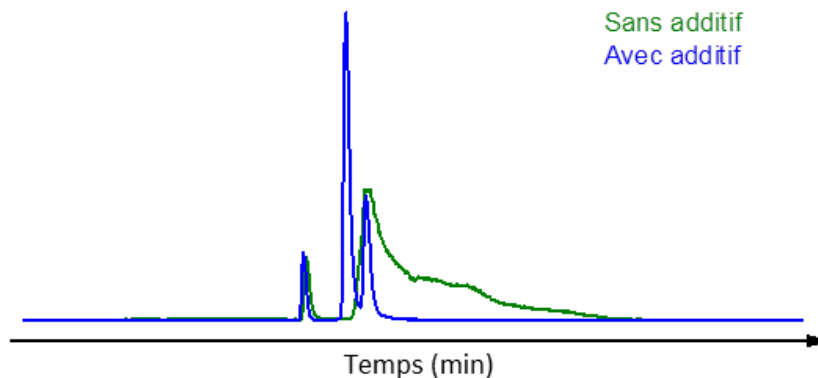


Figure 7 : Effet d'un additif sur le chromatogramme de composés polaires. Mélange de 3 méthylcytidines. 5 à 20 % MeOH + 5 mM AcONH₄, colonne 2-PIC 150 x 2,1 mm, dp 1,7 μm, 150 bar, 30°C.

¹⁴ Valeur de l'énergie de transition de la bande solvatochromique de la sonde : $E(\text{kcal/mol}) = 28591.55/\lambda(\text{nm})$

Les additifs les plus souvent rencontrés sont les acides acétique et formique, l'acétate ou le formiate d'ammonium et l'eau.

Notons ici que l'eau est bien considérée comme un additif et non comme un co-solvant. En effet, l'eau et le CO₂ n'étant pas miscibles, seuls quelques pourcents (1 à 5 %) d'eau peuvent être ajoutés dans le co-solvant [West C. 2013].

Les additifs peuvent agir de différentes manières. Ils peuvent par exemple éviter l'ionisation (en modifiant le pH), se fixer sur des sites actifs de la phase stationnaire ou former des paires d'ions avec les analytes chargés [Berger T.A. 2015]. Ces additifs peuvent parfois modifier de façon irrémédiable la phase stationnaire et donc modifier les caractéristiques d'une colonne [Berger T.A. 1990 ; 1991].

Pour finir, lors d'un couplage à la spectrométrie de masse, l'additif doit être choisi avec soin de manière à ne pas interférer avec l'ionisation des analytes ou polluer les analyseurs. Les amines (isopropylamine, diméthylamine, triéthylamine), les sels d'amines quaternaires et l'acide trifluoroacétique sont à éviter absolument.

2.5.2.3 Le mode isocratique ou mode gradient

Le choix du co-solvant (et de l'additif) est le paramètre chromatographique qui va avoir le plus d'effet sur la séparation. De la même manière qu'en chromatographie en phase liquide, il est possible de moduler (mode gradient d'élution) ou non (mode isocratique) les quantités de co-solvant ajoutées dans le CO₂ au cours du temps. Le mode gradient permet alors d'éluer des composés aux polarités variables en un temps d'analyse convenable.

2.5.2.4 Débit de la phase mobile

Contrairement à la LC, le débit de la phase mobile n'a pas un grand impact sur l'efficacité en SFC. En effet, là où en LC les courbes de van Deemter possèdent un minimum pour une vitesse linéaire moyenne, les courbes obtenues en SFC voient leur efficacité se stabiliser après une valeur limite (4 mm/s dans la Figure 8). Il en résulte qu'une fois cette valeur dépassée, le débit n'aura qu'une faible influence sur l'efficacité. Il aura cependant une influence sur les temps de rétention et les pertes de charges (donc la sur densité pour les phases mobiles pauvres en co-solvant).

Expérimentalement, la recherche du débit optimum est réalisée dans les dernières étapes du développement de méthode dans l'espoir d'influencer légèrement une sélectivité trop faible.

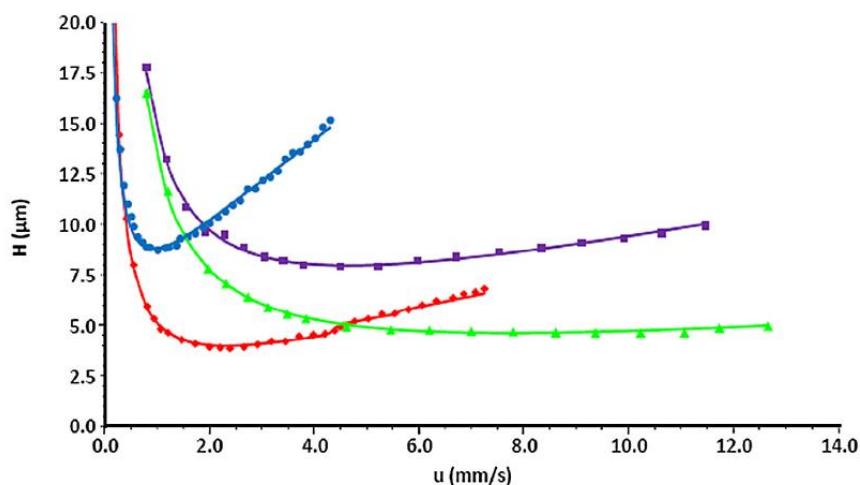


Figure 8 : Comparaison des courbes de van Deemter obtenues pour le butylparabène en UHPLC et en SFC. En bleu : UHPLC dp, 3,5 μm. En rouge : UHPLC, dp 1,7 μm. En violet : SFC, dp 3,5 μm. En vert : SFC, dp 1,7 μm. [Grand-Guillaume Perrenoud A. 2012].

2.5.3 La phase stationnaire

À l'heure actuelle, la quasi-totalité des utilisateurs de systèmes commerciaux de SFC analytique utilise des colonnes possédant des phases stationnaires à base de particules de silice totalement poreuses. L'utilisation de colonnes à base de zirconium, de carbone graphite poreux ou les colonnes monolithiques est plus rarement rapportée, de même que l'utilisation de colonne à noyaux non poreux.

Toutes les colonnes chromatographiques (*i.e.* toutes les phases stationnaires et toutes les géométries de colonne) utilisées en LC le sont également en SFC. De nouvelles phases stationnaires ont également été développées spécialement pour la SFC.

2.5.3.1 Chimie de phase stationnaire

Les colonnes utilisant une phase stationnaire à base de particules de silice, sur lesquelles sont greffées des chaînes octadécyles (C18), sont aujourd'hui classiquement rencontrées en chromatographie en phase liquide. En effet, la chromatographie de partage en phase inverse est de loin le plus répandue à travers le monde. Il existe donc une très grande gamme de colonnes portant ce type de phases stationnaires.

Cette chimie de phase stationnaire peut être utilisée en SFC, notamment pour l'étude de composés apolaires (surfactants, triglycérides, caroténoïdes). Elle est peu utilisée pour l'étude de composés plus polaires car elle tend à fournir peu de rétention et une géométrie de pic hasardeuse.

Généralement, la SFC utilise des colonnes plus polaires. Ces colonnes sont nettement moins utilisées en HPLC. La gamme a donc un moment été plus restreinte mais les fabricants proposent aujourd'hui de nouvelles chimies de phase stationnaire telles que la 2-éthylpyridine ou la gamme Torus de la société Waters.

Les chimies de phases stationnaires classiquement rencontrées dans la littérature sont présentées dans la Figure 9.

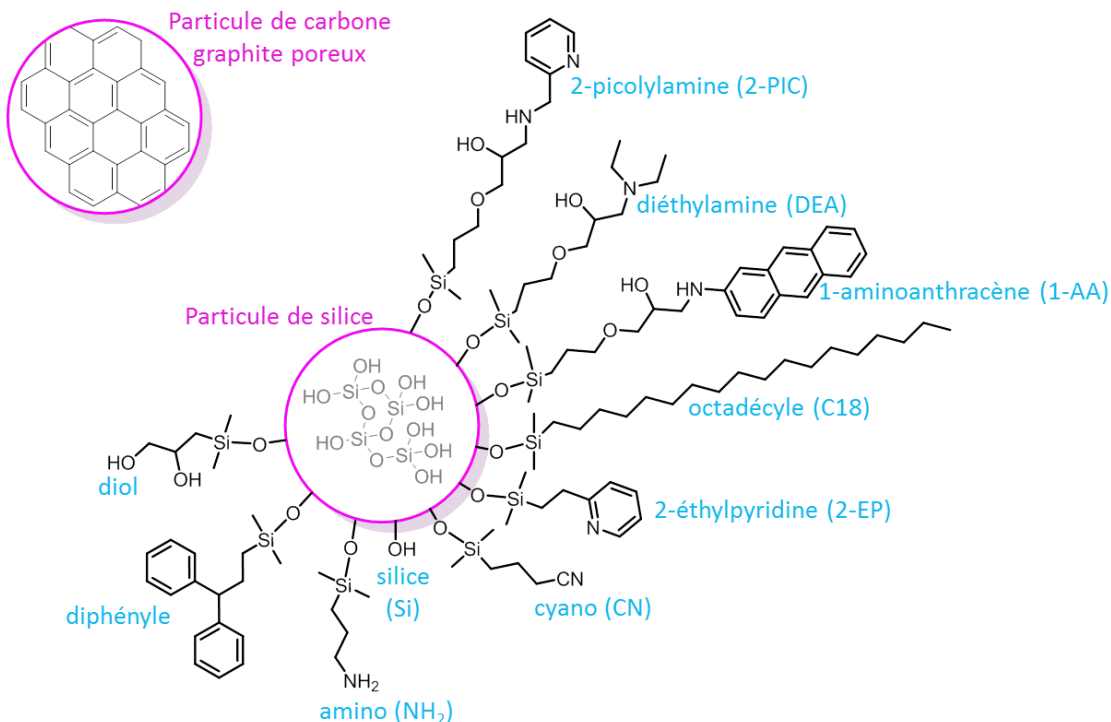


Figure 9 : Phases stationnaires classiquement rencontrées dans la littérature et/ou à disposition au laboratoire. Particules de silice avec ou sans greffage et particules de carbone graphite poreux.

Il n'existe pas de chimie de phase stationnaire idéale et universelle en SFC. Le choix de la phase stationnaire peut cependant s'appuyer sur les travaux de l'équipe d'Éric Lesellier.

Ils proposent une classification en étudiant les facteurs de rétentions (k) obtenus lors de la séparation d'un mélange de 109 composés dans des conditions chromatographiques identiques (à l'exception bien sûr de la phase stationnaire). Cette classification se base sur la caractérisation des colonnes *via* des relations structure-rétention quantitatives (QSRRs¹⁵).

L'équation à résoudre pour chaque colonne est la suivante :

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + d^-D^- + d^+D^+$$

Les lettres en majuscule sont des variables correspondant à chaque composé. Les lettres minuscules sont les constantes à déterminer pour chaque colonne. c est le terme d'interception du modèle. E est lié à l'indice de réfraction de l'analyte, S est lié à la polarité/polarisabilité de l'analyte, A et B sont liés aux caractères acide et basique des liaisons hydrogènes, V est le volume de McGowan, D^+ représente les charges portées par un cation et D^- celles portées par un anion [West C. 2016].

Initialement les termes D n'étaient pas inclus dans le modèle [West C. 2008]. Il en résultait un mauvais comportement de ce dernier lorsque des espèces ioniques ou zwitterioniques étaient considérées. Cependant, le calcul de ces constantes pose un double problème puisqu'il nécessite de connaître à la fois le pH et le pKa *in situ*. En effet, le pKa d'un analyte dépend de son environnement et n'est pas mesurable en SFC. De la même manière, le pH de la phase mobile est difficilement mesurable expérimentalement. West *et al.* proposent l'utilisation d'indicateurs colorés et estiment le pH « apparent aqueux » de la phase mobile CO₂/MeOH (avec ou sans additifs basiques) compris entre 2 et 8 et proche de 1 lors de l'utilisation d'additifs acides [West C. 2017]. Une double approximation a donc été consentie par les auteurs : utiliser une valeur de pH égale à 5 [Wen D. 2000] et les pKa obtenus en solution aqueuse.

Les résultats ainsi obtenus sont présentés sous la forme d'un diagramme araignée où chaque axe correspond à une constante (Figure 10).

¹⁵ Quantitative Structure-Retention Relationships

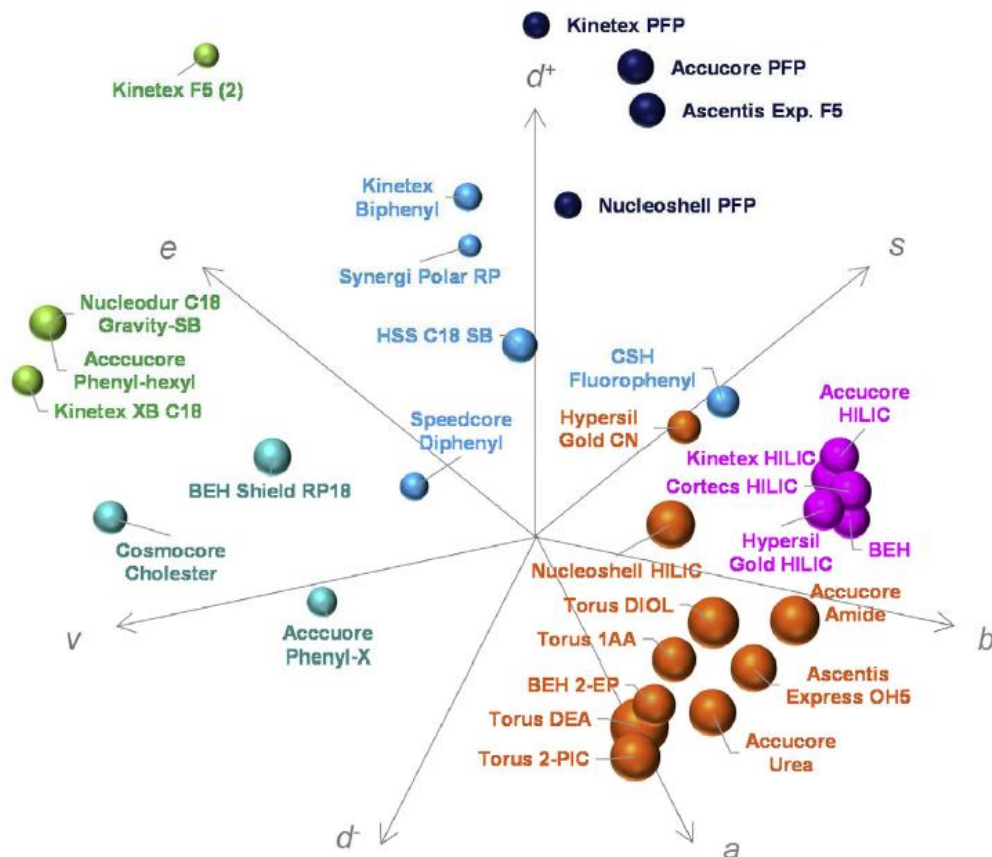


Figure 10 : Diagramme araignée représentant la classification proposée par West *et al.* [West C. 2016].

Bien qu'étant très utile pour avoir une idée des colonnes ayant des sélectivités semblables ou orthogonales, cette classification peut montrer certaines limites, notamment lors de l'emploi d'additifs ou d'un co-solvant connu pour appartenir à une autre famille que celle du méthanol (ex : l'acétonitrile) [Snyder L.R. 1974].

Pour ces raisons, chaque nouveau projet commence par un criblage de colonnes dans notre laboratoire.

2.5.3.2 Conditionnement de la phase stationnaire

Un certain nombre d'auteurs utilisent des colonnes chromatographiques provenant de la HPLC. Ces colonnes possèdent généralement un diamètre de particule de 5 μm . L'utilisation d'un fluide supercritique permet d'augmenter les longueurs de colonne sans craindre les pertes de charges. Certains auteurs vont même jusqu'à coupler 11 colonnes de 4,6 x 200 mm chacune. Ils obtiennent ainsi une colonne chromatographique d'une longueur de 2,20 m capable de générer 220 000 plateaux théoriques en induisant des pertes de charges de l'ordre de 130 bar [Berger A.B. 1993]. Ce montage montre que la SFC peut permettre l'obtention d'une très grande efficacité.

La chromatographie en phase liquide a vu arriver des colonnes contenant des diamètres de particules inférieurs à 2 μm . La réduction de la taille de ces particules permet d'augmenter l'efficacité des colonnes chromatographiques (à longueur de colonne constante) ou de diminuer le temps d'analyse et la longueur des colonnes (à efficacité constante).

Nombre d'auteurs utilisent aujourd'hui ce type de colonnes en SFC. À nouveau les propriétés de la phase mobile en SFC permettent d'augmenter le débit de la phase mobile et/ou la longueur des colonnes chromatographique par rapport à l'UHPLC. Un diamètre interne de la colonne de 2,1 mm

est le plus couramment utilisé en UHPLC puisqu'il permet d'éviter des pertes d'efficacité dues aux effets du gradient radial de température induit par le mode de chauffage [De Villiers A. 2006].

Néanmoins cette dimension n'est pas la plus adaptée pour les systèmes SFC actuels. Les auteurs conseillent plutôt d'utiliser un diamètre interne de 3 mm [Grand-Guillaume Perrenoud A. 2013]. En effet, l'efficacité observée sur un chromatogramme dépend certes de l'efficacité de la colonne mais aussi de la perte d'efficacité induite par les volumes morts. Ainsi, la variance observée pour un pic chromatographique (σ_{total}^2) correspond à la combinaison de la variance induite par la colonne (σ_{col}^2) et de la variance extra-colonne (σ_{ec}^2).

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{ec}^2$$

La variance extra-colonne dépend des tubulures entre la sortie de la colonne et l'entrée dans le détecteur ainsi que du détecteur lui-même (volume, vitesse d'échantillonnage) [Gritti F. 2010].

Actuellement, les systèmes UHPLC proposent des variances extra-colonnes inférieures à $10 \mu\text{L}^2$ [Fekete S. 2011]. Les systèmes SFC Agilent et Waters ont quant à eux des variances environ 10 fois plus élevées ($85 \mu\text{L}^2$ pour les deux systèmes) [Grand-Guillaume Perrenoud A. 2013]. De telles valeurs de variances extra-colonnes réduisent sensiblement l'efficacité intrinsèque de la colonne chromatographique lors de l'utilisation de colonnes de faible diamètre interne puisque la variance extra-colonne devient prépondérante face à la variance induite par la colonne. La Figure 11 permet de visualiser les effets sur la perte d'efficacité de la colonne. Ainsi, pour deux colonnes de 75 mm de long et en intégrant des particules de $1,7 \mu\text{m}$ de diamètre, la colonne ayant un diamètre interne de 3,0 mm conserve 75 % de son efficacité alors que celle de 2,1 mm de diamètre interne n'en conserve que 45 %.

Ainsi, les colonnes d'une longueur de 100 mm et d'un diamètre interne de 3,0 mm sont recommandées par les auteurs lorsque celles-ci sont remplies avec des particules de diamètre inférieur à $2 \mu\text{m}$.

Notre laboratoire a fait le choix d'utiliser tout de même des colonnes de 2,1 mm de diamètre interne. Pour compenser la perte d'efficacité, les colonnes acquises possèdent généralement des longueurs supérieures à celles préconisées par les auteurs. De cette manière l'efficacité observée est sensiblement la même que celle obtenue pour des colonnes de $100 \times 3,0 \text{ mm}$.

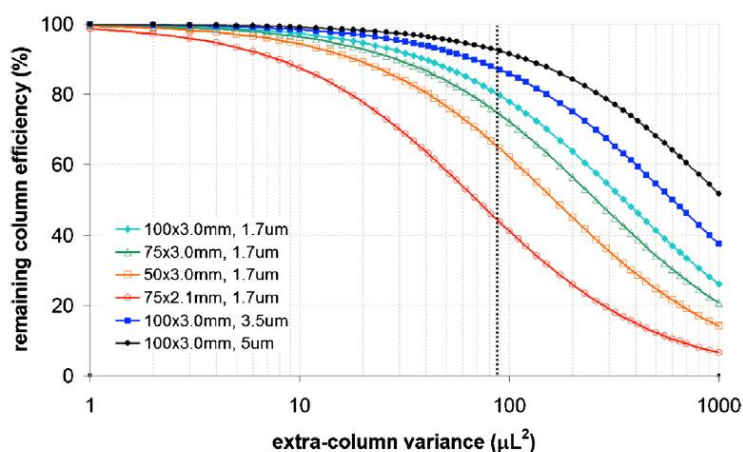


Figure 11 : Conservation de l'efficacité en fonction de la variance extra-colonne des systèmes [Grand-Guillaume Perrenoud A. 2013]. Conditions : colonne BEH, MeOH 2%, 40°C.

2.5.4 La régulation de la température en SFC

Les chromatographes possèdent deux zones de régulation de température.

La première régulation est nécessaire d'un point de vue purement technique. Elle se situe au niveau de la pompe pour la voie CO₂. La tête de la pompe est refroidie en dessous de 10°C de manière à obtenir des taux de compression compatibles avec le matériel. En effet, le taux de compression maximum qu'une pompe classique peut accepter est de 2,45. Dans le cas du CO₂, si la température n'est pas régulée, un taux de compression de près de 7 est nécessaire pour augmenter la pression jusqu'à 400 bar. Lorsque la température est abaissée en dessous de 10°C, ce taux passe à 1,2 pour atteindre la même valeur de pression [Berger T.A 2015].

L'autre zone nécessitant un réglage de la température est la colonne chromatographique, lieu de la séparation. Cette régulation est effectuée par un four à colonne qui va d'une part réguler la température de la colonne grâce au chauffage de l'enceinte thermostatée et d'autre part préchauffer la phase mobile quelques dizaines de centimètres en amont de la colonne.

Bien qu'ayant moins d'influence que la composition de la phase mobile, la température permet souvent de modifier la sélectivité. La Figure 12 met en évidence ce phénomène grâce à un exemple tiré de la littérature [Berger T.A 1991b]. Dans cet exemple, l'ordre d'éluion est complètement inversé entre 28 et 60°C alors que les temps de rétention n'ont pas subi d'énormes changements.

Le même type d'effet a été mis en évidence au cours de notre travail. Les données correspondantes sont présentées dans le chapitre IIA.

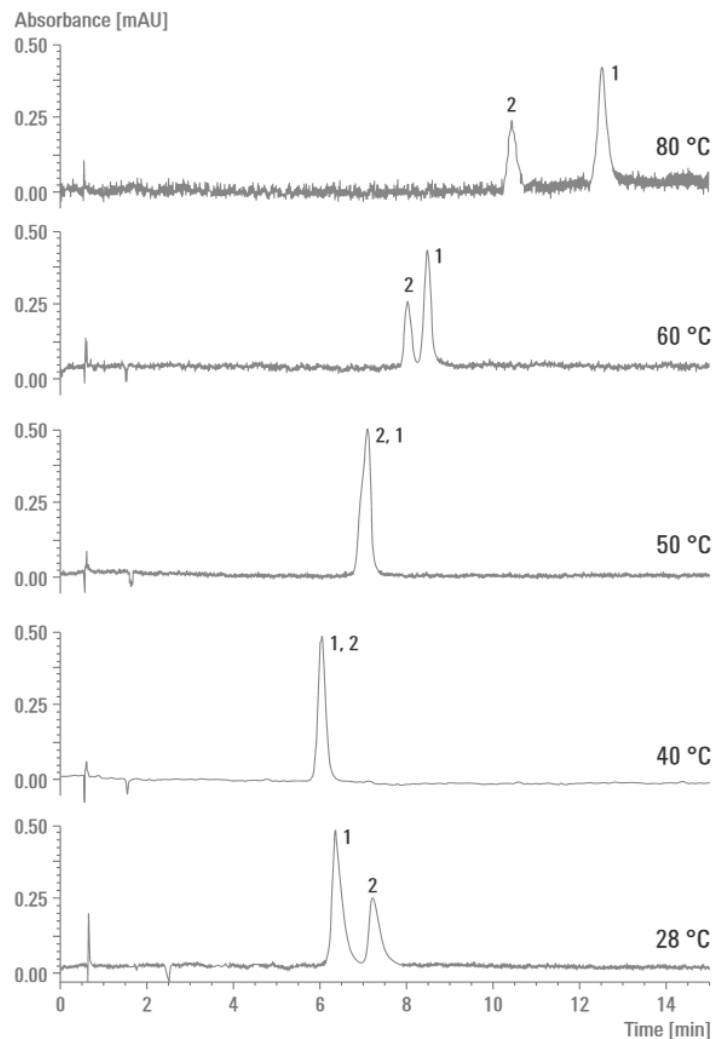


Figure 12 : Effet de la température sur la sélectivité de 2 sulfonamides [Berger T.A 1991]. Conditions : MeOH 5 %, 182 bar, 1,0 mL/min, Zorbax CN 150 x 2 mm, dp 3 µm.

Remarque importante : le lecteur constatera qu'une température de 28°C est en dessous de la température critique (T_c) du CO₂. D'autant plus que l'utilisation de co-solvant (et d'additifs) modifie les coordonnées du point critique (10 % MeOH : $P_c = 130$ bar et $T_c = 74^\circ\text{C}$) [Lesselier E. 2015]. Dans de telles conditions, le terme de chromatographie en phase supercritique n'est pas réellement adapté. Berger rapporte que la terminologie à utiliser a fait l'objet d'un débat, certains auteurs préférant utiliser l'adjectif subcritique au lieu de supercritique ou encore l'appellation « chromatographie convergente ». Berger pense quant à lui que le terme de « chromatographie en phase compressible » serait plus adapté mais qu'il est trop tard pour changer une nomenclature utilisée depuis des décennies [Berger T.A 2015].

2.5.5 Régulation de la contre-pression

Compte tenu de la compression de la phase mobile, un régulateur de contre-pression (BPR¹⁶) est nécessaire afin de maintenir la phase mobile pressurisée dans l'ensemble du système. Ce régulateur est une vanne pilotée qui impose une pression en sortie de colonne indépendamment du débit qui la traverse.

Bien que très important lorsque du CO₂ pur est utilisé comme phase mobile, la valeur de la contre-pression a généralement peu d'influence lorsqu'une phase mobile binaire est utilisée. Les effets sur la rétention sont minimes et ceux sur la sélectivité sont quasiment inexistants. Pour maximiser les chances d'observer des effets, il est nécessaire de faire des changements avec des pas relativement grands (au moins 20 bar) [Berger T.A. 2015].

2.5.6 La détection

Après la séparation, une détection est nécessaire afin de visualiser la présence d'un pic d'élution. Les premiers systèmes SFC utilisaient un détecteur à ionisation de flamme (FID) [Shafer K.S., 1983]. Emprunté à la GC, ce détecteur n'est absolument pas sensible à la présence de CO₂. Cependant, dès lors qu'une faible quantité de co-solvant est ajoutée dans la phase mobile, celui-ci répond fortement et sature le détecteur. Le FID n'est donc aujourd'hui plus adapté à la SFC contemporaine.

Le détecteur UV/Visible a rapidement été intégré aux systèmes intégrant un régulateur de contre-pression [Sugiyama K. 1985]. Cette détection nécessite d'être réalisée en phase condensée ce qui implique que le détecteur doit se trouver entre la sortie de la colonne chromatographique et le régulateur de contre-pression et donc que la cellule optique soit résistante aux hautes pressions (400 bar). La détection UV est compatible avec l'ajout de co-solvant puisque les valeurs de longueur d'onde de coupure (« cut-off ») sont supérieures à 190 nm. À l'image de la température de détection, de nombreux paramètres sont susceptibles de générer du bruit de fond sur les traces des signaux UV (Figure 13). La détection UV est toujours très répandue de nos jours.

¹⁶ Back Pressure Regulator

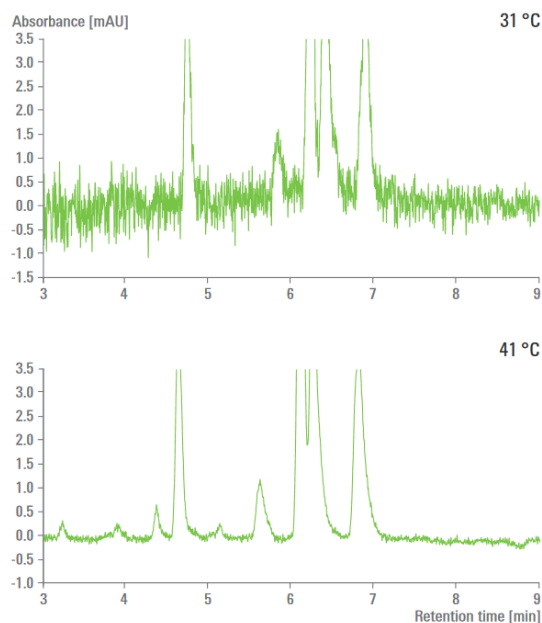


Figure 13 : Différences de bruit généré dans le signal UV pour une même séparation à deux températures de détection (31 et 41°C) [Berger T.A. 2015].

Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD¹⁷) est également utilisé en couplage avec la SFC [Lesellier E. 2012]. Ce détecteur universel est sensible à tous les analytes sans *a priori* tels que le port de chromophores ou de fonctions ionisables. De plus, les aires de pics obtenues sont plus importantes en SFC qu'en HPLC compte tenu de la meilleure nébulisation offerte par le CO₂ comprimé. Cependant, la réponse fournie correspond souvent à une fonction quadratique de la concentration.

Enfin, outre la spectrométrie de masse qui fera l'objet d'une section entière dans ce manuscrit, d'autres détecteurs ont également été couplés avec la SFC : Les détecteurs à fluorescence [Turner C. 2001], les détecteurs de soufre et de phosphore à ionisation de flamme [Markides K.E. 1986] ou la résonance magnétique nucléaire (RMN¹⁸) [Braumann U. 1997].

3 La spectrométrie de masse

3.1 Principe général

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant de déterminer le rapport masse-sur-charge (m/z) d'un ion en phase gazeuse. Avec certains appareils, il est également possible d'avoir accès à des informations relatives à la structure des ions considérés.

Les spectromètres de masse peuvent être divisés schématiquement en 4 parties (Figure 14). Tous intègrent une étape préliminaire d'ionisation (afin que la technique ne soit pas exclusivement réservée aux espèces ioniques) et de vaporisation des composés. Les ions formés sont ensuite séparés suivant le rapport m/z par un analyseur avant d'être détectés. Le détecteur a pour rôle de transformer le courant ionique en signal électronique. Le signal doit ensuite être transformé en un signal exploitable par le chimiste : le spectre de masse. Le spectre de masse est une représentation sous forme de graphique dans laquelle l'ordonnée représente l'intensité du courant ionique et l'abscisse le rapport m/z .

¹⁷ Evaporative Light Scattering Diffusion

¹⁸ Nuclear Magnetic Resonance

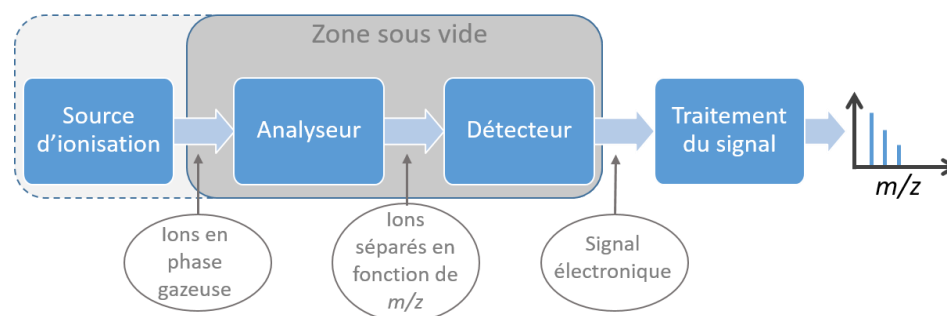


Figure 14 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse.

La majeure partie d'un spectromètre de masse nécessite un vide plus ou moins poussé pour pouvoir fonctionner (Figure 14). Le vide à atteindre dépend de la distance parcourue par les ions : environ $5 \cdot 10^{-6}$ mbar pour un analyseur quadripolaire (quelques dizaines de centimètres parcourues), 10^{-7} mbar pour un analyseur à temps de vol (quelques mètres parcourus) et le meilleur vide possible (env. 10^{-9} mbar) pour les analyseurs à transformée de Fourier (plusieurs centaines de mètres parcourues). En effet, la pression réduite régnant à l'intérieur du spectromètre de masse a pour objectif d'augmenter le libre parcours moyen¹⁹ des ions afin qu'ils ne subissent pas de collision entre la sortie de la source d'ionisation et le détecteur (Tableau 4). Ces collisions provoquent une diminution des performances des appareillages (fragmentations ou déviations du flux d'ions).

Bien que la valeur du vide à atteindre soit différente d'un analyseur à l'autre, tous nécessitent donc une pression réduite pour fonctionner. Il en est de même pour le détecteur. Cette contrainte n'est pas obligatoire pour toutes les sources d'ionisation qui sont divisées en deux catégories : celles à pression réduite et celles à pression atmosphérique (cf. section 3.2).

Nomenclature	Pression en Torr	Pression en bar	Libre parcours moyen
Vide simple	760 - 1	1 - $1 \cdot 10^{-3}$	0,1 à 100 μm
Vide moyen	1 - 10^{-3}	$1 \cdot 10^{-3}$ - 10^{-6}	0,1 à 100 mm
Vide poussé	10^{-3} - 10^{-8}	10^{-6} - 10^{-11}	10 cm à 1 km
Ultra-vide	$<10^{-8}$	$<10^{-11}$	1 à 105 km

Tableau 4 : Libre parcours moyen pour différentes valeurs de vide [De Hoffmann E., 2005].

Pour obtenir des informations relatives à la structure des ions analysés, deux stratégies sont possibles :

- La spectrométrie de masse tandem dans l'espace consiste à positionner deux analyseurs en série et d'y intercaler une cellule de collision (Figure 15). Dans ce cas, le premier analyseur sert de filtre en ne laissant passer qu'un seul rapport m/z . Les ions sont ensuite fragmentés dans une cellule de collision et les fragments obtenus sont séparés dans le second analyseur suivant leur m/z avant d'être détectés (MS/MS ou MS²).

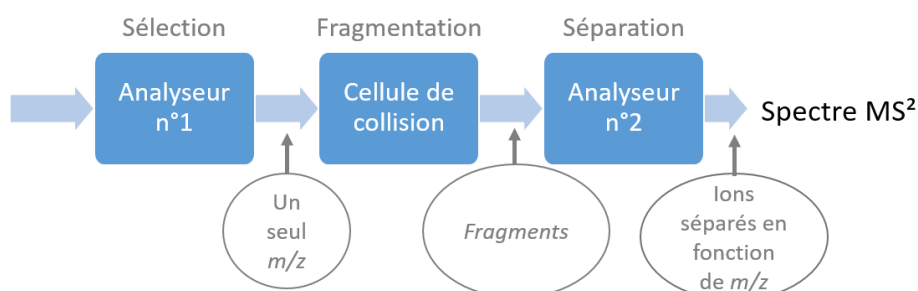


Figure 15 : Représentation schématique de la spectrométrie de masse tandem dans l'espace.

¹⁹ Distance moyenne parcourue par l'ion sans qu'il ne subisse de collision

- La spectrométrie de masse tandem dans le temps consiste à utiliser un analyseur permettant à la fois la séparation, la sélection et la fragmentation (Figure 16). Dans ce cas, le paquet d'ions est piégé, les ions sans intérêt sont ensuite éjectés et les ions restants sont fragmentés puis analysés (MS^2). La sélection et la fragmentation peuvent alors être répétées sur un des ions fragments dans le but d'obtenir des informations sur sa structure (MS^3). Ce raisonnement peut être poursuivi à l'infini du moment que les ions fragments générés sont nombreux dans l'analyseur (MS^n).

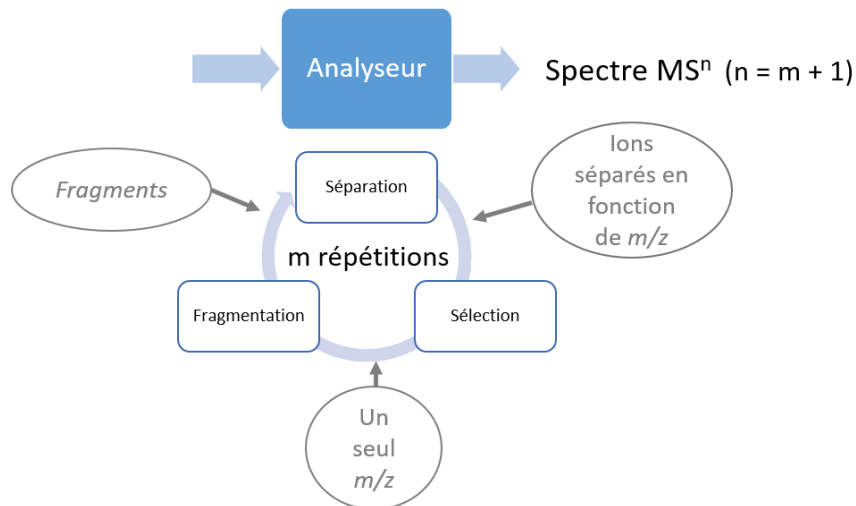


Figure 16 : Représentation schématique de la spectrométrie de masse tandem dans le temps.

La spectrométrie de masse est une technique qui, lorsqu'elle est utilisée seule, peut conduire à des informations lacunaires. En effet, la technique ne permet pas de distinguer facilement des isomères. Dans le cas d'un mélange d'isomères, les ions formés vont tous produire le même rapport m/z . Si certains isomères conduisent à des spectres MS^2 nettement différents, il est très courant d'avoir des ions majoritaires en commun sur les deux spectres MS^2 pour deux isomères. Dans ce cas, la technique ne suffit pas à elle seule et un couplage avec une méthode séparative peut s'avérer indispensable puisqu'elle permet de séparer physiquement les différents isomères avant leur introduction dans le spectromètre de masse.

Un autre problème rencontré lors de l'introduction directe en spectrométrie de masse est un phénomène de compétition à l'ionisation. Ce phénomène dit de « suppression d'ion » conduit généralement à la suppression du signal des molécules les moins concentrées ou les plus difficilement ionisables. À nouveau le couplage à une technique séparative permet de réduire l'influence de ces phénomènes puisque, dans l'idéal, les molécules ne sont pas ionisées en mélange, il n'y a donc plus de compétition à l'ionisation.

Au cours de cette section, chaque partie du spectromètre de masse sera décrite. Une multitude de configurations existe de nos jours. L'étude se cantonnera donc aux éléments les plus importants pour la compréhension des résultats exposés dans les chapitres suivants.

Le couplage de la spectrométrie de masse avec la chromatographie en phase supercritique est développé dans la section 4.

3.2 Les sources d'ionisation

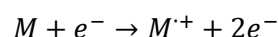
Le rôle des sources d'ionisation est la production d'ions en phase gazeuse. Deux catégories de sources d'ionisation existent, les sources à pression réduite, et celles à pression atmosphérique. Un grand nombre de source d'ionisation a été développé mais toutes fonctionnent en combinant ces différents processus d'ionisation :

- Transfert d'espèces pré-chargées se trouvant dans la phase condensée ;
- Protonation ou déprotonation de l'analyte ;
- Perte ou capture d'un électron ;
- Formation d'adduits (au sodium, au potassium, etc).

Le principe de fonctionnement de quelques sources est présenté ci-après.

3.2.1 Les sources à pression réduite

Les sources à pression réduite sont les premières à avoir équipé les spectromètres de masse. Ces sources sont aujourd'hui quasiment exclusivement dédiées à des couplages avec la chromatographie en phase gazeuse, ou à l'étude d'échantillon solide. Seule la source à ionisation électronique (EI²⁰) sera exposée en détail ici puisqu'elle est la première à apparaître dans la littérature suite aux travaux précurseurs d'Arthur Dempster [Dempster A.J. 1918]. Elle équipe aujourd'hui la majorité des couplages avec la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). L'ionisation est effectuée à l'aide des électrons émis à partir d'un filament chauffé. Comme le montre l'équation ci-après, la formation d'un radical cation (ion moléculaire) est observée lorsqu'un électron interagit avec un analyte (M).



Par convention, les électrons émis possèdent une énergie de 70 eV. Cette valeur élevée d'énergie provoque ensuite une fragmentation intense de l'ion moléculaire si bien que celui-ci n'est pas toujours observé sur le spectre de masse. En revanche, cette fragmentation est caractéristique de l'espèce de départ. Ainsi, des bibliothèques de spectres permettent de remonter à la structure de l'analyte grâce au spectre de masse.

Il existe une multitude d'autres sources à pression réduite, parmi lesquelles :

- ❖ La source à ionisation chimique (CI²¹), qui permet une ionisation plus douce que l'EI grâce à l'ajout d'un gaz réactif dans la source. Ce gaz va s'ioniser en premier avant de céder son proton à un analyte en mode d'ionisation positif. C'est un moyen d'observer l'ion moléculaire lorsqu'il est absent des spectres de masse obtenus après une EI.
- ❖ La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI²²), qui est une source d'ionisation où l'énergie d'une source laser pulsée est captée par une matrice organique co-cristallisée avec l'analyte [Tanaka K. 1987 ; Karas M. 1987]. Il en résulte une désorption et une ionisation dont les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés mais qui conduit souvent à la formation d'espèce protonées $[M+H]^{+}$ de façon majoritaire ainsi qu'à des adduits des cations métalliques (ex : $[M+Na]^{+}$ ou $[M+K]^{+}$) en mode positif.

Les sources à pression réduite ne sont pas compatibles avec des débits entrants importants. En effet, il est difficile de maintenir une valeur satisfaisante de vide si des grands débits entrent dans le même temps. C'est pour cette raison que les sources à pression réduite ne sont pas utilisées lors de couplage avec la LC et que des sources à pression atmosphérique ont été développées.

3.2.2 Les sources à pression atmosphérique

Les sources à pression atmosphérique sont tout à fait compatibles avec une introduction de l'échantillon en solution, que ce soit en introduction directe (infusion) ou en couplage avec une technique séparative telle que la HPLC. Trois techniques composent principalement cette famille de

²⁰ Electron Ionization

²¹ Chemical Ionization

²² Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

sources d'ionisation : l'électronébulisation (ESI²³), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI²⁴) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI²⁵). Ces trois techniques d'ionisation sont disponibles dans notre laboratoire pour un couplage avec la SFC ou la HPLC.

Ces trois sources sont des techniques d'ionisation douce qui produiront donc généralement des espèces moléculaires intactes. Cependant l'APPI peut être considérée comme étant intermédiaire car elle fournit souvent de nombreux fragments en source.

Lorsque la masse moléculaire et la polarité des analytes sont considérées, chacune de ces techniques possède une plage d'utilisation particulière. Dans les faits, une large plage d'utilisation est commune aux 3 techniques (Figure 17).

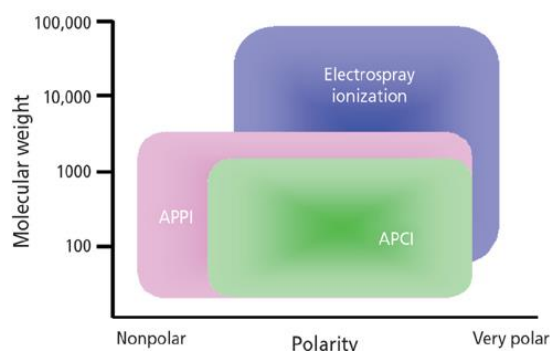


Figure 17 : Domaine d'utilisation des sources à pression atmosphérique [Syage J.A. 2008].

3.2.2.1 La source *electrospray*

La source *electrospray* est aujourd'hui la source la plus classiquement rencontrée [Cesh N.B. 2001 ; Rohner T.C. 2004]. Elle permet l'analyse des molécules peu à fortement polaires et ce quelle que soit leur taille. Le premier couplage ESI-MS a été développé par Fenn en 1989 [Fenn J.B. 1989]. Les espèces obtenues en mode positif sont généralement des espèces protonées une ou plusieurs fois $[M+nH]^{n+}$ et des adduits avec des cations métalliques (ex : $[M+Na]^+$). Celles obtenues en mode négatif sont des espèces déprotonées une ou plusieurs fois $[M-nH]^{n-}$ ou des adduits anioniques (ex : $[M+HCOO]^-$).

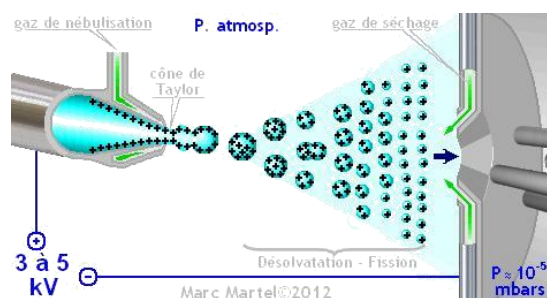


Figure 18 : Illustration du fonctionnement de la source *electrospray*. Auteur: Marc Martel.

La phase liquide se charge grâce à l'application d'une haute tension (jusqu'à 5 kV) entre le capillaire par lequel arrive l'échantillon et la contre-électrode (Figure 18). L'application de cette haute tension induit une accumulation de charge dans la solution et la formation d'un « cône de Taylor » à la sortie du capillaire. Des gouttelettes chargées se détachent continuellement du cône. Un flux d'azote chauffé (100-350°C) permet de diminuer la taille des gouttelettes par évaporation du solvant. La réduction de taille de la gouttelette entraîne une augmentation de la densité de charge. Chaque

²³ ElectroSpray Ionization

²⁴ Atmospheric-Pressure Chemical Ionization

²⁵ Atmospheric-Pressure Photoionization

gouttelette explose lorsque la répulsion électrostatique en son sein devient supérieure à la tension de surface : c'est l'explosion coulombienne [Gomez A. 1994].

D'après Dole, les répétitions successives de ce phénomène provoqueraient la désolvatation totale des ions et donc leur passage en phase gazeuse. C'est le modèle de la charge résiduelle (CRM²⁶) [Dole M. 1968]. Iribarne propose quant à lui une théorie légèrement différente (Figure 19) dans laquelle les ions sont évaporés des gouttelettes. C'est le modèle de l'évaporation ionique (IEM²⁷) [Iribarne J.V. 1976]. Le premier modèle permet d'expliquer l'ionisation des macromolécules qui conduit souvent à l'obtention d'espèces multichargées alors que le second modèle conduit à l'ionisation de petites espèces monochargées.

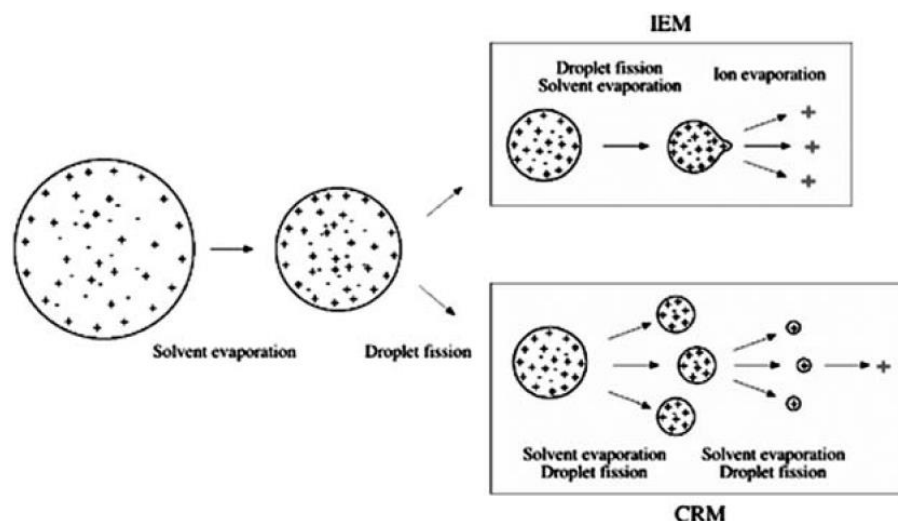


Figure 19 : Représentation schématique des modèles proposés par Dole et Iribarne [Rohner T.C. 2004]

3.2.2.2 La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique

La source APCI est une technique d'ionisation en phase gazeuse. Elle permet l'ionisation de petites molécules (jusqu'à 1500 Da environ) polaires ou peu polaires. La source est composée d'un nébuliseur, qui contrairement à l'ESI n'est pas soumis à une différence de potentiel. Le nébuliseur conduit à la formation de gouttelettes de solvant contenant les composés neutres. Les composés sont désolvatés sous forme neutre grâce aux hautes températures (300-500°C) et à un flux de diazote. Une électrode en pointe est intercalée entre le nébuliseur et l'entrée du spectromètre de masse (Figure 20). L'application d'une forte tension (1-5 kV) sur cette électrode conduit à la formation d'espèce $N_2^{+•}$ par décharge corona. Cette espèce réactive va alors réagir avec le solvant et conduire à la formation d'espèces réactives secondaires telles que $H_3O^+[H_2O]_n$ (mode positif) ou $O^-[H_2O]_n$ (mode négatif). Dans cette situation, un transfert de proton va s'effectuer avec les analytes lors de collisions ion/molécule neutre. Ce transfert est régi par l'affinité protonique des espèces mises en jeu [Bruins A.P. 1991]. Les espèces observées sont généralement monochargées.

²⁶ Charge residue Model

²⁷ Ion Evaporation Model

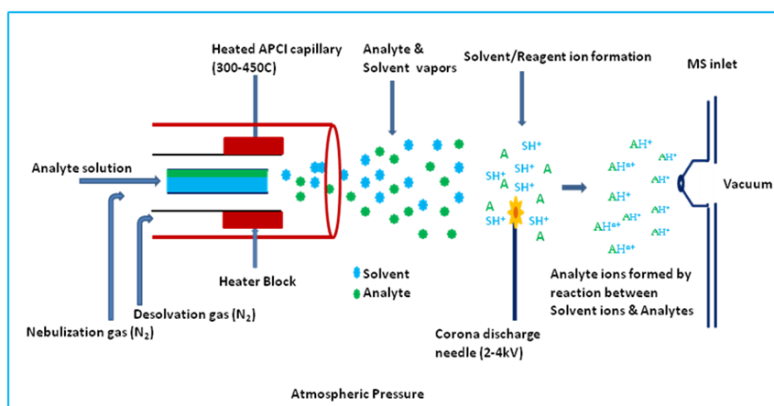
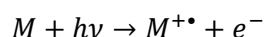


Figure 20 : Représentation schématique de la source APCI. Source : site de l'Université de Pittsburg²⁸.

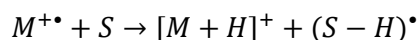
3.2.2.3 La source à photoionisation à pression atmosphérique

La source APPI est instrumentalement proche de la source APCI sauf que l'aiguille corona est remplacée par une lampe UV. Certains auteurs proposent d'ailleurs des sources APPI à partir de sources APCI [Robbs D.B 2000].

Cette source contient donc également un nébuliseur qui, en complément de hautes températures, va conduire à la vaporisation du solvant et des analytes sous forme neutre. Les photons émis par la lampe UV vont ioniser les analytes si l'énergie des photons émis est supérieure à l'énergie d'ionisation des analytes (M).



L'ion radicalaire peut ensuite réagir avec le solvant (S) pour former l'espèce protonée.

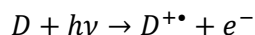


Les spectres de masse générés contiennent généralement les ions moléculaires $M^{+\bullet}$ et les espèces protonées $[M+H]^+$.

Remarque : contrairement à la source APCI, la source APPI ne fait pas intervenir le diazote puisque son énergie d'ionisation (15,58 eV) est supérieure à l'énergie des photons émis par la lampe au Krypton (10,0 et 10,6 eV). Les ions radicalaires $N_2^{+\bullet}$ ne sont donc pas observés.

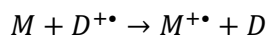
Il est possible d'augmenter la sensibilité de la source APPI en ajoutant un dopant (D). Il s'agit d'un intermédiaire qui va s'ioniser facilement sous l'irradiation UV et qui possède une affinité protonique faible (acétone, THF, toluène).

L'obtention des ions d'intérêt se fait alors en deux temps : l'ionisation du dopant puis l'ionisation de l'analyte par échange de charge (voie A) ou par transfert de proton (voie B).

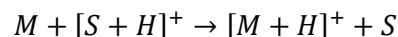
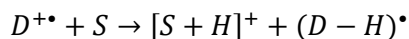


²⁸ <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/mass-spectrometry-introduction> (consulté le 04/04/2017)

Voie A



Voie B



3.3 Les analyseurs en spectrométrie de masse

Le rôle de l'analyseur est de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Les performances d'un spectromètre de masse sont directement reliées au type d'analyseurs qu'il intègre. En effet, les caractéristiques suivantes d'un spectromètre de masse sont imputables à l'analyseur :

- La précision en masse, exprimée en partie par million (ppm), exprime l'exactitude de la valeur de m/z ;
- La résolution en masse est un rapport entre la masse de la molécule (m) et la largeur à mi-hauteur du pic sur le spectre de masse (Δm). Plus la résolution est grande, plus il est possible de distinguer deux masses proches ;
- La vitesse d'analyse correspond au domaine de masse mesuré par unité de temps ;
- La gamme de masse correspond aux valeurs extrêmes de rapport m/z que l'analyseur est capable d'évaluer.

Les analyseurs sont classés en deux catégories :

- Les analyseurs haute résolution qui permettent d'accéder à la masse exacte des ions ;
- Les analyseurs basse résolution qui donnent seulement accès à la masse nominale des ions.

Dans cette section, seuls les analyseurs utilisés lors des travaux présentés dans les chapitres suivants seront décrits.

3.3.1 L'analyseur quadripolaire

L'analyseur quadripolaire est décrit depuis les années 50 [Paul W. 1953]. C'est aujourd'hui un analyseur basse résolution (résolution unitaire) classiquement rencontré dans des couplages avec des méthodes séparatives. Il possède une précision de l'ordre de la centaine de ppm et permet l'étude des rapports m/z inférieurs à 4000 environ. Il est constitué de 4 barres métalliques de section circulaire ou hyperbolique. Chaque barre est soumise à une tension constituée d'une composante continue et d'une composante alternative. Les barres en regard sont soumises à la même tension et les barres voisines sont soumises à l'opposé de cette tension (Figure 21).

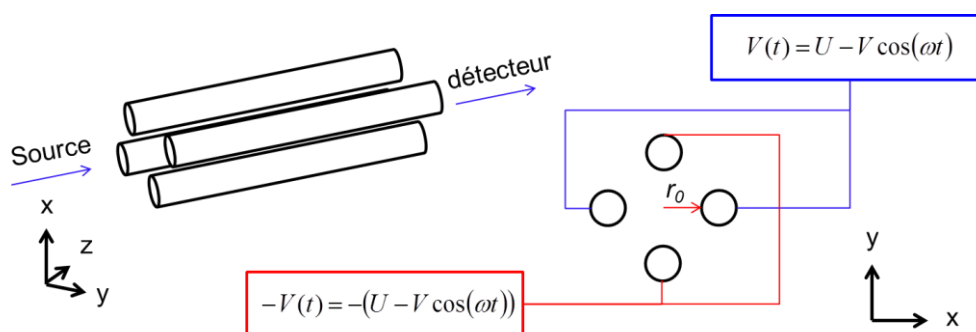


Figure 21 : Principe de fonctionnement de l'analyseur quadripolaire. Source : Cours de Fabien Chirot.

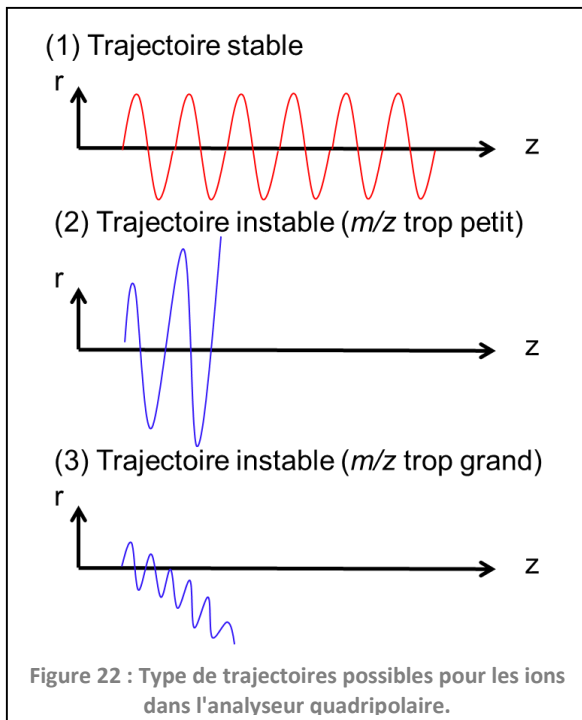


Figure 22 : Type de trajectoires possibles pour les ions dans l'analyseur quadripolaire.

Les ions sont injectés de manière longitudinale dans l'analyseur. Les équations de Mathieu montrent qu'à chaque rapport m/z correspond une valeur de U et V pour lesquelles l'ion va osciller le long de l'axe du quadripôle jusqu'à la sortie de l'analyseur. En revanche les ions trop légers sont éjectés puisque l'accélération due aux radiofréquences augmente l'amplitude de leurs oscillations. Il en est de même pour les ions trop lourds pour lesquels les radiofréquences ne permettent plus de compenser l'attraction due à la composante continue : les ions heurtent les parois (Figure 22).

L'analyseur quadripolaire agit donc comme un filtre en masse. Lorsque U et V sont constants dans le temps, l'analyseur ne laisse passer qu'un seul rapport m/z . Il est également possible de réaliser un balayage de m/z . Dans ce cas, il est

nécessaire d'appliquer des valeurs U et V qui varient en fonction du temps ($U(t)$ et $V(t)$). Dans cette configuration, l'analyseur devient un filtre au cours du temps en laissant passer des m/z différents d'un instant à l'autre. La valeur de la vitesse de variation de U et V entraîne des changements sur la résolution : un balayage lent augmente la résolution en masse.

Il est également possible de l'utiliser en mode guide d'ion (*RF only*). Pour cela il suffit de ne pas appliquer de composante continue. Ce mode est notamment utilisé afin de transmettre tous les ions dans un second analyseur (en MS simple pour un spectromètre de masse hybride Q-ToF par exemple).

3.3.2 L'analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol (TOF²⁹) a été imaginé au milieu des années 40 [Stephens W. 1946] et élaboré une dizaine d'années plus tard [Wiley W.C. 1995]. Le TOF, associé à un miroir électrostatique, est aujourd'hui un analyseur haute résolution : il permet la discrimination d'espèces ayant la même masse nominale. Il est également capable d'offrir des précisions inférieures à 10 ppm.

Le principe de fonctionnement du TOF se base sur le temps nécessaire à un ion pour parcourir une distance dans une zone libre de champ. Un paquet d'ions est injecté dans le tube de vol grâce à l'application d'une différence de potentiel juste à l'entrée de celui-ci. L'énergie acquise par les ions est égale à l'énergie potentielle électrostatique suivant la formule :

$$E_p = qV = zeV$$

Avec q la charge de l'ion (en Coulomb)
 v la différence de potentiel auquel l'ion est soumis (en Volt)
 z le nombre de charge
 e la charge élémentaire d'un électron (en Coulomb)

²⁹ Time Of Flight

Une fois dans la zone libre de champ, l'énergie des ions dépend de leur masse et de leur vitesse, suivant la formule :

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

Avec m la masse (en kilogramme)
 v la vitesse (en m/s)

À l'entrée du tube, E_c est égale à E_p . Ainsi, connaissant m , z , e et V , il est possible de déterminer la vitesse de l'ion dans le tube :

$$v = \sqrt{\frac{2ezV}{m}}$$

Connaissant la longueur du tube de vol (L), il est possible de remonter au temps nécessaire à l'ion pour arriver au détecteur (t) :

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2ezV}}$$

Le temps de vol est donc proportionnel à la racine carrée du rapport m/z . Ainsi, connaissant le moment où le paquet d'ion est éjecté et celui où un ion est détecté, il est possible de remonter au rapport m/z , à condition que le rapport $\frac{L}{\sqrt{V}}$ soit connu et constant.

Pour connaître la valeur de ce rapport, il suffit d'injecter des ions de rapports m/z connus. Pour que ce rapport soit constant, la température de la pièce dans laquelle se trouve le TOF doit être réglée (pour éviter la dilatation thermique) et les tensions d'accélération doivent être extrêmement stables.

Dans les faits, la différence de potentiel servant à accélérer les ions n'est pas instantanément mise en place. De même, il existe un décalage entre la collision de l'ion sur le détecteur et l'émission du signal électrique. Ces deux délais sont totalement indépendants du rapport m/z . Il n'est donc pas possible d'utiliser directement l'équation précédente, celle-ci doit d'abord être corrigée en retranchant les deux temps de délai avant d'être utilisée pour déterminer le rapport m/z .

De plus, les équations précédentes ne prennent pas en compte l'épaisseur du paquet d'ions avant accélération. Cette épaisseur entraîne une légère différence d'énergie cinétique et donc de vitesse pour des rapports m/z identiques. Ces ions vont donc avoir un temps de vol légèrement différents se traduisant par un élargissement des pics et donc une diminution de la résolution [Guilhaus M. 1995].

L'utilisation d'un miroir électrostatique permet de compenser ces effets. Développé dans les années 70 [Mamyrin B.A. 1973], il est constitué d'une série de lentilles portées à des tensions croissantes du même signe que la charge des ions analysés de façon à générer un champ électrique homogène (Figure 23). Le champ électrostatique généré repousse donc les ions s'approchant. Plus un ion a d'énergie cinétique, plus celui-ci pénètre profondément dans ce champ avant d'être renvoyé. Les ions sont renvoyés avec exactement la même énergie cinétique. Finalement, la différence d'énergie cinétique initiale (pour deux m/z identiques) est compensée par une augmentation de la distance de vol : les deux ions arrivent au même instant sur le détecteur. Certains appareils ne possèdent pas de miroir électrostatique (TOF linéaire), d'autres en possèdent un (TOF en V) et d'autres en possèdent 3 (TOF en W). L'autre gros avantage du miroir électrostatique est de proposer une distance de vol doublée pour un instrument de même taille : la résolution est par elle-même doublée.

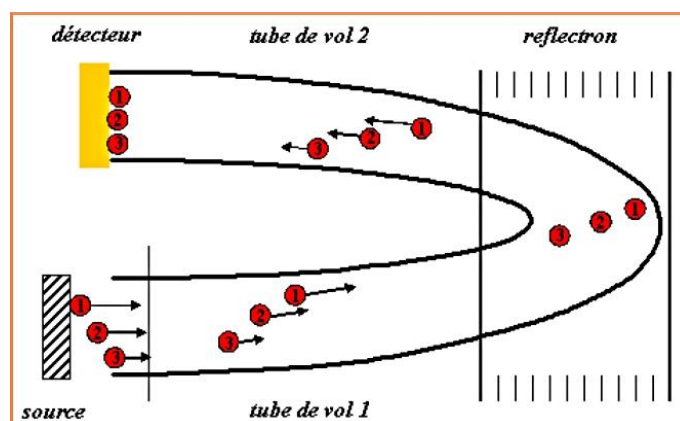


Figure 23 : Principe du miroir électrostatique. Source : site internet UPR4301 CNRS³⁰.

Enfin ce type d'analyseurs fonctionne de manière séquentielle : l'expulsion d'un paquet d'ions, puis la séparation en fonction du temps de vol et la détection. Une fois que le dernier ion est arrivé au détecteur, le second paquet d'ion peut être injecté et ainsi de suite. C'est donc un analyseur parfaitement adapté aux sources d'ion pulsées comme le MALDI. Dès lors qu'une source d'ionisation générant des ions en continu est utilisée, il devient nécessaire de former artificiellement ces paquets d'ion. Il faut donc piéger des ions pour former un paquet, puis injecter le paquet tout en piégeant les ions continuant d'arriver jusqu'à ce que le dernier ion du paquet injecté soit détecté. C'est le rôle du modulateur qui va piéger les ions et les renvoyer dans une direction orthogonale à leur arrivée. De cette manière, la différence d'énergie cinétique avec laquelle arrivent les ions dans le modulateur n'est pas conservée dans le TOF.

3.3.3 L'analyseur Orbitrap

L'analyseur Orbitrap fait partie de la famille des pièges à ions. Il s'inspire des travaux de Kingdon [Kingdon K.H. 1923] et a été développé par Makarov *et al.* [Makarov A. 2000]. Cet analyseur permet d'obtenir de la très haute résolution (env. 100 000) et une excellente précision en masse (env. 1 ppm). Il est constitué de deux électrodes. L'électrode extérieure est creuse et contient l'électrode intérieure qui partage le même axe.

Les ions sont injectés sous la forme d'un paquet d'ions et sont piégés dans un champ électrostatique. Ils vont à la fois tourner autour de l'électrode centrale et osciller le long de son axe. Le mouvement global est donc celui d'une spirale. Si la rotation autour de l'axe n'est pas directement exploitable (car il dépend des conditions initiales), le déplacement le long de ce même axe est relié au rapport m/z via l'équation suivante :

$$w_z = \sqrt{\frac{ke}{m/z}}$$

Avec w_z la pulsation de l'oscillation suivant l'axe des électrodes
 k une constante inhérente à l'électrode centrale
 e la charge élémentaire d'un électron

La pulsation dépend donc uniquement du rapport m/z et de la constante k .

³⁰ <http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?article132> (consulté le 06/07/2017)

Une fois injectés dans l'analyseur, les ions d'un même rapport m/z vont former un anneau autour de l'électrode centrale et osciller ensemble le long de l'axe des électrodes. Cette oscillation va induire un courant image mesurable entre les deux parties de l'électrode externe (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**Figure 25). La mesure de ce courant permet d'obtenir un interférogramme³¹ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) qui, par transformée de Fourier, permet l'obtention du spectre de

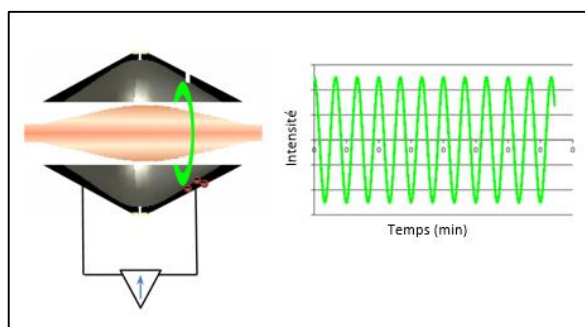


Figure 25 : Courant image généré par l'oscillation des ions d'un même rapport m/z . Source : Cours de Guillaume Van Der Rest.

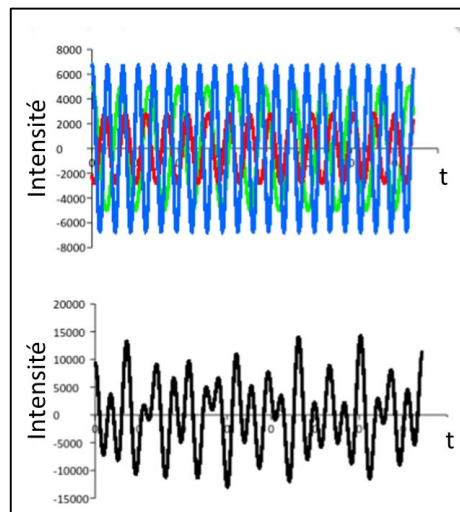


Figure 24 : Exemple de l'interférogramme obtenu (en noir) pour un signal correspondant à 3 m/z (bleu, rouge et vert). Source : Cours de Guillaume Van Der Rest.

masse. résolution obtenue sur le spectre de masse dépend directement du temps d'acquisition. L'obtention de très haute résolution n'est donc parfois pas compatible avec des méthodes séparative présentant des pics chromatographiques très fins.

3.3.4 L'analyseur hybride Q-TOF

L'analyseur hybride Q-TOF est un outil permettant de faire de la spectrométrie de masse tandem dans l'espace (cf. section 3.1). Ce type d'analyseurs est composé d'un analyseur quadripolaire (cf. section 3.3.1) et d'un analyseur à temps de vol (cf. section 3.3.2). Ces deux analyseurs sont séparés par une cellule de collision (Figure 26). La cellule de collision est souvent constituée par un quadripôle ou un hexapôle. Lorsqu'elle est activée, un gaz de collision (argon ou diazote) y est introduit. Le but est de créer des collisions avec le flux d'ions et ainsi induire des fragmentations (CID³²). En jouant sur la pression du gaz ou l'énergie cinétique des ions traversant la cellule, il est possible d'influencer les voies de fragmentation.

Remarque : les représentations graphiques des Q-TOF intègrent souvent un quadripôle supplémentaire noté Q_0 . Celui-ci est utilisé uniquement en guide d'ions (pas en tant qu'analyseur).

³¹ Somme de tous les courants induits par les différents rapports m/z présent dans la source

³² Collision-Induced Dissociation

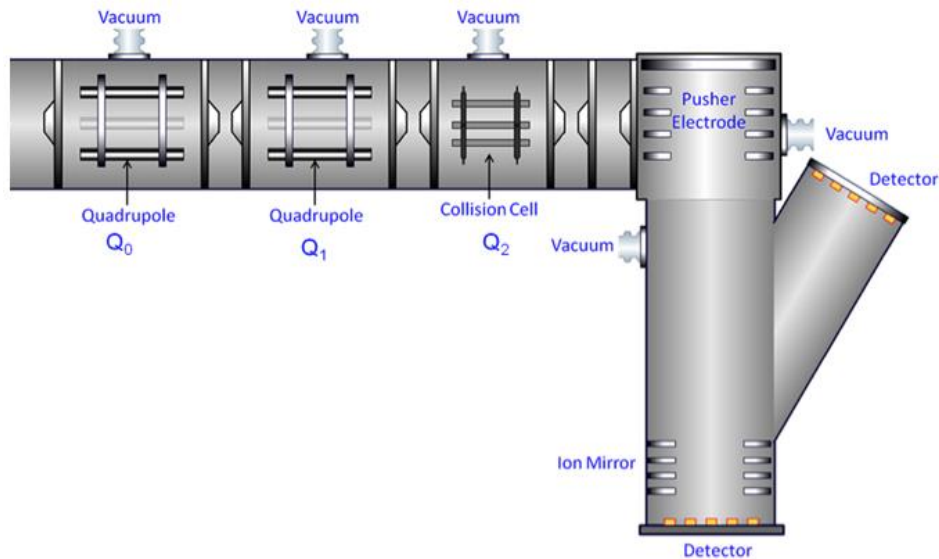


Figure 26 : Présentation d'un Q-TOF. Source : Site internet www.chromacademy.com³³

Le Q-TOF peut être utilisé en mode MS simple. Dans ce cas, le quadripôle et la cellule de collision servent de guide d'ions jusqu'au modulateur (*pusher electrode* sur la Figure 26) du TOF.

Le Q-TOF peut également être utilisé en mode MS/MS. Dans ce cas, le quadripôle est utilisé comme un filtre de rapport m/z , la cellule de collision fragmente le rapport m/z sélectionné par le premier analyseur et le TOF analyse les différents fragments obtenus. Le spectre MS^2 ainsi obtenu est donc de haute résolution puisque c'est le TOF qui analyse les fragments.

Le choix des ions à fragmenter peut être fait *a priori* par l'expérimentateur ou durant l'analyse par le logiciel lui-même. Dans ce cas, l'expérimentateur demande au spectromètre de réaliser les spectres MS^2 de X ions les plus intenses sur le spectre MS. L'appareil va alors répéter le cycle suivant : spectre MS, recherche des X ions les plus intenses, spectre MS^2 de l'ion le plus intense, spectre MS^2 du second ion le plus intense et ce jusqu'au spectre MS^2 du $X^{\text{ème}}$ ion le plus intense.

3.3.5 La cellule de mobilité ionique

La cellule de mobilité ionique n'est pas un analyseur au sens strict. C'est plutôt l'intermédiaire entre une méthode séparative et un analyseur. C'est le pendant en phase gazeuse de ce qu'est l'électrophorèse capillaire en phase liquide. Depuis les premiers systèmes développés dans les années 60 [McDaniel E.W. 1962], plusieurs techniques ont vu le jour pour réaliser des expériences de spectrométrie de mobilité ionique (IMS³⁴). Seul le principe général des cellules intégrées récemment dans les spectromètres de masse sera développé dans ce manuscrit [Kanu A.B. 2008].

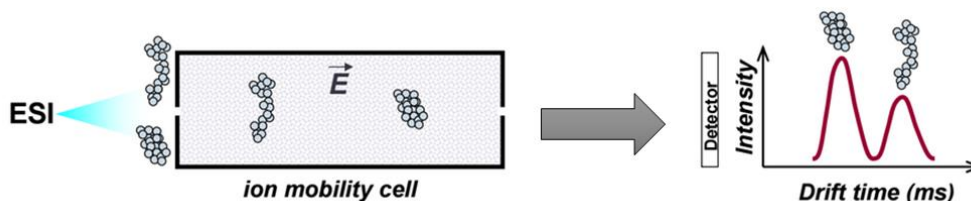


Figure 27 : Principe de fonctionnement de la cellule de mobilité ionique.³⁵

³³ http://www.chromacademy.com/Mass_Analyzers_Traps_and_TOFs_The_Essential_Guide.html (consulté le 06/07/2017)

³⁴ Ion Mobility Spectrometry

³⁵ Source : Cours de Valérie Gabelica

Cette cellule est composée d'une chambre contenant un gaz tampon (He, N₂, CO₂) à une pression de l'ordre de 5 Torr. Un champ électrique est généré dans l'enceinte. Ce champ peut être constant entre l'entrée et la sortie de la cellule (*Drift Tube IMS*) ou oscillant (*Travelling Wave IMS*). Lorsque les ions pénètrent dans la cellule, le champ électrique les accélère vers la sortie alors que dans le même temps le gaz tampon les freine. Deux ions ayant le même rapport m/z subiront la même accélération par le champ électrique. Par contre, si l'un des deux est plus compact que l'autre, celui-ci sera moins freiné par le gaz tampon et aura par conséquent une vitesse plus grande (Figure 27).

Chaque ion adopte un vecteur vitesse stationnaire (\vec{v}) qui dépend du vecteur du champ électrostatique (\vec{E}) et de sa mobilité ionique (K) :

$$\vec{v} = K \times \vec{E}$$

Le temps de drift (d_t) dépend donc de la longueur de la cellule (L), de K et de E .

$$d_t = \frac{1}{K} \frac{L}{E} + t_0$$

De plus, comme L et E sont des constantes, la valeur du temps de drift (corrigée par la constante t_0) est proportionnelle à l'inverse de la mobilité.

Lorsque le champ électrique appliqué est faible, la mobilité peut être exprimée en fonction de paramètres liés à l'ion, au gaz tampon et à l'appareillage tel que :

$$K = \frac{3}{16} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{m}} \times \frac{ze}{N} \frac{1}{\Omega_{moyen}}$$

Avec k_b la constante de Boltzmann
 T la température
 M la masse de l'ion
 m la masse de la molécule
 z la charge de l'ion
 e la charge portée par un électron
 N la densité numérique du gaz (relié à la pression et la nature du gaz)
 Ω_{moyen} la section efficace moyenne de collision

Pour un rapport m/z donné, la mobilité est donc directement proportionnelle à l'inverse de la section efficace moyenne de collision de l'ion (puisque toutes les autres grandeurs définissant K sont constantes). En mesurant à la fois le temps de drift et le rapport m/z , il est possible d'obtenir la section efficace de collision de l'ion en phase gazeuse. Cette valeur peut être reliée à une configuration particulière de l'ion par le biais de calculs théoriques.

Au cours de notre travail, une cellule de collision de type TWINS a été utilisée. Elle est intégrée commercialement dans un système Q-TOF (Figure 28). Ce type d'appareil permet de sélectionner un rapport m/z avec le quadripôle, de séparer les structures différentes dans la cellule de mobilité et de mesurer la masse exacte grâce au TOF. Il est également possible de faire de la fragmentation (CID) avant ou après la cellule de mobilité.

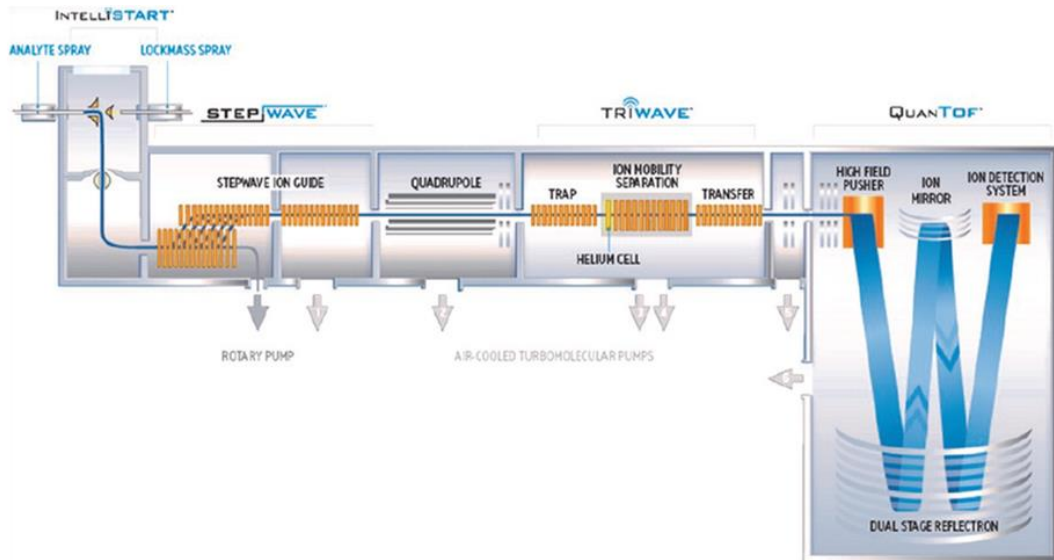


Figure 28 : Représentation du Synapt G2 de la société Waters.

Comme un spectromètre de masse classique, ces appareils peuvent être couplés à une méthode séparative [Zhang X. 2017]. Une quadruple information est dans ce cas obtenue pour chaque composé : temps de rétention, temps de drift, rapport m/z et spectre MS^2 .

3.4 Les détecteurs

Le rôle du détecteur est de convertir le courant ionique en un signal électrique. Plusieurs approches sont possibles pour détecter les ions :

- Détection des ions grâce à leur charge (cylindre de Faraday) ;
- Détection des ions par effet inductif (Orbitrap ou FTICR) ;
- Détection par émission électronique secondaire ;
- Détection par effet de saturation.

Dans ce manuscrit, seule la détection par émission électronique secondaire sera abordée puisqu'elle est la plus souvent rencontrée. Deux détecteurs seront donc présentés : le multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes et le multiplicateur à galettes de microcanaux. Cette technologie est notamment utilisée pour les spectromètres intégrant des TOF. L'Orbitrap utilise quant à elle une détection par effet inductif brièvement abordée dans la section 3.3.3.

3.4.1 Le multiplicateur d'électron à dynodes discrètes

Le multiplicateur d'électron à dynodes discrètes est le plus utilisé à l'heure actuelle. Il dérive directement des photomultiplicateurs développés dans les années 30 pour la détection de faible quantité de photons.

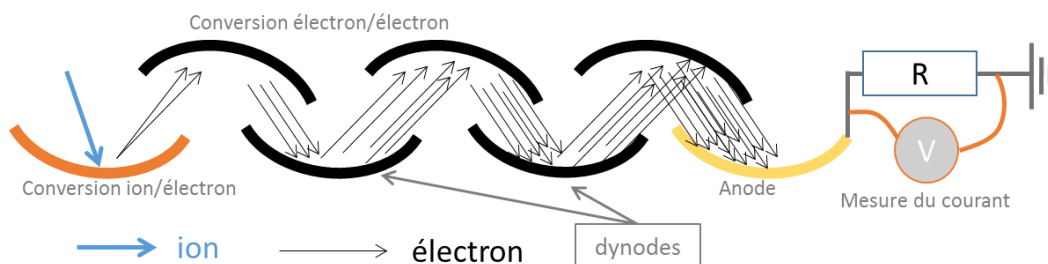


Figure 29 : Principe de fonctionnement du multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes.

Ce détecteur est constitué de dynodes en cascade (Figure 29). La première a pour rôle d'émettre un ou plusieurs électrons suite à l'impact d'un ion (convention ion/électron). Les autres ont pour rôle d'émettre un ou plusieurs électrons suite à l'impact d'un électron (conversion électron/électron). Une différence de potentiel de l'ordre de 100 V est appliquée entre chaque dynode de façon à faciliter l'émission électronique. L'augmentation de la différence de potentiel entre les dynodes permet d'augmenter le gain. En pratique, l'utilisateur augmente cette tension au cours du temps de façon à conserver un gain identique, malgré l'usure normale du détecteur.

Le nombre total de dynodes est généralement compris entre 16 et 24. Pour l'impact d'un seul ion, le nombre d'électrons émis est régi par la formule suivante :

$$N_{\text{electrons}} = \gamma_e \alpha^N$$

Avec $N_{\text{électrons}}$ le nombre d'électrons arrivant sur l'anode
 γ_e le nombre moyen d'électrons secondaires émis suite à l'impact de l'ion primaire
 α le nombre moyen d'électrons secondaires émis suite à l'impact d'un électron primaire
 N le nombre de dynodes

L'ordre de grandeur du nombre d'électrons arrivant sur l'anode (pour un ion primaire) est de 10^5 à 10^6 . En considérant qu'ils arrivent en 10 ns, le courant créé est de l'ordre de quelques μA , ce qui est mesurable³⁶.

Ce type de détecteur est rencontré sur des systèmes intégrant des quadripôles ou des pièges ioniques. Il n'est pas utilisé pour des TOF puisque la forme des dynodes conduit à des distances de parcours variables en fonction du point d'impact de l'ion primaire sur la première dynode. Deux ions identiques arrivant en 2 points différents du détecteur ne seraient donc pas détectés au même moment (perte de résolution).

3.4.2 Les galettes de microcanaux

Les galettes de microcanaux (MCP³⁷) ont été développées dans les années 70 dans le but de fabriquer des lunettes à vision nocturne. Elles ont depuis été détournées de leur application initiale pour des applications en spectrométrie de masse. En effet, le gros avantage de cette technologie est de ne pas induire de déviation temporelle (le lieu de l'impact primaire n'a pas d'influence sur la distance parcourue par les électrons secondaires). Elles sont capables de détecter des ions entre 1 et 100 000 Da [Fraser G.W. 2002].

Cette galette en verre très fine (env. 0,5 mm) peut avoir un diamètre compris entre 1 et plusieurs dizaines de centimètres. Les deux surfaces planes sont recouvertes d'un alliage métallique permettant d'appliquer une différence de potentiel (env. 1 kV). La galette est percée de plusieurs millions de canaux (2 à 20 μm de diamètre) non perpendiculaires à la surface. Lorsqu'un ion pénètre dans un canal, il heurte obligatoirement la paroi. Chaque canal agit ensuite comme un amplificateur d'électron. Le faible diamètre des canaux entraîne des vitesses de traversée identiques quel que soit l'endroit où l'ion primaire atterrit. Une galette fournit un gain d'environ 10^4 . Comme cette valeur est souvent insuffisante en spectrométrie de masse, plusieurs galettes peuvent être associées. Cette association se fait en chevron de manière de maximiser le nombre de collision et donc le gain (Figure 30).

³⁶ Source : Cours de G. Bolbach

³⁷ MicroChannel Plates

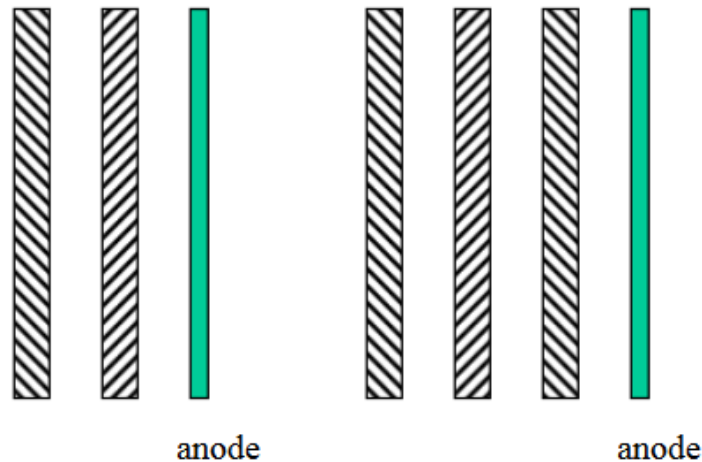


Figure 30 : Empilement des MCP dans l'objectif d'augmenter le gain en sensibilité³⁸.

3.5 Le traitement du signal

Le détecteur fournit un courant électrique sous la forme d'impulsions. Le passage de ce courant à travers d'une résistance permet de le convertir en une tension directement proportionnelle au courant et donc à l'intensité du courant ionique. Cette tension est ensuite amplifiée électroniquement avant de pouvoir être utilisée. Deux stratégies permettent ensuite de digitaliser le signal : le mode analogique et le mode comptage.

Dans tous les cas les valeurs obtenues sont mises en regard des réglages des analyseurs au même instant, de manière à remonter à la masse de l'ion dont l'intensité du courant est en train d'être déterminée.

3.5.1 Mode comptage

Le mode comptage (TDC³⁹) est utilisé lorsque le flux d'ions est faible. Dans le cas où la probabilité que deux ions frappent le détecteur en même temps est très faible ($\ll 1$), une variation du signal peut être reliée à la détection d'un seul ion. Il suffit alors de compter le nombre de variations pour connaître l'intensité du flux d'ions primaires. Il est possible de détecter la collision simultanée de deux ions en prenant en compte l'intensité du signal : si l'une des augmentations de signal est bien plus grande que les autres, cela signifie que deux ions sont arrivés en même temps sur le détecteur. L'avantage de ce détecteur est l'élimination d'une partie du bruit électronique.

3.5.2 Mode analogique

Le mode analogique (ADC⁴⁰) est utilisé lorsque le flux d'ions est important de façon à limiter l'effet des interférences dues à l'arrivée simultanée de plusieurs ions sur le détecteur. Le mode analogique conduit l'échantillonnage du signal (suivant le temps en TOF) et la valeur de la tension est mesurée à intervalles de temps réguliers. Le signal résultant n'est pas directement relié au nombre d'ions incidents (puisque à chaque impact le gain diffère légèrement ce qui entraîne des variations dans la tension amplifiée). Cependant, c'est actuellement le mode le plus utilisé en spectrométrie de masse car il permet d'avoir une grande gamme dynamique. Ce mode est utilisé par le spectromètre Q-TOF présent au laboratoire et par le Synapt G2-Si utilisé pour les expériences de mobilité ionique.

³⁸ Source : Cours de G. Bolbach

³⁹ Time-to-Digital Converter

⁴⁰ Analog Digital Converter

4 Le couplage de la SFC à la spectrométrie de masse

Le couplage de la SFC avec la spectrométrie de masse a longtemps été réalisé de manière artisanale par les utilisateurs. Les premiers couplages utilisaient des spectromètres de masse équipés de sources d'ionisation à pression réduite (EI ou CI), commercialisés pour des couplages avec la chromatographie en phase gazeuse. Aujourd'hui ces couplages ont été remplacés par des systèmes intégrant des sources à pression atmosphérique utilisés en HPLC-MS.

4.1 Les couplages avec des sources à pression réduite

L'une des principales contraintes lors de ce type de couplage réside dans la nécessité d'utiliser des hautes pressions pour la dimension séparative et celle d'utiliser des pressions réduites dans la source d'ionisation et le spectromètre de masse. Ce type de source est donc plus adapté à des systèmes intégrant des colonnes capillaires conduisant à l'utilisation de petits débits de phase mobile. En effet, compte tenu de la compressibilité de CO₂ supercritique, le volume occupé par le fluide supercritique est environ 300 à 500 fois plus réduit que celui de la phase gazeuse correspondante. Lorsqu'un couplage avec la SFC est nécessaire, les sources à pression réduite sont conçues de manière à accepter des débits entrants allant de quelques mL/min à la centaine de mL/min de gaz. Contrairement à la GC, ces débits de gaz importants nécessitent souvent la mise en place de plusieurs étages de pompage avant l'ionisation. La Figure 31 présente ce type d'interface développée en 1978 [Randall L.G. 1978]. Dans ce cas, le volume d'ions est séparé de l'arrivée de l'effluent chromatographique par deux chambres sous vide. Ce dispositif permet d'abaisser la pression pour s'approcher au maximum des valeurs utilisées lors des couplages GC-CI-MS.

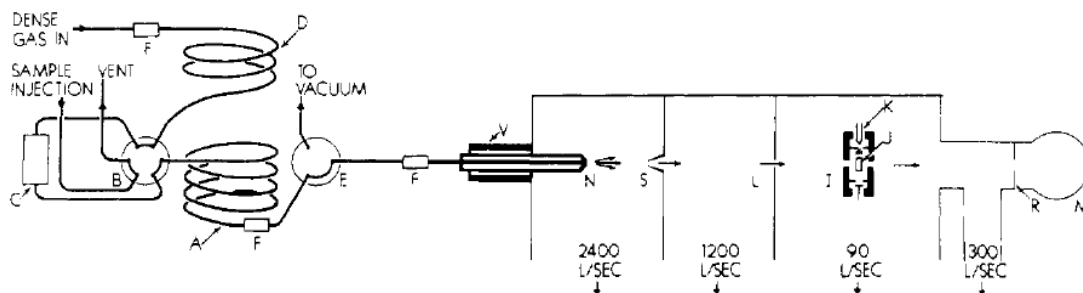


Figure 31 : Interface SFC-MS à introduction directe [Randall L.G. 1978].

Une introduction directe dans le volume d'ion est également possible (Figure 32). Dans ce cas, l'ionisation électronique est réalisée dans un vide moins poussé qu'en GC-EI-MS. La durée de vie du filament est donc diminuée mais l'ionisation s'opère tout de même. Dans cette configuration, la turbopompe d'origine (50 L/s) a été remplacée par une pompe possédant un débit plus important (150 L/s), de manière à accepter les débits mis en jeu par la cSFC et à limiter l'usure du filament [Murugaverl B. 1993].

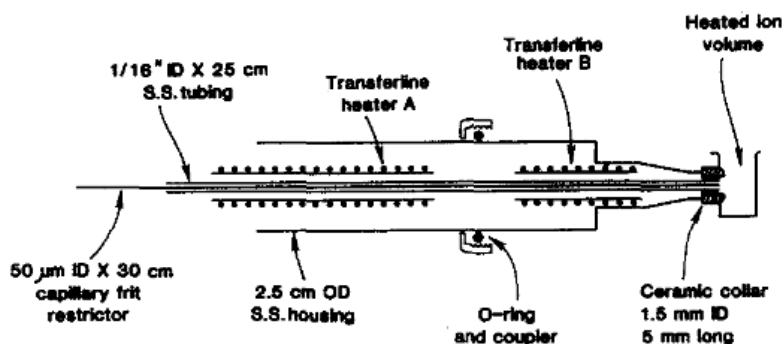


Figure 32 : Interface SFC-MS obtenue à partir d'un GC-MS [Murugaverl B. 1993].

Dans ces deux configurations, la pression est maintenue dans la colonne analytique à l'aide d'un restricteur (absence de régulateur de contre-pression). Ce restricteur a pour but de maintenir le circuit en amont sous pression tout en créant une sortie pour pouvoir appliquer un débit. Les restricteurs peuvent prendre plusieurs formes :

- long tube de faible diamètre interne (env. 50 μm);
- un tube terminé par un orifice de très faible diamètre (quelques μm) qui peut être obtenu par pincement d'un tube métallique ou par ponçage de l'extrémité d'un tube en silice fondue préalablement bouché à chaud.

Le restricteur linéaire proposera une détente lente le long du capillaire. Cette solution peut conduire à des précipitations à l'intérieur du restricteur compte tenu de la diminution progressive du pouvoir éluant. Un chauffage de la ligne de transfert permet de limiter ces phénomènes (Figure 32) mais la seconde solution est souvent celle qui est retenue. Elle permet une détente ponctuelle, ce qui limite le risque de précipitation. C'est ce type de restricteur qui est représenté en Figure 31.

Tout comme lors des couplages GC-MS, et bien que la pression y soit supérieure lors d'un couplage SFC-MS, la source EI permet d'obtenir des spectres riches en fragments. Une comparaison aux bibliothèques de spectres est donc possible afin de remonter à la structure de produits déjà décrits [Murugaverl B. 1993].

4.2 Les couplages avec des sources à pression atmosphériques

Les systèmes SFC actuels diffèrent de ceux utilisés dans les couplages précédemment présentés d'au moins 3 points :

- L'utilisation de colonnes remplies ayant des diamètres internes supérieures à 2 mm ;
- L'utilisation de co-solvants dans la phase mobile ;
- La régulation active de la pression grâce au régulateur de pression.

Dans ces conditions, les débits mis en jeu sont de l'ordre du mL/min de fluide supercritique (ou subcritique). Ces débits ne sont plus du tout compatibles avec des sources à pression réduites. L'utilisation des sources à pression atmosphériques, qui fonctionnent déjà en couplage avec la HPLC, s'avère donc nécessaire. Le couplage avec la spectrométrie de masse peut intervenir avant ou après la régulation de contre-pression.

4.2.1 Couplage *post passage* dans le régulateur de contre-pression

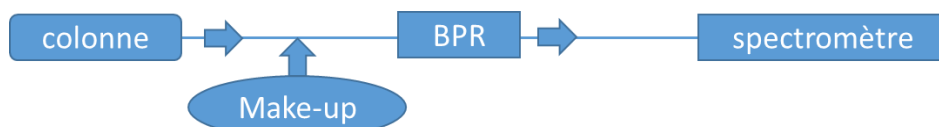


Figure 33 : Couplage SFC-MS avec une détente assurée par le BPR.

L'entrée de l'effluent chromatographique dans la source d'ionisation peut se faire après son passage dans le régulateur de contre-pression (BPR). Dans ce cas, l'effluent est détendu dans le BPR et la sortie du BPR est reliée à la source d'ionisation grâce à un capillaire de transfert [Pinkston J.D 2005]. Après détente, le fluide ne permet plus une bonne solvatisation des analytes. Ces derniers peuvent alors précipiter dans le capillaire de transfert, dégradant ainsi la réponse obtenue. L'ajout d'un solvant, appelé solvant « make-up », permet d'entraîner les analytes jusqu'à la source d'ionisation. Ce solvant aide également à l'ionisation en solution dans le cas de l'utilisation d'une source *electrospray*. Ce solvant est introduit dans le flux chromatographique à l'aide d'un raccord de type

« T » ou « Y ». Cette introduction se fait en amont du BPR. Cette configuration a été utilisée au laboratoire jusqu'à mai 2017.

Bien que permettant d'injecter l'ensemble de l'effluent chromatographique, ce qui est intéressant pour obtenir une bonne sensibilité, ce type de configuration induit d'importants volumes morts extra-colonne de par le passage au travers du BPR. C'est pourquoi un système de split *pre* BPR a été mis en place.

4.2.2 Couplage avec split en amont du régulateur de contre-pression

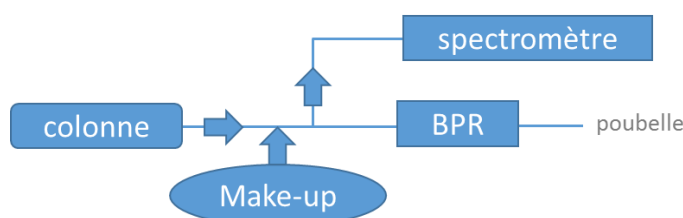


Figure 34 : Couplage SFC-MS utilisant un splitter en amont du BPR.

L'utilisation d'un *splitter* en amont du BPR permet de limiter au maximum les volumes morts du système et par conséquent de limiter la perte d'efficacité due à l'instrument. C'est le couplage le plus rencontré aujourd'hui [Grand-Guillaume Perrenaud A. 2014]. Dans cette configuration, seule une partie de l'échantillon est introduite dans la source d'ionisation mais une meilleure efficacité de la séparation permet de contrecarrer cette perte de matière (pics plus fins mais d'intensité voisine). Dans cette configuration, le BPR a toujours pour rôle de réguler la pression du système. Le *splitter* crée une petite fuite dans le circuit que le BPR doit être en mesure de prendre en charge. Le débit de la fuite dépend de la longueur et du diamètre du capillaire qui relie le splitter à la source d'ionisation ainsi que de la pression à laquelle est réglée le BPR. Dans la pratique, le capillaire utilisé à une longueur d'environ 1 m et un diamètre interne de 50 μm . Ce capillaire permet de détendre l'effluent chromatographique. Au cours de la détente, le fluide perd ses capacités de solvation ce qui nécessite également l'utilisation d'un solvant make-up.

4.3 Le système présent au laboratoire

Le laboratoire possède une chaîne SFC « 1260 Infinity Analytical SFC » de la société Agilent Technologies présentée schématiquement en Figure 35. Elle est composée d'un module SFC **(1)** intégrant une pompe « booster » réfrigérée, chargée de pomper du CO_2 gazeux et de fournir du CO_2 comprimé à la pompe suivante, et du BPR, chargé de maintenir le système en pression de manière indépendante au débit de phase mobile demandé. Le bloc **(2)** est très similaire à un système UHPLC. Il intègre un module de dégazage de solvant **(2.1)**, une vanne 12 positions pour la sélection du co-solvant **(2.2)**, une pompe binaire **(2.3)** chargée de délivrer la phase mobile au bon débit et dans la bonne composition (P_{max} : 600 bar / D_{max} : 5 mL/min), d'un passeur/injecteur d'échantillon thermostaté **(2.4)** utilisant une boucle d'injection de 1,2 μL , de deux modules thermostatés pour colonnes analytiques **(2.5)** équipés chacun d'une vanne de sélection et permettant la mise en place de 8 colonnes de 50 mm au maximum et d'un détecteur UV/Visible **(2.6)** intégrant une cellule haute pression de 5 ou 13 μL (trajet optique de 6 ou 10 mm).

L'interface avec la spectrométrie de masse a été réalisée quasiment exclusivement après détente par le BPR (Figure 33). Seules quelques expériences ont été réalisées à l'aide d'un splitter (Figure 34). La pompe isocratique **(3)** a pour rôle d'injecter le solvant make-up avant le BPR. Un caloritherm **(4)** permet de chauffer la fin du capillaire de transfert dans le but de stabiliser le spray sortant du nébuliseur (il évite la congélation due à la détente du CO_2).

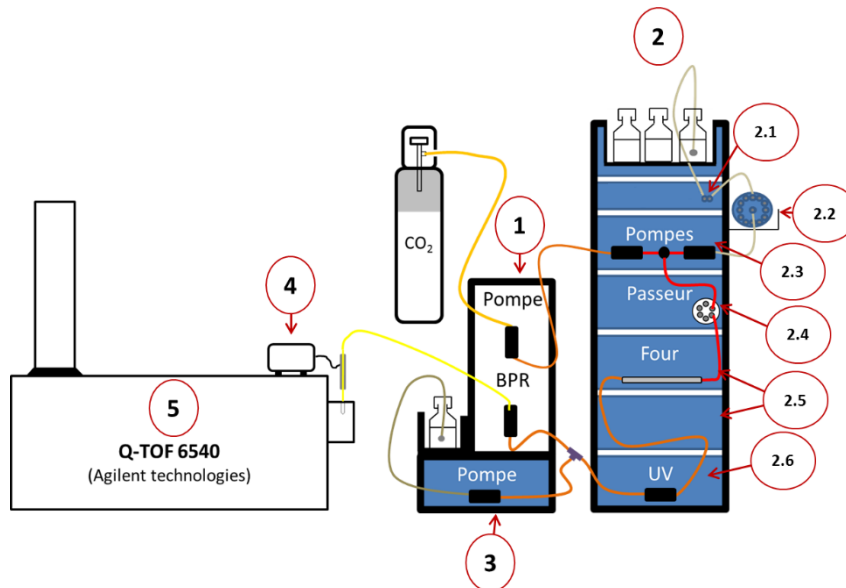


Figure 35 : Représentation schématique du système présent au laboratoire. 1 module SFC, 2 module type HPLC, 2.1 dégazeur, 2.2 vanne de sélection co-solvant, 2.3 pompe binaire, 2.4 injecteur, 2.5 fours à colonnes, 2.6 détecteur UV/Visible, 3 pompe primaire, 4 caloritherm, 5 Q-TOF 6540.

Le spectromètre de masse utilisé est un système Q-TOF 6540 de la même société (5). Il est présenté dans la Figure 36. Il permet d'obtenir une résolution de l'ordre de 20 000 ou 40 000 (en fonction du mode d'acquisition) à m/z 922 et une précision en masse inférieure à 2 ppm grâce à un étalonnage interne. Les vitesses maximum d'acquisition sont de 20 et 10 scan/s en mode MS et MS² respectivement.

Quatre sources d'ionisations sont disponibles au laboratoire : une source APPI, une source APCI et deux sources ESI (l'une classique et l'autre dite « Jet Stream » pour laquelle un flux d'azote chauffé permet de focaliser le spray et d'aider à la désolvation).

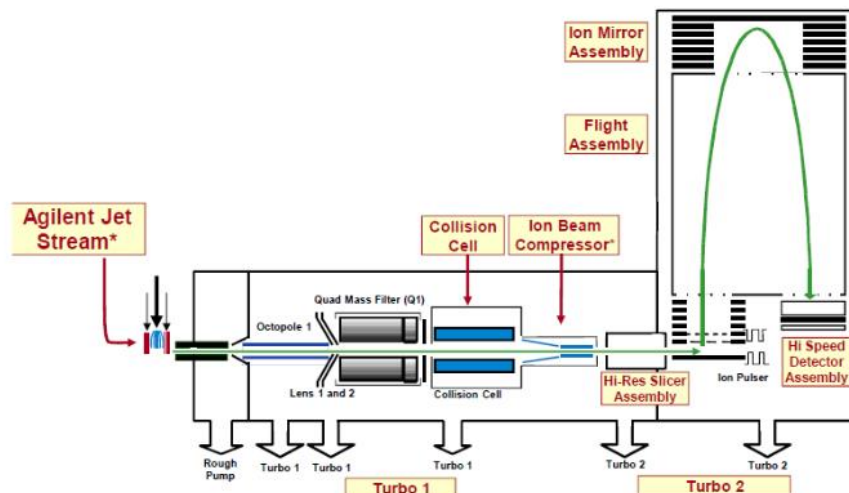


Figure 36 : Représentation schématique du QTOF 6540 (source : Agilent Technologies).

La mise en œuvre de ce système est présentée *via* différents projets dans les chapitres suivants où des méthodes d'analyses ciblées et non ciblées sont mises au point dans le but d'étudier des mélanges complexes de produits naturels moyennement polaires et polaires.

5 Références

A.

[Andrews T. 1869] Andrews T. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 1869; 159:575.

B.

[Berger T.A. 1990] Berger T.A., Deye J.F. *J. Chromatogr. Sci.* 1990; 29:54.

[Berger T.A. 1991a] Berger T.A., Deye J. F. *J. Chromatogr. A.* 1991; 547:377.

[Berger T.A. 1991b] Berger T.A., Deye J.F. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1991; 14:312.

[Berger T.A. 1993] Berger T.A., Wilson W.H. *Anal. Chem.* 1993; 65:1451

[Berger T.A. 2015] Berger T. A., *Supercritical Fluid Chromatography. Primer.* Agilent Technologies. 2015.

[Braumann U. 1997] Braumann U., Händel H., Strohschein S., Spraul M., Krack G., Ecker R., Albert K. *J. Chromatogr. A.* 1997; 761:336.

[Bruins A.P. 1991] Bruins A. P. *Mass Spectrom. Rev.* 1991; 10:53.

C.

[Cesh N.B. 2001] Cesh N. B., Enke C. G. *Mass. Spectrom. Rev.* 2001; 20:362.

[Crowther J.B. 1985] Crowther J. B., Henion J. D., *Anal. Chem.* 1985; 57:2711.

D.

[De Hoffmann E. 2005] De Hoffmann E., Stroobant V. *Spectrométrie de masse.* 3ème édition. Dunod. Paris. 2005. P 42-68, 79-87, 107-124.

[De Villiers A. 2006] De Villiers A., Lauer H., Szucs R. Goodall S., Sandra P. *J. Chromatogr. A.* 2006; 1113:84.

[Dempster A.J. 1918] Dempster A.J. *Phys. Rev.* 1918; 22:316.

[Desfontaine V., 2017] Desfontaine V., Tarafder A., Hill J., Fairchild J., Grand-Guillaume Perrenoud A., Veuthey J.-L., Guillarme D. *J. Chromatogr. A.* 2017; 1511:122,

[Deye J.F. 1990] Deye J.F., Berger T.A., Anderson A.G. *Anal. Chem.* 1990; 52:615.

[Dole M. 1968] Dole M., Hines R. L., Mack R. C., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B. *J. Chem. Phys.* 1968; 49:2240.

F.

[Fairchild J.N. 2013] Fairchild J.N., Hill J.F., Iraneta P.C. *LCGC North America.* 2013; 31:326.

[Fekete S. 2011] Fekete S., Fekete J. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218:5286.

[Fenn J.B. 1989] Fenn J.B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. *Science.* 1989; 246:64.

[Fraser G.W. 2002] Fraser G.W. *Int. J. Mass Spectrom.* 2002; 215:13.

G.

[Gomez A. 1994] Gomez A., Tang K. *Phys. Fluids*. 1994; 6:404.

[Grand-Guillaume Perrenoud A. 2012] Grand-Guillaume Perrenoud A., Boccard J., Veuthey J.-L., Guillarme D. *J. Chromatogr. A*. 2012; 1262:205.

[Grand-Guillaume Perrenoud A. 2013] Grand-Guillaume Perrenoud A., Hamman C., Goel M., Veuthey J.-L., Guillarme D., Fekete S. *J. Chromatogr. A*. 2013; 1314:288.

[Grand-Guillaume Perrenoud A. 2014] Grand-Guillaume Perrenoud A., Veuthey J.-L., Guillarme D. *J. Chromatogr. A*. 2014; 1339:174.

[Gritti F. 2010] Gritti F., Leonardis I., Abia J., Guiochon G. *J. Chromatogr. A*. 2010; 1217:3819.

[Guilhaus M. 1995] Guilhaus M. *J. Mass Spectrom.* 1995; 30:1519.

I.

[Iribarne J.V. 1976] Iribarne J. V., Thompson B. A. *J. Chem. Phys.* 1976; 64:2287.

F.

[Kallio H. 1989] Kallio H., Laakso P., Huopalahti R., Lonko R.R. *Anal Chem.* 1989; 61:968.

[Kanu A.B. 2007] Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill Jr. H.H. *J. Mass Spectrom.* 2008; 43:1.

[Karas M. 1987] Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom.* 1987; 78:53.

[Kingdon K.H. 1923] Kingdon K.H. *Phys. Rev.* 1923; 21:408.

[Klesper E. 1962] Klesper E., Corwin A. H., Turner D.A. *J. org. Chem.* 1962; 27:700.

L.

[Lesselier E. 2012] Lesellier E., Destandau E., Grigoras C., Fougère L., Elfakir C. *J. Chromatogr. A*. 2012; 1268:157.

[Lesselier E. 2015] Lesellier E., West C. *J. Chromatogr. A*. 2015; 1382:2.

M.

[Makarov A. 2000] Makarov A. *Anal. Chem.* 2000; 2:1156.

[Mamyryn B.A. 1973] Mamyryn B. A., Karataev V. I., Schmikk D. V., Zagulin V. A. *Sov. Phys. JEPT*. 1973; 37:45.

[Markides K.E. 1986] Markides K.E., Lee E.D., Bolick R., Lee M.L. *Anal Chem.* 1986; 58:740.

[McDaniel E.W. 1962] McDaniel E.W., Martin D.W., Barnes W.S. *Rev. Sci. Instrum.* 1962; 33:2.

[Morrissay M.A. 1991] Morrissey M. A., Widmer H. M. *J. Chromatogr. A*. 1991; 552:551.

[Murugaverl B. 1993] Murugaverl B., Voorhees K.J. *J. Chromatogr.* 1993; 633:195.

N.

[Novalova L. 2014] Nováková L., Grand-Guillaume Perrenoud A., François I., West C., Lesellier E., Guillarme D. *Analytica Chimica Acta*. 2014; 824:18.

P.

[Paul W. 1953] Paul W., Steinwedel H. S. Z. Naturforsch. 1953; 8a:448.

[Peaden P.A. 1982] Peaden P.A., Fjeldsted J.C., Lee M.L., Springston S.R., Novotny M. Anal. Chem. 1982; 54:1090.

[Peaden P.A. 1983] Peaden P.A., Lee M.L. J. Chromatogr. 1983; 259:1.

[Pinkson J.D. 2005] Pinkston J. D. Eur. J. Mass Spectrom. 2005; 11:189.

[Pinkson J.D. 2006] Pinkston J., Wen D., Morand K.L., Tirey D.A., Stanton D.T. Anal. Chem. 2006; 78:7467.

R.

[Randall L.G. 1978] Randall L.G., Wahraftig A.L. Anal. Chem. 1978; 50:1703.

[Robb D.B. 2000] Robb D.B., Covey T.R., Bruins A.P. Anal. Chem. 2000; 72:3653.

[Rohner T.C. 2004] Rohner T. C., Lion N, Girault H. H. Phys. Chem. Ch. Ph. 2004; 6:3056.

S.

[Schwartz H.E. 1987] Schwartz H. E. LC-GC. 1987; 5:14.

[Shafer K.S. 1983] Shafer K.H. Anal. Cham. 1983; 55:1939.

[Smith S.A. 1990] Smith S.A., Shenai V., Matthews M.A. J. Supercritical Fluids. 1990; 3:175.

[Snyder L.R. 1974] Snyder L.R. J. Chromatogr. 1974; 92:230.

[Snyder L.R. 1978] Snyder L.R. J. Chromatogr. Sci. 1978; 16:223.

[Stephens W. 1946] Stephens W., Phys. Rev. 1946; 69:691.

[Sugiyama K. 1985] Sugiyama K., Saito M., Hondo T., Senda M. J. Chromatogr. 1985; 332:107.

T.

[Tanaka K. 1987] Tanaka K., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. About Laser Ionization Mass Spectrometry 14-Kai BMS Danwakai Koen Yoshishu. Collected Lecture Cores for 14th BMS Talks. 1987.

[Taylor L.T. 2009] Taylor L. T. J. of Supercritical Fluids. 2009; 47:566.

[Thiébaud D. 2016] Thiébaud D. Chromatographie en phase supercritique. Techniques de l'ingénieur. 2016. réf : P1460V4

[Turner C. 2001] Turner C., King J. W., Mathiasson L. J. Chromatogr. A. 2001; 936:215.

W.

[Wen D. 2000] Wen D., Olesik S.V. Anal. Chem.2000; 72:475.

[West C. 2008] West C., Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2008; 1191:21.

[West C. 2013] West C. Chromatoragraphy Today. 2013; 6:22,

[West C. 2016] West C., Lemasson E., Bertin S., Hennig P., Lesellier E. J. Chromatr. A. 2016; 1440:212.

[West C. 2017] West C., Melin J., Ansouri H., Metogo M.M. J. Chromatogr. A. 2017; 1492:136.

[Wiley W.C. 1995] Wiley W.C., McLaren J.B. Rev. Sci. Instrum. 1955; 26:1150.

Z.

[Zhang X. 2017] Zhang X., Kew K., Reisdorph R., Sartain M., Powell R., Armstrong M., Quinn K., Cruickshank-Quinn C., Walmsley S., Bokatzian S., Darland E., Rain M., Imatani K., Reisdorph N. Anal. Chem. 2017; 89:6384.

CHAPITRE II

Étude des acétogénines d'Annonaceae

Partie A

Étude structurale par spectrométrie
de masse tandem

Partie B

Étude de la conformation des adduits
d'acétogénines et des voies de fragmentation
induites par la nature du cation métallique

CHAPITRE IIA

Étude structurale par spectrométrie de masse tandem

Mise au point d'une méthode d'analyse structurale des
acétogénines d'Annonaceae dans un extrait de graine
d'*Annona muricata* L. par SFC-HRMS/MS et cationisation
métallique post-colonne

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique

L. Laboureur, N. Bonneau, P. Champy, A. Brunelle, D. Touboul. Structural Characterisation of Acetogenins from *Annona muricata* by Supercritical Fluid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry, *Phytochemical Analysis*, **2017**, DOI 10.1002/pca.2700

Plan du chapitre

1	Les acétogénines d'Annonaceae.....	61
1.1	Des Annonaceae à l'espèce <i>Annona muricata</i> L.	61
1.2	Les acétogénines d'Annonaceae	61
1.3	Contexte général de l'étude	64
1.4	Les outils d'analyse structurale des acétogénines dans les extraits naturels	65
1.4.1	La résonance magnétique nucléaire (RMN)	65
1.4.2	La spectrométrie de masse en introduction directe	66
1.4.3	La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie	66
1.4.4	Objectifs de ce projet	67
2	Matériels et Méthodes	67
2.1	Les standards	67
2.2	L'extrait de plante	68
2.3	La chromatographie en phase supercritique	68
2.4	La chromatographie en phase liquide	69
2.5	La cationisation au lithium post-colonne	69
2.6	Le spectromètre de masse	70
3	Développement d'une méthode de séparation par SFC.....	71
3.1	Criblage des phases stationnaires	71
3.2	Choix de la phase mobile.....	72
3.2.1	Le co-solvant.....	73
3.2.2	Mise au point d'un gradient d'élution.....	73
3.3	Optimisation des autres paramètres chromatographiques.....	74
3.3.1	Influence de la température du four à colonne	75
3.3.2	Influence du débit de la phase mobile	75
3.3.3	Influence de la contre-pression.....	76
3.3.4	Influence du volume d'injection.....	76
3.4	Méthode chromatographique optimisée.....	76
3.5	Détection des acétogénines en SFC-MS.....	77
3.6	Comparaison de la sensibilité et de la linéarité avec la HPLC	78
4	Développement d'une méthode HRMS/MS pour l'analyse structurale des acétogénines	80
4.1	Présentation de la nomenclature des fragments.....	80
4.2	Historique de l'utilisation de sels de lithium	82
4.3	Introduction des ions lithium dans le système SFC-HRMS/MS	84
4.3.1	Utilisation du pousse-seringue	84

4.3.2	Solvant make-up.....	85
4.3.3	Optimisation de la concentration.....	85
4.4	Fragmentation des adduits au lithium	88
4.4.1	Choix de l'énergie de collision	88
4.4.2	Spectres MS/MS obtenus pour l'annonacine.....	91
5	Étude des acétogénines de l'extrait de graine	92
5.1	L'annonacinone (C ₃₅ H ₆₂ O ₇)	93
5.2	Isomères de la gonionenine (C ₃₇ H ₆₆ O ₇)	94
5.1	Isomères de la montanacine-D (C ₃₅ H ₆₀ O ₇).....	97
6	Conclusion	98
7	Références.....	99
8	Annexe 1 : Structures des acétogénines étudiés	102
9	Annexe 2 : Listes des fragments par acétogénines	104
9.1	L'annonacine	105
9.2	La squamocine.....	106
9.3	L'annonacinone	107
9.4	La gonionenine	107
9.5	Isomère A de la gonionenine.....	108
9.6	Isomère B de la gonionenine.....	108
9.7	La montanacine-D	109

Table des illustrations

Figure 37 : Photos du fruit d' <i>Annona muricata</i> (corossol). A gauche le fruit entier. A droite la pulpe et les gaines.	61
Figure 38 : Structure générale des acétogénines d'Annonaceae.....	62
Figure 39 : Structures des standards utilisés.....	68
Figure 40: Chromatogrammes obtenus lors du criblage de colonne en SFC.	72
Figure 41 : Influence et choix du gradient en SFC sur la colonne 2-EP.	74
Figure 42 : Influence de la température, du débit de la phase mobile et de la contre-pression sur la séparation SFC obtenue avec la colonne 2-EP.	75
Figure 43 : Influence du volume d'injection sur la séparation obtenue en SFC. Extrait de graines. EIC de l'adduit au sodium des isomères de l'annonacine (m/z 619,4544).....	76
Figure 44 : Spectre de masse obtenu pour l'annonacine dans l'extrait de graine (SFC-MS, Tr : 7,7 min).	78
Figure 45 : Comparaison de la linéarité observée pour l'adduit au sodium de l'annonacine en utilisant la SFC (a) et (b) et la HPLC (c) et (d). (b) et (d) sont des zooms de (a) et (c).	79
Figure 46 : Illustration de la nomenclature des fragments obtenus en MS/MS.....	81
Figure 47 : Mécanismes de fragmentation proposés par Laprévote.	81
Figure 48 : Spectre de masse de la squamocine obtenu par FAB-MS.	82
Figure 49 : Effet des sels de lithium sur les spectres MS/MS de l'annonacine en introduction directe. Spectre MS/MS MALDI ToF-ToF à 2 keV sur $[M+Na]^+$ (a) et $[M+Li]^+$ (b). Spectre MS/MS ESI (LTQ-Orbitrap®, CID 50, 33 ms) sur $[M+Na]^+$ (c) et $[M+Li]^+$ (d).	83
Figure 50 : Effet des sels de lithium sur le TIC lors de l'étude d'un extrait naturel par HPLC-MS....	84
Figure 51 : Schéma du système SFC-HRMS/MS. Positionnement du pousse-seringue pour infusion d'iodure de lithium.	84
Figure 52 : Influence de la concentration en iodure de lithium dans le solvant make-up sur le signal correspondant aux adduits au sodium (a-c) et au lithium (d-f) des isomères de l'annonacine (m/z 619,4544 et m/z 603,4806) dans l'extrait de graine.	87
Figure 53 : Effet de la composition du gradient sur la concentration en sels de lithium au niveau de la source d'ionisation.....	88
Figure 54 : Intensités relatives des différents ions précurseurs et fragments de l'annonacine obtenus après fragmentation de son adduit au lithium pour différentes valeurs d'énergie (de 0 à 100 eV avec un pas de 5 eV) dans la cellule de collision.	90
Figure 55 : Spectres MS/MS du pic majoritaire de l'EIC des isomères de l'annonacine (m/z 603,4806) contenus dans l'extrait de graine, à 60 et 80 eV.	92
Figure 56 : Structure de l'annonacinone.	93
Figure 57 : EIC du rapport m/z correspondant à l'adduit au lithium de l'annonacinone (601,4656) après injection de l'extrait de graine en HPLC (a) et en SFC (b).	93
Figure 58 : Spectres MS/MS du pic majoritaire sur l'EIC de l'annonacinone (Figure 57).	94
Figure 59 : EIC du rapport m/z correspondant aux adduits au lithium des isomères de la gonionenine (m/z 629,4963) après injection de l'extrait de graine en HPLC (a) et en SFC (b).	95
Figure 60 : Structure de la gonionenine.	95
Figure 61 : Structure proposée pour le pic A de la Figure 59.....	96
Figure 62 : Structure proposée pour le pic B de la Figure 59.....	96
Figure 63 : EIC du rapport m/z correspondant aux adduits au lithium des isomères de la montanacine-D (599,4500) après injection de l'extrait de graine en mode SFC.	97
Figure 64 : Structure de la montanacine-D.	97

Figure 65 : EIC du fragment Y_2 (m/z 431.3713) provenant de l'adduit au lithium des isomères de la montanacine-D (599,4500) après injection de l'extrait de graine en mode SFC. 97

1 Les acétogénines d'Annonaceae

1.1 Des Annonaceae à l'espèce *Annona muricata* L.

Les Annonaceae constituent une famille de plantes comptant 2300 espèces et 130 genres, se présentant sous plusieurs formes : des arbres (15-20 m) des arbustes et arbrisseaux (1-10 m) ou encore des lianes [Takhtajana A. 1986]. À l'état naturel, les Annonaceae sont principalement retrouvées dans les forêts de basse altitude, à des latitudes tropicales. Certaines sont également cultivées dans le bassin méditerranéen.

Le genre *Annona* compte à l'heure actuelle environ 120 espèces principales, originaires de la zone tropicale du continent américain. Ce genre est aujourd'hui particulièrement répandu puisque plusieurs de ces espèces sont cultivées pour leurs fruits comestibles. C'est le cas de l'*Annona muricata* L., communément appelé corossolier, dont le fruit est le corossol. Le corossol (Figure 37) se présente sous la forme d'un fruit de couleur verte dont la peau est parsemée d'épines souples. Il peut peser jusqu'à 3 kg pour les variétés les plus imposantes. La pulpe est blanche crème et d'aspect granuleux. Chaque fruit contient plus ou moins de graines (de quelques dizaines à 200) noires mesurant 1 à 2 cm de long. Le corossol est consommé sous la forme de fruit entier, de jus, de milkshake et peut également être cuit. Les feuilles et l'écorce d'*Annona muricata* L. sont également utilisées en médecine traditionnelle pour des propriétés sédatives, astringentes ou tonicardiaques, partout où croît l'espèce. Enfin plus récemment, des compléments alimentaires contenant des extraits d'Annonaceae ont fait leur apparition sur des sites internet aux États-Unis, en Amérique du sud ainsi qu'en Europe, diverses parties du fruit étant autorisées dans ces produits. Les vendeurs leur attribuent des propriétés anticancéreuses en se basant sur les articles scientifiques relatant la cytotoxicité par inhibition du complexe I de la mitochondrie exercée par une famille de molécules présente dans la plante : les acétogénines d'Annonaceae [Mc Laughlin J.L. 2008].



Figure 37 : Photos du fruit d'*Annona muricata* (corossol). À gauche le fruit entier. À droite la pulpe et les graines. D'après la thèse de Jessica Le Ven [Le Ven J. 2012].

1.2 Les acétogénines d'Annonaceae

Les acétogénines d'Annonaceae appartiennent à la grande famille des lipides. Polyacétates plutôt apolaires, elles possèdent une forte homogénéité structurale. Comme l'illustre la Figure 38, leur structure peut être décomposée en plusieurs parties :

- Une longue chaîne carbonée composée de 32 ou 34 carbones,
- Une γ -méthyl- γ -lactone terminale, généralement insaturée,
- Un ou plusieurs hétérocycles (le plus souvent furanique ou pyranique),
- Des fonctions oxygénées (hydroxyle, cétone).

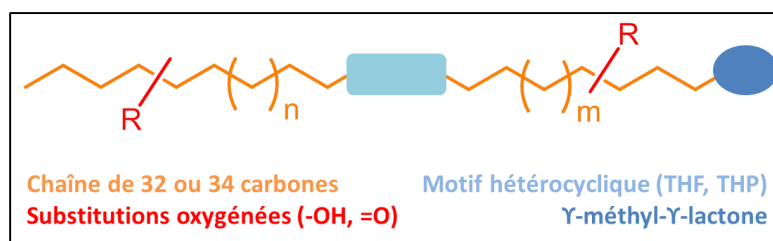


Figure 38 : Structure générale des acétogénines d'Annonaceae.

Les acétogénines comportent donc généralement 35 ou 37 carbones au total (chaîne + lactone). Il en résulte un nombre restreint de formules brutes mais un nombre important d'isomères pour chacune de ces formules brutes. Les structures des principales acétogénines citées dans ce manuscrit sont présentées dans l'annexe 1.

Les acétogénines d'Annonaceae sont classées suivant le motif hétérocyclique d'une part et l'environnement de la lactone d'autre part. Deux classifications coexistent actuellement et sont présentées dans le Tableau 5 et le Tableau 6. La plus simple est celle définie par Cavé en 1997. Le type est défini par la partie hétérocyclique⁴¹ (mono-THF, bis-THF adjacent, bis-THF non adjacent ou Tri-THF). Le sous-type est quant à lui défini par la structure et l'environnement de la lactone (présence ou non d'un hydroxyle en β du noyau lactonique, présence d'un groupement propanone ou d'un hydroxyle sur la lactone, etc.). Cependant, la classification proposée par Cavé ne permet pas de classer les composés contenant un hétérocycle autre que le cycle furanique. La seconde classification est celle initiée par Cortès [Cortès D. 1993] et complétée plus récemment par Bermejo [Bermejo A. 2005]. Elle utilise une autre nomenclature et est plus complète que la première puisqu'elle inclut les cycles pyraniques ou époxydiques.

Après la découverte de la première acétogénine, l'uvaricine, en 1982 [Jolad S.D. 1982], la famille des Annonaceae a connu un fort engouement en raison des propriétés cytotoxiques, antiparasitaires, pesticides et antimicrobiennes de cette classe de molécules. Près de 600 acétogénines ont depuis été isolées [Bonneau N. 2015, Bermejo A. 2005, Liaw C.-C. 2010]. Cependant, depuis une dizaine d'années, leur utilisation informelle à des fins anticancéreuses, en raison de leur importante cytotoxicité [Liaw C.-C. 2010, Mc Laughlin J.L. 2008] est à mettre en opposition avec leur implication probable dans l'apparition de parkinsonismes atypiques chez les consommateurs d'Annonaceae alimentaires ou médicinales.

⁴¹ THF :Tétrahydrofurane. THP : Tétrahydropyrane

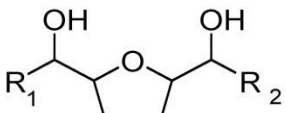
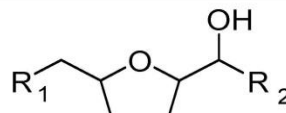
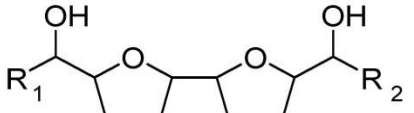
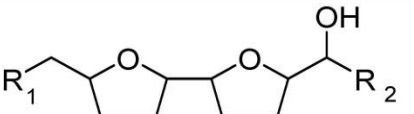
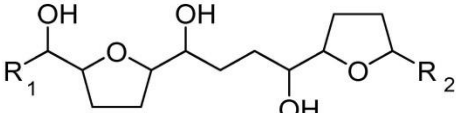
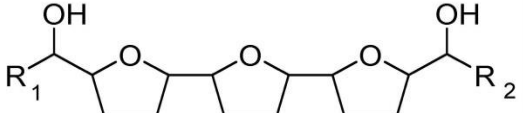
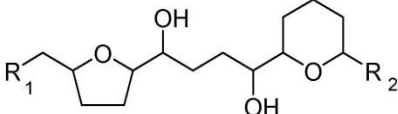
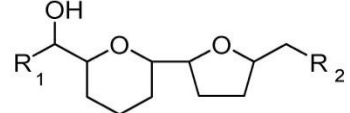
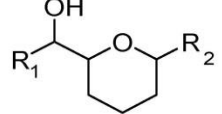
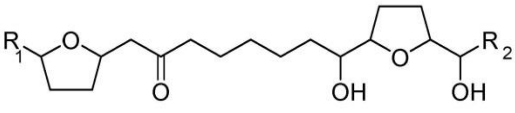
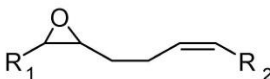
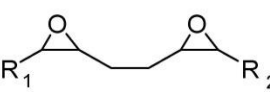
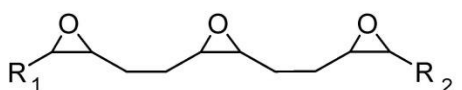
	Cavé <i>et al.</i>	Zafra-Polo <i>et al.</i> et Bermejo <i>et al.</i>	Structure
Type	Type A Mono THF	T-A α, α' -dihydroxylé	
		T-B α -hydroxylé	
	Type B Bis-THF à cycles adjacents	T-C Bis-THF adjacent α, α' -dihydroxylé	
		T-E Bis-THF adjacent α -hydroxylé	
	Type C Bis-THF à cycles non adjacents	T-D	
	Type D Tri-THF adjacents	T-F	
	Type G	T-G.1 Mono-THP α -hydroxylé non adjacent à un THF α' -hydroxylé	
		T-G.2 Mono-THP α -hydroxylé adjacent à un THF	
		T-G.3 Mono-THP	
		T-H Bis-THF non adjacents avec cétone entre les deux noyaux THF	
		E-A mono-époxyde avec double liaison	
		E-B Bis-époxyde	
		E-C Tri-époxyde	

 Tableau 5 : Nomenclatures des acétogénines : les différents types selon Cavé *et al.* ou Zafra-Polo *et al.* enrichis par Bermejo *et al.* [Cavé A. 1997, Zafra-Polo M.-C. 1998, Bermejo A. 2005]

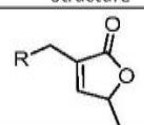
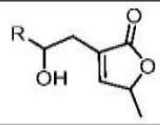
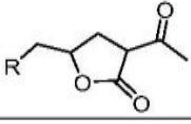
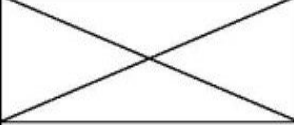
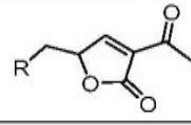
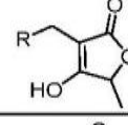

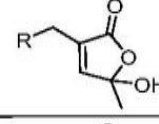
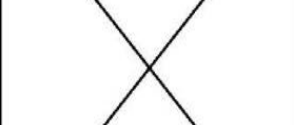
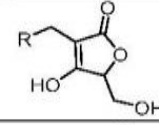

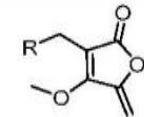
	Cavé <i>et al.</i>	Zafra-Polo <i>et al.</i> et Bermejo <i>et al.</i>	Structure
Sous-type	sous-type 1a γ-méthyl-γ-lactone-α,β-insaturée	L-A1a	
	sous-type 1b γ-méthyl-γ-lactone-α,β-insaturée et hydroxyle en β du noyau lactonique (C-4)	L-A1b	
	sous-type 2 γ-lactone saturée substituée par un groupement propanone	L-B1	
		L-B2 γ-méthyl-γ-lactone-α,β-insaturée substituée par un groupement propanone	
	sous-type 3 γ-méthyl-γ-lactone saturée portant un hydroxyle en β	L-C	
		L-D α-acétyl-γ-lactone-α,β-insaturée	
		L-E γ-hydroxyméthyl-γ-lactone saturée	
		L-F β-méthoxy-γ-méthylène-γ-lactone-α,β-insaturée	

Tableau 6 : Nomenclatures des acétogénines : les différents sous-types selon Cavé *et al.* ou Zafra-Polo *et al.* enrichie par Bermejo *et al.* [Cavé A. 1997, Zafra-Polo M.-C. 1998, Bermejo A. 2005]

1.3 Contexte général de l'étude

La maladie de Parkinson idiopathique est une maladie neurodégénérative décrite pour la première fois au début du XIX^e siècle [Parkinson J. 1817]. À un stade avancé, elle se caractérise par l'apparition de symptômes traduisant la destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire (raideur, lenteur des mouvements et tremblements au repos). Actuellement, le traitement proposé consiste en l'administration de L-DOPA, précurseur de la dopamine, qui permet de réduire les effets de la maladie sur le patient sans toutefois le soigner. La lutte contre la maladie de Parkinson est devenue aujourd'hui un souci de santé mondial puisqu'elle touche près de 5 millions de personnes dans le monde [Dorsey E.R. 2007]. La France compte quant à elle 200 000 malades avec environ 25 000 nouveaux cas diagnostiqués par an à l'âge moyen de 58 ans⁴².

Certaines formes de la maladie de Parkinson associent d'autres signes cliniques que la triade citée précédemment, dont des signes cognitifs. Le monde médical parle alors de parkinsonismes atypiques. Ce terme regroupe les affections neurodégénératives associant un syndrome parkinsonien

⁴² Source : site internet de l'association France Parkinson : www.franceparkinson.fr (consulté le 15 juin 2017)

insensible (ou faiblement sensible) à la dopathérapie à d'autres syndromes neurologiques. Les neurologues ont mis en place des critères symptomatiques pour différencier ces maladies les unes des autres mais dans les faits il est difficile de distinguer ces maladies à l'examen clinique. Seul un examen *post-mortem* permet de confirmer un diagnostic [Fabre N. 1997].

En occident, 80 % des syndromes parkinsoniens sont catégorisés comme maladie de Parkinson idiopathique, les 20 % restant étant qualifiés en maladies de Parkinson atypiques. En 1999, Caparros-Lefèbvre signale que cette proportion est inversée en Guadeloupe [Caparros-Lefèbvre D. 1999]. En 2002, des résultats quantitatifs sur 255 patients sont publiés. Ils mettent en évidence que près de 76 % des malades de l'archipel suivis au CHU de Pointe-à-Pitre sont atteints d'un parkinsonisme atypique [Caparros-Lefèbvre D. 2002].

Des recherches sur d'éventuelles prédispositions génétiques ont été réalisées mais ne se sont pas avérées concluantes. Seul un facteur environnemental a pu être souligné. En effet, les patients atteints de « parkinsonisme guadeloupéen » (nom donné à la pathologie suite à sa caractérisation clinique) se sont révélés être de gros consommateurs chroniques de dérivés d'Annonaceae (sous forme de fruits ou de tisanes). Les patients atteints d'un Parkinson idiopathique n'étaient pas ou peu consommateurs. Cette corrélation entre la consommation de ces produits et l'apparition de parkinsonismes atypiques est également mise en évidence en d'autres points du globe, notamment en Nouvelle-Calédonie [Angibaud G. 2004, Caparros-Lefèbvre D. 2006]. Elle est suggérée pour l'île de Guam [Caparros-Lefèbvre D. 2002], où un autre facteur environnemental est connu. Deux familles de molécules se distinguent par leur dangerosité potentielle dans la famille des Annonaceae : les alcaloïdes isoquinoléïques et les acétogénines [Champy P. 2004]. Les premières interagissent avec des systèmes de neurotransmission et leur neurotoxicité est suspectée ; les secondes sont fortement cytotoxiques et présentent une neurotoxicité avérée [Champy P. 2004 ; Hollerhage M. 2009 ; Yamada E.S. 2014] et pourraient être plus particulièrement responsables de la surexpression des parkinsonismes atypiques observée en Guadeloupe. Des tests sur animeux ont par ailleurs démontré la neurotoxicité des jus de fruits pour des consommateurs chroniques [Rottscholl R. 2016] C'est sur la base des nombreux travaux précédemment cités que l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (ex-AFSSA, Anses) préconise de poursuivre les travaux de recherche entrepris sur les dérivés d'*Annona muricata* L., l'Annonaceae la plus consommée en Guadeloupe, et notamment sur l'annonacine qui est l'acétogénine majoritaire de cette plante [AFSSA 2010].

Dans ce contexte, plusieurs travaux ont déjà été entrepris, notamment au sein de notre laboratoire, afin de caractériser la présence des acétogénines dans des extraits naturels, de déterminer les apports journaliers des consommateurs et d'évaluer la biodisponibilité des acétogénines d'Annonaceae. Dans le cadre de ce projet, nous nous intéresserons à l'étude structurale des acétogénines contenues dans un extrait d'*Annona muricata* L.

1.4 Les outils d'analyse structurale des acétogénines dans les extraits naturels

1.4.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est aujourd'hui la technique de référence en termes d'élucidation structurale. Dans le cas d'études d'acétogénines isolées, bien qu'elle permette d'identifier les différents groupements portés par la chaîne carbonée ainsi de la stéréochimie relative, elle ne permet pas toujours d'en définir la position exacte.

En RMN des mélanges complexes, les signaux des différentes acétogénines contenues dans l'extrait se superposent et rendent la déréplication impossible. Il est néanmoins possible de déterminer rapidement la quantité d'acétogénines présentes dans un extrait grâce à cette technique, par exploitation de signaux communs caractéristiques en ^1H RMN [Bonneau N. 2015 ; Teixeira Machado A. 2015].

1.4.2 La spectrométrie de masse en introduction directe

La spectrométrie de masse est un outil indispensable à l'analyse structurale des acétogénines d'Annonaceae et ce depuis la découverte de l'uvaricine [Jolad S.D. 1982]. Elle permet de connaître la position de l'hétérocycle, et des différentes substitutions le long de la chaîne carbonée.

Dans un premier temps, les méthodes d'analyses utilisées ne comportaient pas de dimension séparative en amont de la spectrométrie de masse. La littérature contient plusieurs exemples utilisant des sources d'ionisation différentes et des analyseurs variés. Ainsi, l'ionisation électronique (IE) [Chahboune N. 2006], l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB⁴³) [Laprévotte O. 1992, 1994] ou l'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI⁴⁴) [Champy P. 2009] sont citées dans la littérature pour l'étude des acétogénines. À l'exception de l'ionisation électronique, qui est une méthode d'ionisation dure, l'information structurale doit être obtenue grâce à des expériences de spectrométrie de masse tandem. Dans ce cas, l'ion moléculaire est fragmenté et l'analyse de ses fragments apporte l'information recherchée. Laprévotte *et al.* ont beaucoup contribué à l'étude structurale des acétogénines par spectrométrie de masse. Ils proposent l'utilisation de sels de lithium pour former des adduits $[\text{M}+\text{Li}]^+$ qui conduisent à des voies de fragmentation différentes des espèces protonées $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ou des autres adduits couramment obtenus : sodium $[\text{M}+\text{Na}]^+$, potassium $[\text{M}+\text{K}]^+$) [Laprévotte O. 1992a, 1992b et 1994]. Cette stratégie sera plus largement développée dans la section 4.2. Ces techniques d'introduction directe sont relativement efficaces pour l'analyse de composés isolés. Elles sont beaucoup moins adaptées pour l'étude d'extraits bruts d'Annonaceae contenant des dizaines, voire des centaines d'analogues [Le Ven J. 2012]. En effet, le plus gros problème est l'impossibilité de distinguer les isomères entre eux, ce à quoi s'ajoute la difficulté de distinguer les adduits de deux acétogénines comportant un oxygène d'écart $[\text{C}_n\text{H}_m\text{O}_p+\text{Na}]^+$ et $[\text{C}_n\text{H}_m\text{O}_{(p-1)}+\text{K}]^+$ ($\Delta_{m/z} = 0.02098$). Il en est de même pour la superposition des massifs isotopiques d'espèces aux degrés d'insaturation distincts [Champy P. 2009].

1.4.3 La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie

Pour l'analyse de mélanges complexes, le couplage apporte une dimension séparative essentielle. La chromatographie liquide haute performance a donc été utilisée pour séparer les différentes acétogénines de l'extrait avant leur étude structurale par spectrométrie de masse [Allegrand J. 2010, Le Ven J. 2012]. Cette étape est indispensable lorsque des isomères sont en mélange. L'étude de mélanges complexes contenant des acétogénines comporte généralement deux niveaux.

Le premier de ces niveaux consiste à caractériser la présence effective d'acétogénines dans l'échantillon analysé. Pour ce faire, les premières études se basent sur la coexistence des espèces protonées, des adduits au sodium et des adduits à l'ammonium (dans le cas où la phase mobile en contient) [Gu Z. 1997] ainsi que sur les pertes de molécules d'eau correspondantes. Les rapports m/z attendus sont générés automatiquement grâce au nombre restreint de formules brutes possibles.

⁴³ Fast Atom Bombardment

⁴⁴ Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation

Le second niveau consiste à obtenir un maximum d'informations structurales sur les acétogénines d'un extrait sans avoir à passer par des étapes de purification. Des études de spectrométrie de masse tandem sont alors nécessaires. À l'instar des études en introduction directe, les sels de lithium ont également été utilisés de façon à former des adduits produisant des fragments contenant plus d'informations structurales (cf. section 4.2). Un travail fastidieux de déréplication a pu être réalisé grâce à la combinaison de la chromatographie liquide utilisée en mode phase inverse et la spectrométrie de masse tandem haute résolution [Allegrand J. 2010, Le Ven J. 2012, 2014].

La stratégie utilisée consiste à faire une acquisition en mode MS simple, d'extraire ensuite le chromatogramme d'ions extraits (EIC⁴⁵) des ions correspondant aux adduits au lithium d'une liste exhaustive d'acétogénines possiblement existantes (générée de façon automatique). Lorsqu'un EIC contient un pic chromatographique, l'ion correspondant est ajouté à la liste des ions qui seront fragmentés lors d'une analyse MS/MS ciblée. Les fragments ainsi obtenus contiennent l'information recherchée et permettent, dans le cas le plus favorable, de remonter à la structure des acétogénines suffisamment abondantes.

1.4.4 Objectifs de ce projet

Les techniques évoluant, il est aujourd'hui envisageable d'employer des méthodes d'analyses plus performantes ou à défaut complémentaires. Bien que la littérature ne fournisse que très peu d'exemples de déréplication dans des extraits naturels à l'aide de la chromatographie en phase supercritique, cette technique séparative semble adaptée à l'étude des acétogénines pour deux raisons : la faible polarité de ces molécules est compatible avec la SFC et le couplage avec la spectrométrie de masse est maîtrisé au laboratoire suite aux travaux de thèse de Marie Méjean [Méjean M. 2014]. Compte tenu de l'utilisation de colonnes chromatographiques constituées de particules de faible diamètre (< 2 µm), une résolution chromatographique au moins égale à celle observée en HPLC peut être attendue. Enfin, la chromatographie en phase supercritique est réputée comme étant plus respectueuse de l'environnement que l'HPLC puisqu'elle propose souvent des temps d'analyse plus courts et utilise des solvants organiques dans des proportions significativement réduites.

Nous ambitionnons donc de développer une méthode d'analyse ciblée pour l'étude structurale des acétogénines grâce à un couplage entre la chromatographie en phase supercritique et la spectrométrie de masse tandem haute résolution (SFC-HRMS/MS). Ce type d'approches pourrait être utilisé ensuite pour la déréplication d'autres familles de molécules dans des extraits naturels.

Ce projet entre dans le cadre d'une collaboration scientifique ancienne avec le laboratoire de Pharmacognosie de l'UMR BioCIS (Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry) et plus particulièrement avec le Professeur Pierre Champy. Celui-ci nous a notamment fourni l'ensemble des échantillons ainsi que son expertise sur les acétogénines.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Les standards

À notre connaissance, aucun standard n'est disponible commercialement à l'heure actuelle. Deux standards ont donc été purifiés à partir d'extraits naturels. Ainsi, l'annonacine (C₃₅H₆₄O₇) a été isolée à partir d'*Annona muricata* et la squamocine (C₃₇H₆₆O₇) à partir d'*Annona squamosa* L.. L'obtention de ces standards résulte du travail de Yazid Khaled Khodja, Jessica Le Ven, et Natacha Bonneau du

⁴⁵ Extracted Ion Chromatogram

laboratoire BioCIS. De nombreuses étapes de lavage, d'extraction, de fractionnement par chromatographie flash et purification sur chromatographie liquide à haute performance à l'échelle préparative ont été nécessaires [Le Ven J. 2012 ; Bonneau N. 2015]. Les produits obtenus ont ensuite été caractérisés avec les techniques habituelles (UV, HRMS, RMN ^1H ^{13}C , RMN 2D). L'étude de la configuration absolue des centres asymétriques a également été entreprise après dérivatisation. La pureté des deux standards a été mesurée à 97 % pour l'annonacine et 99 % pour la squamocine. 10 mg d'annonacine ont été chauffés à reflux dans 10 mL d'une solution basique de méthanol (1 mol/L de NaOH) pendant une nuit afin d'obtenir de l'isoannonacine (rendement 75 %). Les structures correspondantes sont présentées dans la Figure 39.

Des solutions mères à une concentration de 1,5 mmol/L ont été préparées dans le méthanol et conservées à -80°C . Une solution de 10 $\mu\text{mol/L}$ d'annonacine et de squamocine a été réalisée dans le méthanol pour le criblage de colonnes.

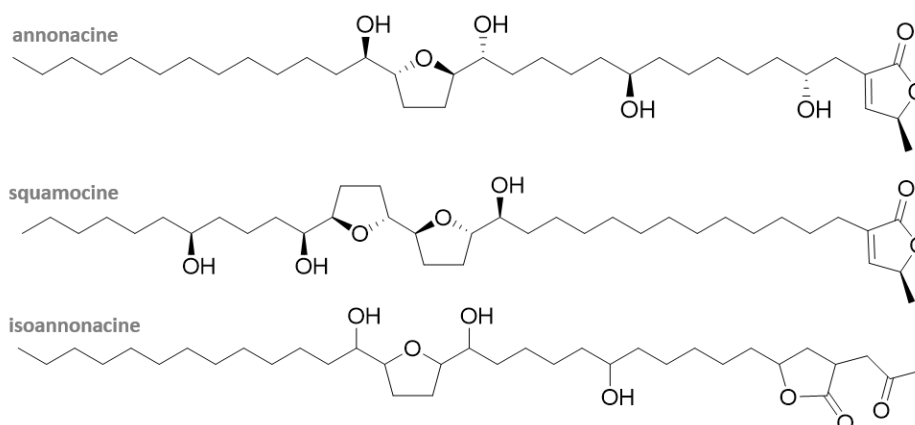


Figure 39 : Structures des standards utilisés.

2.2 L'extrait de plante

Nous avons utilisé un extrait de graines d'*Annona muricata* L.. Le fruit a été collecté en Colombie en 2012 et l'échantillon a été préparé au laboratoire BioCIS. Les gaines (640 g) sont d'abord séparées manuellement de la pulpe avant d'être séchées à température ambiante puis broyées en poudre. Trois extractions liquides à température ambiante sont réalisées avec du méthanol (3 x 4 L) pendant trois nuits successives sous agitation mécanique. Le filtrat est ensuite séché sur du sulfate de magnésium et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait obtenu se présente sous la forme d'une huile orange pâle et le rendement global de l'extraction est de 10,9 %. Cette huile a ensuite été solubilisée dans du méthanol à une concentration de 10 mg/mL puis filtrée à l'aide d'un filtre seringue (membrane PTFE, 0,45 μm). Cet échantillon est conservé au congélateur à -80°C . Des solutions filles ont été préparées au 10^{e} dans du méthanol pour les injections en HPLC et SFC.

2.3 La chromatographie en phase supercritique

Le chromatographe en phase supercritique utilisé pour ce projet est déjà décrit dans la chapitre I, section 4.3. Au cours de ce travail, une nouvelle méthode chromatographique a été développée. Les huit colonnes analytiques testées lors du criblage de phase stationnaire sont répertoriées dans le Tableau 7. La phase mobile était constituée d'un mélange de dioxyde de carbone et d'éthanol. Les différents gradients testés sont présentés dans la section 3.2.2. Plusieurs valeurs ont été testées pour les différents paramètres chromatographiques : le débit de la phase mobile (1,3, 1,5 et 1,7 mL/min), la température du four à colonne (20, 30 et 40°C) et la contre-pression (130, 150 et 170 bar). Deux boucles d'injection ont été également testées (1,2 et 5 μL). Un solvant make-up a été injecté entre la

sortie de la colonne chromatographique et l'entrée du régulateur de contre-pression à un débit de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ce solvant était composé de méthanol pur pour les expériences de MS simple et d'une solution d'iodure de lithium dans le cas d'étude structurale par MS/MS (cette partie est développée dans la section 4.3.3).

Nom commercial	Phase stationnaire	Dimensions (mm) L x \varnothing	\varnothing particule (μm)	Fournisseur
Zorbax Eclipse plus C18 RRHT	C18	150 x 2,1	1,8	Agilent Technologies
Poroshell 120 SB-C18	C18	100 x 2,1	2,7	Agilent Technologies
Pursuit 3 PFP	Pentafluorophényl	150 x 2,0	3,0	Agilent Technologies
Zorbax SB-CN RRHT	Cyano	150 x 2,1	1,8	Agilent Technologies
Zorbax RX-Si RRHT	Silice	150 x 2,1	1,8	Agilent Technologies
Luna NH2	Amino	150 x 2,0	3,0	Phenomenex
Acquity UPC ² BEH 2-EP	2-éthylpyridine	100 x 2,1	1,7	Waters
Hypercarb	Carbone graphite poreux	100 x 2,1	5,0	Thermo Fisher Scientific

Tableau 7 : Caractéristiques des différentes colonnes utilisées lors du criblage de phases stationnaires pour la séparation des acétogénines par SFC.

2.4 La chromatographie en phase liquide

Les résultats obtenus avec la méthode optimisée utilisant la chromatographie en phase supercritique seront comparés à ceux obtenus avec la chromatographie en phase liquide. Pour que la comparaison soit la plus pertinente possible, le même échantillon ainsi que le même spectromètre de masse ont été utilisés. Seule la dimension séparative était variable.

Le chromatographe est un système HPLC Ultimate 3000 (Dionex) comprenant un dégazeur, une pompe quaternaire, un passeur d'échantillon réfrigéré et un four à colonne. La méthode chromatographique a été développée précédemment au sein du laboratoire [Le Ven J. 2012]. Nous avons toutefois substitué la colonne chromatographique par une colonne utilisant des particules à noyaux non poreux (Accucore RP-MS 100 x 2,1 mm 2,6 μm ; Thermo Fisher Scientific) afin d'augmenter l'efficacité de la séparation. La séparation a été effectuée à une température de colonne de 20°C et utilisait une phase mobile contenant de l'eau + 0,1 % d'acide formique (Voie A) et de l'acétonitrile + 0,1 % d'acide formique (Voie B) sur le gradient présenté dans le Tableau 8. Le débit était fixé à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le volume d'injection utilisé était de 1 μL (comme en SFC).

Temps (min)	Composition de la phase mobile (% Voie B)
0	40
25	100
32	100
35	40
40	40

Tableau 8 : Gradient utilisé pour la séparation des acétogénines en HPLC.
Voie A : H₂O+0,1 % AF. Voie B : ACN+0,1 % AF.

2.5 La cationisation au lithium post-colonne

Dans l'objectif d'obtenir des adduits au lithium, un sel de lithium doit être injecté après la séparation et avant l'ionisation. Cette stratégie est bien maîtrisée pour le couplage HPLC-MS [Le Ven J. 2012]. Il

consiste à infuser de l'iodure de lithium dans du méthanol (2 mmol/L, 5 μ L/min) en sortie de colonne chromatographique à l'aide d'un pousse-seringue et d'un raccord de type T.

Cette stratégie n'est pas directement transposable en SFC compte tenu de la pression résiduelle dans le capillaire reliant la SFC au spectromètre de masse. La solution d'iodure de lithium a donc dû être directement ajoutée dans le solvant make-up. Plusieurs valeurs de concentration ont été testées (de 2 à 200 μ mol/L). Ceci est développé dans la section 4.3.

2.6 Le spectromètre de masse

Le spectromètre de masse est décrit précédemment (Chapitre I section 4.3). La source *electrospray* (électronébulisation) est la seule à avoir été utilisée dans ce projet. Le mode négatif s'est révélé être très peu sensible dans le passé [Allegrand J. 2010], ce qui explique que seul le mode positif a été considéré. Les paramètres de la source d'ionisation n'ont pas fait l'objet d'une optimisation poussée puisque les réglages considérés comme standards au laboratoire se sont révélés efficaces. Ils sont reportés dans le Tableau 9.

Paramètres	Valeurs
Débit du gaz	10 L/min
Température du gaz	350°C
Pression du nébuliseur	25 psi
Tension de cône	3500 V

Tableau 9 : Paramètres de la source ESI dual pour l'analyse des acétogénines.

Le spectromètre de masse a été utilisé dans son mode haute résolution ($R \geq 40000$ à m/z 922). Les acquisitions en mode MS simple ont été faites sur une gamme de masse allant de m/z 100 à m/z 950 à une vitesse d'acquisition de 2 spectres/s. Dans le mode MS/MS, la gamme de masse a été optimisée pour chaque ion précurseur et la vitesse d'acquisition a été fixée à 1 spectre/s. L'infusion d'une solution d'étalons internes (m/z 121,0509 et m/z 922,0098), *via* un second nébuliseur, permet d'obtenir une précision en masse inférieure à 2 ppm.

Pour le cas des analyses MS/MS, l'énergie de fragmentation a été optimisée pour que les fragments obtenus soient le plus pertinents et le plus intenses possible (voir section 4.4.1).

3 Développement d'une méthode de séparation par SFC

Le développement de la méthode chromatographique suit le schéma suivant :

- choix de la phase stationnaire ;
- choix du co-solvant et du gradient d'élution ;
- choix des autres paramètres chromatographiques tels que :
 - le débit de la phase mobile ;
 - la température du four à colonne ;
 - la valeur de la contre-pression ;
 - le volume d'injection.

3.1 Criblage des phases stationnaires

Les colonnes chromatographiques testées sont listées dans la section 2.3. Le choix de la phase stationnaire, et par extension de la colonne chromatographique, s'est fait grâce à l'injection du mélange d'annonacine et de squamocine à 10 $\mu\text{mol/L}$ dans le méthanol. Une méthode générique utilisant une phase mobile composée de dioxyde de carbone et d'éthanol, et dont les détails figurent dans le Tableau 10, a été utilisée pour évaluer la capacité des différentes phases stationnaires à retenir et à séparer les deux standards.

Paramètres	Valeurs
Proportion d'éthanol	5 % (mode isocratique)
Débit	1,5 mL/min
Température du four	30°C
Contre-pression	150 bar
Make-up	Méthanol
Débit du make-up	200 $\mu\text{L/min}$
Volume d'injection	1 μL

Tableau 10 : Paramètres chromatographiques utilisés pour le criblage de colonnes en SFC.

Les structures correspondant aux deux standards sont rappelées dans la Figure 40. L'annonacine et la squamocine possèdent des différences structurales significatives. En effet, l'annonacine est une acétogénine de type T-A (mono-THF avec deux groupements hydroxyles en α , α') alors que la squamocine appartient au type T-C (bis-THF avec deux groupements hydroxyles en α , α'). Une autre différence significative est le nombre total de carbones : 35 pour l'annonacine et 37 pour la squamocine. Enfin, l'annonacine possède un hydroxyle en C-4, ce qui n'est pas le cas pour la squamocine. Lorsque l'on considère ces différences structurales d'une part, et la proximité structurale de l'ensemble des acétogénines d'autre part, les attentes quant à la séparation attendues lors du criblage sont claires : la séparation doit être suffisamment importante pour pouvoir imaginer d'intercaler des acétogénines comportant plus de similitudes avec les standards utilisés.

Les résultats du criblage montrent que deux espèces sont détectées pour chacun des deux standards : l'espèce protonée $[M+H]^+$ et l'adduit au sodium $[M+Na]^+$. Ce dernier étant majoritaire, les chromatogrammes d'ion extrait (EIC) correspondant aux adduits au sodium de l'annonacine (m/z 619,4550) et de la squamocine (m/z 645,4707) sont présentés pour chaque colonne dans la Figure 40. Le chromatogramme correspondant à la colonne Hypercarb[®] n'est pas représenté puisque les composés n'ont pas été détectés. Ils sont probablement restés fixés sur la phase stationnaire.

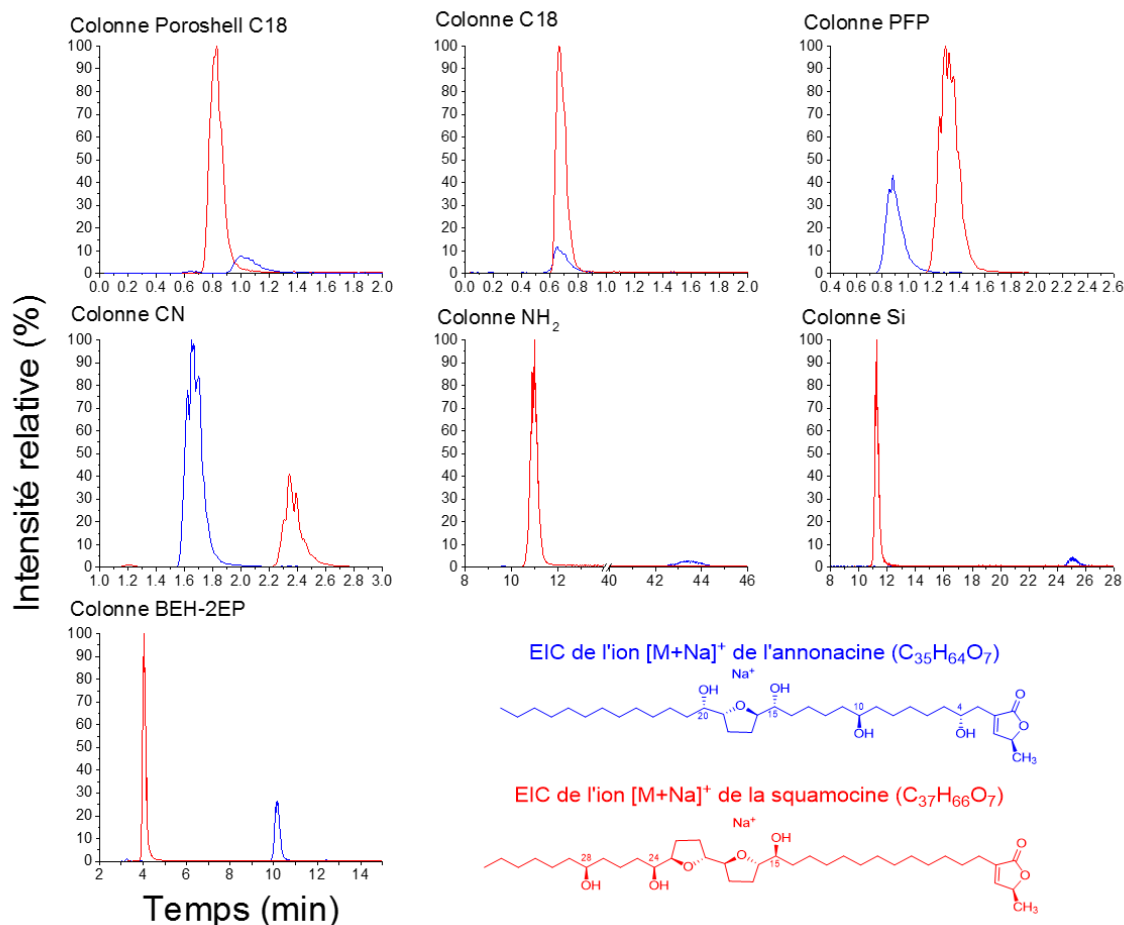


Figure 40: Chromatogrammes obtenus lors du criblage de colonne en SFC. En bleu, EIC de l'adduit au sodium de l'annonacine (m/z 619,4550). En rouge, EIC de l'adduit au sodium de la squamocine (m/z 645,4707).

Les chromatogrammes obtenus peuvent être classés en trois groupes : les colonnes sans sélectivité, les colonnes présentant peu de sélectivité et les colonnes ayant une sélectivité satisfaisante.

Les colonnes apolaires de type C18, employées en HPLC pour la séparation des acétogénines, ne présentent pas de sélectivité en SFC. Il existe une légère différence entre la colonne classique et la colonne à noyau non-poreux qui s'explique sûrement par une différence dans le *end-capping*, la dernière ayant probablement le plus de silanols résiduels.

Viennent ensuite les colonnes cyano et pentafluorophényl (PFP) qui présentent une sélectivité trop faible pour être utilisées pour cette séparation. Il est toutefois notable que la colonne PFP a un ordre d'éluion atypique par rapport aux autres colonnes, pour lesquelles la squamocine est toujours la première éluee.

Les trois chimies de phase stationnaire restantes (2-éthylpyridine, amino et silice) se distinguent des précédentes. En effet, elles présentent une sélectivité élevée. Dès lors, il est envisageable d'utiliser n'importe laquelle de ces trois colonnes. Compte tenu de la largeur et de la symétrie des pics obtenus, la colonne 2-éthylpyridine sera retenue pour la suite de l'étude.

3.2 Choix de la phase mobile

Le choix de la phase mobile constitue la deuxième étape dans la démarche de mise au point d'une méthode pour la séparation d'acétogénines. Cette étape peut se décomposer en deux parties. Il

convient tout d'abord de choisir le co-solvant à utiliser avant de fixer son pourcentage et son évolution au cours de la séparation (mode gradient).

3.2.1 Le co-solvant

L'éthanol est connu pour être un co-solvant peu éluatif en SFC. L'utilisation de méthanol aurait pour effet de diminuer les temps de rétention et par la même occasion la résolution chromatographique. Étant donnée la faible proportion d'éthanol (5 %) utilisée pour éluer les standards lors du criblage, et afin de conserver une très bonne résolution chromatographique, l'éthanol a été choisi comme co-solvant. Ce choix est également conforté par la géométrie des pics chromatographiques obtenus qui sont symétriques et fins (env. 30 s de largeur).

3.2.2 Mise au point d'un gradient d'éluion

Dans un premier temps, un gradient générique (3 à 20 % de 1 à 21 min, 20 à 3 % de 23 à 24 min) est testé sur le mélange de standards. Le chromatogramme est présenté sur la Figure 41b. Par rapport à la méthode isocratique à 5 % (Figure 41a), la largeur de pics est divisée par deux et la résolution reste tout à fait satisfaisante.

Ce gradient est ensuite testé sur l'extrait de graines. L'extraction de la somme des ions correspondants aux adduits $[M+Na]^+$ des principales acétogénines observées dans l'extrait est présentée sur la Figure 41c. La liste des ions extraits et des formules correspondantes est détaillée dans le Tableau 11.

Formules brutes	m/z des $[M+Na]^+$	Formules brutes	m/z des $[M+Na]^+$
$C_{35}H_{62}O_3$	553,4594	$C_{35}H_{64}O_7$	619,4547
$C_{35}H_{62}O_4$	569,4543	$C_{35}H_{64}O_8$	635,4496
$C_{35}H_{60}O_5$	583,4336	$C_{35}H_{66}O_8$	637,4652
$C_{35}H_{62}O_5$	585,4492	$C_{37}H_{68}O_4$	599,5013
$C_{35}H_{64}O_5$	587,4649	$C_{37}H_{64}O_6$	627,4598
$C_{35}H_{62}O_6$	601,4441	$C_{37}H_{66}O_6$	629,4754
$C_{35}H_{64}O_6$	603,4598	$C_{37}H_{68}O_6$	631,4911
$C_{35}H_{62}O_7$	617,4390	$C_{37}H_{68}O_7$	647,4860

Tableau 11 : Formules brutes des principales acétogénines attendues dans l'extrait d'*Annona muricata* et m/z théoriques des adduits au sodium correspondants. D'après [Bermejo A. 2005].

Le chromatogramme obtenu montre que toutes les acétogénines sont éluées avant 10 min. Un nouveau gradient (3 à 11,5 % de 1 à 11 min, 11,5 à 20 % de 11 à 12 min puis 20 à 3 % de 13 à 14 min) est alors proposé. Il est constitué de deux pentes, de façon à écourter le temps d'analyse tout en conservant une partie à 20 % de co-solvant de manière à rincer la colonne entre chaque injection (Figure 41c).

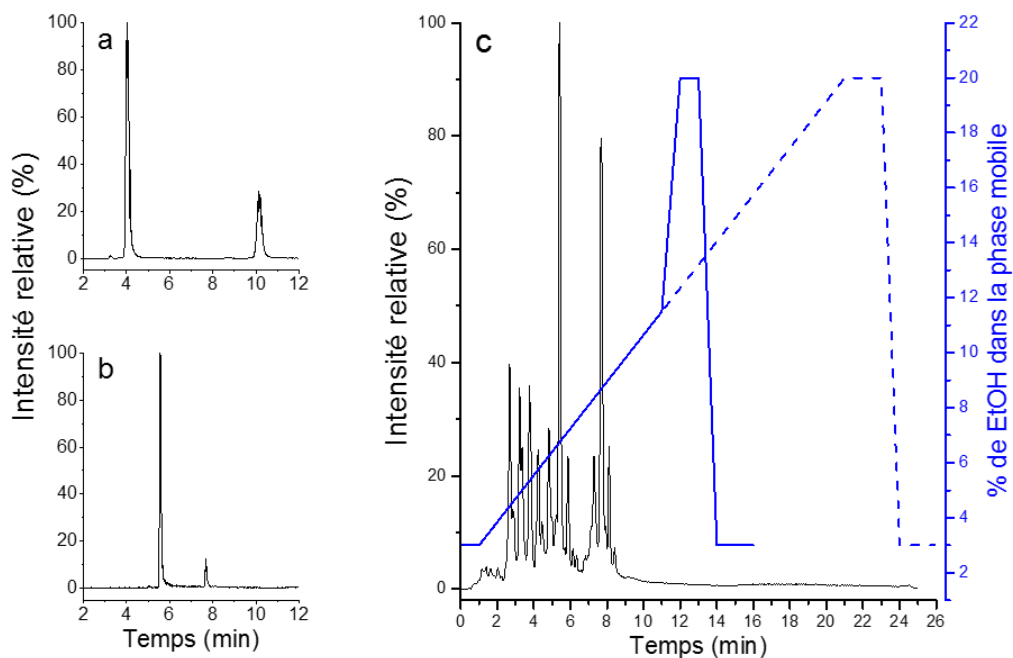


Figure 41 : Influence et choix du gradient en SFC sur la colonne 2-EP. a - Mélange de standards en isocratique 5 % EtOH ; b - Mélange de standards avec le gradient ; c - Extrait de graines, somme des EIC des principales acétogénines. Le gradient retenu est représenté en trait plein, celui testé en première intention est représenté en pointillés. Voir Tableau 10 pour les autres paramètres chromatographiques utilisés.

3.3 Optimisation des autres paramètres chromatographiques

Après avoir choisi la colonne chromatographique, le co-solvant et le gradient d'éluion, quelques paramètres influant sur la séparation restent à optimiser : température du four à colonne, débit de la phase mobile, pression imposée par le régulateur de contre-pression (BPR), et volume d'injection.

L'extrait de gaine d'*Annona muricata* a été injecté sur différentes méthodes chromatographiques pour lesquelles trois valeurs différentes ont été testées pour chacun des paramètres précédemment cités (sauf pour le volume d'injection où seulement deux valeurs ont été utilisées). L'interaction de plusieurs paramètres entre eux n'a pas été évaluée dans notre étude. L'optimisation de ces paramètres chromatographiques a été réalisée en considérant uniquement les EIC de l'adduit au sodium de l'annonacine (et de ses isomères). La Figure 42 rassemble l'ensemble des EIC des adduits au sodium de l'annonacine (et ses isomères) obtenus pour les différentes valeurs de température, débit et contre-pression. La Figure 43 montre l'influence du volume d'injection.

Remarques concernant la Figure 42 :

(i) Sans explications apparentes, les chromatogrammes **c** et **e** ne présentent pas les mêmes intensités alors qu'ils ont été acquis dans les mêmes conditions.

(ii) les chromatogrammes **h** et **f** ont également été acquis dans les mêmes conditions mais dans ce cas les intensités observées sont les mêmes.

Une comparaison en termes d'intensité ne sera donc pas pertinente dans cette section.

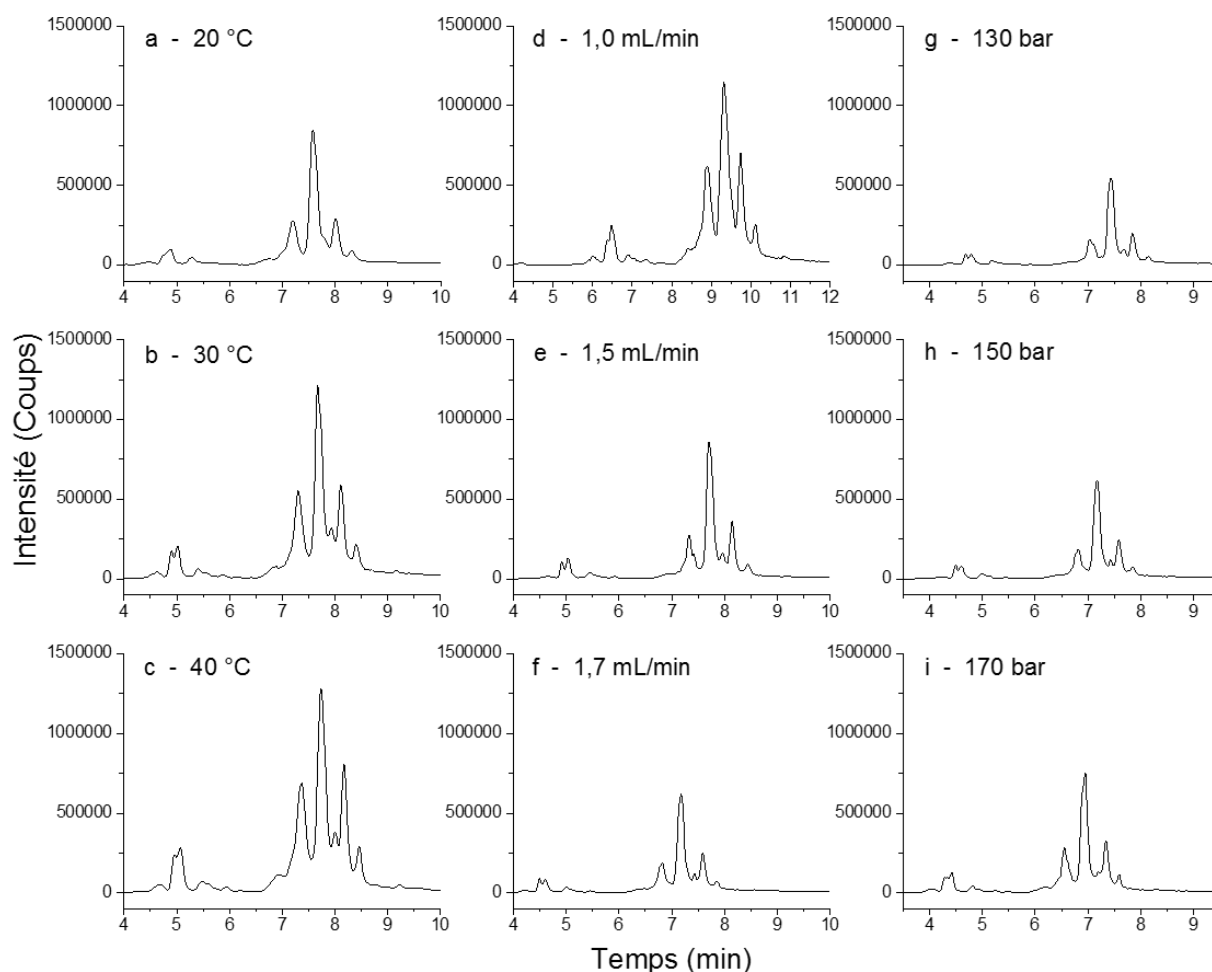


Figure 42 : Influence de la température, du débit de la phase mobile et de la contre-pression sur la séparation SFC obtenue avec la colonne 2-EP. - Extrait de graines - EIC de l'adduit au sodium de l'annonacine et de ses isomères (m/z 619,4544).

3.3.1 Influence de la température du four à colonne

En ce qui concerne l'étude de l'effet de la température du four à colonne, trois niveaux ont été testés (20, 30 et 40°C) et correspondent respectivement aux chromatogrammes **a**, **b** et **c** (Figure 42). Pour ces analyses, la contre-pression et le débit de la phase mobile étaient fixés à 150 bar et 1,5 mL/min.

Lorsque le massif de pics chromatographiques entre 6 et 9 minutes est considéré, les résultats montrent une très légère augmentation de la rétention avec la température. À 20°C, une perte de résolution est observée alors que les chromatogrammes à 30 et 40°C sont relativement semblables. Cependant, une température de 30°C semble légèrement préférable pour les pics à environ 5 minutes. Notre choix s'est donc porté pour une température du four fixée à 30°C.

3.3.2 Influence du débit de la phase mobile

Pour l'étude de l'influence du débit de la phase mobile, les trois niveaux testés sont 1,3, 1,5 et 1,7 mL/min. Ils correspondent respectivement aux chromatogrammes **d**, **e** et **f** (Figure 42). Pour ces analyses la température du four et la contre-pression ont été fixées à 30°C et 150 bar.

La valeur la plus basse peut être écartée compte tenu de la perte de résolution observée. En ce qui concerne les deux autres valeurs, les résultats sont similaires. Le débit de 1,5 mL/min sera finalement retenu puisqu'un débit plus élevé n'améliore pas la résolution alors qu'il entraîne une augmentation des pertes de charges qui peuvent s'avérer dommageables pour la colonne.

3.3.3 Influence de la contre-pression

En ce qui concerne l'effet de la valeur de la contre-pression, trois valeurs ont été testées : 130, 150 et 170 bar. Les chromatogrammes correspondants sont les chromatogrammes **g**, **h** et **i** (Figure 42). Dans le cadre de ces analyses, la température du four à colonne et le débit de la phase mobile étaient fixés à 30°C et 1,7 mL/min.

Dans la gamme de pression explorée, la contre-pression est le paramètre qui a le moins d'influence sur la séparation des isomères de l'annonacine. Une pression de 150 bar a finalement été sélectionnée pour la résolution observée sur le massif à environ 4,5 minutes et celle du pic qui suit le pic majoritaire ($t_r = 7,7$ min dans le chromatogramme **g**).

3.3.4 Influence du volume d'injection

L'influence du volume d'injection a également été étudiée. Deux boucles d'injection différentes sont disponibles au laboratoire : 1,2 μL et 5 μL . La boucle de 1,2 μL a été utilisée en première intention. Elle a fourni tous les résultats précédemment exposés.

Le changement de cette boucle a permis l'injection de 5 μL de l'échantillon d'extrait de graine sur une méthode utilisant les valeurs précédemment optimisées pour chacun des paramètres chromatographiques. L'EIC de l'adduit au sodium de l'annonacine et de ses isomères est présenté sur la Figure 43.

L'augmentation du volume d'injection entraîne une forte dégradation de la séparation des isomères de l'annonacine. La colonne semble totalement saturée. Les pics chromatographiques sont bien présents au même temps de rétention et à la même intensité mais ils sont précédés d'un *fronting* très important. La boucle d'injection de 1,2 μL a donc été choisie pour la suite de notre étude et le volume d'injection est fixé à 1 μL à l'aide d'un programme d'injection.

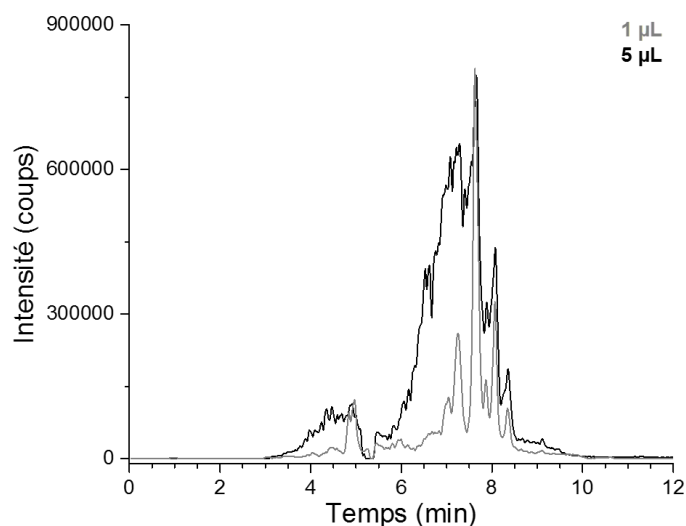


Figure 43 : Influence du volume d'injection sur la séparation obtenue en SFC. Extrait de graines. EIC de l'adduit au sodium des isomères de l'annonacine (m/z 619,4544).

3.4 Méthode chromatographique optimisée

Une méthode chromatographique a été entièrement construite pas à pas. Chaque étape de ce développement de méthode a permis de fixer un paramètre. Chaque paramètre ainsi sélectionné est rappelé dans le Tableau 12.

Paramètre	Valeur
Phase stationnaire	2-éthylpyridine, 1,7 µm
Colonne	100 x 2,1 mm
Phase mobile	CO ₂ /EtOH ; 1,5 mL/min 0 min : 3 % / 1 min : 3 % / 11 min : 11,5 % / 12 min : 20 % / 13 min : 20 % / 14 min : 3 %
Température du four à colonne	30°C
Contre-pression	150 bar
Solvant make-up	MeOH ; 200 µL/min
Volume d'injection	1 µL

Tableau 12 : Conditions chromatographiques optimisées pour la séparation des acétogénine par SFC.

3.5 Détection des acétogénines en SFC-MS

Ces observations ont été faites de façon simultanée au développement de méthode puisque la spectrométrie de masse a été utilisée comme détecteur pendant tout le processus de mise au point. Après la séparation en SFC, les analytes sont détectés grâce au spectromètre de masse. Nous identifions les molécules détectées comme appartenant à la famille des acétogénines grâce à trois critères :

- ✓ La présence simultanée de l'espèce protonée $[M+H]^+$ et de l'adduit au sodium $[M+Na]^+$.
- ✓ La mesure de masse exacte sur les deux ions (avec une précision inférieure à 2 ppm).
- ✓ La comparaison du massif isotopique expérimental avec le massif isotopique théorique.

Le spectre de masse obtenu à 7,7 min lors de l'injection de l'extrait de graine est présenté dans la Figure 44. Il s'agit du spectre de l'annonacine contenue dans l'échantillon. Le spectre total (Figure 44c) contient deux pics majoritaires qui correspondent bien aux ions attendus pour l'annonacine ($[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$). Les précisions obtenues pour ces deux ions sont respectivement de 1,08 et 1,29 ppm (Figure 44a). Enfin le massif isotopique expérimental est fidèle au massif isotopique théorique (Figure 44b).

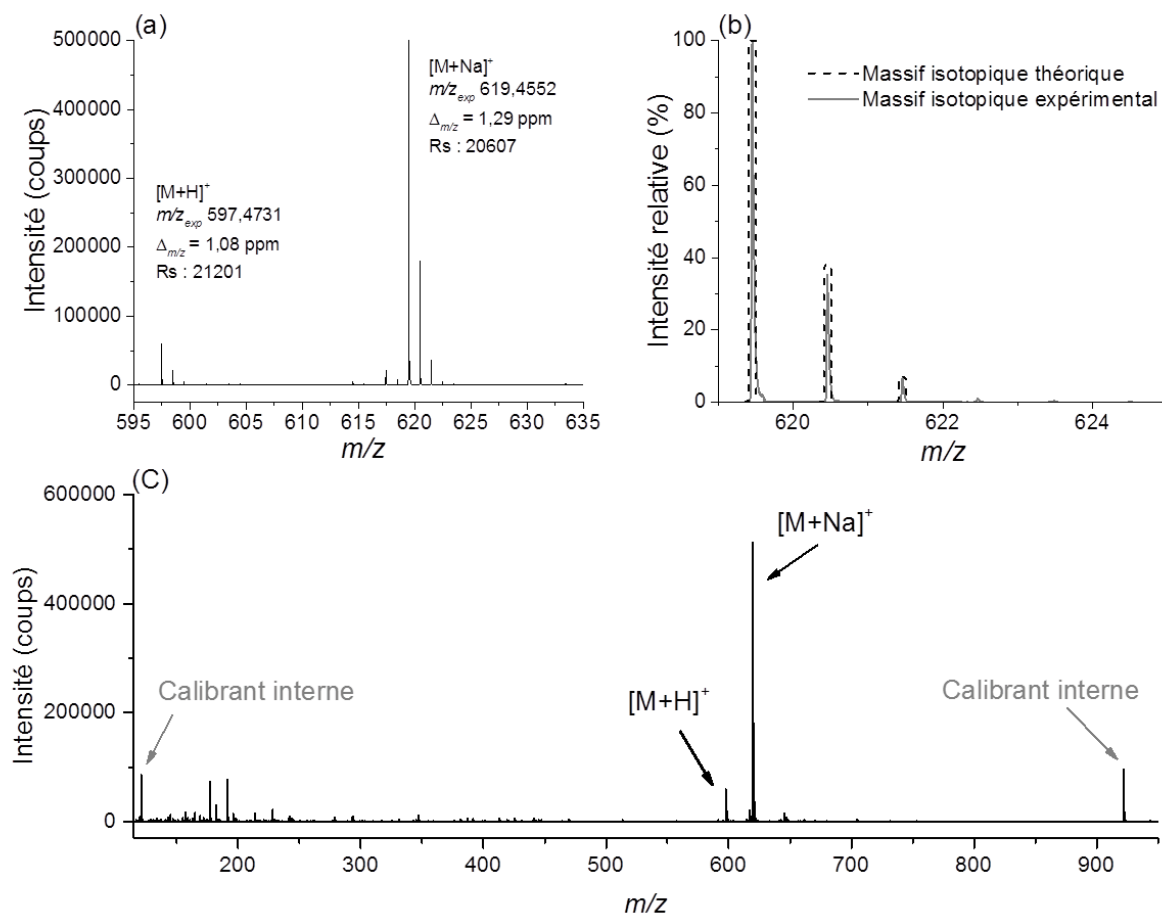


Figure 44 : Spectre de masse obtenu pour l'annonacine dans l'extrait de graine (SFC-MS, Tr : 7,7 min). (a) Zoom sur la gamme de masse de l'annonacine. (b) comparaison du massif isotopique expérimental avec le massif isotopique théorique pour $[M+Na]^+$. (c) Spectre MS total.

Cependant, comme l'illustrent les résultats précédemment exposés, une étude MS simple n'est pas suffisante pour discriminer les différents isomères et diastéréoisomères présents dans les extraits naturels [Le Ven J. 2014]. Dans le cas de l'annonacine, l'EIC correspondant à son adduit au sodium (m/z 619,4544) fournit à lui seul une dizaine de pics chromatographiques (Figure 43). Dans ces conditions, des études de spectrométrie de masse tandem (MS/MS) sont nécessaires.

3.6 Comparaison de la sensibilité et de la linéarité avec la HPLC

La linéarité ainsi que les limites de détection et de quantification ont été estimées en SFC et en chromatographie en phase liquide (LC) (la méthode HPLC est présentée dans la section 2.4). Pour ce faire, 13 solutions d'un mélange équimolaire d'annonacine et de squamocine ont été préparées à des concentrations allant de $7,5 \cdot 10^{-7}$ à $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L dans le méthanol. Chaque solution a été injectée en triplicata sur les deux méthodes chromatographiques. Le tracé de l'intensité en fonction de la concentration pour l'espèce protonée et les adduits au sodium et au potassium met en évidence une gamme de linéarité limitée pour les deux techniques. Le cas de l'adduit au sodium de l'annonacine est représentatif des autres réponses observées, il est exposé dans la Figure 45. Les chromatogrammes (a) et (c) représentent les intensités observées pour cet adduit avec respectivement la chromatographie en phase supercritique et la chromatographie en phase liquide. Les chromatogrammes (b) et (d) sont des zooms sur les parties linéaires aux basses concentrations.

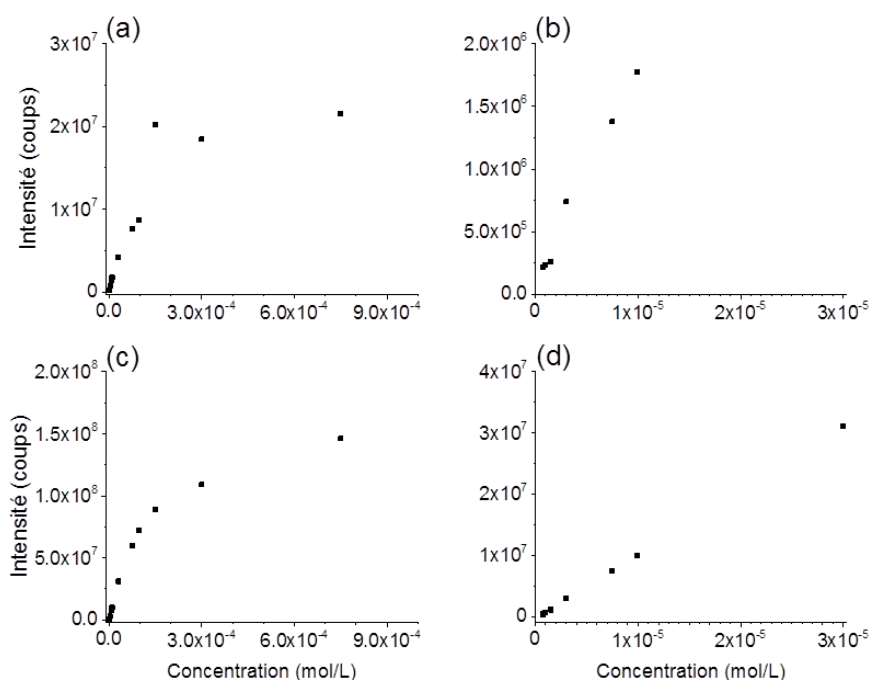


Figure 45 : Comparaison de la linéarité observée pour l'adduit au sodium de l'annonacine en utilisant la SFC (a) et (b) et la HPLC (c) et (d). (b) et (d) sont des zooms de (a) et (c).

Les valeurs de LOD et de LOQ ont ensuite été estimées grâce à une méthode statistique, à partir des droites d'étalonnage ($\text{Intensité} = f[C]$), suivant les formules suivantes :

$$LOD = 3,3 \times \frac{\text{erreur standard}}{\text{pente}}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\text{erreur standard}}{\text{pente}}$$

Il est à noter que cette méthode n'a pour but que d'estimer les performances des techniques. En aucun cas les valeurs obtenues ne doivent être considérées pour une éventuelle étude quantitative. Dans ce cas, les LOD et LOQ devraient être déterminées sans extrapolation et une validation de méthode devrait être réalisée.

Les résultats obtenus pour l'annonacine sont reportés dans le Tableau 13. Ceux pour la squamocine sont présentés dans le Tableau 14.

Remarque : Le volume d'injection utilisé en HPLC est de 5 μL contre 1 μL en SFC.

annonacine	[M+H] ⁺		[M+Na] ⁺		[M+K] ⁺	
	SFC	HPLC	SFC	HPLC	SFC	HPLC
Gamme de linéarité (mol/L)	7,5x10 ⁻⁷ 9,75x10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁷ 9,9x10 ⁻⁶	7,5x10 ⁻⁷ 9,9x10 ⁻⁶	7,5x10 ⁻⁷ 3,0x10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁶ 7,5x10 ⁻⁵	7,5x10 ⁻⁷ 3,0x10 ⁻⁶
r²	0,999	0,998	0,988	1,000	0,974	0,993
LOD (pmolinj)	3,24	2,91	1,54	1,43	20,66	1,70
LOQ (pmolinj)	9,80	8,82	4,68	4,33	62,61	5,15

Tableau 13 : Gamme de linéarité, coefficient de détermination, estimation des limites de détection et de quantification pour les différents adduits de l'annonacine en SFC et en LC.

Squamocine	[M+H] ⁺		[M+Na] ⁺		[M+K] ⁺	
	SFC	HPLC	SFC	HPLC	SFC	HPLC
Gamme de linéarité (mol/L)	9,9x10 ⁻⁷	7,5x10 ⁻⁷	7,5x10 ⁻⁷	7,5x10 ⁻⁷	7,5x10 ⁻⁷	7,5x10 ⁻⁷
	9,9x10 ⁻⁶	3,0x10 ⁻⁵	9,9x10 ⁻⁶	7,5x10 ⁻⁶	9,9x10 ⁻⁶	3,0x10 ⁻⁶
r ²	0,979	1,000	0,979	0,993	0,975	0,988
LOD (pmolinj)	2,09	1,43	2,09	4,47	2,29	2,25
LOQ (pmolinj)	6,34	4,33	6,34	13,56	6,94	6,81

Tableau 14 : Gamme de linéarité, coefficient de détermination, estimation des limites de détection et de quantification pour les différents adduits de la squamocine en SFC et en HPLC.

À l'exception du cas de l'adduit au potassium de l'annonacine, les valeurs de LOD et de LOQ obtenus en HPLC et en SFC sont globalement du même ordre de grandeur. De plus, les coefficients de variance calculés sur les triplicatas sont également comparables en SFC et en HPLC lorsque l'adduit au sodium est considéré (non reporté ici).

Ces résultats tendent à montrer que la SFC devrait être en mesure de fournir des résultats comparables à ceux obtenus dans les précédentes études utilisant la HPLC [Le Ven J. 2012, 2014].

4 Développement d'une méthode HRMS/MS pour l'analyse structurale des acétogénines

Comme exposé dans la section précédente, une détection par spectrométrie de masse haute résolution permet d'obtenir la formule brute des acétogénines présentes dans l'extrait. Pour avoir plus d'information sur la structure de chacune de ces acétogénines, des expériences de spectrométrie de masse tandem (MS/MS) haute résolution sont nécessaires. Pour ce faire, une méthode de MS/MS ciblée est utilisée. La fragmentation des molécules a lieu dans la cellule de collision. Son principe de fonctionnement est exposé dans le chapitre I section 3.3.4. L'analyseur quadripolaire sert de filtre en ne laissant passer que le rapport m/z sélectionné dans la méthode avec une largeur de fenêtre de sélection paramétrable à 1,3 m/z , 4,0 m/z ou 9,0 m/z . Dans le cadre de notre étude, la plus petite largeur de fenêtre a été utilisée. Tous les ions détectés par la suite sont donc normalement issus de la fragmentation de l'espèce sélectionnée.

4.1 Présentation de la nomenclature des fragments

Une nomenclature des fragments (pour déterminer la structure d'une acétogénine grâce à la spectrométrie de masse) a été proposée par Laprévotte *et al.* [Laprévotte O. 1994]. La Figure 46 illustre la nomenclature en utilisant l'exemple de l'annonacine. Les fragments A, B et C conservent l'extrémité portant la lactone. Les fragments X, Y et Z contiennent l'autre extrémité. Les fragments A et X sont obtenus par clivage en α d'un groupement hydroxyle et contiennent l'oxygène de la fonction impliquée. Les fragments B et Y sont obtenus par une coupure de l'hétérocycle. Enfin, les fragments C et Z sont produits par une coupure en α de l'hétérocycle. Une numérotation est ajoutée pour compléter le nom du fragment. Le plus petit nombre correspond à l'ion le plus petit obtenu pour un type de fragmentation. Laprévotte *et al.* proposent également les mécanismes associés, exposés dans la Figure 47.

Les rapports m/z théoriques des différents fragments cités dans ce manuscrit sont rapportés dans l'annexe 2.

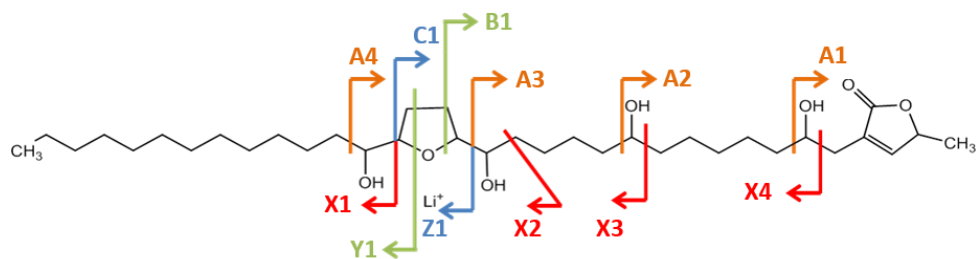


Figure 46 : Illustration de la nomenclature des fragments obtenus en MS/MS pour l'annonacine [Laprévôte O. 1994].

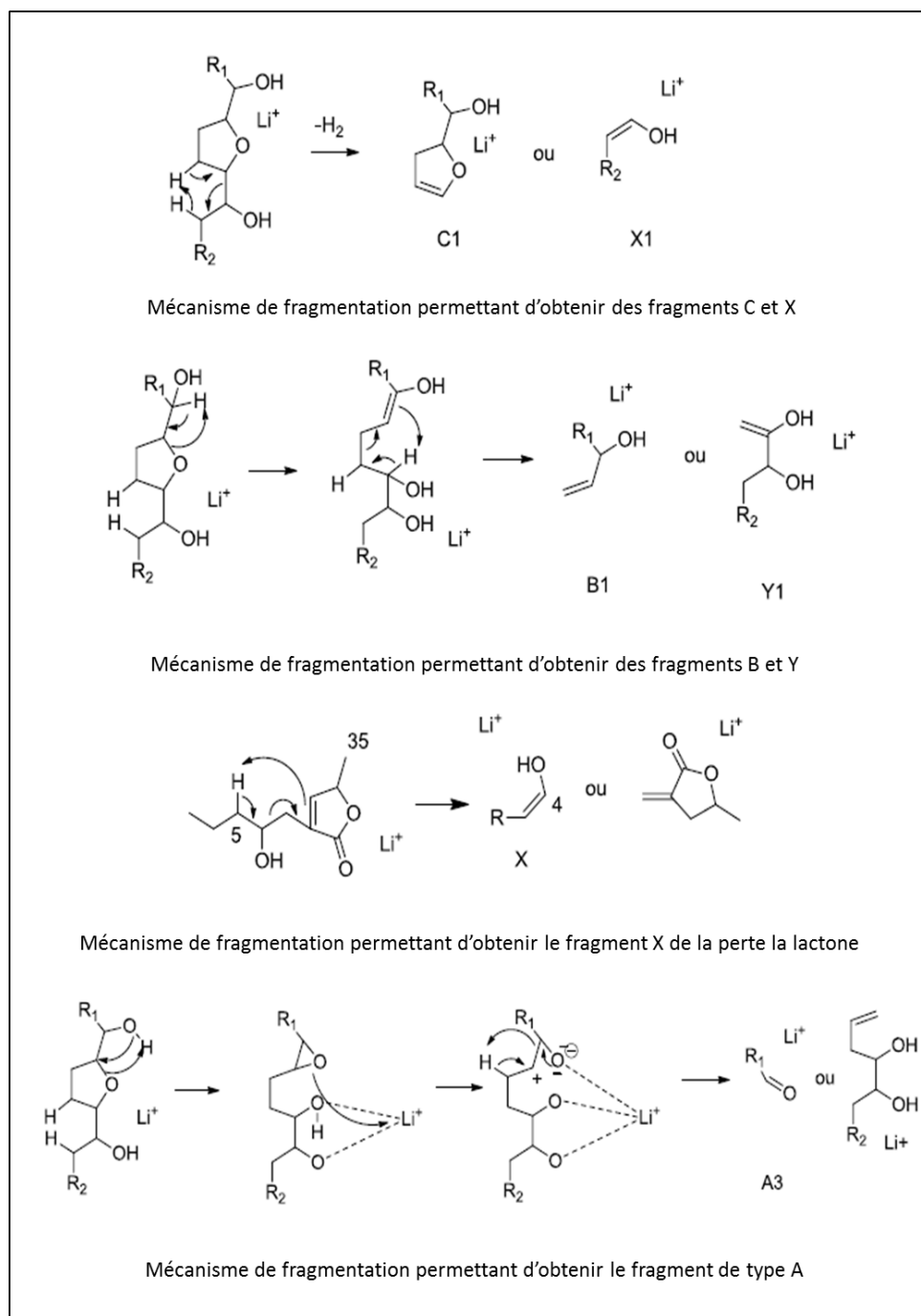


Figure 47 : Mécanismes de fragmentation proposés par Laprévôte.
Figure issue de la thèse de Jessica Le Ven [Le Ven J. 2012].

4.2 Historique de l'utilisation de sels de lithium

Concernant l'élucidation structurale d'acétogénines, les sels de lithium sont utilisés pour la première fois avec des méthodes d'introduction directes (FAB-MS). Ajouté dans la matrice, il permettait de former des adduits $[M+Li]^+$ qui augmentent la sensibilité et fournissent une fragmentation intéressante [Laprévotte O. 1992, 1993 et 1994]. Bien que les spectres MS obtenus portaient les fragments permettant de remonter à la structure, le FAB manquait de sensibilité sur ces fragments (Figure 48).

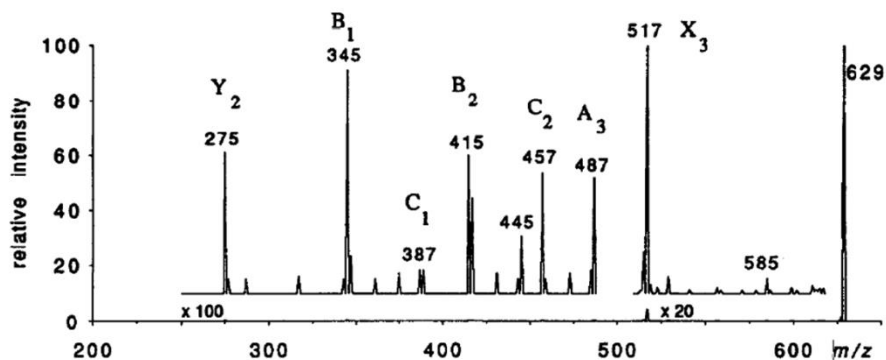


Figure 48 : Spectre de masse de la squamocine obtenu par FAB-MS [Laprévotte O. 1994]

Le FAB est aujourd'hui supplanté par le MALDI et l'*electrospray*. Les sels de lithium restent toutefois nécessaires à l'obtention d'une fragmentation riche en informations structurales comme l'illustre la Figure 49. En effet, sans ces sels, les résultats montrent des spectres MS/MS pauvres en fragments intéressants, que ce soit en MALDI-ToF/ToF ou en ESI-Orbitrap® (spectres **(a)** et **(c)**, Figure 49). Dès lors que des sels de lithium sont ajoutés à l'échantillon, les spectres MS/MS s'enrichissent en informations structurales (spectres **(b)** et **(d)**, Figure 49).

Comme précisé dans la section 1.4.2, les méthodes d'introduction directe ne sont pas appropriées à l'étude de mélanges complexes (discrimination des isomères impossible).

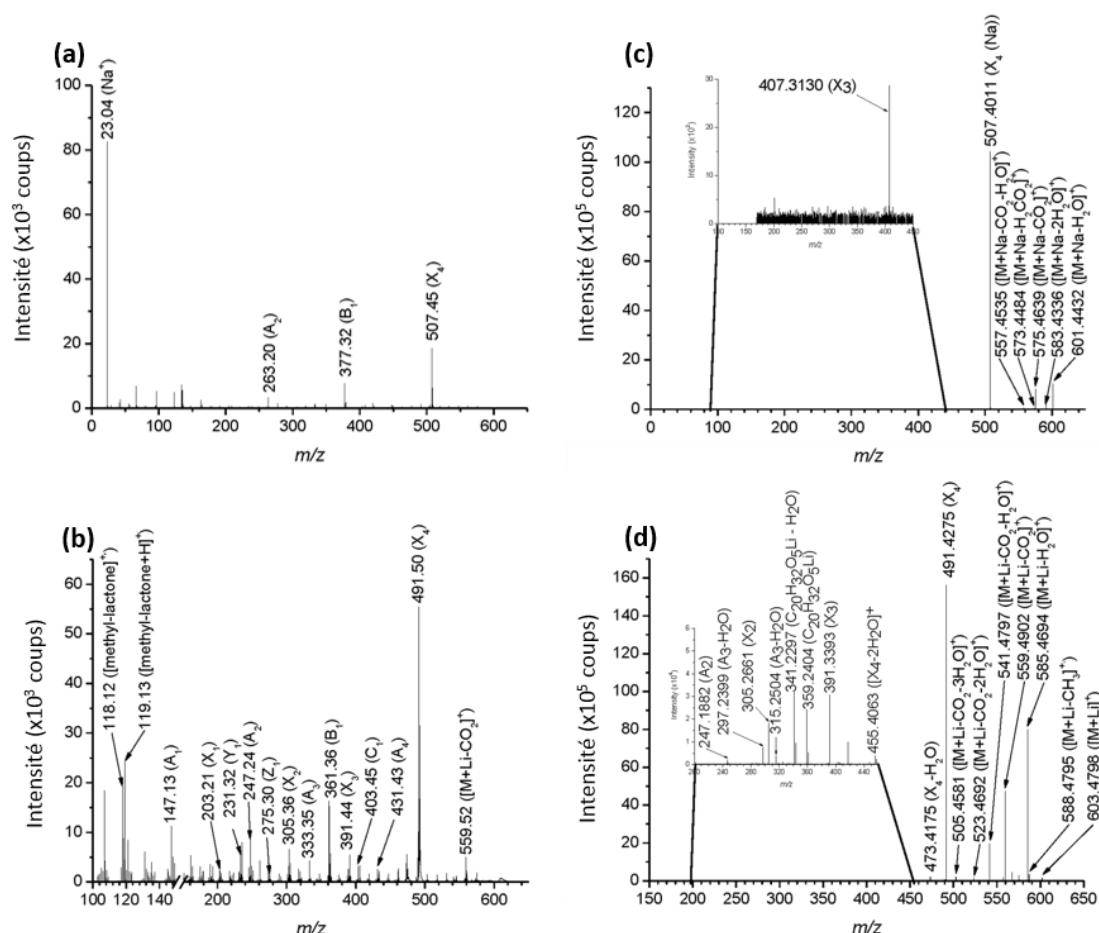


Figure 49 : Effet des sels de lithium sur les spectres MS/MS de l'annonacine en introduction directe. Spectre MS/MS MALDI ToF-ToF à 2 keV sur $[M+Na]^+$ (a) et $[M+Li]^+$ (b). Spectre MS/MS ESI (LTQ-Orbitrap®, CID 50, 33 ms) sur $[M+Na]^+$ (c) et $[M+Li]^+$ (d). D'après [Allegrand J. 2010], figures 2 et 3.

Lorsque la spectrométrie de masse est couplée à la chromatographie liquide, l'introduction de sels de lithium se fait à l'aide d'un pousse-seringue. Les ions Li^+ sont alors injectés après la séparation chromatographique et avant l'ionisation grâce à une solution d'iodure de lithium dans le méthanol à une concentration de 2 mmol/L et un débit de 5 μ L/min [Le Ven J. 2012]. Dans le cas de l'étude de mélanges complexes et de l'utilisation de la chromatographie, les sels de lithium vont permettre :

- ✓ de simplifier les spectres MS obtenus. En effet, sans sels de lithium, les spectres MS contiennent 3 ions moléculaires par acétogénine ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$). L'ajout de sels de lithium conduit à la formation d'adduits au lithium largement prépondérant ;
- ✓ de simplifier le TIC⁴⁶ obtenu (Figure 50) ;
- ✓ d'augmenter la sensibilité (Figure 50) ;
- ✓ de former les adduits au lithium qui fourniront les fragments structuralement intéressants lors d'une analyse MS/MS.

⁴⁶ Total Ion Chromatogram

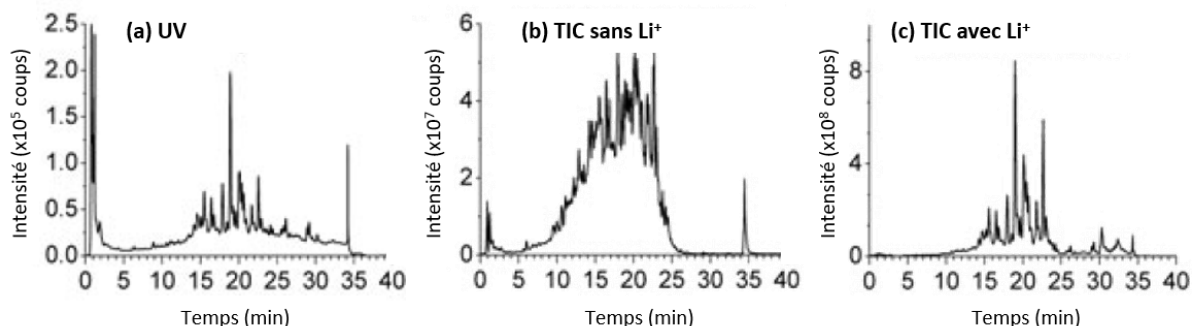


Figure 50 : Effet des sels de lithium sur le TIC lors de l'étude d'un extrait naturel par HPLC-MS. (a) Signal UV à 210 nm. (b) TIC sans ajout de lithium. (c) TIC avec ajout post-colonne de sels de lithium. D'après [Le Ven J. 2012].

Ces différents exemples montrent l'intérêt de la cationisation *post*-colonne au lithium lors de l'analyse structurale d'acétogénines et notamment lors de la déréplication des acétogénines dans des échantillons naturels complexes. Il apparaît donc indispensable d'utiliser également la cationisation *post*-colonne avec le couplage SFC-HRMS/MS.

4.3 Introduction des ions lithium dans le système SFC-HRMS/MS

L'iodure de lithium ayant fait ses preuves par le passé, son utilisation a été de nouveau considérée dans cette étude. Pour l'introduire dans notre système SFC-HRMS/MS plusieurs solutions ont été envisagées. Dans un premiers temps, nous avons souhaité mimer le montage utilisé en chromatographie liquide. Une autre possibilité consiste à introduire directement l'iodure de lithium dans le solvant make-up. Ces deux possibilités sont présentées ci-après.

4.3.1 Utilisation du pousse-seringue

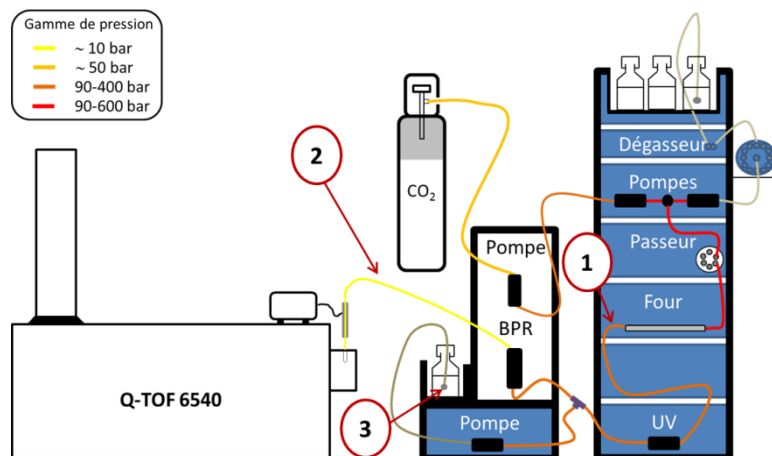


Figure 51 : Schéma du système SFC-HRMS/MS. Positionnement du pousse-seringue pour infusion d'iodure de lithium. 1- entre la colonne chromatographique et le BPR, 2- entre le BPR et le spectromètre de masse, 3- dans le solvant make-up.

Un pousse-seringue a donc été utilisé en première intention. Contrairement à la chromatographie liquide, il a semblé inapproprié de positionner le pousse-seringue directement après la colonne chromatographique (position 1 sur la Figure 51). En effet, à cette position, la pression dans le tube est celle imposée par le régulateur de contre-pression (150 bar dans notre cas). La connexion d'une seringue à cet emplacement n'est donc pas envisageable puisque, dans le cas le plus favorable, une importante fuite serait créée au niveau de l'aiguille (dans le cas le plus défavorable, la seringue pourrait exploser).

La connexion avec la seringue a donc été réalisée après la détente de la phase mobile (position 2 sur la Figure 51). Cependant, nous avons observé que la seringue contenant l'iodure de lithium dans du

méthanol se remplissait de bulles de gaz et se vidait de son liquide dès l'application d'un débit chromatographique.

Pour comprendre les phénomènes mis en jeu à ce niveau du circuit, une mesure de pression a été réalisée. Dans ce but, la pompe make-up a été détournée de son usage et positionnée en **2** sur la Figure 51. En fonctionnement normal, la pression indiquée par la pompe était d'une dizaine de bar. Cette pression n'est pas un problème pour le pousse-seringue qui est capable de délivrer le bon débit dans ces conditions. Le problème vient de la composition de la phase mobile qui contient très majoritairement du gaz après la dépressurisation. Ce gaz remonte à contre-courant jusque dans la seringue ce qui explique nos observations.

Afin de solutionner ce problème, l'utilisation d'un clapet anti-retour sur le tube d'infusion a été proposée. L'idée est d'empêcher la remontée du CO₂ à contre-courant. Cependant, cette configuration n'a pas pu être testée à ce jour.

4.3.2 Solvant make-up

Comptant sur la solubilité de l'iodure de lithium dans le méthanol, l'autre possibilité pour l'introduire est d'utiliser le solvant make-up. L'ajout de sel dans le solvant make-up (position **3** sur la Figure 51) signifie également qu'il va passer dans la pompe isocratique, ce qui peut potentiellement poser des problèmes comme la précipitation dans le corps de pompe ou dans le tube de transfert. Cependant, des sels sont souvent utilisés dans la phase mobile en chromatographie (ex : acétate d'ammonium, acétate de cuivre) ce qui nous a conforté dans notre idée d'expérimentation. Les sels de lithium ont donc été directement ajoutés dans le méthanol du solvant make-up en prenant garde à vérifier périodiquement la pression de la pompe et en la rinçant quotidiennement après utilisation.

4.3.3 Optimisation de la concentration

Compte tenu du nouveau mode d'introduction des sels de lithium, une optimisation de la concentration d'iodure de lithium dans le solvant make-up a été nécessaire. En effet, lors des analyses utilisant la chromatographie liquide, la solution de sels était injectée à une concentration de 2 mmol/L et un débit de 5 µL/min dans une phase mobile dont le débit était de 300 µL/min. Dans le cas de l'étude utilisant la chromatographie en phase supercritique, le débit de la phase mobile est de 1,5 mL/min et contient seulement une faible proportion d'éthanol (de 3 à 11 %). Le débit du solvant make-up est de 200 µL/min. Nous avons donc dans un premier temps calculé la concentration en lithium dans le solvant make-up pour être dans les mêmes conditions que celles utilisées en chromatographie liquide.

Concentration du lithium après introduction dans la phase mobile en chromatographie liquide :

$$C_{finale} = \frac{C_{inf} \times Q_{inf}}{(Q_{inf} + Q_{\phi_{mob}})} = \frac{2.10^{-3} \times 5.10^{-6}}{(0,3.10^{-3} \times 5.10^{-6})} = 3,3.10^{-5} \text{ mol/L soit } 33 \mu\text{mol/L}$$

Avec :

t : temps (min)

Q_{φ_{mob}} : Débit de la phase mobile (L/min)

C_{inf} : Concentration d'infusion (mol/L)

Q_{inf} : Débit d'infusion (L/min)

C_{finale} : Concentration dans la phase mobile après infusion (mol/L)

Pour avoir la même concentration finale en SFC, il faut considérer que le CO₂, gazeux après la dépressurisation, n'est plus à prendre en compte dans le calcul du volume de la phase mobile car les

analytes n'y sont plus solubles. Le débit de la phase mobile après la BPR est donc égal au débit de co-solvant injecté dans le système à quoi s'ajoute le débit du solvant make-up. De plus, compte tenu de l'utilisation d'un gradient d'élution, le débit de co-solvant n'est pas le même sur toute la durée de l'analyse. Le calcul sera fait en utilisant la valeur moyenne du pourcentage du gradient d'élution, soit 7 %.

Concentration du lithium dans le solvant make-up pour avoir un concentration finale de 33 $\mu\text{mol/L}$:

$$C_{\text{make-up}} = \frac{C_{\text{finale}} \times (Q_{\text{make-up}} + Q_{\text{co-solvant}}) \times t}{Q_{\text{make-up}} \times t} = \frac{33 \cdot 10^{-6} \times \left(200 \cdot 10^{-6} + \frac{7}{100} \times 1,5 \cdot 10^{-3}\right)}{200 \cdot 10^{-6}}$$

$$C_{\text{make-up}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L soit } 50 \mu\text{mol/L}$$

Avec :

t :	temps (min)
$Q_{\text{co-solvant}}$:	Débit du co-solvant (L/min). Correspond à 7 % du débit.
$C_{\text{make-up}}$:	Concentration dans le solvant make-up (mol/L)
$Q_{\text{make-up}}$:	Débit du solvant make-up (L/min)
C_{finale} :	C Concentration dans la phase mobile après infusion (mol/L)

Ces calculs permettent de connaître l'ordre de grandeur de la concentration d'iodure de lithium que doit contenir le solvant make-up. Plusieurs valeurs de concentration de d'iodure de lithium ont ensuite été testées. La Figure 52 présente les EIC correspondant d'une part aux adduits au sodium et d'autre part aux adduits au lithium des isomères de l'annonacine contenus dans l'extrait de graine, pour différentes valeurs de concentration en sels de lithium dans le solvant make-up (2, 20 et 200 $\mu\text{mol/L}$).

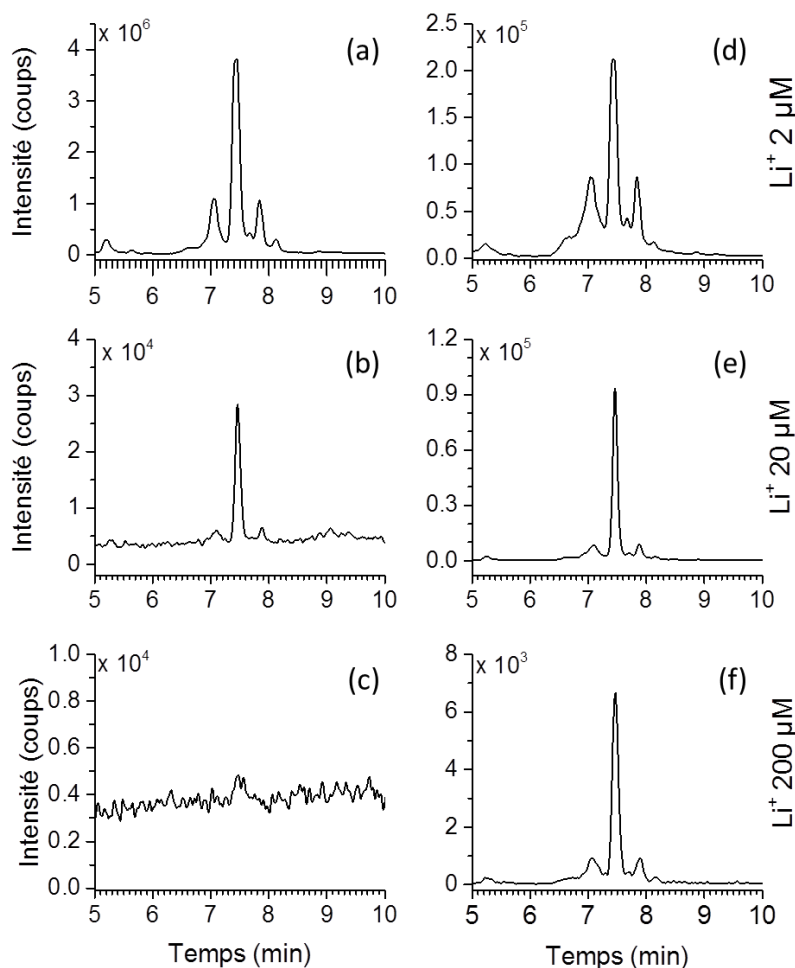


Figure 52 : Influence de la concentration en iodure de lithium dans le solvant make-up sur le signal correspondant aux adduits au sodium (a-c) et au lithium (d-f) des isomères de l'annonacine (m/z 619,4544 et m/z 603,4806) dans l'extrait de graine. Valeur de la concentration : (a) et (d) 2 $\mu\text{mol/L}$, (b) et (e) 20 $\mu\text{mol/L}$ et (c) et (f) 200 $\mu\text{mol/L}$.

Les résultats montrent que lorsque la concentration en iodure de lithium est faible (2 $\mu\text{mol/L}$), le signal correspondant aux adduits au sodium reste très élevé. Il est préférable d'obtenir une conversion la plus totale possible pour simplifier au maximum les spectres de masse obtenus (un seul ion moléculaire par acétogénine). À l'autre extrême, lorsque la concentration en sels de lithium est de 200 $\mu\text{mol/L}$, le signal du $[\text{M}+\text{Na}]^+$ n'est plus observé : la conversion est alors totale. Cependant, à cette concentration, une baisse de l'intensité du signal du $[\text{M}+\text{Li}]^+$ a également été observée (deux ordres de grandeur). L'explication la plus probable est l'existence d'un phénomène de suppression ionique dans la source d'ionisation. La concentration doit donc être diminuée pour conserver un maximum de sensibilité. La dernière concentration présentée ici (20 $\mu\text{mol/L}$) donne une réponse intermédiaire aux deux autres avec une diminution d'un facteur 10 du signal du $[\text{M}+\text{Na}]^+$ alors que le signal du $[\text{M}+\text{Li}]^+$ diminue seulement d'un facteur 2. La valeur optimale de la concentration se situe donc entre 2 et 20 $\mu\text{mol/L}$. Une solution à une concentration de LiI à 12 $\mu\text{mol/L}$ a finalement été utilisée pour la suite de nos expériences.

Contrairement au cas de la chromatographie liquide, l'application d'un gradient d'éluion en chromatographie en phase supercritique implique une variation du volume de phase mobile arrivant au niveau de la source d'ionisation. Le solvant make-up étant injecté à débit constant, il en résulte une variation de la concentration d'iodure de lithium arrivant dans la source d'ionisation au cours du

temps. La Figure 53 illustre cette variation de concentration. Ainsi les composés élués rapidement se trouveront dans un environnement plus riche en lithium que les composés fortement retenus.

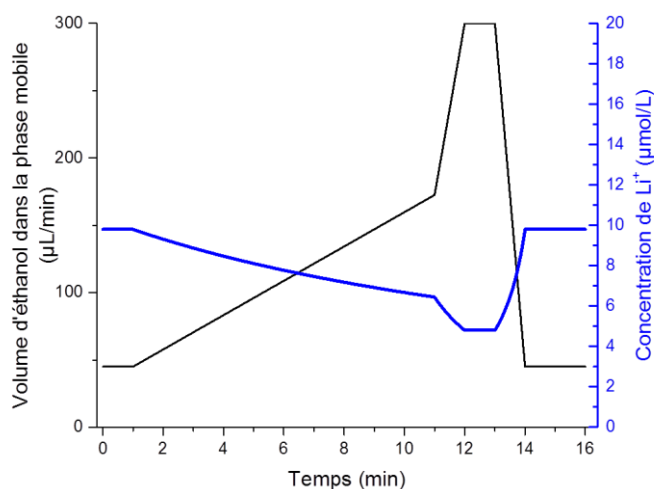


Figure 53 : Effet de la composition du gradient sur la concentration en sels de lithium au niveau de la source d'ionisation.

Cette variation pourrait être compensée en programmant un gradient de débit au niveau de la pompe isocratique qui injecte le solvant make-up dans le système. Nous avons fait le choix de considérer la variation de la concentration de sels de lithium comme étant peu significative puisqu'elle reste relativement limitée dans la zone d'éluion des acétogénines précédemment observées (entre 4 et 10 min, la concentration varie de 8,4 à 6,7 µmol/L).

Enfin, l'affinité pour le lithium est probablement modulée par le type d'acétogénines (un seul type testé ici). De plus la concentration nécessaire en sel est également dictée par la concentration de la cible dans l'échantillon (la quantité de lithium est peut-être trop élevée pour les acétogénines minoritaires). Ces observations soulignent la difficulté d'une analyse d'extrait naturels dans lequel la nature et la concentration des analytes sont extrêmement variables.

4.4 Fragmentation des adduits au lithium

Pour vérifier le bon fonctionnement du système, il est nécessaire de réaliser une expérience MS/MS ciblée avec une énergie de collision nulle. Le spectre MS/MS obtenu doit logiquement comporter l'ion sélectionné par l'analyseur quadripolaire de façon quasi-exclusive (en fonction de la stabilité des molécules, quelques fragments de faible intensité peuvent être observés). Il est ensuite essentiel de choisir une énergie de collision adaptée aux molécules ciblées. Les études précédemment publiées, réalisées par HPLC-HRMS/MS, utilisaient un spectromètre de masse différent (orbitrap ou autre modèle de Q-TOF [Bonneau N. 2017 ; Le Ven J. 2014]). Les paramètres concernant la cellule de collision ont donc dû être ajustés sur notre instrument.

4.4.1 Choix de l'énergie de collision

Il est important de paramétrer la valeur de l'énergie à laquelle vont se produire les collisions entre les ions et les molécules d'azote présentes dans la cellule. La fragmentation obtenue découle directement de cette valeur d'énergie. Elle est molécule-dépendante et bien souvent spectromètre-dépendante car les fabricants utilisent souvent des unités arbitraires de réglage.

Si la valeur de l'énergie de collision est trop faible, la molécule ne se fragmente pas ou peu. À l'inverse, si la valeur de l'énergie de collision est trop forte, des fragmentations successives peuvent

avoir lieu (fragments de fragments) laissant apparaître un spectre de masse contenant des ions de faible rapport m/z sans intérêt structural : l'information structurale est perdue.

Dans le cas des acétogénines, certains fragments n'apportent pas d'information structurale : il s'agit des pertes d'eau. Cette fragmentation est quasiment la seule à être observée lorsque l'espèce protonée $[M+H]^+$ ou l'adduit au sodium $[M+Na]^+$ sont fragmentés. Lorsque les adduits au lithium $[M+Li]^+$ sont utilisés, les pertes d'eau sont toujours visibles mais d'autres fragments apparaissent (voir section 4.1). Ceux-ci nous renseignent alors sur la structure de l'acétogénine considérée. Le but du paramétrage de l'énergie de collision est donc de fournir assez d'énergie au système pour observer le maximum de signal sur les ions intéressants sans toutefois en fournir trop au risque de perdre ce signal.

La Figure 54 présente l'intensité relative correspondant au signal de chaque fragment de l'annonacine lorsque son adduit au lithium est fragmenté. Cette intensité relative est calculée suivant la formule suivante :

$$I_{rel,i} = \frac{I_{abs,i}}{\sum I_{abs}}$$

Avec :

- $I_{rel,i}$: Intensité relative de l'ion fragment considéré
- $I_{abs,i}$: Intensité absolue de l'ion fragment considéré
- $\sum I_{abs}$: Somme de l'intensité absolue des ions fragments

L'intensité relative de l'ion moléculaire commence à décroître aux environs de 30 eV. Il est quasiment nul à 70 eV. Les premiers fragments⁴⁷ commencent logiquement à apparaître aux alentours de 30 eV. Il s'agit alors principalement du fragment X_4 (qui positionne l'hydroxyle sur le carbone n°4) et de fragments peu intéressants (multiples pertes d'eau combinées à la perte d'une molécule de dioxyde de carbone). Le fragment X_4 subit également les pertes successives de trois molécules d'eau à partir de 45 eV. Le fragment X_3 commence à être détecté à 45 eV mais son intensité maximum reste très faible. Les fragments X_1 , X_2 et Z_1 apparaissent à partir de 60 eV avec à nouveau une intensité relative très faible. Les fragments de type A, B et C n'ont pas été détectés contrairement aux résultats obtenus avec le spectromètre utilisé auparavant au laboratoire [Allegrand J. 2010, Le Ven J. 2012].

Les ions A, B et C ne sont pas essentiels à l'élucidation structurale puisqu'ils sont les compléments des ions X, Y et Z. Cependant, la présence de tous les ions de type X, Y et Z devient alors cruciale à l'étude structurale. C'est le cas pour l'annonacine qui sert ici à développer notre outil. Nous verrons par la suite que ces fragments sont parfois absents, ce qui rend l'élucidation structurale incomplète. C'est généralement le cas lors d'études déréplicatives de ce type [Le Ven J. 2012, 2014 ; Pomper K.W. 2009 ; Bonneau N. 2015].

À l'exception de l'ion correspondant au fragment X_4 , tous les ions d'intérêt présentent une intensité très faible. Il devient alors essentiel de maximiser le signal correspondant à chacun de ces ions fragments. Le maximum de l'intensité pour les ions d'intérêt est présenté dans le Tableau 15. À l'exception du fragment X_4 , tous les ions ont un signal maximisé pour une énergie de collision variant de 75 à 85 eV. Nous choisissons donc une énergie à 80 eV pour avoir la meilleure sensibilité possible sur ces ions. Cependant, à cette valeur deux problèmes se posent : l'ion moléculaire est quasiment absent du spectre et l'intensité du fragment X_4 est trois fois plus faible qu'à 60 eV (son maximum). Dans ces conditions, il a été décidé de doubler les acquisitions MS/MS. L'une à 60 eV pour obtenir

⁴⁷ La nomenclature des fragments est présentée dans la section 4.1.

l'ion moléculaire ainsi que le maximum de l'intensité du signal du fragment X_4 et l'autre à 80 eV pour maximiser l'intensité pour les autres fragments porteurs d'informations structurales.

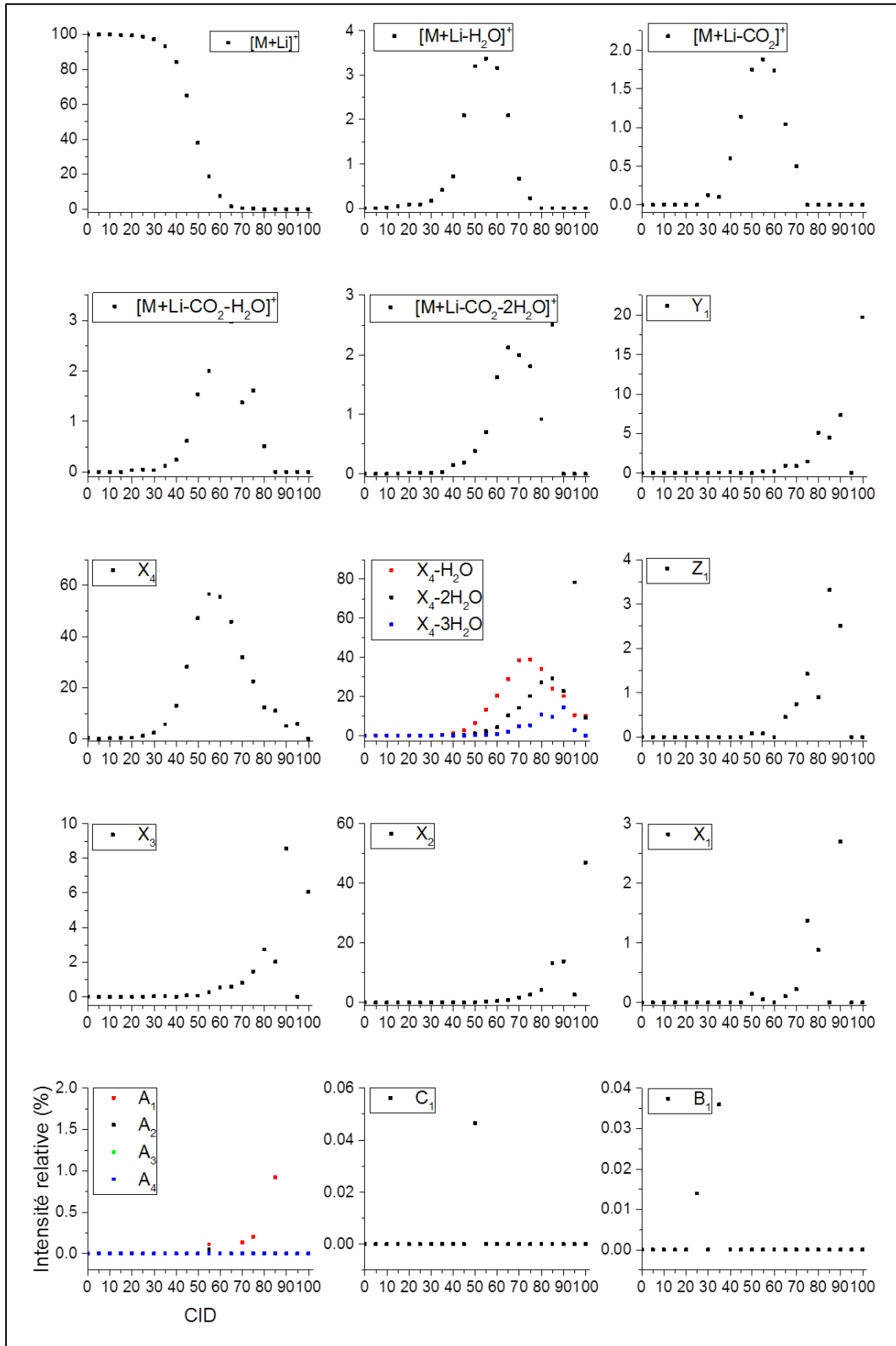


Figure 54 : Intensités relatives des différents ions précurseurs et fragments de l'annonacine obtenus après fragmentation de son adduit au lithium pour différentes valeurs d'énergie (de 0 à 100 eV avec un pas de 5 eV) dans la cellule de collision. La nomenclature des fragments est présentée dans la section 4.1.

Fragment	Formule	$m/z_{\text{théo.}}$	Énergie de collision pour laquelle l'intensité est maximum
X ₁	[C ₁₃ H ₂₆ O+Li] ⁺	205,2140	75 eV
X ₂	[C ₁₈ H ₃₄ O ₃ +Li] ⁺	305,2664	85 eV
X ₃	[C ₂₃ H ₄₄ O ₄ +Li] ⁺	391,3397	80 eV
X ₄	[C ₂₉ H ₅₆ O ₅ +Li] ⁺	491,4285	60 eV
Y ₁	[C ₁₅ H ₃₀ O+Li] ⁺	233,2453	90 eV
Z ₁	[C ₁₇ H ₃₂ O ₂ +Li] ⁺	275,2559	75 eV

Tableau 15 : Valeur optimale de l'énergie dans la cellule de collision pour maximiser le signal de chaque ion fragment porteur d'informations structurales pour l'annonacine. La nomenclature des fragments est présentée dans la section 4.1.

4.4.2 Spectres MS/MS obtenus pour l'annonacine

Les spectres MS/MS du pic majoritaire de l'EIC des isomères de l'annonacine (m/z 603,4806), obtenus avec les deux valeurs d'énergie sélectionnées, sont présentés dans la Figure 55. Comme attendu, à 60 eV les principaux ions correspondent à l'ion moléculaire (m/z 603,4806), aux pertes d'eau successives (jusqu'à 3 pertes d'eau), à la perte d'une molécule de dioxyde de carbone et au fragment X₄. Un zoom permet de mettre en évidence d'autres fragments présents dans le spectre : les pertes d'eau sur X₄ et les fragments X₃, X₂ et Y₁. Ces fragments sont environ 150 fois moins intenses que le fragment X₄ (qui est l'ion majoritaire du spectre). Certains ions d'intensité comparable à celle des fragments identifiés n'ont pu être attribués au regard de la structure de l'annonacine. Ils proviennent possiblement d'un des isomères partiellement co-élué avec l'annonacine. Ces ions sont problématiques puisqu'ils génèrent du bruit au niveau du spectre MS/MS. Il devient alors compliqué d'attribuer ou non un ion donné à une structure inconnue.

Sur le spectre MS/MS obtenu à 80 eV, l'ion moléculaire, les pertes d'eau et de dioxyde de carbone ne sont plus visibles. Les différents fragments observés uniquement en zoomant à 60 eV sont maintenant visibles sans qu'aucun zoom ne soit nécessaire. En outre, les fragments X₁ et Z₁ sont cette fois détectés. Ces observations sont bien en accord avec les résultats présentés dans la Figure 54. Cependant il faut noter que l'information d'intensité absolue est perdue. En effet, à 60 eV les intensités absolues des ions minoritaires sont globalement les mêmes que celles obtenues à 80 eV. Seule l'intensité des fragments majoritaires a diminué (ex : X₄ diminue d'un facteur 20) entre 60 et 80 eV (ce qui explique l'augmentation de l'intensité relative). Dans ces conditions, l'intérêt de l'analyse à 80 eV se justifie uniquement pour l'obtention des fragments Z₁ et X₁ qui n'étaient pas observés à 60 eV. Tout comme celui à 60 eV, le spectre à 80 eV contient des ions qui n'ont pu être reliés à la structure de l'annonacine.

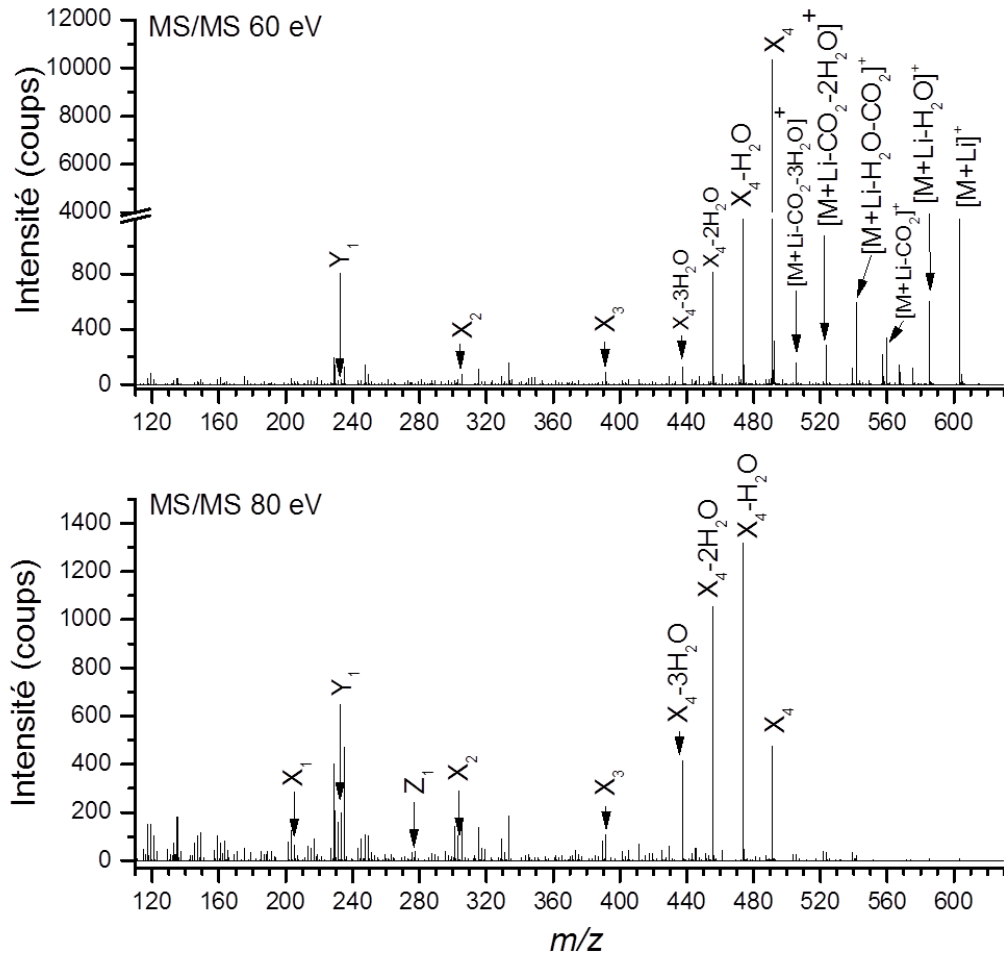


Figure 55 : Spectres MS/MS du pic majoritaire de l'EIC des isomères de l'annonacine (m/z 603,4806) contenus dans l'extrait de graine, à 60 et 80 eV. La nomenclature des fragments est présentée dans la section 4.1.

5 Étude des acétogénines de l'extrait de graine

Notre objectif n'est pas de faire ici une déréplication de toutes les acétogénines présentes dans l'extrait de graine d'*Annona muricata*. Il s'agit plutôt de montrer le potentiel de la méthode utilisée au travers de trois exemples. Le calcul des rapports m/z théoriques des différents fragments est rapporté dans l'annexe 2.

5.1 L'annonacinone (C₃₅H₆₂O₇)

La structure de l'annonacinone (Figure 56) est proche de celle de l'annonacine. Seule la cétone sur le carbone 10 diffère par rapport à l'annonacine (qui porte un hydroxyle à cette position). Le rapport m/z de l'adduit au lithium de l'annonacinone est 601,4656. L'EIC correspondant est présenté en Figure 57 où il est comparé à celui obtenu en utilisant la chromatographie liquide.

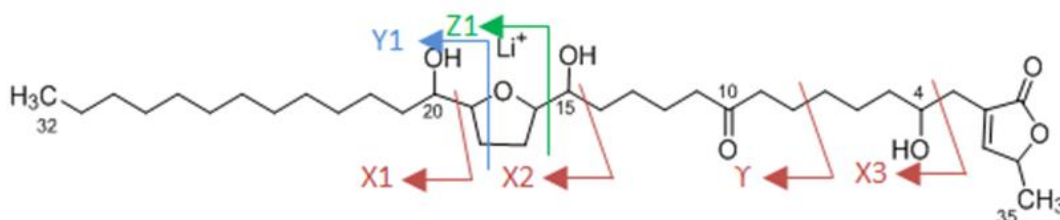


Figure 56 : Structure de l'annonacinone.

À volumes d'injection égaux, l'intensité du pic majoritaire est 1,5 fois plus grande lorsque la HPLC est utilisée. La résolution chromatographique est comparable dans les deux cas (avec un léger avantage pour la SFC). La grande différence est le temps de rétention qui est 3 fois plus court lorsque la chromatographie en phase supercritique est utilisée.

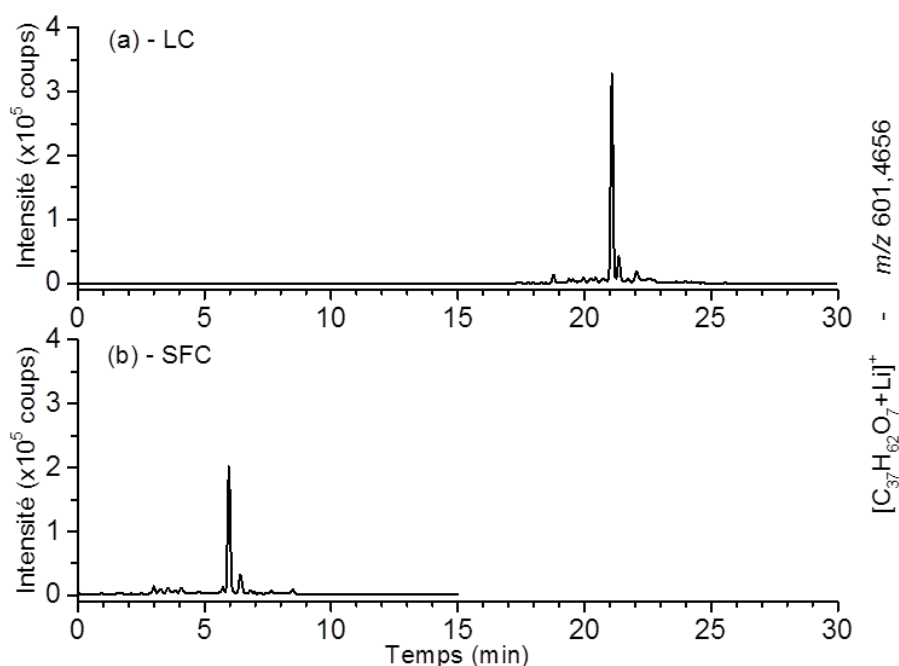


Figure 57 : EIC du rapport m/z correspondant à l'adduit au lithium de l'annonacinone (601,4656) après injection de l'extrait de graine en HPLC (a) et en SFC (b).

Les spectres MS/MS obtenus en HPLC et en SFC ont également été comparés pour cet exemple. Ils sont présentés dans la Figure 58.

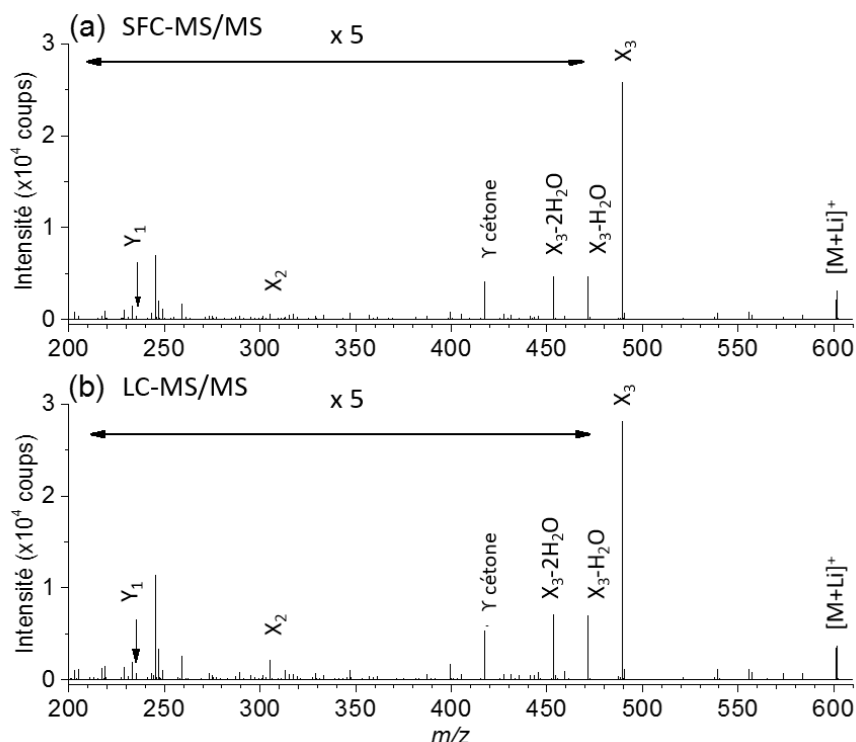


Figure 58 : Spectres MS/MS du pic majoritaire sur l'EIC de l'annonacinone (Figure 57). L'ion noté Y correspond à la fragmentation en Y d'une cétone.

Les spectres MS/MS sont d'intensités et de profils similaires. L'annotation des pics est présentée dans le Tableau 16.

Fragment	m/z théorique	m/z HPLC	Δ (ppm)	m/z SFC	Δ (ppm)
Ion moléculaire	601,4653	601,4658	0,73	601,4655	0,23
X_3	489,4129	489,4133	0,85	489,4132	0,65
X_2	305,2664	305,2662	-0,78	305,2662	-0,78
X_1	205,2140	NO	-	NO	-
Y_1	233,2453	233,2444	-3,77	233,2446	-2,91
Z_1	275,2559	NO	-	NO	-
γ cétone	417,3553	417,3555	0,43	417,3558	1,45

Tableau 16 : Liste des ions fragments attendus pour l'annonacine.

Les résultats obtenus sont donc tout à fait comparables aussi bien du point de vue de l'intensité que de la précision en masse.

Grâce aux fragments observés, il est possible de déterminer la position de l'hydroxyle en C4 (fragment X_3), de l'hydroxyle en C15 (fragment X_2), de la cétone en C10 (fragment γ) et de l'hétérocycle entre C16 et C19 (fragment Y_1). La position du dernier hydroxyle n'a pas pu être déterminée puisque qu'aucun fragment X_1 n'a pu être mis en évidence. Le fragment Y_1 nous apprend cependant que cet hydroxyle se trouve entre C20 et C32.

5.2 Isomères de la gonionenine ($C_{37}H_{66}O_7$)

L'EIC du rapport m/z 629,4967 met en évidence plusieurs pics chromatographiques (Figure 59). Ces pics chromatographiques correspondent aux signaux des adduits au lithium des isomères de la gonionenine dont la structure est présentée Figure 60.

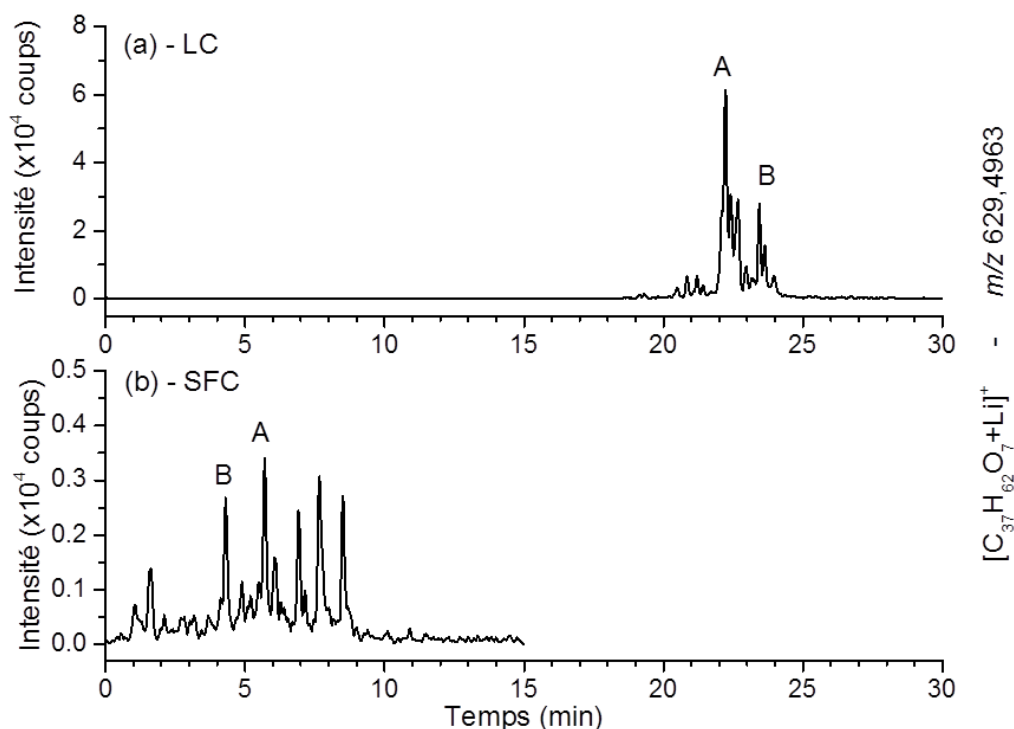


Figure 59 : EIC du rapport m/z correspondant aux adduits au lithium des isomères de la gonionénine (m/z 629,4963) après injection de l'extrait de graine en HPLC (a) et en SFC (b).

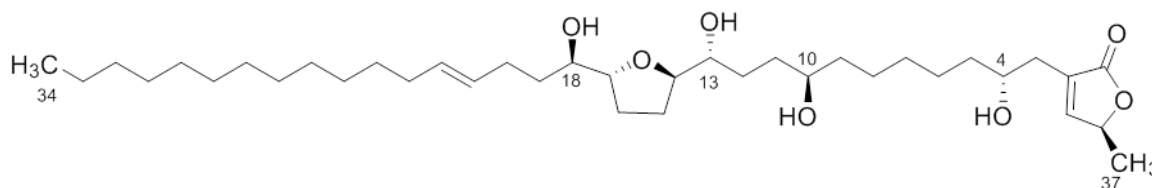


Figure 60 : Structure de la gonionénine.

Les deux EIC de la Figure 59 permettent de confirmer la diminution des temps de rétention lorsque la méthode SFC est utilisée. Cette méthode permet également de répartir les isomères de la gonionénine sur 10 min contre 4 min en HPLC. De plus, le nombre de pics chromatographiques observés en SFC est supérieur à celui obtenu en HPLC (30 contre 13).

Les composés sont moins séparés après l'utilisation de la chromatographie liquide. Il en découle la superposition de fragments provenant de plusieurs isomères dans les spectres MS/MS rendant l'identification hasardeuse. Deux pics chromatographiques (notés A et B sur la Figure 59) ont été étudiés à partir des données collectées par la méthode SFC-HRMS/MS.

Le spectre MS/MS du pic A ($tr_{SFC/LC}$: 6,8/22,2 min) conduit à l'identification de 2 positions d'hydroxyles en C12 (m/z 375,3435, $\Delta = -2,66$ ppm) et C4 (m/z 517,4444 $\Delta = 0,38$ ppm). Le fragment correspondant à la coupure en γ d'une cétone permet de positionner ce groupement en C10 (m/z 445,3862, $\Delta = -0,90$ ppm). Aucun autre fragment ne permet de placer un autre groupement hydroxyle ou un hétérocycle. Cette résolution partielle de structure permet de proposer une structure (Figure 61) pour laquelle les positions du cycle THF et du dernier hydroxyle sont fixées arbitrairement entre le C12 et le C34.

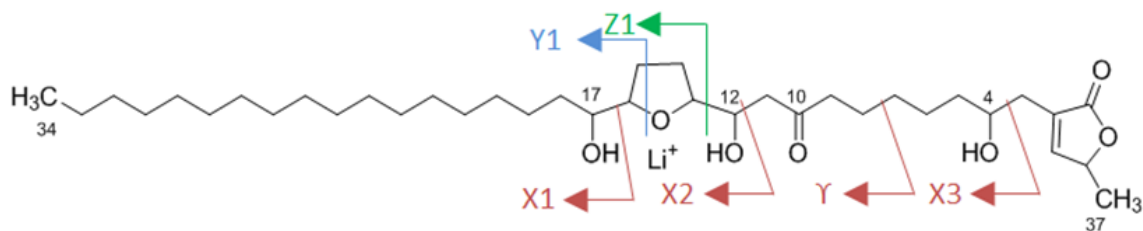


Figure 61 : Structure proposée pour le pic A de la Figure 59.

Le spectre MS/MS du pic B ($t_{r_{SFC/LC}}$: 4,2/23,5 min) ne montre aucun fragment mettant en évidence la présence d'un hydroxyle en C4. Ce type de molécule a déjà été signalé par le passé [Allegrand J. 2010]. Le fragment présentant le plus grand rapport m/z dans le spectre MS/MS pourrait ensuite être attribué à une rupture en γ d'une cétone positionnée en C14 (m/z 389,3238, $\Delta = -0,59$ ppm). Ce fragment correspond à la perte de 3 atomes d'oxygène ce qui peut conduire à deux hypothèses :

- Un hydroxyle est présent entre le C4 et le C14.
- Un hydroxyle est présent sur la lactone.

La présence d'un hydroxyle le long de la chaîne carbonée (entre le C4 et le C14) semble peu probable. En effet, si un hydroxyle était présent, un fragment de type X devrait être visible.

La présence d'un oxygène supplémentaire du côté de la lactone peut être liée à une lactone de type B, C, D, E ou encore F (Tableau 6). Le type B est éliminé grâce à l'injection d'isoannonacine dont le spectre MS/MS ne montre aucune perte de CO_2 contrairement à ce qui est observé ici. Finalement, une lactone de type D est proposée puisque ces molécules ont déjà été mises en évidence dans la genre *Annona* [Bermerjo A. 2005].

La position du cycle furanique est déterminée entre C18 et C22 grâce à la présence du fragment Y_1 (m/z 233,2455, $\Delta = 0,86$ ppm). Le second hydroxyle est positionné en C17 grâce au fragment X_2 (m/z 305,2657, $\Delta = -2,29$ ppm). Le dernier hydroxyle est positionné de façon arbitraire, dans sa position la plus probable [Bermerjo A. 2005], sur la proposition de structure (Figure 62) puisqu'aucun fragment de type X ne permet de le positionner sur un carbone en particulier entre C22 et C34.

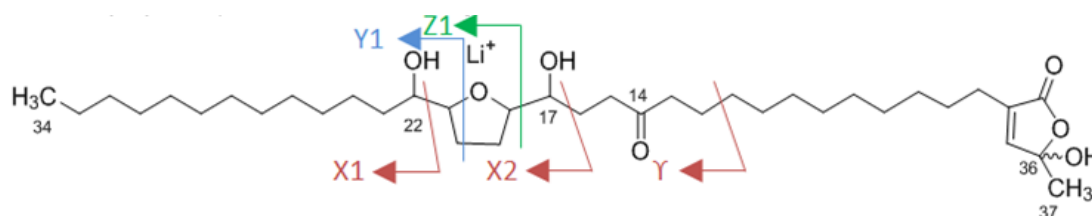


Figure 62 : Structure proposée pour le pic B de la Figure 59

5.1 Isomères de la montanacine-D (C₃₅H₆₀O₇)

L'EIC du rapport m/z 599,4497 met en évidence plusieurs pics chromatographiques (Figure 63). Ces pics chromatographiques correspondent aux signaux des adduits au lithium des isomères de la montanacine-D dont la structure est présentée Figure 64.

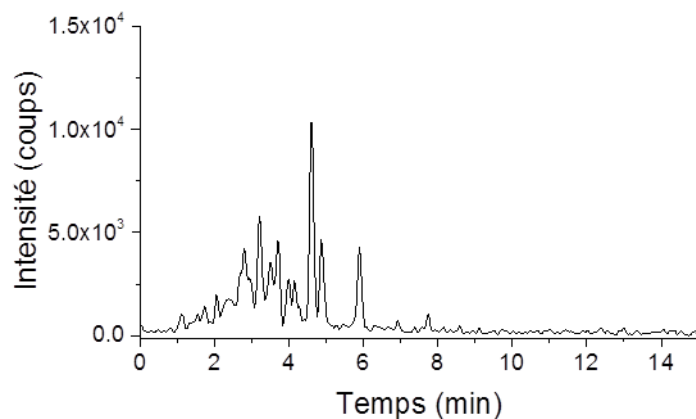


Figure 63 : EIC du rapport m/z correspondant aux adduits au lithium des isomères de la montanacine-D (599,4500) après injection de l'extrait de graine en mode SFC.

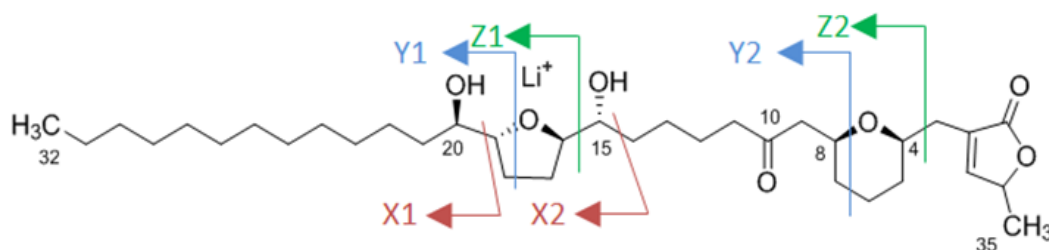


Figure 64 : Structure de la montanacine-D.

La recherche du fragment Y₂ (m/z 431.3713), qui correspond à une coupure au niveau du cycle pyranique, permet de mettre en évidence des isomères portant ce cycle entre le C4 et le C8 à des temps de rétention allant de 2,0 à 4,4 min (Figure 65). Cet EIC montre que les pics majoritaires de la Figure 63 (entre 4,5 et 6,0 min) ne portent pas de cycle pyranique entre le C4 et le C8. L'étude des spectres MS/MS de ces pics chromatographiques permet d'identifier des fragments de type X informant de la présence d'hydroxyle en C4 (m/z 487,3975) et en C8 (m/z 415,3340) en lieu et place de l'hétérocycle.

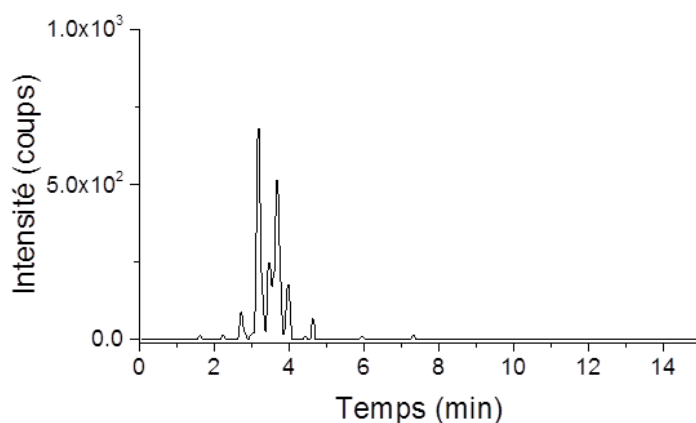


Figure 65 : EIC du fragment Y₂ (m/z 431.3713) provenant de l'adduit au lithium des isomères de la montanacine-D (599,4500) après injection de l'extrait de graine en mode SFC.

La méthode SFC permet donc de séparer en deux groupes les molécules porteuses d'un cycle pyranique entre le C4 et le C8 et celles portant des hydroxyles en C4 et C8. Cette caractéristique pourrait être exploitée dans le cadre d'une stratégie de purification par SFC préparative.

6 Conclusion

La détermination structurale à partir des informations obtenues grâce à la SFC-HRMS/MS permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus en HPLC-HRMS/MS. Les avantages d'une séparation par SFC en amont de la spectrométrie de masse sont :

- ✓ Un temps d'analyse divisé d'un facteur 3 ;
- ✓ Une résolution chromatographique améliorée ;
- ✓ Une diminution du volume de solvant à recycler (env. 12 mL/inj. en HPLC contre 5 mL/inj. en SFC).

Cependant les résultats montrent que l'information structurale reste très difficilement accessible. En effet, les fragments de petites tailles ne sont bien souvent pas détectés sur les spectres MS/MS. L'absence de ces fragments conduit à des attributions partielles de structure. De plus, les ions intéressants sont à peine plus intenses que le bruit généré. Il est alors très difficile de considérer un ion plutôt qu'un autre pour une attribution de structure.

Cette faible intensité est un frein vers l'utilisation d'outils bio-informatiques pour l'annotation automatique des acétogénines présentes dans les mélanges complexes. Ce travail d'annotation, actuellement réalisé manuellement, demande aujourd'hui beaucoup de temps. L'impossibilité de l'utilisation d'outils bio-informatiques est assurément un frein pour l'étude des acétogénines dans les extraits naturels.

Afin de diminuer le bruit des spectres MS/MS, plusieurs options sont envisageables. Il est possible de travailler à nouveau la chromatographie pour diminuer les co-élution d'isomères qui conduisent à la superposition des spectres MS/MS. Il est également possible d'essayer d'augmenter l'efficacité de notre séparation. En diminuant les volumes morts extra-colonne, il est possible d'obtenir une meilleure séparation de nos isomères. Pour ce faire, une nouvelle interface a été acquise par le laboratoire à la fin de ces travaux. Elle permet de s'affranchir du passage des analytes dans le régulateur de contre-pression avant leur détection (voir Chapitre I section 4.2). En effet, ce régulateur est soupçonné d'induire de forts effets extra-colonne. Ce système n'a pas encore pu être testé sur ce projet.

Pour finir, il a été montré qu'il est possible de modifier l'ionisation et la fragmentation des acétogénines en ajoutant des sels de lithium. Le cation semble donc avoir une grande importance pour notre problématique. Il serait donc intéressant de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'utilisation du lithium et de les comparer avec d'autres cations. L'utilisation d'un autre métal permettrait peut-être de modifier favorablement la fragmentation pour qu'elle soit encore plus riche qu'avec l'utilisation du lithium. Ces problématiques sont traitées dans le chapitre suivant (IIB).

7 Références

A.

[AFSSA 2010] AFSSA. Saisine n°2008-SA-0171. 2010.

[Allegrand J. 2010] Allegrand J., Touboul D., Schmitz-Afonso I., Guérineau V., Giuliani A., Le Ven J., Champy P., Laprévotte O. Rapid Comm. Mass Spectrom. 2010; 24:3602.

[Angibaud G. 2004] Angibaud G., Gaultier C., Rascol O. Mov. Dis. 2004; 19:603.

B.

[Bermejo A. 2005] Bermejo A., Figadère B., Zafra-Polo M.-C., Barrachina I., Estornell E., Cortes D. Nat. Prod. Rep. 2005; 22:269.

[Bonneau N. 2015] Natacha Bonneau. Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques : de la biodisponibilité de l'annonacine à l'exposition alimentaire. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2015. Français. <NNT : 2015SACLS271>. <tel-01459289>.

[Bonneau N. 2017] Bonneau N., Baloul L., Bajin ba Ndob I., Sénéjoux F., Champy P. Food Chem. 2017; 226:32.

C.

[Caparros-Lefèbvre D. 1999] Caparros-Lefèbvre D., Elbaz A. Lancet. 1999; 354:281.

[Caparros-Lefèbvre D. 2002] Caparros-Lefèbvre D., Sergeant N., Lees A., Camuzat A., Daniel S., Lannuzel A., Brice A., Tolosa E., Delacourte A., Duyckaerts C. Brain. 2002; 125:801.

[Caparros-Lefèbvre D. 2006] Caparros-Lefèbvre D., Steele J., Kotake Y., Ohta S. Mov. Disord. 2006; 21:1769.

[Chahboune N. 2006] Chahboune N., Barrachina I., Royo I., Romero V., Saez J., Tormo J.R., De Pedro N., Estornell E., Zafra-Polo C.M., Pelaez F., Cortes D. Bioorg. Med. Chem. 2006;14:1089.

[Champy P. 2009] Champy P., Guérineau V., Laprévotte O. Molecules. 2009; 14:5235.

[Champy P. 2004a] Champy P. Étude chimique et biologique des neurotoxines d'*A. muricata* L. (Annonaceae) pouvant être impliquées dans le survenue des parkinsonismes atypiques en Guadeloupe. Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud. Français. 2004.

[Champy P. 2004b] Champy P., Hoglinger G.U., Feger J., Gleye C., Hocquemiller R., Laurens A., Guérineau V., Laprévotte O., Medja F., Lombes A., Michel P.P., Lannuzel A., Hirsch E.C., Ruberg M. J. Neurochem. 2004; 88:63.

[Cortès D. 1993] Cortes D., Myint S.H., Dupont B., Phytochemistry. 1993; 32:1475.

D.

[Dorsey E.R. 2007] Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M. Neurology. 2007; 68:384.

F.

[Fabre N. 1997] Fabre N., Brefel-Courbon C., Rascol O. Rev. Pratic. 1997; 47:1077.

G.

[Gu Z. 1997] Gu Z.M., Zhou D., Wu J., Shi G., Zeng L., McLaughlin J.L. J. Nat. Prod. 1997; 60:242.

H.

[Hollerhage M. 2009] Hollerhage M., Matusch A., Champy P., Lombes A., Ruberg M., Oertel W.H., Hoglinger G.U. Exp. Neurol. 2009; 220:133.

J.

[Jolad S.D. 1982] Jolad S.D., Hoffmann J.J., Schram K.H., Cole J.R., Tempesta M.S., Kriek G.R., Bates R.B. J. Org. Chem. 1982; 47:3151.

L.

[Laprévote O. 1993] Laprévote O., Girard C., Das B.C., Laurens A., Cavé A. Analysis. 1993; 21:207.

[Laprévote O. 1994] Laprévote O., Roblot F., Hocquemiller R., Cavé A. Tetrahedron, 1994; 50:8479.

[Laprévote O. 1992a] Laprévote O., Girard C., Das B.C., Laugel T., Roblot F., Leboeuf M., Cavé A. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1992; 6:352.

[Laprévote O. 1992b] Laprévote O., Girard C., Das B.C., Cortes D., Cavé A. Tetrahedron Lett. 1992; 33:5237.

[Le Ven J. 2012] Le Ven J., Schmitz-Afonso J., Lewin G., Laprévote O., Brunelle A., Touboul D., Champy P. J. Mass Spectrom. 2012; 47:1500.

[Le Ven J. 2012] Jessica Le Ven. Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonisme : identification et quantification d'acétogénines par dérégulation; métabolisation de phase I et approche de la distribution de l'annonacine. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud -Paris XI, 2012. Français.

[Le Ven J. 2014] Le Ven J., Schmitz-Afonso J., Lewin G., Brunelle A., Touboul D., Champy P. J. Agric. Food Chem. 2014; 62:8696.

[Liaw C.-C. 2010] Liaw C.-C., Wu T.-Y., Chang F.-R., Wu Y.-C. Planta Med. 2010; 76:1390.

M.

[Mc Laughlin J.L. 2008] McLaughlin J.L. J. Nat. Prod. 2008; 71:1311.

[Méjean M. 2014] Marie Méjean. Développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français

P.

[Parkinson J. 1817] An essay on the shaking palsy, London. 1817.

[Pomper K.W. 2009] Pomper K.W., Lowe J.D., Crabtree S.B., Keller W. J. Agric. Food Chem. 2009; 57:8339.

R.

[Rottscholl R. 2016] Rottscholl R., Haegele M., Jainsch B., Xu H., Respondek G., Hollerhage M., Rosler T.W., Bony E., Le Ven J., Guerineau V., Schmitz-Afonso I., Champy P., Oertel W.H., Yamada E.S., Hoglinger G.U. J/ Neurochem. 2016; 139:624.

T.

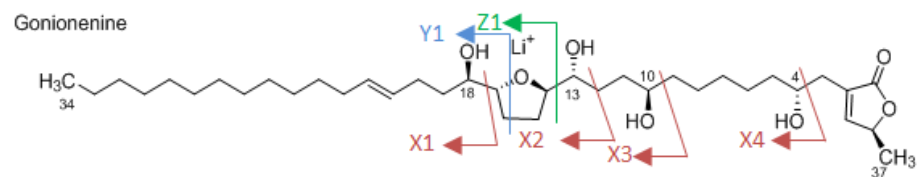
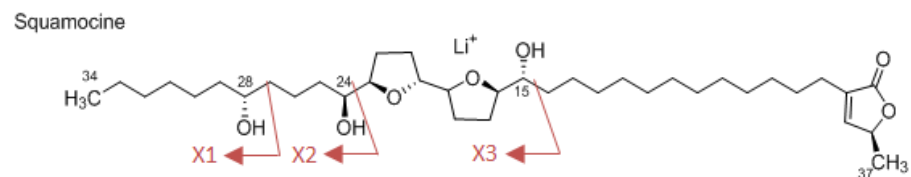
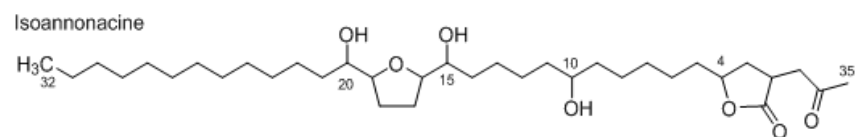
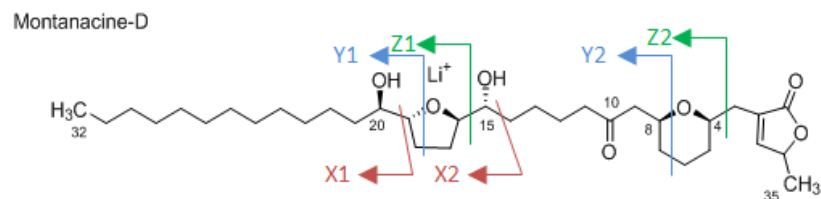
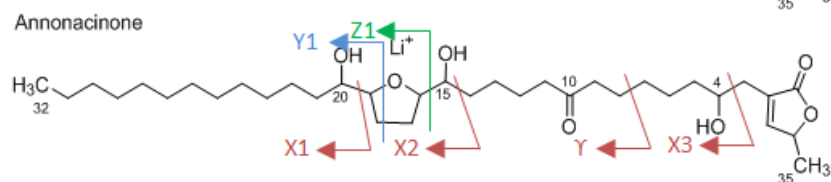
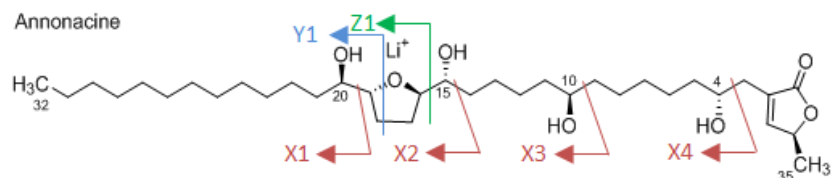
[Takhtajana A. 1986] Takhtajan A. 1986. Floristic regions of the world. University of California. Press Berkeley, 401 p.

[Teixeira Machado A. 2015] Teixeira Machado, A.R.T., Lage, G.A., da Silva Medeiros, F., de Souza Filho, J.D., Pimenta, L.P.S. Appl. Magn. Reson. 2014; 46 :153.

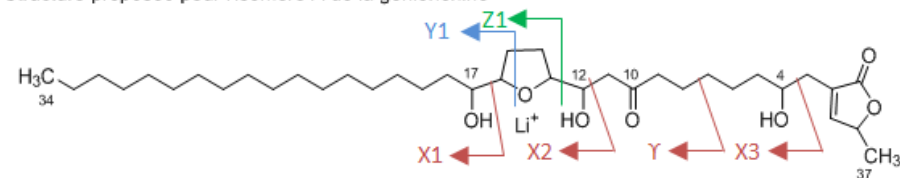
Y.

[Yamada E.S. 2014] Yamada E.S., Respondek G., Mussner S., de Andrade A., Hollerhage M., Depienne C., Rastetter A., Tarze A., Friguet B., Salama M., Champy P., Oertel W.H., Hoglinger G.U. Exp. Neurol. 2014; 253:113.

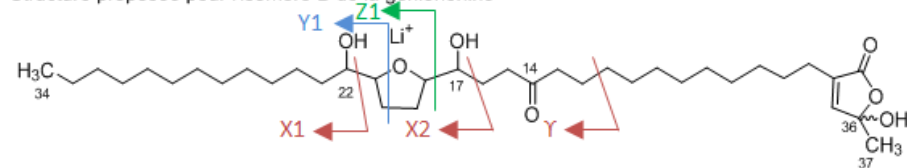
8 Annexe 1 : Structures des acétogénines étudiés



Structure proposée pour l'isomère A de la gonionenine



Structure proposée pour l'isomère B de la gonionenine



9 Annexe 2 : Listes des fragments par acétogénines

Cette annexe regroupe l'ensemble des rapports m/z théoriques des fragments pour les différentes acétogénines étudiées dans ce manuscrit.

Les calculs ont été réalisés avec les données du Tableau A2-1.

Espèce	m/z
C	12,00000
H	1,00783
O	15,99492
Na	22,98977
K	38,96371
Li	7,01601
Cu	62,92960
Électron	-0,00055

Tableau A2-1 : Données utilisées pour le calcul des rapports m/z .

La nomenclature utilisée est rappelée dans la Figure A2-1.

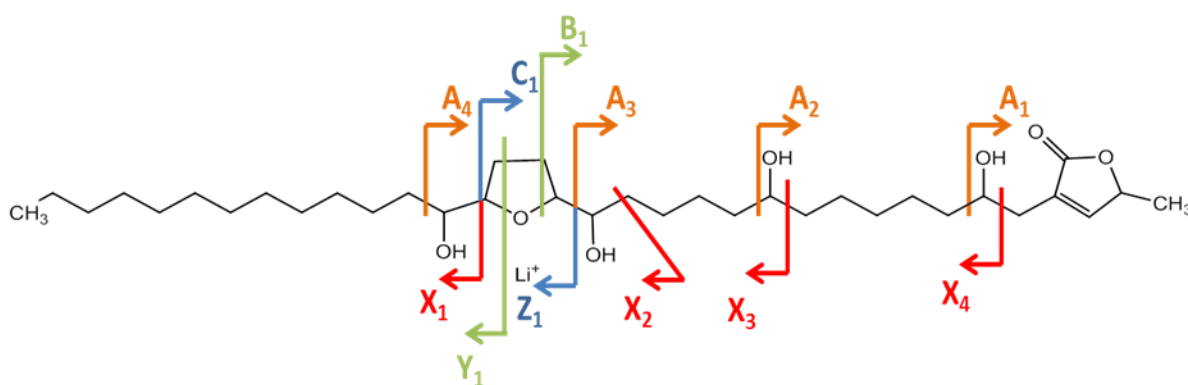
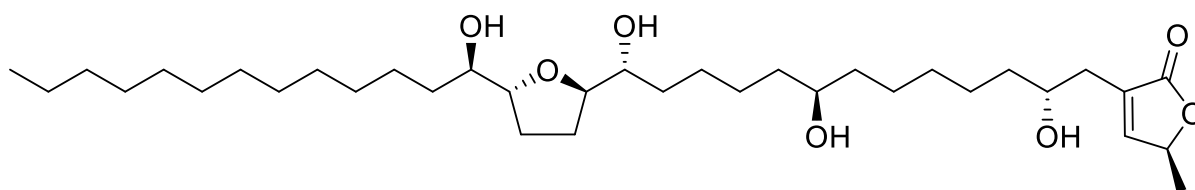


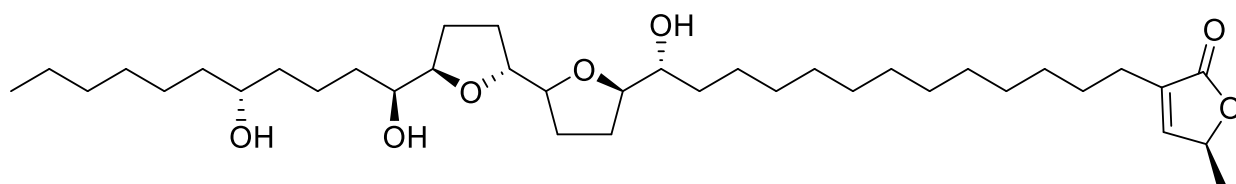
Figure A3-1 : Nomenclature des fragments d'acétogénine.

9.1 L'annonacine



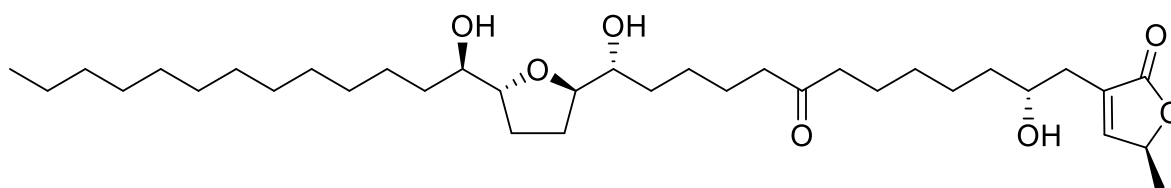
Fragment	Formule			H	Na	K	Li	Cu	Cu - H
	C	H	O						
M	35	64	7	597,47284	619,45478	635,42872	603,48102	659,39461	658,38678
A1	7	8	3				147,06286	202,97645	201,96862
A2	13	20	4				247,15174	303,06533	302,0575
A3	18	30	5				333,22496	389,13855	388,13072
A3-H2O	18	28	4				315,21438	371,12797	370,12014
A4	23	38	7				433,27744	489,19103	488,1832
B1	20	34	5				361,25628	417,16987	416,16204
C1	22	36	6				403,26686	459,18045	458,17262
C1+2H	22	38	6				405,28252	461,19611	460,18828
C1+2H-H2O	22	36	5				387,27194	443,18553	442,1777
X1	13	26	1				205,21396	261,12755	260,11972
X2	18	34	3				305,26644	361,18003	360,1722
X3	23	44	4				391,33966	447,25325	446,24542
X4	29	56	5				491,42854	547,34213	546,3343
X4-2H2O	29	52	3				455,40738	511,32097	510,31314
X4-H2O	29	54	4				473,41796	529,33155	528,32372
Y1	15	30	1				233,24528	289,15887	288,15104
Z1	17	32	2				275,25586	331,16945	330,16162

9.2 La squamocine



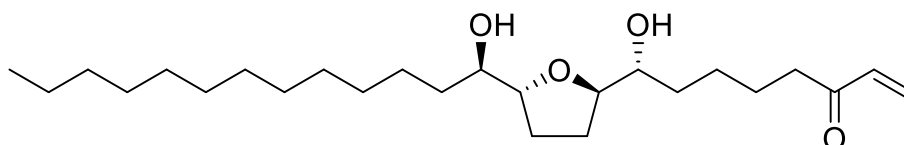
Fragment	Formule			H	Na	K	Li	Cu	Cu - H
	C	H	O						
M	37	66	7	623,4885	645,47044	661,44438	629,49668	685,41027	684,40244
A1	18	30	3				254,12783	310,04142	309,03359
A2	27	44	6				385,17756	441,09115	440,08332
A3	31	52	7				495,27194	551,18553	550,1777
B1	20	34	3				305,20888	361,12247	360,11464
B2	24	40	4				375,25078	431,16437	430,15654
C1	22	36	4				347,21946	403,13305	402,12522
C2	26	42	5				417,26136	473,17495	472,16712
X1	7	15	1				169,23512	225,14871	224,14088
X2	11	22	2				279,3295	335,24309	334,23526
X3	20	36	5				411,38706	467,30065	466,29282
Y1	13	26	2				245,26644	301,18003	300,1722
Y2	17	32	3				315,30834	371,22193	370,2141
Z1	15	28	3				287,27702	343,19061	342,18278
Z2	19	34	4				357,31892	413,23251	412,22468

9.3 L'annonacinone

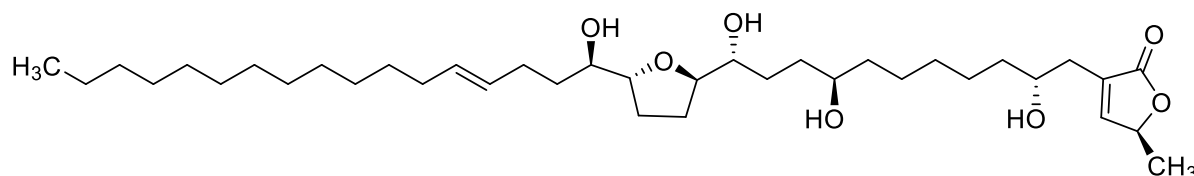


Fragment	Formule			H	Na	K	Li
	C	H	O				
M	35	62	7	595,45718	617,43912	633,41306	601,46536
X1	13	26	1				205,21396
X2	18	34	3				305,26644
X3	29	54	5				489,41288
Y1	15	30	1				233,24528
Z1	17	32	2				275,25586
Y	25	46	4				417,35532

Fragment Y :

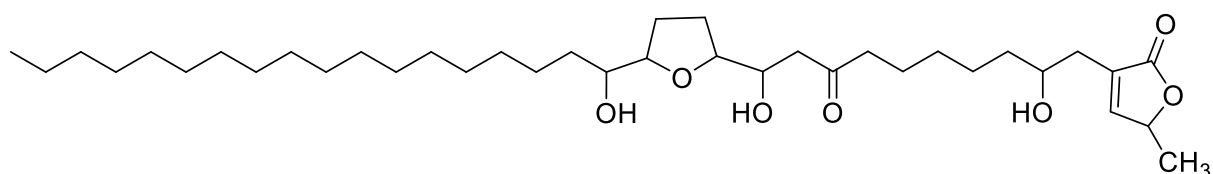


9.4 La gonionenine



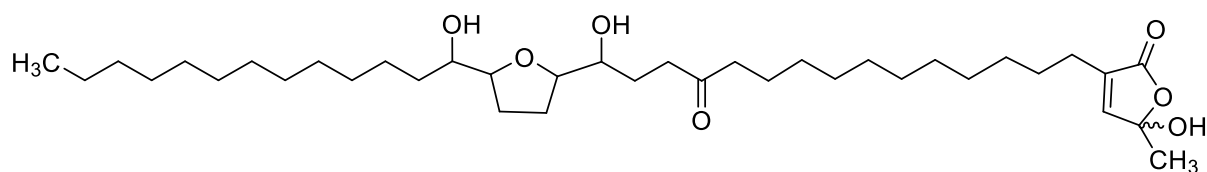
Fragment	Formule			H	Na	K	Li
	C	H	O				
M	37	66	7	623,4885	645,47044	661,44438	629,49668
X1	17	32	1				259,26094
X2	22	40	3				359,31342
X3	31	58	5				517,44420
Y1	19	36	2				303,28718
Z1	21	38	2				329,30284
X4	25	46	5				433,35024

9.5 Isomère A de la gonionénine



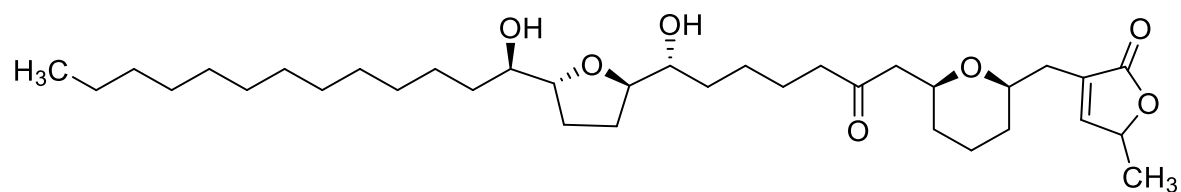
Fragment	Formule			H	Na	K	Li
	C	H	O				
M	37	66	7	623,4885	645,47044	661,44438	629,49668
X1	18	36	1				275,29226
X2	23	44	3				375,34474
X3	31	58	5				517,4442
Y1	20	40	1				303,32358
Z1	22	42	2				345,33416
Y	27	50	4				445,38664

9.6 Isomère B de la gonionénine



Fragment	Formule			H	Na	K	Li
	C	H	O				
M	37	66	7	623,4885	645,47044	661,44438	629,49668
X1	13	26	1				205,21396
X2	18	34	3				305,26644
Y1	15	30	1				233,24528
Z1	17	32	2				275,25586
Y	23	42	4				389,3240

9.7 La montanacine-D



Fragment	Formule			H	Na	K	Li
	C	H	O				
M	35	60	7	593,44152	615,42346	631,3974	599,4497
X1	13	26	1				205,21396
X2	18	34	3				305,26644
Y1	15	30	1				233,24528
Y2	26	48	4				431,37098
Z1	17	32	2				275,25586
Z2	29	52	5				487,39722

CHAPITRE IIB

**Étude de la conformation des adduits
d'acétogénines et des voies de
fragmentation induites par la nature
du cation métallique**

Plan du chapitre

1	Introduction.....	117
2	Étude des adduits en phase gazeuse par spectroscopie de mobilité ionique	117
2.1	Matériels et Méthodes.....	119
2.1.1	Standards.....	119
2.1.2	Les sels.....	119
2.1.3	L'appareillage	119
2.1.4	Calibrant de la cellule de mobilité.....	120
2.2	Résultats	120
2.2.1	Calibration de la cellule de mobilité.....	120
2.2.2	Détermination des sections efficaces de collision	123
2.3	Bilan de l'étude de section efficace de collision	125
3	Fragmentation des adduits d'acétogénines cationisés au cuivre (II)	125
3.1	Matériels et méthodes	127
3.1.1	Les standards.....	127
3.1.2	Le sel de cuivre	127
3.1.3	Conditions chromatographiques.....	127
3.1.4	Spectromètre de masse.....	127
3.2	Résultats	128
3.2.1	Précision en masse	128
3.2.2	Fragmentation de l'annonacine	128
3.2.3	Fragmentation de la squamocine.....	131
3.2.4	Bilan de l'étude des voies de fragmentation des adduits au Cu (II).....	132
4	Références.....	133

Table des Figures

Figure 66 : Hypothèse de structure du complexe $[M+Li]^+$ dans le cas d'une acétogénine portant deux cycles furaniques adjacents.....	118
Figure 67 : Structure des standards utilisés.	119
Figure 68 : Représentation schématique du SynaptG2Si-HDMS.....	120
Figure 69 : Mobilogrammes obtenus pour les polymères d'alanine. n représente le nombre de motifs alanine dans le polymère.	122
Figure 70 : Droites de régression. Voir Tableau 20 pour la description de chaque situation.	123
Figure 71 : Complexation de l'elesclomol par le cuivre (II)..	126
Figure 72 : Spectres MS/MS de l'adduit $[M+Li]^+$ (en haut) et de l'adduit $[M+Cu-H]^+$ (en bas) de l'annonacine.	127
Figure 73 : Spectre MS de l'annonacine obtenu après infusion post-colonne de sels de cuivre.....	128
Figure 74 : Illustration de la nomenclature des fragments obtenus en MS/MS pour l'annonacine.	129
Figure 75 : Spectres MS/MS des adduits $[M+Cu-H]^+$ et $[M+CuCl]^+$ de l'annonacine.....	129
Figure 76 : Propositions de mécanismes conduisant à la formation des ions observés.	130
Figure 77 : Spectre MS/MS obtenu à partir de l'adduit $[M+Li]^+$ de l'annonacine (Figure 19 du chapitre IIA)	131
Figure 78 : Structure de la squamocine et nomenclature des adduits observés.....	131
Figure 79 : Proposition de structure pour l'ion m/z 203,0322 présent sur le spectre de la squamocine.	132

1 Introduction

L'étude structurale des acétogénines par spectrométrie de masse, avec ou sans dimension séparative en amont, nécessite l'utilisation de sels de lithium dans le but de former des adduits $[M+Li]^+$. Le lithium a pour double rôle d'augmenter la sensibilité et d'induire des voies de fragmentation permettant une meilleure caractérisation structurale (position des hydroxyles, des groupements THF, type de lactone ...).

Cette observation est également relevée dans la littérature pour l'étude de polyglycols d'une part et d'acides gras d'autre part. Ces études ont permis de mettre en évidence la capacité des adduits au lithium à fournir des spectres MS/MS différents des autres cations métalliques [Adams J. 1998 ; Lattimer R.P. 1992]. Les auteurs affirment que le lithium est le seul à avoir la capacité de former des liaisons suffisamment énergétiques avec les atomes d'oxygène pour résister aux conditions de fragmentation. Les autres cations formeraient des liaisons moins fortes conduisant majoritairement à la perte du cation métallique lors de la fragmentation.

Concernant l'étude d'acétogénines, notre laboratoire utilise la cationisation au lithium depuis près de 25 ans. En effet, lorsque l'expérimentateur n'a pas recours à ces sels, les spectres de masse obtenus laissent apparaître majoritairement l'espèce protonée $[M+H]^+$ et l'adduit au sodium $[M+Na]^+$, ainsi que l'adduit au potassium $[M+K]^+$ dans une moindre mesure. Les spectres MS/MS après isolement de ces différents adduits permettent d'identifier généralement une succession d'ions fragments correspondants à des pertes d'eau⁴⁸. En revanche, lorsqu'un adduit $[M+Li]^+$ est fragmenté, le spectre MS/MS généré laisse apparaître des fragments permettant d'établir tout ou une partie de la structure de la molécule d'intérêt.

Bien que présente sur les spectres MS/MS, une partie des ions intéressants est souvent confondue avec le bruit car les rendements de fragmentation sont extrêmement faibles (Figure 21 du chapitre IIA). Il est alors très compliqué d'établir la structure de molécules inconnues manuellement et inenvisageable d'informatiser cette étape en l'état.

La mise en place de la méthode SFC-HRMS/MS pour l'analyse structurale des acétogénines d'Annonaceae a fait resurgir des interrogations quant aux phénomènes permettant d'expliquer les différences observées sur les spectres MS/MS des adduits $[M+Li]^+$. Aussi, étant donné que le passage de l'adduit au sodium vers l'adduit au lithium a révolutionné l'usage de la spectrométrie de masse pour l'analyse structurale de ces composés, il est envisageable que d'autres cations métalliques puissent aussi conduire à des voies de fragmentation permettant une meilleure caractérisation structurale.

Au travers ce projet, le laboratoire a souhaité obtenir des pistes permettant d'expliquer l'influence de la nature du cation impliqué dans l'adduit sur les voies de fragmentations observées.

2 Étude des adduits en phase gazeuse par spectroscopie de mobilité ionique

Laprévotte *et al.* proposent l'hypothèse d'un repliement particulier des acétogénines autour du cation lithium [Laprévotte O. 1994]. En effet, les atomes d'oxygène provenant de la lactone terminale et du ou des cycles furaniques formeraient une cage de coordination autour du cation lithium. La structure proposée par les auteurs est présentée en Figure 66. Il serait alors intéressant de vérifier

⁴⁸ Voir sections 1.4 et 4.2 du chapitre précédent.

expérimentalement si un repliement a bien lieu lors de la cationisation au lithium et si ce repliement semble spécifique à ce cation.

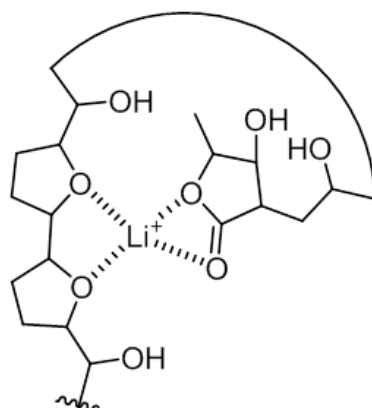


Figure 66 : Hypothèse de structure du complexe $[M+Li]^+$ dans le cas d'une acétogénine portant deux cycles furaniques adjacents [Laprévôte O. 1994].

La spectrométrie de mobilité ionique est un outil permettant d'étudier la configuration des ions en phase gazeuse. En effet, elle permet la séparation des ions en phase gazeuse en fonction de leur section efficace de collision⁴⁹. Pour ce faire, les ions sont introduits dans un tube contenant un gaz tampon. Ils y sont d'une part soumis à un champ électrique contrôlé afin de les accélérer et d'autre part à des collisions avec le gaz tampon, chargées de les ralentir. Ainsi, pour un même rapport m/z , il est possible d'obtenir des temps de traversée, appelés temps de drift, différents en fonction de la forme tridimensionnelle des ions et donc de leur section efficace de collision. Un ion compact subira moins les effets du gaz tampon qu'un ion déplié. Il est également possible de relier la section efficace de collision, le rapport m/z et la mobilité des ions grâce à l'équation suivante :

$$K = \frac{3}{16} \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{m}} \times \frac{ze}{N \Omega_{moyen}}$$

Avec K la mobilité de l'ion
 k_b la constante de Boltzmann
 T la température
 M la masse de l'ion
 m la masse de la molécule de gaz
 z la charge de l'ion
 e la charge portée par un électron
 N la densité numérique du gaz (relié à la pression et la nature du gaz)
 Ω_{moyen} la section efficace moyenne de collision

Cette expression permet de déterminer expérimentalement la section efficace de collision d'un ion en phase gazeuse moyennant un étalonnage de l'appareil.

La section efficace de collision en phase gazeuse est un paramètre intéressant pour notre étude puisqu'elle pourrait constituer la preuve d'un repliement spécifique lors de l'utilisation de lithium. Dans ce contexte, un temps machine nous a été octroyé sur un appareil mutualisé du consortium MOBICS⁵⁰.

⁴⁹ Voir section 3.3.5 du chapitre I.

⁵⁰ <http://www.mobics.u-psud.fr/>

2.1 Matériels et Méthodes

2.1.1 Standards

Deux standards d'acétogénine d'Annonaceae ont été utilisés lors de ce projet. L'annonacine ($C_{35}H_{64}O_7$) a été isolée à partir d'*Annona muricata*. La squamocine ($C_{37}H_{66}O_7$) quant à elle a été isolée à partir d'*Annona squamosa*. Les méthodes de purifications sont précisées dans le chapitre IIA section 2.1. Les structures de ces deux acétogénines sont précisées en Figure 67. L'obtention de ces standards résulte du travail de Yazid Khaled Khodja, Jessica Le Ven, et Natacha Bonneau du laboratoire BioCIS. Pour chaque standard, une solution de travail a été préparée à une concentration de 1 mmol/L dans du méthanol.

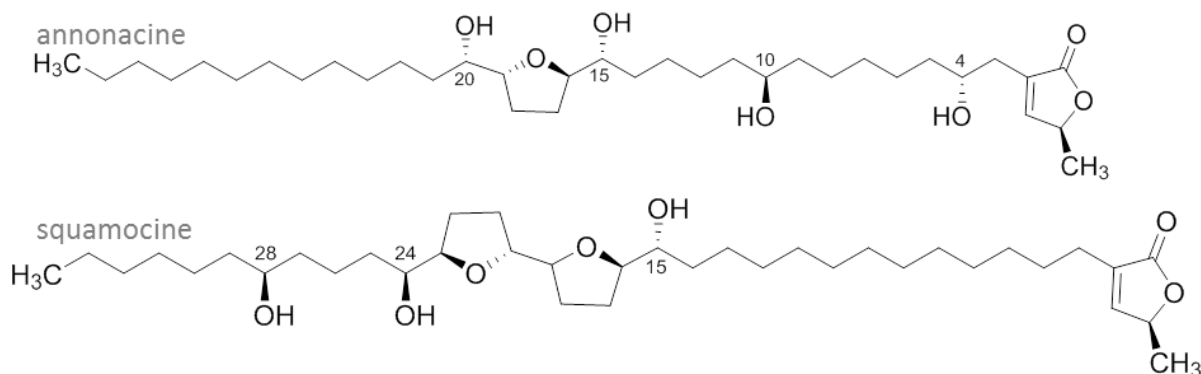


Figure 67 : Structure des standards utilisés.

2.1.2 Les sels

Plusieurs sels métalliques ont été utilisés lors de cette étude dans le but d'observer l'influence de la nature du cation sur la complexation. Ainsi l'étude s'est portée à la fois sur des cations monovalents (sels : NaI, LiI, KI) et bivalents (sels : CuSO₄, CuCl₂ et CaCl₂). Les solutions injectées contenaient 10 μmol/L d'un standard d'acétogénine et 10 mmol/L d'un sel.

2.1.3 L'appareillage

L'appareil utilisé est un spectromètre de masse de type Q-TOF qui intègre une cellule de mobilité ionique intercalée entre le quadripôle et le tube de vol. Il s'agit du Synapt G2Si-HDMS de la société Waters, équipé d'une source *electrospray*. La Figure 68 est une représentation schématique de l'appareil.

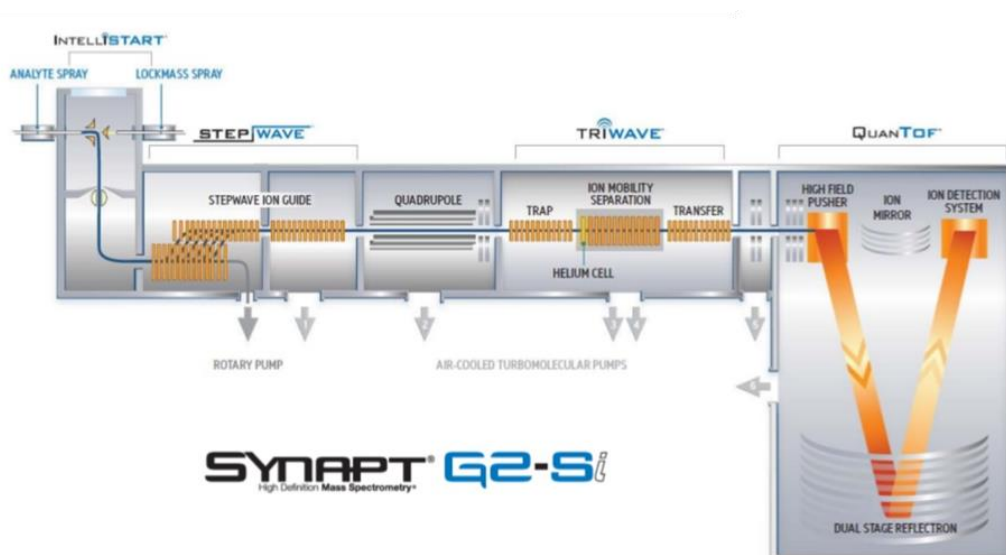


Figure 68 : Représentation schématique du SynaptG2Si-HDMS. Source : Waters.

Le spectromètre a été utilisé avec une résolution en masse de 20000 permettant de concilier résolution et sensibilité. Il a été étalonné à l'aide d'une solution de trifluoroacétate de sodium grâce à la formation de différents clusters en source (m/z 158,9645 ; 294,9393 ; 430,9142 ; 566,8890 ; 702,8638 ; 838,8386) [Moini M. 1998]. La gamme de m/z étudiée a été fixée entre 50 et 900. Les paramètres de source retenus sont présentés dans le Tableau 17. Les solutions ont été infusées à l'aide d'un pousse-seringue à un débit de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les acquisitions ont été réalisées sur 2 minutes pour chaque échantillon.

Paramètre	Valeur
Température de la source	80°C
Température du nébuliseur	280°C
Débit du nébuliseur	600 L/h
Tension du capillaire	3 kV
Tension du cône	50 V
Débit dans la cellule de mobilité	180 mL/min
Vitesse de la vague	400 m/s
Hauteur de la vague	40 V
<i>EDC</i> ⁵¹ Delay	1,4
Nature du gaz dans la cellule de mobilité	N ₂

Tableau 17: Paramètres du SynaptG2Si-HDMS.

2.1.4 Calibrant de la cellule de mobilité

La poly-DL-alanine a été utilisée pour calibrer la cellule de mobilité en mode positif. La solution de calibration a été réalisée dans un mélange eau/acétonitrile (1/1, v/v) à une concentration de 1 mg/mL. Cette solution a ensuite été diluée au 10^{ème} dans du méthanol avant d'être infusée à un débit de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.2 Résultats

2.2.1 Calibration de la cellule de mobilité

Les polymères d'alanine sont utilisés comme calibrant de la cellule de collision car les valeurs des rapports m/z et celles de leurs sections efficaces de collision sont tabulées dans la littérature [Bush

⁵¹ Enhanced Duty Cycle

M.F. 2012]. Les adduits attendus pour les deux acétogénines étudiées se situent dans la gamme de rapport m/z 500-900. Dans cette gamme, 6 polymères d'alanine, contenant 7 à 12 motifs, sont attendus. L'ensemble de ces polymères fourni des ions monochargés correspondants aux espèces protonées. Les rapports m/z ainsi que les sections efficaces de collision sont répertoriés dans le Tableau 19. Les mobilogrammes correspondants à ces rapports m/z ont été extraits (Figure 69). Les temps de drift augmentent avec le nombre de motifs du polymère. Cette observation est cohérente puisque la taille des ions augmente alors que la charge reste la même. L'acquisition a été réalisée en triplicata. Les temps de drift mesurés se sont avérés extrêmement répétables (Tableau 18).

Ruotolo *et al.* proposent une correction des temps de drift mesurés en fonction du rapport m/z et du paramètre *EDC Delay* de l'instrument suivant l'équation [Ruotolo B.T. 2008]:

$$dt' = dt - C \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Avec dt' le temps de drift corrigé
 $C = 0,001 \times \text{EDC Delay}$
 m la masse de l'ion
 z la charge de l'ion

Ces mêmes auteurs proposent également de corriger les valeurs de CCS tabulées dans la littérature suivant l'expression :

$$\Omega' = \frac{\Omega}{z \sqrt{\frac{1}{\mu}}}$$

Avec Ω' la CCS corrigée
 z la charge de l'ion
 μ la masse réduite entre le gaz et l'ion : $\frac{1}{\mu} = \frac{1}{M_{\text{ion}}} + \frac{1}{M_{\text{gaz}}}$

Les valeurs corrigées du temps de drift et de la section efficace de collision sont tabulées dans le Tableau 19.

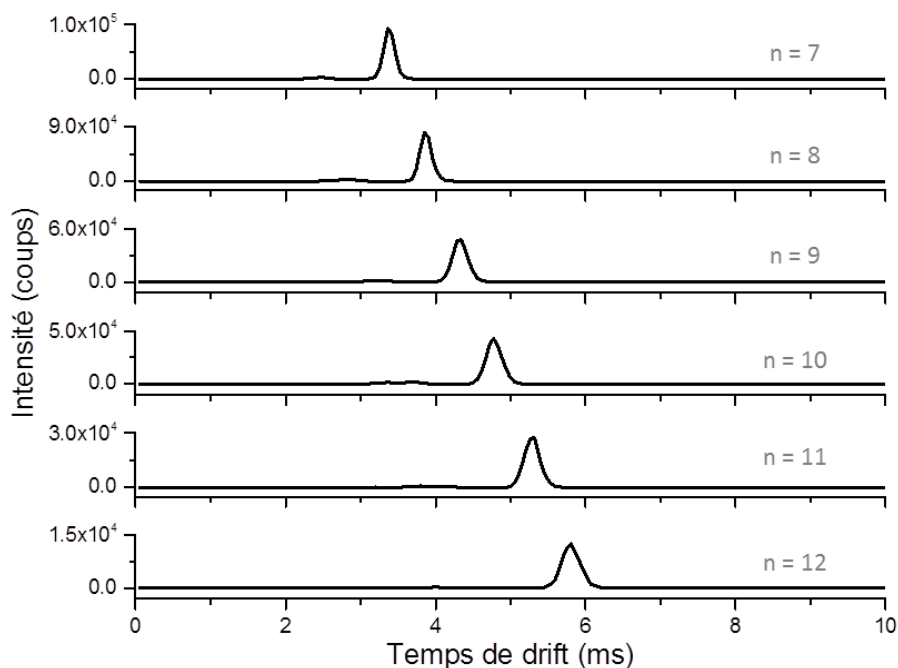


Figure 69 : Mobilogrammes obtenus pour les polymères d'alanine. n représente le nombre de motifs alanine dans le polymère.

n alanine	m/z	temps de drift (ms)			Td _{moyen}	écart-type
		Infusion 1	Infusion 2	Infusion 3		
7	516,2778	3,36	3,36	3,36	3,36	0
8	587,3150	3,85	3,85	3,85	3,85	0
9	658,3521	4,34	4,34	4,34	4,34	0
10	729,3893	4,77	4,77	4,77	4,77	0
11	800,4264	5,32	5,26	5,26	5,28	0,03
12	871,4635	5,8	5,8	5,8	5,80	0

Tableau 18 : Valeurs des temps de drift mesurés en triplicata.

Enfin, les auteurs proposent de réaliser les droites d'étalonnage en utilisant les logarithmes du temps de drift corrigé et de la CCS corrigée. Afin de visualiser l'effet des corrections et du traitement logarithmique sur les valeurs, 4 droites de calibration sont réalisées : sans correction et sans traitement logarithmique, sans correction et avec traitement logarithmique, avec correction et sans traitement logarithmique, et enfin, avec correction et traitement logarithmique. L'objectif est de confirmer la nécessité de ces étapes pour les gammes de rapport m/z et de CCS étudiées. Les différentes droites de calibration sont présentées en Figure 70. Les équations des différentes droites de régression figurent dans le Tableau 20.

n alanine	m/z	Valeurs sans correction		Valeurs avec correction	
		CCS (A ²)	Temps de drift (ms)	Ω'	dt'
7	516,2778	211	3,36	1087	3,33
8	587,3150	228	3,85	1179	3,82
9	658,3521	243	4,34	1259	4,30
10	729,3893	256	4,77	1329	4,73
11	800,4264	271	5,28	1410	5,24
12	871,4635	282	5,8	1469	5,76

Tableau 19 : Valeurs utilisées pour réaliser les droites d'étalonnage.

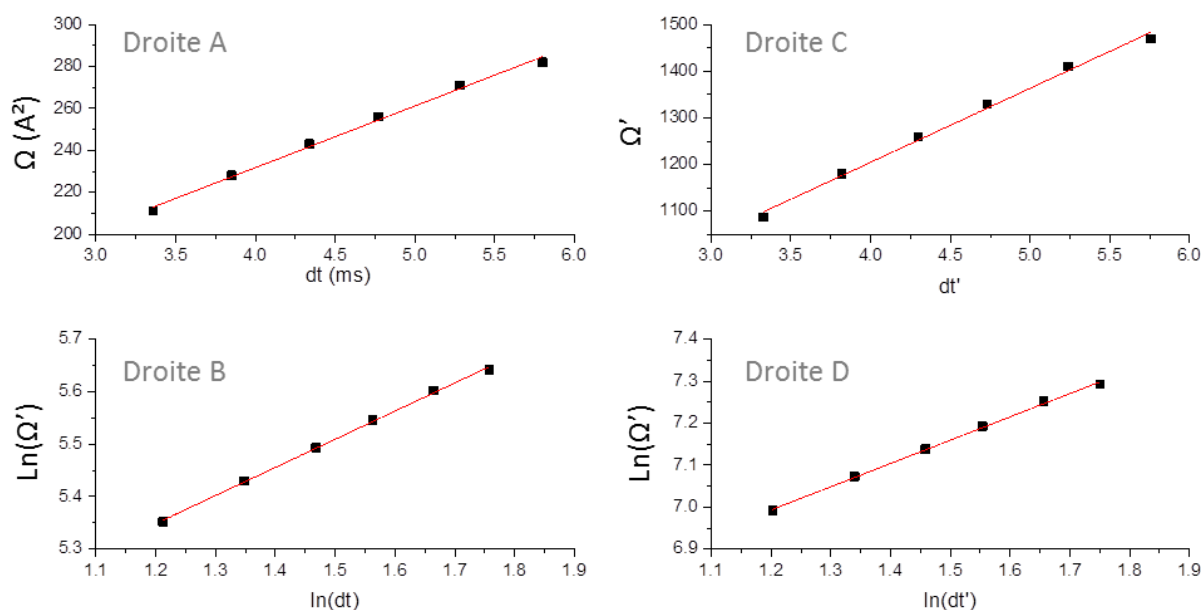


Figure 70 : Droites de régression. Voir Tableau 20 pour la description de chaque situation.

	Correction	traitement Ln(x)	Y = a + bx				
			a	Δa	b	Δb	R ²
Droite A	non	non	114,5	4,9	29,3	1,1	0,994
Droite B	non	oui	4,71	0,02	0,54	0,01	0,998
Droite C	oui	non	570,7	26,9	158,5	5,8	0,993
Droite D	oui	oui	6,33	0,02	0,56	0,01	0,998

Tableau 20 : Équations des régressions linéaires effectuées dans la Figure 70.

Les corrections du temps de drift et de la section efficace de collision n'apportent aucune amélioration de la régression linéaire en absence de traitement logarithmique (courbe A et C). Les erreurs relatives sont de 4,2 et 4,7% sur l'ordonnée à l'origine et 3,7 et 3,6% sur la pente. Le coefficient de détermination est également sensiblement le même. Il n'apparaît donc pas *a priori* nécessaire de réaliser l'étape de correction proposée dans la littérature. L'application d'un traitement logarithmique est quant à lui bien utile à la régression. Il permet une amélioration du coefficient de détermination qui passe de 0,994 à 0,998. Les erreurs relatives sur les valeurs de l'ordonnée à l'origine et sur la pente sont quant à elles réduites d'un facteur 4 environ. Le cas le plus favorable est celui de la droite D, où la correction et le traitement logarithmique sont tous les deux appliqués. La très légère différence s'obtient sur l'erreur de l'ordonnée à l'origine (0,3% au lieu de 0,4%) en faveur du traitement logarithmique et avec correction. C'est finalement cette configuration qui sera choisie pour la détermination des CCS des différents adduits.

2.2.2 Détermination des sections efficaces de collision

Les différentes solutions contenant les sels et un standard ont été étudiées dans des conditions strictement identiques que celles utilisées pour la calibration du spectromètre de masse. L'acquisition a été réalisée en triplicata pour chaque espèce. À l'instar de la calibration (Tableau 18), les temps de drift se sont avérés extrêmement répétables entre deux acquisitions. Les résultats obtenus pour l'annonacine sont présentés dans le Tableau 21. Les résultats concernant la squamocine sont présentés dans le Tableau 22.

Remarque : Lorsque CuCl_2 est utilisé, l'adduit $[\text{M}+\text{Cu}-\text{H}]^+$ est formé majoritairement par rapport à l'adduit $[\text{M}+\text{Cu}]^+$. Cette tendance est clairement inversée lors de l'utilisation du CuSO_4 .

	<i>m/z</i>	dt (ms)	dt'	ln(dt')	ln(Ω')	Ω'	Ω (Å ²)
[M+H] ⁺	597,4731	4,94	4,91	1,59	7,22	1367	264
[M+Cu] ⁺	659,3948	5,10	5,06	1,62	7,24	1392	269
[M+Li] ⁺	603,4813	5,10	5,07	1,62	7,24	1392	269
[M+Cu-H] ⁺	658,3870	5,17	5,13	1,64	7,25	1403	271
[M+CuCl] ⁺	694,3637	5,26	5,22	1,65	7,26	1416	273
[M+Na] ⁺	619,4550	5,26	5,23	1,65	7,26	1417	274
[M+K] ⁺	635,4290	5,32	5,28	1,66	7,26	1426	275
[M+CaCl] ⁺	671,3967	5,39	5,35	1,68	7,27	1436	277
[M+CuHSO ₄] ⁺	756,3544	5,55	5,51	1,71	7,29	1459	281

Tableau 21 : Temps de drift mesurés et détails des différents intermédiaires de calcul de la section efficace de collision des adduits de l'annonacine.

	<i>m/z</i>	dt (ms)	dt'	ln(dt')	ln(Ω')	Ω'	Ω (Å ²)
[M+Li] ⁺	629,4969	4,77	4,73	1,55	7,20	1340	259
[M+Cu-H] ⁺	684,4027	4,94	4,90	1,59	7,22	1367	264
[M+H] ⁺	623,4887	4,94	4,91	1,59	7,22	1367	264
[M+Na] ⁺	645,4707	4,99	4,95	1,60	7,23	1375	265
[M+CuCl] ⁺	720,3793	5,05	5,01	1,61	7,23	1384	267
[M+Cu] ⁺	685,4105	5,10	5,06	1,62	7,24	1392	268
[M+CaCl] ⁺	697,4123	5,21	5,17	1,64	7,25	1409	271
[M+K] ⁺	661,4446	5,21	5,17	1,64	7,25	1409	272
[M+CuHSO ₄] ⁺	782,3701	5,32	5,28	1,66	7,26	1425	274

Tableau 22 : Temps de drift mesurés et détails des différents intermédiaires de calcul de la section efficace de collision des adduits de la squamocine.

D'une série à l'autre, les résultats sont très différents. En effet, les résultats obtenus pour l'annonacine sont globalement en accord avec les rayons ioniques des cations mis en jeu (Tableau 23). Il est cependant à noter que l'annonacine cationisée au cuivre (I) a une section efficace plus petite que celle cationisée au cuivre (II). D'après les rayons ioniques de ces éléments, l'inverse devrait être observé. Le rayon de H⁺ étant négligeable, la perte du proton dans l'adduit [M+Cu-H]⁺ induit probablement un changement de conformation expliquant l'augmentation de CCS.

Cation	Rayon ionique (pm)
Cu ²⁺	73
Li ⁺	76
Cu ⁺	77
Na ⁺	102
K ⁺	138

Tableau 23 : Rayon ionique des cations.

Le cas de la squamocine est totalement différent puisque l'adduit au lithium et l'adduit cuivre (II) ont des sections efficaces anormalement petites. En effet, celle de [M+Li]⁺ est plus petite que l'espèce protonée de près de 2% alors que [M+Cu-H]⁺ a la même CCS. Ce constat confirme l'hypothèse selon laquelle le lithium permet un repliement des acétogénines portant un bis-THF adjacents. Ce repliement semble également avoir lieu avec l'adduit au cuivre (II) et celui au sodium puisqu'ils possèdent chacun une CCS anormalement proche de celle de l'espèce protonée. Parallèlement, l'adduit au cuivre (I) semble anormalement volumineux puisque sa section efficace de collision est supérieure à celle obtenue pour l'adduit [M+CuCl]⁺.

2.3 Bilan de l'étude de section efficace de collision

Il semble que le lithium participe au repliement des espèces portant des bis-THF adjacents contrairement aux acétogénines porteuses d'un seul THF. Cependant cette propriété n'est probablement pas la source de l'explication de la fragmentation spécifique induite par le lithium. Plusieurs raisons conduisent à cette conclusion :

- Le repliement du $[M+Li]^+$ n'est pas observé dans le cas de l'annonacine. Pourtant l'adduit au lithium de l'annonacine conduit bien à une fragmentation spécifique.
- Le repliement de la squamocine semble également avoir lieu avec l'utilisation du sodium. Pourtant les voies de fragmentation autres que les pertes d'eau ne sont pas observées à partir de cet adduit.

En définitive, bien que le repliement ait lieu dans certains cas, celui-ci n'est pas responsable de la fragmentation spécifique observée lors des études MS/MS sur les adduits au lithium d'acétogénine. Des calculs DFT sont actuellement en cours de réalisation par Guillaume Bernadat du laboratoire BioCIS. Une première étape consiste à calculer les conformations les plus stables en phase gazeuse pour chacun des adduits. La seconde étape consiste à calculer les CCS théoriques de ces configurations. L'accord entre les calculs théoriques et les résultats expérimentaux permettrait alors de valider les structures obtenues par DFT.

3 Fragmentation des adduits d'acétogénines cationisés au cuivre (II)

La valeur de la section efficace de collision obtenue pour l'adduit $[M+Cu-H]^+$ nous a interpellés. Des recherches bibliographiques ont permis de confirmer les propriétés de chélation du cuivre. À titre d'exemple, le complexe formé par les interactions entre le Cu (II) et l'élesclomol est présenté en Figure 71. Le cuivre (II) conduit souvent à la formation de complexe plan carré.

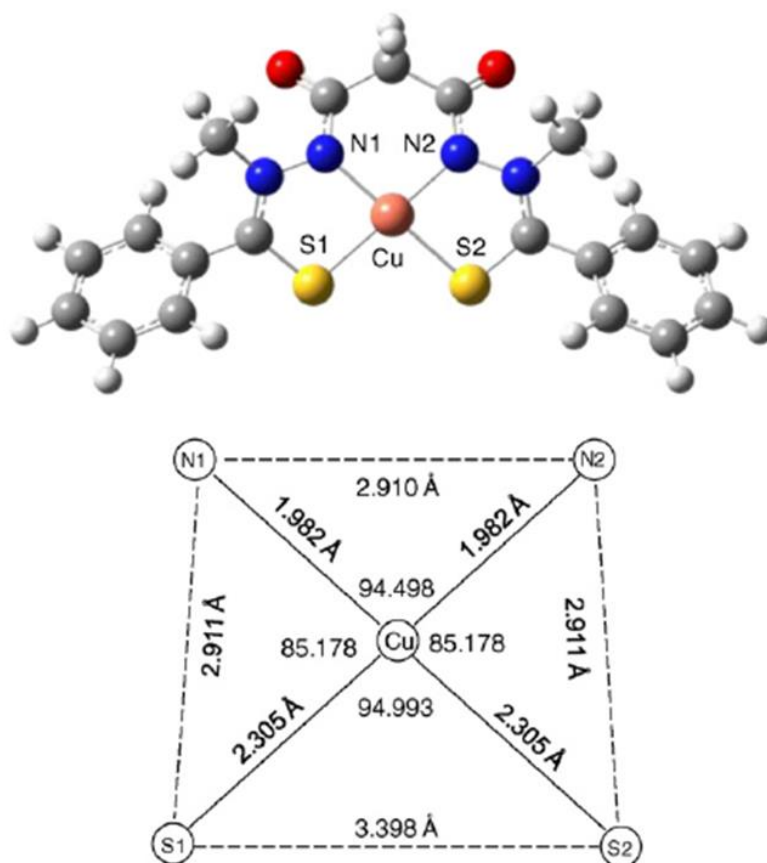


Figure 71 : Complexation de l'elesclomol par le cuivre (II) [Wu L. 2011].

Le cuivre (II) est un acide de Lewis, il forme donc des liaisons avec les atomes donneurs d'électrons tels que O, N ou S [Turecek F. 2007] et est par conséquent souvent impliqué dans des complexes avec des biomolécules tels que des peptides, des sucres ou des nucléotides. Une des propriétés intéressantes du cuivre (II) est sa faculté à se réduire en cuivre (I). Cette propriété est à l'origine de voies de fragmentation originales provoquant des changements de parité d'un fragment à l'autre [Wu L. 2011].

Le créneau accordé sur le Synapt G2Si pour les mesures de CCS de différents adduits a été également mis à profit pour réaliser quelques expériences MS/MS sur différents adduits, et notamment sur $[M+Cu-H]^+$ et $[M+Li]^+$. Le spectre obtenu pour l'adduit au lithium de l'annonacine ne laisse apparaître qu'un seul fragment caractéristique, permettant de confirmer la présence d'un hydroxyle en C4 (Figure 72). Tous les autres ions obtenus sont sans intérêt (pertes de molécules d'eau principalement). Le spectre MS/MS de l'adduit au cuivre (II) laisse également apparaître ce fragment mais avec une intensité très faible. Plusieurs ions de rapport m/z plus faible sont présents avec des intensités relatives significatives (10 à 100%)⁵². Il a donc été décidé d'étudier les spectres MS/MS obtenus après cationisation au cuivre (II). Ces études ont été réalisées au sein de notre laboratoire par HPLC-HRMS/MS.

⁵² L'attribution de ces ions sera discutée dans la suite de ce chapitre.

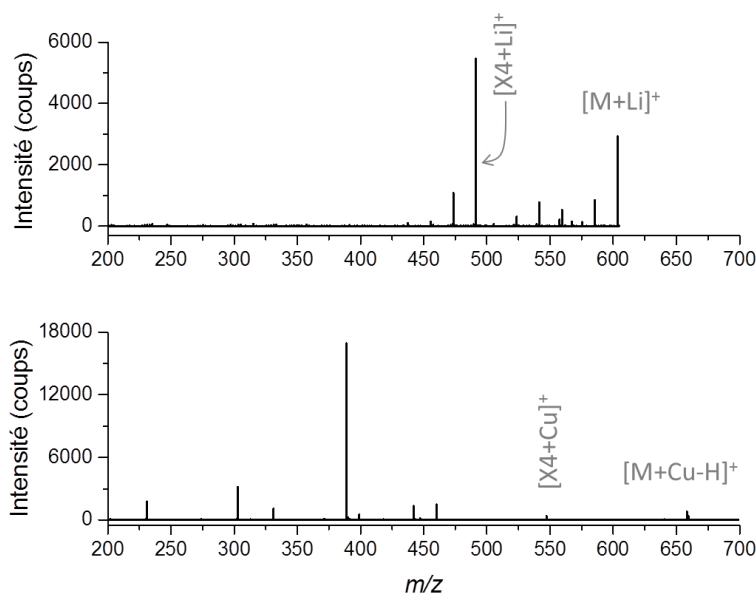


Figure 72 : Spectres MS/MS de l'adduit [M+Li]⁺ (en haut) et de l'adduit [M+Cu-H]⁺ (en bas) de l'annonacine (infusion ESI)

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Les standards

Les deux standards utilisés sont présentés dans la section 2.1.1 de ce chapitre. Il s'agit à nouveau de l'annonacine et de la squamocine. Une solution méthanolique à 10 µmol/L est utilisée pour chaque acétogénine.

3.1.2 Le sel de cuivre

Du chlorure de cuivre (CuCl₂) a été utilisé lors de cette étude. Une solution, à une concentration de 10 mmol/L, a été infusée entre la sortie de la colonne chromatographique et la source d'ionisation à l'aide d'un pousse-seringue (5 µL/min).

3.1.3 Conditions chromatographiques

Une chaîne HPLC a été utilisée de manière à automatiser les analyses. La méthode chromatographique utilisée est décrite dans la section 2.4 du chapitre IIA. Elle utilise une colonne intégrant des particules à noyaux non poreux et une phase mobile constituée d'un mélange eau/ACN. Le volume d'injection a été fixé à 5 µL.

3.1.4 Spectromètre de masse

Les analyses ont été effectuées sur Q-TOF décrit dans la section 4.3 du chapitre I. Il a été équipé d'une source ESI dual en mode positif. Les paramètres de la source d'ionisation sont rapportés dans le Tableau 24. Une méthode MS/MS ciblée a permis la fragmentation spécifique des rapports *m/z* correspondants aux adduits [M+Cu-H]⁺ et [M+CuCl]⁺ de l'annonacine (*m/z* 658,4 et *m/z* 694,4) et de la squamocine (*m/z* 684,4 et *m/z* 720,4) avec une fenêtre de 4 Th de large. L'énergie de collision a été fixée à 10 eV. La vitesse d'acquisition a été elle fixée à 10 spectres/s en MS et 4 spectres/s en MS/MS sur une gamme *m/z* 100-3000. L'infusion d'une solution *via* un second nébuliseur permet l'étalonnage interne (*m/z* 121,0509 et *m/z* 922,0098) du spectromètre de masse.

Paramètres	Valeurs
Débit du gaz	10 L/min
Température du gaz	350°C
Pression du nébuliseur	25 psi
Tension de cône	2500 V
Tension du fragmentor	150 V

Tableau 24 : Paramètres d'ionisation pour l'étude des adduits au cuivre (source ESI) Résultats

3.1.5 Précision en masse

La précision en masse observée lors de cette série d'analyses est anormalement médiocre. En effet, des valeurs de près de 100 ppm sont mesurées dans les modes MS et MS/MS. En temps normal, l'étalonnage interne permet d'obtenir des précisions classiquement inférieures à 2 ppm. La calibration interne ne semble donc pas avoir fonctionné correctement. Effectivement, le spectre de masse ne laisse apparaître qu'un seul ion de calibration à m/z 922,0528, ce qui correspond à une précision de 47 ppm. Ces observations ayant été réalisées *a posteriori*, les données MS et MS/MS présentées ci-après seront de moins bonne qualité que celle discutées dans le reste de ce manuscrit.

3.1.6 Fragmentation de l'annonacine

Le spectre MS obtenu pour l'annonacine est présenté en Figure 73. Les ions correspondant à l'espèce protonée et à l'adduit au sodium sont majoritaires. L'ion $[M+Cu]^{2+}$ est présent de façon très minoritaire (m/z 329,7224, $\Delta = 76$ ppm). Le massif isotopique confirme que l'ion est doublement chargé. Les ions correspondants aux adduits $[M+Cu-H]^+$ (m/z 658,4228 ; $\Delta = 54$ ppm) et $[M+CuCl]^+$ (m/z 694,4001 ; $\Delta = 64$ ppm) présentent une intensité environ 4 fois plus faible que les ions majoritaires. La concentration en sels de cuivre devrait donc être adaptée pour une utilisation optimale mais les signaux sont suffisamment abondants pour l'étude des voies de fragmentation.

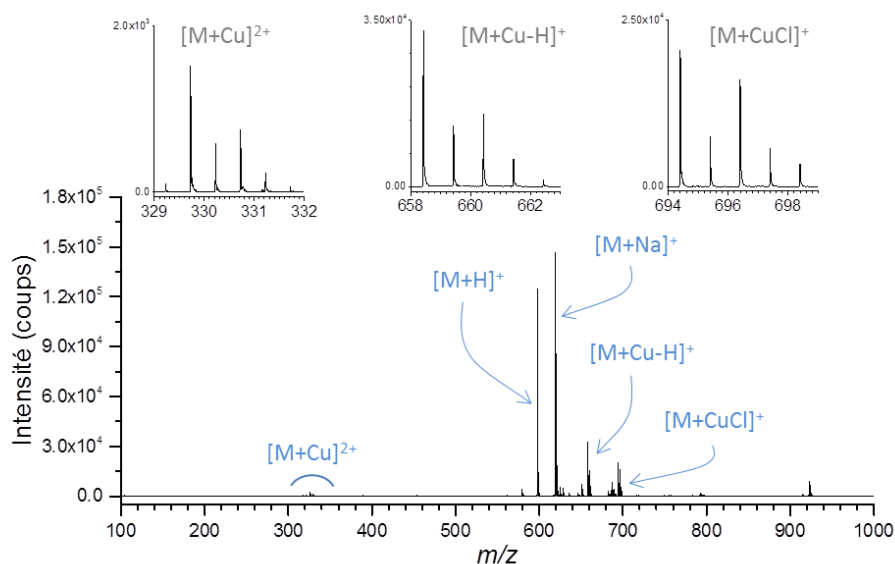


Figure 73 : Spectre MS de l'annonacine obtenu après infusion post-colonne de sels de cuivre.

Le spectre MS/MS obtenu pour l'adduit $[M+Cu-H]^+$ fournit les mêmes informations que celui obtenu pour l'adduit $[M+CuCl]^+$ (Figure 75). L'adduit $[M+Cu-H]^+$ est d'ailleurs présent sur le spectre MS/MS de l'adduit $[M+CuCl]^+$ (perte de HCl). Contrairement à la fragmentation des espèces protonées ou des adduits au sodium, les spectres MS/MS ne comportent aucun ion résultant de pertes de molécule d'eau à partir de l'ion moléculaire.

La plupart des ions présents sur les spectres MS/MS sont impairs. Ils ont donc une parité différente de l'ion moléculaire. Ces ions correspondent à des fragments de type A, Z et X (Figure 74). L'obtention d'ions ayant une parité différente de celle de l'ion moléculaire $[M+Cu-H]^+$ est décrite dans la littérature [Kumar M.R. 2005 ; Wu L. 2011 ; Afonso C. 2005]. Les auteurs l'expliquent par une réduction du Cu (II) en Cu (I). Sur la base de ces publications, des mécanismes de fragmentation sont proposés afin d'expliquer la formation des ions observés (Figure 76). Dans chaque cas, une rupture homolytique de liaison permet de fournir un électron au Cu (II) qui l'utilise pour remplir une de ses orbitales d. Les deux ions ayant un rapport m/z pair correspondent au fragment C1 (C1+2H et la perte d'eau correspondante). Ils sont formés à partir des mécanismes décrits dans la littérature [Laprévôte O. 1994]. Le Tableau 25 rassemble l'ensemble des ions obtenus.

Remarque : L'ion m/z 231 n'a pas pu être attribué à un fragment de l'annonacine. Il semble pourtant caractéristique de la molécule puisqu'il était également présent sur les spectres réalisés sur le spectromètre de masse Synapt G2Si à Orsay (Figure 72).

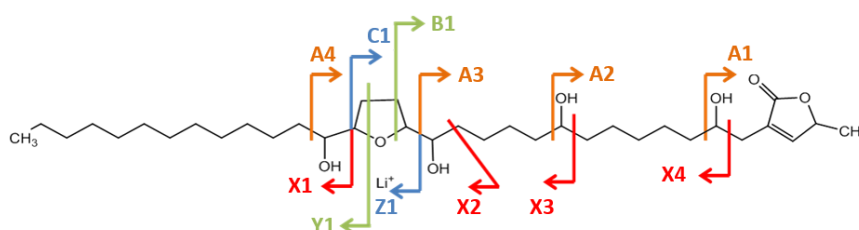


Figure 74 : Illustration de la nomenclature des fragments obtenus en MS/MS pour l'annonacine [Laprévôte O. 1994].

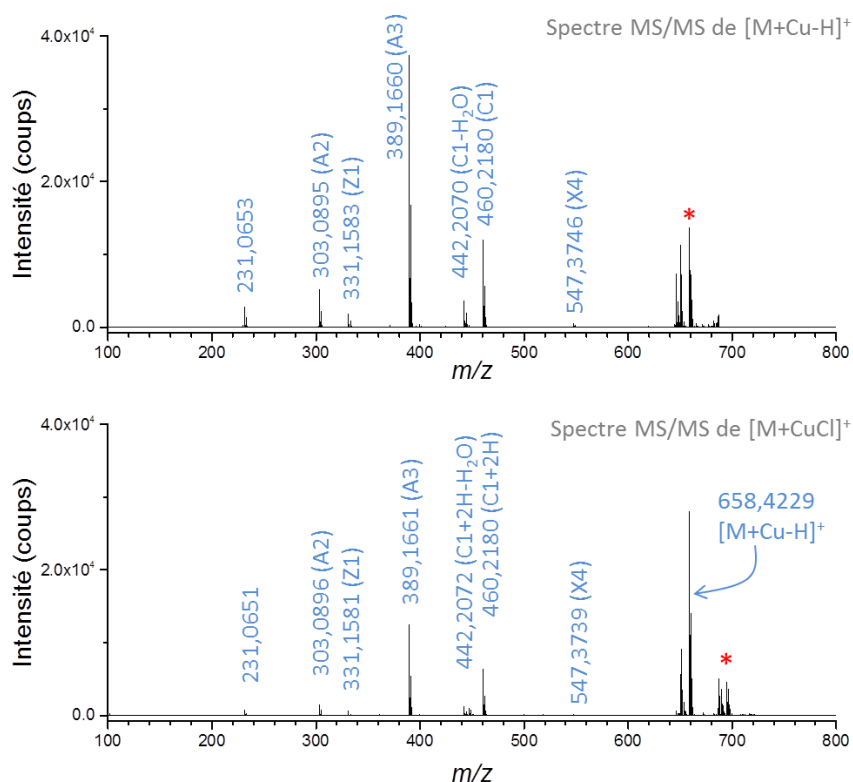


Figure 75 : Spectres MS/MS des adduits $[M+Cu-H]^+$ et $[M+CuCl]^+$ de l'annonacine.

Fragment	adduit	<i>m/z</i> théo.	Δ (ppm)
M	$[M-H+Cu^I]^+$	658,3868	55
X4	$[M-H+Cu^I]^+$	547,3421	59
C1+2H	$[M-H+Cu^{II}]^+$	460,1883	65
A3	$[M-H+Cu^I]^+$	389,1386	71
Z1	$[M-H+Cu^I]^+$	331,1695	-33
A2	$[M-H+Cu^I]^+$	303,0653	80

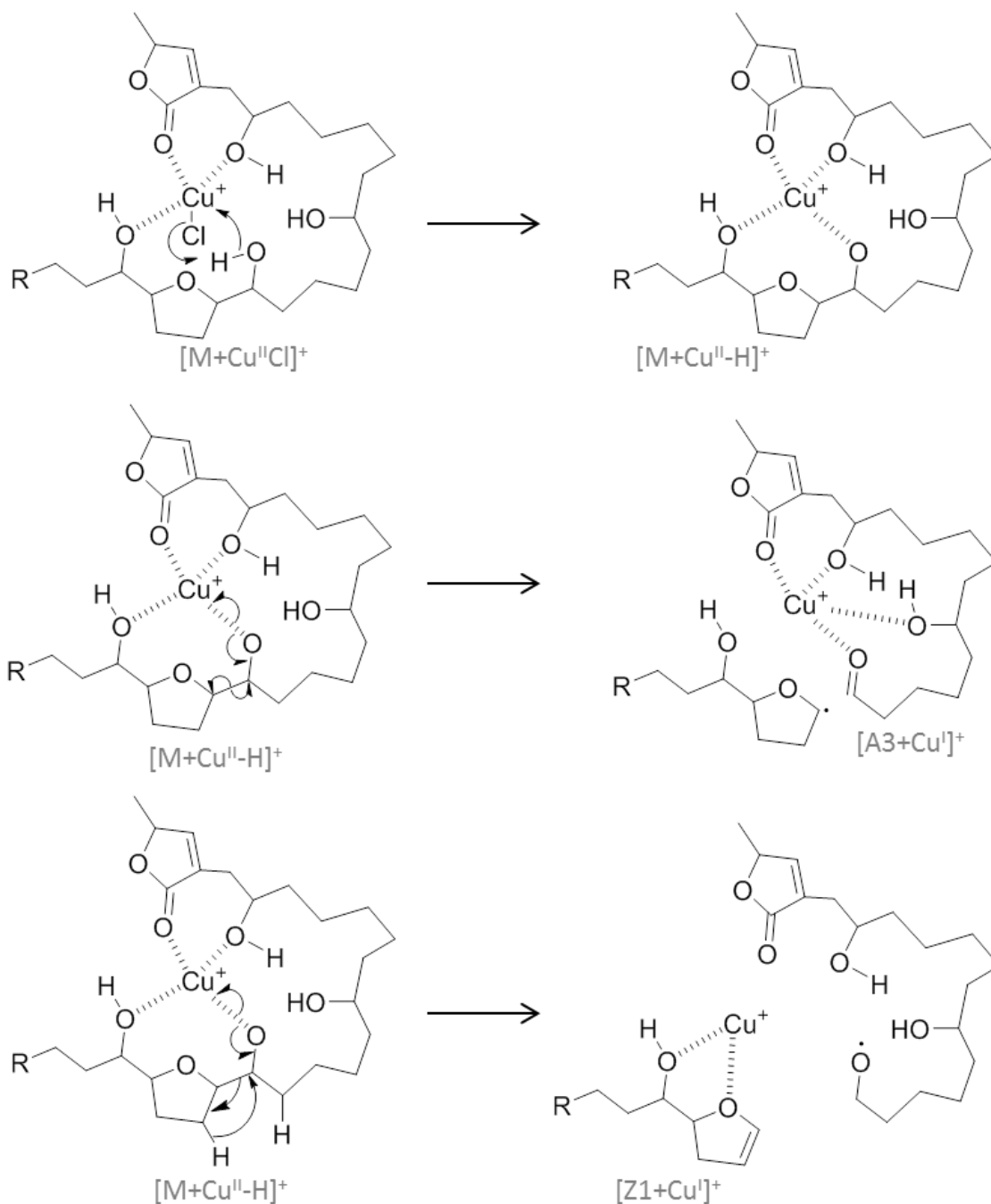
Tableau 25 : Inventaire des ions présents sur le spectre MS/MS des adduits $[M+Cu-H]^+$ et $[M+CuCl]^+$ de l'annonacine.

Figure 76 : Propositions de mécanismes conduisant à la formation des ions observés (cf. Tableau 25)

La structure de l'annonacine peut être déterminée sans ambiguïté possible grâce aux informations du spectre MS/MS de l'adduit $[M+Cu-H]^+$.

Les ions obtenus lors de l'utilisation de sels de cuivre sont, dans le cas de l'annonacine, complètement différents de ceux observés lors de l'infusion de sels de lithium. En effet, avec CuCl_2 , les fragments A sont majoritairement formés là où les fragments complémentaires (les fragments X) étaient obtenus auparavant (Figure 77). De plus, l'intensité des ions pertinents est bien plus importante avec le cuivre qu'avec le lithium.

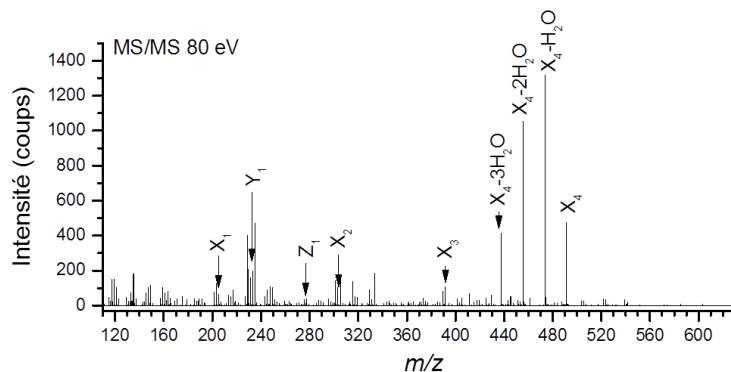


Figure 77 : Spectre MS/MS obtenu à partir de l'adduit $[\text{M}+\text{Li}]^+$ de l'annonacine (Figure 19 du chapitre IIA)

3.1.7 Fragmentation de la squamocine

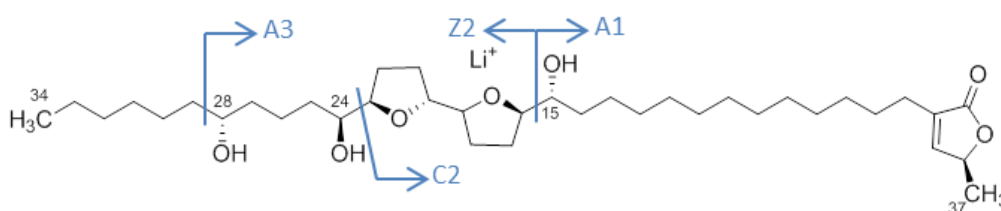


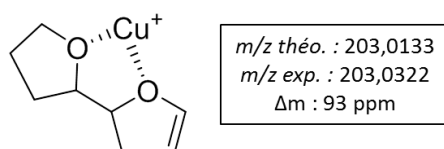
Figure 78 : Structure de la squamocine et nomenclature des adduits observés.

Le spectre MS simple de la squamocine laisse apparaître le même type d'ions que celui de l'annonacine à l'exception de l'adduit $[\text{M}+\text{Cu}]^{2+}$ qui n'est pas détecté (Tableau 26). L'intensité relative des adduits au Cu (II) est plus faible que celle observée lors de l'étude de l'annonacine. La cationisation au Cu (II) semble donc être fortement influencée par la nature de l'acétogénine.

Fragment	m/z théo.	m/z exp.	Δ (ppm)	Intensité relative %
$[\text{M}+\text{H}]^+$	623,4809	623,5242	40	55
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	645,4707	645,5094	60	100
$[\text{M}+\text{Cu}-\text{H}]^+$	684,4027	684,4387	53	5
$[\text{M}+\text{CuCl}]^+$	720,3793	720,4164	52	12
$[2\text{M}+\text{Cu}-\text{H}]^+$	1306,8806	1306,9330	40	3

Tableau 26 : Ions présents sur le spectre MS de la squamocine lors de l'infusion post colonne de sels de cuivre. Intensité maximale : $1,2 \cdot 10^{-5}$ coups.

La structure de la squamocine est rappelée en Figure 78. Quatre des six ions présents sur le spectre MS/MS de l'adduits $[\text{M}+\text{Cu}-\text{H}]^+$ ont été identifiés sans ambiguïté. Il s'agit des fragments A1, Z2, C2 et A3 (Tableau 27). À l'instar de l'annonacine, les fragments A1, A3 et Z22 sont obtenus après une réduction du Cu (II) en Cu (I). Le spectre MS/MS possède deux ions supplémentaires : m/z 570,3306 dont l'attribution n'a pas pu être réalisée et l'ion m/z 203,0324 dont une structure est proposée en Figure 79.

Figure 79 : Proposition de structure pour l'ion m/z 203,0322 présent sur le spectre de la squamocine.

Fragment	adduit	m/z théo.	m/z exp.	Δ (ppm)
M	$[M-H+Cu^I]^+$	684,4024	684,4384	53
A3	$[M-H+Cu^I]^+$	599,3007	599,3348	40
C2+2H	$[M-H+Cu^{II}]^+$	498,2407	498,2711	61
Z2	$[M-H+Cu^I]^+$	390,1831	390,2100	69
A1	$[M-H+Cu^I]^+$	357,1487	357,1746	72

Tableau 27 : Ions présents sur le spectre MS/MS de l'adduit $[M+Cu-H]^+$ de la squamocine.

Le spectre MS/MS de l'adduit au Cu (II) de la squamocine ne permet pas de déterminer entièrement la structure de l'acétogénine. En effet, bien que la position du bis-THF adjacent ainsi que celle de deux groupements hydroxyles (C28 et C15) soient déterminées, aucun ion ne permet l'attribution de l'hydroxyle restant. Les possibilités sont toutes fois relativement limitées (entre C24 et C27). Enfin, l'ion m/z 203 semble être un marqueur de la présence de bis-THF adjacents au sein des acétogénines. Cette information mérite d'être vérifiée dans le futur sur d'autres composés puisqu'un tel ion constituerait une aide très importante pour la déréplication dans les extraits naturels.

3.1.8 Bilan de l'étude des voies de fragmentation des adduits au Cu (II)

L'infusion post-colonne de sels de cuivre permet la formation d'adduits $[M+Cu-H]^+$ et $[M+CuCl]^+$. L'étude des spectres MS/MS obtenus à partir de ces ions permet de mettre en évidence des ions complémentaires à ceux obtenus lors de la fragmentation de sels de lithium. En outre, les fragmentations ont lieu à des énergies bien plus faibles que lors de l'utilisation de sels de lithium (10 eV contre plus de 60 eV). Les rapports signal-sur-bruit obtenus pour les ions d'intérêt sont par ailleurs bien plus élevés avec l'utilisation Cu (II). L'identification manuelle des molécules devient donc beaucoup moins hasardeuse et un traitement informatique des données est envisageable.

Dans un futur proche, il est envisagé de réaliser l'étude de l'extrait de graines d'*Annona muritaca* L. à l'aide d'une méthode MS/MS non ciblée et de réseaux moléculaires. Cette stratégie a déjà montré ses preuves lors de l'étude de diterpènes contenus dans un extrait d'*Euphorbia semiperfoliata* et pour lequel j'ai eu la chance de m'impliquer avec Stéphanie Boutet-Mercey lors de son stage de Master 2 [Nothias L.-F. 2017].

4 Références

A.

[Adams J. 1998] Adams J., Gross M.L. *AnOrg. Mass Spectrom.* 1988; 23:307.

[Afonso C. 2005] Afonso C., Riu A., Xu Y., Fournier F., Tabet J.-C. *J. Mass Spectrom.* 2005; 40:342.

B.

[Bush M.F. 2012] Bush M.F., Campuzano I.D.G., Robinson C.V. *Anal Chem.* 2012; 84:7124.

K.

[Kumar M.R. 2005] Kumar M.R., Prabhakar S., Kumar M.K., Reddy T.J., Vairamani M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19 :113.

L.

[Laprévôte O. 1994] Laprévôte O., Das C. *Tetrahedron.* 1994; 50:8479.

[Lattimer R.P. 1992] Lattimer R.P. *J. Am. Mass Spectrom.* 1992; 3:225.

M.

[Moini M. 1998] Moini M., Jones B.L., Rogers R.M., Jiang L.J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998; 9:977.

N.

[Nothias L.-F. 2017] Nothias L.-F., Boutet-Mercey S., Cachet X., De La Torre E., Laboureur L., Gallard J.-F., Retailleau P., Brunelle A., Dorrestein P.C., Costa J., Bedoya L.M., Roussi F., Leyssen P., Alcami J., Paolini J., Litaudon M., Touboul D. *J. Nat. Prod.* 2017 In Press (10.1021/acs.jnatprod.7b00113)

R.

[Ruotolo B.T. 2008] Ruotolo B.T., Benesch J.L.P., Sandercock A.M., Hyung S.-J., Robinson C.V. *Nat. Protoc.* 2008; 3:1139.

T.

[Turecek F. 2007] Turecek F. *Mass Spectrom. Rev.* 2007; 26:563.

[Wu L. 2011] Wu L., Zhou L., Liu D.Q., Vogt F.G., Kord A.S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011; 54:331.

CHAPITRE III

Étude des modifications post-transcriptionnelles des ARN par SFC-HRMS

Mise au point d'une méthode de chromatographie en phase supercritique et application à deux échantillons biologiques

Plan du chapitre

1	Introduction.....	141
1.1	Structure primaire de l'ARN	141
1.2	Structure secondaire de l'ARN	142
1.3	Structure tertiaire de l'ARN.....	143
1.4	Rôles biologiques des ARN	143
1.5	Modifications post-transcriptionnelles de l'ARN	144
1.6	Étude des modifications des ARN	146
1.6.1	Étude des modifications d'ARN par spectrométrie de masse MALDI-ToF/ToF.....	146
1.6.2	Étude des modifications d'ARN par HPLC-HRMS	146
1.7	Objectif de ce projet.....	147
2	Matériels et méthodes	147
2.1	Les standards.....	147
2.2	Échantillons biologiques.....	148
2.3	Le couplage SFC-HRMS.....	148
2.4	Le couplage LC-HRMS.....	149
3	Développement d'une méthode SFC-HRMS	150
3.1	Étude préliminaire (ionisation).....	150
3.2	Étude de l'influence du solvant d'injection.....	151
3.3	Criblage de colonne.....	152
3.4	Choix de la phase mobile.....	155
3.4.1	L'acétate d'ammonium	156
3.4.2	Le choix du co-solvant	157
3.4.3	Choix du gradient d'élution	158
3.4.4	Introduction d'eau dans le co-solvant.....	159
3.5	Détermination des paramètres chromatographiques	159
3.5.1	Influence de la contre-pression.....	159
3.5.1	Influence de la température du four à colonnes.....	160
3.5.2	Influence du débit de la phase mobile	161
3.6	Composition du solvant make-up	162
3.7	Méthode chromatographique optimisée.....	163
4	Étude du mélange commercial.....	163
4.1	Étude qualitative	164
4.2	Estimation des LOD et LOQ	169
5	Étude d'échantillons biologiques	170

5.1	Comparaison de deux échantillons	170
5.2	Étude qualitative de <i>E. Coli</i>	172
6	Conclusions.....	175
7	Références.....	176
8	Annexes	179

Table des illustrations

Figure 80 : Structures du ribose et du 2'-désoxyribose.....	141
Figure 81 : Structure d'un l'ARN.....	141
Figure 82 : Structure des bases des acides nucléiques.	142
Figure 83 : Structure des nucléosides de l'ARN.....	142
Figure 84 : Structure secondaire des ARN. Auteur : Fdardel	143
Figure 85 : Illustration du rôle des ARN dans la synthèse des protéines.....	145
Figure 86 : Sites de méthylation sur la cytidine.	146
Figure 87 : Spectre de la cytidine (fragmentor 100 V).	151
Figure 88 : Effet du solvant d'injection (ACN, H ₂ O ou MeOH) en SFC sur l'intensité du signal de A, G, C et U	152
Figure 89 : Criblage de colonne. EIC correspondants à la cytidine (<i>m/z</i> 244,0929).....	154
Figure 90 : Exemples de méthylations sur la cytidine avec la 3-methylcytidine et la 2'-O-methylcytidine.....	154
Figure 91 : Deuxième étape du criblage. Injection du mélange commercial sur les colonnes de la gamme Torus.	155
Figure 92 : Influence de la présence et de la concentration de l'acétate d'ammonium dans le co-solvant sur la séparation des nucléosides modifiés en SFC.	157
Figure 93 : Effets du gradient d'élution en SFC sur la séparation des cytidines méthylées. Co-solvant : MeOH + 5 mmol/L AcONH ₄	158
Figure 94 : Influence de la contre-pression sur les EIC correspondants aux cytidines méthylées en SFC.....	159
Figure 95 : Influence de la température sur la séparation SFC des cytidines méthylées (<i>m/z</i> 258,1058)..	161
Figure 96 : Influence du débit sur l'EIC correspondant aux cytidines méthylées (SFC).	162
Figure 97 : Influence de la proportion d'eau dans le solvant make-up sur le signal de la 3-methylcytidine (n=3)	163
Figure 98: Réarrangement de Dimroth sur m1A.	164
Figure 99 : Somme des EIC correspondants aux espèces protonées dans le mélange commercial... 165	165
Figure 100 : EIC des ions attendus dans le mélange commercial obtenu par SFC.....	165
Figure 101 : Spectre MS correspondant aux 3 pics chromatographiques du chromatogramme présenté en Figure 100(c).	166
Figure 102 : Spectre MS correspondant aux pics chromatographiques de la Figure 100(d).	167
Figure 103 : Chromatogramme SFC,obtenu lors de l'injection du standard de m5C.....	168
Figure 104 : Chromatogramme SFC obtenu lors de l'injection du standard de m5U.	168
Figure 105 : Chromatogramme SFC obtenu lors de l'injection du standard de m6A.	169
Figure 106 : EIC correspondants aux cytidines méthylées (<i>m/z</i> 258,1058) dans les ARNt d'E. <i>Coli</i> (a) et de levure de boulanger (b).....	171
Figure 107 : EIC correspondants aux uridines méthylées (<i>m/z</i> 259,0926) dans les ARNt d'E. <i>Coli</i> (a) et de levure de boulanger (b).....	171
Figure 108 : EIC correspondants aux adénosines méthylées (<i>m/z</i> 282,1198) dans les ARNt d'E. <i>Coli</i> (a) et de levure de boulanger (b).....	172

1 Introduction

Découverts en 1868 par Friedrich Miescher [Dahm R. 2005], les acides nucléiques sont des polymères linéaires naturels constitués d'une succession d'unités appelées nucléotides. Ces nucléotides sont la combinaison de trois éléments : un sucre, une base azotée et un phosphate. La base azotée est la seule partie variable du monomère. L'ordre d'enchaînement des différents monomères permet notamment le codage de l'information génétique dans les organismes vivants. Deux acides nucléiques sont particulièrement importants dans la transmission de cette information : l'acide 2'-désoxyribonucléique (ADN) et l'acide 2'-ribonucléique (ARN). Au cours de ce projet, seuls les monomères de l'ARN seront étudiés.

1.1 Structure primaire de l'ARN

Le sucre est l'élément central de chaque monomère. Il porte la base sur sa position **1'** et le groupement phosphate sur sa position **5'**. Comme l'indiquent leurs noms, les ARN sont constitués de monomères intégrant un ribose alors que les ADN portent des 2'-désoxyriboses, riboses pour lesquels le groupement hydroxyle du carbone **2'** est absent (Figure 80).

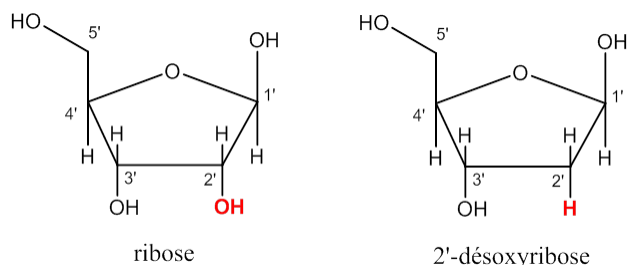


Figure 80 : Structures du ribose et du 2'-désoxyribose

Les riboses sont liés entre eux par une liaison phosphodiester qui intervient entre le groupement phosphate d'un nucléotide (porté en position **5'**) et l'alcool en position **3'** de l'autre partenaire comme l'illustre la Figure 81.

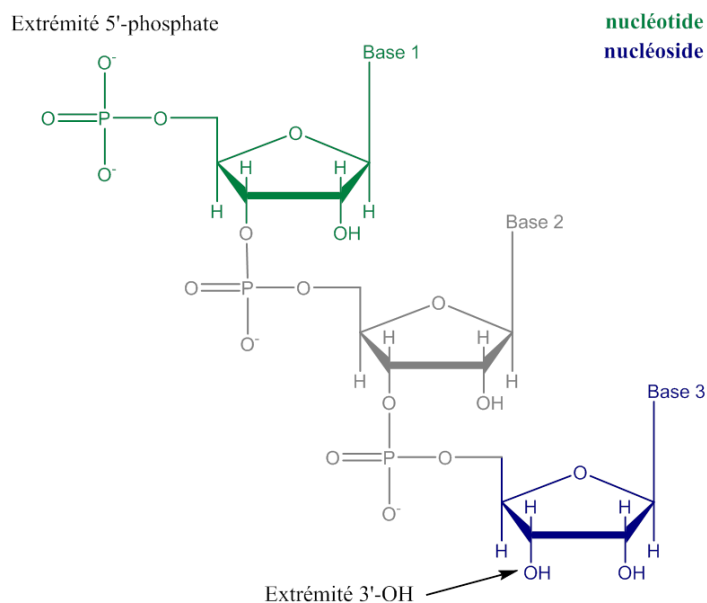
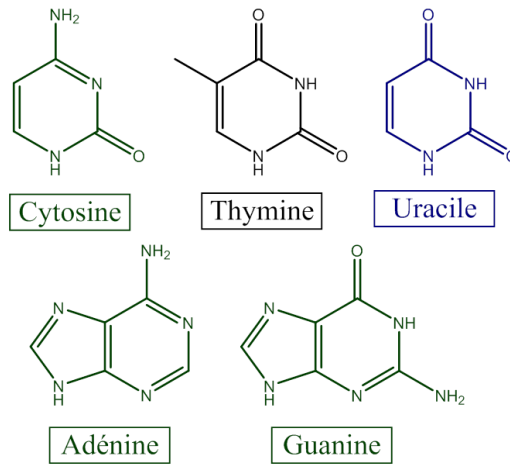


Figure 81 : Structure d'un l'ARN.

Ainsi, les riboses et leurs groupements phosphates forment la colonne vertébrale de l'ARN sur laquelle sont fixées les différentes bases azotées. Deux types de bases existent : celles intégrant un

noyau purinique (adénine, guanine) et celles intégrant un noyau pyrimidique (uracile, thymine, cytosine). L'ARN contient 4 bases canoniques : l'adénine (A), la guanine (G), l'uracile (U) et la cytosine (C). L'ADN contient les mêmes bases à l'exception de l'uracile qui est remplacée par la thymine (T). Les structures correspondantes sont présentées en Figure 82.



Bases communes Base spécifique de l'ARN Base spécifique de l'ADN

Figure 82 : Structure des bases des acides nucléiques.

Les molécules résultantes de l'association du ribose et de la base azotée (sans le groupement phosphate) sont appelées nucléosides. Les 4 nucléosides de l'ARN sont l'adénosine (A), la guanosine (G), la cytidine (C) et l'uridine (U). Leurs structures sont présentées en Figure 83.

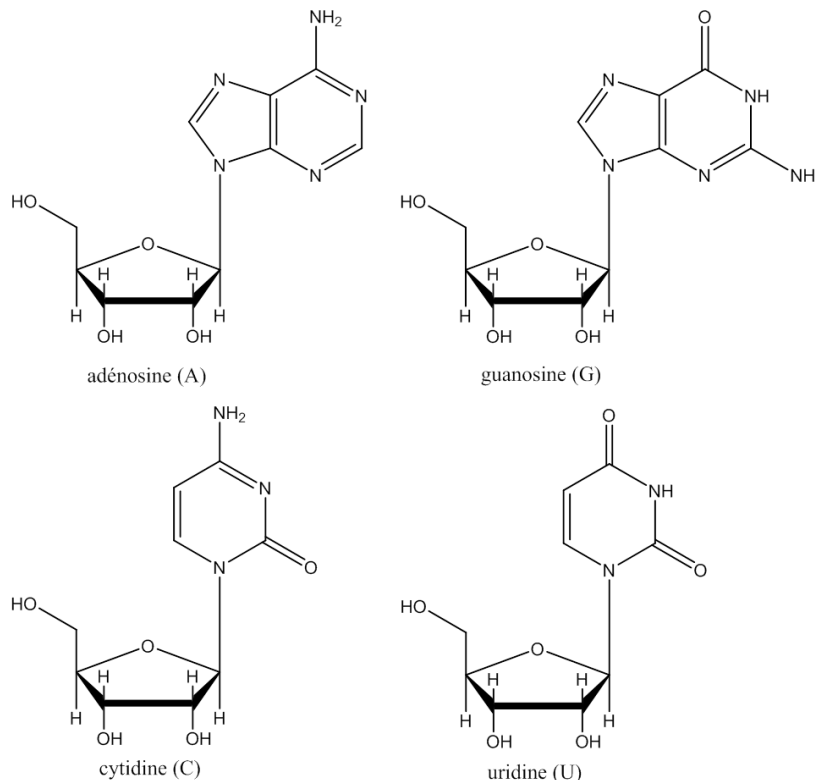


Figure 83 : Structure des nucléosides de l'ARN.

1.2 Structure secondaire de l'ARN

À l'état naturel, les ARN se présentent généralement sous forme monocaténaire (simple brin, contrairement aux ADN qui forment des hélices double brins) et se replient sur eux-mêmes en

fonction de l'affinité des bases entre-elles. Ces appariements apparaissent entre bases dites complémentaires (A et U, G et C, G et U). Les appariements sont rencontrés notamment lorsque des régions de l'ARN contiennent des séquences palindromiques⁵³ qui forment alors localement des tiges en forme d'hélice séparées par des zones non-appariées comme l'illustre la Figure 84. Ces appariements intramoléculaires permettent notamment de stabiliser les ARN.

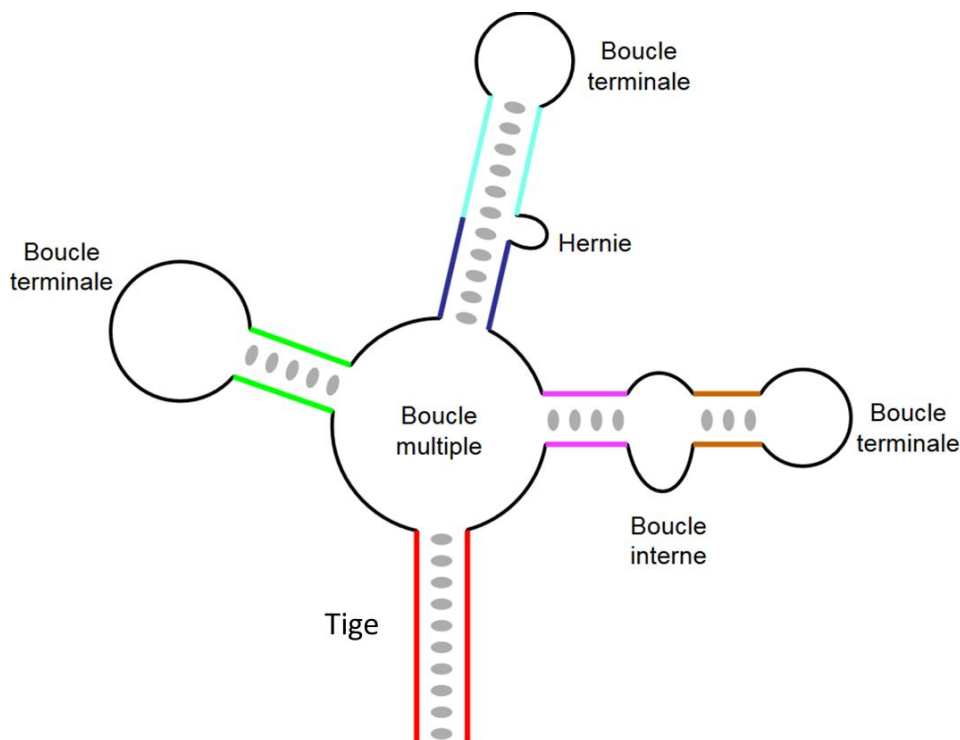


Figure 84 : Structure secondaire des ARN. Auteur : Fdardel

1.3 Structure tertiaire de l'ARN

L'ARN possède également une structure tridimensionnelle. Les repliements s'expliquent par l'existence d'interaction à grande distance dans la structure secondaire des ARN. Cette structure peut être mise en évidence grâce à la cristallographie par rayons X ou par résonance magnétique nucléaire. Douze familles de repliements ont ainsi pu être listées [Leontis B.N. 2002]. Ces repliements sont en grande partie responsables de l'activité biologique des ARN, notamment celle de catalyse enzymatique, puisqu'ils autorisent ou non les interactions intermoléculaires (avec des petites molécules ou des protéines par exemple).

1.4 Rôles biologiques des ARN

L'information génétique est portée par l'ADN dans la plupart des organismes vivants. Dans ce cas, des ARN codants synthétisés dans une enzyme (l'ARN polymérase) servent d'intermédiaires à la synthèse des protéines (transcription de l'ADN). Ces enzymes sont capables de lire un brin d'ADN et de polymériser le brin d'ARN en fonction de l'enchaînement des bases lues sur le brin d'ADN. Ces molécules d'ARN sont appelées ARN messagers (ARNm). Les ARNm sont ensuite lus dans les ribosomes, lieux de synthèse des protéines. Les ribosomes sont eux-mêmes constitués d'ARN non codants dit ribosomaux (ARNr) et de protéines. Le ribose polymérise les acides aminés dans un ordre défini par le code porté par l'ARNm. Ces acides aminés sont véhiculés jusqu'au ribose par de petits

⁵³ Lorsque deux séquences complémentaires sont présentes dans la même molécule (exemple : – UGCGxxxxxxxxUGUAG–), une association antiparallèle est alors possible (création d'une tige).

ARN : les ARN de transfert (ARNt) qui possèdent un acide aminé fixé sur leur extrémité 3'-OH. Ces différentes fonctions sont illustrées en Figure 85.

D'autres ARN possèdent des fonctions régulatrices : les micro ARN (ARNmi) et les ARN interférents (ARNsi). Ces ARN influencent l'expression des gènes en agissant sur la dégradation de certains ARNm ou en inhibant la traduction des protéines.

1.5 Modifications post-transcriptionnelles de l'ARN

Bien qu'initialement synthétisés à l'aide de seulement 4 nucléosides différents (**A**, **G**, **C** et **U**), les ARN subissent ensuite une multitude de modifications chimiques appelées modifications post-transcriptionnelles. Ces modifications sont relativement abondantes dans les organismes vivants. À titre d'exemple, plus de 15 % des nucléosides constituant l'ARNt de la levure de boulanger sont des nucléosides modifiés [Hopper A.K. 2013]. Actuellement, plus de 140 nucléosides modifiés ont été identifiés [Machnicka M. 2013].

L'une des principales modifications est l'ajout d'un groupement méthyle grâce à des enzymes appelées méthyltransférases. Cette méthylation peut alors avoir lieu sur le ribose en position 2'-OH et/ou sur la base azotée. La Figure 86 illustre les différentes possibilités de méthylation sur la cytidine.

En modulant les liaisons hydrogènes intramoléculaires, ces modifications chimiques influencent les structures secondaire et tertiaire des ARN. L'une des conséquences directes de ces variations de structure peut être la modification des propriétés biologiques d'un ARN.

Les modifications peuvent également permettre d'augmenter la stabilité des ARN. C'est notamment le cas de la méthylation du ribose qui rend la molécule moins sensible à l'hydrolyse.

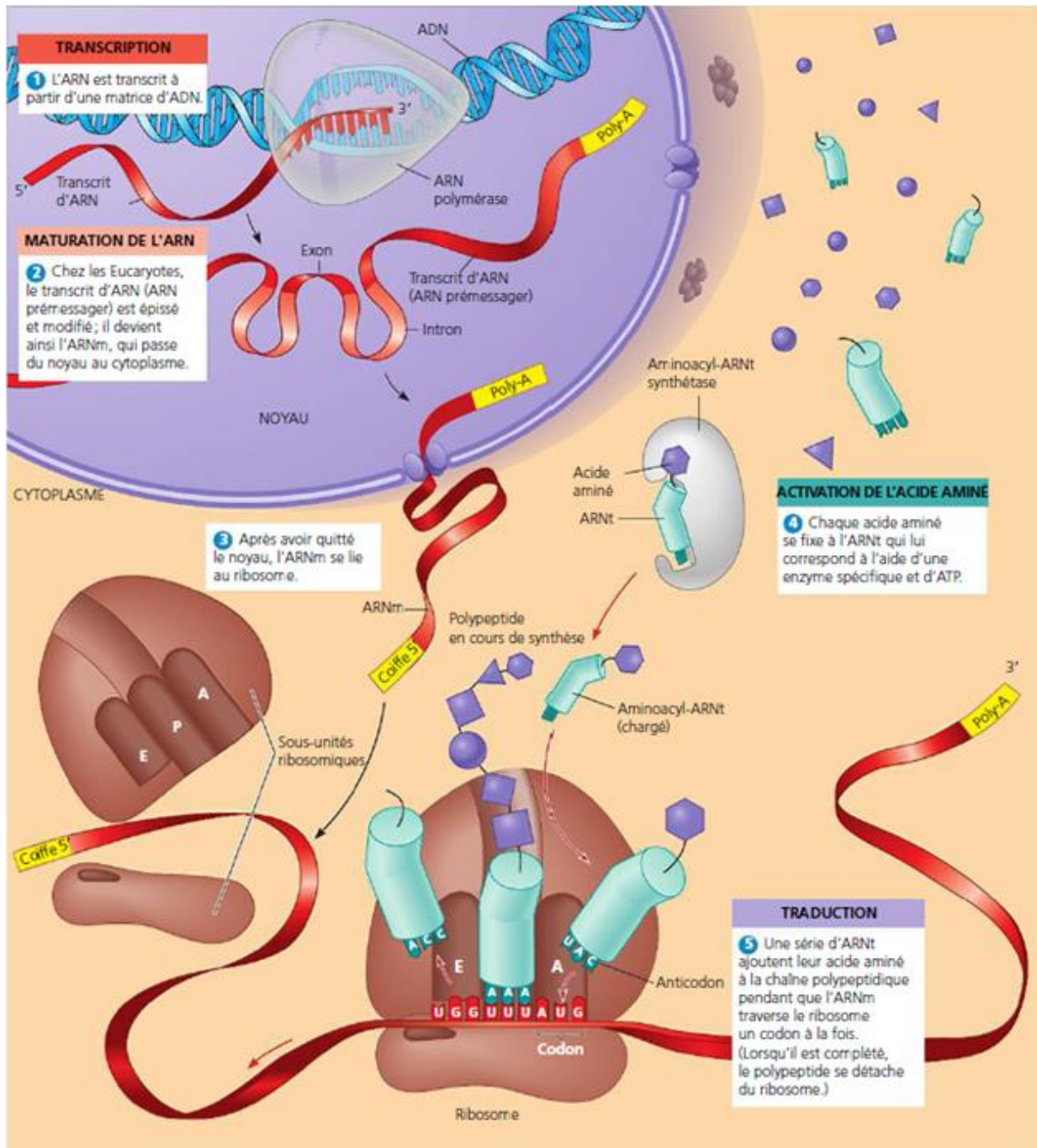


Figure 85 : Illustration du rôle des ARN dans la synthèse des protéines [Reece J. 2012].

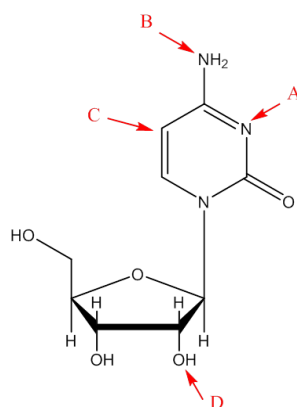


Figure 86 : Sites de méthylation sur la cytidine. Les nucléosides modifiés correspondants sont : 3-méthylcytidine (A), N4-méthylcytidine (B), 5-méthylcytidine (C) et 2'-O-méthylcytidine (D).

De plus, plusieurs études permettent de faire le lien entre la présence de modifications et l'apparition de maladies telles que l'obésité [Jia G. 2011] ou des maladies mitochondriales [Kirino Y. 2004]. Il est donc important de pouvoir fournir des outils d'analyse performants aux biologistes qui s'y intéressent.

1.6 Étude des modifications des ARN

Afin d'étudier les modifications des ARN, deux approches ont été développées au sein de notre laboratoire par Vincent Guérineau. La première utilise le spectromètre de masse MALDI-ToF/ToF et consiste à identifier d'une part le type de modification, mais également la position du nucléoside modifié dans la séquence de l'ARN après digestion partielle. L'autre approche utilise la HPLC-HRMS et consiste à étudier de manière qualitative et quantitative, le taux global de modifications sans toutefois s'intéresser à la position de ces modifications dans la séquence.

1.6.1 Étude des modifications d'ARN par spectrométrie de masse MALDI-ToF/ToF

Le but de ce type d'approches est donc d'une part d'identifier une modification, mais également de la positionner le long de la chaîne polymérique. Pour ce faire, un ARN purifié est dans un premier temps digéré par exemple à l'aide de la RNase T1. Cette enzyme va hydrolyser la séquence après chaque guanosine. Un mélange d'oligonucléotides est alors obtenu. Ce mélange est ensuite analysé par MALDI-ToF/ToF. Les rapports m/z obtenus sont comparés aux rapports m/z théoriquement possibles pour une suite de nucléosides non modifiés. Dès lors qu'un écart est observé, des études de spectrométrie de masse tandem sont réalisées afin d'identifier la position de la modification responsable du décalage du rapport m/z [Bou-Nacer C. 2015 ; Hamdane D. 2014].

Ce type d'approches fournit une réponse très ciblée mais elle ne permet pas d'avoir une vision globale et rapide des modifications d'un ARN. De plus, elle demande une préparation d'échantillon fastidieuse.

1.6.2 Étude des modifications d'ARN par HPLC-HRMS

L'objectif de ce type d'approches est de visualiser de manière plus globale les modifications portées par un ensemble d'ARN. Lors de cette approche, les molécules d'ARN purifiés subissent une hydrolyse enzymatique à l'aide de la nucléase P1 qui va hydrolyser toutes les liaisons phosphoesters. Le mélange de nucléosides ainsi obtenu est ensuite analysé par HPLC-HRMS à l'aide la méthode présentée dans la section 2.4 [Russel S. 2013].

Lors de ces études, l'information sur la localisation des modifications le long de la séquence est totalement perdue suite à la préparation d'échantillon. Cependant, une telle approche permet la comparaison de cohorte d'échantillons biologiques et fournit des informations tout à fait complémentaires à celles fournies par la méthode MALDI-ToF/ToF exposée dans la section précédente.

1.7 Objectif de ce projet

L'objectif de ce projet est d'étudier la réponse que peut apporter la chromatographie en phase supercritique pour l'étude des modifications des ARN. Il s'agit notamment de voir si la SFC peut se positionner comme alternative à l'approche HPLC présentée dans la section précédente. En effet, bien que les résultats fournis par la HPLC-HRMS soient tout à fait satisfaisants, la méthode utilisée monopolise nos instruments analytiques pour des temps relativement longs (env. 2 h/inj. si un blanc est ajouté entre les échantillons). L'utilisation de la SFC pourrait permettre de réduire significativement les temps d'analyse.

À notre connaissance, aucune publication ne traite de la séparation des nucléosides modifiés par SFC, seules quelques-unes proposent des séparations de nucléobases [Ashraf-Khorassani M. 2010] ou d'un nombre très limité de nucléosides contenus dans un mélange complexe [Huang Y. 2017]. Effectivement, lorsque l'on considère la polarité de ces molécules ($\log P < 0$), la SFC n'apparaît pas forcément comme étant la méthode séparative la plus adaptée. Cependant, de plus en plus d'auteurs publient des travaux visant à séparer des produits polaires par cette approche [Grand-Guillaume Perrenoud A. 2014].

L'objectif pour l'équipe est donc double :

- Acquérir de l'expérience pour la séparation de composés polaires en SFC ;
- Étudier les possibilités de la technique pour réduire le temps d'analyse des nucléosides modifiés.

2 Matériels et méthodes

2.1 Les standards

Plusieurs standards ont été nécessaires au développement de la méthode SFC-HRMS. Ces standards ont été achetés, pur ou en mélange, auprès de 4 sociétés différentes : Sigma-Aldrich, TCI Europe, Fluka et Interchim. Le Tableau 28 regroupe des informations sur les standards purs. L'ensemble des structures correspondantes est présenté en annexe I.

Les standards purs ont été mis en solution dans du méthanol ou dans un mélange eau/acétonitrile (50/50, v/v) lorsqu'ils présentaient une mauvaise solubilité dans le méthanol. Ces solutions mères ont été préparées à des concentrations de l'ordre de plusieurs mg/mL (de 2,5 à 5,0 mg/mL). Les solutions filles des nucléosides sans modification (A, C, G et U) ont ensuite été préparées dans 3 solvants différents (ACN, MeOH et H₂O) à deux concentrations (10 et 100 µmol/L). Les solutions filles des autres standards ont été préparées à 100 µmol/L dans H₂O uniquement.

Un mélange commercial de 12 nucléosides modifiés (*Nucleosides Test Mix*), acheté auprès de la société Sigma-Aldrich, a également été utilisé lors du développement de méthode. Les informations concernant ce mélange sont compilées dans le Tableau 29. Aucune autre préparation d'échantillon n'a été réalisée sur ce mélange avant son étude par SFC-HRMS.

Nom	Abréviation	Fournisseur
adénosine	A	Sigma-Aldrich
guanosine	G	Sigma-Aldrich
cytidine	C	Fluka
uridine	U	Fluka
N6-methyladénosine	m6A	Interchim
5-methylcytidine	m5C	TCI Europe
2'-O-methyluridine	Um	TCI Europe
5-methyluridine	m5U	TCI Europe
2'-O-methyladénosine	Am	TCI Europe
2'-O-methylguanosine	Gm	TCI Europe

Tableau 28 : Standards utilisés pour le développement de méthode.

Nom	Abréviation	Concentration
cytidine	C	50 µg/mL
guanosine	G	25 µg/mL
inosine	I	25 µg/mL
1-méthyladénosine	m1A	25 µg/mL
5-methylcytidine	m5C	50 µg/mL
2'-O-methylcytidine	Cm	20 µg/mL
3-methylcytidine	m3C	100 µg/mL
7-méthylguanosine	m7G	25 µg/mL
5-methyluridine	m5U	100 µg/mL
pseudouridine	Y	25 µg/mL
2-thiocytidine	s2C	10 µg/mL
uridine	U	25 µg/mL

Solvant : H2O + 1 % d'acétate de sodium

Tableau 29. : Composition du mélange commercial de nucléosides modifiés.

2.2 Échantillons biologiques

Deux extraits d'ARNt (d'*Escherichia coli* et de levure de boulanger) ont été obtenus auprès de la société Sigma-Aldrich. Sylvie Auxilien (I2BC, Gif-sur-Yvette) a procédé à la digestion des ARNt à l'aide de la nucléase P1, provenant de *Penicillium citrinum*, et de phosphatase alcaline (BAP⁵⁴), provenant d'*E. coli* C75, dans le but d'obtenir les nucléosides correspondants. Le protocole utilisé est le suivant : 16 unités A₂₆₀ sont incubées pendant 3 h à 37°C avec 3 unités de nucléase P1 et 1 unité de BAP dans une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (5 mM, pH 7) pour un volume total de 40 µL. La concentration finale d'ARNt était donc de 16 µg/µL. L'hydrolysate ensuite été directement injecté en chromatographie en phase supercritique et en chromatographie en phase liquide après avoir été dilué 10 fois dans du méthanol.

2.3 Le couplage SFC-HRMS

Les instruments (chromatographe et spectromètre de masse) ont préalablement été décrits dans le chapitre d'introduction (chapitre I section 4.3). Lors du développement de la méthode chromatographique, plusieurs colonnes analytiques ont été testées. Leurs caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 30. La phase mobile était composée de dioxyde de carbone, de méthanol, d'eau et d'acétate d'ammonium. Différentes proportions ont été testées et seront présentées dans la section 3.4. De la même manière, plusieurs conditions chromatographiques (débit

⁵⁴ Bacterial Alkaline Phosphatase

de la phase mobile, température du four à colonne, valeur de la contre-pression) ont été testées et seront présentées dans la section 3.5.

Nom commercial	Phase stationnaire	Dimensions (mm x mm)	Ø particule (µm)	Fournisseur
Acquity UPC ² Torus 2-PIC	2-picolylamine	150 x 2,1	1,7	Waters
Acquity UPC ² Torus DEA	Diéthylamine	150 x 2,1	1,7	Waters
Acquity UPC ² Torus 1-AA	1-aminoanthracene	150 x 2,1	1,7	Waters
Acquity UPC ² BEH 2-EP	2-éthylpyridine	100 x 2,1	1,7	Waters
Zorbax SB-CN RRHT	Cyano	100 x 2,1	1,8	Agilent Technologies
Zorbax RX-Si RRHT	Silice	100 x 2,1	1,8	Agilent Technologies
Luna NH2	Amino	150 x 2,0	3,0	Phenomenex
Hypercarb	Carbone graphite poreux	100 x 2,1	5,0	Thermo Fisher Scientific

Tableau 30 : Caractéristiques des différentes colonnes analytiques utilisées pour la séparation des nucléosides.

L'ionisation a été assurée par l'utilisation d'une source *electrospray* (*Dual ESI*) et le spectromètre de masse a été utilisé dans son mode haute résolution (40000 à m/z 922). Une calibration interne permet d'obtenir des précisions en masse inférieures à 2 ppm dans la gamme de masse considérée (m/z 100-1000) grâce à l'infusion d'un mélange de standards sur le second nébuliseur (m/z 121,0509 et m/z 922,0098). Au cours de cette étude, le spectromètre de masse et la source d'ionisation ont été configurés avec des valeurs classiques pour les différents paramètres. Seule la valeur de la tension du capillaire de transfert ($V_{\text{fragmentor}}$) a été abaissée de 150 à 100 V, dans le but de limiter au maximum la fragmentation en source consécutive à la perte du ribose. Les paramètres utilisés sont présentés dans le Tableau 31.

Paramètres	Valeurs
Débit du gaz	10 L/min
Température du gaz	350°C
Pression du nébuliseur	25 psi
Tension de cône	3000 V
Tension de fragmentor	100 V
Tension skimmer	45 V
Tension octopole	750 V
Gamme de masse	m/z 100-1000
Vitesse d'acquisition	1 spectre/s

Tableau 31 : Paramètres du spectromètre de masse (source ESI).

2.4 Le couplage LC-HRMS

Le système HPLC est le même que celui décrit dans le chapitre II section 2.4. La méthode chromatographique se base sur de la littérature [Pomerantz S.C. 1990 ; Russel S. 2013]. Elle est régulièrement utilisée par Vincent Guérineau, ingénieur d'étude de notre équipe, dans le cadre de collaborations. Elle utilise une colonne chromatographique remplie de particules à noyaux non poreux (accucore RP-MS ; 2,1 x 100 mm ; 2,6 µm ; Thermo Fisher Scientific). La phase mobile est constituée d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (5 mM, pH 5,3) (voie A) et d'un mélange acétonitrile/eau 50/50 v/v (voie B) suivant le gradient d'éluion présenté dans le Tableau 32. Le débit de la phase mobile est de 200 µL/min. La température du four à colonne est réglée à 30°C. Le volume d'injection est programmé à 6 µL.

Temps (min)	Composition de la phase mobile (% Voie B)
0,0	0,0
3,0	0,0
4,4	0,2
5,8	0,8
7,2	1,8
8,6	3,2
10,0	5,0
25,0	25,0
30,0	50,0
34,0	75,0
37,0	75,0
45,0	100,0
48,0	100,0
53,0	0,0

Tableau 32 : Gradient d'éluion utilisé pour la séparation des nucléosides modifiés par HPLC. Voie A : H₂O + 5 mM AcONH₄. Voie B : ACN/H₂O 50/50 v/v.

Un spectromètre de masse haute résolution basé sur le couplage entre une trappe linéaire et un analyseur orbitrap (LTQ-Orbitrap) a été utilisé en couplage avec la HPLC. Tout comme pour le couplage avec la SFC, l'ionisation est réalisée par une source *electrospray*. Les paramètres utilisés sont reportés dans le Tableau 33.

Paramètre	Valeur
Température du capillaire	300°C
Pression du nébuliseur	25 psi
Tension de cône	4500 V
Sheath gas	40 (unité arbitraire)
Auxiliary gas	12 (unité arbitraire)
Sweep gas	7 (unité arbitraire)
Gamme de masse	m/z 100-1000

Tableau 33 : Paramètres du LTQ-Orbitrap pour l'étude des nucléosides modifiés (source ESI).

3 Développement d'une méthode SFC-HRMS

Pour développer une méthode SFC-MS, une trame classique est adoptée au sein de notre laboratoire. Elle consiste à s'intéresser dans un premier temps à la séparation avant d'optimiser la détection. Cependant, dans le cadre de cette étude, une étape préliminaire a été nécessaire en amont de l'optimisation de la séparation. En effet, lors de l'injection des standards de nucléosides non modifiés (**A**, **G**, **C** et **U**) en mode *bypass* (sans colonne chromatographique), aucun signal n'était observé. Nous avons donc dû travailler sur l'ionisation afin de pouvoir détecter les analytes lors de l'optimisation de la dimension séparative.

3.1 Étude préliminaire (ionisation)

L'étude de l'ionisation a été réalisée grâce à l'infusion directe de **A** dans le méthanol. L'infusion de la solution fille à 10 µmol/L permet d'obtenir une intensité d'environ 3000 coups par spectre pour l'espèce protonée [M+H]⁺ (m/z 268,1046). Lorsque la solution 10 fois plus concentrée est infusée au même débit, l'intensité relevée pour cette même espèce passe à environ 30000 coups par spectre. L'ordre de grandeur des intensités observées semble trop faible aux vues des concentrations mises en jeu. Le type de source d'ionisation aurait pu être mis en cause mais les études antérieures par

HPLC-MS montrent qu'il est possible d'obtenir un bon signal pour **A** avec une source ESI. La seule différence entre notre expérience préalable et une étude par HPLC-MS est le solvant dans lequel se trouve l'analyte (MeOH lors de l'infusion et un mélange ACN/H₂O en LC). L'eau semble être importante pour l'ionisation de **A**. Le contenu de la seringue a donc été dilué par un facteur 2 avec H₂O. L'intensité observée a augmenté de 3.10^4 à 7.10^5 coups par spectre, alors que dans le même temps la concentration a diminué de 100 à 50 $\mu\text{mol/L}$. Cette expérience préliminaire a mis en évidence la nécessité de la présence d'eau dans le système pour permettre d'obtenir une ionisation correcte. Le solvant make-up a donc été modifié pour intégrer 20 % d'eau (MeOH/H₂O 80/20 v/v).

Remarque : cette expérience préliminaire a également mis en évidence la nécessité de diminuer la tension sur le capillaire de transfert à l'entrée du spectromètre de masse. En effet, pour une valeur de 200 V, une importante perte de sucre est observée en source (m/z 112,0506). La réduction de cette tension à 100 V a permis de conserver un bon signal sur l'espèce protonée (Figure 87) tout en réduisant le signal correspondant à la perte du ribose (le but n'étant pas d'éliminer cet ion du spectre de masse puisqu'il peut nous être utile pour distinguer deux isomères comme **m3C** et **Cm**).

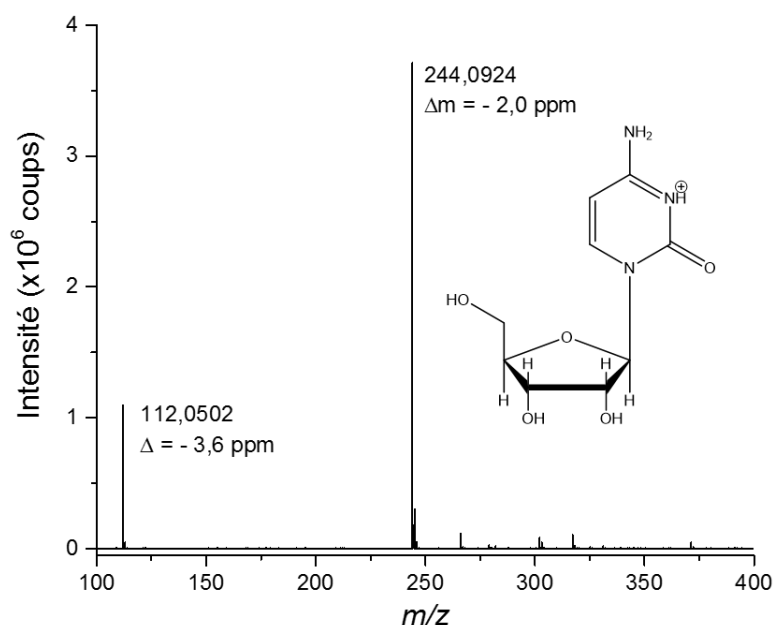


Figure 87 : Spectre de la cytidine (fragmentor 100 V).

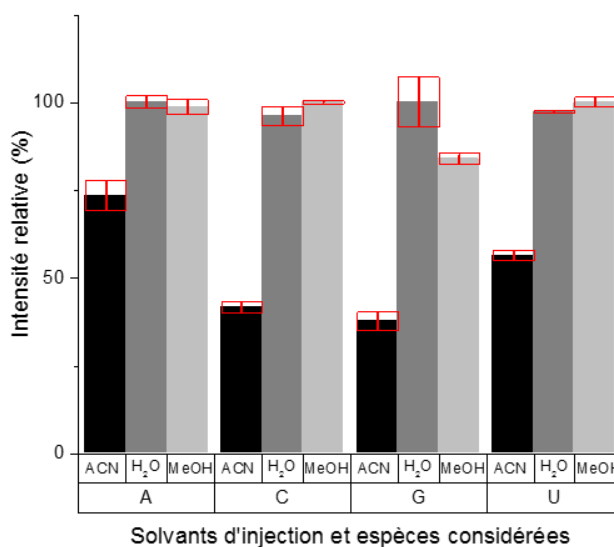
3.2 Étude de l'influence du solvant d'injection

Une étude sur l'impact du solvant d'injection a également été menée. L'influence du solvant d'injection a été observée sur le signal de chacun des 4 nucléosides non modifiés pour 3 solvants d'injection (ACN, H₂O et MeOH). Des solutions filles, à la concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ dans ACN, H₂O et MeOH, ont été injectées en duplicata sur la méthode générique présentée dans le Tableau 34.

Paramètres	Valeurs
Colonne	Si 150 x 2,1 mm 1,8 μ m
Co-solvant	MeOH + 5 mmol/L AcONH ₄
Gradient	5 à 20 % en 20 min
Débit	1,5 mL/min
Température du four	30°C
Contre-pression	150 bar
Make-up	MeOH/H ₂ O 80/20 v/v
Débit du make-up	200 μ L/min
Volume d'injection	1 μ L

Tableau 34 : Méthode utilisée pour visualiser les effets du solvant d'injection en SFC.

L'extraction du chromatogramme d'ions extraits correspondant à l'espèce protonée de chaque nucléoside a été réalisé dans tous les cas, afin d'observer l'influence du solvant d'injection. Les géométries de pic sont restées globalement constantes malgré les changements de solvant. La nature du solvant a cependant influencé la hauteur des pics chromatographiques comme l'illustre la Figure 88. Dans cette figure, l'intensité est représentée de façon relative par rapport à la valeur la plus élevée pour chacun des ions. Le méthanol et l'eau fournissent des résultats globalement comparables. Un léger avantage est constaté pour l'eau, avec une amélioration du signal de la guanosine de près de 20 % par rapport au cas utilisant du méthanol. *A contrario*, l'utilisation d'acétonitrile réduit la hauteur des pics chromatographiques d'un facteur 2 environ. Finalement, c'est donc l'eau qui a été retenue en tant que solvant d'injection. Ce choix est d'autant plus pertinent que les digestions d'ARN sont réalisées en milieu aqueux.

Figure 88 : Effet du solvant d'injection (ACN, H₂O ou MeOH) en SFC sur l'intensité du signal de A, G, C et U

3.3 Criblage de colonne

Le choix de la chimie de phase stationnaire est une étape primordiale pour obtenir une séparation chromatographique avec une bonne résolution. C'est donc la première étape du développement de méthode. Pour ce faire, un criblage de colonne a été réalisé à l'aide des 8 colonnes analytiques présentées en section 2.3, et en utilisant une méthode générique en mode gradient (Tableau 35). Ce criblage a été décomposé en 2 étapes.

Paramètres	Valeurs
Co-solvant	MeOH + 5 mmol/L AcONH ₄
Gradient	5 à 20 % en 25 min
Débit	1,5 mL/min
Température du four	30°C
Contre-pression	150 bar
Make-up	MeOH/H ₂ O 80/20 v/v
Débit du make-up	200 µL/min
Volume d'injection	1 µL

Tableau 35 : Méthode utilisée pour la première étape du criblage de colonne en SFC.

Dans un premier temps, une solution contenant les 4 nucléosides sans modification (**A**, **G**, **U** et **C**) à 100 µmol/L dans H₂O a été injectée sur chacune des colonnes. Ces 4 espèces présentent des Log P négatifs mais des propriétés acido-basiques différentes (Tableau 36). Compte tenu de ces propriétés, de l'acétate d'ammonium a été ajouté dans le co-solvant (méthanol) afin d'améliorer la géométrie des pics chromatographiques. L'ajout de cet additif est largement rapporté dans la littérature pour la séparation d'espèces polaires, basiques ou ionisables par SFC [Grand Guillaume Perrenoud A. 2012 ; Novakova L. 2014].

Nucléoside	Log P	pKa
adénosine	-1,05	3,63
cytidine	-2,51	4,11
uridine	-1,98	9,25
guanosine	-1,90	2,20/9,50

Tableau 36 : Log P expérimentaux de A, C, U et G. Source : www.hmdb.ca (Consulté le 12/05/2017).

La Figure 89 présente les EIC de la cytidine obtenus lors du criblage. Dans les conditions du criblage (Tableau 35), aucun nucléoside n'a été détecté lors de l'utilisation de la colonne Hypercarb[®]. De façon à éluer les composés, un plateau utilisant 20 % de co-solvant a été ajouté à la suite de la méthode chromatographique. La cytidine a finalement été éluee 30 minutes après l'injection (**a**) et avec une largeur de pic décevante (6 min à sa base). Toutes les autres colonnes ont conduit à l'élution des nucléosides grâce à la méthode générique. Cependant, à l'exception des 3 colonnes de la gamme Torus ((**f**), (**g**) et (**h**)), tous les EIC présentent des pics chromatographiques très larges (plusieurs minutes), et ayant dans certains cas un important *tailing* ((**c**) et (**d**)). Les colonnes Torus fournissent quant à elles des pics chromatographiques ayant une largeur tout à fait classique pour notre système (de l'ordre de la minute) et une symétrie bien plus convenable malgré une faible traînée de pic. Ces résultats particuliers pour la cytidine sont généralisables aux autres composés (A, U et G). Ces trois colonnes semblent donc adaptées à la séparation de nucléosides.

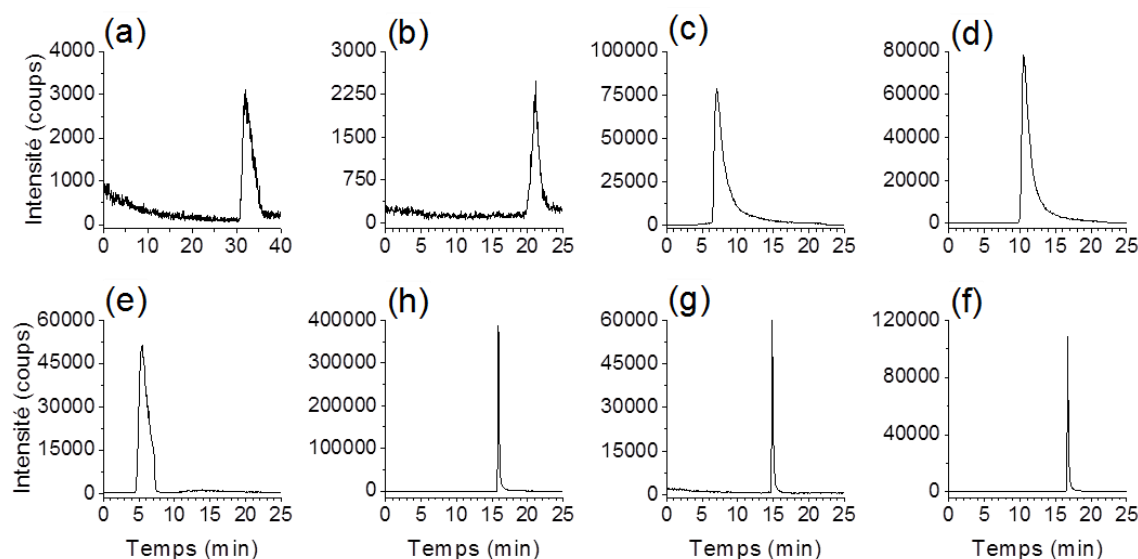


Figure 89 : Criblage de colonne. EIC correspondants à la cytidine (m/z 244,0929). (a) Hypercarb, (b) NH₂, (c) 2-EP, (d) Si, (e) CN, (f) 2-PIC, (g) 1-AA et (h) DEA.

La seconde étape du criblage vise à évaluer la capacité des trois colonnes Torus à séparer les différents isomères. L'une des principales modifications observées dans les organismes vivants est la méthylation du nucléoside. Cette méthylation peut avoir lieu sur la base (ex : **m5C**) ou sur le sucre (ex : **Cm**) comme l'illustre la Figure 90.

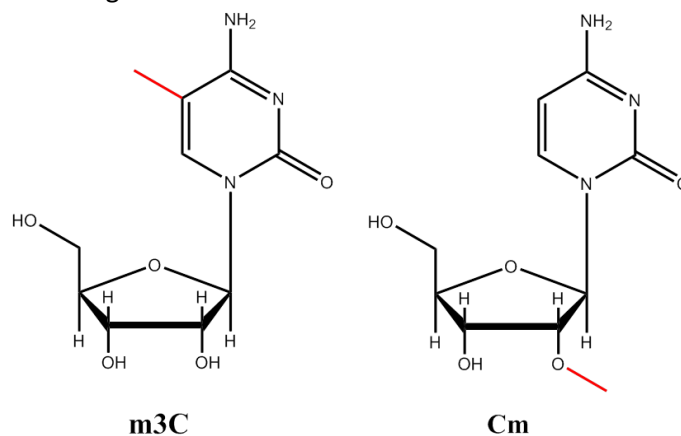


Figure 90 : Exemples de méthylations sur la cytidine avec la 3-méthylcytidine et la 2'-O-méthylcytidine.

Ces différents sites de modification conduisent donc à la possible coexistence d'isomères, que la MS simple ne permet pas de distinguer, au sein d'un ARN. Dans ce cas, la chromatographie doit impérativement permettre leur séparation en amont. De cette manière, l'utilisation de standards permettra de déterminer le temps de rétention des différents isomères.

Pour évaluer la capacité des phases stationnaires à séparer les isomères, le mélange commercial (décrit dans la section 2.1) a été injecté sur les trois colonnes Torus en utilisant la méthode chromatographique présentée dans le Tableau 35. Ce mélange contient notamment trois isomères de la cytidine méthylée (**m3C**, **m5C** et **Cm**). Les chromatogrammes d'ions extraits correspondants (m/z 258,1058) sont présentés dans la Figure 91. La colonne DEA (**c**) ne fournit que deux pics chromatographiques. Une co-élution totale est donc observée entre deux méthylcytidines. L'EIC correspondant à la colonne 2-PIC (**e**) présente une co-élution partielle ($R = 1,0$) entre **m3C** et **m5C**, **Cm** étant largement séparé des deux autres. L'EIC (**a**), correspondant à la colonne 1-AA, montre trois pics parfaitement séparés. Cette colonne semble donc à première vue être la plus adaptée pour notre étude.

Cependant, la colonne 1-AA semble moins idéale lorsque les signaux des autres nucléosides du mélange sont considérés. Les EIC correspondant à **m7G** (m/z 298,1147) sont rapportés en Figure 91. La colonne 1-AA **(b)** est la seule à fournir un signal d'une très faible intensité et un pic chromatographique extrêmement large (plusieurs minutes). Le pic obtenu est tout à fait correct pour les deux autres colonnes **(d)** et **(g)**. Globalement, la colonne 1-AA n'apparaît donc plus comme étant la plus adaptée à nos besoins. Celle intégrant la phase 2-PIC constitue un bon compromis puisque que tous les nucléosides y sont élués et que les isomères sont partiellement séparés avec l'utilisation d'une méthode générique. Il est donc envisageable qu'une modification des conditions chromatographiques (gradient, température, ...) puisse conduire à une augmentation de la résolution chromatographique entre **m3C** et **m5C**. Cette phase stationnaire est retenue pour la suite de notre étude.

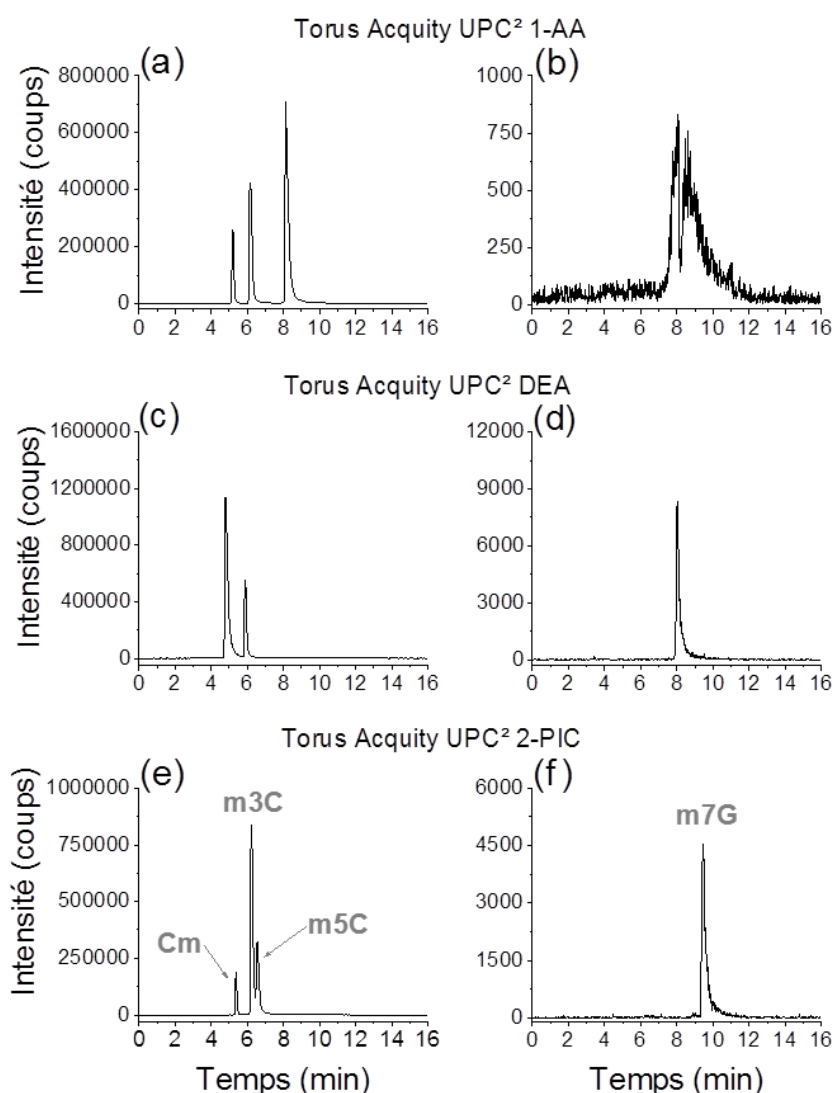


Figure 91 : Deuxième étape du criblage. Injection du mélange commercial sur les colonnes de la gamme Torus (1-AA: (a) et (b) ; 2-PIC: (c) et (d) ; DEA (e) et (f)). (a), (c) et (e) sont les EIC des cytidines méthylées. (b), (d) et (f) sont les EIC de la 7-méthylguanosine.

3.4 Choix de la phase mobile

Une fois la colonne chromatographique choisie, il est important de déterminer la composition de la phase mobile et par conséquent le co-solvant à utiliser. Comme dans la quasi-totalité des cas en SFC,

la majeure partie de la phase mobile est constituée de dioxyde de carbone sous pression. Pour le reste, un co-solvant organique est utilisé pour faire varier la polarité de la phase mobile.

3.4.1 L'acétate d'ammonium

Lors du criblage de colonnes, le méthanol n'a pas été utilisé pur. De l'acétate d'ammonium (5 mmol/L) a été ajouté dans l'espoir d'améliorer les pics chromatographiques [Grand Guillaume Perrenoud A. 2012 ; Novakova L. 2014]. L'une des premières étapes dans le choix de la phase mobile a été d'observer l'influence de l'utilisation d'acétate d'ammonium comme additif. Pour ce faire, le mélange commercial a été injecté sur la méthode utilisée précédemment (Tableau 35) intégrant la colonne sélectionnée (2-PIC). Différentes phases mobiles ont été testées. Elles utilisaient toutes du méthanol comme co-solvant et une concentration croissante d'additif (0, 5 10 ou 15 mmol/L). Une partie des résultats obtenus est présentée en Figure 92. Cette figure permet de suivre le signal de 3 rapports m/z : 245,0769 (**U** et **Y**), 258,1085 (**Cm**, **m3C** et **m5C**) et 260,0700 (**s2C**). Pour chacun de ces exemples, la présence de l'additif apparait essentielle à l'obtention de pics chromatographiques puisque les chromatogrammes (**a**), (**b**) et (**c**) possèdent des pics très larges (plusieurs minutes) et/ou déformés et/ou peu intenses.

Les chromatogrammes (**d**) à (**l**) soulignent ensuite le fait que la concentration en additif n'est elle pas un facteur très influent. En effet, d'une concentration à l'autre, les pics chromatographiques possèdent des temps de rétention identiques et une géométrie similaire. Dans le cas des méthylcytidines, l'augmentation de la concentration entraîne une légère amélioration de la résolution entre **m3C** et **m5C**. Cependant une diminution de l'intensité de l'ensemble des signaux est observée (moins 65 % pour **s2C** entre 5 et 15 mmol/L). Ces observations ont conduit à sélectionner un co-solvant intégrant de l'acétate d'ammonium à une concentration de 10 mmol/L.

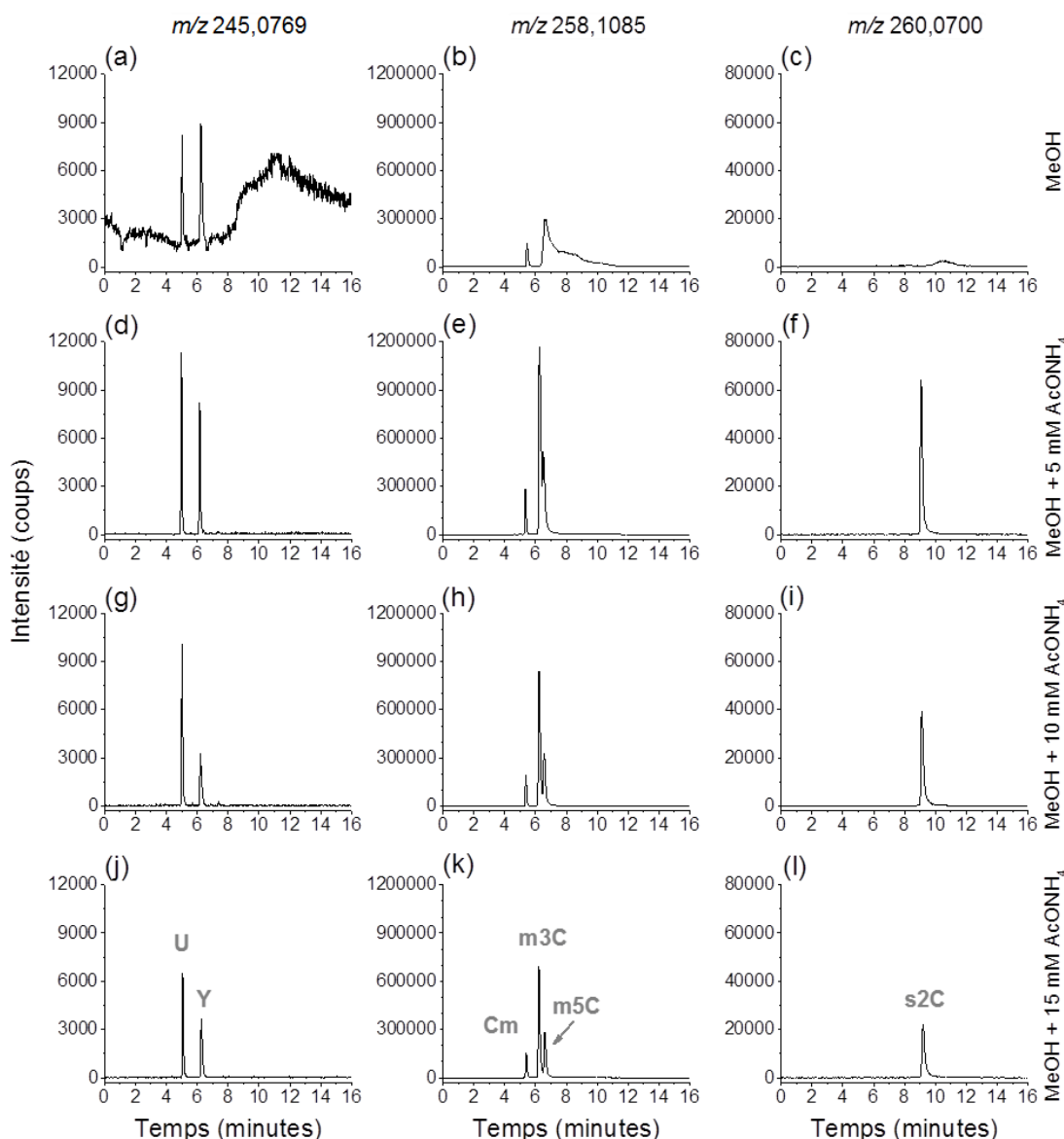


Figure 92 : Influence de la présence et de la concentration de l'acétate d'ammonium dans le co-solvant sur la séparation des nucléosides modifiés en SFC. (a) (b) et (c) : sans additif. (d), (e) et (f) : 5 mmol/L. (g), (h) et (i) : 10 mmol/L. (j), (k) et (l) : 15 mmol/L.

3.4.2 Le choix du co-solvant

En chromatographie en phase supercritique, le choix du co-solvant est généralement guidé par la rétention et la résolution chromatographique visées. Concernant notre étude, l'étape de criblage fournit des temps de rétention corrects (moins de 10 min) et des résolutions satisfaisantes (outre celle observée entre **m3C** et **m5C**). Pour obtenir ces résultats, le pourcentage de co-solvant utilisé était de l'ordre de 10 % (13 % à 10 min). L'utilisation d'un autre co-solvant, comme l'éthanol ou l'isopropanol, aurait eu probablement pour conséquence d'augmenter les résolutions chromatographiques mais également d'augmenter les temps de rétention ou le pourcentage de co-solvant (et par conséquent d'augmenter les pressions en tête de colonne) [Berger T.A. 2015]. Le méthanol a donc été conservé comme co-solvant le temps de vérifier si la co-élution entre **m3C** et **m5C** pouvait être résolue grâce à l'optimisation du gradient d'élution ou des autres paramètres chromatographiques (température du four à colonne, contre-pression, débit de la phase mobile).

3.4.3 Choix du gradient d'élution

Différents gradients d'élution ont été testés dans le but de résoudre la co-élution observée entre **m3C** et **m5C**. La Figure 93 représente les EIC obtenus pour le rapport m/z 258,1058 en utilisant différents gradients d'élution et un co-solvant constitué d'une solution méthanolique d'acétate d'ammonium à 5 mmol/L. Les gradients présentés dans cette figure ont pour point commun d'atteindre un plateau à 25 % de co-solvant. La pente et la composition de départ varient de façon à tendre de plus en plus rapidement vers le mode isocratique à 25 % (**f**). Les 5 premiers chromatogrammes mettent en évidence une augmentation de la résolution chromatographique avec l'augmentation de la proportion de co-solvant. En effet, le chromatogramme (**a**) affiche une résolution de 0,6 entre **m3C** et **m5C** alors que la résolution est de 1,2 pour le chromatogramme (**e**). Le mode isocratique (**f**) confirme également cette tendance mais dans ce cas une nouvelle co-élution apparaît (**Cm/m3C**).

Les résultats présentés dans la Figure 93 ont permis de sélectionner le gradient d'élution utilisé en (**e**). En effet, il permet à la fois de maximiser la résolution chromatographique pour les cytidines méthylées et réduire le temps d'analyse.

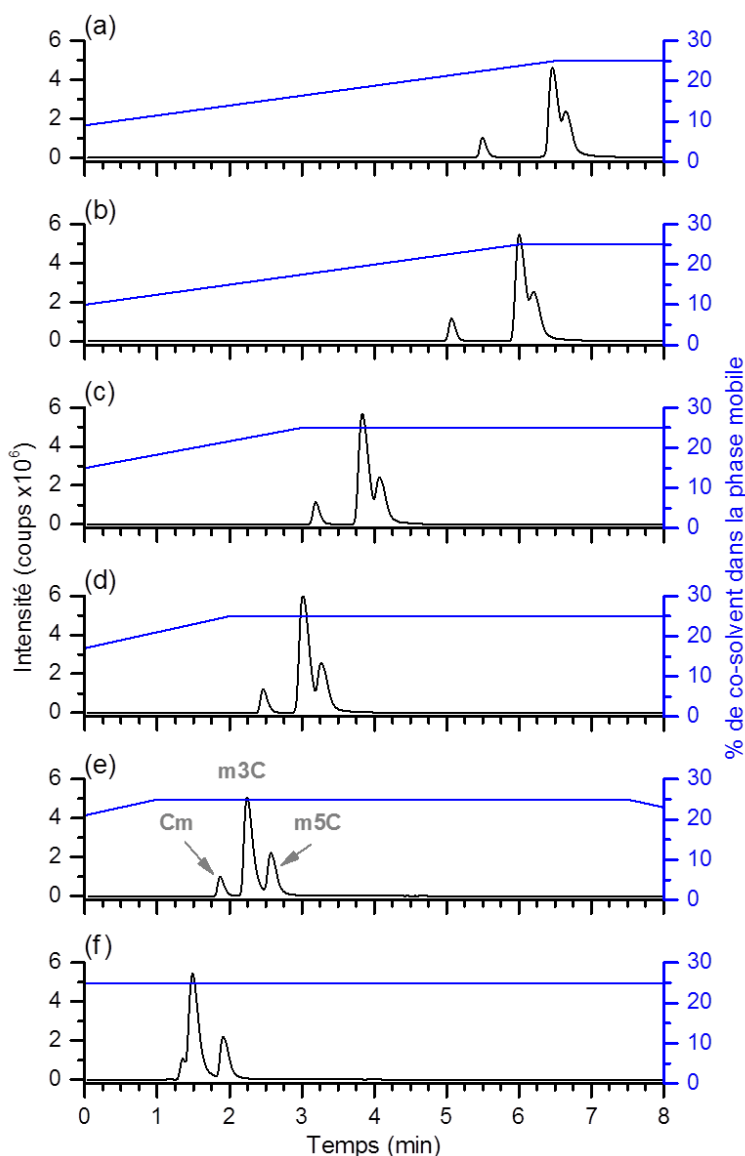


Figure 93 : Effets du gradient d'élution en SFC sur la séparation des cytidines méthylées. Co-solvant : MeOH + 5 mmol/L AcONH₄.

3.4.4 Introduction d'eau dans le co-solvant

Plusieurs auteurs rapportent l'intérêt de l'ajout d'un faible pourcentage d'eau (0,5 à 5 %) dans le co-solvant pour améliorer la géométrie des pics chromatographiques [West C. 2013].

L'influence de l'ajout d'une faible quantité d'eau (1, 2 et 3 % dans MeOH + 5 mmol/L AcONH₄) a été étudiée sans qu'aucun effet sur les chromatogrammes n'ait pu être identifié. Cependant, considérant que de l'eau était utilisée comme solvant d'injection, 2 % d'eau ont été ajoutés au co-solvant dans l'objectif d'éviter d'éventuels soucis de reproductivité liée à l'accumulation progressive d'eau sur la phase stationnaire à chaque injection [Berger T.A. 2015].

3.5 Détermination des paramètres chromatographiques

La dernière étape du processus de développement de méthode chromatographique est l'optimisation des autres paramètres chromatographiques tels que le débit de la phase mobile, la valeur de la contre-pression et la température du four à colonnes. Différentes valeurs ont été testées pour chacun de ces paramètres. Notre objectif étant toujours de séparer les différentes cytidines méthylées, les résultats présentés ici se concentreront uniquement sur le signal des EIC correspondants à leur rapport m/z à 258,1058.

3.5.1 Influence de la contre-pression

La contre-pression imposée par le système influence la densité et la polarité d'un fluide supercritique. Par conséquent, la valeur de la contre-pression peut avoir un impact sur la séparation chromatographique en SFC. Dans le cadre de cette étude, 3 valeurs de contre-pression ont pu être testées. Pour le cas des cytidines méthylées, la variation de contre-pression a entraîné une variation de la rétention sans que la résolution chromatographique ne soit impactée : les temps de rétention ont simplement été diminués avec l'augmentation de la contre-pression. La Figure 94 permet de mettre en évidence ce phénomène. Il s'agit de la superposition des 3 EIC (m/z 258,1058) correspondants aux 3 valeurs de contre-pression. De façon à visualiser un potentiel effet sur l'allure des pics chromatographiques, ou sur la résolution chromatographique, les temps de rétention ont été corrigés pour que les pics majoritaires se superposent (+ 0,175 min pour l'analyse à 130 bar et + 0,350 min pour l'analyse à 150 bar). Il en résulte une superposition parfaite entre les trois chromatogrammes, confirmant ainsi que la valeur de la contre-pression n'influçait pas la résolution dans cet exemple. La valeur de la contre-pression a donc été fixée arbitrairement à une valeur de 150 bar.

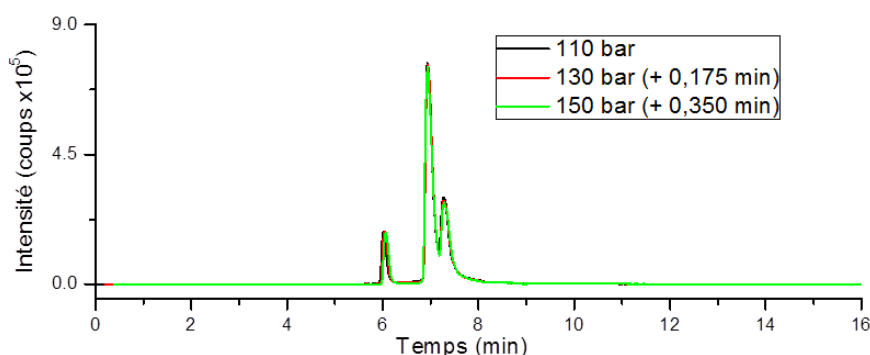


Figure 94 : Influence de la contre-pression sur les EIC correspondants aux cytidines méthylées en SFC. Superposition de 3 EIC (noir 110 bar, rouge 130 bar, vert 150 bar) avec une correction des temps de rétention (rouge +0,175 ; +0,350 min) dans le but de superposer le pic majoritaire.

3.5.2 Influence de la température du four à colonnes

La température du four à colonnes est un élément qu'il est important de maîtriser en chromatographie en phase liquide lorsque des résultats répétables sont recherchés. Cette variable devient cruciale en SFC puisque, avec la pression, elle de modifier les propriétés (ex : masse volumique) de la phase mobile. Afin de visualiser l'influence de la température sur la séparation des nucléosides modifiés, 4 valeurs de températures ont été testées (20, 30, 40 et 50°C). L'influence de ces paramètres est à nouveau présentée pour les EIC correspondants au rapport m/z des cytidines méthylées (m/z 258,1058) en Figure 95.

Considérant, d'une part les coordonnées du point critique du CO₂ pur (31°C, 74 bar), et d'autre part, la composition de notre phase mobile (CO₂/MeOH/AcONH₄), le point critique est attendu pour des valeurs (P, T) plus élevées. Dans le but de s'approcher d'un fluide supercritique, les températures 40°C, puis 50°C, ont dans un premier temps été testées. Ces deux valeurs entraînaient une dégradation de la résolution chromatographique entre **m3C** et **m5C**. En effet, à 50°C un seul pic chromatographique est observé pour les deux composés alors qu'un épaulement laisse deviner la présence d'une co-élution quasi-totale à 40°C. La résolution obtenue à 30°C était d'environ 1,0. Il apparaît donc évident que l'augmentation de la température conduit à la perte de la séparation des deux isomères considérés. Bien que cette valeur soit bien en deçà du point critique du CO₂ pur, un essai à 20°C a été réalisé. Le chromatogramme montre étonnamment une augmentation de la résolution entre **m3C** et **m5C** qui passe de 1,0 à 1,5 (cette valeur est légèrement tronquée par la traînée de pic observée pour **m3C**).

Ces résultats mettent donc en évidence une augmentation de la résolution chromatographique entre **m3C** et **m5C** lorsque la température diminue. Bien qu'il soit possible de diminuer la température du four en dessous de 20°C, aucune valeur plus basse n'a été testée puisque la diminution de la température entraîne une augmentation de la pression. La température de four à colonne de 20°C a été sélectionnée.

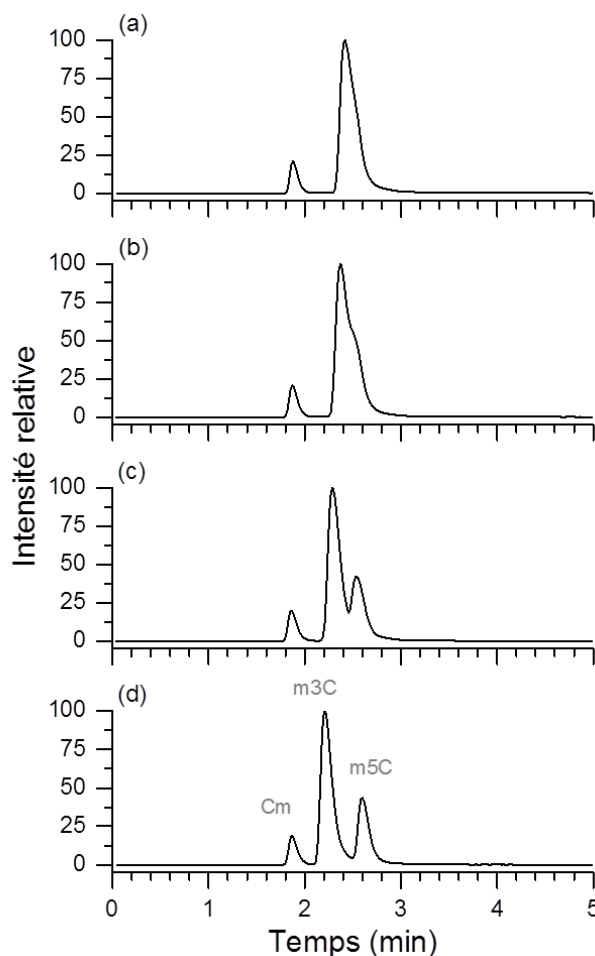


Figure 95 : Influence de la température sur la séparation SFC des cytidines méthylées (m/z 258,1058). (a) 50°C. (b) 40°C. (c) 30°C. (d) 20°C.

3.5.3 Influence du débit de la phase mobile

Pour visualiser l'influence du débit de la phase mobile sur les chromatogrammes obtenus, différentes injections du mélange commercial ont été réalisées en modifiant ce paramètre. La gamme de débits testés s'étend de 0,8 à 1,5 mL/min par pas de 0,1 mL/min. Les EIC correspondants sont présentés en Figure 96. Les résultats montrent que l'augmentation du débit provoque, sans surprise, une diminution des temps de rétention (pour le pic majoritaire le temps de rétention passe de 9,6 min à 0,8 mL/min, à 6,3 min à 1,5 mL/min). Les pics chromatographiques deviennent également plus fins avec l'augmentation de la valeur du débit entre 0,8 et 1,1 mL/min (diminution de 40 % de la largeur à mi-hauteur pour le pic majoritaire), la largeur de pics se stabilise ensuite pour les débits plus élevés. La conséquence directe de la réduction de la largeur des pics est l'augmentation de l'intensité observée ($\times 2,8$ pour le pic majoritaire entre 0,8 et 1,1 mL/min). Dans ces conditions, la valeur optimale de débit semble être 1,5 mL/min puisque l'intensité y est maximisée. Cependant, l'augmentation du débit dans le système induit également une augmentation de la pression en tête de colonne. Cette pression est limitée à 600 bar sur le système utilisé. Expérimentalement, il a été constaté qu'il est important de conserver une marge (env. 50 bar) en-dessus de cette valeur maximale. En effet, lors de certaines analyses réalisées à des débits supérieurs à 1,2 mL/min, des sauts de pression (probablement artefactuels) ont conduit à l'arrêt instantané du système (arrêt du débit et dépressurisation). Cette situation est problématique, notamment lorsque cet arrêt n'est pas rapidement remarqué, de nuit par exemple, puisque les sels d'ammonium viennent alors précipiter

dans la colonne et probablement la détériorer. Pour ces raisons pratiques, le débit a finalement été fixé à 1,2 mL/min.

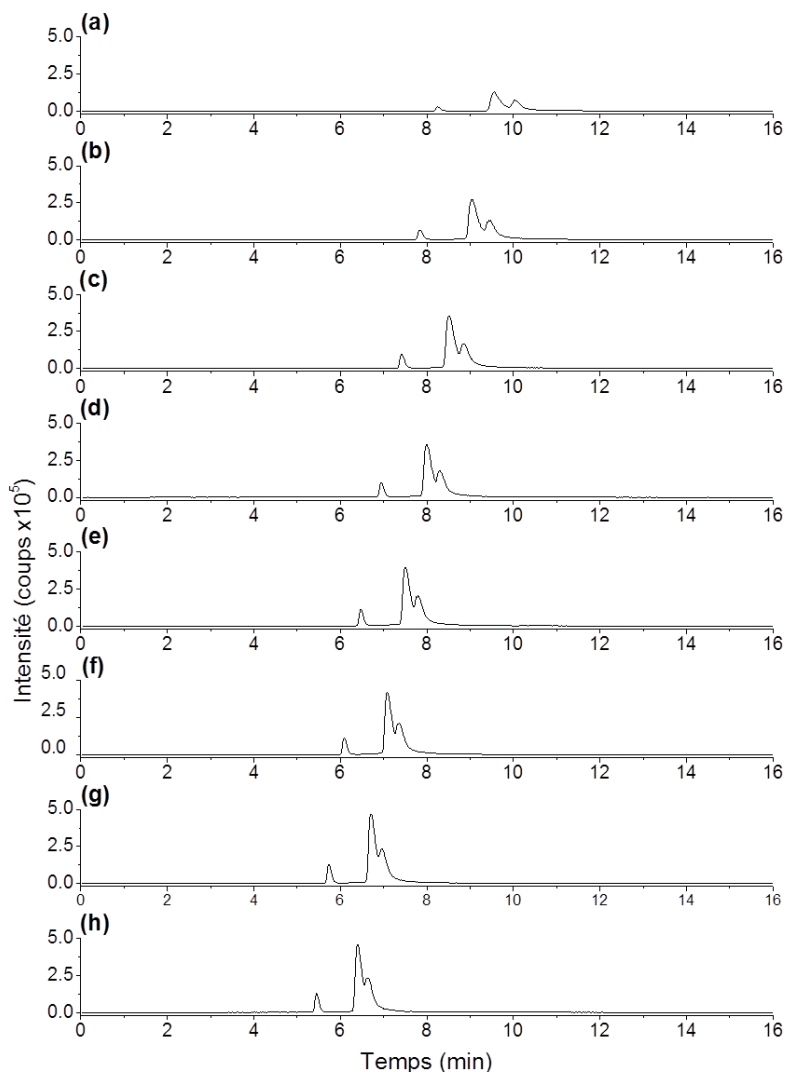


Figure 96 : Influence du débit sur l'EIC correspondant aux cytidines méthylées (SFC). (a) 0,8 mL/min. (b) 0,9 mL/min (c) 1,0 mL/min. (d) 1,1 mL/min. (e) 1,2 mL/min. (f) 1,3 mL/min. (g) 1,4 mL/min. (h) 1,5 mL/min.

3.6 Composition du solvant make-up

Le développement de méthode se termine par l'optimisation de l'ionisation. L'étude préliminaire (voir section 3.1) a mis en évidence la nécessité d'ajouter de l'eau dans le méthanol constituant le solvant make-up afin d'obtenir une ionisation satisfaisante. En se basant sur ses observations, un mélange méthanol/eau (80/20, v/v) a été utilisé arbitrairement durant toute la phase de développement de méthode chromatographique. L'objectif de cette partie est de visualiser l'influence du pourcentage d'eau dans le solvant de make-up afin de définir sa composition optimale.

Pour ce faire, le mélange commercial de nucléosides modifiés a de nouveau été injecté en triplicata, en faisant varier la proportion d'eau dans le solvant de make-up de 0 à 60 %. Les aires de pics pour chacun des composés ont été comparées. Les résultats sont globalement à l'image de ceux obtenus pour **m3C** (Figure 97) où l'intensité augmente fortement (d'un facteur 5) avec le pourcentage de d'eau dans le solvant de make-up entre 0 et 20 %. Après 20 %, l'augmentation du pourcentage d'eau ne permet plus d'augmenter le signal et peut même avoir tendance à le diminuer dans certains cas

(ex : **m1A**). Le solvant make-up optimal est donc un mélange binaire de méthanol et d'eau contenant 20 % d'eau.

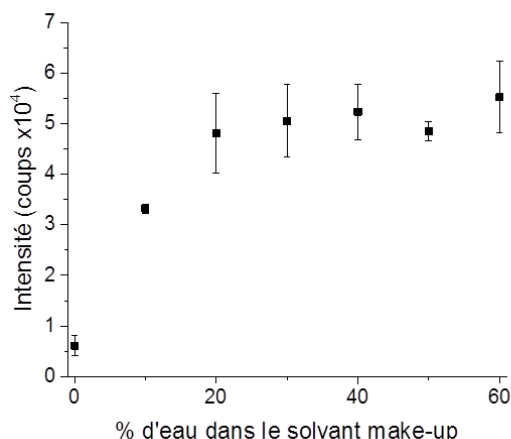


Figure 97 : Influence de la proportion d'eau dans le solvant make-up sur le signal de la 3-méthylcytidine (n=3)

3.7 Méthode chromatographique optimisée

Au cours de ce projet, une méthode SFC-MS a été développée pour l'étude des nucléosides modifiés. Chaque paramètre a fait l'objet d'une série de tests afin d'en évaluer les effets sur la séparation. Le Tableau 37 regroupe l'ensemble des paramètres de la méthode retenue.

Valeur	Paramètre
Phase stationnaire	2-picolylamine, 1,7 μm
Colonne	150 x 2,1 mm
Phase mobile	Co-solvant : MeOH/H ₂ O 98/2 v/v Additif : AcONH ₄ (5 mmol/L) 1,2 mL/min 0 min : 21 % / 1 min : 25 % / 10 min : 25 % / 11 min : 21 % / 14 min : 21 %
Température du four à colonne	20°C
Contre-pression	150 bar
Solvant make-up	MeOH/H ₂ O 80/20 v/v ; 200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Volume d'injection	1 μL
Solvant d'injection	H ₂ O

Tableau 37 : Paramètres de la méthode SFC optimisée.

4 Étude du mélange commercial

Bien que ce mélange soit vendu comme étant constitué de 12 nucléosides modifiés (cf. section 2.1), l'équipe de Patrick Limbach l'a déjà décrit comme un mélange contenant en réalité 14 nucléosides modifiés [Russell S. 2013]. D'après les auteurs, les deux nucléosides modifiés supplémentaires sont la N⁶-methyladenosine (**m6A**) et la 3-méthyluridine (**m3U**). La présence de **m6A** serait due à un réarrangement de Dimroth (Figure 98) à partir de **m1A** [Macon J. 1968]. **m3U** serait quant à elle un sous-produit de la synthèse de **m5U**.

Lors des différentes étapes du développement de la méthode chromatographique, seuls certains composés (notamment les cytidines méthylées) ont été suivis. A ce stade, il est impératif de retrouver une vue plus globale de l'effet de la méthode séparative sur cet échantillon. Les signaux correspondants aux 14 nucléosides attendus seront donc étudiés dans cette section, l'objectif étant

de visualiser si tous les pics chromatographiques sont séparés grâce à la méthode SFC, avec une attention particulière pour les isomères que contient le mélange.

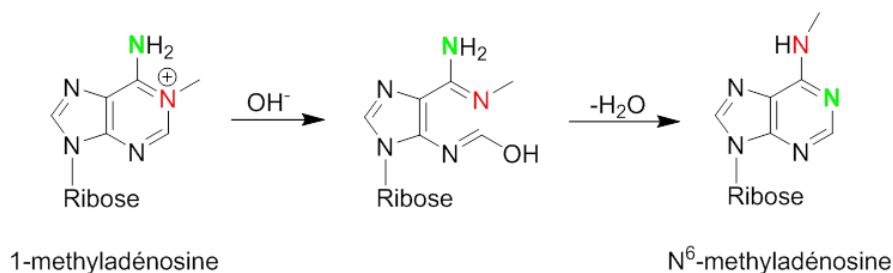


Figure 98: Réarrangement de Dimroth sur m1A.

4.1 Étude qualitative

Compte tenu de la présence d'isomères, les 14 nucléosides modifiés peuvent être suivis grâce à 9 EIC. Les rapports m/z correspondants aux espèces protonées sont présentés dans le Tableau 38.

Nom	Abréviation	[M+H] ⁺
cytidine	C	244,0929
uridine	U	245,0769
pseudouridine	Y	
3-méthylcytidine	m3C	258,1058
5-méthylcytidine	m5C	
2'-O-méthylcytidine	Cm	
3-méthyluridine	m3U	259,0926
5-méthyluridine	m5U	
2-thiocytidine	s2C	260,0700
inosine	I	269,0881
1-méthyladénosine	m1A	282,1198
N6-méthyladénosine	m6A	
guanosine	G	284,0990
7-méthylguanosine	m7G	298,1147

Tableau 38 : Rapports m/z des espèces protonées attendues dans le mélange commercial de nucléosides modifiés.

La Figure 99 présente la somme des 9 EIC correspondants au rapport m/z des espèces protonées attendues dans le mélange commercial (Tableau 38). Les EIC sont réalisés avec une fenêtre de 10 ppm (± 5 ppm). La méthode chromatographique permet la séparation des nucléosides modifiés en moins de 10 minutes. Cependant, le chromatogramme ne laisse apparaître que 11 pics chromatographiques ce qui indique la présence de 3 co-élutions totales. Quatre co-élutions partielles sont également visibles.

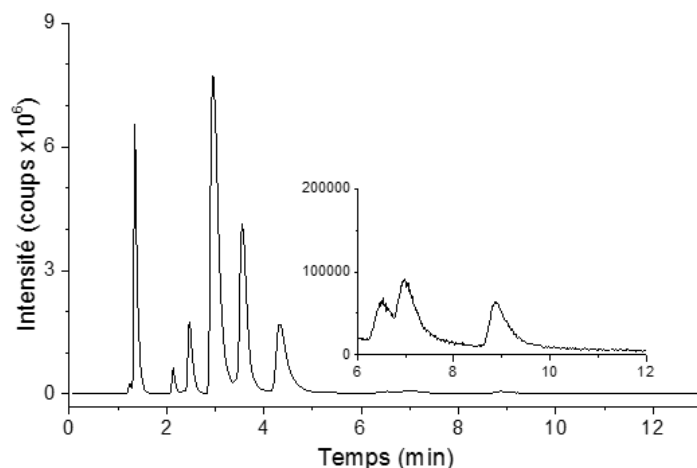


Figure 99 : Somme des EIC correspondants aux espèces protonées dans le mélange commercial (SFC).

L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution tolère certaines co-élutions, du moment où elle ne concerne pas deux isomères.

Afin de visualiser d'éventuelles co-élutions d'isomères, chaque EIC doit être étudié séparément. La Figure 100 rassemble l'ensemble des EIC nécessaires. Chaque pic chromatographique y est numéroté suivant son ordre d'élution dans **(a)**.

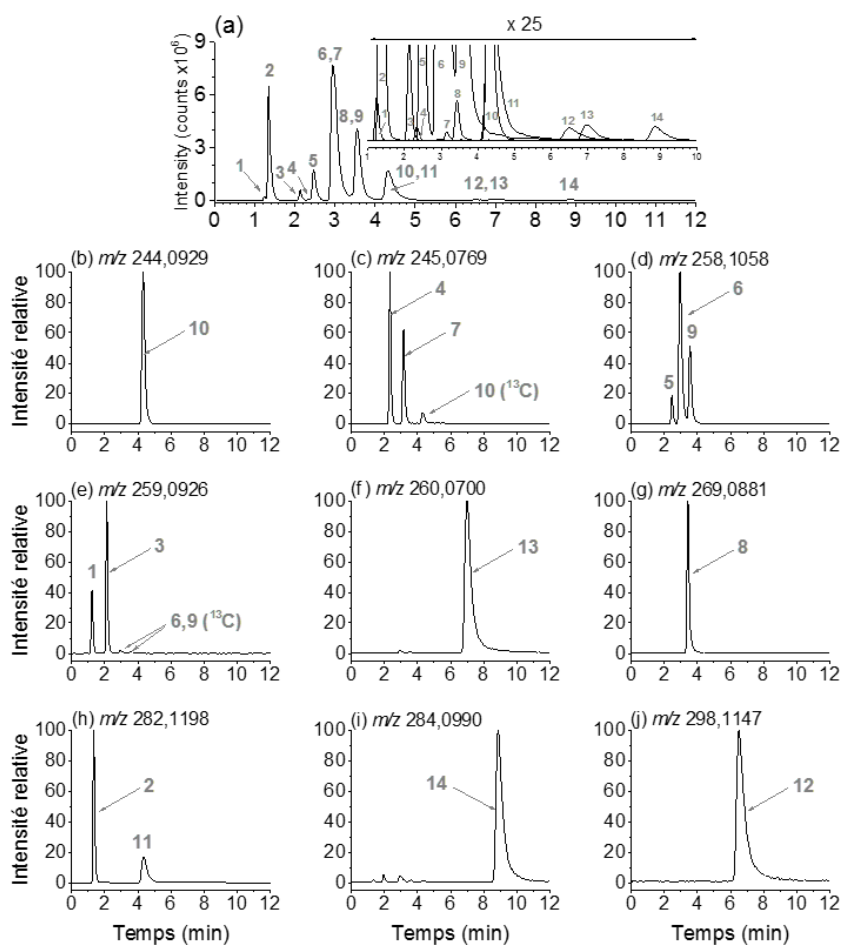


Figure 100 : EIC des ions attendus dans le mélange commercial obtenu par SFC (cf. Tableau 38). (a) somme des 11 extractions. (b) cytidine. (c) uridine/pseudouridine. (d) cytidines méthylées. (e) uridines méthylées. (f) 2-thiocytine. (g) inosine. (h) adénosines méthylées. (i) guanosine. (j) 7-methylguanosine

Les chromatogrammes **(b)**, **(f)**, **(g)**, **(i)** et **(j)** permettent de mesurer sans ambiguïté possible les temps de rétention pour **C** (4,3 min), **s2C** (7,0 min), **I** (3,4 min), **G** (8,9 min) et **m7G** (6,5 min). Les autres chromatogrammes méritent d'être étudiés au cas par cas.

- **Chromatogramme (c)** : Le rapport m/z 245,0769 correspond à l'uridine et à la pseudouridine. Ces deux nucléosides sont effectivement des constituants du mélange. Deux pics chromatographiques sont par conséquent attendus sur cet EIC. Cependant, le chromatogramme laisse apparaître un pic supplémentaire. Les temps de rétention obtenus sont 2,3 min **(4)**, 3,2 min **(7)** et 4,3 min **(10)**. Le dernier pic **(10)** est nettement moins intense que les deux autres. L'étude du spectre de masse associé au pic chromatographique (Figure 101**(c)**) permet d'identifier rapidement l'origine du signal comme étant la contribution isotopique de la cytidine (m/z 244,0929). Cette observation est également confirmée par le temps de rétention (4,3 min) correspondant à celui obtenu en **(b)**. La spectrométrie de masse permet de distinguer **U** et **Y** puisque **U** se fragmente en source en perdant le ribose. L'ion m/z 113,0345 ($\Delta = -5,3$ ppm) est présent dans le spectre du 1^{er} pic chromatographique uniquement (Figure 101**(a)**), ce qui permet d'identifier **U** (2,3 min **(4)**). Par déduction, le temps de rétention de **Y** est donc de 3,2 min **(7)**.

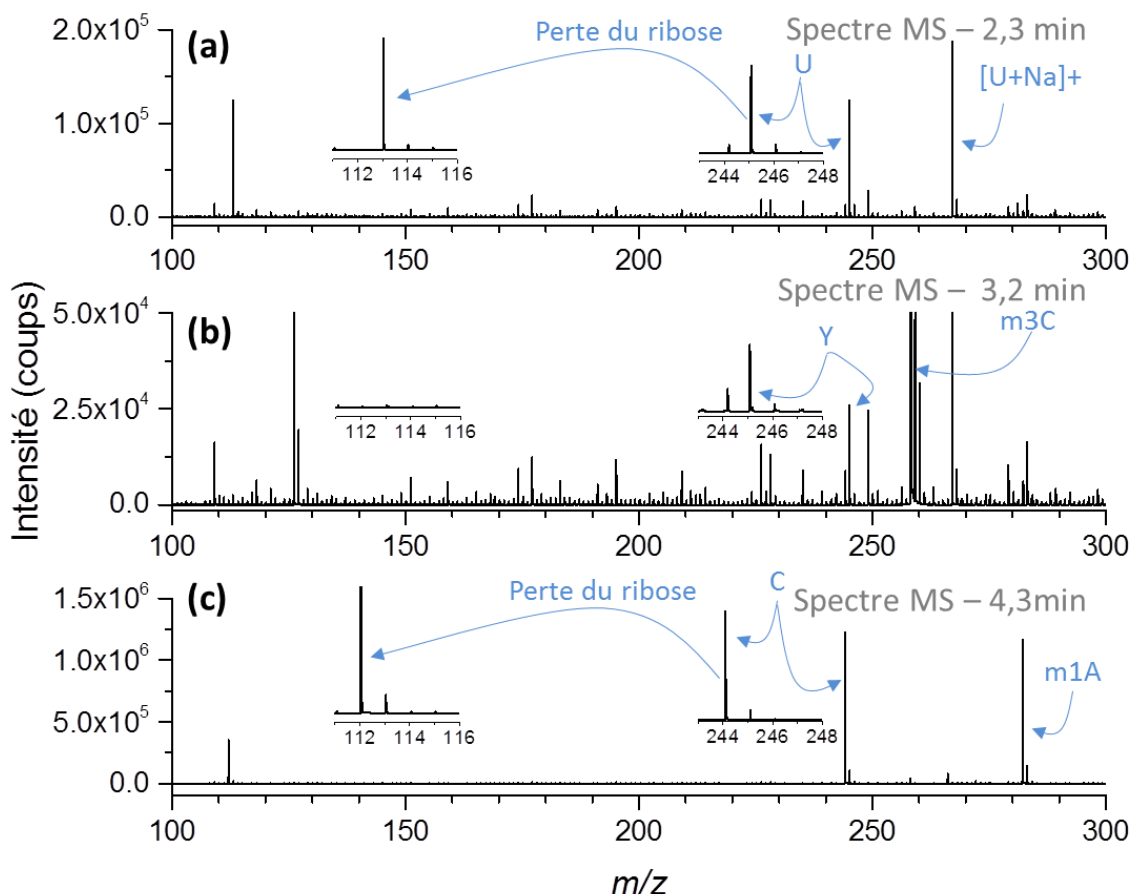


Figure 101 : Spectre MS correspondant aux 3 pics chromatographiques du chromatogramme présenté en Figure 100(c).

- **Chromatogramme (d)** : Le rapport m/z 258,1058 correspond aux cytidines méthylées. L'EIC laisse apparaître 3 pics chromatographiques comme attendus (**m3C**, **m5C** et **Cm**). Les temps de rétention observés sont 2,5 min **(5)**, 3,0 min **(6)** et 3,6 min **(9)**. Grâce à la fragmentation en source, il est possible de distinguer **Cm** des deux autres composés. En effet, pour **Cm**, la

méthylation est portée par la position 2'-O du sucre. L'ion correspondant à la perte du sucre (cf. section 2.3) aura un rapport m/z de 112 (cytosine protonée) alors des **m3C** et **m5C** afficheront un ion à m/z 126 (cytosine méthylée protonée). Expérimentalement, le spectre de masse du pic **(5)** contient un ion à m/z 112,0506 (cytosine protonée, $\Delta = 4,5$ ppm), ce qui permet de l'identifier comme étant **Cm** (Figure 102(a)). Les spectres de masse de **(6)** et **(9)** portent eux aussi le signal correspondant à la perte du ribose avec l'ion à m/z 126,0663 ($\Delta = -3,2$ ppm) (Figure 102(b)(c)). La spectrométrie de masse simple ne permet pas de différencier **m3C** et **m5C**. L'injection d'un des deux isomères est par conséquent nécessaire pour déterminer les temps de rétention de chacun. Le chromatogramme obtenu suite à l'injection d'une solution de **m5C** est présenté en Figure 103. Il permet d'attribuer le pic **(9)** à **m5C** et par déduction le pic **(6)** à **m3C**.

Remarque : Il est intéressant de noter que les méthylcytidines ne fournissent pas tous le même type de signal MS. En effet, **Cm** et **m5C** forment le dimère $[2M+H]^+$ avec une intensité comparable au monomère $[M+H]^+$ (Figure 102). **m3C** forme uniquement $[M+H]^+$. Au cas où des études quantitatives seraient envisagées, il s'avérerait donc nécessaire de ne pas présumer d'une réponse similaire d'une espèce à l'autre et d'effectuer des droites de calibration pour chaque espèce.

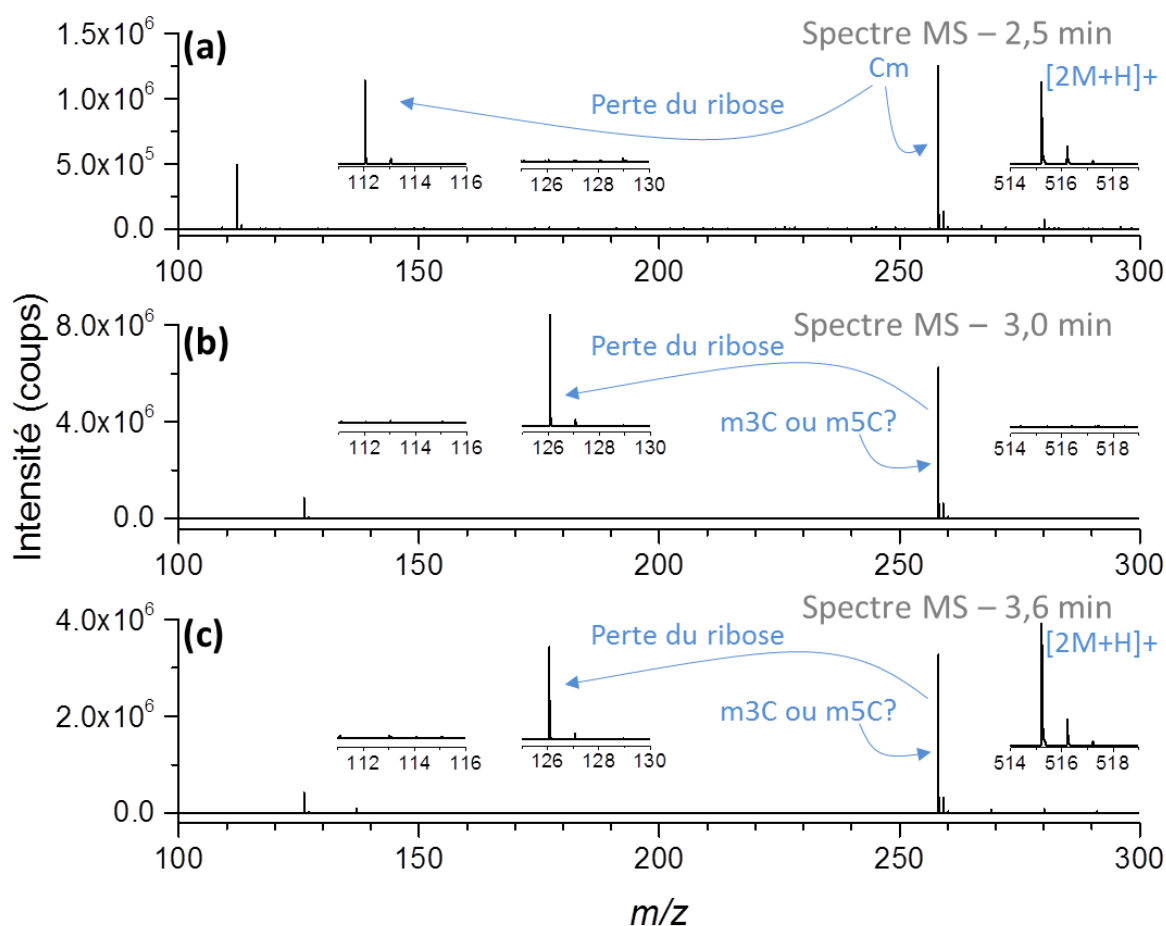


Figure 102 : Spectre MS correspondant aux pics chromatographiques de la Figure 100(d).

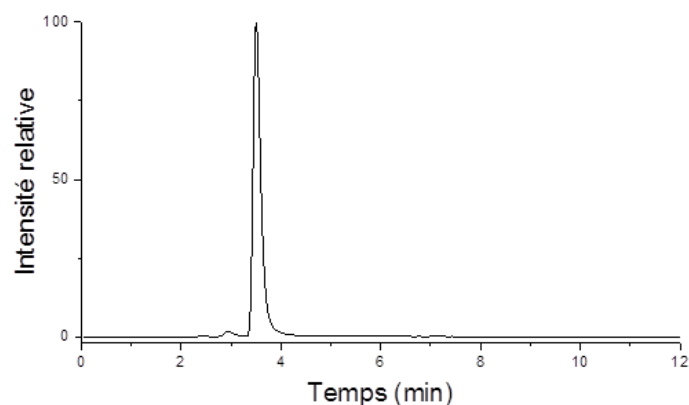


Figure 103 : Chromatogramme SFC, obtenu lors de l'injection du standard de m5C.

- **Chromatogramme (e)** : Le rapport m/z 259,0926 correspond aux uridines méthylées. L'EIC laisse apparaître 4 pics chromatographiques (1,2 min, 2,1 min, 3,0 min et 3,6 min) dont les deux derniers sont largement minoritaires. À nouveau, l'étude des spectres de masse correspondants aux deux pics minoritaires permet d'établir qu'il s'agit des signaux correspondant à la contribution isotopique des pics **(6)** et **(9)**. Les deux uridines méthylées contenues dans le mélange (**m3U** et **m5U**) ne peuvent être discriminées par spectrométrie de masse simple. L'injection d'une solution de **m5U** (Figure 104) permet de connaître le temps de rétention celle-ci (2,1 min, **(3)**) et de déduire celui de **m3U** (1,2 min, **(1)**).

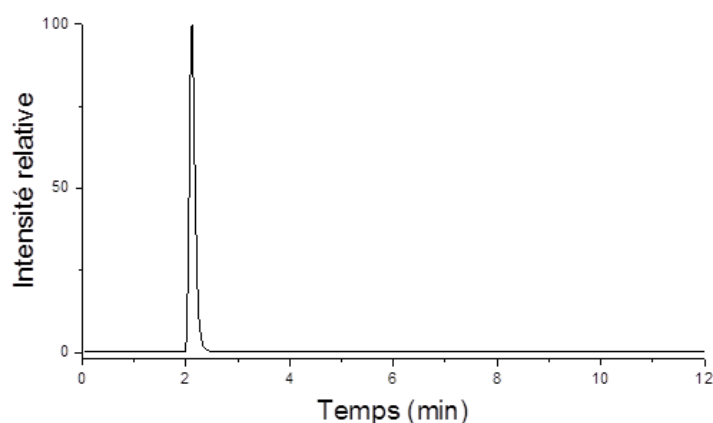


Figure 104 : Chromatogramme SFC obtenu lors de l'injection du standard de m5U.

- **Chromatogramme (h)** : Le rapport m/z 282,1198 correspond aux adénosines méthylées. L'EIC fournit deux pics chromatographiques à 1,3 min **(2)** et 4,4 min **(11)**. Une nouvelle fois, l'emploi d'un standard (Figure 105) permet de distinguer **m6A (2)** de **m1A (11)**.

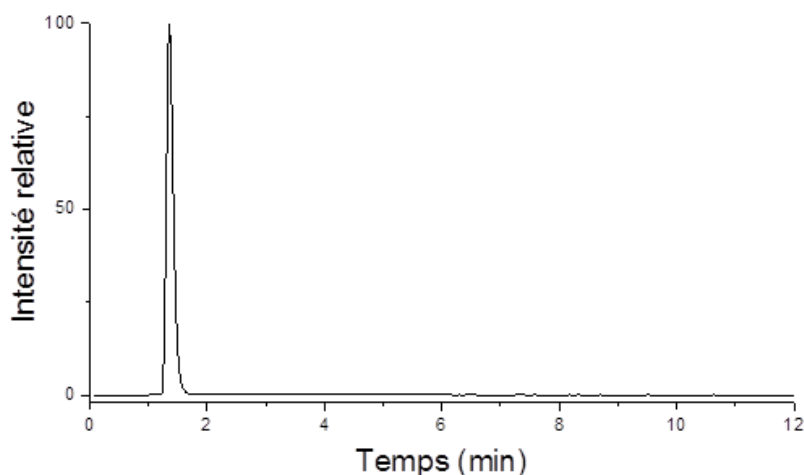


Figure 105 : Chromatogramme SFC obtenu lors de l'injection du standard de m6A.

En conclusion, les résultats montrent que même si la méthode séparative utilisée conduit à des co-élutions, celles-ci sont tout à fait gérables grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse. En effet, aucune co-élution gênante (co-élutions d'isomères) n'a pu être constatée. Dans ces conditions, l'utilisation de standards a permis de déterminer les temps de rétention de l'ensemble des constituants du mélange. Ces temps de rétention sont rappelés dans le Tableau 39.

Numéro de pic	Nom	Abréviation	Temps de rétention
1	3-methyluridine	m3U	1,2 min
2	N6-methyladenosine	m6A	1,3 min
3	5-methyluridine	m5U	2,1 min
4	uridine	U	2,3 min
5	2'-O-methylcytidine	Cm	2,5 min
6	3-methylcytidine	m3C	3,0 min
7	pseudouridine	Y	3,2 min
8	inosine	I	3,4 min
9	5-methylcytidine	m5C	3,6 min
10	cytidine	C	4,3 min
11	1-méthyladénosine	m1A	4,4 min
12	7-méthylguanosine	m7G	6,5 min
13	2-thiocytidine	s2C	7,0 min
14	guanosine	G	8,9 min

Tableau 39 : Temps de rétention obtenu en SFC pour les nucléosides modifiés contenus dans le mélange commercial.

4.2 Estimation des LOD et LOQ

La méthode développée fournit des résultats intéressants en termes de séparation et de temps d'analyse. Il est cependant nécessaire d'évaluer les capacités quantitatives de cette méthode. La gamme de concentration accessible doit être en accord avec les concentrations d'échantillons biologiques d'intérêt.

Plusieurs dilutions du mélange commercial ont été réalisées afin d'estimer les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de ses constituants. La méthode statistique a été utilisée (voir chapitre IIA section 3.6). Onze solutions correspondantes à deux ordres de grandeur de concentrations ont été utilisées.

Remarque : Les valeurs calculées pour les concentrations des solutions filles sont directement dépendantes des valeurs annoncées par le fabricant du mélange commercial. Étant donnée la

présence de 2 nucléosides supplémentaires, les valeurs annoncées paraissent indicatives. Dans ces conditions, il est donc important de souligner le fait que les LOD et LOQ estimées servent uniquement à l'obtention d'un ordre de grandeur afin d'évaluer la pertinence de la méthode développée. Ces valeurs ne pourraient aucunement être utilisées dans le cas d'une étude quantitative. Il conviendrait alors de faire une gamme à partir de standards purs voire d'utiliser des standards marqués (D ou ^{13}C).

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 40. Ils démontrent la bonne répétabilité des temps de rétention ($\text{CV} < 3\%$). L'ensemble des nucléosides a fourni des réponses linéaires sur la gamme de concentration étudiée à l'exception de **U** pour qui les 3 points les plus concentrés n'ont pas été pris en compte dans la régression linéaire servant à l'estimation de la LOD et de la LOQ. **s2C** fournit la meilleure sensibilité avec une LOD estimée à $3,9 \mu\text{mol/L}$ et une LOQ estimée à $11,6 \mu\text{mol/L}$ (soit $3,9$ et $11,6 \text{ pmol}$ injectée). La moins bonne sensibilité est obtenue pour **m5C** avec une LOD estimée à $43,4 \mu\text{mol/L}$ et une LOQ estimée à $131,4 \mu\text{mol/L}$. Ces valeurs de l'ordre de la dizaine de micromolaires sont compatibles avec l'étude d'échantillons biologiques.

Pic	Nucléoside	Tr (min)	RT RSD (%)	Équation	r^2	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)
3	m5U	2,1	0,4	$y = 7288x - 133196$	0,990	43,4	131,4
4	U	2,3	0,5	$y = 3679x + 2986$	0,995	8,8	26,5
5	Cm	2,4	0,4	$y = 146718x + 350867$	0,992	8,2	24,7
6	m3C	2,8	1,4	$y = 343148x - 320798$	0,994	25,2	76,4
7	Y	3,2	0,4	$y = 2985x + 36897$	0,990	10,2	30,8
8	I	3,5	0,3	$y = 14604x + 90335$	0,986	12,8	38,6
9	m5C	3,6	0,4	$y = 234978x + 1799545$	0,990	22,5	68,0
10	C	4,3	0,7	$y = 63702x + 381185$	0,992	11,8	35,7
11	m1A	4,3	1,9	$y = 176918x + 330288$	0,993	10,2	30,7
12	m7G	6	2,9	$y = 16727x + 71805$	0,983	12,6	38,1
13	s2C	6,7	1,6	$y = 35363x + 201367$	0,990	3,9	11,6
14	G	8,9	2,1	$y = 15788x + 110584$	0,975	16,3	49,2

Tableau 40 : Estimation des LOD/LOQ pour les nucléosides annoncés dans le mélange commercial (SFC).

5 Étude d'échantillons biologiques

Afin de confirmer la compatibilité de la sensibilité avec des échantillons biologiques, deux extraits d'ARN transfert (ARNt) ont été étudiés grâce à la méthode mise au point.

Ainsi, les ARNt d'une bactérie (*Escherichia Coli*) et de la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été hydrolysés par Sylvie Auxilien (I2BC, Gif-sur-Yvette) suivant le protocole présenté dans la section 2.2. Les hydrolysats ont ensuite été directement injectés sur la méthode SFC-HRMS.

5.1 Comparaison de deux échantillons

Les deux échantillons biologiques ont fourni des réponses tout à fait satisfaisantes. En outre, grâce à la méthode développée, des différences de composition peuvent facilement être mises en évidence en moins de 15 min. La Figure 106 illustre par exemple le fait que les ARNt de *E. Coli* et de levure de boulanger sont tous les deux porteurs de cytidines méthylées (**Cm**, **m3C** et **m5C**). Il est aussi possible de mettre en évidence que le taux de méthylation de la position 3 est plus élevé pour l'ARN de *E. Coli* que pour celui de la levure.

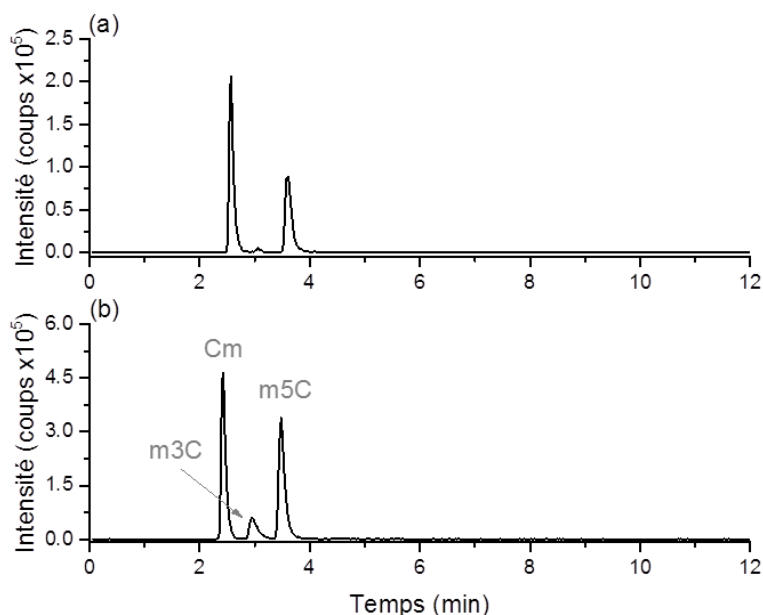


Figure 106 : EIC correspondants aux cytidines méthylées (m/z 258,1058) dans les ARNt d'*E. Coli* (a) et de levure de boulanger (b).

De la même manière, la Figure 107 représente les EIC correspondants aux méthylations portées par les uridines. Ces résultats montrent que la proportion de méthylation en position 3 est plus importante dans la levure par rapport la bactérie. Le chromatogramme (a) présente également un troisième pic chromatographique qui pourrait être attribué à une pseudouridine méthylée mais dont l'attribution nécessiterait l'injection d'un standard.

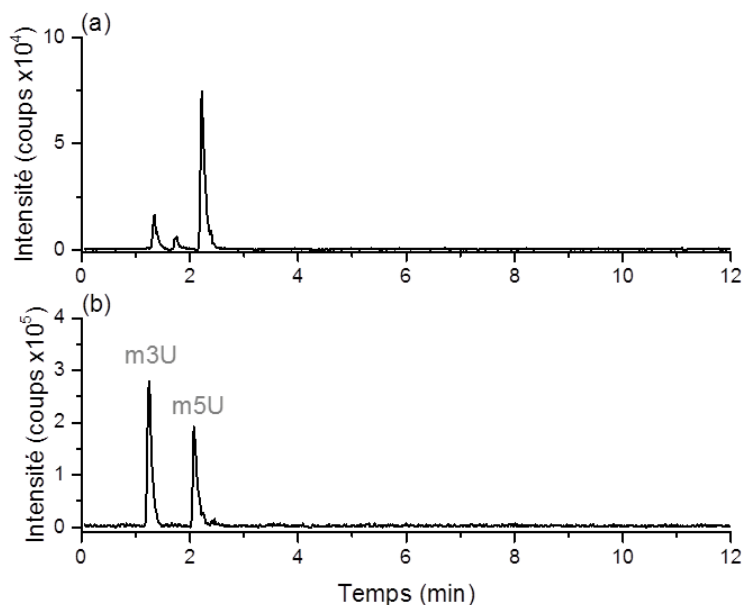


Figure 107 : EIC correspondants aux uridines méthylées (m/z 259,0926) dans les ARNt d'*E. Coli* (a) et de levure de boulanger (b).

La Figure 108 présente les EIC correspondants aux signaux des méthylations fixées sur les adénosines (m/z 282,1198). Pour ce dernier exemple, les EIC sont totalement différents d'un organisme à l'autre. En effet, dans *E. Coli* les méthylations se trouvent majoritairement sur les positions 6 et 2 de la base alors que l'ARNt de la levure porte des méthylation en position 2'-O du sucre et en position 1 de la base.

Remarque : l'attribution du pic de **Am** a été réalisée à l'aide d'un standard. Celles de **m1A** et de **m6A** ont préalablement été effectuées lors de l'étude du mélange commercial. L'attribution de **m2A** est quant à elle une déduction puisqu'il s'agit de la dernière méthylation de l'adénosine décrite dans la base MODOMICS⁵⁵.

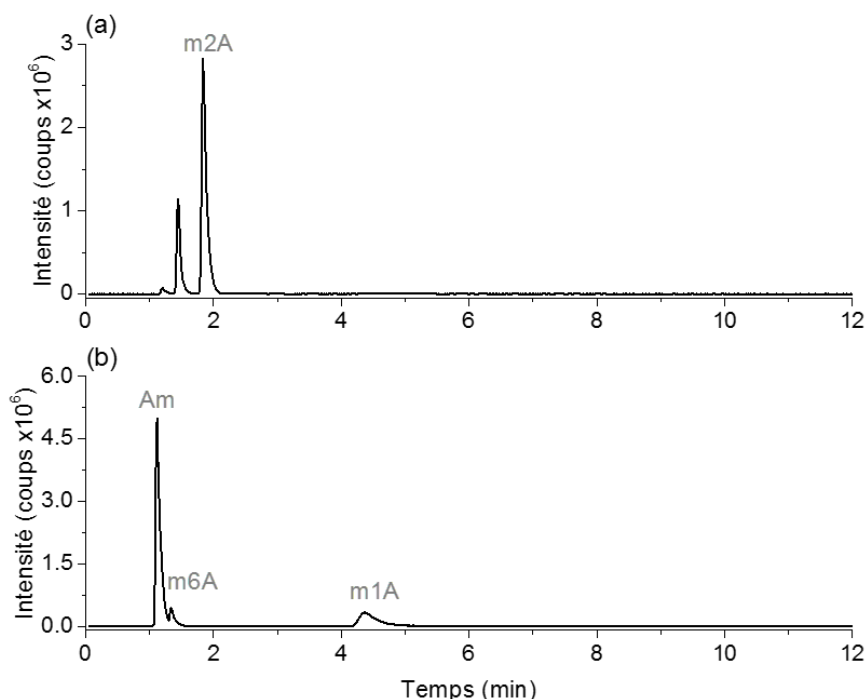


Figure 108 : EIC correspondants aux adénosines méthylées (m/z 282,1198) dans les ARN, d'*E. Coli* (a) et de levure de boulanger (b).

Ces deux résultats illustrent l'intérêt de la méthode mise au point pour le suivi des taux de modifications des ARN. Outre la comparaison de deux échantillons totalement différents, comme celle réalisée ici, et qui présente peu d'intérêt biologiquement parlant, cette méthode pourrait tout à fait permettre le suivi des modifications portées par l'ARN d'organismes identiques soumis à différents stress afin de visualiser les modifications post-transcriptionnelles qu'ils induisent.

5.2 Étude qualitative de *E. Coli*

Une étude qualitative visant à rechercher toutes les modifications portées par l'ARNt d'*E. Coli* a été réalisée. Pour y parvenir, un traitement manuel des données a été effectué après l'injection de l'hydrolysate sur la méthode SFC-HRMS. L'EIC correspondant à chaque nucléoside modifié précédemment identifié dans un échantillon comparable [Russell S. 2013] a été étudié.

Lorsque qu'un ou plusieurs pics chromatographiques étaient présents sur un EIC, le spectre de masse correspondant a été étudié afin de confirmer la présence d'un ion au bon rapport m/z . Plusieurs niveaux d'identification ont par la suite été définis :

- Le nucléoside modifié est dit « identifié » lorsque la masse exacte correspondante a été détectée et qu'un standard était disponible au laboratoire pour confirmer le temps de rétention obtenu.
- Le nucléoside modifié est dit « annoté » lorsque la masse exacte correspondante a été détectée et qu'aucun isomère n'est décrit dans la base ou lorsque la fragmentation en source permet de discriminer deux isomères sans ambiguïté.

⁵⁵ <http://modomics.genesilico.pl/> (consulté en janvier 2017)

- Le nucléoside modifié est dit « à confirmer » lorsque la masse exacte correspondante a été détectée mais que plusieurs isomères coexistent dans la base de données sans possibilité de distinction par spectrométrie de masse simple.

Ainsi, 15 nucléosides (**C, Y, U, Cm, m3C, m5C, m3U, m5U, s2C, A, I, m6A, G, m7G** et **Gm**) ont ainsi pu être identifiés sans ambiguïté. Six autres (**D, m2A, Am, ac4C, i6A** et **ms2i6A**) ont pu être annotés. Enfin 5 nucléosides sont à classer dans la catégorie à confirmer (**Ym, Um, m1Y** ou **m3Y** (1 seul pic); **hm6A, m1G** ou **m2G** (3 pics); **hn6A** ou **m6t6A** (1 seul pic)).

À titre de comparaison, le même échantillon a été analysé avec le système HPLC-HRMS présenté dans la section 2.4. Cette analyse a permis l'annotation de 7 nucléosides supplémentaires (**s4U, mnm5s2U, cmo5U, acp3U** ou **cmnm5Um** (1 seul pic), **k2C, QtRNA** et **t6A**) non observés avec la méthode SFC-HRMS. Cependant 2 espèces sont observées uniquement en SFC (un des isomères de la méthylguanosine (tr 2,2 min) et **m3U**).

L'ensemble de ces observations est compilé dans le Tableau 41. Il semble que les nucléosides ayant un rapport m/z supérieur à 300 sont moins bien détectés avec la méthode SFC-HRMS.

Quelques pistes ont été brièvement explorées, notamment l'influence du log P afin de tenter d'expliquer les différences de réponse sans parvenir à dégager la moindre tendance.

				Temps de rétention (min)	
				LC	SFC
<u>name</u>	<u>short_name</u>	[M+H] ⁺	[B+2H] ⁺		
cytidine	C	244,0929	112,0506	2,5	4,3
pseudouridine	Y	245,0769	-	3,8	3,2
uridine	U	245,0769	113,0346	2,6	2,4
dihydrouridine	D	247,0926	115,0502	1,9	2,0
2'-O-méthylcytidine	Cm	258,1085	112,0506	6,9	2,5
3-méthylcytidine	m3C	258,1085	126,0662	3,6	3,0
5-méthylcytidine	m5C	258,1085	126,0662	5,2	3,5
2'-O-méthylpseudouridine	Ym	259,0926	-	5,7	1,7
2'-O-méthyluridine	Um		113,0346		
1-méthylpseudouridine	m1Y		-		
3-méthylpseudouridine	m3Y		-		
3-méthyluridine	m3U	259,0926	127,0502		1,3
5-méthyluridine	m5U	259,0926	127,0502	8,9	2,1
2-thiocytidine	s2C	260,0700	128,0277	4,0	6,7
4-thiouridine	s4U	261,0541	129,0117	11,3	
adénosine	A	268,1041	136,0618	15,9	2,1
inosine	I	269,0881	137,0458	8,5	3,5
2-méthyladénosine	m2A	282,1198	150,0774	20,3	1,8
2'-O-méthyladénosine	Am	282,1198	136,0618	18,5	1,2
N6-méthyladénosine	m6A	282,1198	150,0774	20,7	1,4
guanosine	G	284,0990	152,0567	8,28	8,4
N4-acétylcytidine	ac4C	286,1035	154,0611	15	1,8
N6-hydroxyméthyladénosine	hm6A, m1G or m2G	298,1147	166,0724		2,2
1-méthylguanosine				14,6	4
N2-méthylguanosine				15,3	7,5
7-méthylguanosine	m7G	298,1147	166,0724	6,8	6,4
2'-O-méthylguanosine	Gm	298,1147	152,0567	14,4	4,1
5-méthylaminométhyl-2-thiouridine	mnm5s2U	304,0963	172,0540	5,1	
uridine 5-oxyacetic acid	cmo5U	319,0773	187,0350	2,7	
N6-isopentenyladénosine	i6A	336,1667	204,1244	34,1	1,0
3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine	acp3U	346,1246	241,0823	3,1	
5-carboxyméthylaminométhyl-2'-O-méthyluridine	cmnm5Um		200,0666		
2-lysidine	k2C	372,1879	240,1456	13,8	
2-méthylthio-N6-isopentenyladénosine	ms2i6A	382,1545	250,1122	36,9	1,2
quenosine	QtrNA	410,1672	278,1248	13,5	
N6-thréonylcarbamoyladénosine	t6A	413,1417	281,0993	19,0	
N6-hydroxynorvalylcarbamoyladénosine	hn6A or m6t6A	427,1573	295,1150	27,8	2,1
N6-méthyl-N6-thréonylcarbamoyladénosine					

Tableau 41 : Nucléosides détectés dans *E. Coli* grâce à la SFC-HRMS et à la HPLC-HRMS. En vert les nucléosides identifiés. En jaune les nucléosides annotés. En orange les nucléosides à confirmer. En rouge les nucléosides non détectés.

Pour finir, une recherche exhaustive de tous les nucléosides modifiés présents dans la base de données MODOMICS a été initiée en SFC et en LC. Ces résultats préliminaires tendent à confirmer les observations précédentes : contrairement à la méthode SFC-HRMS, la méthode HPLC-HRMS permet la détection d'une vingtaine de nucléosides supplémentaires avec un niveau de certitude faible « à confirmer ».

6 Conclusions

Lors de ce projet, une méthode SFC-HRMS permettant l'étude des modifications portées par les nucléosides a été mise au point à l'aide de standards purs ou en mélange. Cette expérience a notamment permis au laboratoire d'acquérir un savoir-faire portant sur la séparation de composé polaires par SFC.

Malgré la présence de plusieurs co-élutions, la SFC a permis la séparation, en moins de 15 min, de tous les isomères rencontrés lors de ce projet. C'est ainsi que la méthode proposée permet l'identification de l'ensemble des constituants d'un mélange commercial contenant les nucléosides modifiés principalement étudiés aujourd'hui. De plus, l'estimation de la sensibilité permet d'envisager une utilisation sur de véritables échantillons.

L'étude comparative de deux échantillons biologiques (ARNt d'*E. Coli* et ARNt de levure de boulanger) permet de démontrer que la SFC peut réellement avoir sa place parmi les outils utilisés dans le cadre d'études épigénétiques. En effet, elle permet la comparaison rapide des profils de modification d'un ARN et pourrait parfaitement être utilisée dans le but d'observer les effets sur les modifications post-transcriptionnelles induites par différents stress sur un même organisme vivant.

Néanmoins, la méthode développée montre certaines limites lorsque qu'une recherche exhaustive de modifications est entreprise. En effet, l'étude approfondie par SFC des modifications présentes dans l'échantillon d'ARNt de la bactérie ne permet pas de mettre en évidence autant de modifications que lorsque l'approche HPLC-HRMS est utilisée. Notre outil paraît donc moins adapté à ce type de recherche.

Une fois de plus, la SFC vient en complément de la HPLC. Bien que moins complète, l'approche utilisant la SFC propose un temps d'analyse 4 fois plus court que celui proposé en HPLC. Cet avantage considérable ne demande qu'à être exploité dans le cadre de comparaison de profils de certaines modifications. Cependant, la chromatographie en phase liquide semble beaucoup plus adaptée dès lors qu'une étude plus globale est nécessaire, visant par exemple à lister toutes les modifications détectables sur un ARN, et notamment pour les modifications avec un rapport m/z de plus de 300.

Afin de visualiser les modifications conduisant à des m/z supérieurs à 300, il pourrait être intéressant de s'attarder de nouveau sur le développement de méthode en utilisant un mélange qui contient ce type de molécules. En outre, il serait intéressant de mettre en place une méthodologie utilisant les capacités de spectrométrie de masse tandem de notre instrument. En effet, ce type d'approche, en complément de l'exploitation des données de fragmentation en source, permettrait certainement de discriminer certains isomères en l'absence de l'utilisation de standards. Un mode d'acquisition dit « *data dependent* » serait dans ce cas particulièrement adapté pour des études non ciblées.

7 Références

A.

[Ashraf-Khorassani M. 2010] Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. *J. Sep. Sci.* 2010; 33:1682.

B.

[Berger T.A. 2015] Berger T. A., *Supercritical Fluid Chromatography. Primer.* Agilent Technologies. 2015.

[Bou-Nacer C. 2015] Bou-Nader C., Pecqueur L., Bregeon D., Kamah A., Guerineau V., Golinelli-Pimpaneau B., Guimaraes B.G., Fontecave M., Hamdane D. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:9446.

[Dahm R. 2005] Dahm R. *Developmental Biology.* 2005; 278:274.

G.

[Grand-Guillaume Perrenoud A. 2012] Grand-Guillaume Perrenoud A., Boccard J., Veuthey J.-L., Guillarme D. *J. Chromatogr. A.* 2012; 1262:205.

[Grand-Guillaume Perrenoud A. 2014] Grand-Guillaume Perrenoud A., Veuthey J.-L., Guillarme D. *J. Chromatogr. A.* 2014; 1339:174.

H.

[Hamdane D. 2014] Hamdane D., Guelorget A., Guerineau V., Golinelli-Pimpaneau B. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42:11697.

[Hopper A.K. 2013] Hopper A.,K. *Genetics.* 2013; 194:43.

[Huang Y. 2017] Huang Y., Zhanga T., Zhao Y., Zhou H., Tanga G., Filleta M., Crommena J., Jianga Z. *J. Chromatogr. A.* 2017 In press.

J.

[Jia G. 2011] Jia G., Fu Y., Zhao X., Dai Q., Zheng C., Yang Y., Yi C., Lindahl T., Pan T., Yang Y.-G., He C. *Nature Cham. Biol.* 2011; 7:885.

K.

[Kirino Y. 2004] Kirino Y., Yasukawa T., Ohta S., Akira S., Ishihara K., Watanabe K., Suzuki T. *PNAS.* 2004; 101:15070.

L.

[Leontis B.N. 2002] Leontins N.B., Stombaugh J., Westhof E. *Nucleic Acids Res;* 2002; 30:3497.

M.

[Machnicka M. 2013] Machnicka M.A., Milanowska K., Osman Oglou O., Purta E., Kurkowska M., Olchowik A., Januszewski W., Kalinowski S., Dunin-Horkawicz S., Rother K.M., Helm M., Bujnicki J.M., Grosjean H. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:Database issue D263.

[Macon J. 1968] Macon J., Woldenden R. *Biochem.* 1968; 7:3453.

N.

[Novakova L. 2014] Nováková L., Grand-Guillaume Perrenoud A., François I., West C., Lesellier E., Guillaume D. *Analytica Chimica Acta*. 2014; 824:18.

P.

[Pomerantz S. 1990] Pomerantz S.C, McCloskey J.A. *Meth. Enzymol.* 1990; 193:796.

R.

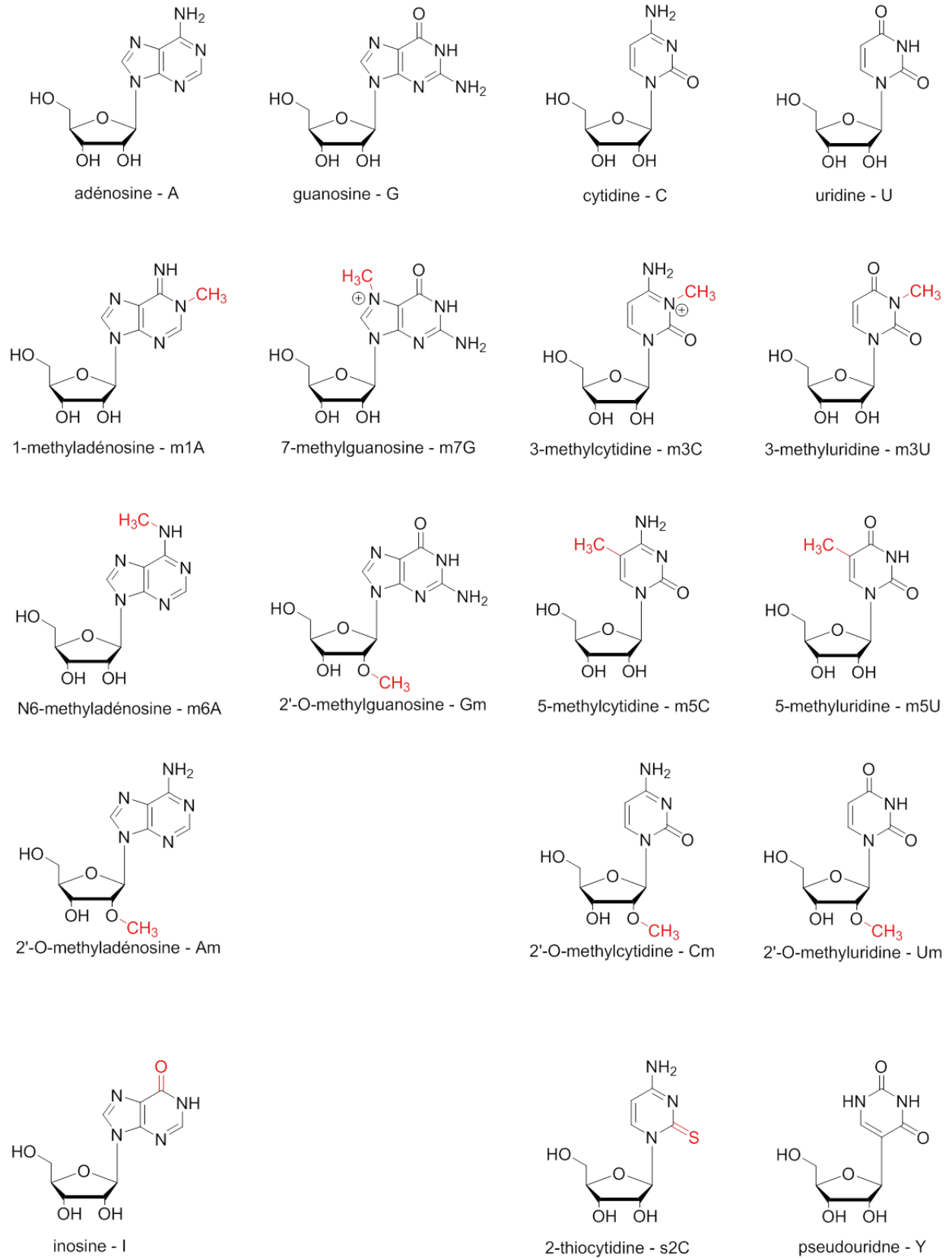
[Reece J. 2012] Reece J., Urry L., Cain M., Wasserman S., Minorsky P., Jackson R. *Campbell Biology*. Pearson Education. 4^{ème} édition, Version Française. 2012.

[Russel S. 2013] Russel S., Limbach P.A. *J. Chromatogr. B*. 2013; 923:74.

W.

[West C. 2013] West C. *Chromatography Today*. 2013; 6:22.

8 Annexes



Annexe 1 : Structures des nucléosides modifiés présents dans le mélange commercial ou utilisés comme standard.

CHAPITRE IV

Analyse d'extraits lipidiques par SFC-HRMS

Mise en place d'une méthode de séparation par classe
lipidique

Plan du chapitre

1	Introduction	187
2	Stratégies analytiques pour l'étude de lipides	190
2.1	Introduction directe	190
2.2	Couplages avec la chromatographie en phase liquide	190
2.2.1	La séparation des lipides par classe par NPLC.....	191
2.2.2	La séparation des lipides par espèce par RPLC.....	192
2.2.3	Séparation par classe puis par espèce grâce à la LC bidimensionnelle.....	193
2.3	Couplages avec la chromatographie en phase supercritique	195
2.3.1	Exemples tirés de la littérature	195
2.3.2	État de l'art dans notre laboratoire.....	198
3	Mise au point d'une seconde méthode de séparation des classes lipidiques	199
3.1	Matériels et méthodes	200
3.1.1	Les standards.....	200
3.1.2	Extrait lipidique de plasma humain.....	200
3.1.3	Colonnes chromatographiques	200
3.1.4	Appareillage.....	201
3.2	Criblage de colonnes	202
3.3	Vérification de la séparation par classe	209
3.4	Les tests d'optimisations	212
3.4.1	Influence de composition de phase mobile	212
3.4.2	Influence de l'additif.....	212
3.4.3	Influence de la température du four à colonne	212
3.4.4	Méthode finale	213
3.4.5	Mise en place de la nouvelle interface de couplage SFC-MS	213
4	Conclusion	216
5	Références.....	219
6	Annexe 1 : Structure des standards	221

Table des Figures

Figure 109 : Répartition des lipides répertoriés dans la base de données du consortium LIPIDMAPS dans chacune des 8 familles lipidiques au 1/09/17.....	187
Figure 110 : Exemples d'espèce pour chacune des familles lipidiques.....	188
Figure 111 : Illustration schématique de l'organisation des biomolécules dans les membranes cellulaires.....	189
Figure 112 : Répartition des modes chromatographiques rencontrés dans la littérature pour les études de lipidomique.....	191
Figure 113 : Séparation par classe obtenue par NPLC-MS en utilisant une source APCI en mode positif (à gauche) et négatif (à droite).....	191
Figure 114 : Étude de la réponse fournie par différentes sources (ESI, APCI et APPI) pour un extrait lipidique après séparation par NPLC.....	192
Figure 115 : Chromatogramme obtenu avec une source ESI, en mode positif, pour l'étude d'un extrait de plasma humain par UHPLC en phase inverse..	193
Figure 116 : Représentation schématique du système NP/RP 2D-LC..	194
Figure 117 : Chromatogrammes obtenus pour un extrait de plasma humain en NPLC (A) et en NP/RP 2D LC (B).....	194
Figure 118 : Séparation obtenue pour un mélange d'une cinquantaine de standards représentant 14 classes lipidiques.	196
Figure 119 : Influence de la longueur des chaînes d'acides gras et/ou du nombre d'insaturation sur la rétention des TG (A et B) et des PC (C).....	197
Figure 120 : Séparation par classe lipidique d'une mélange de standards, d'après les conditions exposées dans le Tableau 43.....	198
Figure 121 : Séparation des classes de lipides optimisée par Marie Méjean au cours de sa thèse....	199
Figure 122 : Représentation schématique du couplage initial.....	201
Figure 123 : Représentation schématique du nouveau couplage.....	202
Figure 124 : Nouvelle interface SFC-MS.....	202
Figure 125 : Spectre de masse du standard de PC lors de l'utilisation d'une phase mobile contenant de l'ammonium.....	203
Figure 126 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne 2-EP.....	204
Figure 127 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne Si.....	205
Figure 128 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne Hypercarb®.....	206
Figure 129 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne 1-AA.....	207
Figure 130 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne DEA.....	208
Figure 131 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne 2-PIC.....	209
Figure 132 : EIC de plusieurs espèces appartenant à des classes lipidiques apolaires (TG et DG) et polaires (PC et LPC) dans l'extrait lipidique de plasma humain.	210
Figure 133 : BPC entre m/z 750 et 850 pour l'extrait lipidique de plasma humain et spectre de masse correspondants aux PC et aux SM de l'échantillon.	211
Figure 134 : Évolution de la pression maximale mesurée en tête de colonne en fonction de la température du four.	213
Figure 135 : Évolution des aires de pics des TG et CE avec l'ancien et le nouveau couplage. Pour le nouveau couplage, différentes valeurs de contre-pression ont été testées.....	215
Figure 136 : Comparaison des réponses obtenues avec l'ancienne (rouge) et la nouvelle (noir) interface SFC-MS suite à l'injection de l'extrait lipidique de plasma.	215

Figure 137 : Évolution des aires de pics des PC, SM et LPC avec l'ancien et le nouveau couplage.
Pour le nouveau couplage différentes valeurs de contre-pression ont été testées. 216

1 Introduction

Les biomolécules constituant les organismes vivants sont de natures et de tailles variées. Elles sont regroupées en grandes familles telles que les protéines, les sucres ou encore les lipides. Lors de ce projet, notre attention s'est portée sur l'étude des lipides.

Les lipides peuvent être définis par leurs propriétés physico-chimiques ou par leur origine biosynthétique. Les lipides sont des molécules hydrophobes, solubles dans les solvants organiques, insolubles dans l'eau et ayant une densité inférieure à celle de l'eau. Ils proviennent de la condensation d'unités d'isoprène, ou de thioesters. Certaines familles de lipides possèdent une tête polaire à laquelle sont rattachées une ou plusieurs chaînes hydrophobes leur conférant un caractère amphiphile. Cette large définition des lipides laisse place à une très grande diversité structurale.

Le consortium LIPIDMAPS propose une classification des lipides. Ceux-ci sont classés en 8 familles lipidiques principales : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les shingolipides, les stérols, les pré-nols, les saccharolipides et les polycétides. La Figure 109 illustre la répartition de ces quelques 40 000 lipides dans les 8 familles lipidiques. Chaque famille est ensuite divisée en classes [Fahy E. 2009]. Un exemple de structure pour chaque famille est proposé en Figure 110. À ce jour, plus de 40 000 structures de lipides sont référencées par ce consortium⁵⁶.

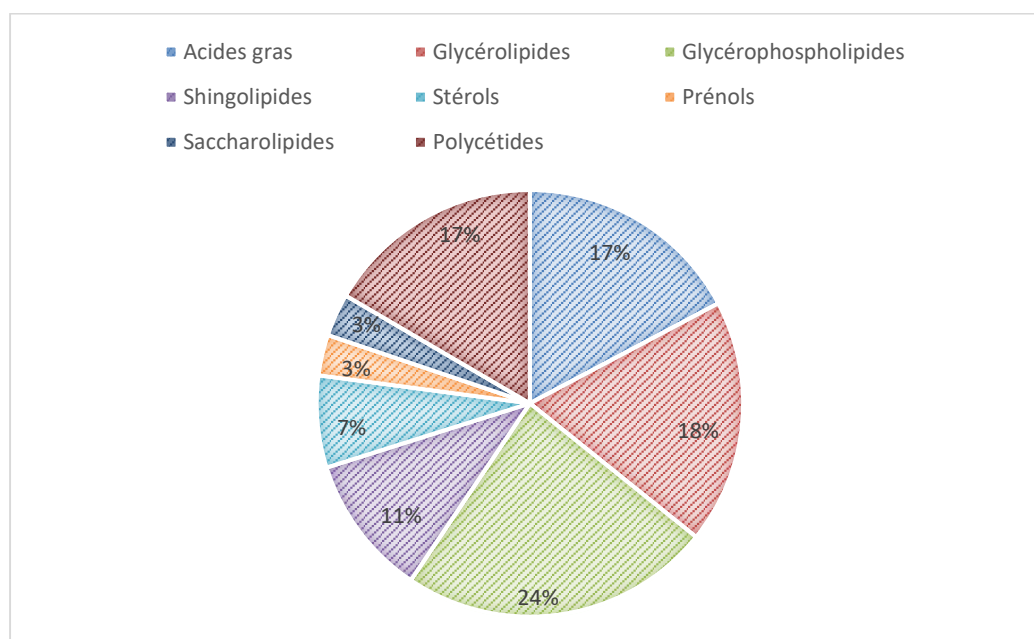


Figure 109 : Répartition des lipides répertoriés dans la base de données du consortium LIPIDMAPS dans chacune des 8 familles lipidiques au 1/09/17.

⁵⁶ Site internet : <http://www.lipidmaps.org> [consulté le 01/09/2017]

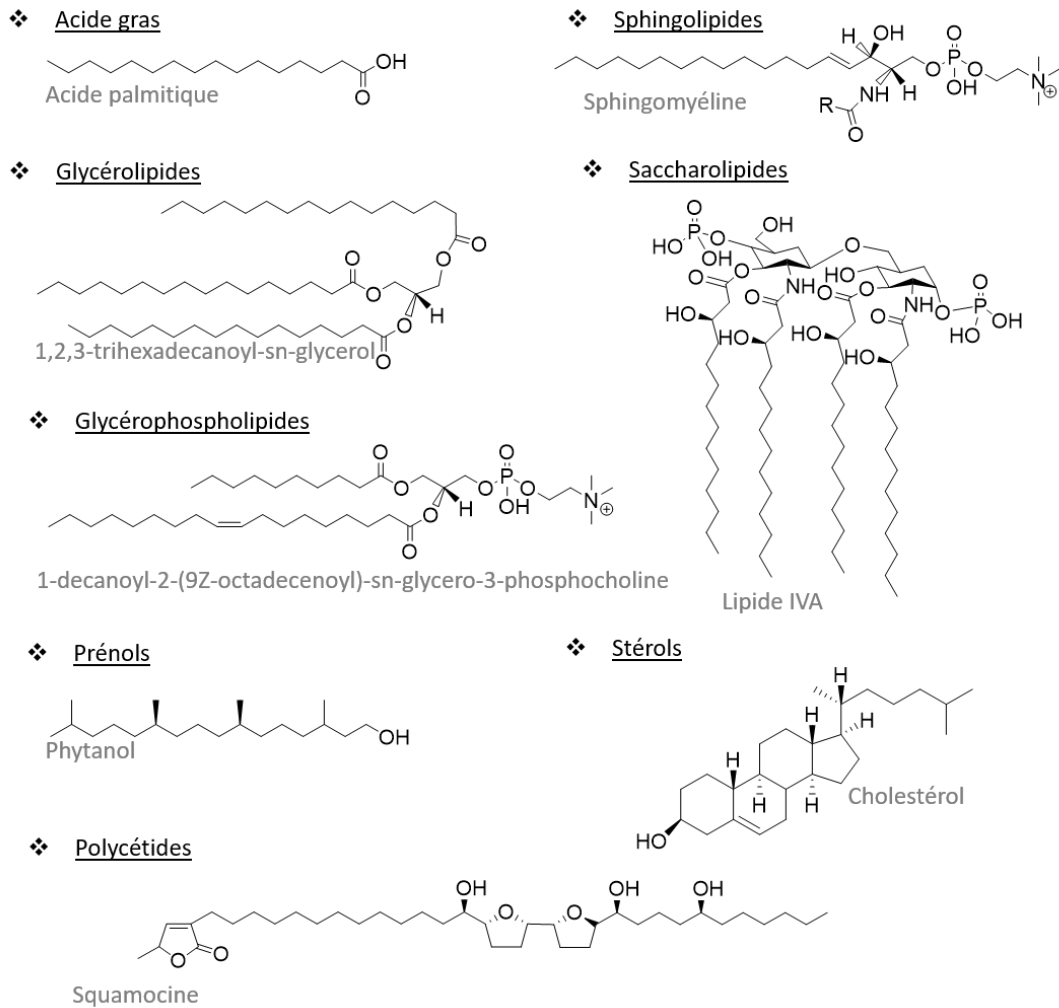


Figure 110 : Exemples d'espèce pour chacune des familles lipidiques.

Toutes les fonctions que peuvent avoir les différents lipides ne sont pour le moment pas totalement explorées [Muro E. 2014].

Plusieurs types de fonctions peuvent être attribués aux lipides dans les organismes vivants. L'une des plus évidentes est la compartimentation des milieux cellulaires. En effet, grâce aux propriétés amphiphiles que possèdent la plupart des lipides, ceux-ci sont capables de s'auto-assembler en bicouches pour former les parois cellulaires. Les têtes polaires d'une couche sont en contact avec le milieu cellulaire et celles de la seconde couche sont en contact avec le milieu extracellulaire. Les chaînes hydrophobes des deux couches sont en regard les unes des autres (Figure 111). Le rayon de courbure de la cellule est influencé par la nature des lipides membranaires qui la constitue [Muro E, 2014].

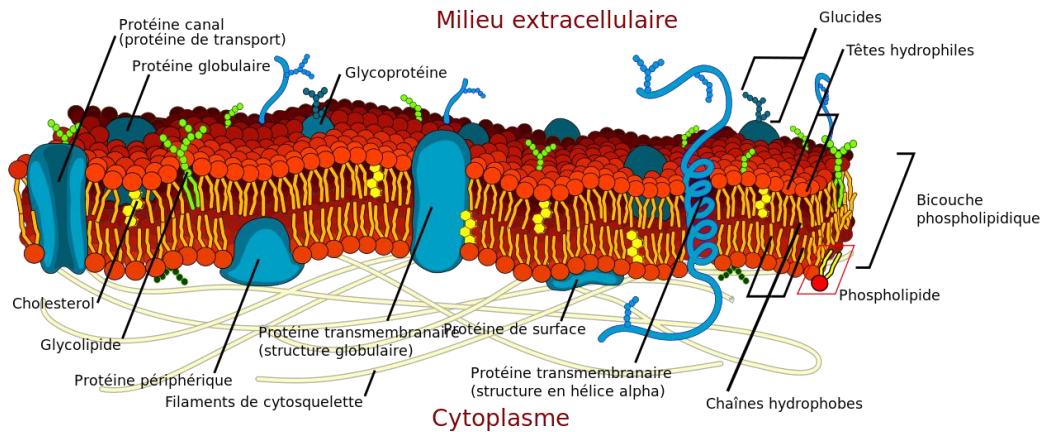


Figure 111 : Illustration schématique de l'organisation des biomolécules dans les membranes cellulaires. Source wikimédia. Auteur : LadyofHats.

Les lipides constituent également une source d'énergie pour l'organisme. Chez les vertébrés, environ 40 % de l'énergie sont apportés par les lipides. Ceux-ci permettent également le stockage de cette énergie. Ainsi, les acides gras apportés par l'alimentation sont transformés en glycérolipides (triglycérides) puis stockés dans les tissus adipeux sous forme de gouttelettes [Beller M. 2010]. Lorsque l'organisme est en carence énergétique (diète, activité sportive), l'action des triglycérides lipases permet la libération d'acides gras et leur utilisation par les cellules.

Certains lipides sont également connus pour leur participation à la signalisation cellulaire (médiateurs extracellulaires, messagers intracellulaires) : c'est la signalisation lipidique. Dans ce cas, le lipide vient se fixer sur une protéine. Cette fixation induit des changements dans les propriétés biologiques de la protéine hôte. Cependant, les lipides servant à la signalisation sont particulièrement difficiles à tracer compte tenu de la surabondance de lipides dans les organismes [Wymann M.P. 2008].

Enfin, étant directement exposés aux contenus intra et extra cellulaires, les lipides peuvent être modifiés quand ces milieux sont perturbés par une pathologie. L'observation de variation dans la composition du lipidome peut alors être un moyen indirect d'observer les dysfonctionnements des organismes. Le lipide devient alors un biomarqueur [Stephenson D. 2017].

C'est dans ce contexte que notre laboratoire cherche à développer des outils analytiques permettant dans un premier temps l'analyse qualitative de lipides. En collaboration avec Benoit Colsch (CEA Saclay), notre étude se concentre sur la mise au point d'une méthode de séparation par classe utilisant la chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. Le travail présenté ici est le fruit de plusieurs étudiants. Il a été initié par Marie Méjean au cours de sa thèse. J'ai ensuite poursuivi ce projet auquel Stéphanie Boutet-Mercey (stage de M2, Master IMAM, Université Paris Saclay) et Carlos Rincon (stage de M2, Master Sciences du médicament, Université Paris Saclay) ont également contribué, et pour lesquels j'ai participé activement à l'encadrement.

2 Stratégies analytiques pour l'étude de lipides

Plusieurs stratégies analytiques permettent l'étude des lipides. Dans tous les cas, la détection et l'identification se font grâce à un spectromètre de masse dès lors qu'une information structurale est recherchée. Deux stratégies sont alors envisagées : l'introduction directe ou l'utilisation d'une méthode séparative en amont du spectromètre de masse.

2.1 Introduction directe

À l'instar des autres applications développées dans ce manuscrit, l'utilisation de la spectrométrie de masse est possible sans dimension séparative en amont. La première étude de lipidomique par introduction directe a été publiée par Han *et al.* et est basée sur l'utilisation d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle [Han X.L. 1994]. Cette stratégie, dite *shotgun*, permet d'obtenir un spectre MS global de l'échantillon en un temps très court. Lorsqu'elle est automatisée, elle permet l'analyse de plusieurs centaines d'échantillons par jour. Elle est très intéressante lors de la recherche de biomarqueurs de maladie dans des cohortes de patients [Anand S. 2016 ; Gonzalez-Dominguez R. 2014].

Néanmoins, cette technique possède quelques limitations telles que l'absence de discrimination entre deux isomères, la présence de phénomènes de suppression d'ions pour les lipides minoritaires ainsi que la superposition des contributions isotopiques. Ce type d'approches nécessite obligatoirement l'utilisation de logiciels de retraitement des données (déconvolution des contributions isotopiques) afin de procéder à des identifications et bénéficier des performances des appareils très haute résolution de dernière génération.

2.2 Couplages avec la chromatographie en phase liquide

Compte tenu de la complexité des extraits lipidiques, une séparation chromatographique est souvent utile à la détection d'un maximum d'espèces. Le recours aux méthodes séparatives permet de limiter les phénomènes de suppression d'ions et de distinguer les isomères, au détriment du temps d'analyse qui augmente significativement. Plusieurs techniques chromatographiques ont fait leurs preuves pour la séparation des lipides. La littérature propose des exemples utilisant la chromatographie sur couche mince (TLC) [White T. 1998], la chromatographie en phase gazeuse (GC) [Gutnikov G.J. 1995], la chromatographie liquide en phase normale et en phase inverse [Deschamps F.S. 2001 ; Vernooij E.A.M. 2002] et la chromatographie en phase supercritique [Bamba T. 2008]. Cependant, le couplage de la chromatographie sur couche mince avec la spectrométrie de masse est peu répandu et l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse demande une préparation d'échantillon fastidieuse (dérivatisation des lipides polaires afin de les rendre plus volatils). La chromatographie en phase liquide apparaît donc aujourd'hui comme étant la technique de choix pour l'analyse des lipides.

Le mode le plus rencontré dans la littérature est le mode partage en phase inverse (Figure 112). Il devance la chromatographie d'absorption et la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC⁵⁷). Ces modes chromatographiques peuvent conduire à deux types de séparation : la séparation par classe lipidique et la séparation par espèce moléculaire.

⁵⁷ Hydrophilic interaction chromatography

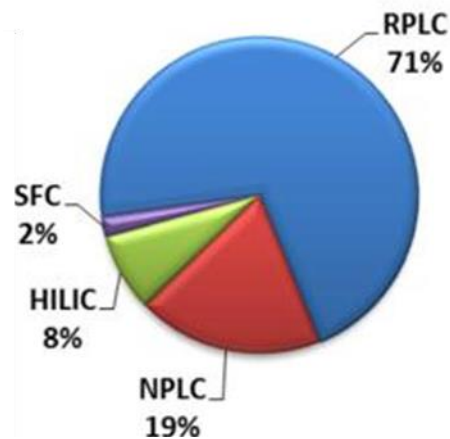


Figure 112 : Répartition des modes chromatographiques rencontrés dans la littérature pour les études de lipidomique [Cajka T. 2014].

2.2.1 La séparation des lipides par classe par NPLC

La chromatographie d'absorption consiste en l'utilisation d'une colonne chromatographique constituée de particules de silice vierges et d'un gradient de solvant de polarité croissante (exemple : hexane vers isopropanol). La séparation est principalement guidée par des interactions avec la tête polaire du lipide. Cette technique tend donc à séparer les lipides par classe, c'est-à-dire que tous les lipides d'une même classe possèdent un temps de rétention identique ou très proche (Figure 113).

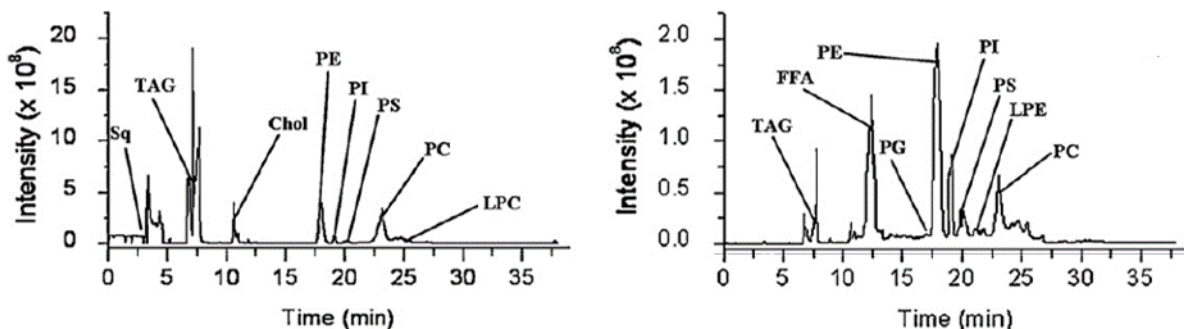


Figure 113 : Séparation par classe obtenue par NPLC-MS en utilisant une source APCI en mode positif (à gauche) et négatif (à droite) [Imbert L. 2012].

La séparation par classe permet de simplifier le travail d'identification. En effet, comme chaque temps de rétention correspond à une classe de lipide, l'analyste possède un *a priori* sur la structure de chaque ion. Il en est de même pour les logiciels d'annotation automatique pour lesquels l'association temps de rétention/classe lipidique permet de réduire le nombre de fausses attributions.

Pour obtenir ce type de résultats, les méthodes chromatographiques de la NPLC sont relativement longues (environ 50 min) et nécessitent de recourir à l'utilisation de solvants toxiques en quantités non négligeables. À titre d'exemple, le chromatogramme présenté en Figure 113 a nécessité l'utilisation d'heptane, d'acétate d'éthyle, d'acétone, d'isopropanol, d'acide acétique, et d'éthanolamine. Ces solvants conduisent également à des couplages peu robustes avec une source *electrospray* (ESI). La Figure 114 compare les réponses obtenues avec l'utilisation de trois sources différentes (ESI, APCI et APPI) dans les deux polarités. En mode positif, les sources ESI et APCI fournissent le même type d'informations (les espèces ionisées sont les mêmes) mais l'intensité est 20 fois moins élevée avec la source ESI. En ce qui concerne le mode négatif, les sources APPI et APCI fournissent des résultats similaires là où la source ESI fournit un chromatogramme 5 fois moins intense avec un bruit de fond plus élevé. La source ESI ne semble pas pertinente pour l'étude de

lipides dans les conditions de la NPLC. C'est pourtant aujourd'hui la source de référence pour le couplage avec la chromatographie, si bien qu'un grand nombre de laboratoire n'est équipé que de ce type de matériel. Il serait donc intéressant de proposer une séparation dont le couplage avec une source *electrospray* est robuste.

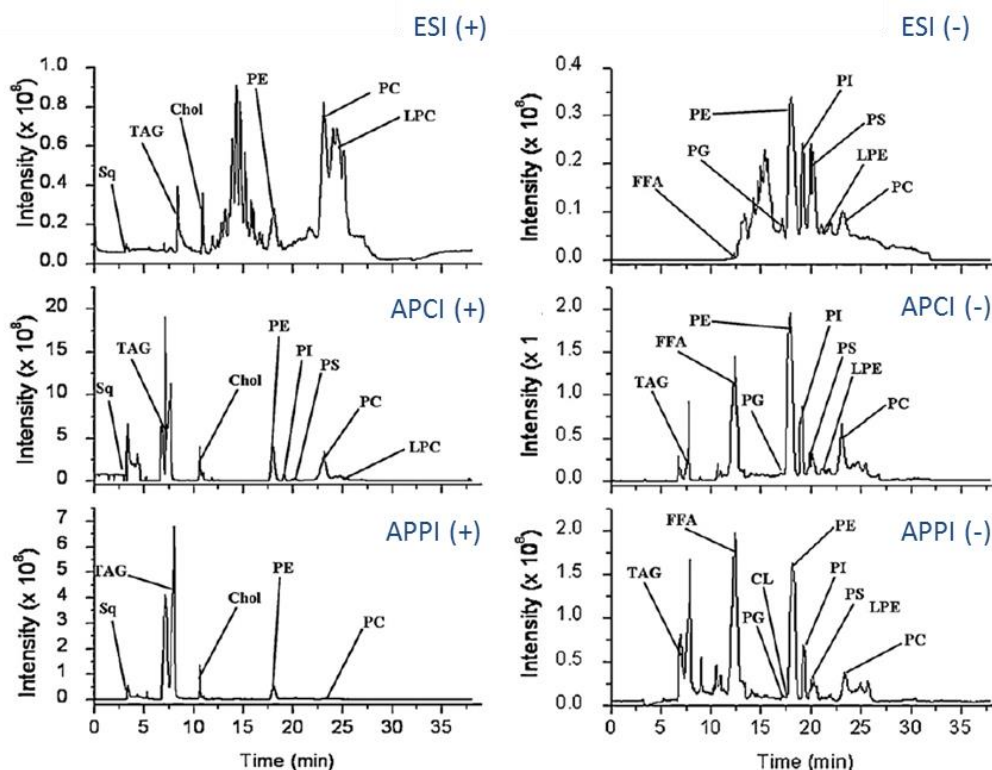


Figure 114 : Étude de la réponse fournie par différentes sources (ESI, APCI et APPI) pour un extrait lipidique après séparation par NPLC [Imbert L. 2012].

Dans ce contexte, l'utilisation de la chromatographie d'interaction hydrophile ou celle de la chromatographie en phase supercritique pourrait s'avérer être une alternative à l'utilisation de solvants toxiques, tout en conservant la séparation par classe qui intéresse particulièrement notre équipe de recherche. Par ailleurs, ces deux techniques utilisent des phases mobiles compatibles avec l'ESI.

2.2.2 La séparation des lipides par espèce par RPLC

De nos jours, le mode chromatographique le plus rencontré en chromatographie liquide est le partage en phase inverse. Ce mode consiste en l'utilisation d'une phase stationnaire constituée de particules de silice sur lesquelles sont greffés des groupements apolaires (le plus souvent octadécyl C18). Pour l'analyse de lipides, la phase mobile utilisée est le plus souvent un mélange eau/acétonitrile (voie A), isopropanol/acétonitrile (voie B) contenant quelques mmol/L d'acétate d'ammonium.

Dans ce type de configuration, la séparation est guidée dans un premier temps par le caractère hydrophobe des différents lipides. Par conséquent, la longueur de leur chaîne et le nombre d'insaturation vont influencer la rétention des composés. Les composés d'une même classe lipidique seront séparés dans le temps sur plusieurs minutes (Figure 115).

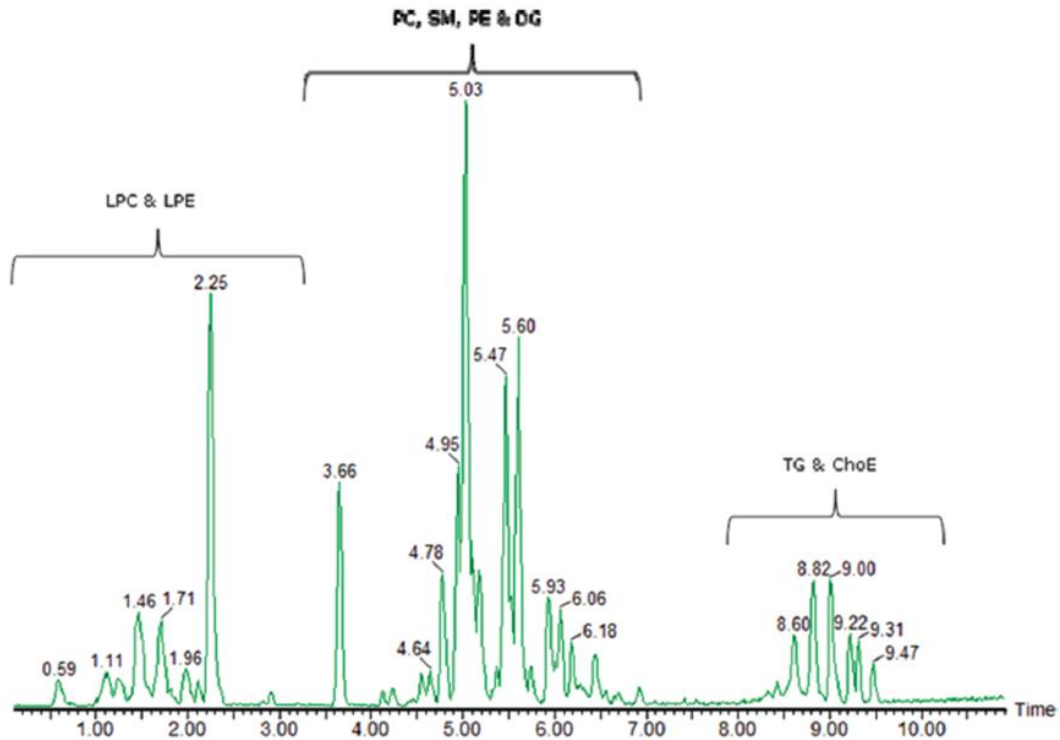


Figure 115 : Chromatogramme obtenu avec une source ESI, en mode positif, pour l'étude d'un extrait de plasma humain par UHPLC en phase inverse [Castro-Perez J.M. 2009]. Conditions RPLC : colonne C18 HSS T3 100 x 2,1 mm, dp 1,8 μ m, voie A Eau/ACN 60/40 + acétate d'ammonium, voie B ACN/IPA 10/90 + acétate d'ammonium, 0,4 mL/min, 55°C. Conditions : colonne HSST3 100 x 2,1 mm, 1,8 μ m ; Voie A : H₂O/ACN 60/40 + 10 mM AcONH₄ ; Voie B : ACN/IPA 10/90 + 10 mM AcONH₄ ; gradient : 60 à 100%B en 10 min ; 0,4 mL ; 55°C

Cette séparation par espèce est un atout lorsque le but est de caractériser une classe lipidique isolée auparavant par fractionnement, puisqu'elle permet de séparer les lipides de cette classe et ainsi de favoriser la détection des éléments peu abondants (moins de suppression d'ions). Cependant, lors de l'étude d'extraits totaux, les différentes classes lipidiques vont avoir des bandes d'élution qui se chevauchent (Figure 115). L'annotation des ions est alors plus compliquée puisqu'un temps de rétention donné peut correspondre à plusieurs classes lipidiques à la fois. Outre ces problèmes d'annotation, des phénomènes de suppression d'ions peuvent apparaître entre des espèces provenant de classes très abondantes et des espèces provenant de classes minoritaires présentant le même temps de rétention. Pour finir, les solvants d'injection doivent être choisis de manière à solubiliser tous les lipides de l'extrait tout en étant miscibles avec la phase mobile afin d'éviter les déformations de pics. Pour ce faire, les auteurs utilisent généralement des mélanges méthanol/chloroforme intégrant au moins 50 % de l'alcool [Cajka T., 2014].

2.2.3 Séparation par classe puis par espèce grâce à la LC bidimensionnelle

Les séparations par classe et par espèce s'avèrent finalement complémentaires. En effet, dans un but de caractérisation d'extraits totaux, il est intéressant de séparer dans un premier temps les lipides par classe avant d'effectuer une séparation par espèce afin de caractériser chaque classe.

Certains auteurs proposent des séparations orthogonales *off-line*. Dans ce cas, une première séparation par classe est effectuée en NPLC ou en HILIC. Chaque pic chromatographique est collecté séparément. Après évaporation de la phase mobile, l'échantillon est solubilisé dans le solvant d'injection afin de subir une séparation par RPLC [Cifkova E. 2013].

D'autres auteurs proposent d'automatiser totalement ce type de séparation bidimensionnelle grâce à l'utilisation d'une vanne 10 voies et de deux boucles de collection (Figure 116). L'extrait lipidique

subit une séparation par classe en première dimension (NPLC), l'effluent chromatographique remplissant alors la boucle 2. Un système de vide permet l'évaporation de la phase mobile de la boucle afin d'éviter les problèmes de compatibilité avec la phase mobile de la seconde dimension. Lorsque la vanne permute, le contenu de la boucle 2 est injecté sur la seconde dimension (RPLC) et l'effluent de la première dimension peut remplir la boucle 1. Dans cet exemple, les auteurs proposent un mode *stop flow*, c'est-à-dire que le débit de la première dimension est stoppé le temps que la séparation soit effectuée en seconde dimension. Ce choix permet d'adapter la séparation en seconde dimension pour chaque classe lipidique. Les chromatogrammes correspondants sont rapportés en Figure 117. L'intérêt de la technique est particulièrement visible pour les acides gras où le pic chromatographique de 4 minutes en première dimension est étalé sur 20 minutes en seconde dimension.

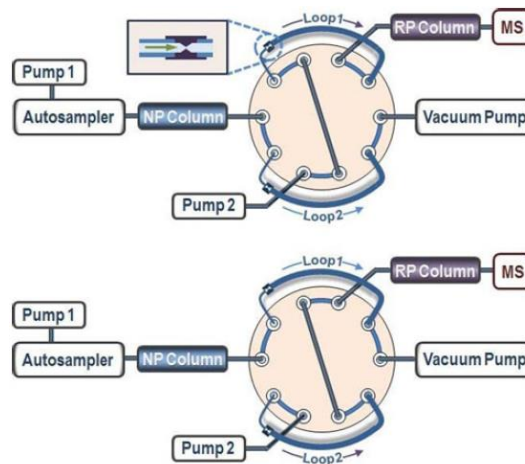


Figure 116 : Représentation schématique du système NP/RP 2D-LC [Li M. 2013].

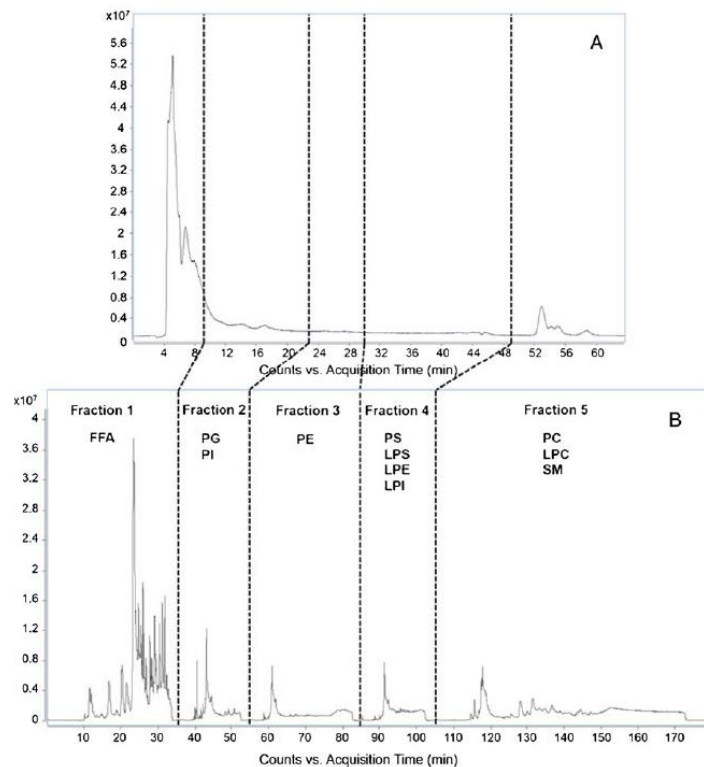


Figure 117 : Chromatogrammes obtenus pour un extrait de plasma humain en NPLC (A) et en NP/RP 2D LC (B) [Li M. 2013].

2.3 Couplages avec la chromatographie en phase supercritique

2.3.1 Exemples tirés de la littérature

La chromatographie en phase supercritique est utilisée pour la séparation de lipides depuis les années 90. La littérature contient ainsi une multitude d'exemples dont certains sont rapportés dans une revue écrite en collaboration avec Mario Ollero (Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil) [Laboureur L. 2015].

Cependant, la plupart quantifient un nombre réduit de lipides (exemples : stérols [Ong C.P. 1990], stéroïdes [David P.A. 1989] ou les vitamines E [Méjean M. 2015]).

Peu d'articles traitent de l'étude d'extraits totaux. Bamba *et al.* sont les premiers à démontrer la séparation par classe d'un extrait lipidique total de Pervenche de Madagascar par SFC-ESI-MS [Bamba T. 2008]. Les auteurs utilisent un mélange de standards de lipides afin de développer leur méthode. Ce mélange couvre 14 classes lipidiques. La méthode chromatographique finale est présentée dans le Tableau 42. La séparation correspondante est présentée en Figure 118. Seules quelques co-élutions sont observées, notamment entre les acides phosphatidiques (PA) et les phosphatidyléthanolamines (PE) puis les phosphatidylinositols (PI) ainsi qu'entre les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylcholines (PC) puis les sphingomyélines (SM).

Paramètres de la méthode	
Colonne chromatographique	Cyano 250 x 4,6 mm (diamètre de particule non renseigné)
Co-solvant	Méthanol
Additif	0,1 % formiate d'ammonium
Débit	3 mL/min
Gradient	10 % à 30 % en 20 min
Température du four	35°C
Contre-pression	100 bar

Tableau 42 : Paramètres chromatographiques pour l'étude d'un extrait lipidique de Pervenche de Madagascar par SFC (Figure 118)[Bamba T., 2008].

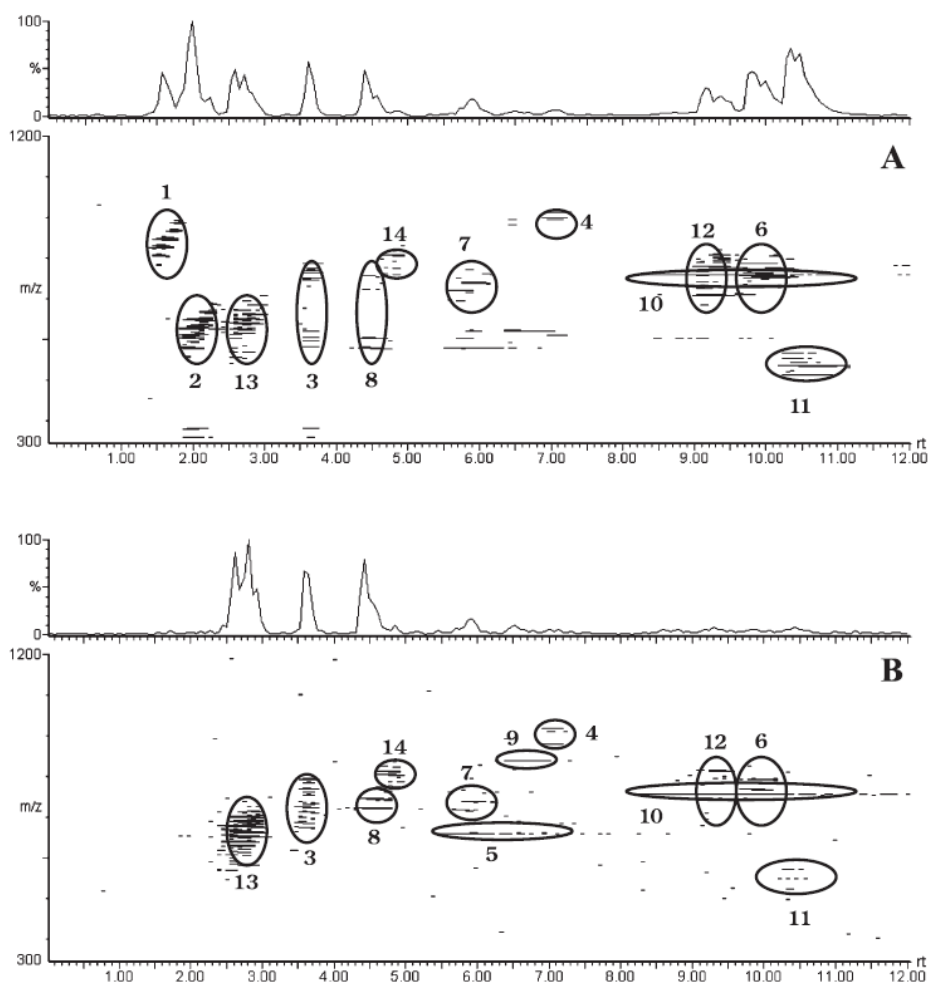


Figure 118 : Séparation obtenue pour un mélange d'une cinquantaine de standards représentant 14 classes lipidiques. (A) mode positif. (B) mode négatif. 1 Triglycéride (TG) ; 2 Diglycéride (DG) ; 3 monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) ; 4 digalactosyldiacylglycérol (DGDG) ; 5 acide phosphatidique (PA) ; 6 phosphatidylcholine (PC) ; 7 phosphatidyléthanolamine (PE), 8 phosphatidylglycérol (PG), 9 phosphatidylinositol (PI), 10 phosphatidylsérine (PS) ; 11 lysophosphatidylcholine (LPC) ; 12 sphingomyéline (SM) ; 13 Céramide (Cer) ; 14 cérébroside (CB) [Bamba T. 2008].

Plus récemment, l'équipe d'Holcapek annonce la séparation de 30 classes lipidiques provenant de 6 familles de lipides (acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, stérols, prénoles) en moins de 6 minutes [Lisa M. 2015]. La méthode (Tableau 43) a également été développée à l'aide d'un mélange de standards. Grâce à l'injection d'un extrait lipidique de cerveau de porc, les auteurs ont contrôlé la séparation par classes en observant les chromatogrammes d'ions extraits de plusieurs espèces appartenant à la même classe lipidique (Figure 119). Les trois exemples choisis par les auteurs montrent que la séparation par classe est effective pour les TG et les PC. En effet, les espèces d'une même classe sont toutes éluées dans une fenêtre de 10 secondes de large.

Paramètres de la méthode	
Colonne chromatographie	Acquity BEH UPC ² 100 x 3 mm 1,7 µm
Co-solvant	MeOH/eau 99/1 v/v
Additif	Acétate d'ammonium (30 mM)
Débit	1,9 mL/min
Gradient (% de co-solvant)	1 min : 1 % ; 5 min : 51 % ; 6 min : 51 %
Température du four	60°C
Contre-pression	124 bar

Tableau 43 : Paramètres chromatographiques utilisés par les auteurs pour l'obtention d'une séparation par classe lipidique (Figure 119, Figure 120) [Lisa M. 2015].

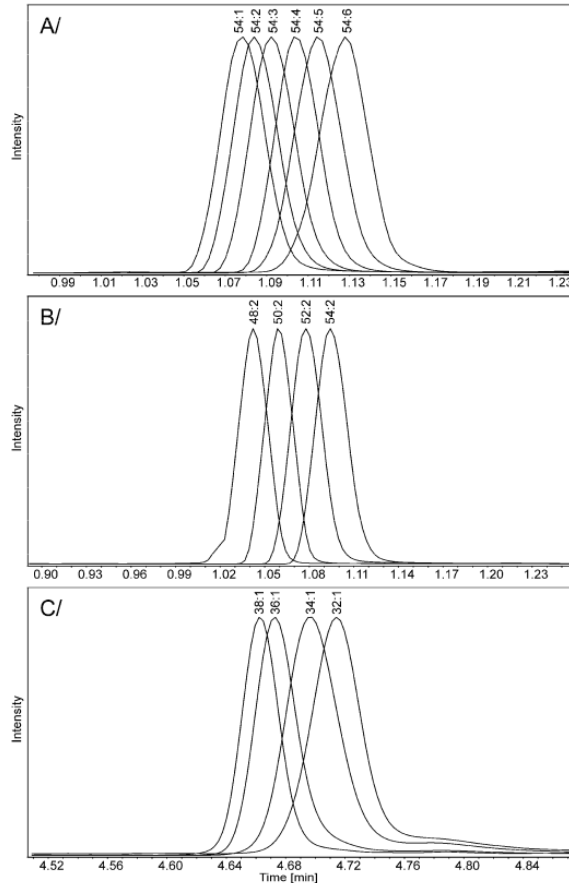


Figure 119 : Influence de la longueur des chaînes d'acides gras et/ou du nombre d'insaturation sur la rétention des TG (A et B) et des PC (C) [Lisa M.2015].

Le chromatogramme obtenu sur le mélange de standards est présenté dans la Figure 120. Des essais avec une phase stationnaire semblable (mais de fournisseur et de dimensions différents) ont été menés dans les mêmes conditions. La séparation obtenue était nettement moins efficace que celle présentée par ces auteurs. Les 1,2-DG et 1,3-DG étaient notamment co-élués. Ce constat nous a conduits à un développement classique de méthode.

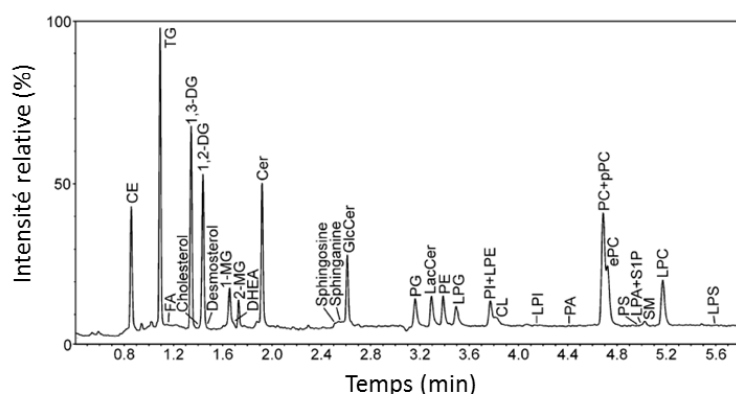


Figure 120 : Séparation par classe lipidique d'un mélange de standards, d'après les conditions exposées dans le Tableau 43 [Lisa M. 2015].

2.3.2 État de l'art dans notre laboratoire

La séparation des classes lipidiques grâce à la chromatographie en phase supercritique a débuté au sein de notre équipe lors de la thèse de Marie Méjean. La méthode chromatographique a été développée en utilisant un mélange de standards à l'instar des deux précédents exemples. Un criblage de phases stationnaires a été réalisé sur 6 colonnes chromatographiques différentes (C18, CN, NH₂, 2-EP, PC HILIC et Si). La colonne offrant les meilleurs résultats s'est avérée être celle intégrant un greffage 2-éthylpyridine. L'ensemble des paramètres a ensuite fait l'objet d'une optimisation. La méthode optimisée est présentée dans le Tableau 44.

Paramètre	Valeur
Colonne chromatographie	2-éthylpyridine 100 x 2,1 mm ; 1,7 μm
Co-solvant	MeOH/ACN 1/1 v/v
Additif	Formiate d'ammonium (0,1 %)
Débit	1 mL/min
Gradient (% de co-solvant)	1 min : 3 % ; 16 min : 50 % ; 18 min : 50 % ; 28 min : 60 %
Température du four	60°C
Contre-pression	130 bar

Tableau 44 : Paramètres optimisés par Marie Méjean pour la séparation des classes lipidiques.

Après avoir travaillé sur la séparation, Marie a eu l'occasion de travailler sur la détection de différentes espèces. Une source ESI classique a dans un premier temps été utilisée avant de choisir une source *electrospray jet stream* (ESI JS). Cette source permet de focaliser le spray et d'augmenter la désolvatation grâce à un flux d'azote chauffé injecté de manière coaxiale au nébuliseur. L'utilisation de cette source a permis, après optimisation de ses paramètres, d'augmenter la sensibilité jusqu'à 40 fois (DG). Seules les céramides ont vu leur intensité diminuer d'un facteur 2. Les paramètres optimisés pour la détection des lipides sont rapportés dans le Tableau 45.

Paramètre	Valeur
Drying gas	350°C ; 10 L/min
Nébuliseur	30 psi
Tension de cône	3500 V
Fragmentor	160 V
Skimmer	40 V
Sheat gas	350°C ; 7,5 L/min
Nozzle	500 V

Tableau 45 : Paramètres optimisés pour le spectromètre de masse et la source ESI JS pour la détection des lipides.

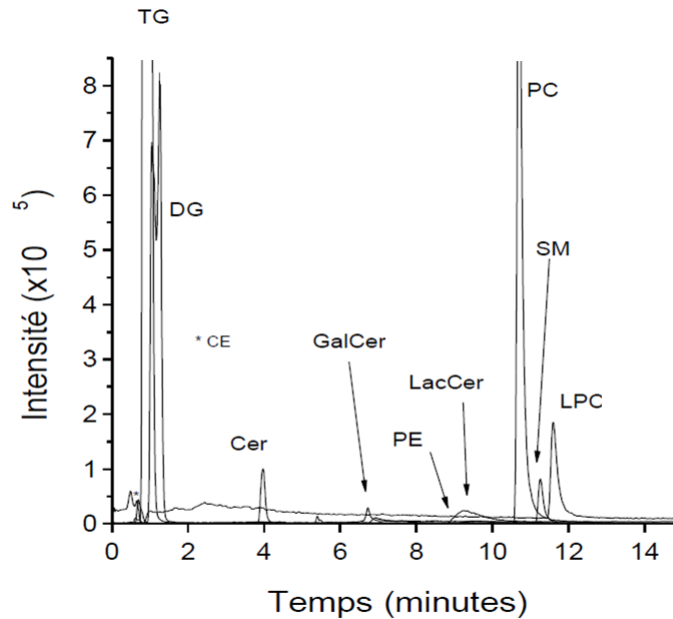


Figure 121 : Séparation des classes de lipides optimisée par Marie Méjean au cours de sa thèse.

La méthode développée permet l'obtention du chromatogramme présenté dans la Figure 121. Ce chromatogramme laisse apparaître quelques points pouvant s'avérer problématiques lors de son exploitation :

- ✚ Les TG et les DG sont partiellement co-élus. Cette co-élution est gênante dans la mesure au les TG sont susceptibles de perdre un acide gras suite à des fragmentations en source. L'ion résultant est le même que celui provenant du DG correspondant. Il est dans ce cas impossible d'attribuer avec certitude le signal à un DG ou à un TG se fragmentant en source.
- ✚ Deux types de DG existent : ceux pour lesquels les acides gras sont fixés en position 1 et 2 (1,2-DG) et ceux pour lesquels les acides gras sont fixés en position 1 et 3 (1,3-DG) du glycérol. Le standard utilisé est un 1,3-DG. Considérant la co-élution de ce standard avec le TG, il est très peu probable d'observer une séparation 1,2-DG/1,3-DG. La littérature montre pourtant qu'il est possible d'obtenir une très bonne séparation de ces composés (Figure 120) [Lisa M. 2015].
- ✚ Le dernier point gênant concerne la co-élution PC/SM. En effet, bien qu'étant de parité différente, ces deux classes lipidiques sont détectées dans la même gamme de m/z 700-900. De plus, les PC fournissent très souvent un signal bien plus intense que les SM laissant craindre des problèmes de compétition à l'ionisation.

3 Mise au point d'une seconde méthode de séparation des classes lipidiques

C'est dans l'objectif de résoudre les co-élutions TG/DG, 1,2-DG/1,3-DG et PC/SM que la méthode a été à nouveau travaillée. Dans un but pédagogique, à l'intention de deux stagiaires de Master2, certaines étapes de développement font doublon avec les travaux de Marie Méjean. La stratégie utilisée pour le développement de la méthode chromatographie est la même que celle exposée dans les chapitres précédents : criblage de colonne, choix du co-solvant, des additifs, du gradient d'élution et optimisation des paramètres tels que la température du four à colonne, les valeurs de la contre-pression et du débit.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Les standards

Deux diglycérides (1,2-dipalmitoyl-glycérol et 1,3-dipalmitoyl-glycérol) ont été achetés auprès de la société Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Allemagne). Une solution à 50 µg/mL a été préparée dans un mélange chloroforme/méthanol (1/1, v/v) pour chaque DG.

Un mélange de standards fournis par Benoit Colsch est utilisé pour le développement de la méthode. Ce mélange couvre vingt classes lipidiques appartenant aux glycérolipides, aux glycérophospholipides, aux sphingolipides et aux stérols (Tableau 46). Les structures des standards sont présentées dans l'annexe 1. Le solvant utilisé est un mélange chloroforme/méthanol (1/1, v/v).

Famille lipidique	Classe lipidique	Molécule	Concentration ng/mL
Glycérolipides	Diglycéride (DG)	14:0/14:0 D ₅	200
	Triglycéride (TG)	20:0/20:1/20:0	1000
Glycérophospholipides	Acide phosphatidique (PA)	14:0/14:0	5000
	Lyso-acide phosphatidique (LPA)	14:0	1000
	Phosphatidylcholine (PC)	13:0/13:0	500
	Lyso-phosphatidylcholine (LPC)	11:0	200
	Phosphatidyléthanolamine (PE)	12:0/12:0	500
	Lyso-phosphatidyléthanolamine (LPE)	13:0	100
	Phosphatidylglycérol (PG)	12:0/12:0	100
	Lyso-phosphatidylglycérol (LPG)	13:0	1000
	Phosphatidylinositol (PI)	18:0/18:0	5000
	Lyso-phosphatidylinositol (LPI)	13:0	100
	Phosphatidylsérine (PS)	18:1/16:0 D ₃₁	2000
	Lyso-phosphatidylsérine (LPS)	13:0	1000
Sphingolipides	Céramide (Cer)	d18:1/12:0	1000
	Galactocéramide (GalCer)	d18:1/12:0	1000
	Lactosylcéramide (LacCer)	d18:1/12:0	300
	Sphingomyéline (SM)	d18:0/12:0	100
	Sulfatide (Su)	d18:1/12:0	500
	Stérols	Ester de cholestérol (CE)	22:0

Tableau 46 : Composition du mélange de standards de lipides utilisé pour le développement de la méthode.

3.1.2 Extrait lipidique de plasma humain

Benoit Colsch nous a également fourni un extrait lipidique de plasma humain. Il a été préparé en utilisant la méthode de Bligh et Dyer [Bligh E.G. 1959]. Le plasma (1 mL) est incorporé dans 3,75 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (1/2, v/v). Après solubilisation, 1,25 mL de chloroforme sont à nouveau ajoutés. Après agitation (1 min), 1,25 mL d'eau sont ajoutés. Après centrifugation, les protéines précipitées se trouvent dans le culot du tube. La phase organique, contenant les lipides, est évaporée et reprise avec un mélange chloroforme/méthanol (1/1, v/v) dans les proportions solvant/échantillon suivantes : 20/7, v/v. L'échantillon a ensuite été dilué au 100^e dans le MeOH avant son injection.

3.1.3 Colonnes chromatographiques

Un jeu de six colonnes chromatographiques a été présélectionné en se basant d'une part sur les résultats obtenus par Marie Méjean et d'autre part un article de l'équipe de Michal Holcapek [Lisa M. 2015]. En effet, les phases stationnaires à base de silice vierge ont montré leur capacité à séparer les classes lipidiques dans ces deux travaux. La phase 2-éthylpyridine a été retenue dans la méthode finale proposée par Marie. Les trois colonnes de la gamme Torus ont récemment été acquises par notre laboratoire. Elles n'avaient donc pas été intégrées dans le criblage précédent. Enfin, la colonne

Hypercarb® a déjà fait ces preuves au sein de notre laboratoire (séparation de diterpènes) [Nothias L.-F. 2017]. Les caractéristiques des colonnes utilisées sont présentées dans le Tableau 47.

Phase stationnaire	Fournisseur	Nom commercial	Géométrie mm x mm	Diamètre de particule (µm)
Silice	Agilent	ZORBAX RX-SIL - Rapid Resolution HT	100 x 2,1	1,8
2-éthylpyridine	Waters	ACQUITY UPC ² BEH 2-EP	100 x 2,1	1,7
1-aminoanthracène	Waters	Torus ACQUITY UPC ² Torus 1-AA	150 x 2,1	1,7
Diéthylamine	Waters	Torus ACQUITY UPC ² Torus DEA	150 x 2,1	1,7
2-picolylamine	Waters	Torus ACQUITY UPC ² Torus 2-PIC	150 x 2,1	1,7
Carbone graphite poreux	ThermoFisher	Hypercarb®	100 x 2,1	3,0

Tableau 47 : Caractéristiques des colonnes chromatographiques utilisées lors du criblage.

3.1.4 Appareillage

Le chromatographe et le spectromètre de masse utilisés sont présentés dans la section 4.3 du Chapitre I. Lors de cette étude, le détecteur UV/Visible n'a pas été utilisé. Afin de minimiser les volumes morts extra-colonnes, l'effluent chromatographique n'a pas été envoyé dans la cellule UV/Visible : la sortie de la colonne chromatographique a directement été raccordée au régulateur de contre-pression.

Ayant fait ses preuves lors des travaux de Marie Méjean, la source ESI JS a été de nouveau utilisée lors de cette étude. Seul le mode positif a été utilisé pour le moment. De légères modifications ont eu lieu dans les paramètres de la source d'ionisation (Tableau 48) suite aux travaux de Carlos Rincon. L'influence de ces changements reste tout de même relativement faible sur la réponse obtenue (de l'ordre de la dizaine de % de gain en sensibilité).

Paramètre	Valeur
Drying gas	300°C ; 10 L/min
Nébuliseur	50 psi
Tension de cône	(+) 3500 V / (-) 2500 V
Fragmentor	160 V
Skimmer	45 V
Sheat gas	350°C ; 11 L/min
Nozzle	1000 V
Vitesse d'acquisition	1 spectre/s

Tableau 48 : Paramètres de la source ESI JS.

Le chromatographe et le spectromètre de masse étaient initialement couplés en ligne sans diviser l'effluent chromatographique en amont. La sortie du régulateur de contre-pression était alors directement reliée à la source d'ionisation par un tube métallique (Figure 122). L'ajout d'un solvant make-up en amont du régulateur de contre-pression permet d'éviter les précipitations dans le capillaire de transfert et aide à l'ionisation pour l'*electrospray*.

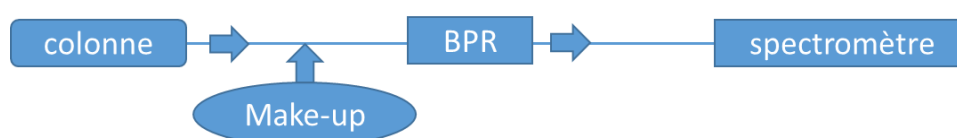


Figure 122 : Représentation schématique du couplage initial.

Au cours des derniers mois, le laboratoire a acquis une nouvelle interface. Elle se base sur un *split* avant le régulateur de contre-pression (Figure 123). L'interface, présentée dans la Figure 124, est un système commercial (PN : G4309-68715, Agilent Technologies).

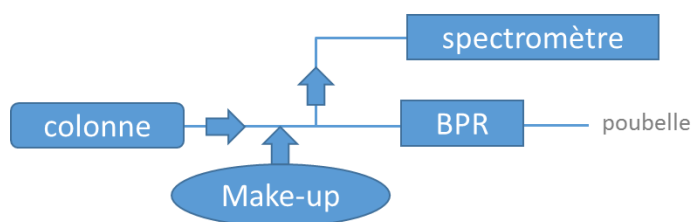


Figure 123 : Représentation schématique du nouveau couplage SFC-MS.

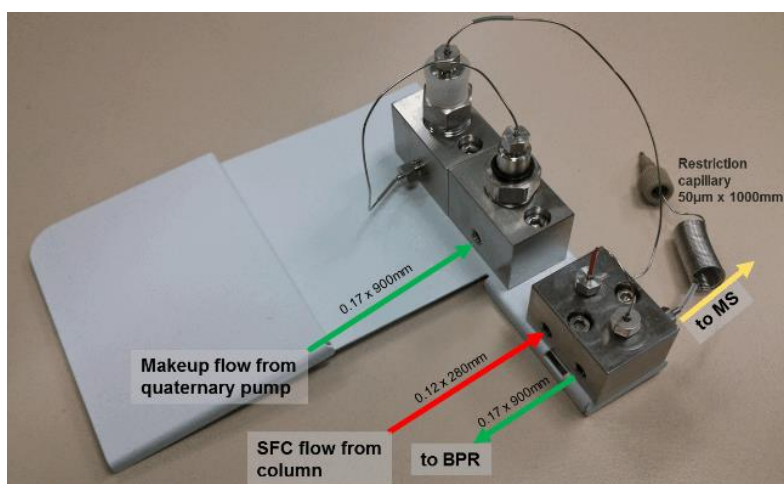


Figure 124 : Nouvelle interface SFC-MS (source : Agilent Technologies).

3.2 Criblage de colonnes

Le mélange de 20 standards a été injecté sur les 6 colonnes chromatographiques avec une méthode inspirée de nos précédents travaux et de la bibliographie. Le mélange MeOH/ACN précédemment utilisé a été remplacé par du MeOH pur [Lisa M. 2015]. Le débit a été abaissé à 0,8 mL/min compte tenu des dimensions des colonnes chromatographiques utilisées.

L'effet des additifs a également été étudié dès l'étape de criblage avec un essai sans additif suivi d'un essai avec de l'acétate d'ammonium (10 mmol/L), lui-même suivi d'un essai avec du formiate d'ammonium à la même concentration. Le gradient d'éluion commençait avec une phase mobile constituée de 1 % de co-solvant pour finir à 51 % de co-solvant en 15 minutes. La température du four à colonne a été fixée à 60°C.

Dans un premier temps, la nature de l'ion majoritaire de chaque espèce a été déterminée. Pour ce faire, le chromatogramme d'ions extraits représentant la somme des espèces protonées, des adduits au sodium et des adduits à l'ammonium a été réalisé pour tous les lipides. Le spectre de masse de chaque pic chromatographique a été étudié de manière à déterminer l'espèce majoritairement formée. L'exemple relatif au standard de PC est présenté dans la Figure 125. Les ions obtenus correspondent à l'espèce protonée et à l'adduit au sodium. Dans les deux cas la précision en masse est inférieure à 1 ppm. Cette précision est notamment rendue possible grâce à l'utilisation d'un étalonnage interne (présence de l'ion m/z 922,0098). L'ion majoritaire correspond à l'espèce protonée. Les ions majoritaires des autres lipides détectés sont listés dans le Tableau 49. La présence d'un additif n'a pas d'influence sur l'ion majoritairement formé sauf pour le TG. En effet, lorsque la

phase mobile ne contient pas d'ammonium, l'espèce majoritaire est $[M+Na]^+$ pour le standard de TG ($m/z_{théorique}$ 1000,9291).

Quelleque soit la colonne utilisée, aucun signal n'a été détecté pour les autres lipides (LPA, PA, LPE, PG, LPG, PI, LPI, PS et LPS).

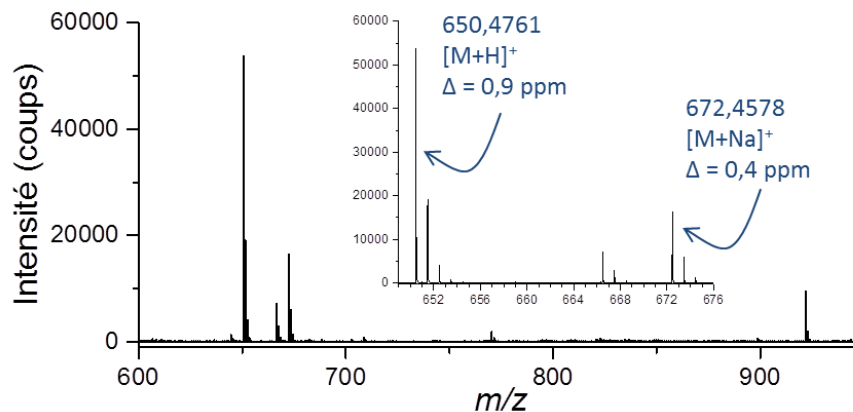


Figure 125 : Spectre de masse du standard de PC lors de l'utilisation d'une phase mobile contenant de l'ammonium.

Espèce	Ion majoritaire	m/z théorique
DG	$[M+Na]^+$	540,4647
TG	$[M+NH_4]^+$	995,9737
PC	$[M+H]^+$	650,4755
LPC	$[M+H]^+$	426,2615
PE	$[M+H]^+$	580,3973
Cer	$[M+Na]^+$	504,4387
GalCer	$[M+Na]^+$	666,4915
LacCer	$[M+Na]^+$	828,5444
SM	$[M+H]^+$	649,4279
CE	$[M+Na]^+$	731,6677

Tableau 49 : Ion majoritaire observé pour chaque standard détecté (SFC-MS).

Les chromatogrammes présentés dans les figures suivantes représentent le chromatogramme d'ions extraits de la somme des espèces majoritaires observées avec une fenêtre d'extraction de 10 ppm (± 5 ppm).

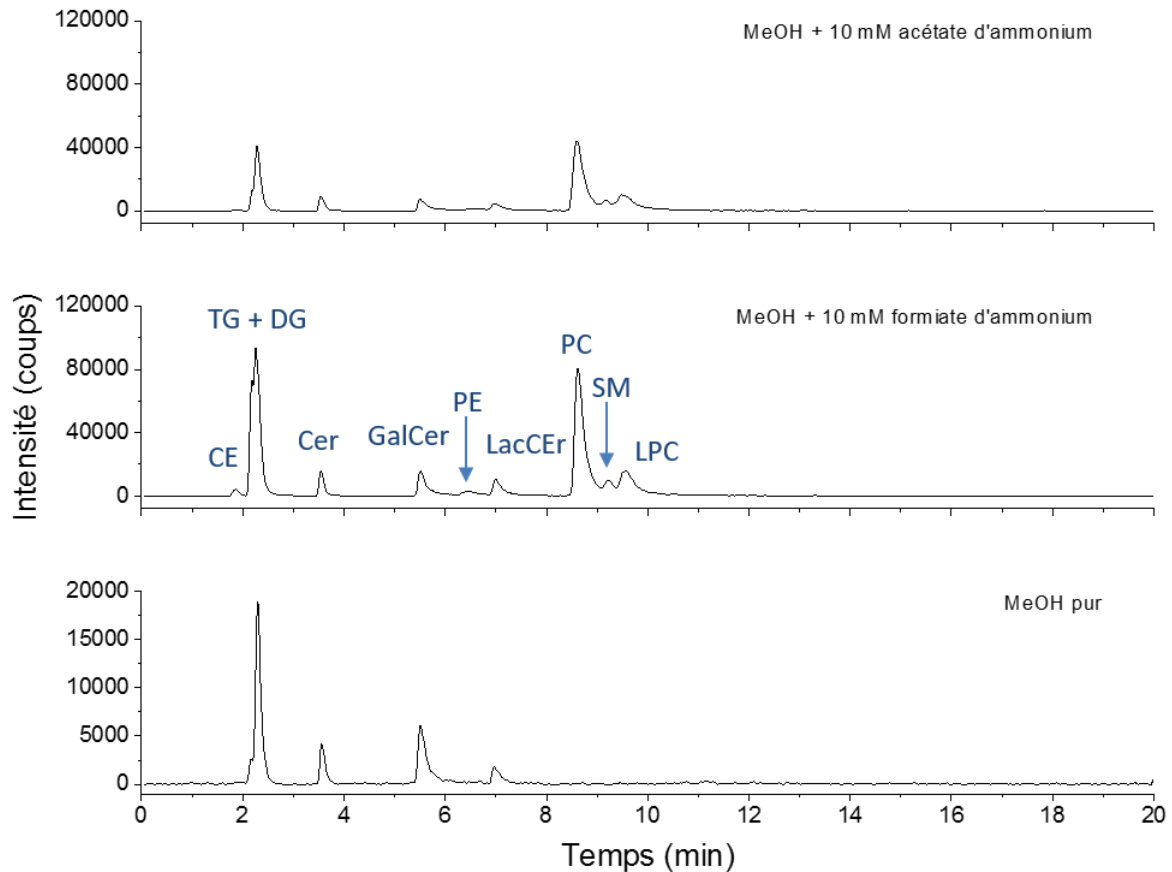


Figure 126 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne 2-EP.

L'utilisation de la colonne 2-éthylpyridine permet d'observer neuf pics chromatographiques dans le cas le plus favorable (formiate d'ammonium). Ces pics correspondent en réalité à dix espèces puisque le TG et le DG sont totalement co-élus. Comme exposé dans la section 2.3.2, cette co-élution est un réel problème pour l'étude d'échantillons biologiques.

Dans cet exemple, l'utilisation d'un additif semble essentielle pour l'étude de TG, PC, SM et LPC. En effet, ces 4 espèces ne sont pas ou très peu détectées lorsque le méthanol est utilisé pur en tant que co-solvant.

Il est à noter que l'acétate d'ammonium conduit à des signaux moins intenses que le formiate d'ammonium.

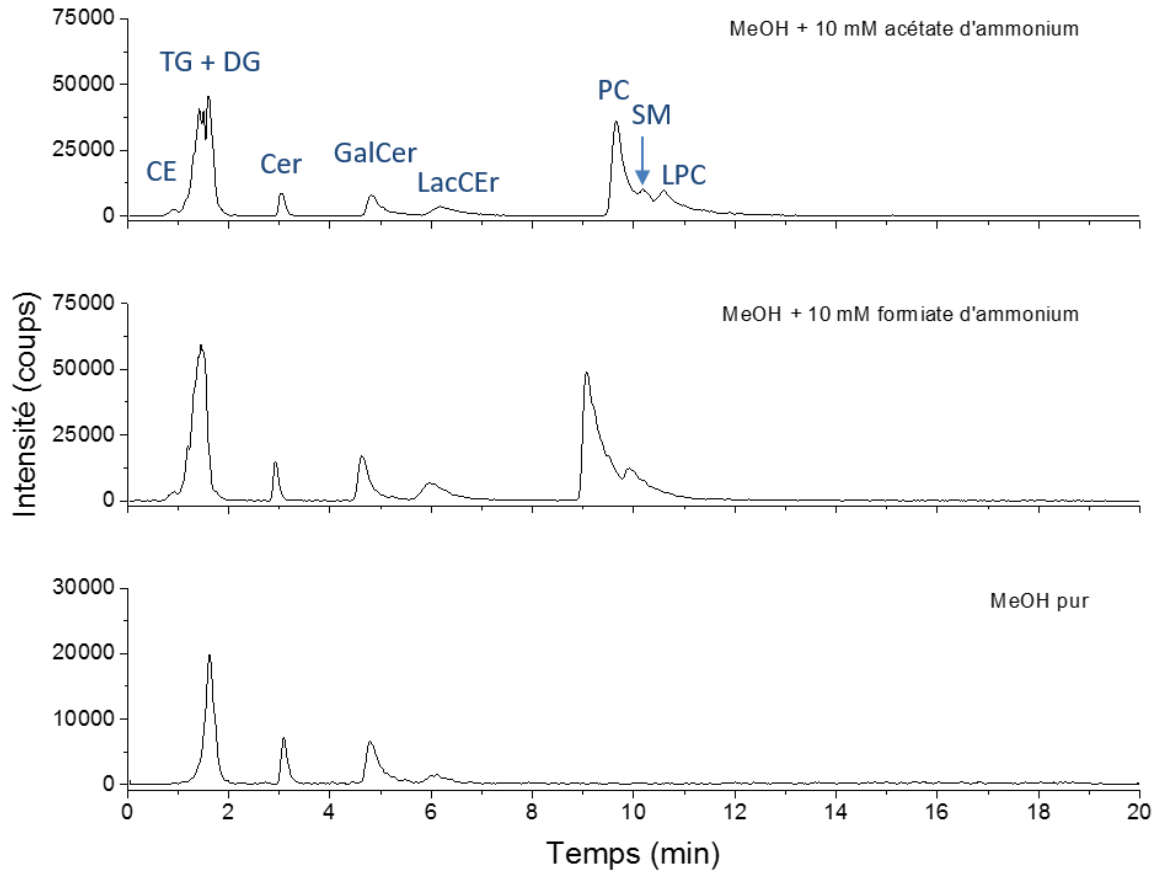


Figure 127 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne Si.

L'utilisation de la colonne intégrant des particules de silice vierge permet d'observer huit pics chromatographiques dans le cas le plus favorable (acétate d'ammonium). Ces pics correspondent en réalité à 10 espèces puisque le TG et le DG sont totalement co-élués et que l'intensité du PE est trop faible pour apparaître sur la somme des EIC, mais il est effectivement détecté.

À nouveau l'utilisation d'un additif est nécessaire à l'étude de plusieurs analytes (CE, TG, PE, PC, SM, et LPC).

Contrairement au dernier exemple, le cas le plus favorable correspond à l'utilisation de l'acétate d'ammonium. En effet, entre 9 et 11 minutes, la résolution des pics chromatographiques pour les espèces PC, SM et LPC se dégrade avec le formiate.

En l'état, cette colonne chromatographique ne répond pas à nos besoins puisque le DG et le TG sont totalement co-élués et que les PC et SM le sont partiellement.

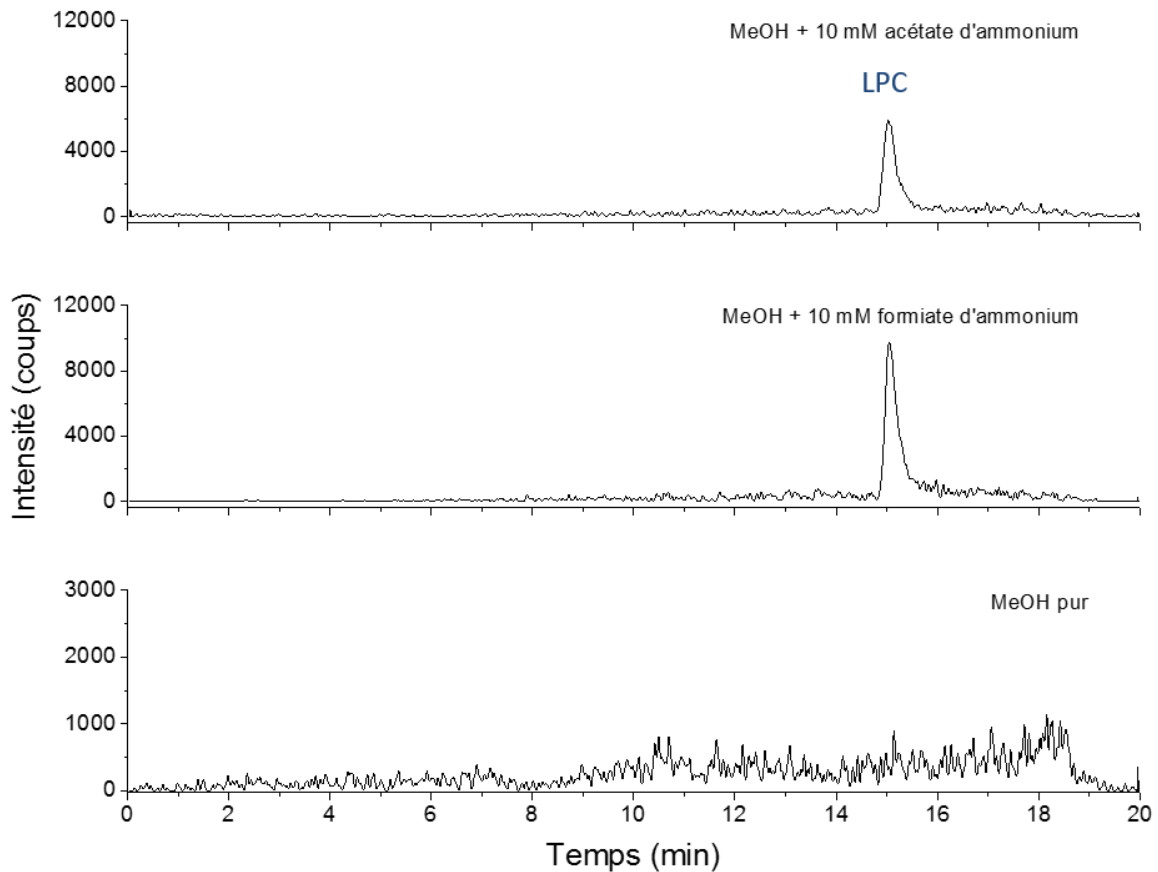


Figure 128 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne Hypercarb®.

Les chromatogrammes obtenus après une injection sur la colonne intégrant une phase stationnaire de carbone graphite poreux fournissent un seul pic chromatographique et uniquement avec l'utilisation d'un additif. Ce pic correspond à l'élution du LPC. Une méthode plus longue (1 h) intégrant d'importantes proportions de co-solvant (60 %) n'a pas permis d'éluer d'autres lipides.

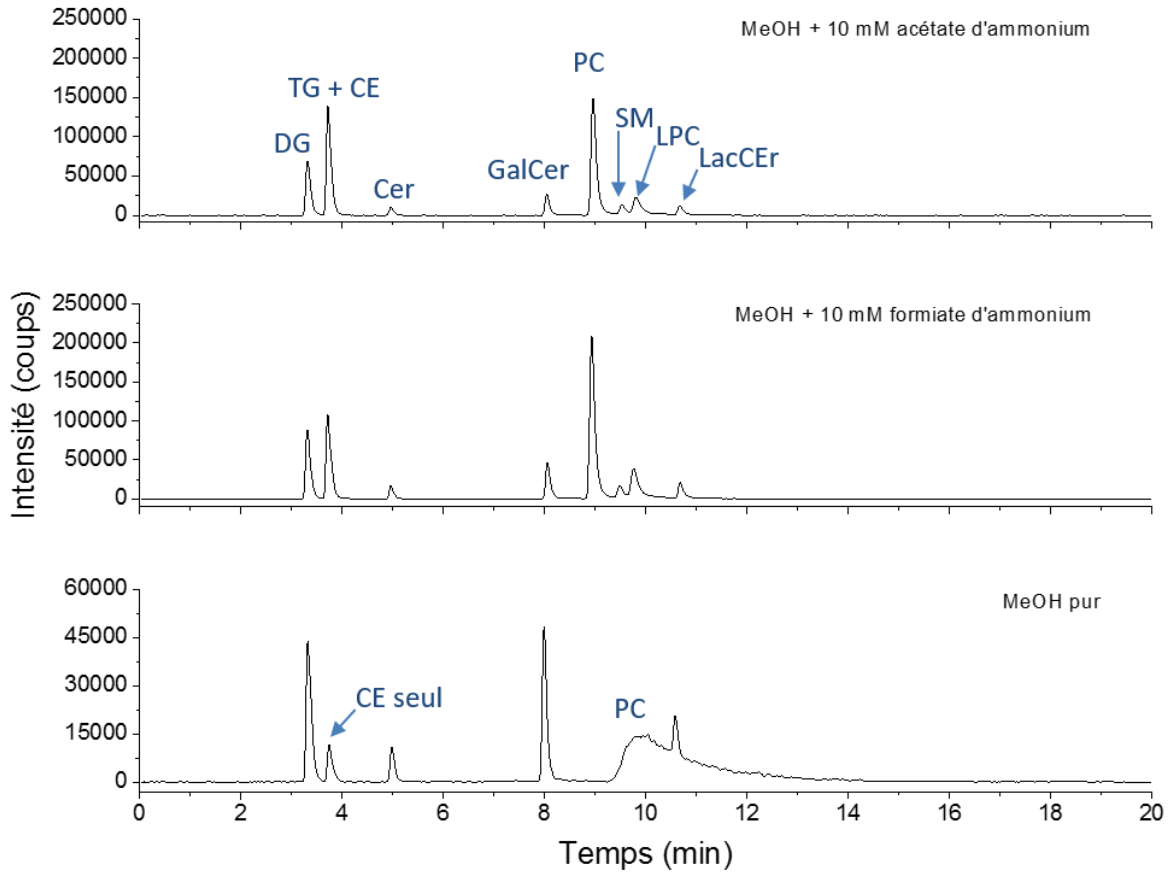


Figure 129 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne 1-AA.

L'utilisation de la colonne intégrant la phase stationnaire 1-AA permet d'observer huit pics chromatographiques lors de l'utilisation d'un additif. Il est cependant possible d'identifier 10 espèces. En effet, une seule co-élution est observée entre le CE et le TG, et le PE possède un temps de rétention de 9,8 min avec une intensité à 1000 coups. Le DG et le TG sont parfaitement séparés.

Une fois de plus la présence d'un sel est nécessaire à l'étude des PC, SM et LPC. Il est à noter que le sel contribue à une forme plus symétrique du pic du PC. En effet, en l'absence de sel, le PC est observable sous la forme d'un pic avec un phénomène de *tailing* important (Tr environ 10 min).

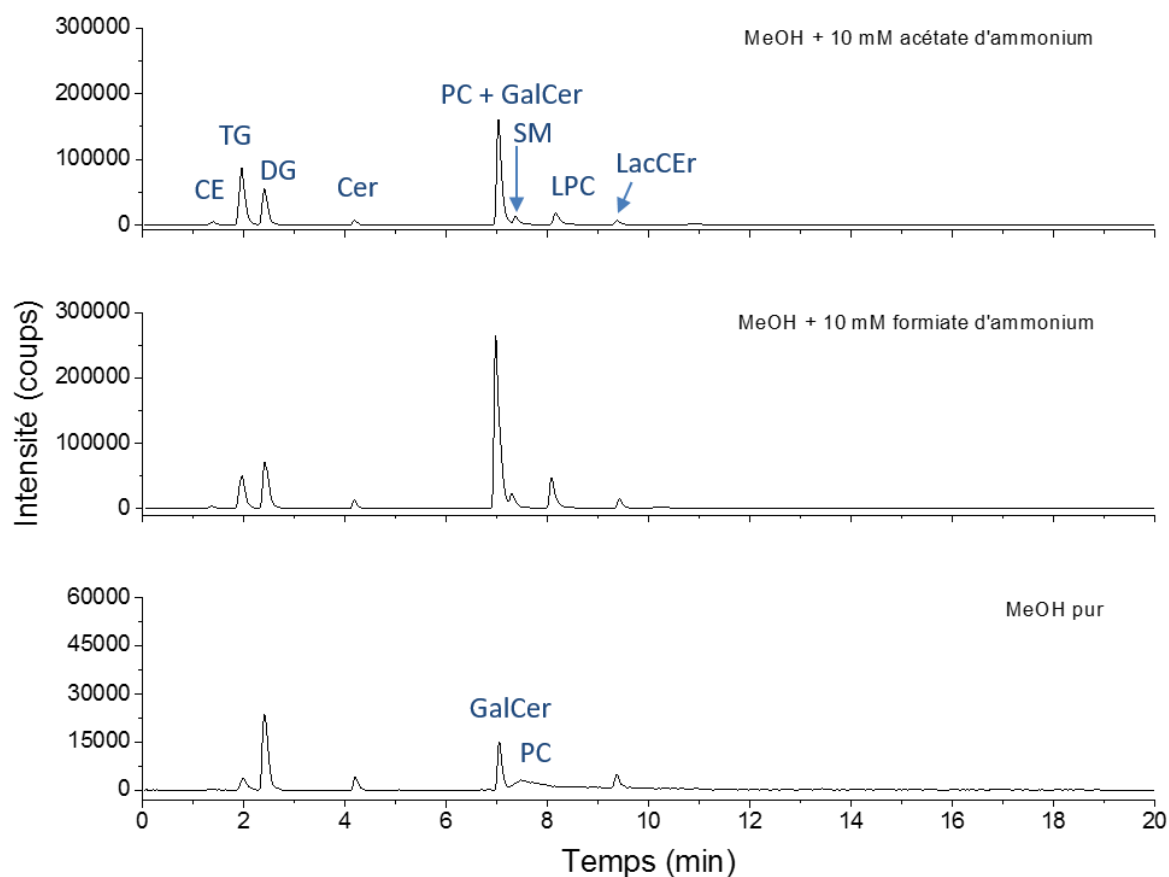


Figure 130 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne DEA.

L'utilisation de la colonne intégrant la phase stationnaire DEA permet d'observer huit pics chromatographiques lors de l'utilisation d'un additif. En regardant plus en détail, 10 lipides sont détectés. Le PC est co-élué avec le GalCer. Le PE est observé à 10,9 min avec une intensité trop faible (2000 coups) pour apparaître sur la somme des EIC. À nouveau le TG et le DG sont parfaitement séparés.

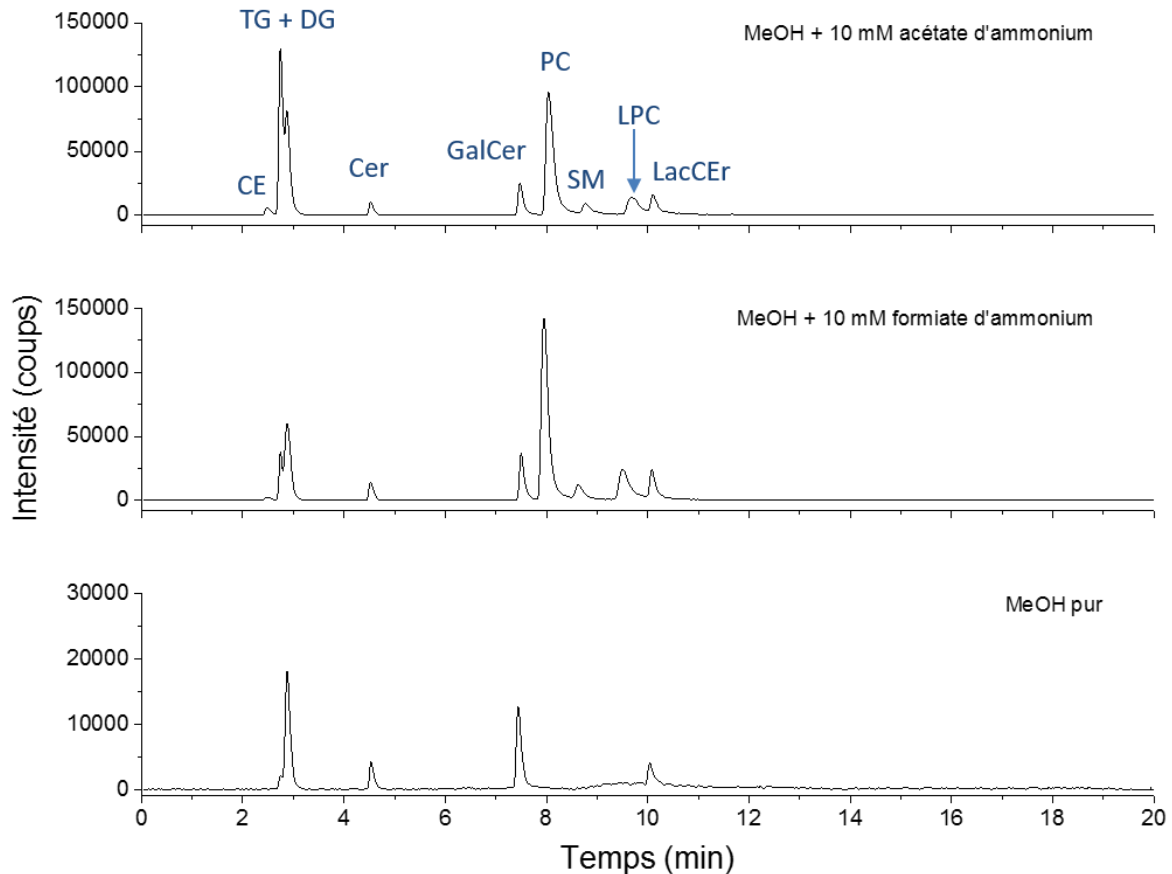


Figure 131 : Somme des EIC des espèces majoritaires obtenue en utilisant la colonne 2-PIC.

L'utilisation de la colonne intégrant la phase stationnaire 2-PIC permet d'observer huit pics chromatographiques lors de l'utilisation d'un additif. L'étude détaillée permet de mettre en évidence une forte co-élution entre le TG et le DG. Le PE est également co-élué avec le LacCer à 10,3 min (1000 coups).

Bilan du criblage de colonne : À l'exception de la colonne hypercarb[®], toutes les colonnes permettent la détection de 10 classes lipidiques. Les cinq colonnes restantes proposent malheureusement toutes des co-élutions dans les conditions testées. La co-élution la moins désirable est celle entre les DG et les TG puisqu'il serait alors impossible de faire la différence entre la fragmentation en source d'un TG et le DG correspondant. Les colonnes possédant cette co-élution (Si, 2-Pic, 2-EP) n'ont par conséquent pas été retenues pour la suite de notre étude.

Les deux colonnes restantes (1-AA et DEA) conduisent chacune à une co-élution totale (CE/TG et PC/GalCer, respectivement). La colonne DEA a finalement été retenue puisqu'il est facile de discriminer des GalCer par rapport à des PC grâce à la mesure de masse exacte.

3.3 Vérification de la séparation par classe

À ce stade, il est important de contrôler l'obtention d'une séparation par classe. En effet, le mélange de lipides ne comporte qu'un seul standard par classe. Il nous est donc pour le moment impossible d'affirmer que la séparation s'effectue bien par classe.

Afin de contrôler ce point, un extrait lipidique de plasma humain a été injecté sur la colonne DEA en utilisant de l'acétate d'ammonium est les conditions présentées dans le Tableau 47 : Caractéristiques des colonnes chromatographiques utilisées lors du criblage. Tableau 47.

Six classes lipidiques ont pu être détectées (TG, DG, Cer, PC, SM et LPC).

Remarque : Quatre classes détectées dans le mélange de standards ne sont pas observés sur l'échantillon réel. Les lipides sont connus pour leur mauvaise stabilité dans le temps. Or, notre échantillon a été conservé de longues années au congélateur (-20°C). Dans ce contexte, il serait intéressant d'injecter un échantillon frais. L'idéal serait d'utiliser un échantillon préalablement caractérisé par une méthode conventionnelle afin de connaître la liste des espèces présentes. À défaut d'échantillon frais, l'étude a été poursuivie en considérant les 6 classes détectées dans cet extrait lipidique de plasma humain.

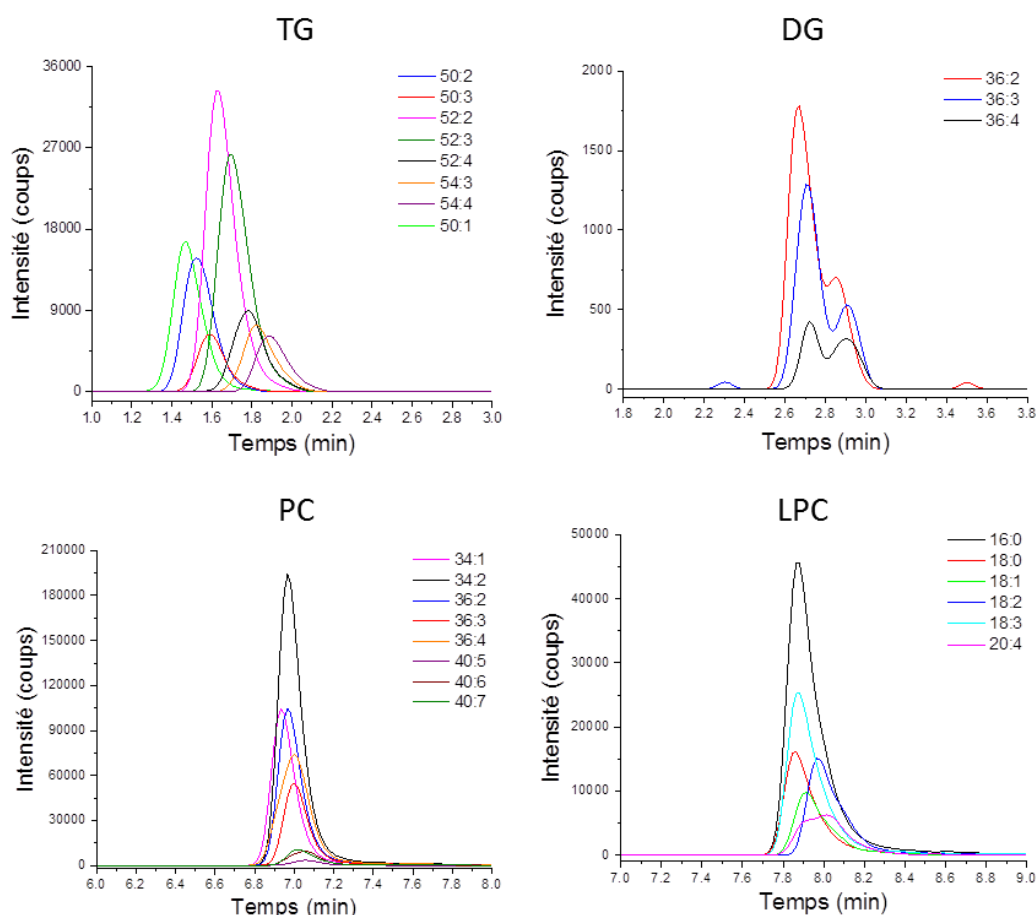


Figure 132 : EIC de plusieurs espèces appartenant à des classes lipidiques apolaires (TG et DG) et polaires (PC et LPC) dans l'extrait lipidique de plasma humain.

Les résultats obtenus pour deux classes lipidiques apolaires (TG et DG) et deux classes lipidiques polaires (PC et SM) sont présentés en Figure 132. La pertinence de la présence de ces lipides dans le plasma humain a été vérifiée grâce à la littérature [Quehenberger O. 2010].

En ce qui concerne les TG, un début de séparation par espèce est observé. Les temps de rétention augmentent à la fois avec la longueur des acides gras, à nombre d'insaturations constant, et avec le nombre d'insaturations, à longueur de chaîne constante. Cependant, toutes les espèces sont éluées dans une fenêtre de moins d'une minute, ce qui permet de considérer ce résultat comme étant tout à fait satisfaisant.

La même tendance est observée pour les DG où le temps de rétention augmente avec le nombre d'insaturation. Pour ces espèces, les trois EIC laissent apparaître l'esquisse de deux pics chromatographiques par rapport m/z . Il s'agit très probablement d'un début de séparation entre le

1,2-DG et les 1,3-DG. Ce résultat est très encourageant puisqu'une séparation chromatographique permettrait de discriminer ces différentes espèces avant une détection par spectrométrie de masse. Dans la suite de notre étude, des modifications de la méthode chromatographique seront entreprises afin de tendre vers une séparation plus résolue des 1,2-DG et 1,3-DG.

La colonne DEA propose ici une totale co-élution des PC d'une part et des LPC d'autre part. Les EIC correspondants aux SM (non présentés ici) conduisent aux mêmes observations. Le fait d'obtenir des temps de rétention très peu variables pour les PC et les SM est particulièrement intéressant. Ceci permet d'attribuer des structures plus facilement et en évitant de confondre le signal de la contribution isotopique d'un PC avec le signal d'un SM (Figure 133). L'extraction des spectres de masse correspondant à chacun de ces deux pics permet de caractériser la présence de plusieurs PC et SM (Figure 133, Tableau 50 et Tableau 51).

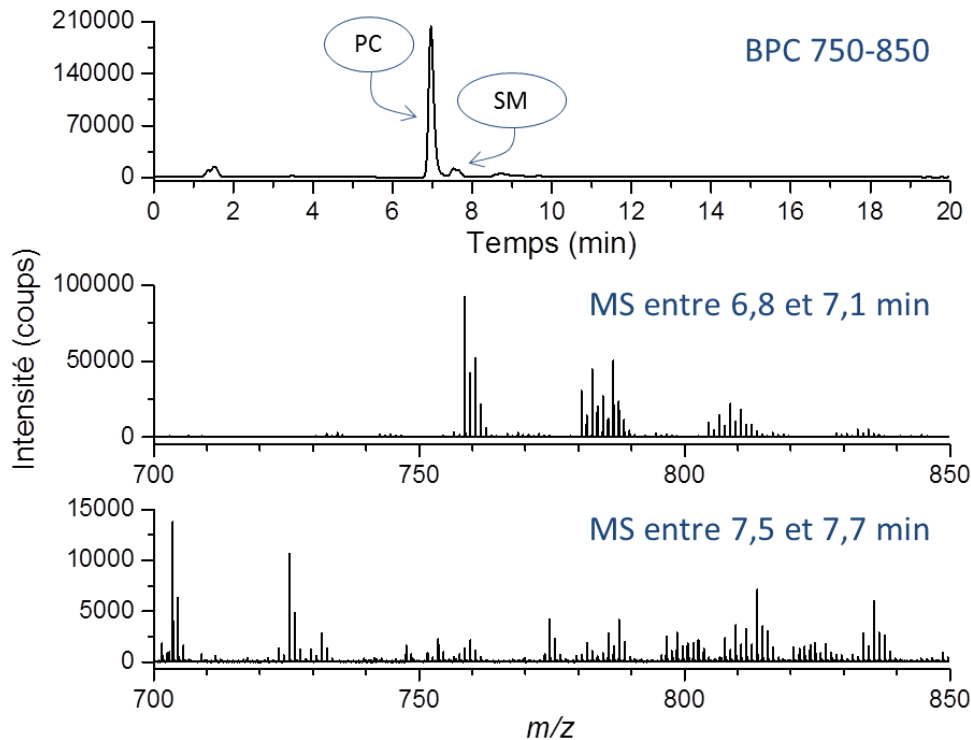


Figure 133 : BPC entre m/z 750 et 850 pour l'extrait lipidique de plasma humain et spectre de masse correspondants aux PC et aux SM de l'échantillon.

Lipide	[M+H] ⁺			[M+Na] ⁺		
	m/z théorique	m/z exp	Δ (ppm)	m/z théorique	m/z exp	Δ (ppm)
34:1	760,5861	760,5842	-2,5	782,5650	782,5684	4,3
34:2	758,5704	758,5697	-0,9	780,5519	780,5524	0,6
36:2	786,6017	786,6007	-1,3	808,5837	808,5830	-0,9
36:3	784,5861	784,5843	-2,3	806,5680	806,5678	-0,2
38:4	810,6017	810,5997	-2,5	832,5837	832,5829	-1,0

Tableau 50 : PC identifiés à partir du spectre présenté dans la Figure 133.

Lipide	[M+H] ⁺			[M+Na] ⁺		
	m/z théorique	m/z exp	Δ (ppm)	m/z théorique	m/z exp	Δ (ppm)
34:1	703,5758	703,5751	-1,0	725,5578	725,5570	-1,1
36:1	731,6071	731,6062	-1,2	753,5891	753,5884	-0,9
36:2	729,5915	729,5902	-1,8	751,5734	751,5713	-2,8
38:1	759,6384	759,6369	-2,0	781,6204	781,6190	-1,8
40:1	787,6698	787,6684	-1,8	809,6517	809,6504	-1,6
40:2	785,6541	785,6534	-0,9	807,6361	807,6355	-0,7
42:2	813,6854	813,6843	-1,4	835,6674	835,6658	-1,9
42:3	811,6698	811,6687	-1,4	833,6517	833,6510	-0,8

Tableau 51 : SM identifiés à partir du spectre présenté dans la Figure 133.

3.4 Les tests d'optimisations

Au cours de son stage de Master 2, Carlos Rincon a réalisé plusieurs tests afin de réduire le temps d'analyse tout en conservant la séparation. Certains des points qu'il a eu à traiter sont rapportés dans cette section.

3.4.1 Influence de composition de phase mobile

Différents co-solvants ont été testés : MeOH, EtOH, MeOH/ACN (1/1, v/v) et MeOH/IPA (1/1, v/v). Dans un premier temps, chaque co-solvant a été utilisé avec de l'acétate d'ammonium (10 mmol/L). L'utilisation de l'EtOH et des deux mélanges conduisent tous à augmenter les temps de rétention des lipides polaires. À titre d'exemple, le temps de rétention des PC est de 5,9 puis 9,2 puis 10,5 et enfin 11,8 min avec respectivement MeOH, MeOH/ACN, MeOH/IPA et EtOH. Les signaux des espèces apolaires ne subissent aucune modification. Au final, l'éthanol s'avère trop peu éluant. Les deux mélanges conduisent à un élargissement des pics (0,3 min de largeur à la base pour les PC avec MeOH contre 1 min avec MeOH/IPA). Le MeOH a donc été retenu comme co-solvant. Il conviendra tout de même de garder en mémoire la très forte amélioration de la séparation PC/SM/LPC obtenue lors de l'utilisation des mélanges dans le cas où une méthode spécifique devrait être mise au point.

3.4.2 Influence de l'additif

En plus des deux additifs utilisés lors du criblage (acétate d'ammonium et formiate d'ammonium), l'acide formique (0,1 %) a été testé en mélange avec le méthanol. Son utilisation n'a pas eu d'influence sur la réponse observée : le chromatogramme obtenu était semblable à celui obtenu sans additif (MeOH pur).

L'influence de la concentration en acétate d'ammonium a également été évaluée. La séparation a été effectuée à une concentration de 10, 20 puis 30 mmol/L. Comme observé lors du développement de la méthode d'analyse des nucléosides, la concentration en sel n'a pas influencé la réponse des lipides. Ce sel est donc nécessaire mais une faible concentration est préférable afin de limiter le risque de précipitation.

Pour finir, quelques pourcents d'eau (1 et 2 %) ont été ajoutés à la solution méthanolique d'acétate d'ammonium. L'ajout a permis une amélioration de la résolution chromatographique entre les PC et les SM. Celle-ci a évolué de 2,7 à 3,1 puis 3,7 pour 0, 1 et 2 % d'eau dans le co-solvant respectivement. Étant donné que le pic des PC présente un léger *tailing*, il est intéressant d'augmenter cette résolution. La méthode finale pourra donc intégrer 2 % d'eau.

3.4.3 Influence de la température du four à colonne

Notre attention s'est également portée sur la température optimale pour le four à colonne. Sept températures, réparties uniformément de 10 à 70°C, ont été testées. L'augmentation de la

température permet d'améliorer la séparation entre CE et TG. Ces derniers sont totalement co-élus de 10 à 40°C. Un début de séparation est obtenu à partir de 50°C. Cette séparation s'améliore alors jusqu'à 70°C pour atteindre une résolution chromatographique de 0,6. Cependant, l'augmentation de la température provoque une augmentation de la largeur de l'ensemble des pics chromatographiques (à l'exception des TG). À titre d'exemple la largeur à mi-hauteur des PC passe de 9 à 17 secondes entre 10 et 70°C.

La température influence également la viscosité et par conséquent les pertes de charges. Ainsi, la diminution de la température du four à colonne conduit à l'augmentation de la pression en tête de colonne (Figure 134). Bien que la limite instrumentale soit fixée à 600 bar, une température de 40°C a finalement été sélectionnée afin de ne pas dépasser les 500 bar à 35 % de méthanol dans la phase mobile.

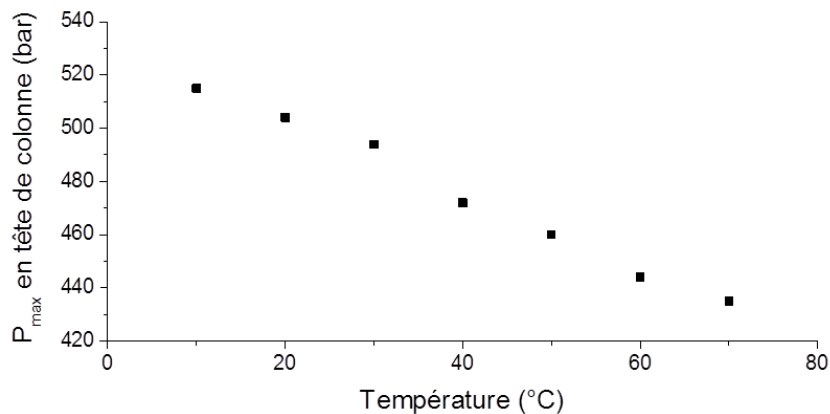


Figure 134 : Évolution de la pression maximale mesurée en tête de colonne en fonction de la température du four (co-solvant : 35 % de MeOH au maximum de la méthode utilisé pour cette étude).

3.4.4 Méthode finale

L'ensemble des étapes du développement de méthode permet de proposer la méthode chromatographique exposée dans le Tableau 52.

Paramètre	Valeur
Colonne chromatographique	DEA 150 x 2,1 mm ; 1,7 µm
Co-solvant	MeOH
Additif	Acétate d'ammonium (10 mM)
Débit	1 mL/min
Gradient (% de co-solvant)	0 min : 1 % ; 8 min : 35 % ; 10 min : 35 %
Température du four	40°C
Contre-pression	130 bar

Tableau 52 : Méthode SFC optimisée pour la séparation des lipides par classe.

3.4.5 Mise en place de la nouvelle interface de couplage SFC-MS

3.4.5.1 Considérations théoriques

La nouvelle interface est présentée dans le chapitre I section 4.2.2 ainsi que dans la section 3.1.4. Tel qu'il était configuré jusqu'alors, le système conduisait à envoyer l'ensemble de l'effluent chromatographique dans la source d'ionisation après son passage par le régulateur de contre-pression. Cette étape induit nécessairement des volumes morts extra-colonnes conduisant à un élargissement des pics.

Le nouveau système propose de s'abstenir du passage des analytes dans le régulateur de contre-pression avant détection. De cette manière les volumes morts extra-colonnes sont réduits significativement et la dispersion des pics chromatographiques diminue. Les pics résultants sont donc moins larges. Si dans le même temps l'aire reste la même, l'intensité augmente. Cependant, le régulateur de contre-pression reste essentiel au fonctionnement du système. Il est donc nécessaire de continuer à envoyer un flux dans ce régulateur. L'utilisation d'un diviseur de débit permet de faire un compromis. Une partie du flux est dirigée vers le spectromètre sans traverser le régulateur de contre-pression. L'autre partie est dirigée vers ce régulateur pour qu'il puisse fonctionner.

Le ratio de *split* dépendra alors de deux paramètres : la géométrie du tube reliant le *splitter* à la source d'ionisation (50 μm x 1 m dans notre cas) et la valeur de la contre-pression. Plus la contre-pression sera réglée à une valeur élevée, plus le débit vers le spectromètre sera important. Quoiqu'il en soit, la quantité d'analytes arrivant dans le spectromètre de masse est plus faible que lorsque l'ancien système était utilisé. Cependant, le gain escompté sur la largeur des pics devrait permettre de conserver un très bon rapport signal/bruit.

3.4.5.2 Considérations pratiques

D'un point de vue pratique, le diviseur de flux crée une fuite dans le système SFC. Si le débit de cette fuite est trop important, le régulateur de contre-pression n'arrive plus à maintenir la pression de consigne et le système cesse de fonctionner. Le moment le plus critique est la mise en service. Lorsque l'appareil est démarré, le régulateur de contre-pression se ferme tant que la pression de consigne n'est pas atteinte. Il a été constaté que le système échoue très souvent lors de cette étape de mise en route. Une parade consiste à boucher le capillaire de transfert relié à la source d'ionisation le temps que le système démarre. Le bouchon peut ensuite être retiré et le capillaire raccordé à la source.

3.4.5.3 Résultats préliminaires

Une fois le nouveau couplage en place, l'injection d'un échantillon de plasma a été réalisée à différentes valeurs de contre-pression. Seuls des résultats préliminaires sont actuellement disponibles.

Concernant les lipides apolaires, le *splitter* ne présente pas un réel atout pour TG et CE. En effet, les intensités obtenues se sont dégradées avec le changement de système (Figure 135). Cette tendance n'est cependant plus observée pour les DG où l'intensité obtenue est très proche de celle obtenue avec l'ancien système. Par ailleurs, la nouvelle interface tend à stabiliser le signal. Ce phénomène est illustré dans la Figure 136. En effet, sur le chromatogramme d'ions extraits des DG, le signal avec la nouvelle interface apparaît moins bruité. L'obtention de pics chromatographiques légèrement plus fins permet également d'augmenter la résolution chromatographique entre les 1,2-DG et les 1,3-DG qui atteint environ 1,2 dans le meilleur des cas. L'utilisation de deux standards permet également de déterminer l'ordre d'élution : 1,3-DG puis 1,2-DG.

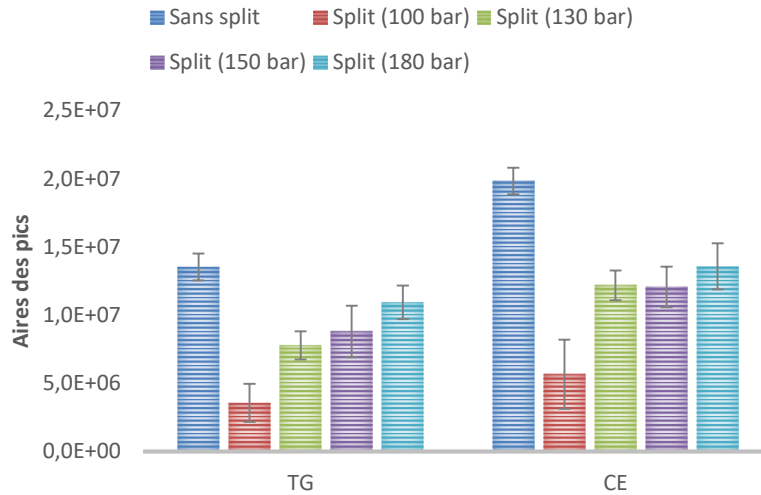


Figure 135 : Évolution des aires de pics des TG et CE avec l'ancien et le nouveau couplage SFC-MS. Pour le nouveau couplage, différentes valeurs de contre-pression ont été testées.

Concernant les lipides polaires, l'utilisation de la nouvelle interface permet d'obtenir des signaux plus intenses et plus fins. L'exemple le plus parlant est celui des PC (Figure 136) où l'intensité est doublée et la largeur à la base du pic est réduite de près de 40 %. Les mêmes observations sont faites pour les SM et les LPC. L'évolution de la sensibilité semble toutefois dépendre des composés puisque cette tendance est bien moins marquée pour ces derniers (Figure 137).

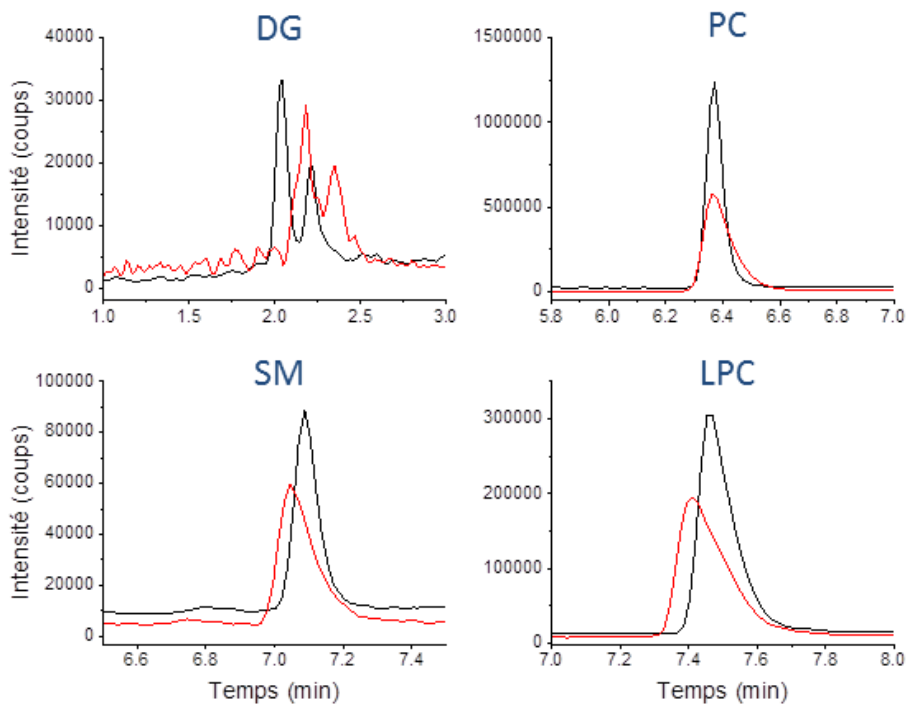


Figure 136 : Comparaison des réponses obtenues avec l'ancienne (rouge) et la nouvelle (noir) interface SFC-MS suite à l'injection de l'extrait lipidique de plasma.

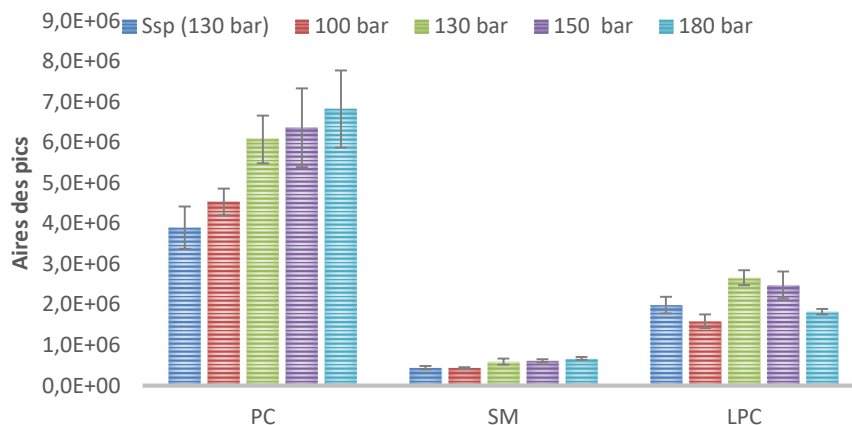


Figure 137 : Évolution des aires de pics des PC, SM et LPC avec l'ancien et le nouveau couplage. Pour le nouveau couplage différentes valeurs de contre-pression ont été testées.

4 Conclusion

Une nouvelle méthode chromatographique pour la séparation des classes lipidiques est sur le point d'être finalisée. À l'heure actuelle, la méthode chromatographique permet l'étude de 10 classes lipidiques (CE, TG, DG, Cer, PE, GalCer, PC, SM, LPC et LacCer) pour le mélange de standards grâce à l'utilisation d'une source *electrospray* en mode positif. Bien qu'il n'ait pour le moment pas été utilisé, le mode négatif permettra très certainement d'augmenter le nombre de classes accessibles. Les LPE et les Su sont notamment attendus dans ce mode. La méthode répond aux objectifs qui nous étaient fixés, à savoir, une très bonne séparation TG/DG, une distinction des 1,2-DG et des 1,3-DG et la séparation des PC et des SM.

L'injection d'un extrait de plasma a permis de vérifier la séparation par classe pour les TG, DG, PC, SM et LPC. Un seul CE a été détecté pour le moment. Il n'est donc pas possible de vérifier la séparation par classe pour ceux-ci. De la même manière aucun PE, GalCer ou LacCer n'a été détecté en mode d'ionisation positif. Notre échantillon ayant passé plusieurs années dans le congélateur, il serait intéressant d'en acquérir un nouveau avant de tirer des conclusions hâtives.

L'implémentation d'une nouvelle interface a été réalisée tout dernièrement. Bien que celle-ci ne soit pas encore totalement caractérisée, les premiers résultats semblent prometteurs. En effet, pour la majorité des composés, la nouvelle interface permet d'augmenter l'intensité observée. De plus, en réduisant la largeur des pics chromatographiques, cette interface permet d'augmenter les performances de l'instrument. Cependant, une nouvelle optimisation des paramètres de la source d'ionisation est à prévoir. En effet, les paramètres utilisés jusqu'alors avaient été optimisés pour un débit entrant d'environ 1 mL/min (effluent chromatographique et solvant make-up) mais l'utilisation du *splitter* conduit à des débits bien plus faibles à l'entrée de la source.

Dans un avenir proche, il conviendra de réaliser l'étude d'un plasma frais en mode positif et négatif. L'objectif est de lister toutes les classes accessibles grâce à notre méthode. Afin de nous aider dans ce travail, Benoit Colsch nous a fourni un set de fractions provenant d'un extrait lipidique de plasma humain. Ce fractionnement est réalisé sur des colonnes SPE depuis plusieurs années au sein de son laboratoire. La composition probable de chaque fraction est donc connue, ce qui s'avèrera d'une grande aide au moment de l'annotation des pics.

Dans un avenir plus lointain, il serait intéressant d'informatiser l'annotation des pics. Dans cet objectif, l'association d'un temps de rétention à une classe lipidique s'avèrerait être un véritable atout. Couplé à une méthode MS/MS automatique (*data depend*), ce type d'outil pourrait s'avérer très efficace pour la recherche de biomarqueurs ou pour l'étude du lipidome en général.

5 Références

A.

[Anand S. 2016] Anand S., Young S.A., Esplin M.S., Peadar B., Tolley H.D., Porter T.F., Varner M.W., D'Alton M.E., Jackson B.J., Graves S.W. *J. Lipid Res.* 2016; 57:687.

B.

[Bamba T. 2008] Bamba T., Shimonishi N., Matsubara A., Hirata K., Nakazawa Y., Kobayashi A., Fukusaki E. *J. Biosci. Bioeng.* 2008; 105:460.

[Beller M. 2010] Beller M., Thiel K., Thul P. J., Jäckle H. *FEBS. Lett.* 2010; 584:2176.

[Bligh E.G. 1959] Bligh E. G., Dyer W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37:911.

C.

[Cajka T. 2014] Cajka T. T., Fiehn O. *Trends Anal. Chem.* 2014; 62:192.

[Castro-Perez J.M. 2009] Castro-Perez L.M., Kamphorst J., DeGroot J., Lafeber|| F., Goshawk J., Yu Kate, Shockcor J.P., Vreeken R.J., Hankemeier T. *J. Proteom. Res.* 2010; 9:2377.

[Cifkova E. 2013] Cifkova E., Holcapek M., Lise M. *Lipids.* 2013; 48:915.

D.

[David P.A. 1989] David P.A., Novotny M. *J. Chromatogr.* 1989; 461:111.

[Deschamps F.S. 2001] Deschamps F. S., Lesellier E., Bleton J., Baillet A., Tchaplà A., Chaminade P. J. *Chromatogr. A.* 2004; 1040 :115.

F.

[Fahy E. 2009] Fahy E., Subramanian S., Murphy R. C., Nishijima M., Raetz C. R. H., Shimizu T., Spener F., Van Meer G., Wakelam M. J. O., Dennis E. A. *J. Lipid. Res.* 2009; 50:S9.

G.

[Gonzalez-Dominguez R. 2014] Gonzalez-Dominguez R., Garcia-Barrera T., Gomez-Ariza J.-L. *J Pharm. Biopharm. Anal.* 2018; 98:321.

[Gutnikov G.J. 1995] Gutnikov G. J. *Chromatogr. B.* 1995; 71:71.

H.

[Han X.L. 1994] Han X.L., Gross R.W. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994; 91:10635.

I.

[Imbert L. 2012] Imbert L., Gaudin M., Libong D., Touboul D., Abreu S., Loiseau P. M., Laprévôte O., Chaminade P. J. *Chromatogr. A.* 2012; 1242:75.

L.

[Laboureur L. 2015] Laboureur L., Ollero M., Touboul D. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16:13868.

[Li M. 2013] Li M., Feng B., Liang Y., Zhang W., Bai Y., Tang W., Wang T., Liu H. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013 ; 405 :6629.

[Lisa M. 2015] Lisa M., Holcapek M. *Anal. Chem.* 2015; 87:7187.

M.

[Méjean M. 2015] Méjean M., Brunelle A., Touboul D. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407:5133.

[Muro E. 2014] Muro E., Atilla-Gokcumen G.E., Eggert U.S. *Mol. Bio. Cell.* 2014; 25:1819.

N.

[Nothias L.-F. 2017] Nothias L.-F., Boutet-Mercey S., Cachet X., De La Torre E., Laboureur L., Gallard J.-F., Retailleau P., Brunelle A., Dorrestein P.C., Costa J., Bedoya L.M., Roussi F., Leyssen P., Alcami J., Paolini J., Litaudon M., Touboul D. *J. Nat. Prod.* 2017 In Press (10.1021/acs.jnatprod.7b00113)

O.

[Ong C.P. 1990] Ong C.P., Lee H.K., Li S.F.Y. *J. Chromatogr.* 1990;515:509.

Q.

[Quehenberger O. 2010] Quehenberger O, Armando A.M., Brown A.H., Milne S.B., Myers D.S., Merrill A.H., Bandyopadhyay S., Jones K.N., Kelly S., Shaner R.L., Sullards C.M., Wang E., Murphy R.C., Barkley R.M., Leiker T.J., Raetz C.R.H., Guan Z., Laird G.M., Six D.A., Russell D.W., McDonald J.G., Subramaniam S., Fahy E., Dennis E.A. *J. Lipids Res.* 2010; 51:3299.

S.

[Stephenson D. 2017] Stephenson D.J., Hoferlin A., Chalfant C.E. *Translat. Res.* 2017. In Press

V.

[Vernooij E.A.M. 2002] Vernooij E. A. A. M., Brouwers F. H. M., Jantina Kettenes-van den Bosch J., Crommelin A. J. A. *J. Sep. Sci.* 2002; 25:285.

W.

[White T. 1998] White T., Bursten S., Federighi D., Lewis R. A., Nudelman E. *Anal. Biochem.* 1998; 258:109.

[Wymann M.P. 2008] Wymann M.P., Schneider R. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2008; 9:162.

6 Annexe 1 : Structure des standards

Nom du lipide	Formule brute	Formule développée
DG 1,3 – 14:0 D5	$C_{31}H_{55}D_5O_5$	
TG 20:0/20:1/20:0	$C_{63}H_{115}D_5O_6$	
PA 12:0/12:0	$C_{27}H_{53}O_8P$	
LPA 14:0	$C_{17}H_{35}O_7P$	
PC 13:0/13:0	$C_{34}H_{68}NO_8P$	
LPC 11:0	$C_{19}H_{40}NO_7P$	
PE 12:0/12:0	$C_{29}H_{58}NO_8P$	
LPE 13:0	$C_{18}H_{38}NO_7P$	
PG 12:0/12:0	$C_{30}H_{59}O_{10}P$	

Nom du lipide	Formule brute	Formule développée
LPG 13:0	$C_{19}H_{39}O_9P$	
PI 18:0/18:0	$C_{45}H_{87}O_{13}P$	
LPI 13:0	$C_{22}H_{43}O_{12}P$	
PS 18:1/16:0 D31	$C_{40}H_{47}D_{31}NO_{10}P$	
LPS 13:0	$C_{19}H_{38}NO_9P$	
Cer d18:1/12:0	$C_{30}H_{59}NO_3$	
GalCer d18:1/12:0	$C_{36}H_{69}NO_8$	
LacCer d18:1/12:0	$C_{42}H_{79}NO_{13}$	
SM d18:0/12:0	$C_{35}H_{73}N_2O_6P$	

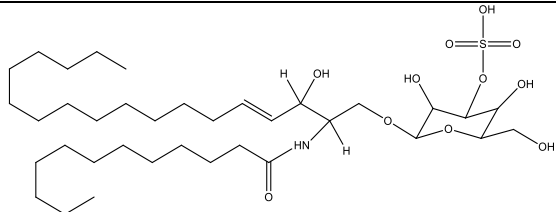
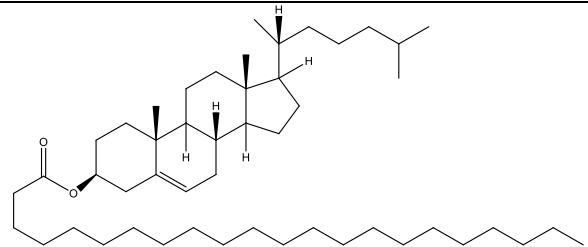
Nom du lipide	Formule brute	Formule développée
Su d18:1/12:0	$C_{36}H_{69}NO_{11}S$	
CE 22:0	$C_{49}H_{88}O_2$	

Tableau A1 : Structures des lipides utilisés pour développer la méthode chromatographique
[Méjean M. 2015]

CHAPITRE V

Conclusion générale

L'ensemble de ces travaux constitue la seconde thèse s'intéressant au couplage de la chromatographie en phase supercritique à la spectrométrie de masse à haute résolution au sein de notre laboratoire. Les projets abordés durant ces trois années ont eu pour but de promouvoir l'utilisation de la SFC en traitant des thématiques en lien avec les substances naturelles.

Dans un premier temps, le couplage a permis l'étude structurale des acétogénines d'Annonaceae contenues dans un extrait de gaines d'*Annona muricata*. Bien qu'ayant 25 ans d'expérience et riche d'une collaboration pérenne avec le laboratoire BioCis, et plus particulièrement avec le Professeur Pierre Champy, notre laboratoire est toujours à la recherche d'outils analytiques performants pour cette application. Une méthode SFC a d'abord été mise au point dans le but d'obtenir une séparation différente de celle obtenue en RPLC. La méthode finale propose une séparation 3 fois plus rapide que les méthodes précédemment développée au laboratoire par HPLC. Outre le gain de temps, cette méthode est aussi une source d'économie puisque le volume de déchets produits a été divisé d'un facteur 2. Grâce à l'expérience du laboratoire, une stratégie de cationisation post-colonne au lithium a été mise en place pour la première fois lors d'un couplage SFC-MS/MS. L'identification structurale de plusieurs acétogénines a permis de valider notre stratégie globale et l'ensemble de ces travaux a été publié dans *Phytochemical Analysis*. Cependant, l'identification d'espèces inconnues reste un challenge compte tenu de la très faible intensité de certains ions caractéristiques. Cette démarche reste manuelle et extrêmement chronophage. Une étude plus fondamentale, portant sur la caractérisation des adduits cationiques d'acétogénines, a été menée en parallèle des développements analytiques. Le but étant d'essayer d'apporter des éléments pour expliquer les différentes voies de fragmentation observées lors de la fragmentation des adduits cationiques d'acétogénines. L'une des hypothèses avancées propose un repliement particulier des acétogénines autour du lithium. La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse a donc été utilisée pour l'étude d'une série d'adduits d'annonacine et de squamocine. Les résultats montrent qu'un repliement particulier est obtenu uniquement dans le cas de la squamocine. En tout état de cause, ce repliement ne permet donc pas d'expliquer la fragmentation spécifique des adduits au lithium des acétogénines. Pour finir, un travail sur les adduits de cuivre a été initié. Les premiers résultats montrent que le cuivre induit également une fragmentation intéressante avec des intensités pour les ions fragments compatibles avec un traitement informatique. Cette approche constitue une perspective prometteuse sur la thématique « acétogénine » du laboratoire.

Dans un second temps, le laboratoire a souhaité tester les capacités de la SFC à séparer des composés polaires. En effet, bien que la littérature compte de plus en plus d'exemples en ce sens, aucune tentative n'avait jusqu'alors été réalisée à l'ICSN. Les nucléosides et nucléosides modifiés ont été choisis comme objet d'étude. Une fois encore, le laboratoire possède un recul de plusieurs années sur le sujet en HPLC-HRMS, notamment suite à des collaborations de David Touboul et Vincent Guérineau avec Sylvie Auxilien et Satako Yoshizawa du laboratoire I2BC. La méthode proposée a permis l'étude de modifications post-transcriptionnelles de deux échantillons réels pour un temps d'analyse de moins de 15 minutes. Plusieurs co-élutions n'ont pu être résolues *via* la SFC. Cependant, la spectrométrie de masse haute résolution a permis une discrimination des composés co-élus. Les résultats sont actuellement en cours d'acceptation dans *Journal of chromatography A*.

Les deux premiers projets proposaient chacun une séparation de composés de structures et de propriétés physicochimiques proches. Dans les deux cas, l'étude se portait sur des espèces ciblées. Le dernier projet que nous avons traité au cours de ces travaux a eu pour objectif de proposer une méthode d'analyse permettant l'étude de composés possédant des polarités différentes lors d'une même injection. Des extraits lipidiques de plasma humain ont été choisis comme objet d'étude, en collaboration avec Benoit Colsch (CEA Saclay). Bien qu'inachevée pour le moment, la méthode

actuelle permet la séparation des lipides par classe en moins de 20 minutes. Dix classes lipidiques ont pu être séparées par SFC grâce à la source ESI Jet Stream en mode positif. Les classes apolaires (TG, DG) sont détectées en début de chromatogramme et les classes polaires (PC, LPC, SM) sont éluées en fin d'analyse. Les résultats préliminaires nous tendent vers la mise en place d'une méthode de lipidomique non ciblée par SFC-HRMS/MS.

Enfin, d'un point de vue instrumental, le laboratoire a acquis très récemment une nouvelle interface pour le couplage SFC-MS. Ce nouveau couplage devrait permettre de réduire les volumes morts extra-colonnes, et de fait, d'augmenter les performances analytiques de l'instrument. Les résultats préliminaires sont tous à fait encourageants mais cette interface demande encore à être caractérisée dans les prochains mois. D'autre part, le laboratoire envisage d'acquérir un collecteur de fraction. Le but est de collecter les classes lipidiques suite à une séparation par SFC. Les fractions pourraient ensuite être injectées sur une méthode orthogonale dans le but de séparer les espèces moléculaires de chaque classe. Cette stratégie bidimensionnelle *off-line* constituerait un outil performant pour l'étude du lipidome de différents organismes vivants.

Au cours de ce travail, les capacités de la SFC, et celles de son couplage à la spectrométrie de masse, ont pu être établies. Cependant, il est important de signaler qu'à l'heure actuelle la SFC reste complémentaire de la LC dans notre laboratoire. En effet, pour le moment, la SFC représente une part marginale de notre activité chromatographique qui est essentiellement réalisée par HPLC. Aussi, outre la détermination de quelques limites de détection, seuls des aspects qualitatifs ont été traités dans ce manuscrit. Par la suite il serait très intéressant d'évaluer les possibilités quantitatives de manière plus systématique, afin d'évaluer notamment la robustesse des méthodes développées. À titre d'exemple, la séparation de nucléosides est beaucoup plus rapide en SFC mais très répétable en HPLC. La méthode utilisant la SFC a pu montrer certaines limites (surpressions régulières).

Titre : Profilage et élucidation structurale de produits naturels par chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse tandem haute résolution.

Mots clés : Chromatographie en phase supercritique, Spectrométrie de masse, Produits naturels, fragmentation en phase gazeuse

Résumé : Cette thèse vise à démontrer la pertinence de la chromatographie en phase supercritique (SFC) et de son couplage à la spectrométrie de masse tandem haute résolution (HRMS/MS) quant à l'étude de produits naturels en mélange complexe. Pour y parvenir trois projets ont été menés en parallèle.

Une méthode d'analyse structurale ciblée sur les acétogénines d'Annonaceae a été développée. Le recours à une cationisation post-colonne par des sels de lithium a permis d'obtenir les informations structurales recherchées. Des études ont également été menées quant à l'influence de la nature du cation sur la conformation de l'adduit formé et les voies de fragmentation observées.

Une séparation de composés polaires et ionisables a également été mise au point à

travers l'étude des nucléosides modifiés de l'ARN. La SFC-HRMS permet la séparation et l'étude d'un grand nombre de modifications et constitue donc un nouvel outil d'analyse pour le biologiste.

Pour finir, une étude en lipidomique globale a également été entreprise. Bien que préliminaires, les premiers résultats semblent très prometteurs avec pour but de développer des méthodes d'analyses non ciblées associés à des outils d'annotation automatique.

Pour chaque projet, la pertinence de nos approches a été vérifiée par l'étude d'échantillons réels et complexes permettant de tirer des conclusions réalistes quant aux possibilités de la SFC-HRMS/MS pour l'étude de composés naturels

Title : Profiling and structural elucidation of natural products using supercritical fluid chromatography and high resolution tandem mass spectrometry

Keywords : Supercritical fluid chromatography, Mass Spectrometry, Natural Products, gas-phase fragmentation

Abstract : This PhD work aims to demonstrate the relevance of supercritical fluid chromatography (SFC) and its hyphenation to high resolution tandem mass spectrometry (HRMS/MS) in the field of natural product analysis. Three different research projects were carried out.

A new strategy for structural analysis of Annonaceous acetogenins was developed by SFC and targeted HRMS/MS including post-column lithium cationisation to give access to the relevant structural information. Investigations were conducted to observe the influence of cations onto the gas-phase conformation and fragmentation pathways.

A separation of polar and ionisable compounds was also developed using modified nucleosides from RNA as models. The SFC-HRMS method led to the separation and analysis of several tens of modifications and demonstrated to be a new performant analytical tool for biologists.

Finally, a global lipidomic approach was optimized. Preliminary results look compatible with the development of untargeted approaches using automatic annotation tools.

For each project, the relevance of our work was evaluated analyzing complex samples to obtain a realistic point of view of the capabilities for SFC-HRMS/MS systems for natural product studies.

