UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Archive ouverte UNIGE
https://archive-ouverte.unige.ch

Thèse 2017

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Étude des différentes stratégies en spectrométrie de masse, couplée à la chromatographie liquide, pour l'analyse des métabolites polaires dans les cellules humaines, animales et végétales

Cudre Correia De Almeida, Sandrine

How to cite

CUDRE CORREIA DE ALMEIDA, Sandrine. Étude des différentes stratégies en spectrométrie de masse, couplée à la chromatographie liquide, pour l'analyse des métabolites polaires dans les cellules humaines, animales et végétales. Doctoral Thesis, 2017. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:107177

This publication URL: https://archive-ouverte.unige.ch/unige:107177
Publication DOI: 10.13097/archive-ouverte/unige:107177

© This document is protected by copyright. Please refer to copyright holder(s) for terms of use.

UNIVERSITÉ DE GENÈVE **FACULTÉ DES SCIENCES**

Section de chimie minérale et analytique
Spectrométrie de masse du vivant

Professeur G. HOPFGARTNER

Etude des différentes stratégies en spectrométrie de masse, couplée à la chromatographie liquide, pour l'analyse des métabolites polaires dans les cellules humaines, animales et végétales

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur ès sciences,

mention sciences pharmaceutiques

par

Sandrine Cudré Correia de Almeida

(Autigny, Fribourg)

Thèse N° 5128

Université de Genève
Genève
2017

UNIVERSITÉ
DE GENÈVE
FACULTÉ DES SCIENCES

DOCTORAT ÈS SCIENCES, MENTION SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Thèse de Madame Sandrine CUDRE CORREIA DE ALMEIDA

intitulée :

«Etude des différentes stratégies en spectrométrie de masse, couplée à la chromatographie liquide, pour l'analyse des métabolites polaires dans les cellules humaines, animales et végétales»

La Faculté des sciences, sur le préavis de Monsieur G. HOPFGARTNER, professeur ordinaire et directeur de thèse (Département de chimie minérale et analytique), Monsieur J. WOLFENDER, professeur ordinaire (Section des sciences pharmaceutiques), Monsieur C. JUNOT, docteur (Service de pharmacologie et immunoanalyse, Institut Jolliot, Université Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 22 septembre 2017

Thèse - 5128 -

Le Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives aux thèses de doctorat à l'Université de Genève".

Table générale des matières

Chapitre 1 : Introduction 13

Chapitre 2 : Etude de l'extraction des métabolites dans des matrices végétales et animales 57

Chapitre 3 : Séparation par chromatographie liquide et quantification par monitoring de réactions sélectionnées (SRM) des métabolites polaires dans les érythrocytes 205

Chapitre 4 : Stratégies d'utilisation des fenêtres variables SWATH pour l'amélioration de l'analyse des données métabolomiques 289

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives 351

Chaque chapitre contient une table des matières détaillée.

1. Introduction générale

1.1. Avant-propos

Cette thèse a pour objet l'analyse des cellules en tant que matrices biologiques grâce à la spectrométrie de masse couplée avec la chromatographie liquide. Ces cellules proviennent de plusieurs sources (végétales, animales, humaines). Des instruments hybrides de haute et basse résolution sont utilisés dans des études de quantification à la fois relative et absolue des métabolites polaires. Les thèmes liés aux modes d'acquisitions dépendants et indépendants des données sont discutés.

La littérature concernant la métabolomique est étendue, et souvent liée à des concepts plus vastes. Le développement des connaissances s'est opéré de manière parallèle dans de nombreux articles. C'est pourquoi la littérature représentative liée à la métabolomique a fait l'effort d'un choix orienté, afin de présenter de façon concise les concepts existants, ceci dans le but d'éviter de nombreuses redondances. Les choix ont été faits de manière éclairée et consciencieuse afin de refléter au maximum les connaissances à ce propos.

1.2. Structure de la thèse

La thèse est divisée en cinq chapitres.

Le premier chapitre de cette thèse introduit les concepts de l'analyse métabolomique et des approches ciblées versus approches non ciblées. Les matrices cellulaires, leurs particularités ainsi que la définition de métabolites polaires endogènes et les propriétés physicochimiques y référant sont exposées. Ensuite, les moyens analytiques existants, et mis en place, afin de réaliser une préparation d'échantillon, de séparer et d'analyser les métabolites polaires provenant de ces matrices biologiques cellulaires sont présentés. Enfin, un résumé des moyens statistiques et des logiciels utilisés pour traiter les données est décrit.

Le second chapitre est divisé en trois parties qui s'enchaînent sur le thème de la préparation d'échantillon. La première partie traite de la préparation d'échantillons unicellulaires d'origine végétale, et du moyen le mieux adapté afin d'accéder au contenu

intracellulaire. La lyse est quantifiée à l'aide de la cytométrie de flux. La seconde partie, via une approche ciblée et non ciblée, évalue quatre préparations d'échantillons utilisant l'extraction liquide-liquide sur trois types de matrices (cellules d'algues, cellules sanguines et tissus hépatiques bovins). La haute résolution, par l'utilisation d'un quadrupôle temps de vol (TTOF 5600 ABSciex), apporte une information qualitative et quantitative (QUAL/QUANT). Le mode d'acquisition SWATH (acquisition de tous les ions théoriques par fenêtres séquentielles) est utilisé afin d'identifier un maximum de métabolites. Le but est de déterminer quelle préparation d'échantillon est la plus adaptée à une étude métabolomique de la fraction polaire. La troisième partie utilise les connaissances définies dans les parties précédentes (une et deux), et étudie l'effet au niveau des métabolites polaires d'algues unicellulaires, exposées à des concentrations de cuivre supérieures, aux conditions standards, pendant une durée de 2 heures et de 48 heures.

Le troisième chapitre est axé sur la quantification absolue des métabolites polaires dans des érythrocytes et des hépatocytes humains. Ce chapitre est à son tour divisé en trois parties. La première partie étudie la chromatographie liquide pour séparer les métabolites polaires. La rétention des métabolites polaires est évaluée en comparant deux types de chromatographie, la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC), et la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC). Il s'avère que la RPLC n'est pas adaptée à la rétention des composés polaires et que la HILIC, bien qu'étant mieux adaptée, est plus difficile à mettre en place rapidement, et n'a pas donné les résultats attendus en termes de stabilité, de forme de pic et de temps d'analyse. C'est pourquoi la RPLC est utilisée avec l'ajout d'un agent d'appariement d'ions et permet la rétention des métabolites polaires afin d'être quantifiés. La seconde partie traite de la quantification absolue des métabolites polaires dans des érythrocytes humains sains, et dans des érythrocytes infectés, par le parasite de la malaria (*P. falciparum*). Les métabolites polaires, provenant de quantités croissantes (10^5-10^7 cellules) d'hépatocytes humains, cultivés à partir d'une lignée cellulaire cancéreuse (HepG2), sont aussi quantifiés, afin de déterminer, la quantité cellulaire minimale nécessaire, dans le but de réaliser une quantification sur des cellules hépatiques infectées par le parasite. Enfin, la troisième partie étudie un nombre supérieur de métabolites (52), et quantifie 21 d'entre eux dans des globules rouges sains et infectés, et ayant subi, ou non, une étape supplémentaire de saponification. L'étude du recouvrement de ces métabolites, lors de la préparation d'échantillon, est abordée mais s'avère peu reproductible.

Le quatrième chapitre concerne la technique d'analyse par spectrométrie de masse. En effet, un quadrupôle - temps de vol (TTOF 5600 ABSciex), en mode d'acquisition SWATH, permet de réaliser des études pour lesquelles le mode est indépendant des données (DIA). Ce mode va fragmenter tous les ions présents, et ceux-ci seront répartis entre différentes fenêtres. Ce chapitre s'intéresse à la façon de créer ces fenêtres et d'en faire varier la taille, afin d'améliorer l'identification de métabolites polaires dans des érythrocytes bovins.

Le chapitre 5 est une synthèse des chapitres précédents et aborde des perspectives du point de vue de la métabolomique, des bases de données et des stratégies analytiques mises en place pour l'étude des métabolites.

2. Liste des abréviations

API	Atmospheric Pressure Ionization, ionisation à pression atmosphérique
AUC	Area Under the Curve, aire sous la courbe
CE	Collision Energy, énergie de collision
CES	Collision Energy Spread, variation d'énergie de collision
DDA	Data Dependant Acquisition, acquisition dépendante des données
DIA	Data Independant Acquisition, acquisition indépendante des données
DP	Declustering Potential, potententiel de séparation des groupements
ESI	Electrospray Ionization, ionisation par électrospray ou électronébulisaiton
FCM	Flow Cytometry
FSC	Forward Scatter
GR	Globules Rouges
HILIC	Hydrophilic Liquid Interaction Chromatography, chromatographie liquide d'interactions hydrophiles
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry, spectrométrie de masse à haute résolution
IDA	Information Dependant Acquisition, acquisition dépendante des informations
IPC	Ion Pairing Chromatography, chromatographie par paire d'ions
LC	Liquid Chromatography, chromatographie liquide
MS	Mass Spectrometry, spectrométrie de masse
PCA	Principal Composant Analysis, analyse en composante principale
PCVG	Principal Component Variable Grouping, analyse en composante principale par groupement de variables
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography, chromatographie liquide en phase inverse
SFC	Supercritical Fluid Chromatography, chromatographie en phase supercritique
SSC	Side Scatter
SRM	Selected Reaction Monitoring, monitoring de réactions sélectionnées
SWATH	Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra, Acquistion par fenêtres séquentielles de tous les spectres de masse théoriques
TIC	Total Ion Current, courant ionique total

TOF	Time Of Flight, temps de vol
XIC	Extracted Ion Chromatogram, chromatogramme extrait selon un ion

N’attendez pas que les orages passent …
Apprenez à danser sous la pluie !

« La vie c’est comme une bicyclette,
il faut avancer pour ne pas perdre l’équilibre »

Albert Einstein

« Un pessimiste fait de ses occasions des difficultés,
un optimiste fait de ses difficultés des occasions. »

Antoine de Saint-Exupéry

« Si vous jugez un poisson sur ses capacités à grimper aux arbres, il passera sa vie à croire qu’il est stupide »

Albert Einstein

Chapitre 1:

Métabolomique ;

Introduction du processus analytique à partir de la préparation d'échantillons biologiques cellulaires et tissulaires jusqu'au spectromètre de masse et à l'analyse des données

Table des matières - Chapitre 1

1. Métabolomique 17
1.1. Histoire et définition de la métabolomique 17
1.2. La métabolomique en 2017 19
1.3. Enjeux de l'étude du métabolisme 20
2. Approches analytiques ciblées versus non ciblées 22
2.1. L'hypothèse biologique reliée à l'étude des métabolites 23
3. Matrices biologiques 24
3.1. Les globules rouges 25
3.2. Le tissu hépatique 27
3.3. Les cellules d'algues unicellulaires 27
4. Définition et particularités des métabolites endogènes cellulaires 28
4.1. Métabolites endogènes polaires / apolaires 29
5. La préparation des échantillons biologiques en métabolomique 30
5.1. Conditions préalables à la préparation d'échantillons 30
5.2. Préparation d'échantillons 30
6. Plateformes analytiques utilisées en métabolomique 32
7. Techniques séparatives 35
7.1. Séparation par chromatographie gazeuse 35
7.2. Séparation par chromatographie liquide 35
7.3. Chromatographie en phase supercritique (SFC) 39
8. Spectrométrie de masse 39
8.1. Utilisation de la basse résolution en analyse métabolomique 41
8.2. Utilisation de la haute résolution (HRMS) en analyse métabolomique 41
8.3. Suppression ionique dans la source 41
9. Traitement statistique des données métabolomiques 42
9.1. Analyse en composante principale (PCA) 44
9.2. Analyse en composante principale par groupement de variables (PCVG) 45
10. Logiciels utilisés pour le traitement des données 46
10.1. PeakView 46
10.2. MasterView 47
10.3. LibraryView 50
11. Références 51

1. Métabolomique

1.1. Histoire et définition de la métabolomique

Le terme « métabolomique » aussi nommé « métabonomique » [1] est apparu dans la littérature en septembre 1998, et décrit par Oliver ainsi que par Tweeddale [2-4]. Toutefois, les études en tant que telles sont réalisées depuis le début du 20ème siècle, secondées par l'émergence de nouvelles techniques analytiques telles que la spectroscopie UV ainsi que par la spectrométrie de masse [3, 5]. La métabolomique est l'analyse au niveau moléculaire de l'ensemble des métabolites, c'est-à-dire des petites molécules ayant un poids inférieur à 1500 Da [6]. Le nombre de publications comprenant le terme métabolomique ou métabonomique est en constante augmentation depuis son apparition à la fin des années 1990 (Figure 1).

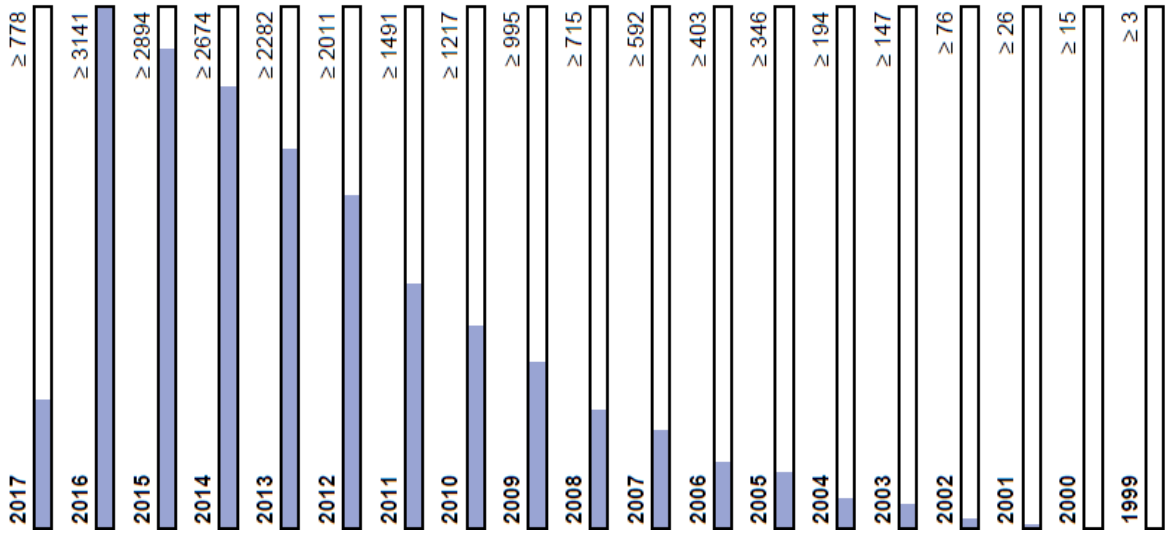


Figure 1: Recherche effectuée le 16 mars 2017 sur SciFinder web comprenant les résultats contenant le terme et le concept metabolomic. Selon les critères MeSH, le terme metabolomic comprend aussi le terme metabonomic ainsi que metabolomics.

Le métabolome a été défini comme étant le regroupement de façon quantitative et qualitative de l'ensemble des molécules ayant un faible poids moléculaire présent dans la cellule. Ces molécules sont impliquées dans les réactions métaboliques générales et dans celles qui sont nécessaires au maintien, à la croissance et aux fonctions cellulaires [7]. Le métabolome est le produit final de la cascade biologique, et donc le dernier maillon de l'expression du phénotype [6], [8]. Le nombre admis de métabolites est moins grand que celui de gènes, et ceci donne un avantage à l'étude des métabolites [2].

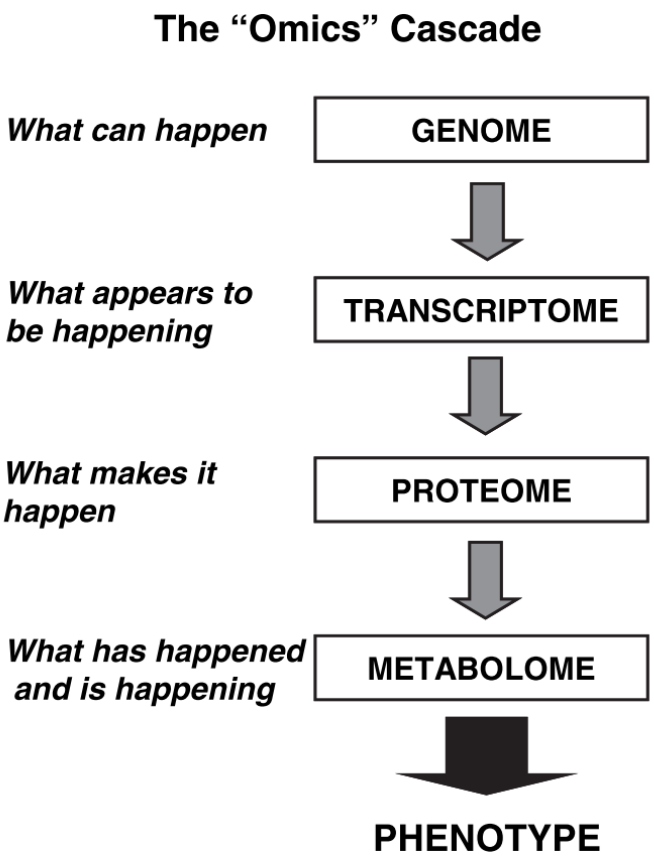


Figure 2: La cascade "omique", reproduite avec l'autorisation de [8]

L'expression du métabolome étant directement reliée au phénotype, elle constitue un choix idéal pour l'étude des systèmes biologiques et des interactions aux différents niveaux moléculaires [6, 8, 9] (figure 2). C'est en quelque sorte une photographie de l'état d'un système à un temps « t » extrêmement précis. Les métabolites sont constamment transformés et utilisés dans les cascades biologiques, ce qui entraîne un équilibre qui peut être à tout moment, et très rapidement perturbé afin de modifier l'état de la cellule et donc la réponse biologique.

Le métabolome possède une grande variabilité d'expression, contrairement au protéome et au transcriptome. Ces changements de concentration peuvent être de l'ordre d'un millimolaire par seconde [10]. Il est aussi donné que des variations au niveau des gènes ou de la transcription d'un individu à l'autre n'ont qu'une influence relativement petite au niveau des flux métaboliques. Cependant, ils peuvent avoir un effet au niveau des concentrations des métabolites [5]. De plus, de nombreux métabolites sont communs à de nombreuses espèces, c'est pourquoi il est possible de dire que leur étude est plus générique en ce sens. Les propriétés chimiques (pKa, logP) rencontrées lors de l'analyse des métabolites sont très grandes [11].

1.2. La métabolomique en 2017

La recherche pharmaceutique et médicale tend actuellement vers une médecine dite « personnalisée », et qui considère les spécificités individuelles. Outre la prise en compte des variations du métabolisme propres à l'individu, la recherche tend à inclure des facteurs externes à l'individu et à le placer dans un contexte plus large. On parle d'influences extérieures telles que la « métabolomique environnementale » [12] ou encore du terme « d'exposome » [13, 14], qui fait référence à l'ensemble des xénobiotiques auxquels un individu est exposé et accumule durant sa vie [5].

L'analyse des métabolites souffre cependant encore de l'absence de moyens pour normaliser les résultats obtenus, principalement au niveau du traitement (prélèvement, analyse) des échantillons. Les variations inter et intra laboratoires sont un sujet d'actualité : il s'agit d'obtenir les résultats les plus robustes et reproductibles possibles [15, 16].

> The measurement of single metabolites as a source of information related to health and disease has a long history that precedes the introduction of metabolomics and acronyms such as metabolomics, body fluid profiling, metanomics, metabonomics, metabolic profiling, etc. (Oliver et al., 1998; Raamsdonk et al., 2001; Lindon, Holmes, & Nicholson, 2003; Ramsden, 2009). The terminology is not relevant for the content. As stated by Juliet in Shakespeare's Romeo and Juliet, "*What's in a name? That which we call a rose by any other name would smell as sweet*" (Shakespeare, 1594).

Figure 3: Citation reprise sans modifications et avec autorisation [17]

L'étude des métabolites est découpée en de nombreuses catégories qui ne sont pas toujours adoptées par tous les laboratoires et peuvent souvent prêter à confusion. Plusieurs revues, notamment celles de M. R. Mashego [3] K. Dettmer [8] et de J-L. Wolfender [18], ont défini de manière plus rigoureuse les catégories d'analyses des métabolites. Ces différentes catégories ont été résumées dans la figure suivante.

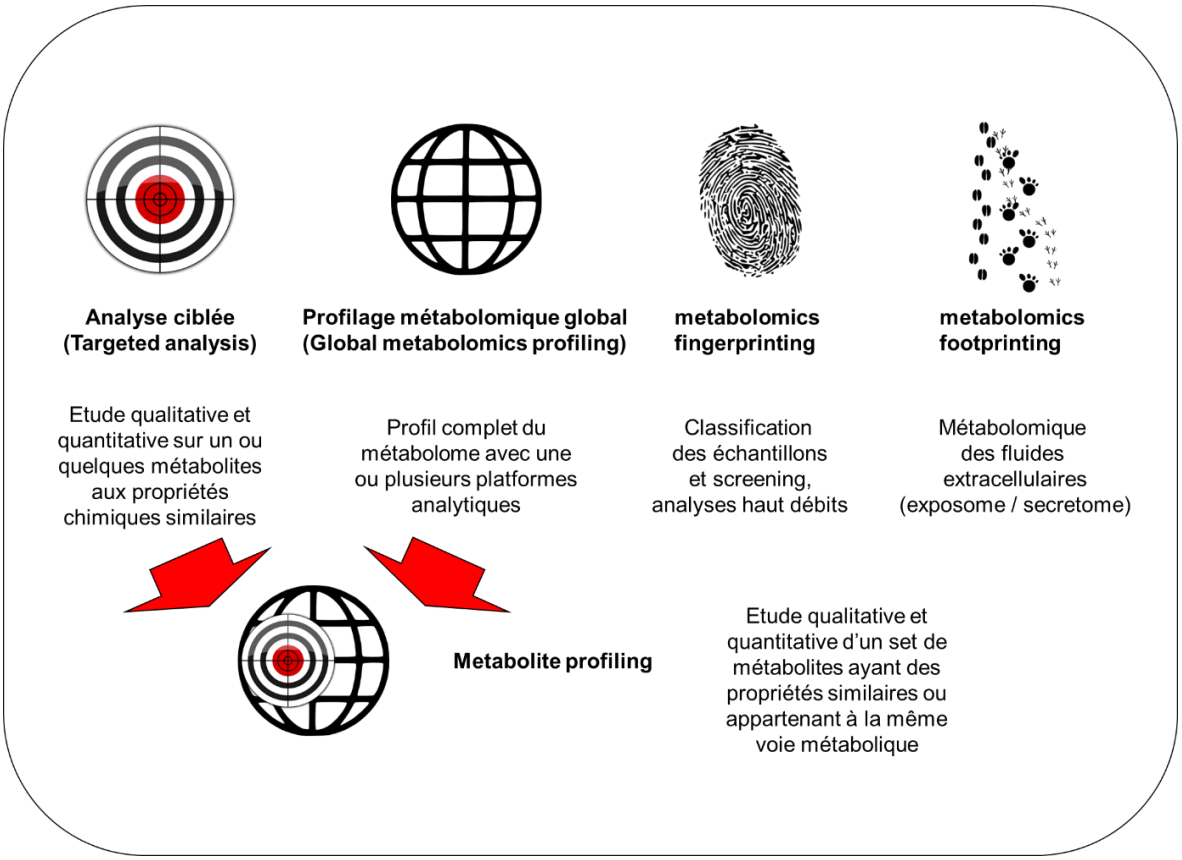


Figure 4: Appellations et termes utilisés couramment pour qualifier les études métabolomiques, figure inspirée des références [3, 7, 18-21]

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'analyse ciblée d'un nombre défini de métabolites et dans le profilage métabolomique, c'est-à-dire de la caractérisation des métabolites dans une voie métabolique donnée, comme par exemple la voie de l'acide citrique. Cette diversité de propriétés chimiques et les implications lors des procédures analytiques sont abordées dans le point suivant concernant la préparation d'échantillons (chapitre 2).

1.3. Enjeux de l'étude du métabolisme

Selon Nicholson [1], les enjeux des études métabolomiques se situent soit au niveau de l'individu par l'apport que représente la médecine personnalisée, soit dans un contexte plus global, au niveau d'une population (voir figure 5). Les enjeux sont, dans ce deuxième cas, épidémiologiques et concernent la santé publique. Le troisième angle d'approche concerne la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

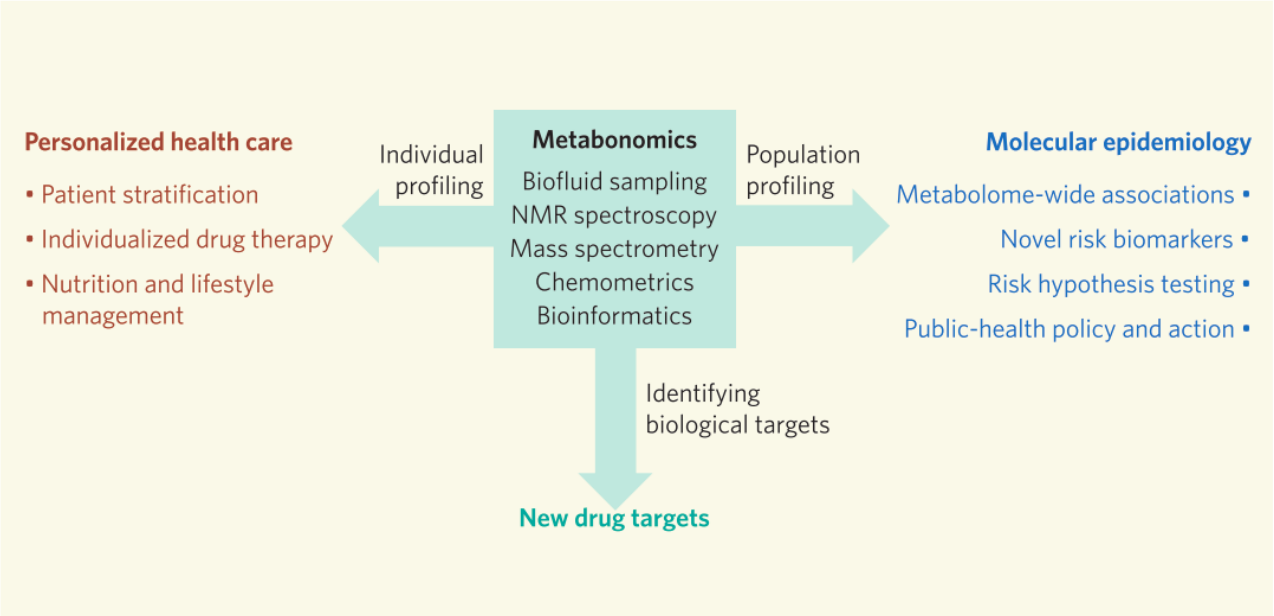


Figure 5: Les enjeux de la métabolomique, adapté avec l'autorisation [1]

Le but principal de toute étude métabolomique est d'obtenir un seul, ou un ensemble de biomarqueurs propres à définir un état pathologique ou spécifique à un système biologique donné, dans des conditions précises. Par exemple, l'analyse chez les nouveau-nés des acides aminés par screening néonatal permet de mettre en évidence des maladies métaboliques telles que la phénylcétonurie. En effet, cette maladie est dépistée grâce à l'apparition d'une concentration anormalement élevée de phenylalanine [22].

Une déficience en glucose 6-phosphate déshydrogénase, dont la prévalence au niveau mondial représente plus de 400 millions de personnes, provoque des altérations majeures au niveau du métabolisme. Cette enzyme est capitale pour l'activité antioxydante des globules rouges [23].

Le métabolisme étant sujet à de nombreuses variations inter et intra-individu [15], il est parfois difficile d'y relier directement une cause ou une maladie [1]. Par exemple, l'effet du moment du prélèvement des échantillons biologiques a déjà été mis en évidence. En effet, au sein du même individu, des variations au cours de la journée matin/soir [24], nuit/jour, l'influence des repas [25] et de l'activité physique ont été rapportées.

2. Approches analytiques ciblées versus non ciblées

Les analyses sont conduites selon une hypothèse biologique [8]. Cependant, deux types d'approches sont couramment évoqués [20, 26]. Ces termes sont définis par l'analyse ciblée et non-ciblée des métabolites, cela si on se place du point de vue strictement analytique. T. Cajka [20] a démontré que la frontière entre ciblé et non ciblé est parfois très ambiguë. Ceci est résumé dans la figure 6.

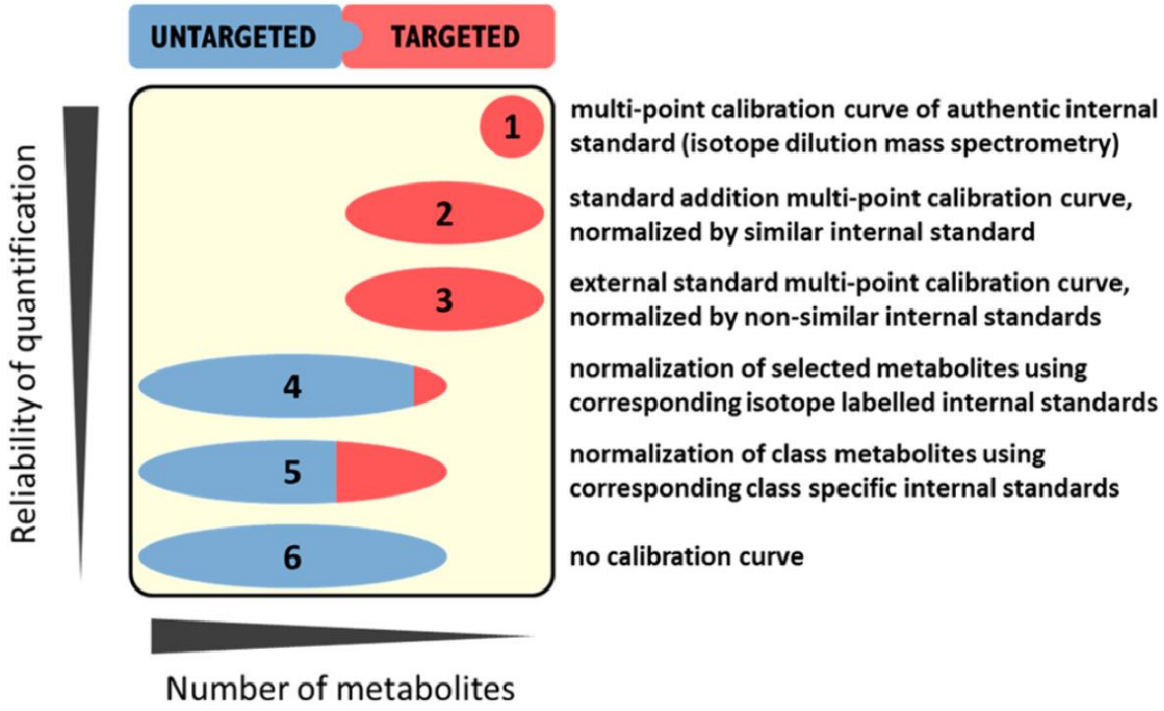


Figure 6: Méthodes ciblées et non-ciblées en métabolomique/lipidomique en relation avec le nombre de métabolites détectés et la fiabilité des résultats quantitatifs, reproduit avec autorisation de [20]

Plus l'analyse comporte un grand nombre de métabolites étudiés, plus le lien à la quantification absolue est diminué. En effet, il devient plus compliqué d'avoir des standards et des courbes de calibration pour chacun des métabolites. L'analyse ciblée est synonyme d'un nombre restreint de métabolites, dans le but d'une quantification absolue (figure 6). Outre le fait de parler d'analyse ciblée et non ciblée, il faut tenir compte de l'aspect de la quantification relative ou absolue, ainsi que de l'identification de tous les métabolites, ou alors seulement de ceux qui seraient les plus représentatifs.

La qualité analytique des mesures effectuées est directement corrélée au nombre de métabolites analysés. Une méthode optimisée et dédiée à une certaine classe de molécules va indubitablement produire des données de haute qualité. Le profilage d'une

large gamme de métabolites sera automatiquement un compromis du point de vue des méthodes employées. La qualité des données ne sera ainsi pas homogène entre les analytes. L'approche par métabolomique dite « fingerprint », permet de couvrir une plus large gamme de composés, mais est cependant particulièrement vulnérable aux artefacts qui pourraient mener à des conclusions erronées. Aucune approche proposée en métabolomique n'est pleinement satisfaisante et les taux d'identification, tout comme la quantification des métabolites, dépendent de la précision, de l'exactitude et de la sensibilité des méthodes analytiques employées [9]. Ce compromis est décrit à la figure 7.

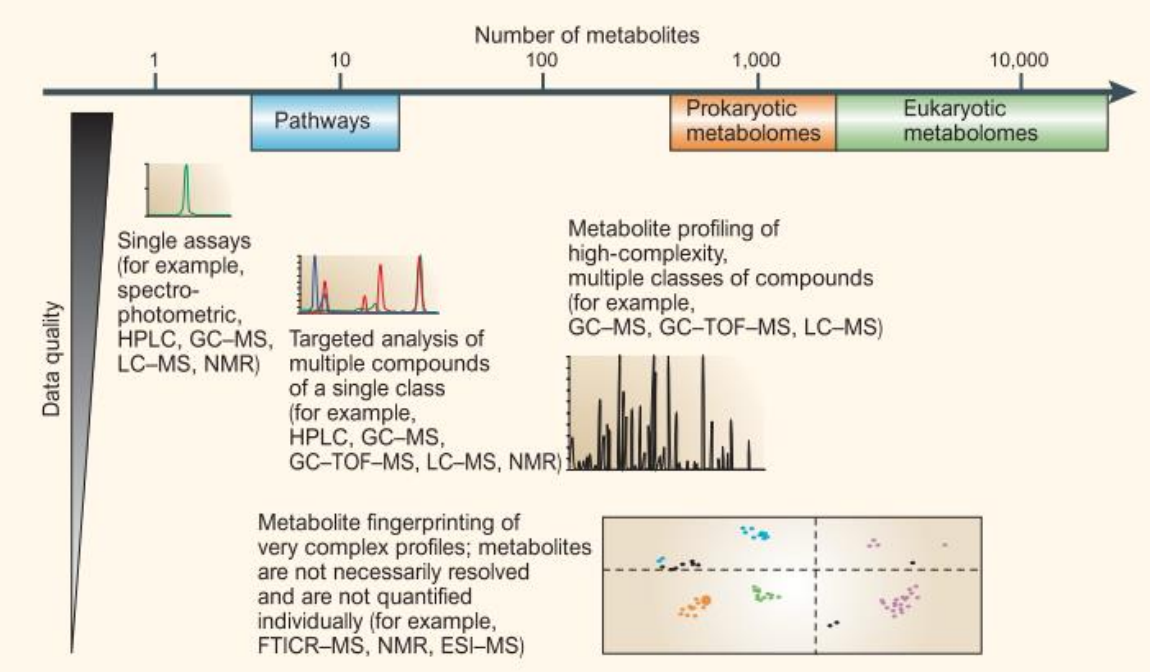


Figure 7: Compromis entre le recouvrement métabolique et la qualité des analyses métaboliques, tiré de [9] avec autorisation

2.1. L'hypothèse biologique reliée à l'étude des métabolites

Le cycle des études métabolomiques est le même que le cycle du savoir décrit par Kell en 2004 [27]. En effet, que l'approche soit ciblée ou non, elle est toujours dirigée par une hypothèse biologique de départ, à savoir un état pathologique, une confrontation à un environnement particulier ou la relation entre un état X et Y. Les analyses réalisées mènent à des données, qui sont transformées, et les résultats sont confrontés à l'hypothèse de départ. C'est un cycle continu.

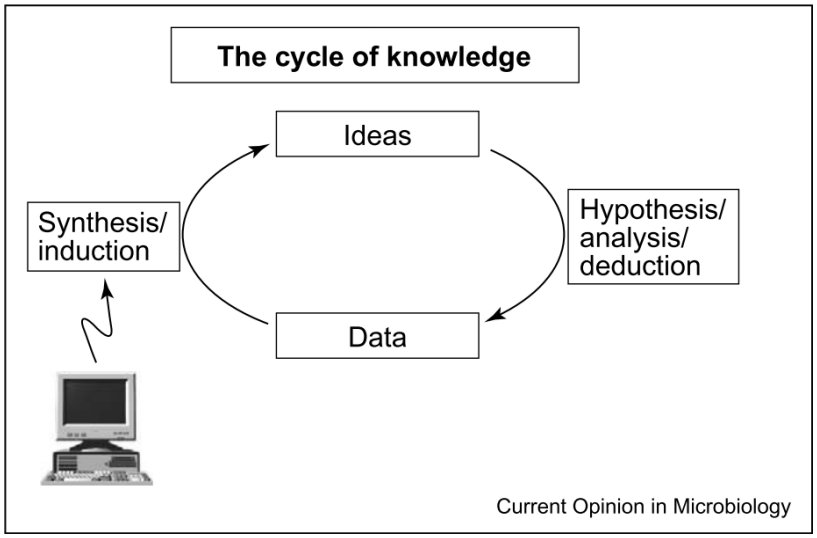


Figure 8: Le cycle du savoir, reproduit avec autorisation de [27]

Certaines cascades biologiques sont connues pour être essentielles à la vie cellulaire de nombreux organismes, c'est pourquoi elles sont étudiées de façon extensive. C'est notamment le cas du cycle de l'acide citrique [28] ou encore de la voie des pentoses phosphates. D'autres composés tels que les acides aminés ou encore les nucléotides (ADP, ATP, NADP, NADPH, NAD, NADH) sont directement liés aux processus énergétiques cellulaires. Enfin l'étude du glutathion permet de mettre en évidence le stress oxydatif rencontré par un organisme, ou encore la dégradation occasionnée (rapport GSH / GSSG).

La métabolomique seule manque d'approche compréhensive globale et d'inclusion dans un ensemble [27], elle doit donc s'inscrire dans une approche biologique plus générale en incluant la génomique et la protéomique.

3. Matrices biologiques

Les matrices biologiques humaines communément utilisées sont soit des fluides biologiques, soit des tissus. Les fluides biologiques sont l'urine ou le sang, par exemple. Il existe une multitude de sources biologiques afin d'analyser des métabolites tels que le méconium, la salive, les cheveux, les ongles ou encore les gaz rejetés lors de la respiration [29].

Les matrices utilisées dans ce travail de thèse sont les globules rouges, le tissu hépatique et les cellules végétales d'une algue unicellulaire. Tous ces modèles sont de type cellulaire. Ce sont des compartiments propres qui possèdent une paroi afin d'être séparés du milieu externe. Ces cellules peuvent être totalement indépendantes et vivre dans un

milieu externe différent, comme c'est le cas pour les cellules d'algues. Ce sont des compartiments indépendants évoluant dans un environnement externe contrôlé : cela concerne les cellules sanguines, par exemple. Enfin, certaines cellules sont interdépendantes et reliées entre elles, ce qui est illustré par les cellules hépatiques.

3.1. Les globules rouges

Les globules rouges ou érythrocytes sont de forme biconcave et de taille moyenne de 8µm avec un volume moyen de 90fL [30]. Ils sont responsables du transport de l'O_2 depuis les poumons vers l'ensemble du corps et se chargent également de ramener vers les poumons le CO_2 généré par l'activité métabolique. Un adulte possède environ $5*10^{12}$ globules rouges par litre de sang. La durée de vie moyenne d'un globule rouge est de 110 jours. La particularité de ces cellules est l'absence de noyau. Elles sont composées de 4 sous-unités de globines qui sont normalement de 2 unités α et 2β. Les globules rouges sont exempts de mitochondries et de ribosomes [31]. Les cellules sanguines ainsi que les cellules hépatiques sont une cible des parasites responsables de la malaria. Ils utilisent le métabolisme de la cellule hôte afin de croître. Ce processus est illustré dans la figure 9.

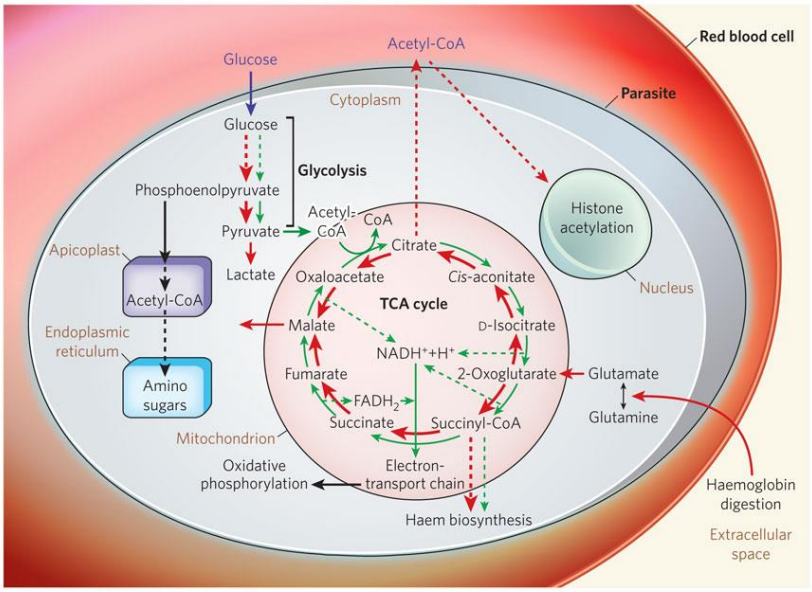


Figure 9: Un érythrocyte infecté par *P. falciparum*, parasite responsable de la malaria. La voie verte correspond au processus normal. La voie empruntée par le parasite est décrite par les flèches rouges avec une bifurcation au niveau du 2-oxoglutarate. Le processus cellulaire principal menant à l'utilisation des ressources en métabolites est en noir. Les contributions de la cellule sont en bleu. Adapté avec l'autorisation de [32]

Le sang peut être analysé sous forme de sang total, de plasma ou de sérum. Le plasma est largement utilisé et décrit dans la littérature en métabolomique [33]. Les érythrocytes et le sang total sont moins investigués. Ils nécessitent une préparation d'échantillons spécifique.

Les globules rouges représentent cependant un intérêt biologique et métabolomique particulier du fait qu'ils possèdent une membrane séparant le contenu intérieur du contenu extérieur. Ces cellules sont en outre essentielles pour un certain nombre de processus biochimiques et sont la cible du parasite responsable de la malaria.

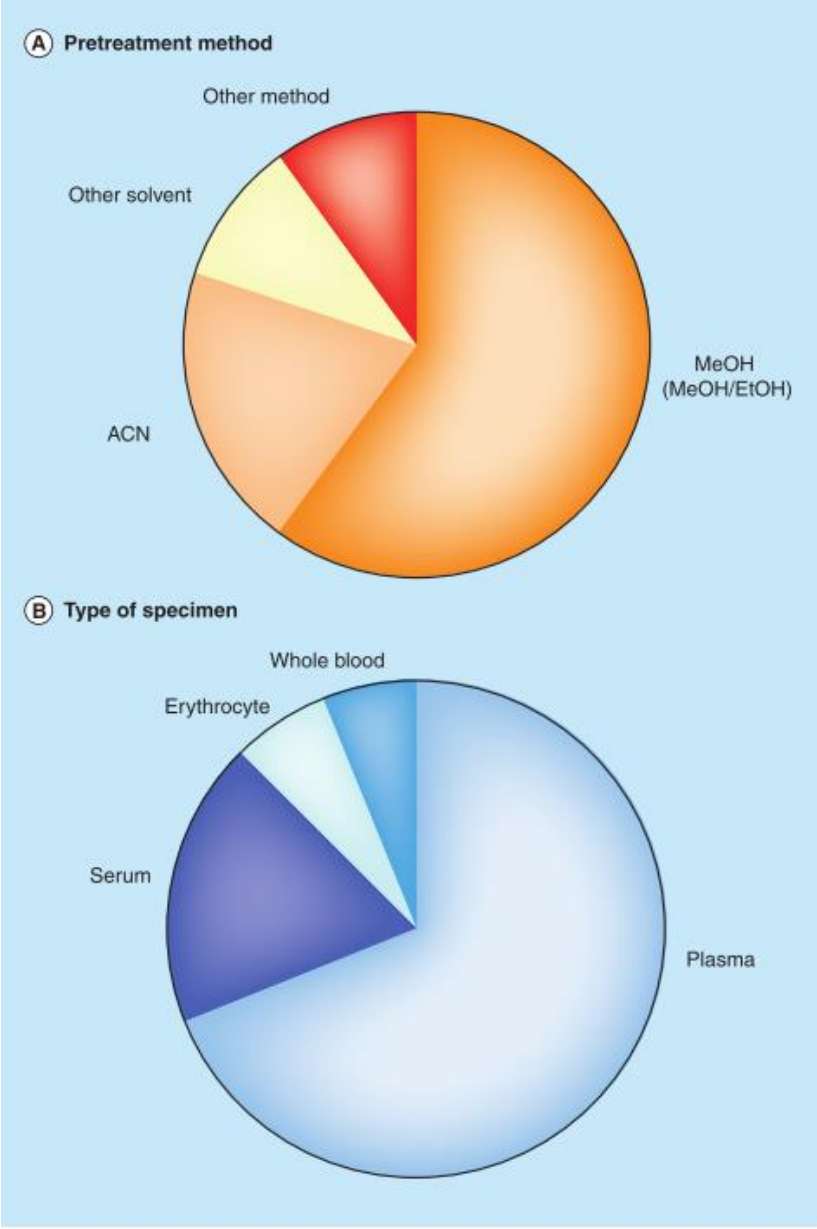


Figure 10: (A) Méthodes de pré-traitement d'échantillons d'origine sanguine appliquées avant analyse par profilage LC-MS, (B) Préférences dans le type d'échantillons d'origine sanguine utilisés dans l'analyse de profilage métabolomique par LC-MS tiré de [33] avec autorisation

3.2. Le tissu hépatique

Le foie est composé d'une structure uniforme de grappes de cellules appelées lobules, c'est aussi le lieu des fonctions vitales. Le tissu hépatique est composé de nombreux éléments tels que les hépatocytes (qui occupent 80% de l'espace) et est fortement vascularisé (figure 11). L'activité métabolique est extrêmement intense afin de transformer et éliminer les éléments toxiques.

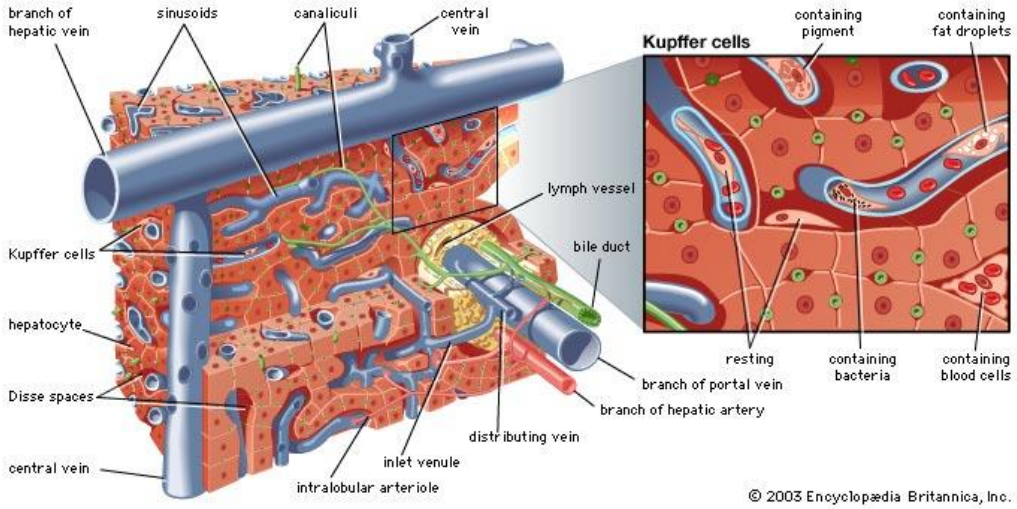


Figure 11: Représentation des unités du foie [34]

3.3. Les cellules d'algues unicellulaires

L'algue de type chlamydomonas est unicellulaire (figure 12). Les phytoplanctons sont des espèces représentatives de par leur rôle clé dans le milieu aquatique et leur utilisation intensive dans les tests d'écotoxicité [35]. Ces cellules sont largement étudiées afin de démontrer les effets des polluants sur leur activité métabolique [36-46]. Elles représentent en outre un défi lors de la préparation d'échantillon, car elles vivent dans un milieu hostile et leur membrane cellulaire, bien que permettant les échanges avec le milieu cellulaire, est extrêmement rigide. Leur lyse est très difficile à réaliser.

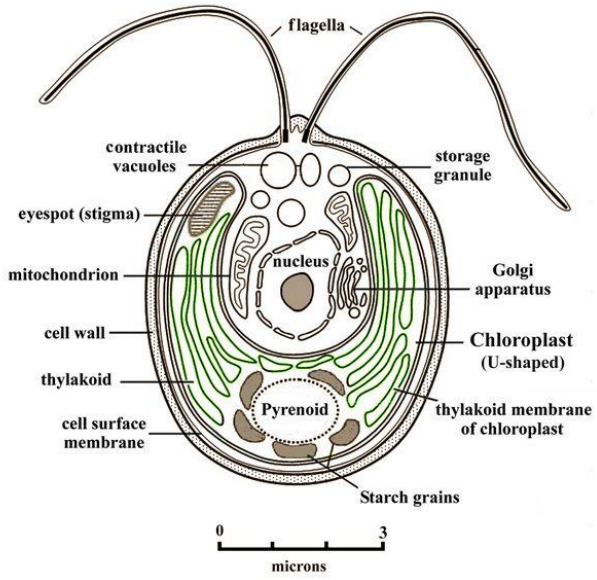


Figure 12: Algue unicellulaire de type Chlamydomonas, tiré de [47]

4. Définition et particularités des métabolites endogènes cellulaires

Les métabolites appartiennent aux molécules de faible poids moléculaire et sont impliqués dans les cascades métaboliques. Contrairement aux xénobiotiques ou aux molécules pharmaceutiques ceux-ci, possèdent des propriétés physicochimiques très variées (acides, neutres, bases, zwitterions, amphotères avec des pKa et LogP très différents, voir figure 14). Les métabolites sont, par exemple, des lipides, des acides organiques, des acides aminés, des nucléotides [8]. Une particularité à ne pas sous-estimer est la large gamme d'abondance et donc de concentration rencontrée lors de l'analyse des métabolites [5]. En effet, le domaine de concentration de ces métabolites peut varier de l'ordre du mM (cas du glucose) allant jusqu'au pM, et ceci ne dépend que de la limite de détection des instruments analytiques [8, 48]. En outre, la stabilité des molécules rencontrées dans les systèmes biologiques est aussi un point à ne pas négliger en particulier lors du stockage et de la préparation d'échantillons [5, 49]. Pour toutes ces raisons, il existe de nombreux défis dans l'analyse des métabolites [50]. Ces défis sont résumés dans la figure suivante.

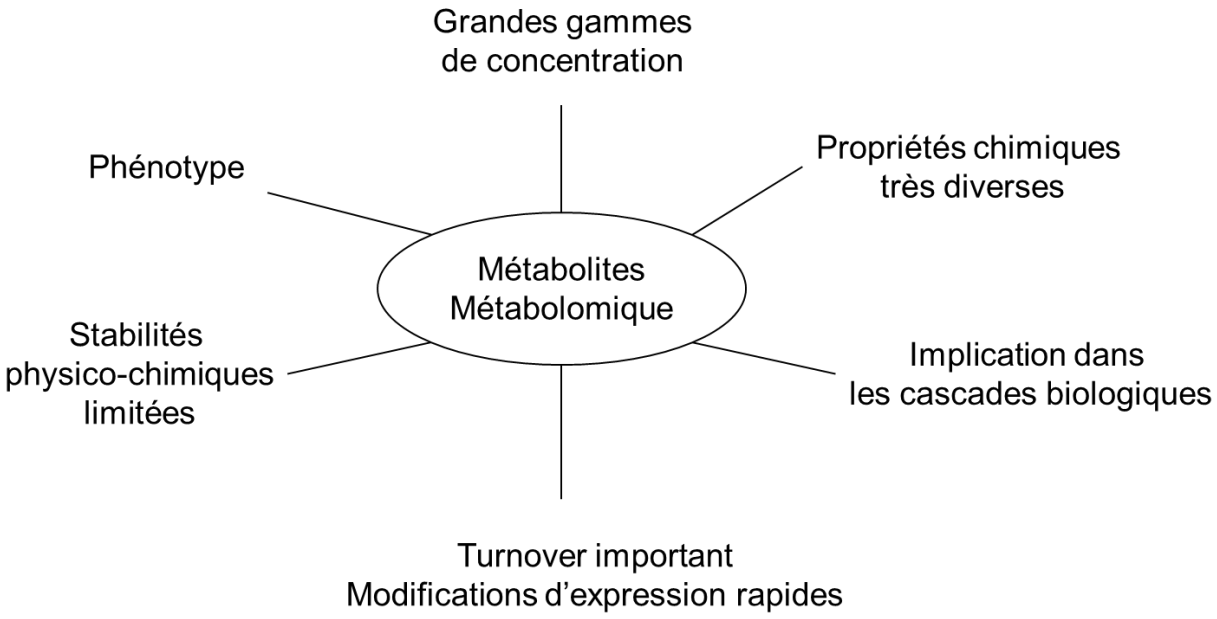


Figure 13: Particularités analytiques et physicochimiques des métabolites

4.1. Métabolites endogènes polaires / apolaires

La base de données de références pour les métabolites humains est « the human metabolome database» HMDB 3.6 [51-53]. Elle recense plus de 37'000 métabolites annotés, dont plus de 29'000 métabolites endogènes [54]. Ce sont pour la plupart des lipides. Les propriétés physicochimiques des métabolites offrent une grande gamme de polarité. On peut séparer ces métabolites en deux classes principales, à savoir les métabolites dits polaires avec un logP eau/octanol inférieur à zéro, et les métabolites apolaires, ayant un logP eau/octanol supérieur à zéro. Une classe est souvent extraite de la métabolomique et concerne l'analyse des lipides, autrement dit la lipidomique. Les métabolites polaires sont en partie des acylcarnitines, des sucres, des sucres possédant une fonction alcool, des acides organiques, des acides aminés, des triméthyl amines N oxydes (TMAO), le groupe des bétaines, les polyamines, les purines (PUR) et pyrimidines (PYR) [20].

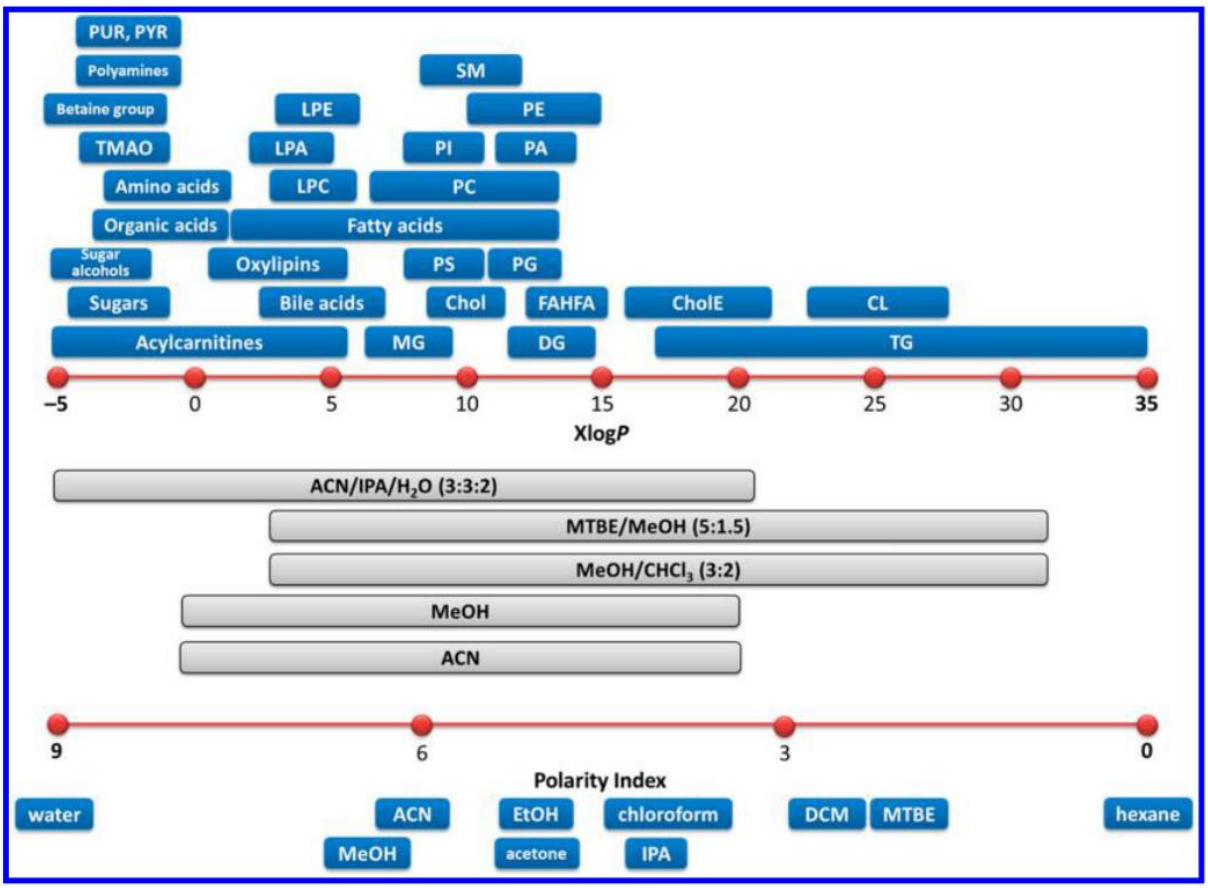


Figure 14: Coefficient de partition octanol/eau prédit pour les métabolites communs, Mélanges typiques de solvants utilisés en métabolomique et lipidomique, Legende: Cer, ceramides; Chol, cholesterol; CholE, cholesteryl esters; CL, cardiolipins; DG, diacylglycerols; FAHFA, fatty acid estersof hydroxyl fatty acids; LPA, lysophosphatidic acids; LPC, lysophosphatidylcholines; LPE, lysophosphatidylethanolamines; MG, monoacylglycerols; PA, phosphatidic acids; PC, phosphatidylcholines; PE, phosphatidylethanolamines; PG, phosphatidylglycerols; PI, phosphatidylinositols; PS, phosphatidylserines; PUR, purines; PYR, pyrimidines; SM, sphingomyelins; TG, triacylglycerols; TMAO, trimethylamine N-oxide reproduit avec l'autorisation de [20]

5. La préparation des échantillons biologiques en métabolomique

5.1. Conditions préalables à la préparation d'échantillons

L'article d'Alvares-Sànchez, publié en 2010 [10], résume les bases des éléments essentiels à prendre en compte lors de l'étape entre la collection et la préparation d'échantillons biologiques en vue d'une analyse métabolomique. Les points essentiels sont :

a) l'inactivation le plus rapidement possible du métabolisme [55, 56] ,
b) le maintien de l'intégrité de l'échantillon,
c) l'absence de variations induites par l'arrêt du métabolisme (quenching)
d) l'accessibilité aux éléments concernés par la préparation d'échantillon [3].

L'inactivation du métabolisme doit être plus rapide que les changements métaboliques apparaissant dans l'échantillon [57]. C'est pourquoi une étape de quenching, qui est l'arrêt instantané de l'activité métabolique endogène [3] est utilisée. Ce processus est principalement effectué à l'aide de méthanol froid (généralement à une température inférieure à -40°C). L'utilisation de méthanol froid permet de maintenir l'intégrité cellulaire et d'analyser les métabolites intra et extracellulaires [58]. L'utilisation d'azote liquide (-196°C) est une autre possibilité et produit le même effet que le méthanol froid, cependant l'intégrité cellulaire peut être altérée et peut augmenter la formation de cristaux de glace [10]. Ceci favorise l'apparition de cycles de congélation/décongélation (freeze/thaw cycle) qui peuvent mener à la dégradation des métabolites [59].

5.2. Préparation d'échantillons

La préparation d'échantillon est un élément clé de la réussite de toute procédure analytique, et c'est de son efficacité que dépend la qualité des données ultérieures [8]. Elle est notamment essentielle en termes de « contamination » des instruments analytiques tels que les spectromètres de masse (compétition ionique dans la source). Il s'agit d'éviter de boucher les colonnes chromatographiques ou d'en modifier les propriétés physicochimiques [60]. De façon générale, une préparation d'échantillons inappropriée peut être responsable de biais [61]. Il est préférable, en termes de temps, d'avoir une

méthode générique pour une large gamme de composés , ceci incluant la préparation d'échantillon, la séparation des analytes et l'analyse de ceux-ci [60].

Toujours selon Alvares-Sànchez [10], celle-ci doit répondre à un certain nombre de critères fondamentaux, à savoir :

a) la libération effective des métabolites à partir de l'échantillon,
b) la séparation et suppression des interférents pouvant perturber l'analyse ultérieure,
c) la compatibilité avec cette même procédure d'analyse,
d) la capacité de concentrer les analytes présents en faible quantité.

Les différents types de préparations d'échantillons "off-line" généralement utilisés sont :

a) une dilution de l'échantillon sans préparation,
b) une précipitation de protéines (PP)
c) l'extraction liquide-liquide (LLE) ou encore
d) l'extraction en phase solide (SPE) [60].

Les échantillons urinaires sont principalement dilués, alors que le plasma subit une précipitation de protéines. Le sang total peut être collecté par la méthode du dried blood spot (DBS) et ensuite extrait à postériori (figure 15) [62].

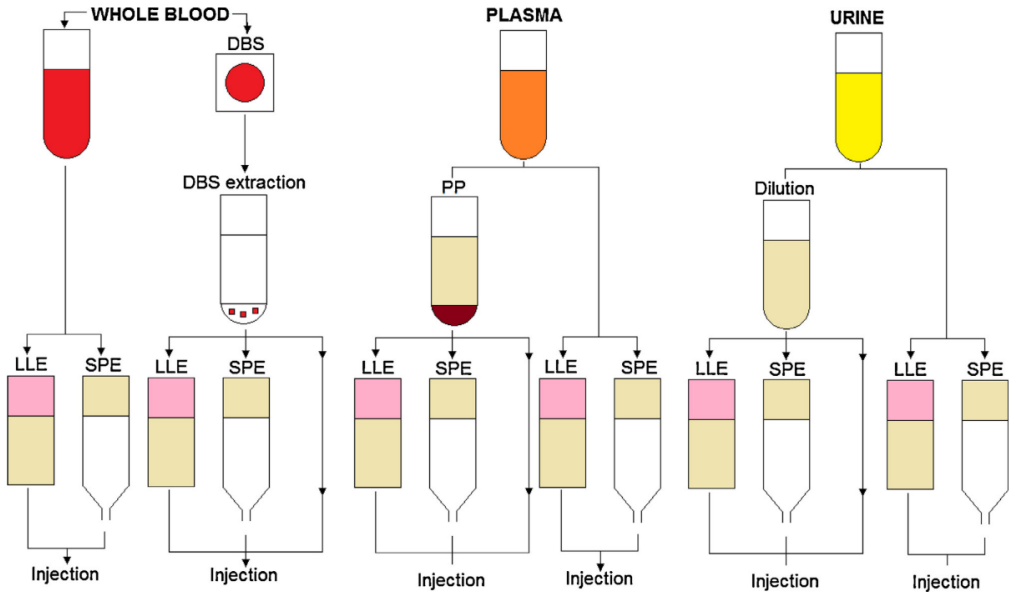


Figure 15: Exemple de préparation d'échantillons selon la matrice utilisée, reproduit avec l'autorisation de [62]

La LLE, bien que couramment utilisée, ne peut pas être une procédure générique, car les solvants d'extraction doivent être adaptés aux classes d'analytes recherchés [60]. La figure représentée au paragraphe 4.1 illustre parfaitement les différentes gammes de polarité des solvants d'extraction, ainsi que la polarité des métabolites rencontrés dans les analyses biologiques.

La préparation d'échantillons cellulaires et tissulaires comporte généralement une phase supplémentaire qui permet de lyser la membrane et d'accéder au contenu métabolomique. Cette étape est réalisée par une lyse mécanique à faible température, souvent suivie par une extraction liquide-liquide [10].

6. Plateformes analytiques utilisées en métabolomique

Les plateformes analytiques utilisées doivent parer à de nombreux défis dans l'analyse des métabolites [50]. En effet, les métabolites d'intérêt n'appartiennent pas forcément à la même classe de molécules physico-chimiques, il est donc nécessaire d'utiliser des techniques analytiques permettant d'analyser la plus grande gamme de composés possible [63]. La séparation des composés permet une meilleure identification et caractérisation de ceux-ci avec, comme information, le temps de rétention ou d'élution. Elle permet aussi de diminuer l'effet de contaminants présents dans l'échantillon.
Les plateformes analytiques les plus couramment utilisées sont la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), ainsi que la résonance magnétique nucléaire (RMN) [64]. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est aussi utilisée pour les analyses métabolomiques [65]. Les techniques d'identification sans l'utilisation de techniques séparatives sont l'infrarouge à transformée de Fourrier (FTIR), la spectrométrie de masse à infusion directe (DIMS) ou encore, comme cité précédemment, la RMN (ou NMR en anglais).

Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse par les sources d'ionisation à pression atmosphérique (API) a été une avancée particulièrement importante dans l'utilisation de la LC-MS dans les études métabolomiques. En effet, la GC-MS souffrant du manque de volatilité de certains métabolites, a pu être complétée grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide. De par ses propriétés permettant

l'ionisation d'une large gamme de composés ayant des poids moléculaires très différents, la source la plus employée est l'électrospray ou électronébulisation (ESI) [66].

Malgré les nombreuses avancées des plateformes analytiques pour les études métabolomiques, il apparaît toujours que celles-ci sont basées sur des compromis et aucune ne permet une analyse extensive de tous les métabolites. Une combinaison des différentes plateformes apparaît nécessaire dès lors que les analyses requièrent une compréhension globale des processus biologiques au niveau moléculaire [67].

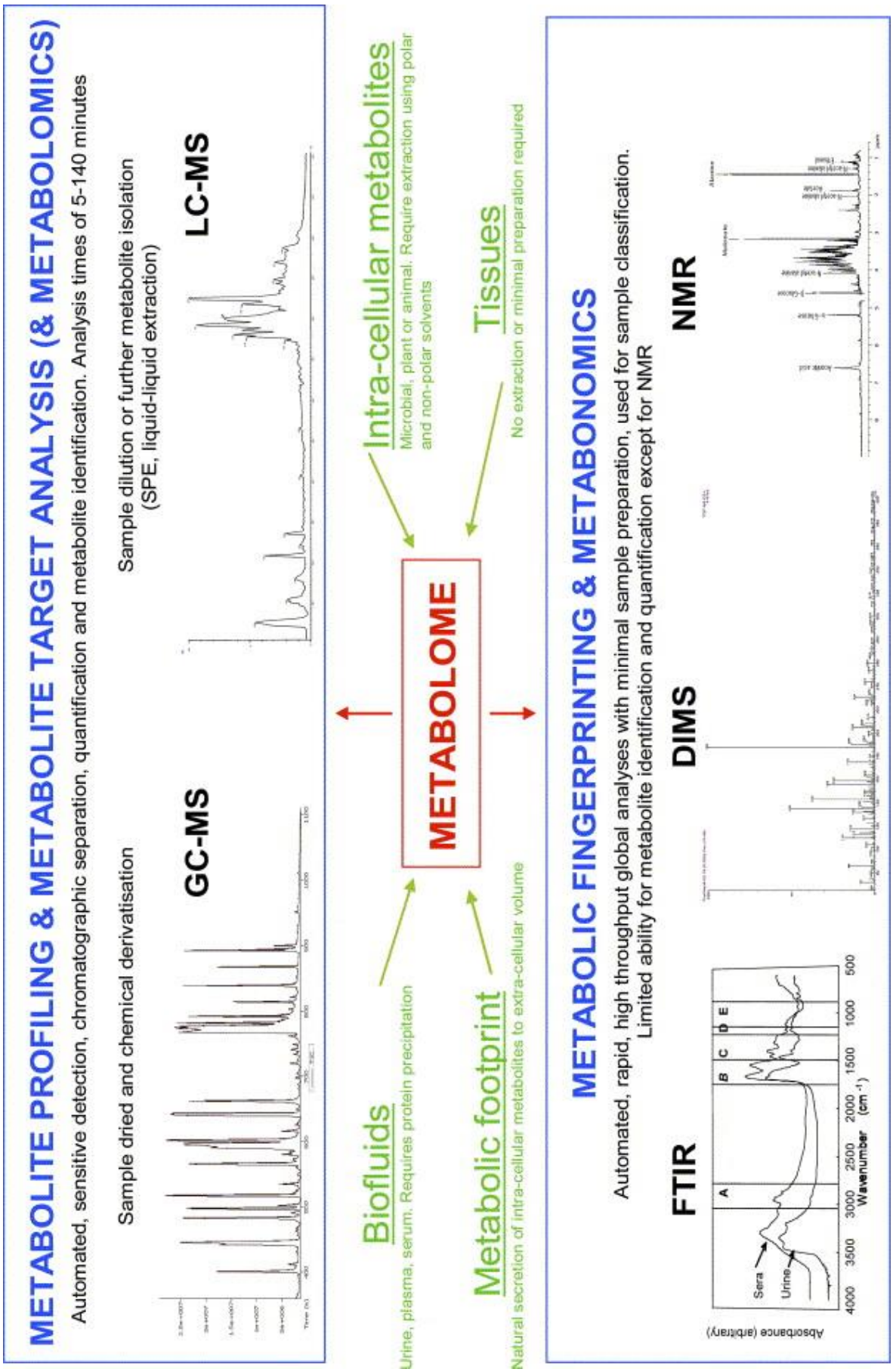


Figure 16: Workflow analytique et représentation des méthodes utilisées, reproduit avec autorisation de [7]

7. Techniques séparatives

7.1. Séparation par chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse est la technique la plus largement répandue pour l'analyse des métabolites [68]. Elle permet l'analyse d'échantillons se trouvant en phase gazeuse ou liquide par un processus de chauffage extrêmement rapide qui va mener à la vaporisation de l'échantillon. La rétention de l'analyte est corrélée à son affinité avec la phase stationnaire, qui peut être de polarité différente, ainsi qu'à sa pression de vapeur [69]. La chromatographie en phase gazeuse est une technique rapide, robuste, ayant une grande efficacité en termes de plateaux théoriques (N élevé). De plus, elle peut être couplée avec l'impact électronique qui est une source hautement reproductible, et produisant des ions fragments facilement identifiables [63].

Le principal désavantage de cette technique est l'utilisation d'agents de dérivatisation tels que le MSTFA ou le BSTFA afin de rendre volatils et stables thermiquement des composés qui le sont peu ou pas [10, 70]. Cette étape peut avoir pour effet d'introduire des contaminants provenant des réactifs et provoquant des interférences lors des analyses. Ceci amène en outre une étape supplémentaire lors de la préparation d'échantillon.

Pour l'analyse des composés polaires et non volatils il semble donc plus approprié de choisir des techniques comme la chromatographie en phase liquide, l'électrophorèse capillaire ou encore la chromatographie en phase supercritique [71].

7.2. Séparation par chromatographie liquide

Il existe de nombreux types d'interactions physico-chimiques en chromatographie en phase liquide (LC) qui dépendent du mode chromatographique utilisé ainsi que des analytes. Ces interactions sont résumées dans la figure suivante. Trois modes LC complémentaires, utilisés lors de cette thèse sont abordés dans ce chapitre : la chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC), la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) ainsi que la chromatographie liquide par paire d'ions (IPC).

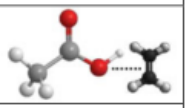
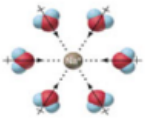
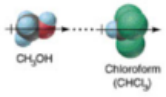
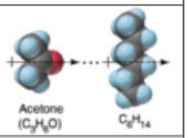
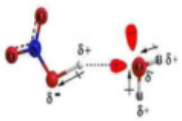
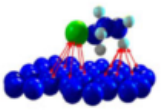
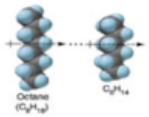
Type of interaction		Characterization	Energy [kJ·mol^{-1}]	Example system
Chemical interactions	Hydrogen bonding	formed between hydrogen of the protodonor group and atom being hydrogen acceptor, can be formed within the same molecule, as well as between two different	- (4 - 17)	
	Donor – acceptor interactions	occurs between pairs of electron donor (Lewis base) and acceptor (Lewis acid)	- (4 - 17)	
Physical interactions	Ion – dipole	ion acts on electrically neutral molecule; leads to a multicomponents	- (4 - 17)	
	Dipole – dipole	force between two electrically neutral particles, but having determined dipole moments	- (4 - 17)	
	Dipole-induced dipole	forces between the molecule possesses clear dipole moment and non-polar molecule	- (4 - 17)	
	Temporary dipole-induced dipole	two electrically neutral particles, if they come close together, will attract on the electrostatic forces way	- (4 - 17)	
Intermolecular interactions (Van der Waals forces)		weak forces of attraction between the fragments of individual molecules, declining rapidly with increasing distance between the interacting particles, do not lead to permanent connections	- (2 - 4)	
Hydrophobic interactions		forces operating in the aquatic environment between molecules with low affinity for water	- 4	

Figure 17: Type d'interactions entre l'analyte, la phase mobile et la phase stationnaire en chromatographie liquide tiré de [72] avec autorisation

Chromatographie liquide en phase inversée (RPLC)

La chromatographie liquide en phase inversée est la plus couramment utilisée pour les analyses métabolomiques [19]. Elle permet de séparer les composés apolaires à moyennement polaires [19]. La phase stationnaire est composée de silice greffée par des groupements alkyl hydrophobes (C_4, C_8, C_{18} par exemple) et d'une phase mobile hydro-organique. Les métabolites polaires sont peu retenus avec de telles phases, c'est pourquoi d'autres groupements polaires tels que les carbamates ou amides sont ajoutés, soit à la base du greffon soit à la surface de la silice [73-75]. Ces phases stationnaires modifiées sont cependant spécifiques à certaines catégories de métabolites. Elles peuvent

donc être adaptées lors d'analyses métabolomiques ciblées mais ne représentent cependant pas un choix adéquat lors d'analyses métabolomiques globales non ciblées.

Chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC)

L'acronyme HILIC a été introduit en 1990 par Alpert [76]. La HILIC comporte l'utilisation d'une phase stationnaire polaire corrélée à une phase mobile de type hydro-organique composée majoritairement de solvant aprotique miscible à l'eau (généralement l'acétonitrile).. Les principaux mécanismes de rétention identifiés sont : a) le partage hydrophile de l'analyte entre la couche d'eau à la surface de la phase stationnaire et la phase mobile riche en acétonitrile b) les interactions électrostatiques, et c) les liaisons hydrogènes (figure 18) [76, 77]. Les matrices biologiques telles que l'urine sont souvent aqueuses et donc les métabolites ont des propriétés principalement polaires. C'est pourquoi l'utilisation de la HILIC semble tout à fait adaptée à cette problématique [78].

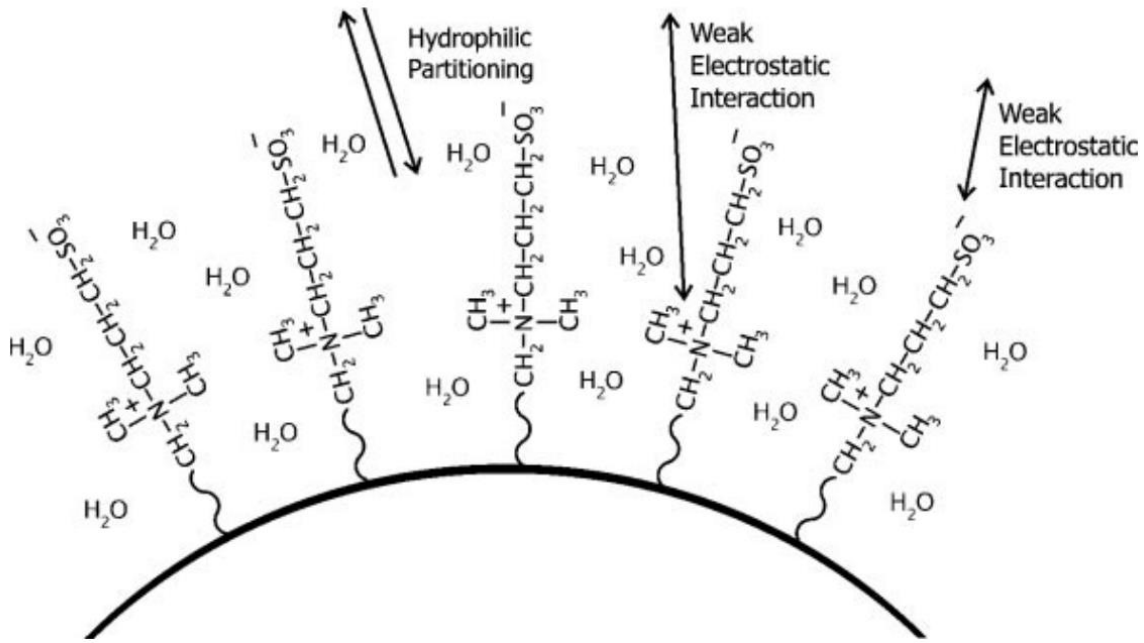


Figure 18: Représentation schématique des processus de rétention d'une phase stationnaire sulfoalkylbetaine zwitterionique. Adapté de « A Practical Guide to HILIC, Including ZIC®-HILIC applications » Merck

La phase stationnaire est de la silice vierge ou greffée de groupements polaires tels qu'amine, amide ou diol. La HILIC se différencie de la chromatographie liquide des phases normales (NPLC) par la phase mobile employée. En effet, les phases mobiles utilisées en HILIC sont proches en termes de polarité (phase organique comme l'acétonitrile) de celles utilisées en chromatographie en phase inverse (figure 19) [71]. Le pourcentage de phase aqueuse varie entre 3 et 40%. L'augmentation de la phase aqueuse permet l'élution des composés hydrophiles.

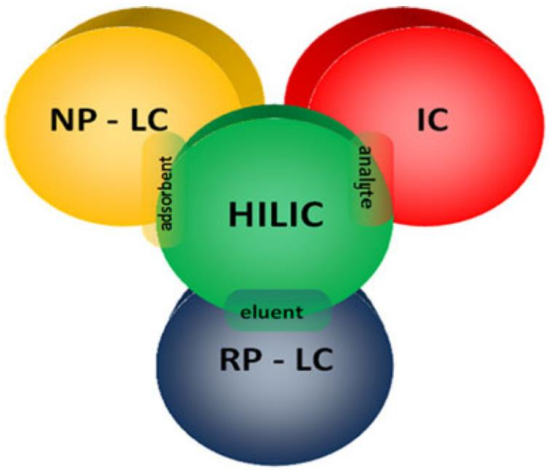


Figure 19: Mécanismes en HILIC provenant des trois principales méthodes de chromatographie liquide, adapté de [72] avec autorisation

Chromatographie liquide par paire d'ions (IPC)

La chromatographie par paire d'ions est une technique qui date des années 1970 avec l'utilisation de la chromatographie liquide en phase inverse. Il est recherché alors des composés ioniques pouvant être compatibles avec la RPLC, et qui augmentent la capacité de rétention du système et des analytes chargés de façon opposée [79]. La chromatographie par paire d'ions repose principalement sur l'utilisation de colonnes C18 et C8 traditionnellement utilisées en RPLC [80]. Les agents de paire d'ions vont avoir un équilibre entre la surface de la phase stationnaire et l'analyte.

L'utilisation d'un agent de paire d'ions va dépendre de l'analyte et devra être adapté du point de vue physicochimique à celui-ci. Les agents de paire d'ions typiques sont des alkyl sulfonate ou alkyl ammonium. Cependant ces composés tendent à être retenus de façon quasi permanente à la phase stationnaire, et il devient très difficile dès lors de retrouver les conditions de départ dans lesquelles la colonne chromatographique se trouvait avant l'utilisation de ces composés [79]. De plus les agents de paire d'ions ayant de longues chaînes alkyles, ne sont pas compatibles avec la spectrométrie de masse car ils sont peu volatils [79]. Le couplage avec la spectrométrie de masse reste sensible et utilisé avec précaution car les agents de paire d'ions principalement peu volatils peuvent polluer la source d'ionisation et modifier l'intensité du signal. Il semble cependant que l'orientation des sprays dans la source a une influence (Z-spray < orthogonal spray < linear spray Z, [81]) Les sprays en Z sont moins touchés par cette problématique que les sprays linéaires . Enfin, les agents de paire d'ions peuvent perturber le processus menant à la vaporisation et à la formation d'ions dans la source due à la formation de liaisons entre l'analyte et

celui-ci [82]. En effet, ils peuvent provoquer une suppression ionique préjudiciable à la sensibilité de la méthode [83].

Toutefois, la RPLC utilisée avec des agents de paire d'ions a été démontrée comme étant une méthode de séparation adaptée à l'analyse d'une large gamme de métabolites polaires chargés négativement ou positivement tels que les nucléotides, les sucres avec un groupement phosphate ou encore les acides carboxyliques [84-90] .L'utilisation de la chromatographie liquide additionnée d'un agent de paire d'ions permet d'augmenter la rétention des composés organiques polaires, tout en étant compatible avec des composés apolaires. Cependant, des problèmes liés à la sensibilité peuvent apparaître en diminuant l'intensité du signal MS. Le gain de rétention apporté par cette approche, en évitant au composé de se retrouver dans le temps mort (où la compétition d'ionisation est importante), peut être diminué par le fait que la capacité d'ionisation est diminuée.

7.3. Chromatographie en phase supercritique (SFC)

La SFC est une technique qui été rapportée la première fois par Klesper et al. [91, 92]. Cette technique est utilisée pour la détection de composés pharmaceutiques et de leurs éventuels métabolites, ainsi que pour des composés majoritairement apolaires, mais reste cependant peu utilisée pour la détection de composés endogènes polaires. [91, 93-95]. On utilise un gaz (principalement le CO_2), qui se trouve sous forme liquide à des conditions de températures et de pression données. Tout d'abord, les composés polaires sont couramment solubilisés dans des mélanges méthanol-eau avec parfois de l'acide chlorhydrique ou alors de l'hydroxyde de sodium, ce qui peut se révéler compliqué pour les analyses ultérieures, car la SFC ne tolère qu'un faible pourcentage d'eau. Ensuite, ceux-ci ont une mauvaise solubilité dans le CO_2, qui est faiblement polaire par son absence de moment dipolaire. Il est possible d'ajouter un solvant polaire tel que le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH) ou encore l'isopropanol (IprOH) mais la séparation des composés sera alors bien plus influencée par ces solvants que par la pression ou la densité [96-99].

8. Spectrométrie de masse

Les spectromètres de masse qui ont été les premiers à être décrits à la fin des années 1970 pour la quantification des métabolites sont des triples quadrupôles, avec le mode

d'acquisition en selected reaction monitoring ou SRM [100]. C'est cependant quelques années plus tard que des applications de ceux-ci couplés à la LC sont apparues. Lu *et al.* a écrit en 2008 que l'utilisation des triples quadrupôles devait être préférée lors d'analyses métabolomiques ciblées sur un nombre restreint de métabolites. S'il s'agit d'une gamme de métabolites plus vaste, les analyses devaient être menées de préférence en utilisant la haute résolution (QTOF ou orbitrap). Ceci fait aussi référence aux analyses dites « ciblées et non-ciblées ». Ce thème est plus largement développé dans le chapitre 4.

Les spectromètres de masse sont généralement divisés selon leur résolution. Les quadrupôles, sont de basse résolution car unitaires, alors que les temps de vol, orbitrap et ion cyclotron resonance (ICR), sont considérés comme ayant une haute résolution. La figure 20 ci-dessous résume les propriétés d'un certain nombre de spectromètres de masse.

Table 1
Overview of commercial mass spectrometers designed for LC–MS with their technical specifications provided by individual manufacturers.[a]

Mass analyzer type	Instrument name, manufacturer	Resolving power (FWHM defined at m/z)	Resolution ($\Delta m/z$)	Mass accuracy (ppm)		m/z range	Acquisition speed (Hz)
				Internal calibration	External calibration		
Q	6150, Agilent	–	1	–	–	10–1350	10[b]
	Flexar SQ 300 MS, PerkinElmer	–	0.6	–	–	20–3000	10[b]
	LCMS-2020, Shimadzu	–	1	–	–	10–2000	15[b]
	LC/MS Purification System, Gilson	–	1	–	–	50–3000	10[b]
	MSQ plus, Thermo Scientific	–	1	–	–	17–2000	12[b]
	SQ Detector 2, Waters	–	1	–	–	2–3072	15[b]
IT	Amazon Speed ETD, Bruker Daltonics	–	0.1	–	–	50–6000	52[b]
	LCQ Fleet, Thermo Scientific	–	0.3	–	–	15–4000	12[b]
LIT	LTQ Velos Pro, Thermo Scientific	–	0.05	–	–	15–4000	66[b]
QqQ	6490, Agilent	–	0.4	–	–	5–1400	10[b]
	LCMS-8030, Shimadzu	–	0.7	–	–	10–2000	15[b]
	TQ Detector, Hitachi	–	1	–	–	2–2000	10[b]
	Triple Quad 5500, AB SCIEX	–	1	–	–	5–1250	12[b]
	TSQ Vantage, Thermo Scientific	7500 (m/z 508)	0.07	5	–	10–3000	5[b]
	XEVO TQ-S, Waters	–	1	–	–	2–2048	10[b]
Q-LIT	QTRAP 5500, AB SCIEX	9200 (m/z 922)	0.1	–	–	5–1250	20[b]
TOF	6230 TOF, Agilent	24,000 (m/z 1522)	0.06	1–2	–	25–20,000	40
	AccuTOF, Jeol	6000 (m/z 609)	0.1	5	–	6–10,000	10
	AxION 2 TOF MS, PerkinElmer	12,000 (m/z 922)	0.08	2	–	18–12,000	70
	Citius, Leco	100,000 (m/z 609)	0.006	<1	–	50–2500	200
	micrOTOF II focus, Bruker Daltonics	16,500 (m/z 922)	0.06	<2	<5	50–20,000	40
	XEVO G2 TOF, Waters	22,500 (m/z 956)	0.04	<1	–	20–16,000	30
IT-TOF	LCMS-IT-TOF, Shimadzu	10,000 (m/z 1000)	0.1	3	5	50–5000	10
Q-TOF	maXis 4G, Bruker Daltonics	60,000 (m/z 1222)	0.02	<0.6	<2	50–20,000	30 (MS), 10 (MS/MS)
	micrOTOF-Q II, Bruker Daltonics	20,000 (m/z 922)	0.05	<2	<5	50–20,000	20
	TripleTOF 5600, AB SCIEX	35,000 (m/z 956)	0.03	0.5	2	5–40,000	25 (MS), 100 (MS/MS)
	XEVO G2 QTof, Waters	22,500 (m/z 956)	0.04	<1	–	20–16,000	30
	6550 QTOF, Agilent	42,000 (m/z 922)	0.02	<1	–	50–10,000	50
Q-IMS-TOF	Synapt G2-S HDMS, Waters	40,000 (m/z 956)	0.02	<1	–	20–100,000	30
Orbitrap	Exactive, Thermo Scientific	100,000 (m/z 200)	0.002	<2	<5	50–4000	10 (at RP = 10,000)
Q-Orbitrap	Q Exactive, Thermo Scientific	140,000 (m/z 200)	0.001	<1	<5	50–4000	12 (at RP = 17,500)
LIT-Orbitrap	Orbitrap Elite, Thermo Scientific	240,000 (m/z 400)	0.002	<1	<3	50–4000	8 (at RP = 15,000)
Q-ICR	SolariX 15T, Bruker Daltonics	2,500,000 (m/z 400)	0.0002	<0.25	<0.6	100–10,000	–
LIT-ICR	LTQ FT Ultra 7T, Thermo Scientific	750,000 (m/z 400)	0.0005	<1	<1.2	50–4000	2 (at RP = 50,000)

[a] If manufacturers have more instruments in particular series, then only the instrument with the best performance is listed here. Individual manufacturers take the full responsibility for the correctness of technical specifications. Instruments in individual classes are sorted alphabetically according to the instrument name. This list contains only main manufacturers and may not be comprehensive.
[b] Acquisition speed for low RP mass analyzers is typically specified by manufacturers in Da/s, but we have recalculated these values into Hz units for the mass range of $\Delta m/z$ 1000.

Figure 20: Résumé des différents spectromètres de masse, tiré de [101] avec autorisation

8.1. Utilisation de la basse résolution en analyse métabolomique

Les triples quadrupôles (QqQ), ainsi que les quadrupôles comprenant la possibilité d'utiliser le troisième quadrupôle sous forme de trappe (QqLIT), sont généralement préférés de par leur grande sensibilité, pour la quantification des métabolites. Ceux-ci sont opérés en mode selected ion monitoring (SIM) ou selected reaction monitoring (SRM). Les modèles de fragmentation apportent de plus une information supplémentaire quant à la connaissance structurale des composés analysés [21].

8.2. Utilisation de la haute résolution (HRMS) en analyse métabolomique

La haute résolution conduite à travers l'utilisation d'instruments hybrides QqTOF, et par la suite du LIT-orbitrap ou Quadrupôle-orbitrap, est de plus en plus utilisée pour effectuer des analyses à la fois quantitatives et qualitatives (QUAL/QUANT) [102]. L'avantage de la HRMS sur les méthodes SRM est qu'il n'est pas nécessaire de développer des méthodes MS/MS pour les études [103]. Les fragments n'ont pas besoin d'être connus à l'avance et les transitions ne sont pas optimisées. Cependant l'énergie de collision est un paramètre qui peut être déterminé expérimentalement. Il est en outre possible d'obtenir une information qualitative supplémentaire concernant les échantillons [104]. En effet, Henry *et al* ont démontré, que sur une gamme de 17 composés pharmaceutiques, la HRMS était comparable à la SRM en termes de précision, d'exactitude, de spécificité et de sensibilité [102, 105].

8.3. Suppression ionique dans la source

Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse ne peut se faire sans passer d'un état liquide à un état gazeux. Malgré la grande efficacité des sources à pression atmosphérique actuellement disponibles telles que l'ionisation par électrospray (ESI) ou encore l'ionisation chimique (APCI), il existe des inconvénients intrinsèques à ces techniques.

L'ESI est soumis à des variations en termes d'ionisation, en fonction des phases mobiles utilisées. De plus une compétition peut exister entre différentes molécules présentes simultanément dans la source. Les molécules de plus grande taille peuvent augmenter la

suppression d'ions des plus petites molécules. Il a été rapporté que la suppression des molécules polaires est plus importante que celle des autres molécules [106]. Une étude des phénomènes de variabilité d'ionisation en électrospray, due aux méthodes de préparation d'échantillons, a estimé que cet effet était le plus grand sur la caféine, le composé le plus polaire de l'étude [107]. Les sels, les agents de paire d'ions, ou encore les composés endogènes peuvent faire varier l'efficacité de la formation des gouttelettes ou l'évaporation de celles-ci, ce qui va faire fluctuer la quantité d'ions chargés dans la phase gazeuse, et par conséquent ceux qui atteindront le détecteur. [106]

9. Traitement statistique des données métabolomiques

Les études métabolomiques génèrent un nombre important de données. C'est pourquoi il est essentiel d'utiliser un outil statistique pour organiser, traiter et mettre en évidence les éléments qui sont d'intérêt.

Les procédures statistiques auxquelles les données sont soumises vont directement influer sur les résultats qui en ressortent. Ceci a donc un impact par la suite sur les interprétations biologiques qui en découlent [108].

Table 1. Glossary of terms in statistical analysis of metabolomics data

Abbreviation	Term	Explanation of use
ANN	Artificial Neural Networks	Machine-learning technique, relating inputs to an output through non-linear functions, mimicking neural networks of the brain
ASCA	ANOVA-Simultaneous Component Analysis	Finding underlying structure when the data are collected according to an experimental design
DA	Discriminant Analysis	Methods relating explanatory variables to a categorical response (e.g., controls *versus* diseased subjects)
ML	Multi-level data	Data with a multi-level structure (e.g., time series measured for different subjects)
ML-PLS-DA	Multi-level Partial Least Squares Discriminant Analysis	Multi-level version of PLS-DA
MSCA	Multi-level SCA	SCA method for multi-level data
N-way data	Multi-way data	Data that can be meaningfully arranged in a cube or higher-way array
N-PLS-DA	N-way Partial Least Squares	Generalization of PLS-DA to N-way data
O-PLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis	Version of PLS-DA with a simplified interpretation
PARAFAC	Parallel Factor Analysis	Generalization of PCA for N-way data
PARAFASCA	Parallel Factor Analysis ANOVA-Simultaneous Component Analysis	Combination of PARAFAC and ASCA for N-way data with an underlying experimental design
PCA	Principal Component Analysis	Exploratory analysis method reducing multivariate data to a few underlying (principal) components
PLS	Partial Least Squares	Regression method suitable for high-dimensional collinear data
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis	Discriminant analysis method based on PLS
PCDA	Principal Component Discriminant Analysis	Discriminant analysis method based on PCA
Regression		Methods relating explanatory variables to continuous responses
RF	Random Forests	Method relating explanatory variables to categorical or continuous responses using averaging over an ensemble of simple models
SCA	Simultaneous Component Analysis	Generalization of PCA for simultaneous analysis of several data sets
SVM	Support Vector Machines	Discriminant analysis method based on hyperplanes separating groups

Figure 21: Résumé des termes des analyses statistiques utilisés pour traiter les données métabolomiques, tiré de [109] avec autorisation

Les développements des procédures statistiques et la complexité qui en découle nécessitent beaucoup de temps et représentent un désavantage pour les études métabolomiques [110]. Cependant, cette étape est essentielle dans les études métabolomiques et va avoir une incidence très forte sur la qualité des données et l'interprétation biologique future [111].

La variabilité des résultats est la conséquence des erreurs tout au long du processus analytique (figure 22) [112]. C'est pourquoi chaque étape doit être minutieusement contrôlée et étudiée afin d'en minimiser les conséquences. Le cas échéant, les variations produites par les différents éléments de la séquence analytique doivent être connues. La variabilité reconnue comme étant la plus importante et la moins maîtrisable est la variabilité biologique.

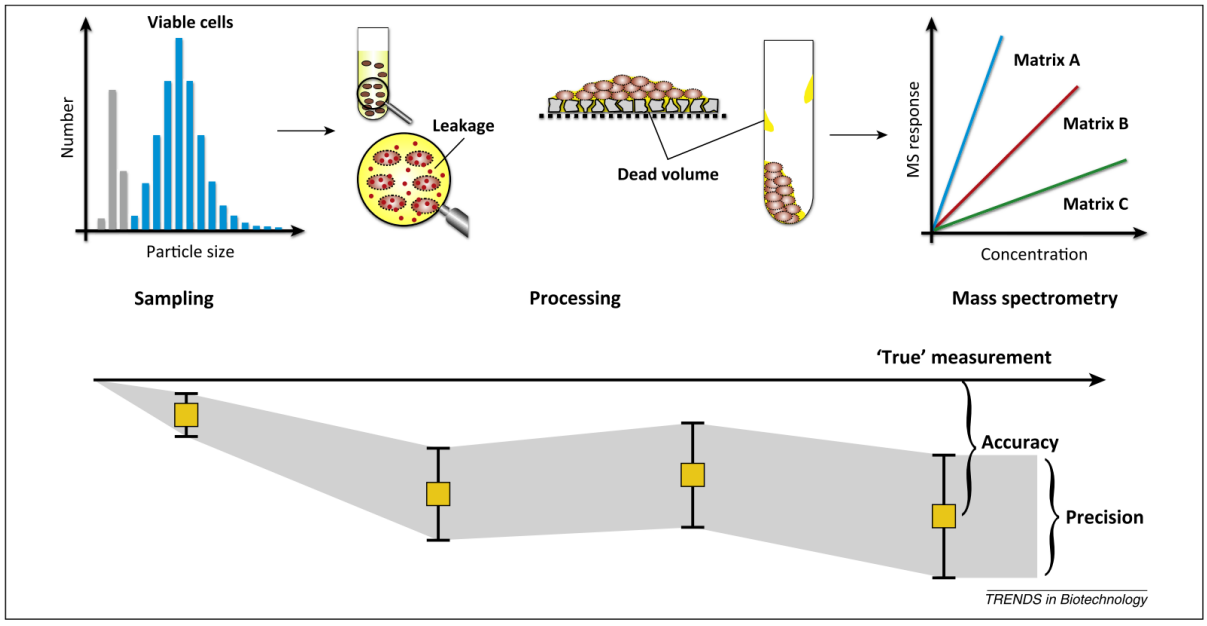


Figure 22: Erreurs d'analyse tout au long du protocole de mesure en métabolomique, adapté avec autorisation de [112]

Différents logiciels de traitement de données sont disponibles sur le marché. Certains sont spécifiques des instruments utilisés. Par exemple, le logiciel MarkerView (propriété d'ABSciex), utilisé au cours de cette thèse, permet de traiter les données par analyse en composante principale (PCA) puis d'y extraire des groupements de variables (PCVG) afin de mettre en évidence des variables significatives (sous la forme de : *m/z*, temps de rétention, expérience MS).

9.1. Analyse en composante principale (PCA)

Les données analysées par composante principale peuvent être traitées de manière supervisée ou non-supervisée. En effet, l'analyse statistique va extraire les composantes principales pour lesquelles les variations du modèle sont les plus représentatives et pour lesquelles l'explication de la variabilité est la plus grande. Ce traitement des données réduit le nombre de variables en un système mathématique plus simple à représenter. Toutes les dimensions dans l'espace ne sont pas occupées de façon égale, et cette propriété est exploitée au travers de la PCA. La PCA permet de réduire le bruit induit par les nombreuses données et d'en extraire l'essentiel. En effet, les premières composantes principales (PC) sont celles qui possèdent le plus de variabilité, représentées par les vecteurs des métabolites ayant le plus de poids [26]. Le score plot est le nouveau système d'axe obtenu, il montre la position relative des échantillons, ce qui peut être interprété en termes de similarité (ou l'inverse) entre ces échantillons (figure 23).

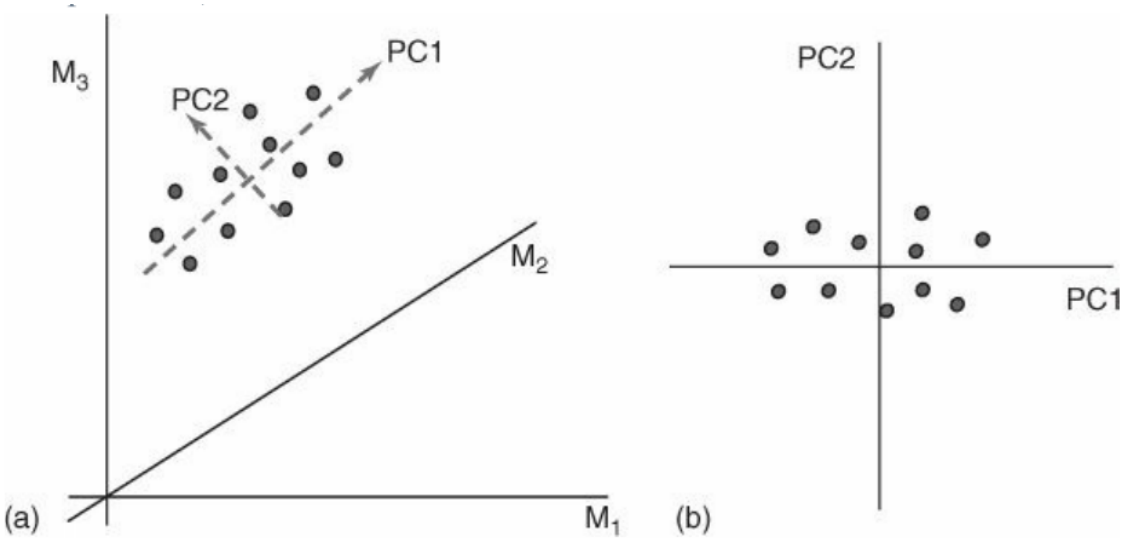


Figure 23: (a) Espace original et (b) Espace réduit ; adapté de la référence [113]

Lorsque l'analyse est effectuée en analyse discriminante (supervisée, PCDA [114]), le modèle va être représenté de façon à séparer les groupes. Elle utilise alors la combinaison entre l'analyse linéaire discriminante et l'analyse en composante principale. C'est en effet la combinaison d'un ensemble de vecteurs de score de PCA.

Les données doivent être mises à l'échelle avant d'être traitées de façon statistique. Il existe plusieurs algorithmes dont « l'autoscaling » ou encore le « mean scaling » qui signifient respectivement la mise à l'échelle automatique et la mise à l'échelle des variables par la moyenne (figure 24).

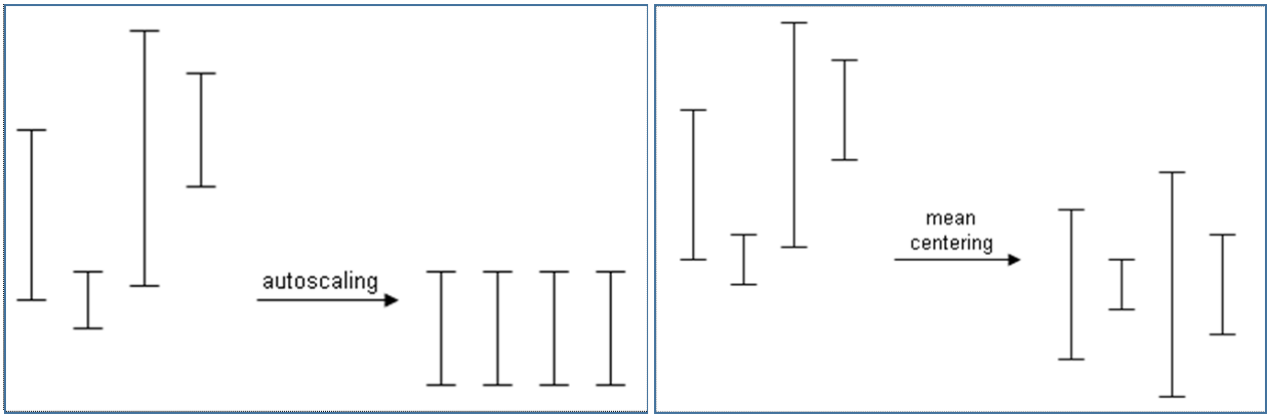


Figure 24: Mise à l'échelle des données tiré de "MarkerView, 1.2.1 Sofware Reference Manual"

Le désavantage de la mise à l'échelle automatique est la perte de l'information corrélée à l'intensité : donc toutes les variables auront le même poids. Ce qui est l'inverse pour la mise à l'échelle à la moyenne qui va négliger les variables ayant la plus faible intensité et ne tenir compte que des variables ayant l'intensité la plus grande. La loi de Pareto permet de niveler ces deux effets et semble un bon compromis entre ces ceux méthodes de mise à l'échelle (MarkerView 1.2.1 Software Reference Manual). Cette loi décrit que 80% des effets proviennent de 20% des causes.

9.2. Analyse en composante principale par groupement de variables (PCVG)

L'analyse en composante principale par groupement de variables (PCVG) est considérée comme un type d'analyse statistique non supervisée. Cette technique va mettre en évidence les variables qui ont un profil similaire parmi les échantillons [59, 111].

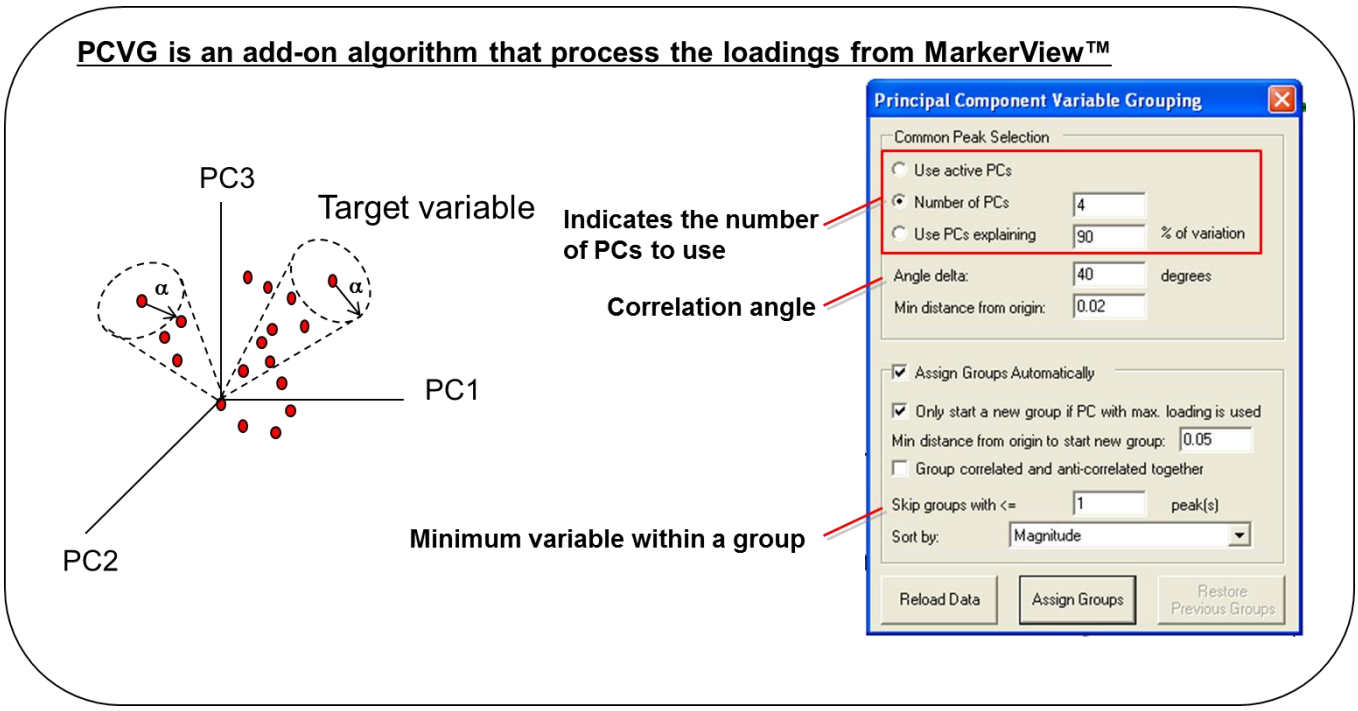


Figure 25: Description du processus d'analyse en PCVG à l'aide du logiciel MarkerView tiré de [111]

Ce traitement des données va permettre de mettre en évidence un ensemble de variables. Il est possible de filtrer les données utilisées pour ce groupement de variables à partir de la PCA réalisée en amont.

10. Logiciels utilisés pour le traitement des données

L'ensemble des logiciels ABSciex utilisés pour de cette thèse est brièvement introduit dans cette partie. Il est important de noter la complémentarité de ces outils. L'information contenue dans un fichier d'acquisition est maintenue au travers de tous ces logiciels. Il est aussi à tout moment possible d'accéder aux données de base et de vérifier la conformité des résultats. Bien que payants, ces logiciels sont des outils extrêmement performants et adaptés aux modes d'acquisition particuliers (notamment le SWATH). En effet, peu de logiciels sont capables de traiter des données SWATH.

10.1. PeakView

Le logiciel PeakView est un outil permettant la visualisation des chromatogrammes et des spectres ainsi que le traitement de ceux-ci. C'est un logiciel de base dans le traitement des données acquises à l'aide d'un instrument ABSciex et duquel il est possible de basculer vers l'utilisation d'autres logiciels (plug-in) comme FormulaFinder pour la recherche de la formule élémentaire. C'est au travers de ce logiciel qu'opère MasterView.

10.2. MasterView

Masterview est utilisé pour l'identification de variables (au travers de l'extraction du courant ionique total d'une espèce *m/z*). Les spectres MS/MS de ces variables sont comparés à la base de données annotée présente dans le logiciel LibraryView (voir point 10.3). Une recherche de formule chimique des espèces extraites peut être réalisée. Les paramètres de recherches se font selon trois axes.

Tout d'abord, les paramètres d'extraction des signaux sont définis. Il est possible de réaliser une recherche non-ciblée avec une sensibilité plus ou moins fine de détection. Cela demande cependant un temps de recherche beaucoup plus long. La recherche de formules selon une certaine tolérance de masse suivant l'instrument utilisé ainsi que les éléments chimiques sont des paramètres pour la recherche de formule moléculaire. Celle-ci tient en outre compte des isotopes dans le calcul de la formule moléculaire. Dans le cas d'acquisition SWATH, cette recherche est effectuée sur le spectre TOF-MS. Ces paramètres sont décrits dans la figure suivante.

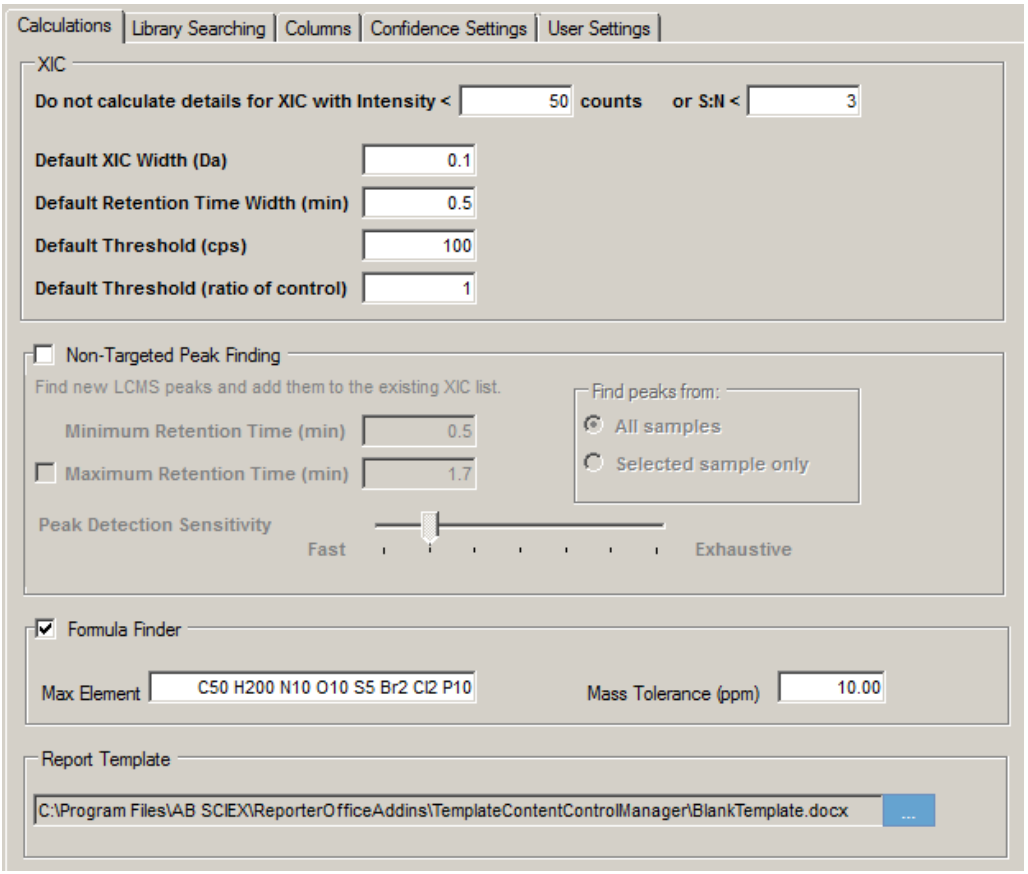


Figure 26: Paramètres "calculation" de recherche du logiciel MasterView

La recherche librairie peut se faire selon trois algorithmes (figure 27). Il y a principalement la recherche de confirmation et la recherche de candidats. La recherche de confirmation va comparer la liste exacte utilisée pour la comparaison à la librairie. S'il existe une différence entre le composé recherché et la proposition de la librairie, celui-ci ne sera pas retenu. Par contre, lors de la recherche de candidats, la recherche n'est pas contrainte au composé recherché et la recherche peut proposer des candidats alternatifs. Les résultats peuvent ensuite être classés de plusieurs façons. Les spectres sont comparés soit en « fit », « reversed fit » ou « purity ».

Avec le paramètre « fit », le score est obtenu grâce à la comparaison du spectre expérimental avec le spectre théorique. Si le spectre expérimental contient plus de fragments que le spectre théorique, le score sera bon car ce sont les pics appartenant au spectre expérimental qui sont contraignants. Ce mode est particulièrement adapté aux anaylses SWATH, car celles-ci contiennent des fragments appartenant à d'autres molécules. En ce qui concerne le mode « reversed fit » ce sont les fragments présents dans le spectre expérimental qui doivent correspondre au spectre théorique. Enfin, la sélection selon le mode « pureté » est la combinaison exacte entre les pics présents dans le spectre théorique et expérimental.

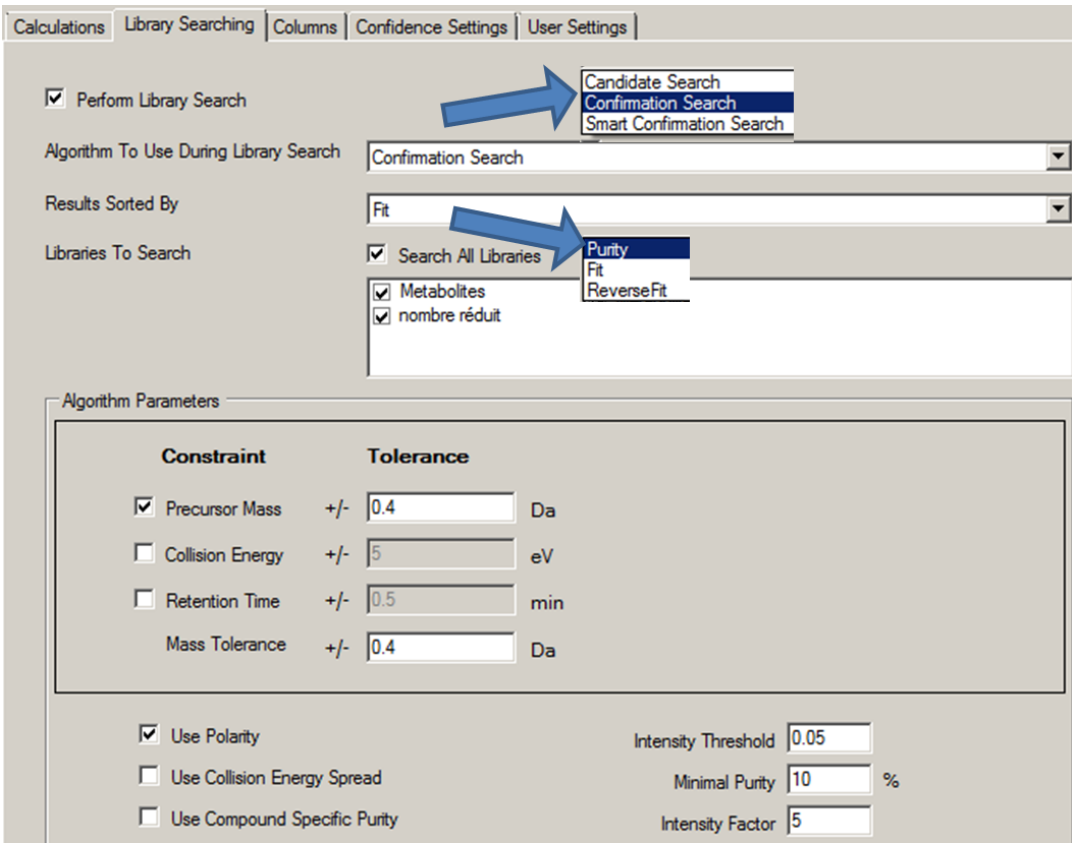


Figure 27: Paramètres "library searching" de recherche du logiciel MasterView

Enfin, les paramètres de confiance sont intégrés dans l'algorithme de recherche afin de catégoriser les identifications selon l'erreur de masse (en ppm), l'erreur sur le temps de rétention (si spécifié et connu), la différence de ratio des isotopes, le score de la librairie, et enfin la recherche de formule. Le score obtenu est une combinaison de ces différents paramètres qui peuvent être pondérés de façon différente (figure 28).

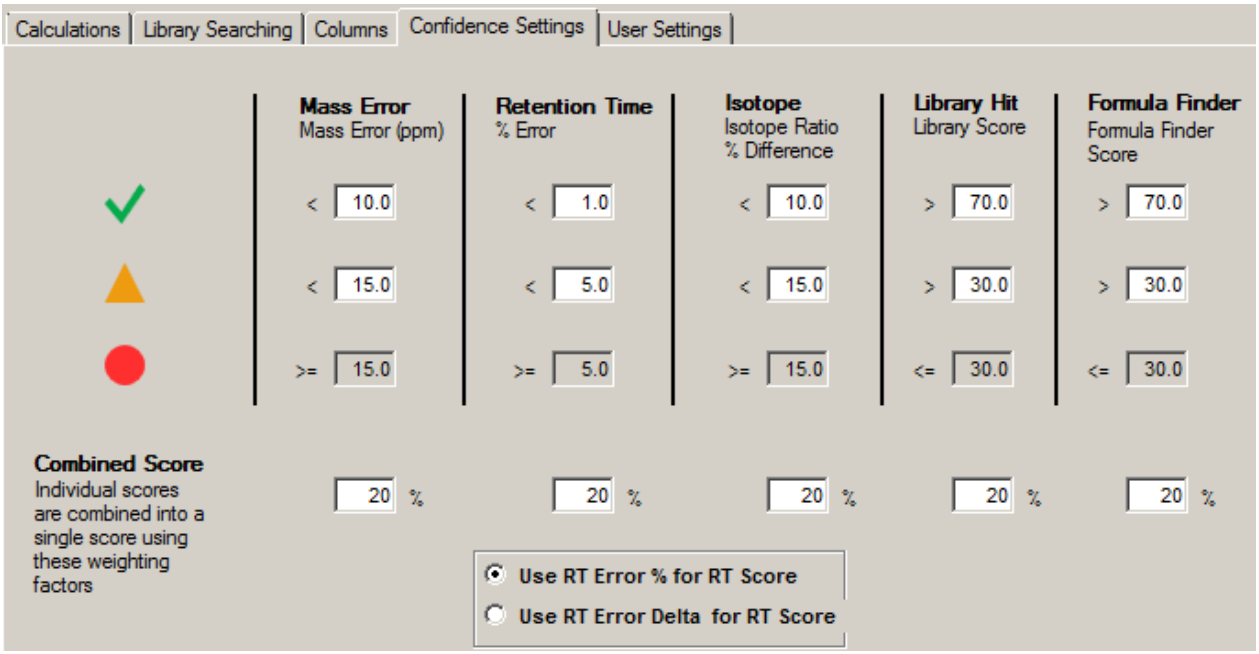


Figure 28: Paramètres "confidence searching" de recherche du logiciel MasterView

La ligne comprenant le métabolite avec le score déterminé précédemment est sélectionnée (A) (figure 29). La trace chromatographique de ce composé est extraite selon sa masse dans l'expérience TOF-MS, et la ligne rose représente le temps de rétention du chromatogramme où le spectre de l'expérience MS/MS est utilisé pour une comparaison avec le spectre de référence présent dans la librairie (B). Les isotopes sont présentés en C. C'est la comparaison entre la masse exacte et le ratio des aires des isotopes qui y est illustrée. Enfin, le spectre de référence provenant de la librairie et le spectre expérimental sont comparés (D).

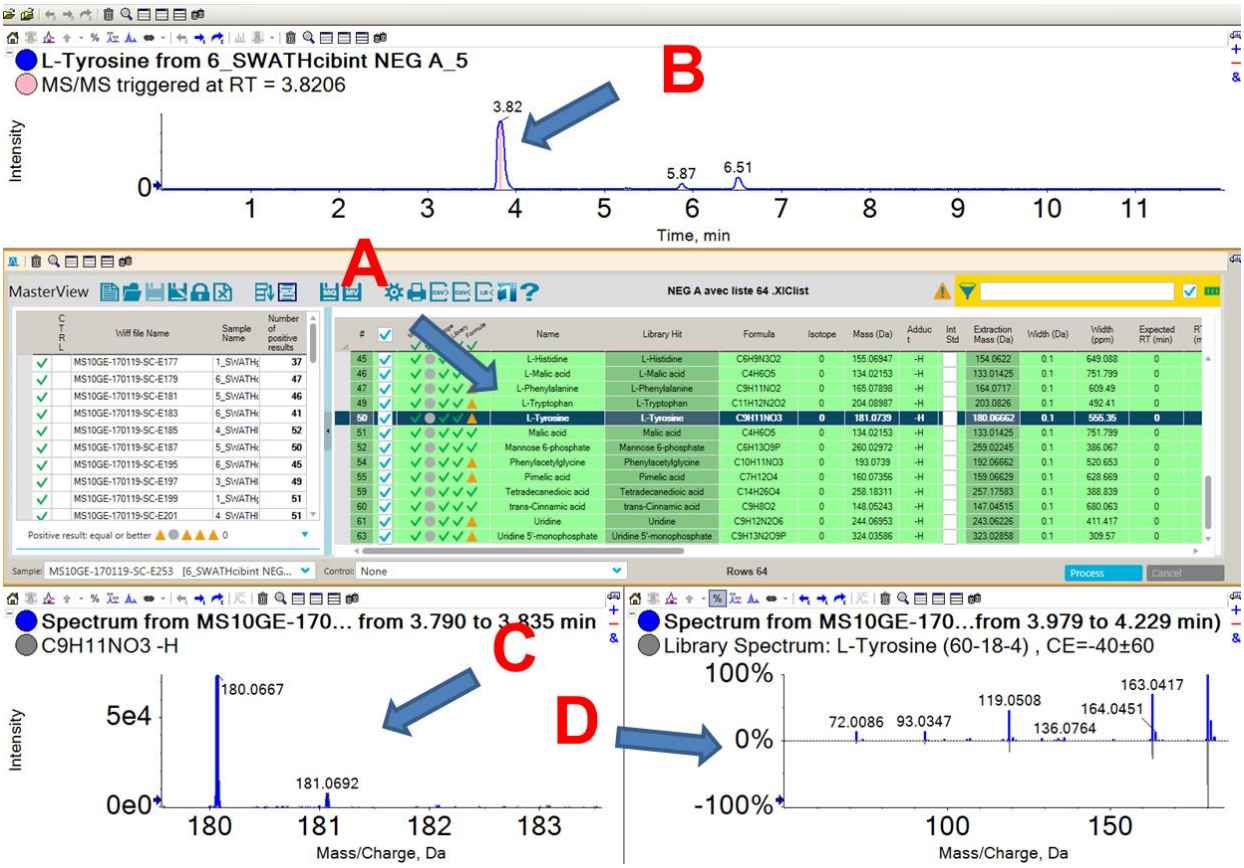


Figure 29: Résultats d'une recherche avec le logiciel MasterView

10.3. LibraryView

Le logiciel LibraryView est composé de spectres expérimentaux qui ont été annotés et dont les isotopes ont été supprimés. Cette librairie annotée (avec 532 métabolites faisant partie de HMDB) a été développée avec des standards dans le cadre d'une thèse précédente [115]. Le cas de l'acide citrique est présenté dans la figure ci-dessous.

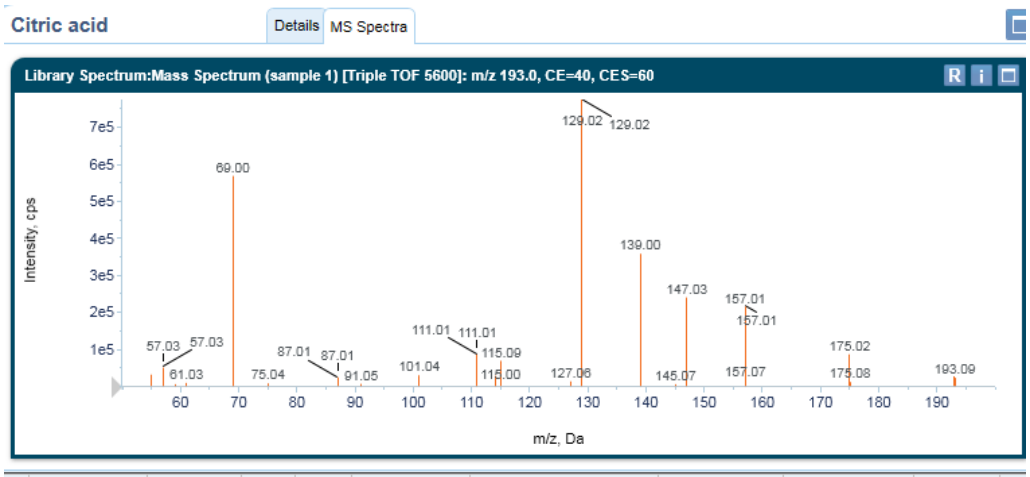


Figure 30: Recherche dans le logiciel LibraryView de l'acide citrique

11. Références

1. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Metabonomics.* Nature (London, U. K.), 2008. **455**(7216): p. 1054-1056.
2. Oliver, S.G., et al., *Systematic functional analysis of the yeast genome.* Trends Biotechnol., 1998. **16**(9): p. 373-378.
3. Mashego, M.R., et al., *Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies.* Biotechnol. Lett., 2007. **29**(1): p. 1-16.
4. Tweeddale, H., L. Notley-McRobb, and T. Ferenci, *Effect of slow growth on metabolism of Escherichia coli, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis.* J. Bacteriol., 1998. **180**(19): p. 5109-5116.
5. Kell, D.B. and S.G. Oliver, *The metabolome 18 years on: a concept comes of age.* Metabolomics, 2016. **12**(10): p. 1-8.
6. Fiehn, O., *Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes.* Plant Mol. Biol., 2002. **48**(1-2): p. 155-171.
7. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2005. **24**(4): p. 285-294.
8. Dettmer, K., P.A. Aronov, and B.D. Hammock, *Mass spectrometry-based metabolomics.* Mass Spectrom. Rev., 2007. **26**(1): p. 51-78.
9. Fernie, A.R., et al., *Innovation: Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2004. **5**(9): p. 763-769.
10. Alvarez-Sanchez, B., F. Priego-Capote, and M.D. Luque de Castro, *Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2010. **29**(2): p. 120-127.
11. Ivanisevic, J., et al., *Toward 'Omic Scale Metabolite Profiling: A Dual Separation-Mass Spectrometry Approach for Coverage of Lipid and Central Carbon Metabolism.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2013. **85**(14): p. 6876-6884.
12. Bundy, J.G., M.P. Davey, and M.R. Viant, *Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives.* Metabolomics, 2009. **5**(1): p. 3-21.
13. Athersuch, T.J. and H.C. Keun, *Metabolic profiling in human exposome studies.* Mutagenesis, 2015. **30**(6): p. 755-762.
14. Rappaport, S.M., et al., *The blood exposome and its role in discovering causes of disease.* Environ. Health Perspect., 2014. **122**(8): p. 769-774, 6 pp.
15. Saito, K., et al., *Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations.* Metabolomics, 2014. **10**(3): p. 402-413.
16. Alvarez-Sanchez, B., F. Priego-Capote, and M.D. Luque de Castro, *Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2010. **29**(2): p. 111-119.
17. van der Greef, J., et al., *Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO.* Mass Spectrom. Rev., 2013. **32**(5): p. 399-415.
18. Wolfender, J.-L., et al., *Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts.* J. Chromatogr. A, 2015. **1382**: p. 136-164.
19. Theodoridis, G., H.G. Gika, and I.D. Wilson, *LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2008. **27**(3): p. 251-260.
20. Cajka, T. and O. Fiehn, *Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2015: p. Ahead of Print.

21. Gorrochategui, E., et al., *Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2016. **82**: p. 425-442.
22. Feillet, F., *Phénylcétonurie.* La Presse Médicale, 2006. **35**(3): p. 502-508.
23. Mason, P.J., J.M. Bautista, and F. Gilsanz, *G6PD deficiency: the genotype-phenotype association.* Blood Reviews, 2007. **21**(5): p. 267-283.
24. Scalbert, A., et al., *Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research.* Metabolomics, 2009. **5**(4): p. 435-458.
25. Wishart, D.S., *Metabolomics: applications to food science and nutrition research.* Trends Food Sci. Technol., 2008. **19**(9): p. 482-493.
26. Zhou, B., et al., *LC-MS-based metabolomics.* Mol. BioSyst., 2012. **8**(2): p. 470-481.
27. Kell, D.B., *Metabolomics and systems biology: making sense of the soup.* Curr. Opin. Microbiol., 2004. **7**(3): p. 296-307.
28. Han, J., et al., *Metabolomic analysis of key central carbon metabolism carboxylic acids as their 3-nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS.* Electrophoresis, 2013. **34**(19): p. 2891-2900.
29. Romano, A., et al., *Metabolomic profiles of exhaled breath condensate of 39 nickel exposed workers.* G Ital Med Lav Ergon, 2012. **34**(3 Suppl): p. 682-6.
30. B. Bull, J.B.-G., ed. *Morphology of the erythron*. T. Kipps (Ed.) ed. William's Hematology, ed. McGraw-Hill. 1995: New York. pp.349-363.
31. Peter Klinken, S., *Red blood cells.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2002. **34**(12): p. 1513-1518.
32. Ginsburg, H., *Metabolism: Malaria parasite stands out.* Nature, 2010. **466**(7307): p. 702-703.
33. Gika, H. and G. Theodoridis, *Sample preparation prior to the LC--MS-based metabolomics/metabonomics of blood-derived samples.* Bioanalysis, 2011. **3**(14): p. 1647-1661.
34. 2017 [cited 2017 17 march]; Available from: https://www.britannica.com/science/hepatocyte.
35. Cheloni, G., *Toward a mechanistic understanding of the combined action of copper micropollutants and light irradiation on phytoplankton: an investigation across multiple levels of biological organization*. 2016.
36. Jamers, A., R. Blust, and W. De Coen, *Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena?* Aquat. Toxicol., 2009. **92**(3): p. 114-121.
37. Jamers, A., et al., *Copper toxicity in the microalga Chlamydomonas reinhardtii: an integrated approach.* BioMetals, 2013. **26**(5): p. 731-740.
38. Khobot'ev, V.G., et al., *Copper uptake by algae from copper-containing compounds and the effect of this process on their salt metabolism.* Gidrobiol. Zh., 1976. **12**(1): p. 40-6.
39. May, P., et al., *Metabolomics- and proteomics-assisted genome annotation and analysis of the draft metabolic network of Chlamydomonas reinhardtii.* Genetics, 2008. **179**(1): p. 157-166.
40. Park, J.-J., et al., *The response of Chlamydomonas reinhardtii to nitrogen deprivation: a systems biology analysis.* The Plant journal : for cell and molecular biology, 2015. **81**(4): p. 611-24.
41. Puzanskiy, R.K., et al., *Analysis of Metabolic Profile of Chlamydomonas reinhardtii Cultivated under Autotrophic Conditions.* Applied Biochemistry and Microbiology, 2015. **51**(1): p. 83-94.
42. Zhang, L.P., et al., *Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Cell Physiol, 2008. **49**(3): p. 411-9.

43. Boelling, C. and O. Fiehn, *Metabolite profiling of Chlamydomonas reinhardtii under nutrient deprivation.* Plant Physiol., 2005. **139**(4): p. 1995-2005.
44. Lee do, Y. and O. Fiehn, *Metabolomic response of Chlamydomonas reinhardtii to the inhibition of target of rapamycin (TOR) by rapamycin.* J Microbiol Biotechnol, 2013. **23**(7): p. 923-31.
45. Lee, D.Y. and O. Fiehn, *High quality metabolomic data for Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Methods, 2008. **4**: p. 7.
46. Yang, D., et al., *Lipidomic Analysis of Chlamydomonas reinhardtii under Nitrogen and Sulfur Deprivation.* PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137948.
47. *Chlamydomonas cell*. 2017 [cited 2017 16 march]; Available from: http://www.meritnation.com/ask-answer/question/neat-and-well-labelled-diagram-of-chlamydomonas-and-amoeba/microorganisms-friend-and-foe/9524041.
48. Khamis, M.M., D.J. Adamko, and A. El-Aneed, *Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery.* Mass Spectrom. Rev., 2017. **36**(2): p. 115-134.
49. Lu, W., B.D. Bennett, and J.D. Rabinowitz, *Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics.* J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2008. **871**(2): p. 236-242.
50. Watanabe, K., *Approaches for improving throughput and sensitivity of LC-ESI-MS/MS analysis for small molecules in biological Samples*. 2015.
51. Wishart, D.S., et al., *HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013.* Nucleic Acids Res., 2013. **41**(D1): p. D801-D807.
52. Wishart, D.S., et al., *HMDB: the Human Metabolome Database.* Nucleic Acids Res., 2007. **35**(Database Iss): p. D521-D526.
53. Wishart, D.S., et al., *HMDB: a knowledgebase for the human metabolome.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D603-10.
54. 2017 [cited 2017 16 march]; Available from: http://www.hmdb.ca/statistics.
55. Faijes, M., A.E. Mars, and E.J. Smid, *Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of Lactobacillus plantarum.* Microb. Cell Fact., 2007. **6**: p. No pp. given.
56. Villas-Boas, S.G., et al., *Global metabolite analysis of yeast: Evaluation of sample preparation methods.* Yeast, 2005. **22**(14): p. 1155-1169.
57. Bolten, C.J. and C. Wittmann, *Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts.* Biotechnol. Lett., 2008. **30**(11): p. 1993-2000.
58. Winder, C.L., et al., *Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2008. **80**(8): p. 2939-2948.
59. Mohamed, R., et al., *Comprehensive Analytical Strategy for Biomarker Identification based on Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and New Candidate Confirmation Tools.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2009. **81**(18): p. 7677-7694.
60. Hopfgartner, G. and E. Bourgogne, *Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry.* Mass Spectrom. Rev., 2003. **22**(3): p. 195-214.
61. Teahan, O., et al., *Impact of Analytical Bias in Metabonomic Studies of Human Blood Serum and Plasma.* Anal. Chem., 2006. **78**(13): p. 4307-4318.
62. Casas, M.E., et al., *Analytical sample preparation strategies for the determination of antimalarial drugs in human whole blood, plasma and urine.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014. **962**: p. 109-31.
63. Mirnaghi, F.S. and A.A. Caudy, *Challenges of analyzing different classes of metabolites by a single analytical method.* Bioanalysis, 2014. **6**(24): p. 3393-3416.

64. Begley, P., et al., *Development and Performance of a Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis for Large-Scale Nontargeted Metabolomic Studies of Human Serum.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2009. **81**(16): p. 7038-7046.
65. Garcia, A., et al., *Capillary electrophoresis mass spectrometry as a tool for untargeted metabolomics.* Bioanalysis, 2017. **9**(1): p. 99-130.
66. Holcapek, M., R. Jirasko, and M. Lisa, *Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules.* J. Chromatogr. A, 2010. **1217**(25): p. 3908-3921.
67. van der Greef, J., et al., *The Art and Practice of Systems Biology in Medicine: Mapping Patterns of Relationships.* J. Proteome Res., 2007. **6**(4): p. 1540-1559.
68. Xu, F., L. Zou, and C.N. Ong, *Multiorigination of Chromatographic Peaks in Derivatized GC/MS Metabolomics: A Confounder That Influences Metabolic Pathway Interpretation.* J. Proteome Res., 2009. **8**(12): p. 5657-5665.
69. Wachsmuth, C.J., P.J. Oefner, and K. Dettmer, *Equipment and metabolite identification (ID) strategies for mass-based metabolomic analysis.* Woodhead Publ. Ser. Food Sci., Technol. Nutr., 2013. **251**(Metabolomics in Food and Nutrition): p. 3-28.
70. Lei, Z., D.V. Huhman, and L.W. Sumner, *Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics.* J. Biol. Chem., 2011. **286**(29): p. 25435-25442.
71. Periat, A.C., *Utilisation de la chromatographie d'interaction hydrophile pour l'analyse de composés d'intérêt pharmaceutique*. 2015.
72. Buszewski, B. and S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique.* Anal. Bioanal. Chem., 2012. **402**(1): p. 231-247.
73. Wilson, N.S., et al., *Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VI. Columns with embedded or end-capping polar groups.* J. Chromatogr. A, 2004. **1026**(1-2): p. 91-100.
74. McCalley, D.V., *Comparison of the performance of conventional C18 phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr. A, 1999. **844**(1 + 2): p. 23-38.
75. Euerby, M.R. and P. Petersson, *Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis.* J. Chromatogr. A, 2005. **1088**(1-2): p. 1-15.
76. Alpert, A.J., *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds.* J. Chromatogr., 1990. **499**: p. 177-96.
77. Alpert, A.J., et al., *Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates.* J. Chromatogr. A, 1994. **676**(1): p. 191-202.
78. Cubbon, S., et al., *Metabolomic applications of HILIC-LC-MS.* Mass Spectrom. Rev., 2010. **29**(5): p. 671-684.
79. Cecchi, T., *Theoretical Models of Ion Pair Chromatography: A Close Up of Recent Literature Production.* J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2015. **38**(3): p. 404-414.
80. Cecchi, T., *Ion pairing chromatography.* Crit. Rev. Anal. Chem., 2008. **38**(3): p. 161-213.
81. Holcapek, M., et al., *Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates.* J. Mass Spectrom., 2004. **39**(1): p. 43-50.
82. Gustavsson, S.A., et al., *Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents.* J. Chromatogr. A, 2001. **937**(1-2): p. 41-47.

83. Takino, M., S. Daishima, and K. Yamaguchi, *Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents.* Anal. Sci., 2000. **16**(7): p. 707-711.
84. Coulier, L., et al., *Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.* Analytical chemistry, 2006. **78**(18): p. 6573-82.
85. Luo, B., et al., *Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry.* J. Chromatogr. A, 2007. **1147**(2): p. 153-164.
86. Huck, J.H.J., et al., *Profiling of pentose phosphate pathway intermediates in blood spots by tandem mass spectrometry: Application to transaldolase deficiency.* Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2003. **49**(8): p. 1375-1380.
87. Tuytten, R., et al., *Short capillary ion-pair high-performance liquid chromatography coupled to electrospray (tandem) mass spectrometry for the simultaneous analysis of nucleoside mono-, di- and triphosphates.* Rapid Commun. Mass Spectrom., 2002. **16**(12): p. 1205-1215.
88. Kumar, B., et al., *Interaction between sulphur mobilization proteins SufB and SufC: Evidence for an iron-sulphur cluster biogenesis pathway in the apicoplast of Plasmodium falciparum.* Int. J. Parasitol., 2011. **41**(9): p. 991-999.
89. Knee, J.M., et al., *A novel ion pairing LC/MS metabolomics protocol for study of a variety of biologically relevant polar metabolites.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013. **936**: p. 63-73.
90. Laourdakis, C.D., et al., *Comprehensive quantitative analysis of purines and pyrimidines in the human malaria parasite using ion-pairing ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 2014. **967**(0): p. 127-133.
91. Sen, A., et al., *Analysis of polar urinary metabolites for metabolic phenotyping using supercritical fluid chromatography and mass spectrometry.* J. Chromatogr. A, 2016. **1449**: p. 141-155.
92. Klesper, E., A.H. Corwin, and D.A. Turner, *Porphyrin studies. XX. High pressure gas chromatography above critical temperatures.* J. Org. Chem., 1962. **27**: p. 700-1.
93. Desfontaine, V., et al., *Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis.* J. Pharm. Biomed. Anal., 2015. **113**: p. 56-71.
94. Dispas, A., et al., *Quantitative determination of salbutamol sulfate impurities using achiral supercritical fluid chromatography.* J. Pharm. Biomed. Anal., 2017. **134**: p. 170-180.
95. Perrenoud, A.G.-G., et al., *Evaluation of stationary phases packed with superficially porous particles for the analysis of pharmaceutical compounds using supercritical fluid chromatography.* J. Chromatogr. A, 2014. **1360**: p. 275-287.
96. Randall, L.G., *Carbon dioxide-based supercritical fluid chromatography. Column efficiencies and mobile-phase solvent power.* ACS Symp. Ser., 1984. **250**(Ultrahigh Resolut. Chromatogr.): p. 135-69.
97. Berger, T.A. and J.F. Deye, *Effect of mobile phase density gradients on efficiency in packed column supercritical fluid chromatography.* Chromatographia, 1990. **30**(1-2): p. 57-60.
98. Berger, T.A. and J.F. Deye, *Composition and density effects using methanol/carbon dioxide in packed column supercritical fluid chromatography.* Anal. Chem., 1990. **62**(11): p. 1181-5.
99. Grand-Guillaume-Perrenoud, A., *Chromatographie en phase supercritique : nouvelles perspectives dans le domaine de l'analyse pharmaceutique*. 2014.
100. Yost, R.A. and C.G. Enke, *Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer.* J. Am. Chem. Soc., 1978. **100**(7): p. 2274-5.

101. Holcapek, M., R. Jirasko, and M. Lisa, *Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques.* J. Chromatogr. A, 2012. **1259**: p. 3-15.
102. Hopfgartner, G., D. Tonoli, and E. Varesio, *High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices.* Anal. Bioanal. Chem., 2012. **402**(8): p. 2587-2596.
103. Korfmacher, W. and R. Ramanathan, *HRMS in DMPK.* Bioanalysis, 2016. **8**(16): p. 1635-1637.
104. Zhang, N.R., et al., *Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers - a different approach for analysis of biological samples.* Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009. **23**(7): p. 1085-1094.
105. Henry, H., et al., *Comparison between a high-resolution single-stage Orbitrap and a triple quadrupole mass spectrometer for quantitative analyses of drugs.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012. **26**(5): p. 499-509.
106. Annesley, T.M., *Ion suppression in mass spectrometry.* Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2003. **49**(7): p. 1041-1044.
107. Bonfiglio, R., et al., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds.* Rapid Commun. Mass Spectrom., 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
108. Want, E. and P. Masson, *Processing and analysis of GC/LC-MS-based metabolomics data.* Methods Mol. Biol. (N. Y., NY, U. S.), 2011. **708**(Metabolic Profiling): p. 277-298.
109. Hendriks, M.M.W.B., et al., *Data-processing strategies for metabolomics studies.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2011. **30**(10): p. 1685-1698.
110. Werner, E., et al., *Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Accelerating the Characterization of Discriminating Signals by Combining Statistical Correlations and Ultrahigh Resolution.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2008. **80**(13): p. 4918-4932.
111. Ivosev, G., L. Burton, and R. Bonner, *Dimensionality Reduction and Visualization in Principal Component Analysis.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2008. **80**(13): p. 4933-4944.
112. Noack, S. and W. Wiechert, *Quantitative metabolomics: a phantom?* Trends Biotechnol., 2014. **32**(5): p. 238-244.
113. Laemmerhofer, M., W. Weckwerth, and Editors, *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*. 2013: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 475 pp.
114. Snyder, N.W., et al., *Untargeted metabolomics from biological sources using ultraperformance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS).* J. Visualized Exp., 2013(75): p. e50433, 8 pp.
115. Bruderer, T., *Accurate mass spectral libraries and predicted liquid chromatography retention times in bioanalysis and data independent metabolomics*. 2016.

Chapitre 2

Etude de l'extraction des métabolites polaires dans des matrices cellulaires végétales et animales

Table des matières - Chapitre 2

1. Introduction 61
1.1. Définition des matrices biologiques 61
1.2. Concept biologique lié à la métabolomique 61
1.3. Compréhension des systèmes biologiques 62
1.4. Conditions pré-analytiques : collection et conservation des échantillons 62
1.5. Préparation d'échantillons des matrices biologiques cellulaires 63
2. Etudes menées dans ce chapitre 65
2.1. Première étude - section 3 Partie 1 - Etude par cytométrie de flux de la lyse des cellules d'algues, par sonication et agitation mécanique 65
2.2. Seconde étude - section 4 Partie 2 - Comparaison des conditions d'extraction liquide-liquide des métabolites cellulaires polaires par analyse non-ciblée LC-SWATH/MS 66
2.3. Troisième étude - section 5 Partie 3 - Analyse non-ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/SWATH-MS) des variations d'expression métabolique de cellules d'algues exposées à différentes concentrations de cuivre 67
3. Références de l'introduction du chapitre 2 68
4. Partie 1 - Etude par cytométrie de flux de la lyse des cellules d'algues par sonication et agitation mécanique 71
4.1. Introduction 71
4.2. Matériel et méthodes 73
Préparation d'échantillon 74
4.3. Résultats et discussion 74
4.4. Conclusions et perspectives de la partie 1 du chapitre 2 79
5. Références de la partie 1 du chapitre 2 80
6. Partie 2 - Comparaison des conditions d'extraction liquide-liquide des métabolites cellulaires polaires par analyse non-ciblée LC-SWATH/MS 81
6.1. Introduction 81
6.2. Matériel et méthodes 83
Produits chimiques 83
Échantillons biologiques 84
Conditions chromatographiques 85
Paramètres de spectrométrie de masse 86
Préparation d'échantillons 87
Traitement des données 91
6.3. Résultats et discussion 92
Approche non-ciblée 93

Approche ciblée 96
6.4. Conclusion et perspectives 115
7. Références Partie 2 chapitre 2 118
8. Partie 3 - Analyse non-ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/SWATH-MS) des variations d'expression métabolique de cellules d'algues exposées à différentes concentrations de cuivre 121
8.1. Introduction 121
Analyse des cellules d'algues par LC-MS 121
Analyse non-ciblée pour la recherche de métabolites polaires 121
Les librairies et bases de données liées à l'identification des métabolites 122
Les enjeux des concentrations de cuivre dans l'environnement et l'utilisation de Chlamydomonas reinhardtii comme modèle biologique 122
8.2. Matériel et méthodes 123
Produits chimiques 123
Algues et conditions de culture 123
Milieu expérimental 124
Echantillons biologiques et cadre d'exposition pour l'étude des métabolites polaires et apolaires 125
Détermination du Cu intracellulaire 126
Préparation d'échantillons 126
Conditions chromatographiques 127
Paramètres de spectrométrie de masse 129
Traitement des données 129
8.3. Résultats et discussion 137
Analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide 139
Séquence 1, analyses statistiques globales 141
Séquence 2, analyses statistiques des résultats de l'exposition au cuivre 155
Identification des variables mises en évidence par l'analyse statistique pour les échantillons exposés au cuivre pendant 48h 167
Identification des métabolites via la base de données AMML 173
8.4. Conclusions et perspectives 194
8.5. Références partie 3 chapitre 2 197
9. Conclusions et perspectives du chapitre 2 199
10. Remerciements 200
11. Annexes 201

1. Introduction

1.1. Définition des matrices biologiques

Le terme « matrice » est utilisé pour exprimer un grand nombre de concepts et fait référence à des domaines d'application tels que les mathématiques, la géologie ou encore l'imprimerie [1]. Ce terme sera donc défini en tant que matrice biologique qui fait référence au compartiment ou à la matière dans laquelle se trouvent les éléments tels que le cytoplasme ou les mitochondries par exemple. Les matrices biologiques sont par exemple le plasma, le sérum et l'urine [2, 3]. Il existe aussi d'autres matrices biologiques, lors de problématiques liées à la médecine légale. Les cheveux, les ongles peuvent être analysés sur des dépouilles humaines pendant de nombreux mois après le décès de la personne [4, 5].

Les matrices biologiques d'intérêt utilisées dans ce chapitre sont cellulaires et tissulaires d'origine animale et végétale : cellules d'algues, tissu hépatique et érythrocytes bovins.

1.2. Concept biologique lié à la métabolomique

La plupart des analyses de profilage des métabolites (voir chapitre 1) sont réalisées dans une problématique et un contexte biologiques précis, avec une hypothèse de départ, et non une détermination après analyse, de paramètres biologiques individuels résultant de ces analyses [6]. Le métabolome est le produit final de la cascade biologique, et donc le dernier maillon de l'expression du phénotype.[6, 7]. C'est donc à partir de ce phénotype supposé que les analyses métabolomiques sont conduites. Les métabolites participent aux réactions nécessaires afin de permettre la croissance, l'entretien et les fonctions cellulaires [8, 9].

1.3. Compréhension des systèmes biologiques

Les métabolites font partie d'un système en perpétuelle interaction [10]. Malgré la possibilité de quantifier les métabolites par de nombreuses techniques, il est important de ne pas pour autant en tirer trop rapidement des conclusions qui pourraient se révéler erronées [10-12]. C'est en bâtissant un réseau d'informations concordantes que celles-ci peuvent être confirmées. C'est pourquoi une lecture globale des résultats obtenus ne peut se faire qu'en intégrant l'ensemble des données « omiques » obtenues [12].

1.4. Conditions pré-analytiques : collection et conservation des échantillons

Il faut opérer la manipulation des échantillons, ainsi que le stockage, de façon rapide afin de minimiser les effets de variabilité [13]. Le but des analyses métabolomiques est avant tout d'obtenir le nombre maximum de métabolites et d'éviter que ceux-ci ne s'altèrent entre la collection d'échantillons et leur préparation [14]. De nombreuses études appliquent des protocoles comprenant des étapes conventionnelles [15] . Or il est très important, avant de procéder à des analyses de métabolites ou métabolomiques, de connaître la matrice de laquelle les éléments sont extraits et par quelles méthodes de préparation d'échantillons essentielle, ces métabolites doivent être traités.

Les résultats des analyses métabolomiques doivent refléter l'état biologique exact dans lequel se trouve l'échantillon lorsque celui-ci a été prélevé. Il a été démontré qu'un échantillonnage et des protocoles de prétraitement inadéquats peuvent mener à des biais dus à la conversion ou à la dégradation des métabolites [16, 17]. Ceci implique d'être particulièrement rapide et de stopper le plus vite possible l'activité enzymatique des protéines par une méthode dite de « quenching »[15, 18] . Il est reconnu que le turnover, ou rotation des espèces chimiques au niveau métabolique, est de l'ordre de la milliseconde [19, 20] . A l'inverse, les métabolites doivent être préservés de toute dégradation afin de ne pas fausser les résultats ainsi obtenus [17].

Il existe plusieurs types de « quenching » mais celui qui est le plus couramment utilisé est une étape de refroidissement rapide et intense. Ceci est réalisé soit en plongeant l'échantillon dans un bain d'azote liquide, soit en « injectant » l'échantillon dans une solution de méthanol froid de plus de -20°C [21]. L'avantage de la technique utilisant le

méthanol froid est de minimiser les effets des pertes des métabolites intracellulaires en évitant une lyse de la membrane due au choc thermique (formation de cristaux) [22].

1.5. Préparation d'échantillons des matrices biologiques cellulaires

Certaines matrices biologiques, comme le plasma ou l'urine, ne nécessitent que peu d'étapes de préparation d'échantillon en vue de leur analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, car elles sont déjà dans un milieu liquide [23, 24]. L'analyse de cellules nécessite à la fois une méthode de « quenching » (arrêt rapide du métabolisme) et une méthode lyse afin d'obtenir le contenant intracellulaire [15].

2. Etudes menées dans ce chapitre

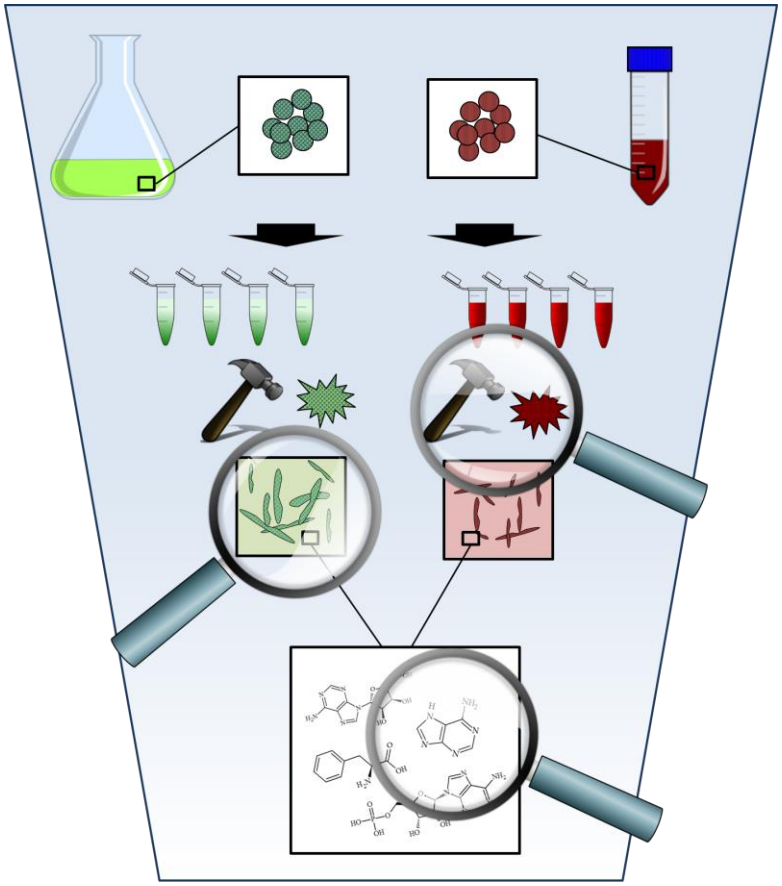


Figure 31: Points mis en avant dans ce chapitre lors du processus analytique (loupes)

2.1. Première étude - section 3 Partie 1 - Etude par cytométrie de flux de la lyse des cellules d'algues, par sonication et agitation mécanique

La première partie de ce chapitre décrit l'optimisation de la lyse cellulaire de l'algue *Chlamydomonas Reinhardtii*. Cette algue unicellulaire est souvent utilisée comme modèle biologique afin d'évaluer l'impact des polluants aquatiques sur l'environnement [25]. Elle appartient à la famille des *Chlorophyceae* et est largement employée dans le champ des études dites « –omiques » [26]. Cette algue vit dans un environnement aquatique pouvant subir de nombreuses variations, c'est pourquoi elle a une membrane externe rigide mais pouvant cependant réaliser des échanges avec son environnement. Afin d'analyser les métabolites présents, il est nécessaire de briser cette membrane.

Les cellules sont soit lyophilisées, regroupées dans le culot du tube, ou en suspension. Elles subissent ensuite une étape de sonication, ou alors d'agitation intense à l'aide de billes en verre. Les analyses sont réalisées à l'aide de la technologie de cytométrie de flux (flow cytometry), qui va permettre d'évaluer la taille des cellules intactes et ensuite la disparition de celles-ci.

2.2. Seconde étude - section 4 Partie 2 - Comparaison des conditions d'extraction liquide-liquide des métabolites cellulaires polaires par analyse non-ciblée LC-SWATH/MS

La seconde étude menée dans ce chapitre, s'intéresse de plus près aux métabolites extraits par différentes préparations d'échantillon. Les matrices cellulaires utilisées pour l'étude de l'extraction des métabolites sont des cellules d'algues, des cellules sanguines d'origine bovine, ainsi qu'une matrice d'un autre type à savoir du tissu hépatique lui aussi d'origine bovine. En effet, une fois l'enveloppe renfermant les métabolites rompue, il est possible d'extraire le matériel intracellulaire. Les méthodes de préparation d'échantillons sur des matrices biologiques plus complexes telles que le sang, le foie ou les cellules végétales, reposent principalement sur des techniques d'extraction liquide-liquide avec des solvants ayant des polarités différentes [15, 18].

Ces solvants peuvent soit être miscibles ou alors contenir des espèces différentes telles que des espèces chimiques liquides dites « polaires » ou « apolaires » et mener à deux phases liquides non miscibles. C'est cette dernière approche que sera étudiée. Le fait d'avoir deux phases séparées, renfermant de facto des métabolites de polarités différentes, permet d'adapter le type d'analyse chromatographique en termes de colonne, de solvant d'élution, dans le but d'obtenir un plus grand nombre de métabolites.

La seconde partie traite de l'extraction solide-liquide par trois solvants différents (eau, méthanol et chloroforme) selon des ordres différents, et de l'application ou non d'une agitation mécanique importante. Cette seconde partie est testée sur trois types de matrices : cellules sanguines, tissu hépatique, cellules d'algues (*Chlamydomonas reinhardtii).* Les analyses par LC-ESI-MS comportent deux types de pH, (pH 3 et pH 8) via une séparation sur une phase stationnaire inverse classique (C_{18}). Les acquisitions sont réalisées en mode positif et négatif.

2.3. Troisième étude - section 5 Partie 3 - Analyse non-ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/SWATH-MS) des variations d'expression métabolique de cellules d'algues exposées à différentes concentrations de cuivre

La dernière partie est une application de la technique de lyse sélectionnée, couplée à l'extraction liquide-liquide, ayant donné les meilleurs résultats en termes d'extraction des métabolites et de répétabilité. Cette technique est appliquée sur des cellules d'algues ayant subi une variation de la concentration de cuivre libre dans leur milieu de culture. En effet, l'assimilation de métaux traces tels que le cuivre, le cadmium ou encore le manganèse a été largement décrite au niveau de l'expression des gènes et des protéines [27, 28]. Ces expressions permettent d'évaluer l'impact de tels polluants dans l'environnement [29]. Les phytochélatines et le glutathion qui sont responsables de la détoxification des cellules d'algues en sont des indicateurs [30]. Ces métaux tels que le cuivre sont à la fois essentiels à la croissance et à l'activité biologique de la cellule, mais se révèlent toxiques en grande quantité. Ceci indique la complexité supplémentaire de cette étude car le cuivre est un élément présent dans les cellules.

3. Références de l'introduction du chapitre 2

1. http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/matrice/49902?q=matrice#49802. [cited 2017 21 février].
2. Panuwet, P., et al., *Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring.* Crit. Rev. Anal. Chem., 2016. **46**(2): p. 93-105.
3. Kebarle, P. and L. Tang, *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry.* Anal. Chem., 1993. **65**(22): p. 972A-986A.
4. Kohler, I., *Sensitivity improvements in capillary electrophoresis-mass spectrometry for clinical and forensic toxicology*. 2013.
5. Butzbach, D.M., *The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results.* Forensic Sci Med Pathol, 2010. **6**(1): p. 35-45.
6. Dettmer, K., P.A. Aronov, and B.D. Hammock, *Mass spectrometry-based metabolomics.* Mass Spectrom. Rev., 2007. **26**(1): p. 51-78.
7. Fiehn, O., *Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes.* Plant Mol. Biol., 2002. **48**(1-2): p. 155-171.
8. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Metabonomics.* Nature (London, U. K.), 2008. **455**(7216): p. 1054-1056.
9. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2005. **24**(4): p. 285-294.
10. Fernie, A.R., et al., *Innovation: Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2004. **5**(9): p. 763-769.
11. Jamers, A., R. Blust, and W. De Coen, *Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena?* Aquat. Toxicol., 2009. **92**(3): p. 114-121.
12. Kell, D.B., *Metabolomics and systems biology: making sense of the soup.* Curr. Opin. Microbiol., 2004. **7**(3): p. 296-307.
13. Zhou, B., et al., *LC-MS-based metabolomics.* Mol. BioSyst., 2012. **8**(2): p. 470-481.
14. Mushtaq, M.Y., et al., *Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome.* Phytochem. Anal., 2014. **25**(4): p. 291-306.
15. Alvarez-Sanchez, B., F. Priego-Capote, and M.D. Luque de Castro, *Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2010. **29**(2): p. 120-127.
16. Teahan, O., et al., *Impact of Analytical Bias in Metabonomic Studies of Human Blood Serum and Plasma.* Anal. Chem., 2006. **78**(13): p. 4307-4318.
17. Alvarez-Sanchez, B., F. Priego-Capote, and M.D. Luque de Castro, *Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2010. **29**(2): p. 111-119.
18. Winder, C.L., et al., *Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2008. **80**(8): p. 2939-2948.
19. Theobald, U., et al., *In vivo analysis of metabolic dynamics in Saccharomyces cerevisiae: I. Experimental observations.* Biotechnol. Bioeng., 1997. **55**(2): p. 305-316.
20. De Koning, W. and K. Van Dam, *A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH.* Anal. Biochem., 1992. **204**(1): p. 118-23.

21. Bolten, C.J. and C. Wittmann, *Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts.* Biotechnol. Lett., 2008. **30**(11): p. 1993-2000.
22. Wittmann, C., et al., *Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria.* Anal. Biochem., 2004. **327**(1): p. 135-139.
23. Wong, M.C.Y., et al., *An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/QToF MS.* J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2008. **871**(2): p. 341-348.
24. Hodson, M.P., et al., *An approach for the development and selection of chromatographic methods for high-throughput metabolomic screening of urine by ultra pressure LC-ESI-ToF-MS.* Metabolomics, 2009. **5**(2): p. 166-182.
25. Mohammed, M.H. and B. Markert, *Toxicity of heavy metals on Scenedesmus quadricauda (Turp.) de Brebisson in batch cultures.* Environ Sci Pollut Res Int, 2006. **13**(2): p. 98-104.
26. Jamers, A., R. Blust, and W. De Coen, *Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena?* Aquat Toxicol, 2009. **92**(3): p. 114-21.
27. Knauer, K., R. Behra, and L. Sigg, *Adsorption and uptake of copper by the green alga Scenedesmus subspicatus (Chlorophyta).* Journal of Phycology, 1997. **33**(4): p. 596-601.
28. Meylan, S., R. Behra, and L. Sigg, *Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: A microcosm study.* Environmental Science & Technology, 2004. **38**(11): p. 3104-3111.
29. Brautigam, A., et al., *Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using Chlamydomonas reinhardtii.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(6): p. 1737-1747.
30. Le Faucheur, S.V., R. Behra, and L. Sigg, *Thiol and metal contents in periphyton exposed to elevated copper and zinc concentrations: A field and microcosm study.* Environmental Science & Technology, 2005. **39**(20): p. 8099-8107.

4. Partie 1 - Etude par cytométrie de flux de la lyse des cellules d'algues par sonication et agitation mécanique

4.1. Introduction

L'algue *Chlamydomonas reinhardtii* est utilisée comme modèle cellulaire afin de tester la capacité de différentes préparations d'échantillon à rompre sa membrane cellulaire. Cette algue vit dans un environnement aquatique pouvant subir de nombreuses variations liées aux changements de température, d'osmolarités ou encore de rayonnements solaires [1-3]. Elle possède donc une membrane externe très rigide mais permettant de réaliser des échanges avec son environnement. Afin d'étudier les métabolites présents, il est nécessaire de briser cette membrane. Il existe diverses études, notamment celles du laboratoire de Fiehn, évaluant la capacité à stopper l'activité métabolique (quenching) et à lyser des cellules. Cette étude analyse en outre, la composition du solvant d'extraction et l'annotation des métabolites [4]. Aucune étude ne s'est focalisée sur l'évolution macromoléculaire des cellules et du pourcentage de cellules rompues. Il existe pourtant un lien clair entre la rupture cellulaire, et donc l'accès au matériel intracellulaire, et la quantité de métabolites obtenus.

Pour ce faire, deux techniques de lyses distinctes sont utilisées, l'agitation mécanique et la sonication à l'aide d'une sonde. Ensuite la forme sous laquelle les cellules sont lysées est aussi décisive. La sonication ne peut être effectuée qu'en solution. Par contre, l'agitation mécanique peut être réalisée sur un pellet d'algues, lyophilisées ou non, ou encore directement en solution, comme c'est le cas pour la sonication. Les résultats sont ensuite évalués par cytométrie de flux, spécifique aux cellules d'algues.

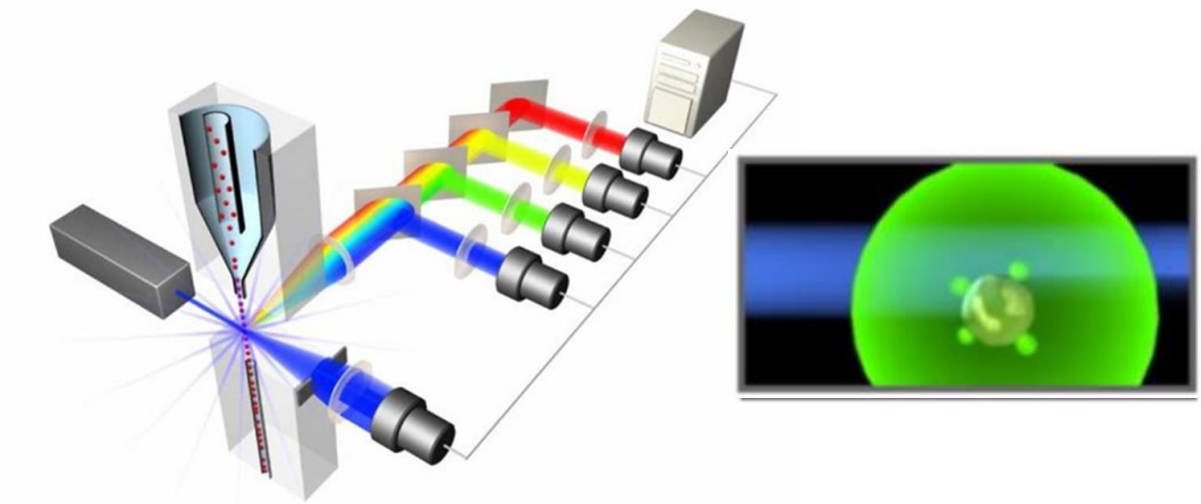


Figure 32: adaptée du tutorial se trouvant à la référence [5]

La cytométrie de flux permet d'analyser différents paramètres tels que la taille des cellules ou encore la complexité cellulaire. Les cellules sont amenées, dans un milieu liquide, à passer à travers un laser [6]. Deux phénomènes se produisent alors. Le premier phénomène, illustré à la figure 33 A est le rayon incident qui est masqué par le passage de la cellule, c'est ce qu'on appelle le « forward scatter » ou diffusion vers l'avant. Cette diffusion vers l'avant est corrélée à la taille de la cellule. Plus celle-ci sera grande, plus la diffusion observée de façon verticale sera importante. Ensuite, le rayon va aussi être réfracté lors du contact avec la cellule et sa complexité interne. Ceci fait référence au « side scatter SSC » ou dispersion latérale. La combinaison de ces deux paramètres permet de différencier des cellules de taille et/ou de complexité différentes comme par exemple des algues de type *Chlamydomonas reinhardtii* et *cyanobacterium Synechocystis* [7].

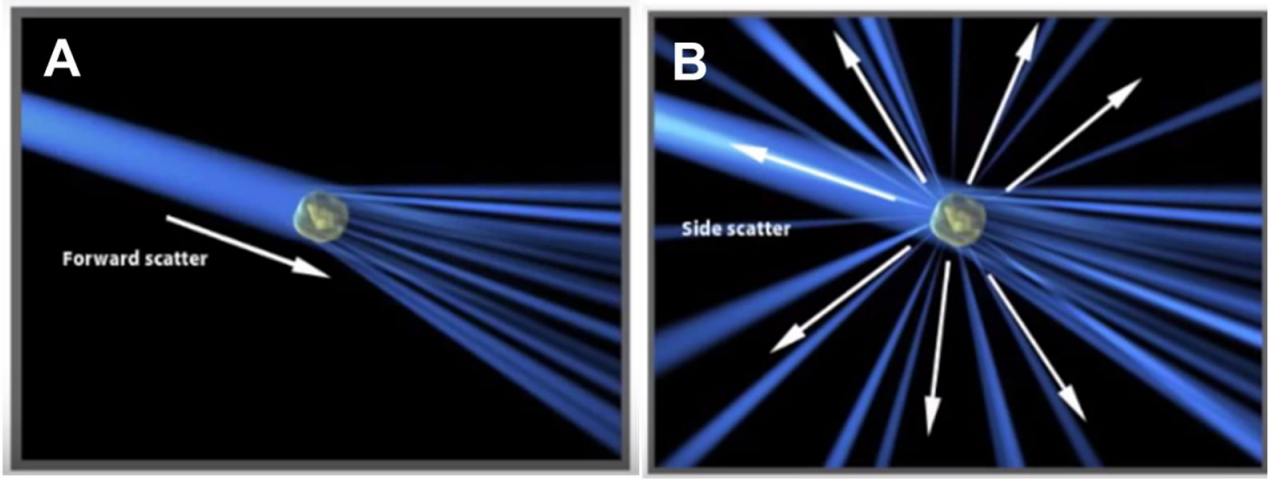


Figure 33: Adaptée du tutorial se trouvant à la référence [5]

4.2. Matériel et méthodes

Le méthanol est fourni par VWR, et l'eau ultra pure est obtenue d'un système MilliQ intégral (Merck-Millipore). L'agitation mécanique est réalisée sur le Mill Mixer MM 400 (Retsch) et les billes en verre ont un diamètre de 1-1.5 mm. Le sonicateur est un désintégrateur à ultrasons (130 W), type VCX 130 avec une sonde de 2 mm de diamètre de Blanc-Labo, Suisse. Le cytomètre de flux (FCM) est un modèle BD Accuri C6 équipé d'un CSampler et du logiciel BD Accuri 264.15 pour l'acquisition et l'analyse de données. (BD Biosciences, San Jose, USA). Ce FCM est équipé avec un laser argon à 488 nm et trois détecteurs à fluorescence, vert 530 ± 15 nm, orange 585 ± 20 nm et rouge 670 ± 25 nm. La souche CPCC11 de *Chlamydomonas reinhardtii* a été obtenue auprès du F, Canada). Les algues ont été cultivées dans des conditions axéniques dans du milieu Tris-acétate-phosphate dilué 4 fois (19) à 20 ° C, et sous agitation continue de 100 tr / min dans un incubateur spécialisé (Infors, Bottmingen, Suisse) et une illumination de 110 µmol phot m^{-2} s^{-1}.

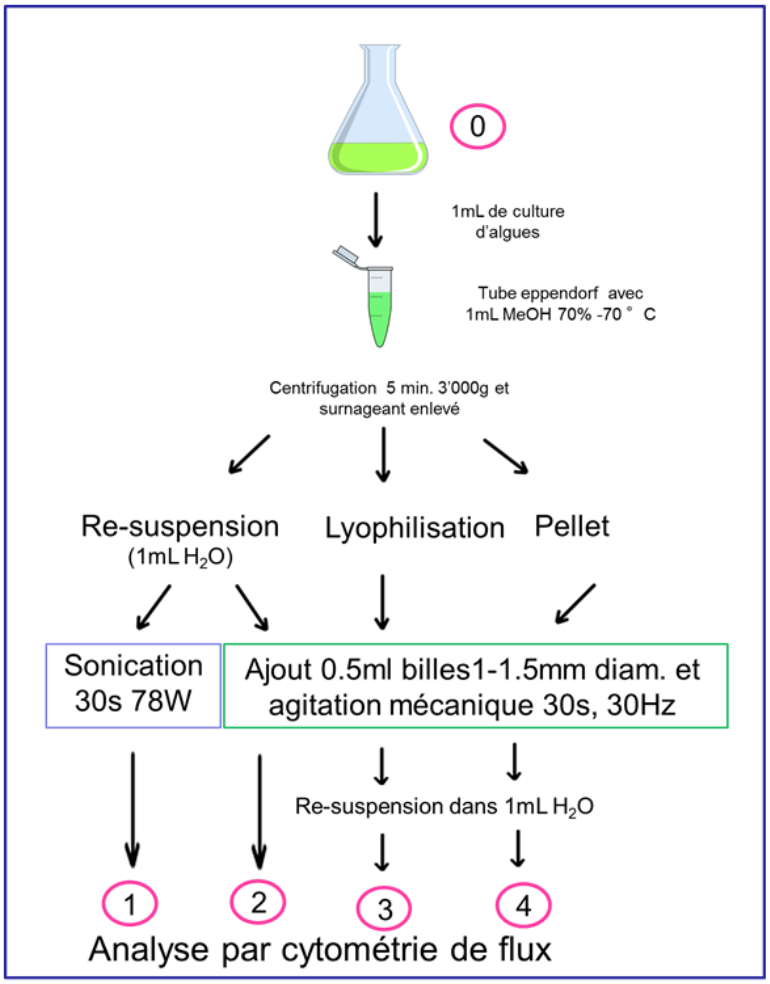


Figure 34: Préparation d'échantillons

Préparation d'échantillon

1 mL de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée pendant 48 h (phase de croissance) dans du milieu TAP est prélevé et injecté dans un tube contenant 1 mL de méthanol froid 70% à -70°C. Ce tube est ensuite centrifugé et le surnageant est enlevé. Plusieurs approches sont alors possibles : soit 1 mL d'eau est ajouté, soit les cellules sont lyophilisées ou alors le pellet est traité. Les tubes contenant 1 mL d'eau et les cellules d'algues sont alors lysées par sonication (meilleures conditions déterminées expérimentalement) à 60% de la puissance maximale, qui est de 130 W pendant 30 secondes, ou alors 0,5 mL de billes en verre 1-1.5 mm ID est ajouté et agité 30 secondes à 30 Hz, tout comme le pellet d'algues et les cellules lyophilisées. Le volume de bille est mesuré de façon générale par un eppendorf de 0.5 mL. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie de flux.

4.3. Résultats et discussion

La cytométrie de flux permet d'obtenir des résultats quantitatifs et qualitatifs sur la lyse cellulaire des algues. En effet, le SSC-A (Side Scatter) en fonction du FSC-A (Forward Scatter) ce qui revient à comparer la taille en fonction de la granularité et permet de cibler la population d'algues avant toute préparation d'échantillons. La zone P1, délimitée manuellement, représente la population d'algues. Cette zone regroupe 98.1% de la population avant lyse cellulaire. Le FL3-A est une longueur d'onde spécifique aux algues, et plus particulièrement à *Chlamydomonas reinhardtii*, de sorte que la présence d'autres contaminants tels que des poussières ou encore des cultures d'autres algues ne viendrait pas perturber la mesure. La zone M1 prend en compte le nombre de « count » c'est-à-dire de cellules en fonction de la longueur d'onde. Ce dernier paramètre permet d'obtenir le nombre de cellules présumé, et donc de faire une corrélation quantitative en fonction de la technique de préparation d'échantillons qui a été appliquée.

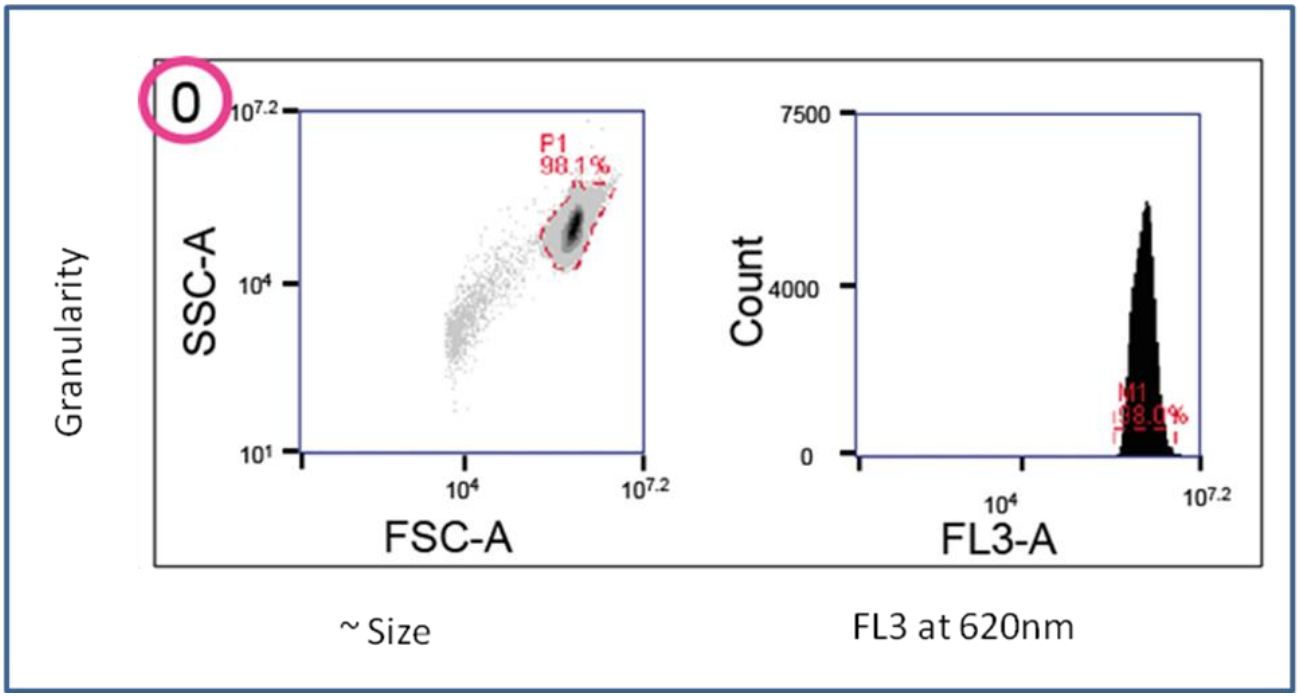


Figure 35: Analyse par cytométrie de flux avant la lyse cellulaire, sur la gauche, Side scatter (SSC~granularité) en fonction du. Forward Scatter (FSC~taille) sur la droite : Count (nombre de cellules) en fonction de l'intensité de la fluorescence à 620nm (FL3).

L'effet de la cryogénisation des algues sur la membrane a été aussi investigué et ne génère pas de changements. La quantité de billes ajoutée en passant de 0.5 à 1 mL ne présente pas non plus de différences, tout comme l'augmentation du temps d'agitation par 4 (de 30 s à 2 min). Les paramètres de base explorés ont donc mené à cette étude en utilisant les quantités minimales de billes ajoutées pour des raisons logistiques, ainsi que la durée minimale soit 0.5 mL de billes et 30 secondes d'agitation à 30 Hz. L'augmentation de la quantité de billes rend difficile la récupération de l'échantillon, et l'augmentation de la durée d'agitation mène à une augmentation de la température, ce qui pourrait se révéler délétère pour les métabolites en favorisant leur dégradation. Il est connu que la stabilité des métabolites tels que les nucléotides (ATP, ADP) se dégrade particulièrement rapidement dans des conditions défavorables de luminosité ou de température [8, 9].

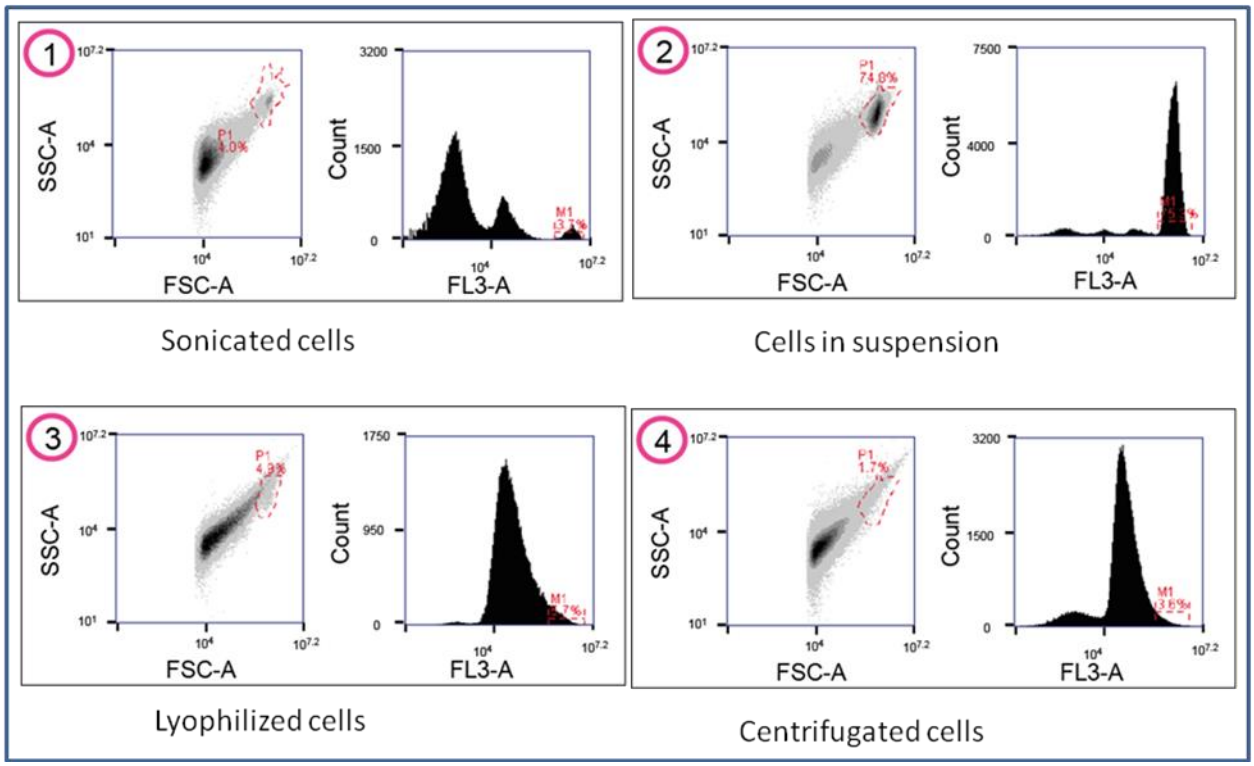


Figure 36: Analyse par cytométrie de flux après la lyse cellulaire, sur la gauche, Side scatter (SSC~granularité) en fonction du. Forward Scatter (FSC~taille) sur la droite : Count (nombre de cellules) en fonction de l'intensité de la fluorescence à 620 nm. Le plot n°1 représente les cellules en suspension ayant subi une sonication, le plut n°2 indique les cellules en suspension dans un milieu aqueux et ajouté de billes en verre. Le plot 3 et 4 représente une agitation mécanique additionnée de billes en verre sur des cellules préalablement lyophilisées ou centrifugées avec le surnageant enlevé.

Les plots 1 et 2 représentent les cellules gardées dans un milieu aqueux et soumises soit à un ajout de billes, soit à une sonication. La population d'algues intactes passe de 98.1% à 4% pour l'étape de sonication, et reste cependant à 74% en ce qui concerne la solution contenant des billes. Il est donc démontré que le fait de laisser les cellules en suspension avec des billes ne permet pas d'obtenir une bonne lyse cellulaire. Ceci peut être expliqué par la petite taille des cellules d'algues et la difficulté rencontrée par les billes de broyer des cellules en suspension. La sonication quant à elle donne de nombreux débris de petite taille (diminution de la florescence). Cependant, l'accumulation de minuscules débris augmente de façon tronquée le nombre réel de cellules rompues. Ce résultat sera plus amplement discuté dans la partie quantitative. Cela provoque, en outre, une augmentation non négligeable de la température de l'échantillon et doit être réalisé sur un fond réfrigéré.

Table 1: Préparation d'échantillon n°1 ; sonication des algues en suspension

Cellules avant préparation cellules/mL	Cellules en suspension avec sonication	en %
57'920	44'020	76%
	47'090	81%
	38'530	67%

Table 2: Préparation d'échantillon n°2,3 et 4 utilisant l'agitation mécanique additionnée de billes en verre pour la lyse cellulaire des algues

Cellules avant préparation cellules/mL	Cellules en suspension avec agitation mécanique	en %	Cellules avant préparation cellules/mL	Cellules lyophilisées avec agitation mécanique	en %	Cellules avant préparation cellules/mL	Cellules centrifugées avec agitation mécanique	en %
74'514	82'924	111%	67'185	7'940	12%	74'514	3'517	5%
	80'039	107%		25'060	37%		2'987	4%
	79'915	107%		8'510	13%		4'787	6%
				5'180	8%			
				13'180	20%			

Concernant les cellules ayant subi une agitation mécanique (2, 3 et 4), la population restante est respectivement de 74.0%, 4.9% et 1.7%. La méthode 2 ne semble pas appropriée à la lyse rapide, efficace et complète des cellules. La rupture des cellules par agitation mécanique sur des algues rassemblées dans le culot après centrifugation (4) ou ayant subi une étape de lyophilisation (3) présente dans les deux cas une diminution quasi totale de la population d'algues intactes. Il est cependant important de prendre en compte d'autres paramètres ; la lyophilisation demande une manipulation supplémentaire et du temps pendant lequel le métabolisme des algues pourrait être altéré. Bien que les algues puissent subir une étape de flash froze préalable, les risques sont grands quant à la possibilité de dégradation ou de modification des quantités de métabolites. Cependant, il est possible de lyophiliser les cellules à -50°C comme réalisé par Fiehn et al. [10].

Les résultats des analyses quantitatives sont tirés de la zone M1. Ceux-ci se présentent en termes de nombre de cellules intactes, et non en termes de cellules dont la membrane a été rompue. Un résultat proche de 100% correspond à une technique ne présentant pas de lyse cellulaire. Une comparaison du pourcentage restant de cellules intactes sur plusieurs réplicats est présentée à la figure suivante.

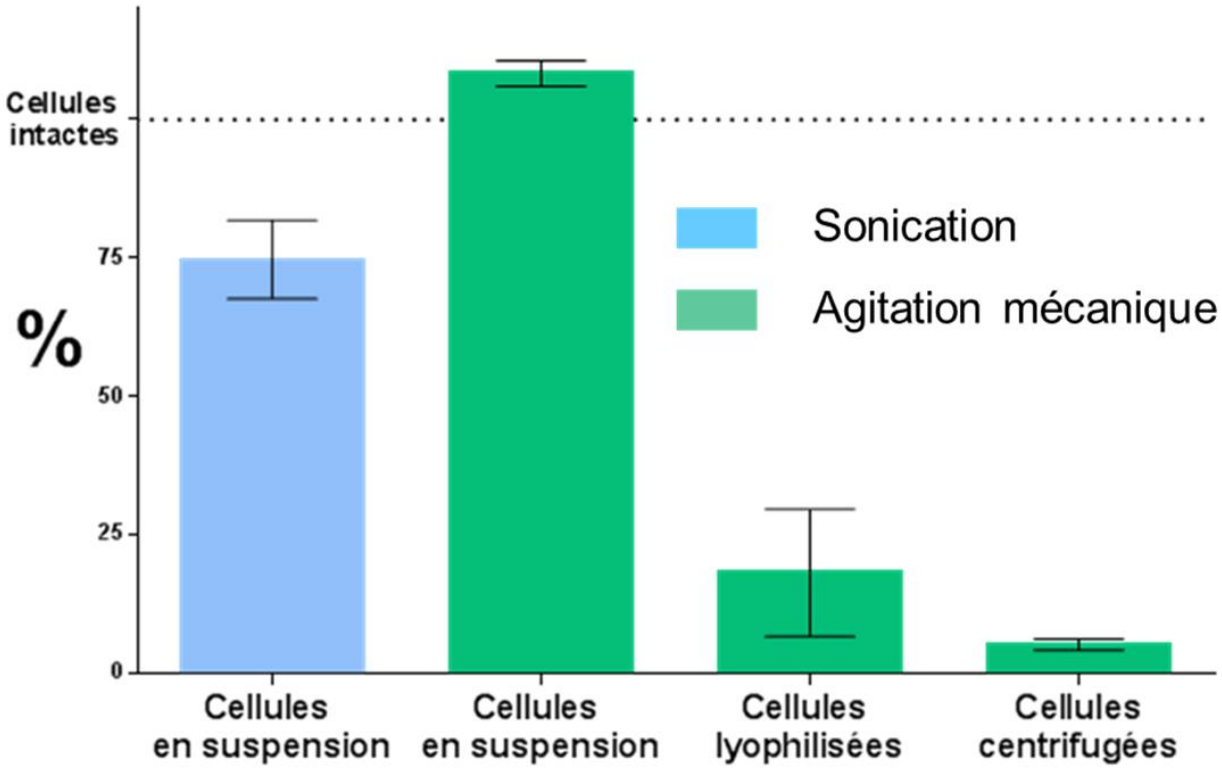


Figure 37: Nombre de cellules intactes après application d'un processus de lyse, n=3 sauf pour les cellules lyophilisées où n=5 reports des résultats obtenus aux tables 1 et 2

Les cellules en suspension ayant subi une agitation mécanique présentent un pourcentage de cellules intactes supérieur après agitation. Ceci pourrait être expliqué par une multiplication des cellules pendant la préparation d'échantillons. La sonication donne de meilleurs résultats que l'agitation des cellules en suspension. Cependant la variabilité des mesures obtenues ainsi est supérieure. L'agitation mécanique sur un pellet d'algues soit lyophilisé soit centrifugé, produit les meilleurs résultats de lyse des membranes cellulaires d'algues.

La sonication est une technique rapide, mais présentant de nombreux désavantages. L'augmentation de la température notamment peut se révéler délétère pour l'analyse ultérieure des métabolites. En outre, la sonde doit être nettoyée entre chaque échantillon afin d'éviter une contamination, ce qui demande un temps supplémentaire lors de la préparation de nombreux échantillons. Enfin la variabilité observée dans cette étude est grande. Un nombre supplémentaire d'échantillons pourrait mettre en évidence la présence de certains résultats aberrants.

La rapidité, ainsi que la possibilité de travailler en stabilisant les échantillons à l'aide d'azote liquide, sont des avantages de la technique d'agitation mécanique. En effet le Mill Mixer peut être équipé d'un système de refroidissement par azote liquide, ou encore les échantillons peuvent être introduits dans un bain d'azote juste avant l'agitation mécanique, ce qui minimise les effets de frottements dus aux billes. Enfin, le fait d'ajouter les billes directement à l'échantillon ne fait pas craindre d'éventuelles pertes de matériel ou encore des contaminations supplémentaires, outre celles provenant des billes elles-mêmes. Le principal désavantage, par contre, est la présence des billes et la difficulté d'accéder au solvant sans pour autant boucher l'embout de la pipette avec les billes. Il y a donc une perte inévitable de matériel. Il faut pour cela ajouter une quantité supplémentaire de solvant dans le tube pour diminuer la concentration des analytes, ce qui engendre un coût supplémentaire en termes de temps, car c'est une quantité additionnelle à évaporer.

4.4. Conclusions et perspectives de la partie 1 du chapitre 2

Deux principaux éléments de la préparation d'échantillon sont pris en considération en vue de l'analyse ultérieure par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse des métabolites polaires. Tout d'abord, il est nécessaire de lyser la membrane cellulaire afin d'accéder aux métabolites, la membrane des algues unicellulaire de type *Chlamydomonas reinhardtii* étant particulièrement robuste. Il existe des techniques chimiques pour dégrader la membrane cellulaire (par exemple, acidification avec de l'acide nitrique), mais ces techniques ne sont pas toutes adaptées à l'étude des métabolites par LC-MS. Ensuite, il est nécessaire de maintenir des conditions de température les plus basses possibles, avec un arrêt rapide du métabolisme, afin de garantir les résultats reflétant au mieux l'état métabolique dans lequel se trouve l'échantillon [11]. La technique utilisant l'agitation mécanique avec l'utilisation des billes en verre sur un pellet d'algues se révèle être la technique la plus adaptée pour lyser la membrane cellulaire robuste des algues.

Une étude des métabolites au niveau moléculaire devrait aussi compléter cette étude macroscopique, c'est pourquoi le chapitre suivant s'attelle à la détection de ces métabolites par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L'analyse de la dégradation des métabolites n'a pas été envisagée dans ce contexte et pourrait être un paramètre à prendre en compte.

5. Références de la partie 1 du chapitre 2

1. Noyes, P.D., et al., *The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world.* Environ. Int., 2009. **35**(6): p. 971-986.
2. Fischer, B.B., et al., *Multiple stressor effects of high light irradiance and photosynthetic herbicides on growth and survival of the green alga Chlamydomonas reinhardtii.* Environ. Toxicol. Chem., 2010. **29**(10): p. 2211-2219.
3. Heugens, E.H.W., et al., *A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment.* Crit. Rev. Toxicol., 2001. **31**(3): p. 247-284.
4. Lee do, Y. and O. Fiehn, *Metabolomic response of Chlamydomonas reinhardtii to the inhibition of target of rapamycin (TOR) by rapamycin.* J Microbiol Biotechnol, 2013. **23**(7): p. 923-31.
5. *Introduction to Flow Cytometry - Tutorial*. [cited 2017 02.06]; Available from: http://www.thermofisher.com/ch/en/home/support/tutorials.html#vid5.
6. Troussellier, M., C. Courties, and A. Vaquer, *Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology.* Biol Cell, 1993. **78**(1-2): p. 111-21.
7. G., C., *Toward a mechanistic understanding of the combined action of copper micropollutants and light irradiation on phytoplankton: an investigation across multiple levels of biological organization*. 2016, University of Geneva. p. 197.
8. Whillier, S., et al., *The effects of long-term storage of human red blood cells on the glutathione synthesis rate and steady-state concentration.* Transfusion (Malden, MA, U. S.), 2011. **51**(7, Pt. 1): p. 1450-1459.
9. Lu, W., B.D. Bennett, and J.D. Rabinowitz, *Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics.* J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2008. **871**(2): p. 236-242.
10. Lee, D.Y. and O. Fiehn, *High quality metabolomic data for Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Methods, 2008. **4**: p. 7.
11. Lin, C.Y., et al., *Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics.* Metabolomics, 2007. **3**(1): p. 55-67.

6. Partie 2 - Comparaison des conditions d'extraction liquide-liquide des métabolites cellulaires polaires par analyse non-ciblée LC-SWATH/MS

6.1. Introduction

Les procédures d'extraction afin d'analyser des métabolites sont largement décrites. Elles sont dépendantes du type d'échantillon [1]. Ces méthodes ont tout d'abord été étudiées dans le cadre des lipides, et ensuite ont été appliquées à l'extraction de métabolites polaires [2-5]. Comme introduit précédemment, la technique dite de « Bligh and Dyer » [5] repose sur l'extraction de plusieurs types de composés. Ces techniques biphasiques permettent de séparer les composés extraits en 3 trois classes principales : la phase supérieure aqueuse, le disque protéique à l'interface des deux types de solvants non-miscibles, et enfin la phase inférieure, composée d'un solvant organique ayant une densité plus importante que le, ou les solvants, présents dans la phase supérieure. Une autre possibilité d'extraction solide-liquide est décrite par Folch [4] et concerne l'extraction des métabolites en phases successives, d'abord par un mélange méthanol-chloroforme, suivi d'un « lavage » avec une phase aqueuse. Les extraits sont ensuite rassemblés et complétés afin que deux phases se forment.

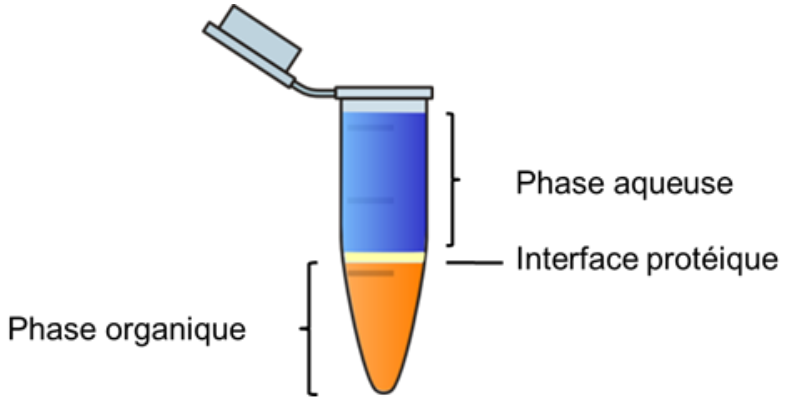


Figure 38: Processus d'extraction des métabolites polaires et apolaires menant à deux phases séparées

Ces techniques ont été développées dans le cadre d'analyses de protéines et de lipides provenant de divers tissus comme par exemple le tissu hépatique ou cérébral [4]. C'est pourquoi, tout en gardant les mêmes proportions équivalentes de solvant d'extraction, une étude nouvelle est proposée en changeant l'ordre d'ajout des solvants. Au lieu de commencer par un solvant de type plutôt apolaire (MeOH, $CHCl_3$), est étudiée la possibilité de commencer par ajouter un solvant contenant une partie aqueuse. Ce postulat est proposé à la suite d'une constation macroscopique d'agrégats de cellules sanguines lors de l'ajout du méthanol et chloroforme. La question de l'accessibilité des métabolites au solvant d'extraction s'est donc posée, car ces agrégats ne sont pas

favorables pour maximiser la surface de contact solide-liquide. Ensuite, le métabolisme doit être stoppé le plus rapidement possible. Malgré cela, de nombreuses études persistent à agiter les tissus ou cellules à extraire, ceci pendant de nombreuses heures à des températures supérieures ou égales à 4°C [6]. Enfin, en accord avec l'étude abordée dans la première partie de ce chapitre, l'utilisation de billes en verre menant à une agitation mécanique est explorée. De nombreux critères sont donc évalués tels que la reproductibilité de la préparation d'échantillons, le type de métabolites extraits ainsi que leur nombre, ou encore l'intensité des signaux des métabolites extraits (comparaison d'extraction relative). Cette étude part directement de la matrice d'intérêt et, de façon non-ciblée, est à la fois qualitative et quantitative, QUAL/QUANT.

Le but de ce projet est de comparer quatre préparations d'échantillons selon leur capacité à extraire des métabolites ; pour cela, la fraction érythrocytaire du sang est utilisée. Les préparations d'échantillons sont appliquées directement sur la matrice concernée et les analyses réalisées sont de type non-ciblé. Aucun métabolite n'est ajouté en plus des standards internes d'extraction. La préparation est de type Bligh and Dyer avec la présence de deux phases [5]. La préparation d'échantillons permet de séparer les métabolites polaires et apolaires qui se répartissent selon leur affinité entre la phase supérieure contenant du méthanol et de l'eau et la phase inférieure composée principalement de chloroforme.

L'identification des métabolites se fait par rapport à une base de référence de plus de 500 composés développés dans le cadre d'une précédente thèse au sein du laboratoire. L'utilisation d'une technique d'analyse de spectrométrie de masse particulièrement adaptée à ce genre de problématique est utilisée. Cette technique est appelée SWATH : analyse séquentielle de tous les ions théoriques. Cette technique récente est décrite et développée de façon détaillée dans le chapitre 4.

L'analyse en composante principale est une approche statistique extrêmement performante, qui permet de visualiser rapidement des données et d'en tirer des conclusions du point de vue biologique ou expérimental. Un des logiciels de choix pour réaliser ces études est le logiciel R. Cette technique statistique demande cependant des connaissances préalables, et n'est malheureusement pas à la portée directe de nombreux scientifiques qui cherchent une explication rapide de leurs résultats.

Les données obtenues sont abordées de deux façons différentes. La figure 39 illustre ces deux approches qui sont à la fois une étude globale non ciblée et une étude plus spécifique avec une liste spécifique et restreinte de métabolites. Ces approches sont décrites de façon plus détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ».

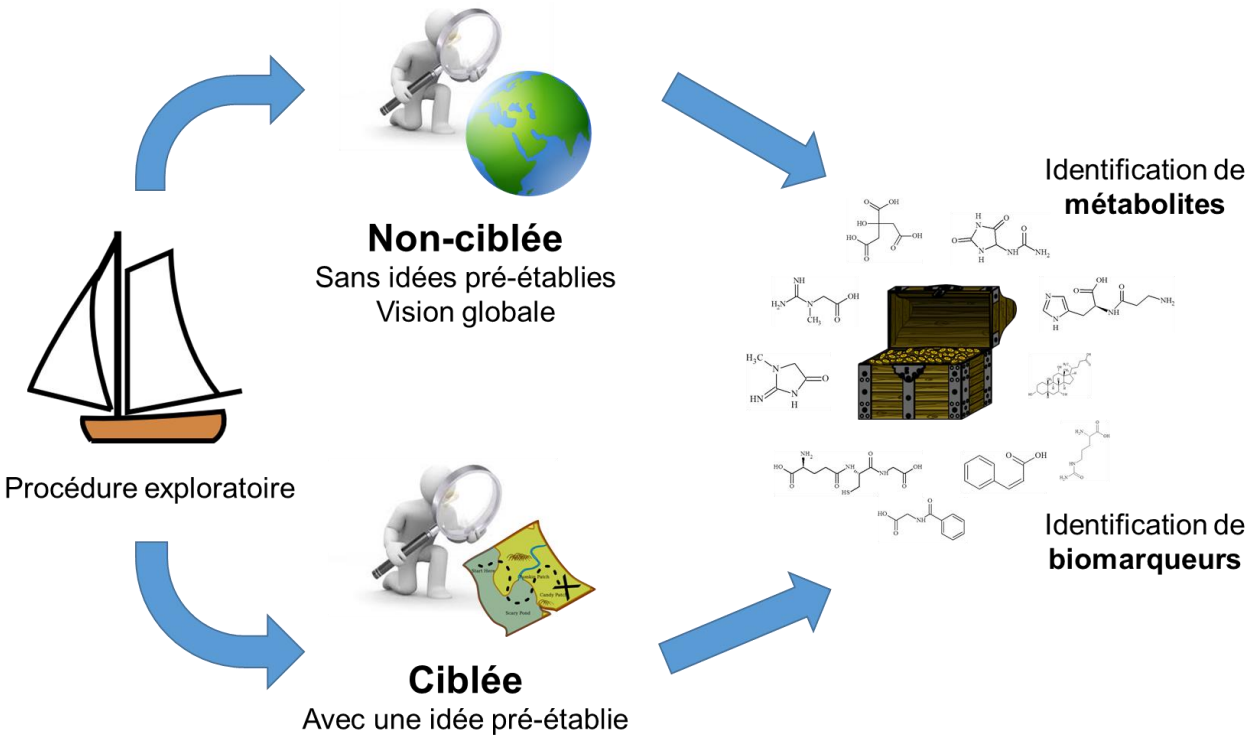


Figure 39: Processus analytique

6.2. Matériel et méthodes

Produits chimiques

Le chloroforme, ainsi que l'acétonitrile de qualité HPLC-S, proviennent de Fisher Chemical (UK). Le méthanol est fourni par BioSolve (NL) et l'eau ultrapure est obtenue par un système MilliQ intégral (Merck-Millipore). L'agitation mécanique est réalisée par le Mill Mixer MM 400 (Retsch) et les billes en verre ont un diamètre de 0.5-0.7 5mm. L'acide glutamique-d_5, le tryptophane-d_5, l'adénosine-$^{13}C_5$, l'acide adipique-$^{13}C_6$ et l'acide cholique-d_4 ont été obtenu chez Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA). L'acide succinique-d_4 provient de Sigma-Aldrich. L'ammonium acetate provient de Fisher Scientific, l'acide formique de Merck.

Échantillons biologiques

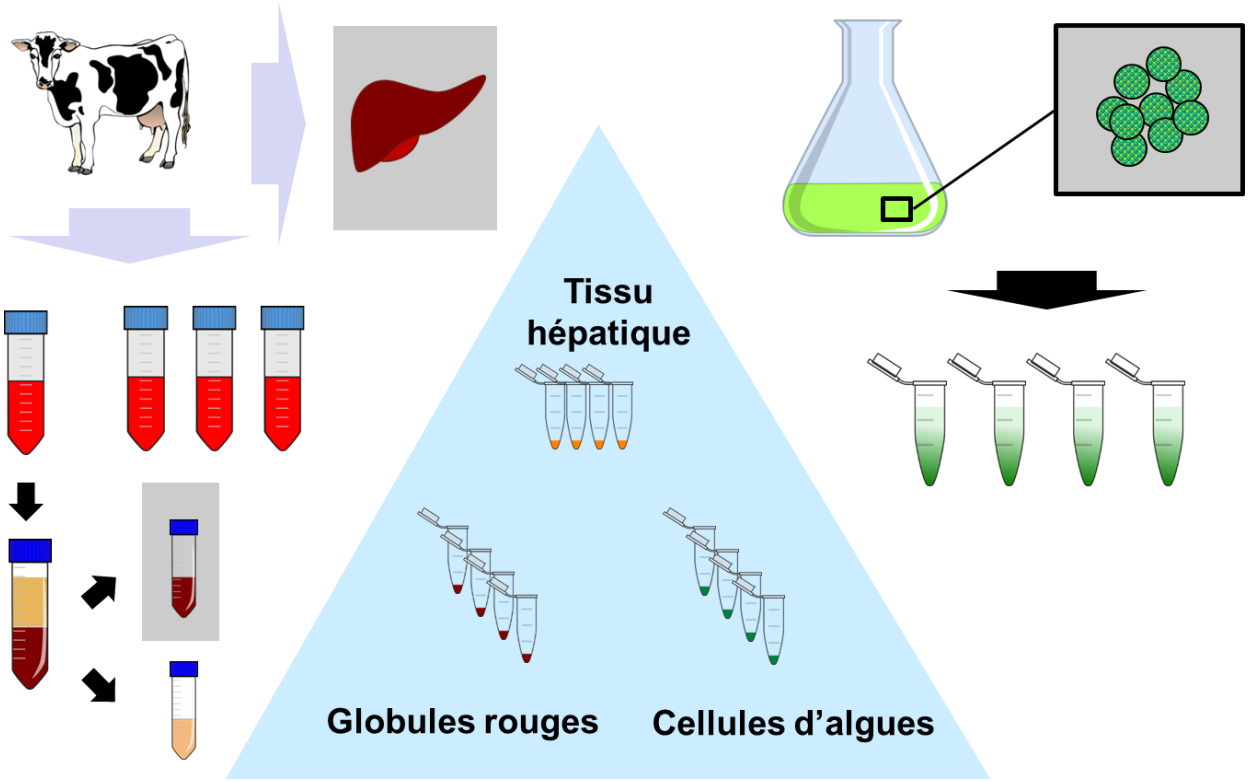


Figure 40: Types de matrices biologiques utilisées pour l'étude ; tissu hépatique et érythrocytes bovins, cellules d'algues de type *Chlamydomonas reinhardtii*

Les échantillons proviennent de l'abattoir situé à Meinier dans le canton de Genève (Suisse). 1 tube Falcon de 50 mL est prélevé par animal et contient 300 µL d'une solution d'héparine sodique vendue en officine contenant 5 mL à 5'000 UI/mL (Heparin FRESENIUS, Fresenius Medical Care (Suisse) AG, 6370 Oberdorf NW, lot n°0H001, exp 08.2017). Les données obtenues font référence à 15-30 UI par mL de sang [7]. Les tubes sont héparinés à 30 UI par mL de sang. Le sang obtenu provient des artères carotides et des jugulaires des animaux. Ceci est donc à la fois un sang veineux et artériel. Les tubes sont ensuite retournés 2 fois afin de permettre à l'héparine de se répartir dans le sang prélevé.

Ils sont ensuite entreposés dans la chambre froide de l'abattoir. Après transport, le même jour, les tubes ont été à nouveau agités et stockés dans un réfrigérateur à 4°C. 30 mL de sang hépariné à 30 UI/mL ont été centrifugés pendant 30 minutes à 1200 g à 4°C.Une partie du contenu du culot a été prélevée (10 mL). Les globules rouges ont été répartis à raison de 200 µL dans des tubes eppendorf safe-lock de 2 mL. Les tubes ont ensuite été rapidement plongés dans une solution d'azote liquide et maintenus dans ces conditions, le temps de procéder aux différentes préparations d'échantillons qui ont eu lieu en parallèle. 28 échantillons ont été ainsi préparés. Il y 7 réplicats par préparation d'échantillons. Les

lettres correspondent aux préparations d'échantillons (A, B, C, D) SA1-SA7, SB1-SB7, SC1-SC7, SD1-SD7 et 12 blancs SA0-SA00, SB0-SB000, SC0-SC000, SD0-SD000.

Une quantité de foie de quelques grammes est prélevée par le vétérinaire sur chaque animal au niveau de la partie enveloppante du foie (lobus caudatus, processus caudatus flèche rouge ou partie terminale, flèche verte) et exempte de parasites (par exemple, la petite douve). La quantité prélevée est introduite dans un tube Falcon de 50 mL et stockée à 4°C en vue de réaliser les analyses.

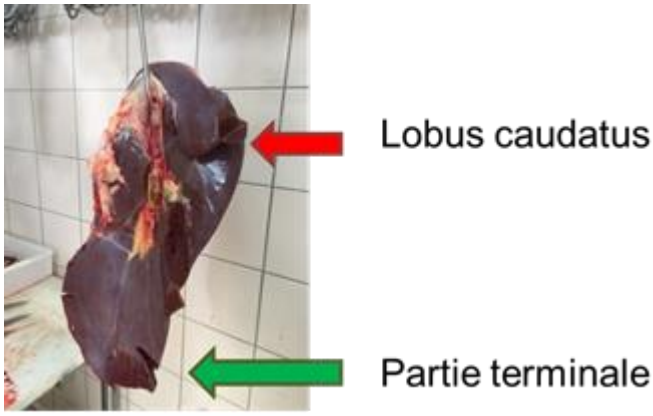


Figure 41: Foie de l'animal, la flèche indique les emplacements desquels les parties de foie ont été prélevées, le foie est sain et exempt de parasites

200 mg (± 5%) de foie ont été prélevés et insérés dans des tubes eppendorfs safe-lock de 2 mL. Les échantillons ont été maintenus à une température de 4°C en vue de leur traitement par les différentes préparations d'échantillons. 28 échantillons ont été ainsi préparés. FA1-FA7, FB1-FB7, FC1-FC7, FD1-FD7 et 12 blancs FA0-FA00, FB0-FB000, FC0-FC000, FD0-FD000

Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique à ultra haute performance est réalisée sur un système dual UHPLC UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Germany) configuré avec deux pompes binaires à gradient à haute pression. La condition acide contient une phase mobile A : H_2O + 0.1% FA et B : MeOH. La condition basique est pour A : 10 mM d'ammonium acétate et tamponné à pH 8.2 avec de l'hydroxyde d'ammonium et B : MeOH. La phase mobile B est de 0% la première minute, puis augmente jusqu'à atteindre 100%, cette valeur est maintenue pendant une minute, puis est suivie par le retour aux

conditions de départ en 0.1 minute. Pendant cette période, la seconde colonne est équilibrée aux conditions de départ, ce qui représente un gain de temps et une meilleure stabilité des conditions de départ. Les colonnes utilisées proviennent de GL Sciences (JP), Inertsil ODS-3 C_{18}, 5 µm, 2.1 mm x 150 mm avec une colonne de garde SecurityGuard (Phenomenex, Torrance, CA) et un filtre approprié de catégorie C_{18}. Le débit est de 450 µL/min, les échantillons sont gardés à 6°C dans l'autosampler et les colonnes sont thermostatées à 30°C.

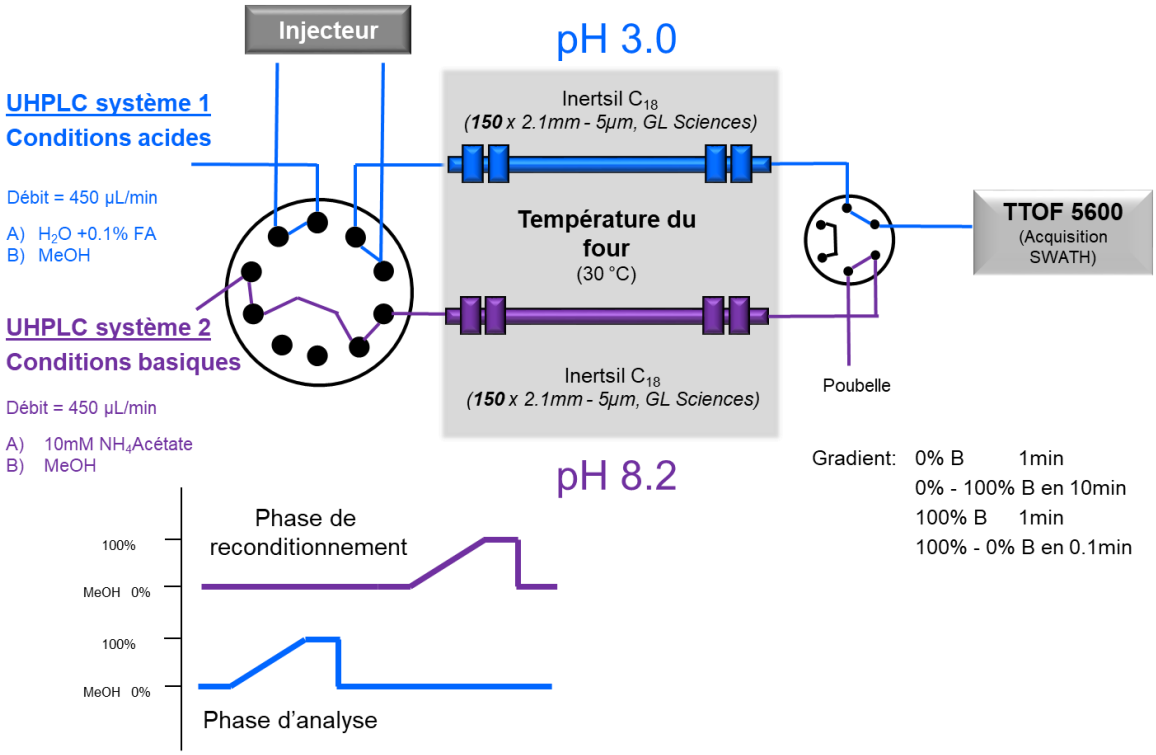


Figure 42: Système chromatographique travaillant en mode dual avec deux systèmes de pompes connectés via des systèmes multiports permettant d'injecter les échantillons sur les deux systèmes et de laisser un temps de reconditionnement optimal entre deux injections

Paramètres de spectrométrie de masse

Un quadrupôle – temps de vol (TTOF 5600, ABSciex, Concord, CA) est opéré suivant deux types d'expériences. Tout d'abord une analyse TOF-MS sur un rang de *m/z* 80-800 est effectuée pendant 50 ms, suivie par 48 expériences SWATH de 15 unités chacune en partant de 80 *m/z* à 800 *m/z* avec un temps d'accumulation de 50ms. Les ions produits sont détectés à partir de 50 *m/z* à 800 *m/z*. Le temps du cycle est de 2.5 s. Une rampe d'énergie de collision est effectuée de 10 à 50 eV pour le mode positif et de -50 à -10 eV pour le mode négatif.

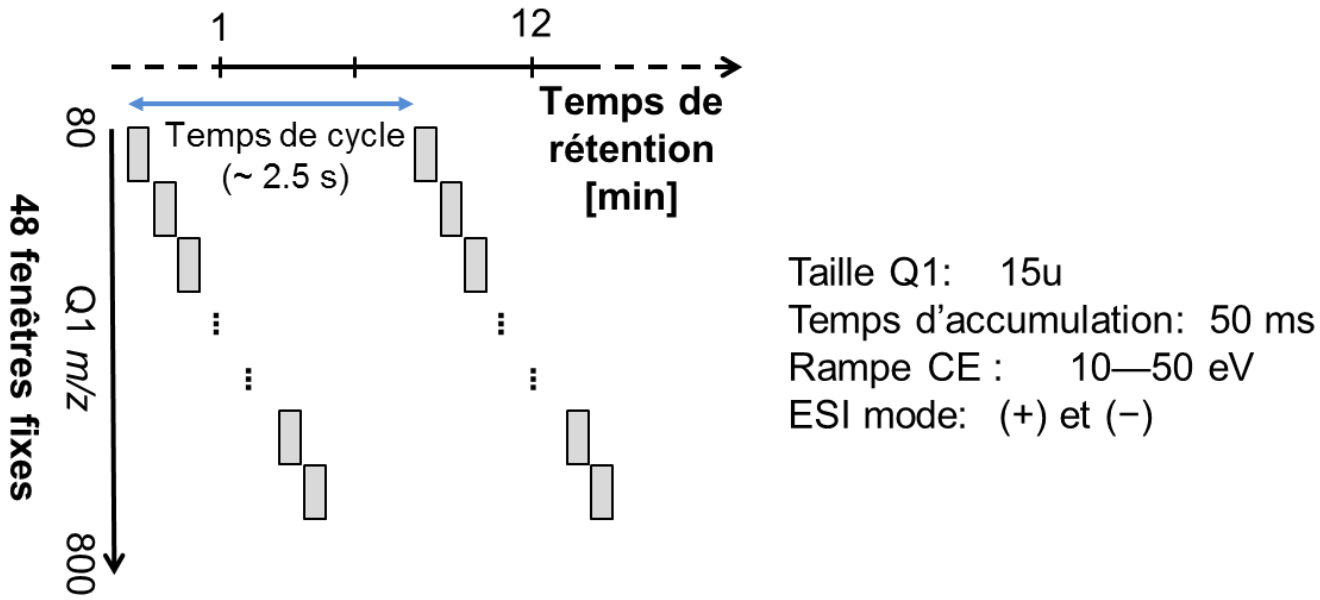


Figure 43: Paramètres liés à la spectrométrie de masse

La source est de type électrospray et les paramètres sont : GS1 50 psi, GS2 50 psi, curtain plate 25 psi. Les paramètres de source sont : 500°C 5200 V et -4800 V pour le mode négatif. Le spectromètre de masse est contrôlé via le logiciel Analyst 1.7 TF.

Préparation d'échantillons

Les préparations d'échantillons sont complémentaires et comportent toutes le même solvant d'extraction, à savoir le chloroforme, le méthanol et l'eau. Ce qui varie en revanche c'est tout d'abord l'ordre d'addition de ces solvants, ainsi que la technique d'agitation utilisée. En effet, le mélange de solvant ajouté en premier est soit de nature plutôt polaire ou au contraire apolaire, et la technique d'agitation est soit une agitation qualifiée de « douce » (Thermomixer thermostaté à 4°C pendant 1h) ou une agitation intense avec des billes en verre pendant 30 secondes (MM 400).

L'acide cholique d_5 et l'adénosine $^{13}C_5$ sont présents dans le méthanol à raison de 5 µg/mL. Une fois les phases séparées par centrifugation et prélevées (800 µL pour la phase supérieure et 400 µL pour la phase inférieure) celles-ci sont évaporées à sec. Le solvant de reconstitution est de H_2O ; CH_3OH, (8;2). Celui-ci contient quatre standards internes : GABA-d_6, acide succinique-d_4, acide glutamique-d_5 et tryptophane-d_5. Cette

phase de reconstitution est décrite par « SI chromato » dans la suite des résultats, car elle permet de valider le bon déroulement de la séquence chromatographique.

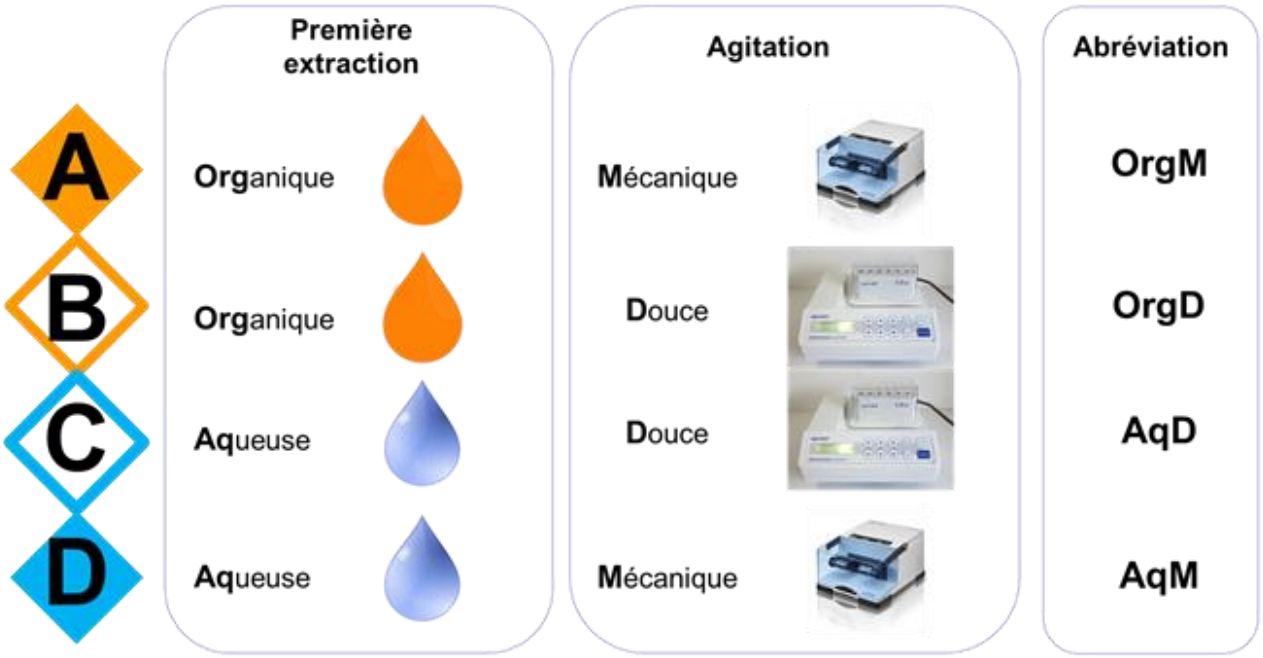


Figure 44: Schéma simplifié des conditions de préparation d'échantillons

La couleur orange est choisie pour caractériser une extraction, tout d'abord par un mélange de solvants, principalement organiques. Les préparations d'échantillons A et B reposent sur des préparations d'échantillons déjà utilisées [1, 3-5, 8-10]. Les préparations d'échantillons C et D sont caractérisées par la couleur bleue et font référence à une extraction eau-méthanol. Ce mélange eau-méthanol ~70% (75%) est particulièrement utilisé afin de précipiter les protéines ; ce mélange est souvent refroidi à -80°C pour stopper l'activité métabolique de l'espèce à analyser.



Figure 45: Schéma représentant de façon visuelle les différentes proportions et l'ordre d'ajout des solvants

Tableau 1: Résumé des étapes de la préparation d'échantillons suivant les différents types d'extraction. A et B sont des extractions pour lesquelles la première étape d'extraction liquide-liquide est dite « organique » (couleur orange) et les préparations d'échantillons C et D sont dites « aqueuses » (couleur bleue). A et D sont agités par une méthode mécanique alors que B et C sont agités par Thermomixer et cette agitation est qualifiée de « douce »

	A			B			C			D		
Etape 1	Agitation mécanique 30s 30Hz			H_2O -	CH_3OH 100µL	$CHCl_3$ 600µL	H_2O 100µL	CH_3OH 300µL	$CHCl_3$ -	Agitation mécanique 30s 30Hz		
Etape 2	H_2O 300µL	CH_3OH 600µL	$CHCl_3$ 300µL	Agitation 4°C 1h 400rpm sonication 5min à T=30min			Agitation 4°C 1h 400rpm sonication 5min à T=30min			H_2O 100µL	CH_3OH 300µL	$CHCl_3$ -
Etape 3	Agitation mécanique 30s 30Hz			Centrifugation 14'500rpm 10min surnageant collecté			Centrifugation 14'500rpm 10min surnageant collecté			Agitation mécanique 30s 30Hz		
Etape 4	H_2O 300µL	CH_3OH -	$CHCl_3$ 300µL	H_2O 100µL	CH_3OH 200µL	$CHCl_3$ -	H_2O -	CH_3OH 100µL	$CHCl_3$ 600µL	H_2O -	CH_3OH 300µL	$CHCl_3$ 600µL
Etape 5	Agitation mécanique 30s 30Hz			Agitation 4°C 1h 400rpm sonication à T=30min			Agitation 4°C 1h 400rpm sonication à T=30min			Agitation mécanique 30s 30Hz		
Etape 6	Centrifugation 7'700rpm 10min			Centrifugation 14500rpm 10min surnageant collecté			Centrifugation 14500rpm 10min surnageant collecté			H_2O 500µL	CH_3OH -	$CHCl_3$ -
Etape 7	Séparation des phases			Collection des fractions			Collection des fractions			Centrifugation 7700rpm 10min		
Etape 8	-			H_2O 500µL	CH_3OH -	$CHCl_3$ 300µL	H_2O 500µL	CH_3OH 200µL	$CHCl_3$ -	Séparation des phases		
Etape 9	-			Centrifugation 7'700rpm 10min			Centrifugation 7'700rpm 10min			-		
Etape 10	-			Séparation des phases			Séparation des phases			-		

Traitement des données

Les données sont traitées à l'aide des logiciels ABSciex, Concord (CA). Le logiciel PeakView permet de visualiser les spectres, de faire l'extraction des masses et est lié à l'utilisation de MasterView pour la recherche dans la librairie. Le logiciel MultiQuant permet l'extraction des transitions et donc l'obtention des aires sous les pics pour une analyse quantitative.

Approche non-ciblée ; paramètres du logiciel MultiQuant

Le spectre TOF-MS est utilisé pour cette analyse. La tolérance du temps de rétention est fixée à 0.5 min et la tolérance de masse est de 10 ppm. Cette première étape est plus communément nommée « peak picking », c'est-à-dire le fait d'extraire un certain nombre de pics LC-MS. Cette méthode est utilisée pour filtrer les éléments des données brutes qui seront ensuite traités de façon statistique [11]. Le seuil d'intensité limite est de 5 et le nombre minimum dans lequel le pic apparaît est déterminé à 2 échantillons. Les pics sont extraits sur un laps de temps allant de 0-10 minutes. La largeur du pic LC est de 20 secondes, et le seuil de bruit, d'un facteur 5. La largeur minimale du pic par spectre est définie à 0.05 Da et la largeur minimale du temps de rétention du pic à 5 spectres.

Approche ciblée,

La première étape consiste à identifier un maximum de métabolites présents dans l'échantillon. Pour ce faire, les données ont été importées dans le logiciel MasterView. Celles-ci ont ensuite été comparées à une base de données interne de plus de 500 métabolites. Les pics sont traités à l'aide du logiciel MultiQuant, et une correction manuelle de l'intégration des pics, et donc du signal de l'aire sous la courbe, est réalisée. Enfin, les valeurs obtenues sont reformatées afin d'être traitées de façon statistique par PCA via le logiciel MarkerView.

Les données sont épurées de tout bruit et il n'y pas de « peak picking » réalisé au préalable. Le nombre de variables diminue donc fortement, et est réduit au nombre de métabolites identifiés. Le traitement des données est à chaque fois fait de façon non supervisée, et supervisée, afin d'extraire le plus d'informations possibles. Les

représentations des variables sont illustrées sous la forme de « loading plot ». Les extractions sont comparées selon leur procédure d'ajout de solvant « polaire versus apolaire ». Enfin, une étude est réalisée afin de comprendre l'effet de la correction des signaux par celui du standard interne de préparation d'échantillons (adénosine $^{13}C5$) et des standards internes chromatographiques (différents pour chaque type d'analyse, acide/basique, mode positif/mode négatif).

6.3. Résultats et discussion

Les données ont été abordées selon deux approches différentes. La première comporte une analyse non-ciblée. Une extraction des aires des pics est d'abord effectuée par « peak picking », puis traitée en analyse par composante principale (PCA). La seconde approche est effectuée en réalisant une identification d'un maximum de métabolites présents dans les échantillons. L'aire sous la courbe des pics représentant ces métabolites est ensuite extraite des traces des expériences SWATH, et transformée en variables. Ces variables, qui sont cette fois des pics appartenant à des métabolites identifiés, sont analysées par PCA, afin de déterminer leur prépondérance dans les différentes préparations d'échantillons.

Approche non-ciblée

La première approche par analyse non ciblée est totalement descriptive, et sans traitement préalable. Elle est essentielle afin d'aborder de façon globale et sans biais les données ainsi récoltées. Un test de Student a cependant été effectué sur les 7 premières analyses et les 7 dernières qui se trouvent être les standards chromatographiques. Ce test a été appliqué à l'ensemble des données. Les variables ayant une valeur de p inférieure à 0.05, et donc confirmant l'hypothèse que les variables sont différentes, ont été supprimées de l'analyse par PCA. La pondération des variables suit la loi de Pareto.

Approche ciblée

La deuxième approche est l'identification d'un maximum de métabolites à l'aide de la librairie développée en interne. L'aire des métabolites identifiés pour chaque échantillon est ensuite traitée par analyse statistique. Il y a donc un nombre de variables réduit au nombre de métabolites identifiés.

Approche non-ciblée

Les différentes préparations d'échantillons sont SA, SB, SC, et SD ce qui signifie : Sang, préparation d'échantillon A. Rappelons que les catégories sont : A OrgM, B OrgD, C AqD et D AqM. Les résultats ci-dessous concernent l'étude non-ciblée par PCA des analyses en mode positif des phases aqueuses par séparation chromatographique dans des conditions acides (pH 3).

La préparation d'échantillon C (AqD) se démarque nettement des autres préparations d'échantillon. L'axe PC1 est le plus représentatif par 80.9%. La valeur de PC2 est extrêmement faible (3.1%) ce qui signifie que PC1 possède un très grand poids dans l'explication du modèle. Il y a toujours une scission dans les valeurs des composantes principales après la 4ème ou 5ème composante. Cependant, dans le résultat présent, le fait que la diminution soit si rapidement observée met en évidence un phénomène très net, et important du point de vue de la pondération des variables.

L'analyse des variables qui tendent à séparer le modèle fait ressortir un temps de rétention de 7.3 minutes. Il est observé également que les autres variables ont des rapports *m/z* élevés et, dans la majorité des cas, supérieurs à 400 *m/z*. Les temps de rétention sont aussi en fin de gradient (supérieurs à 6min). Ces observations mènent à la conclusion que le modèle est séparé par des variables de grandes masses et de type plutôt apolaire car ces composés sont retenus par la colonne chromatographique de type C_{18}. Une analyse des spectres obtenus à un temps de rétention de 7.3 min permet de conclure à la présence de protéines. Celles-ci, multichargées, ont une masse aux alentours de 15 kDa. Le nombre important d'états d'ionisation, et donc de pics, explique la tendance marquée à séparer le modèle. En effet, chaque pic étant considéré comme une variable indépendante, il va amener l'ensemble à une plus grande différenciation. Ces protéines sont probablement des chaînes d'hémoglobine qui ont une masse aux alentours de 15 kDa. Cependant, pour pouvoir affirmer de manière certaine l'identité de la molécule, une analyse par empreinte de fragments de masse (PMF), par exemple, est nécessaire [12]. Le but n'étant pas de déterminer l'identité, mais de mettre en évidence la présence abondante de protéines, il n'a pas été effectué d'analyses supplémentaires.

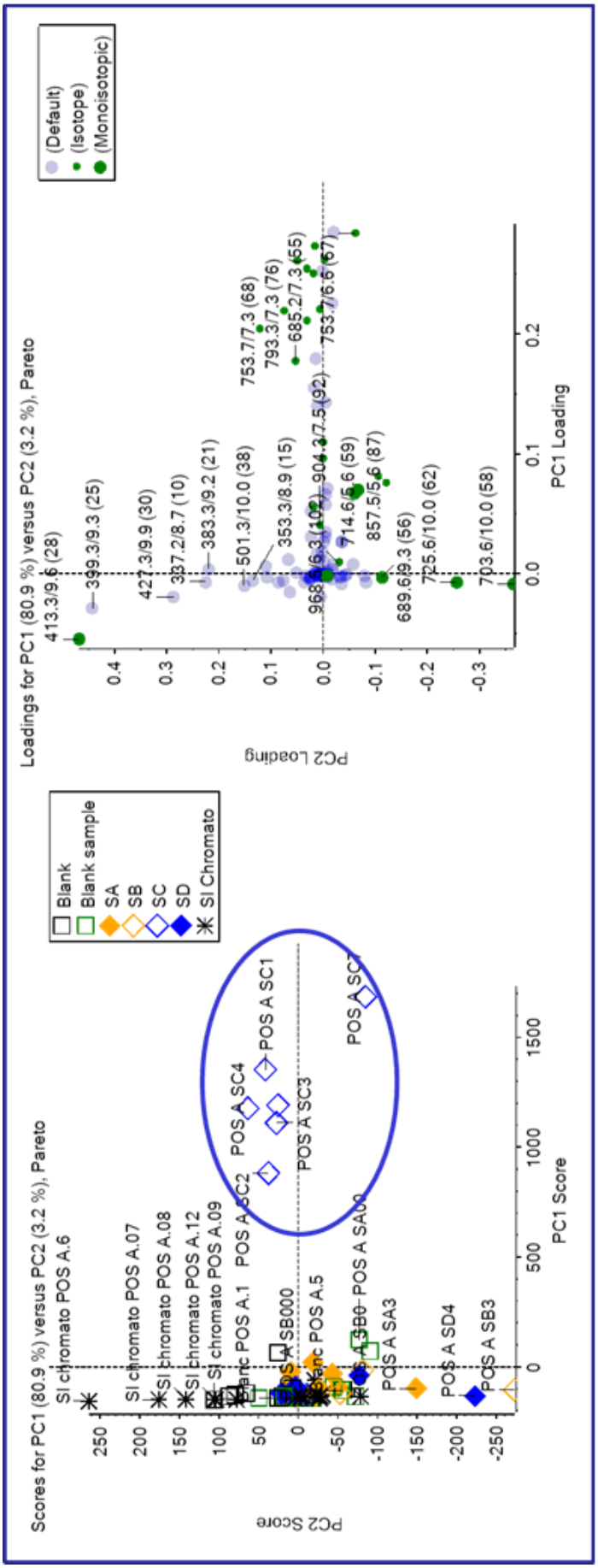


Figure 46: Analyse non-supervisée des données brutes extraites et traitées via le logiciel MarkerView représentant le graphique des composantes principales 1 et 2 avec un score total de 84.1%

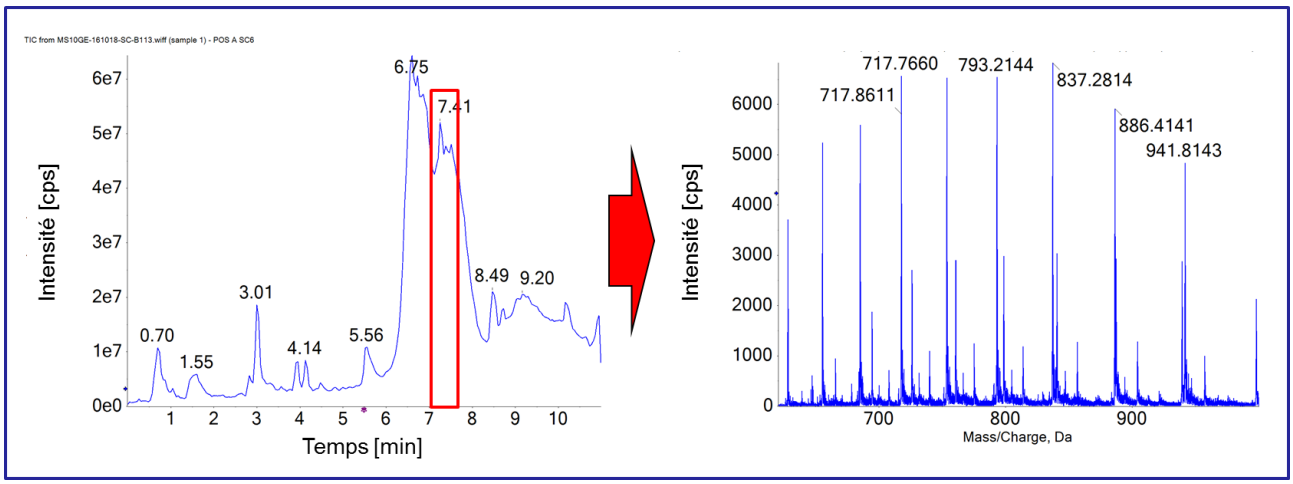


Figure 47: TIC à gauche et le spectre extrait de 600 à 1000 *m/z* aux alentours du temps de rétention mis en évidence par la PCA de 7.3 min

La présence de protéines en analyse LC-MS de petites molécules n'est pas désirée pour de nombreuses raisons. Par exemple, ces molécules peuvent être responsables de l'obstruction des colonnes chromatographiques ou causer de la suppression d'ions. Les protéines peuvent engendrer des biais dans les analyses. Ces protéines sont souvent difficiles à éliminer de la colonne chromatographique et de nombreuses procédures les décrivent de façon exhaustive. Cette présence non désirée engendre de plus un effet de carry-over dans la séquence chromatographique. C'est pourquoi une précipitation de protéines dans la préparation d'échantillons est nécessaire. Cette étape bien qu'intégrée aux préparations d'échantillons (MeOH-H_2O) n'est pas suffisante dans le cas présent (figures 47 et 48).

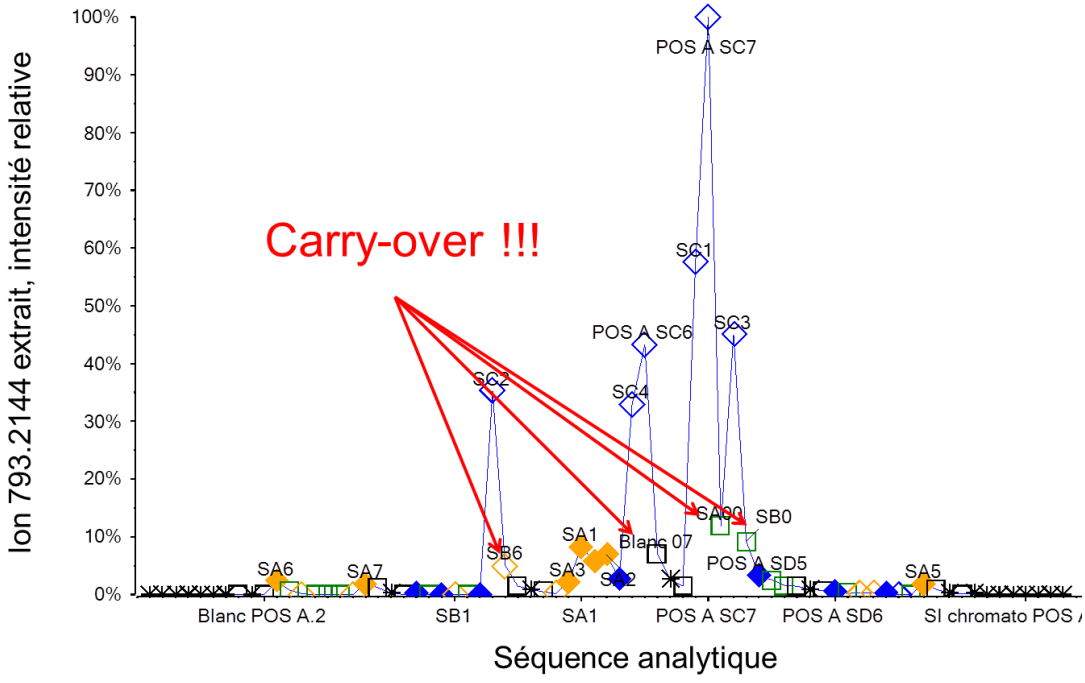


Figure 48: Extraction de l'ion à 793.21 *m/z* à travers la séquence chromatographique afin d'illustrer un phénomène de carry-over

Le set de données a donc été traité en restreignant le temps de rétention d'extraction à 6 min. Il n'apparaît pas de séparation claire du modèle, et aucun ensemble de variables permettant d'observer une tendance dans l'explication du modèle n'a pu être déterminé. C'est pourquoi une autre stratégie de traitement des données a été envisagée (approche ciblée). Cette approche est néanmoins très importante pour avoir une vue d'ensemble sur le set de données. Ceci permet en outre d'écarter la préparation d'échantillon C (AqD). Cette préparation d'échantillon met en contact les cellules sanguines avec un mélange H_2O ;CH_3OH (1 ;3) pendant une heure à 4°C. Cette étape permet de solubiliser des protéines non désirées. Ces protéines devraient d'ailleurs être précipitées, ou alors se trouver à l'interface des deux phases non-miscibles des solvants d'extraction, ce qui n'apparaît pas dans le cas présent. Les résultats concernant le mode négatif ne sont pas présentés ici, mais ont été traités, et ne mettent pas en évidence des résultats supplémentaires.

Approche ciblée

Les données obtenues sont importées dans le logiciel MasterView. La recherche de candidats appropriés (fit) selon une tolérance de 10 ppm et de recherche de pic non ciblée est ensuite effectuée selon les données présentes dans la librairie interne. De nombreux paramètres sont pris en compte pour l'analyse des pics et de leur correspondance à la librairie. Ces paramètres sont les suivants : le score entre le spectre MS/MS de référence et le spectre MS/MS obtenu de façon expérimentale, l'erreur de masse de la formule moléculaire, et enfin les isotopes identifiés. La haute résolution couplée à une librairie concernant les fragments MS/MS des métabolites permet de mettre en évidence, de façon justifiée, les éléments déterminés. Une rampe d'énergie de collision allant de 10 à 50 eV augmente la probabilité d'obtenir des fragments pour une fenêtre donnée. Tous les métabolites identifiés ont été vérifiés un à un pour permettre la meilleure identification possible.

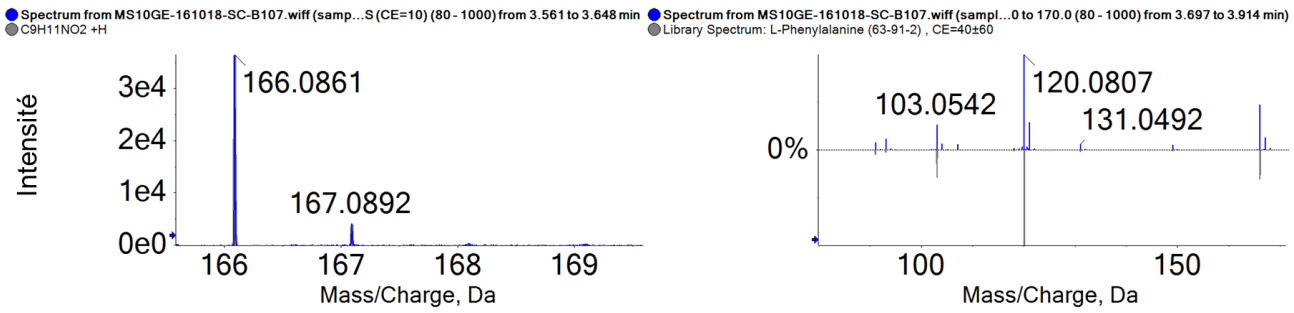


Figure 49: étude de l'abondance isotopique à gauche et comparaison entre le spectre expérimental et théorique obtenu à partir d'un standard.

La complémentarité entre les différentes acquisitions est en outre d'une grande aide. Par exemple certains composés ne possèdent pas de fragments spécifiques dans un mode d'acquisition (positif ou négatif) mais possèdent cette condition dans le mode opposé. Le fait que le temps de rétention soit le même, les deux modes ayant été acquis selon les deux conditions chromatographiques, permet de confirmer l'identité d'un composé pour autant que celui-ci soit ionisé dans les deux conditions. Seuls les métabolites remplissant tous les critères précités ont été pris en compte. Le mode d'acquisition SWATH augmente la complexité des spectres MS/MS obtenus. Il existe cependant un manque cruel de procédures standardisées dans l'identification des métabolites [13]. Ce problème est aussi couplé au manque de librairies fidèles, précises et normalisées.

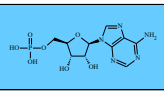
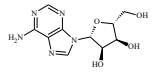
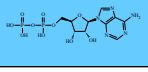
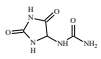
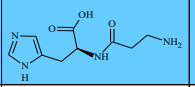
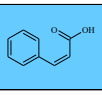
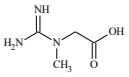
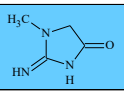
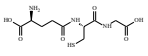
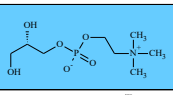
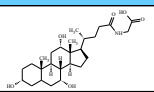
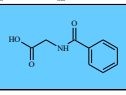
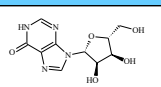
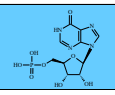
Mode **positif** conditions **acides**	15
Mode **positif** conditions **basiques**	16
Mode **négatif** conditions **acides**	23
Mode **négatif** conditions **basiques**	14
	68

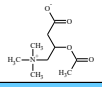
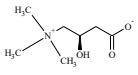
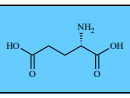
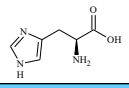
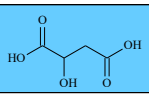
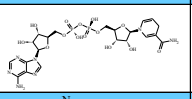
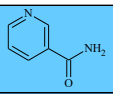
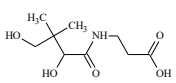
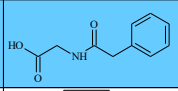
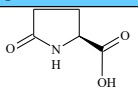
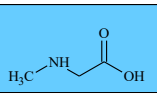
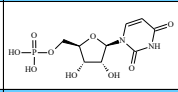
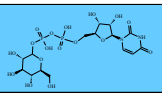
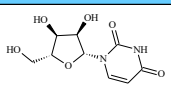
39

Figure 50: Composés identifiés par type de conditions chromatographiques

Ainsi 68 composés dont 39 composés uniques ont été mis en évidence sur les 4 modes d'analyses effectués (acquisition en mode positif et négatif, conditions chromatographiques acides et basiques). Un même composé peut être détecté en mode positif et négatif et/ou conditions chromatographiques acides et basiques. Un composé est qualifié d' « unique » quand cet aspect en pris en compte et enlevé (adénosine identifiées dans tous les modes, donc identifiée quatre fois mais un seul composé « unique »). Le mode négatif a permis l'identification de 37 composés contre 31 pour le mode positif. Ceci pourrait être expliqué par l'obtention de spectres comportant moins d'éléments perturbants dans les analyses en mode négatif. Ces éléments perturbants peuvent être, par exemple, les phtalates qui ionisent très bien en mode positif, ou d'autres contaminants. Une autre possibilité est qu'il y a moins de composés ayant des adduits en mode négatif, et par conséquent le signal du $[M-H]^-$ n'est pas diminué par la propension des espèces à former des adduits. Une fois les traces extraites selon les fenêtres SWATH, si l'ion adduit se trouve dans une fenêtre adjacente, celui-ci ne sera pas fragmenté dans la même fenêtre. Cependant, ceci est aussi composé-dépendant, car les espèces ne contenant pas d'adduits sont écartées si l'identification ne peut se faire dans le mode opposé.

Tableau 2: Résumé des métabolites identifiés et de leurs propriétés physico-chimiques

	GENERIC_NAME	Structure	Formula	Exact Mass	[M+H]+	[M-H]-	LogP (v.12.01)	LogD at pH=2.70 (v.12.01)	LogD at pH=3.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.22 (v.12.01)
1	3-Phosphoglyceric acid		C3H7O7P	185.9929	187.0002	184.9857	-1.88 (+/-0.35)	-3.12	-3.55	-7.55	-7.58
2	5'-Methylthioadenosine		C11H15N5O3S	297.0896	298.0968	296.0823	0.67 (+/-0.58)	-0.67	-0.41	0.67	0.67
3	Adenine		C5H5N5	135.0545	136.0618	134.0472	-0.03 (+/-0.27)	-1.80	-1.55	-0.03	-0.03
4	Adenosine monophosphate		C10H14N5O7P	347.0631	348.0704	346.0558	-0.22 (+/-0.58)	-2.32	-2.32	-4.64	-4.67
5	Adenosine		C10H13N5O4	267.0968	268.1040	266.0895	-1.02 (+/-0.51)	-2.37	-2.10	-1.03	-1.03
6	ADP		C10H15N5O10P2	427.0294	428.0367	426.0221	-2.91 (+/-0.77)	-5.54	-5.66	-8.19	-8.26
7	Allantoin		C4H6N4O3	158.0440	159.0513	157.0367	-2.89 (+/-0.34)	-2.89	-2.89	-3.20	-3.32
8	Carnosine		C9H14N4O3	226.1066	227.1139	225.0993	-2.17 (+/-0.50)	-5.85	-5.78	-4.83	-4.84
9	Cholic acid		C24H40O5	408.2876	409.2949	407.2803	2.61 (+/-0.28)	2.61	2.61	-0.51	-0.67
10	Cinnamic acid		C9H8O2	148.0524	149.0597	147.0452	2.41 (+/-0.32)	2.40	2.39	-0.99	-1.10
11	Citric acid		C6H8O7	192.0270	193.0343	191.0197	-1.72 (+/-0.40)	-2.21	-2.44	-7.47	-7.47
12	Citrulline		C6H13N3O3	175.0957	176.1030	174.0884	-1.53 (+/-0.35)	-4.15	-4.09	-4.03	-4.04
13	Creatine		C4H9N3O2	131.0695	132.0768	130.0622	-1.88 (+/-0.64)	-3.91	-3.94	-4.38	-4.38
14	Creatinine		C4H7N3O	113.0589	114.0662	112.0516	-1.69 (+/-0.69)	-3.45	-3.30	-1.69	-1.69
15	Glutathione		C10H17N3O6S	307.0838	308.0911	306.0765	-0.87 (+/-0.74)	-3.52	-3.55	-4.41	-4.44
16	Glycerophosphocholine		C8H20NO6P	257.1028	258.1101	256.0955	-5.63 (+/-0.62)	-5.04	-5.04	-5.03	-5.03
17	Glycocholic acid		C26H43NO6	465.3090	466.3163	464.3018	1.49 (+/-0.47)	1.38	1.30	-2.22	-2.24
18	Hippuric acid		C9H9NO3	179.0582	180.0655	178.0510	0.31 (+/-0.53)	0.26	0.21	-3.35	-3.38
19	Inosine		C10H12N4O5	268.0808	269.0880	267.0735	-2.32 (+/-0.56)	-2.34	-2.33	-2.38	-2.42
20	Inosinic acid		C10H13N4O8P	348.0471	349.0544	347.0398	-1.02 (+/-0.63)	-1.95	-2.21	-5.49	-5.54

	GENERIC_NAME	Structure	Formula	Exact Mass	[M+H]+	[M-H]-	LogP (v.12.01)	LogD at pH=2.70 (v.12.01)	LogD at pH=3.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.22 (v.12.01)
21	L-Acetylcarnitine		C9H17NO4	203.1158	204.1230	202.1085	-4.15 (+/-0.41)	-4.01	-3.93	-3.55	-3.55
22	L-Alanine		C3H7NO2	89.0477	90.0550	88.0404	-0.68 (+/-0.28)	-3.30	-3.25	-3.19	-3.19
23	L-Carnitine		C7H15NO3	161.1052	162.1125	160.0979	-4.52 (+/-0.73)	-4.41	-4.34	-3.92	-3.92
24	L-Glutamic acid		C5H9NO4	147.0532	148.0604	146.0459	-1.43 (+/-0.31)	-4.01	-3.98	-4.94	-4.94
25	L-Histidine		C6H9N3O2	155.0695	156.0768	154.0622	-1.27 (+/-0.35)	-4.79	-4.78	-3.83	-3.86
26	Malic acid		C4H6O5	134.0215	135.0288	133.0142	-1.26 (+/-0.31)	-1.41	-1.52	-6.01	-6.01
27	L-Methionine		C5H11NO2S	149.0510	150.0583	148.0438	0.37 (+/-0.41)	-2.20	-2.16	-2.15	-2.16
28	L-Phenylalanine		C9H11NO2	165.0790	166.0863	164.0717	1.11 (+/-0.29)	-1.47	-1.43	-1.41	-1.43
29	L-Tryptophan		C11H12N2O2	204.0899	205.0972	203.0826	1.04 (+/-0.31)	-1.53	-1.50	-1.47	-1.47
30	L-Tyrosine		C9H11NO3	181.0739	182.0812	180.0666	0.38 (+/-0.30)	-2.22	-2.18	-2.15	-2.17
31	NADH		C21H29N7O14P2	665.1248	666.1320	664.1175	-4.35 (+/-0.95)	-7.10	-7.27	-8.85	-8.85
32	Niacinamide		C6H6N2O	122.0480	123.0553	121.0407	-0.11 (+/-0.24)	-0.82	-0.60	-0.11	-0.11
33	Pantothenic acid		C9H17NO5	219.1107	220.1179	218.1034	-0.85 (+/-0.60)	-0.86	-0.88	-4.35	-4.43
34	Phenylacetylglycine		C10H11NO3	193.0739	194.0812	192.0666	0.18 (+/-0.56)	0.06	-0.04	-3.54	-3.55
35	Pyroglutamic acid		C5H7NO3	129.0426	130.0499	128.0353	-2.39 (+/-0.27)	-2.46	-2.52	-6.07	-6.10
36	Sarcosine		C3H7NO2	89.0477	90.0550	88.0404	-0.79 (+/-0.28)	-3.36	-3.33	-3.30	-3.30
37	Uridine 5'-monophosphate		C9H13N2O9P	324.0359	325.0431	323.0286	-1.58 (+/-0.50)	-2.50	-2.78	-6.03	-6.07
38	Uridine diphosphate glucose		C15H24N2O17P2	566.0550	567.0623	565.0477	-4.51 (+/-0.83)	-6.45	-6.93	-9.02	-9.03
39	Uridine		C9H12N2O6	244.0695	245.0768	243.0623	-1.61 (+/-0.44)	-1.61	-1.61	-1.63	-1.65

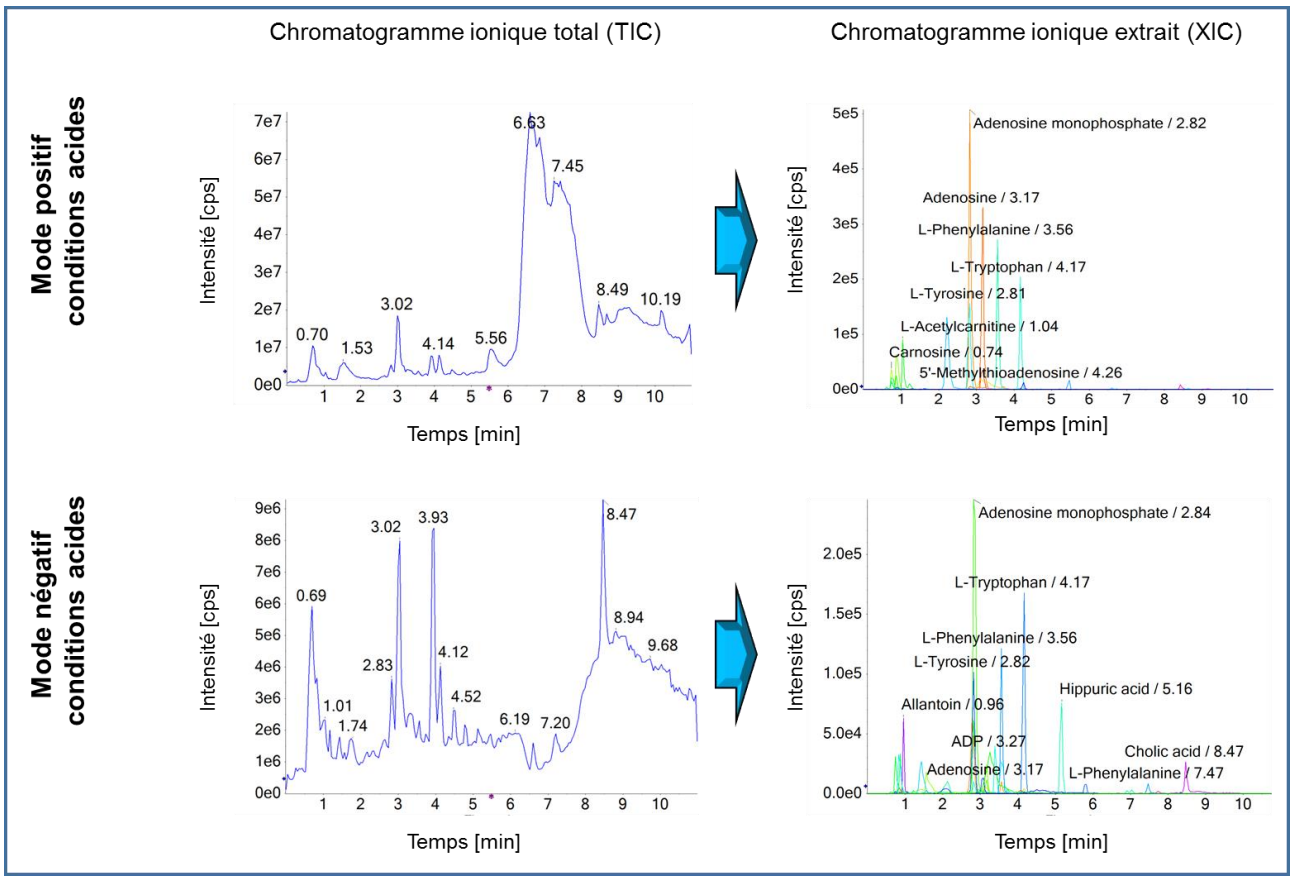


Figure 51: Chromatogramme positif et négatif dans les conditions chromatographiques acides et traces extraites des métabolites identifiés pour ces deux modes

Pour une lecture simplifiée des conditions MS et chromatographique, une nomenclature a été mise en place. Les métabolites sont suivis de 4 lettres faisant référence à l'origine de l'échantillon, à la phase extraite, aux conditions d'analyses MS et aux conditions chromatographiques.

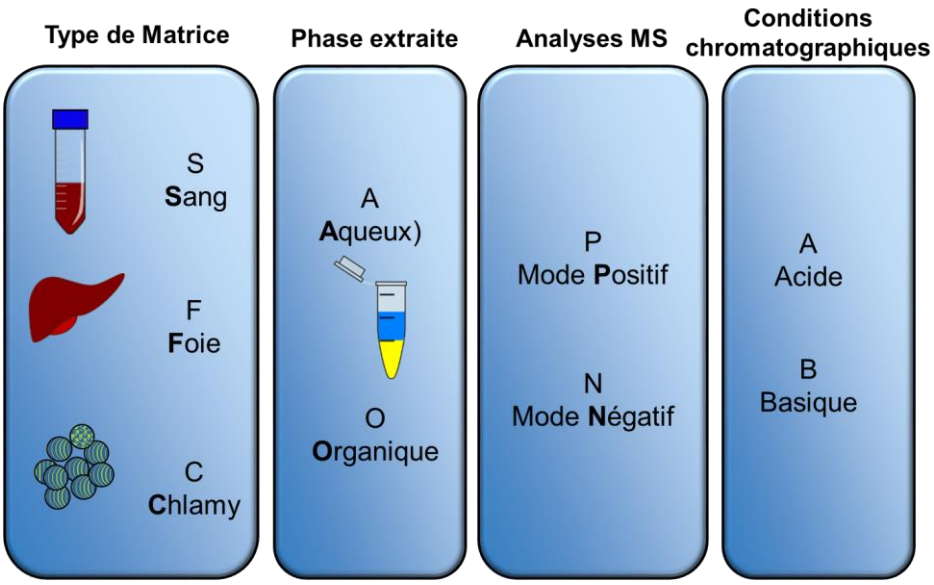


Figure 52: Nomenclature des métabolites extraits

Ainsi l'adénosine « **SAPA** » est un métabolite provenant d'un échantillon **S**anguin, de la phase **A**queuse, analysé en mode **P**ositif et séparé selon des conditions chromatographiques **A**cides.

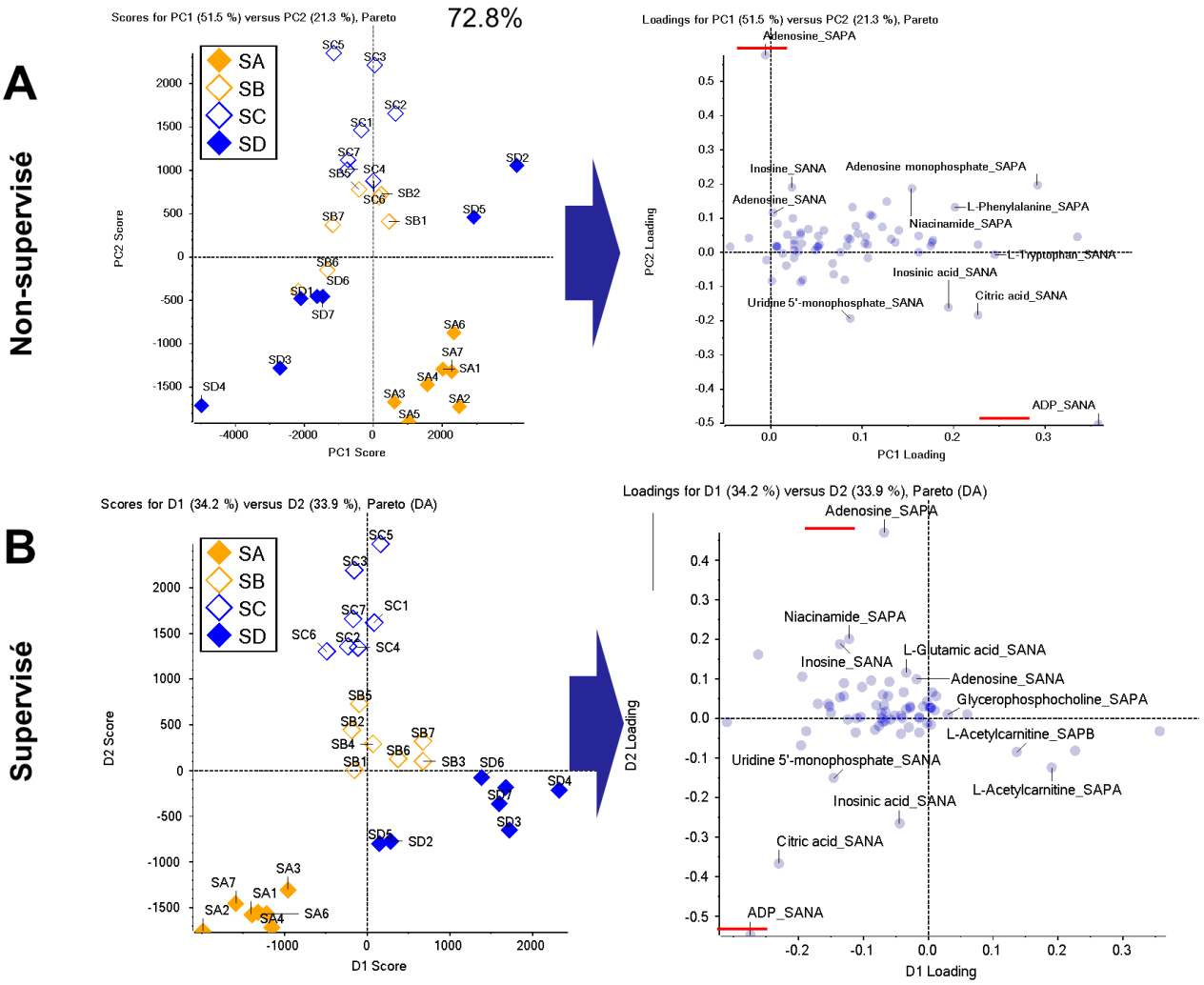


Figure 53: Analyse en composante principale supervisée et non supervisée des 68 variables identifiées

L'étude par analyse en composante principale de façon non-supervisée (A) tend à séparer le modèle avec 72.8% d'explication cumulée par PC1 et PC2. La séparation semble conduite par le mode d'agitation plutôt que par l'ordre des solvants ajoutés. Les variables appartenant au mode d'extraction SD (AqM) sont éparpillées à travers la représentation statistique, ce qui tend à révéler un manque de cohérence entre les différents réplicats, et donc une problématique liée à la reproductibilité de la préparation d'échantillon. Ce résultat peut paraître surprenant car, contrairement à la préparation d'échantillon avec une agitation douce, il n'y a pas d'étape de prélèvement supplémentaire. Les composés se trouvant aux extrêmes du modèle sont l'adénosine et l'ADP. Ces composés sont donc liés à la compréhension du processus de séparation des préparations d'échantillons selon le

type d'agitation. L'analyse en composante principale supervisée met aussi en évidence une séparation basée sur le type d'agitation, et les mêmes métabolites se retrouvent aux extrêmes du modèle à savoir : l'ADP, l'acide citrique, l'acide inosinique, l'uridine 5'-monophosphate pour l'agitation mécanique, et l'adénosine, l'inosine, la niacinamide pour l'agitation douce.

Etant donné que certains composés s'ionisent dans les deux modes, ou encore sont retenus et ionisés suivant les 2 conditions chromatographiques, il a été envisagé de supprimer les « variables doublons » et de ne tenir compte que des variables possédant la plus grande intensité. Cette étape ne produit pas de changements dans l'explication du modèle, car les variables ayant l'intensité la plus grande ont été utilisées.

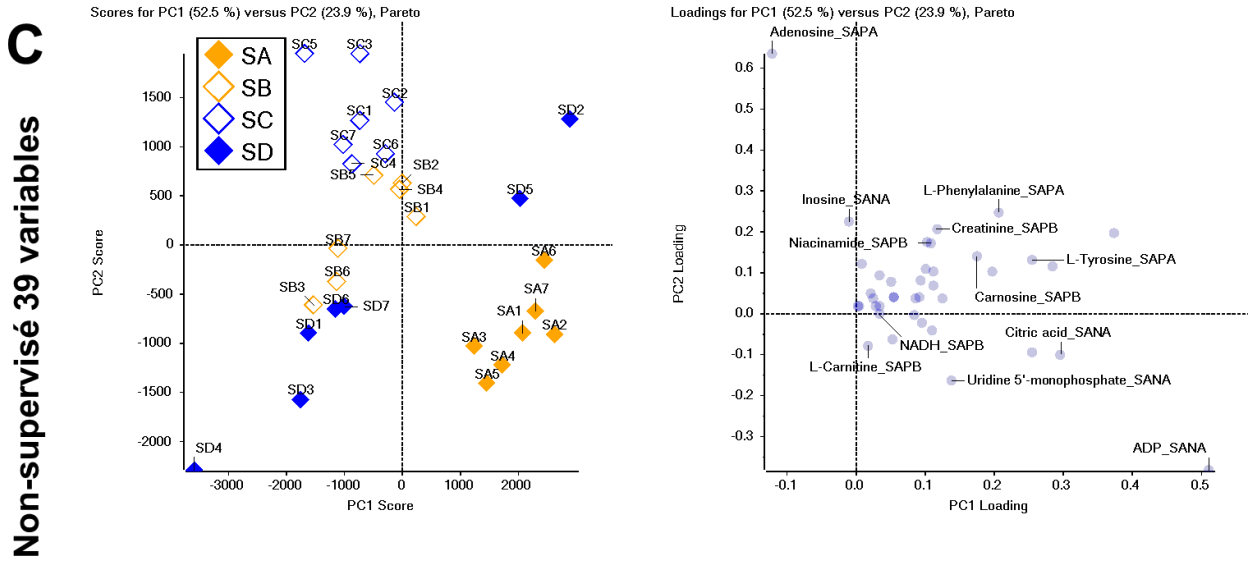


Figure 54: Analyse non-supervisée comprenant uniquement 39 variables, ce qui correspond aux 39 métabolites identifiés

La heat map représente les intensités des aires des différents métabolites qui sont utilisés en tant que variables dans le modèle de la PCA, au moyen du logiciel MarkerView. L'ADP, l'AMP, la phénylalanine, la tyrosine, l'acide citrique, la niacinamide, le tryptophane ainsi que l'adénosine, comportent des valeurs importantes d'aire sous la courbe. Ce sont d'ailleurs ces mêmes variables qui se trouvent aux limites du modèle.

Il n'y a pas eu d'étape de « peak-picking » pour l'extraction de ces variables mais une extraction des signaux et une correction manuelle de l'intégration des pics à l'aide du logiciel MultiQuant. Cette heat map permet en outre de représenter le comportement d'un même métabolite selon le type de chromatographie et de mode d'ionisation. Le graphique ainsi que les valeurs brutes de chaque métabolite se trouvent en annexe. Le comportement des métabolites est cohérent entre les différentes conditions.

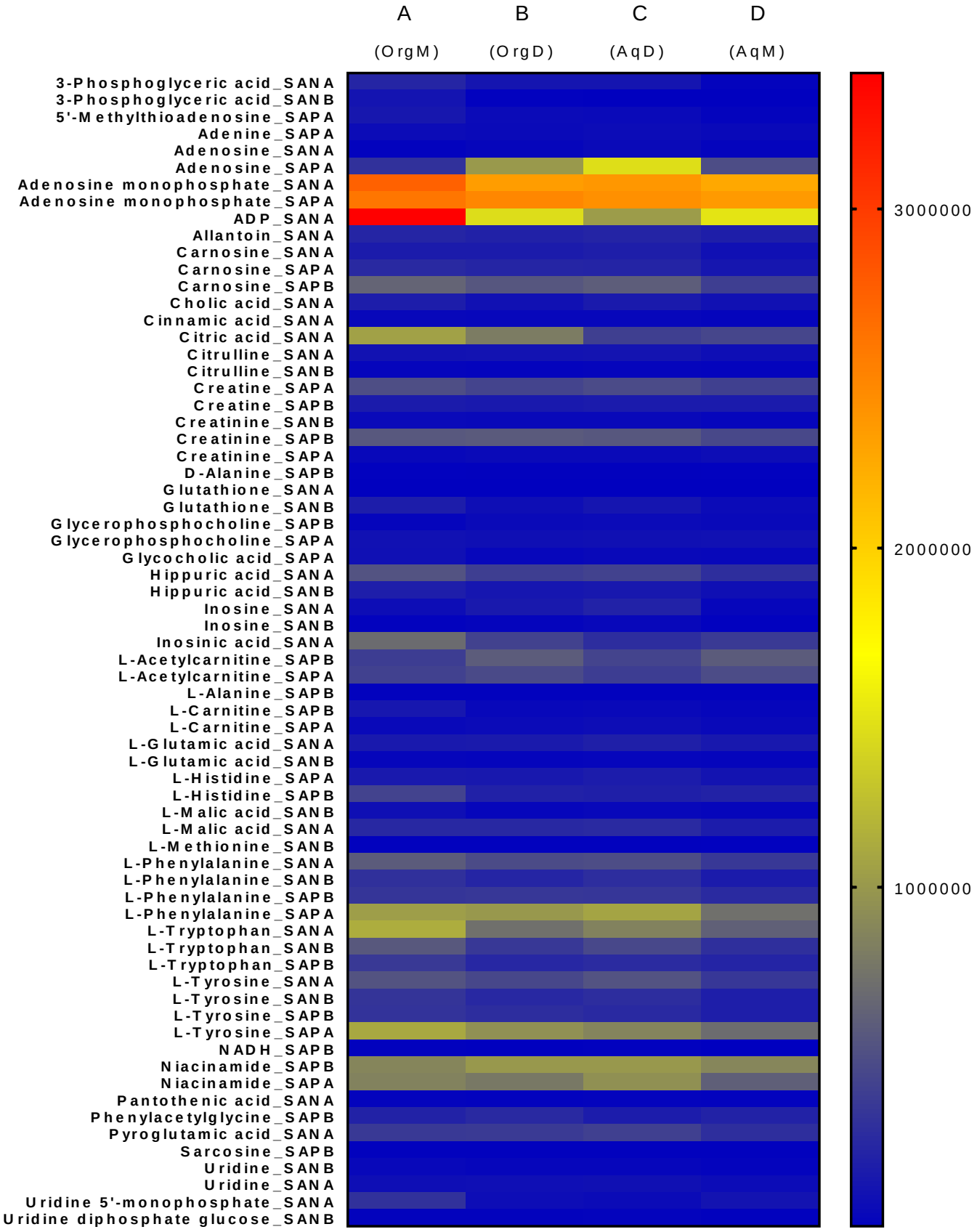


Figure 55: Heat map des intensités des aires sous les pics des métabolites identifiés à l'aide de la librairie interne selon le type de préparation d'échantillon

Dès lors que la séparation des types de préparation d'échantillons semble corrélée au type d'agitation, l'analyse des résultats est envisagée selon l'ordre d'ajouts des solvants.

Le score du modèle pour PC1 et PC2 est meilleur dans le cas de l'agitation mécanique (85.4% contre 63.9%) avec une séparation plus marquée des deux types d'extractions. Il est à noter que le nombre de métabolites, et donc de variables, est limité aux espèces qui ont été identifiées préalablement. Ce nombre est fixe. On retrouve à nouveau l'ADP et l'adénosine aux extrémités du modèle, ce qui tend à démontrer que ces métabolites sont sensibles à la fois au type d'agitation et au type d'extraction.

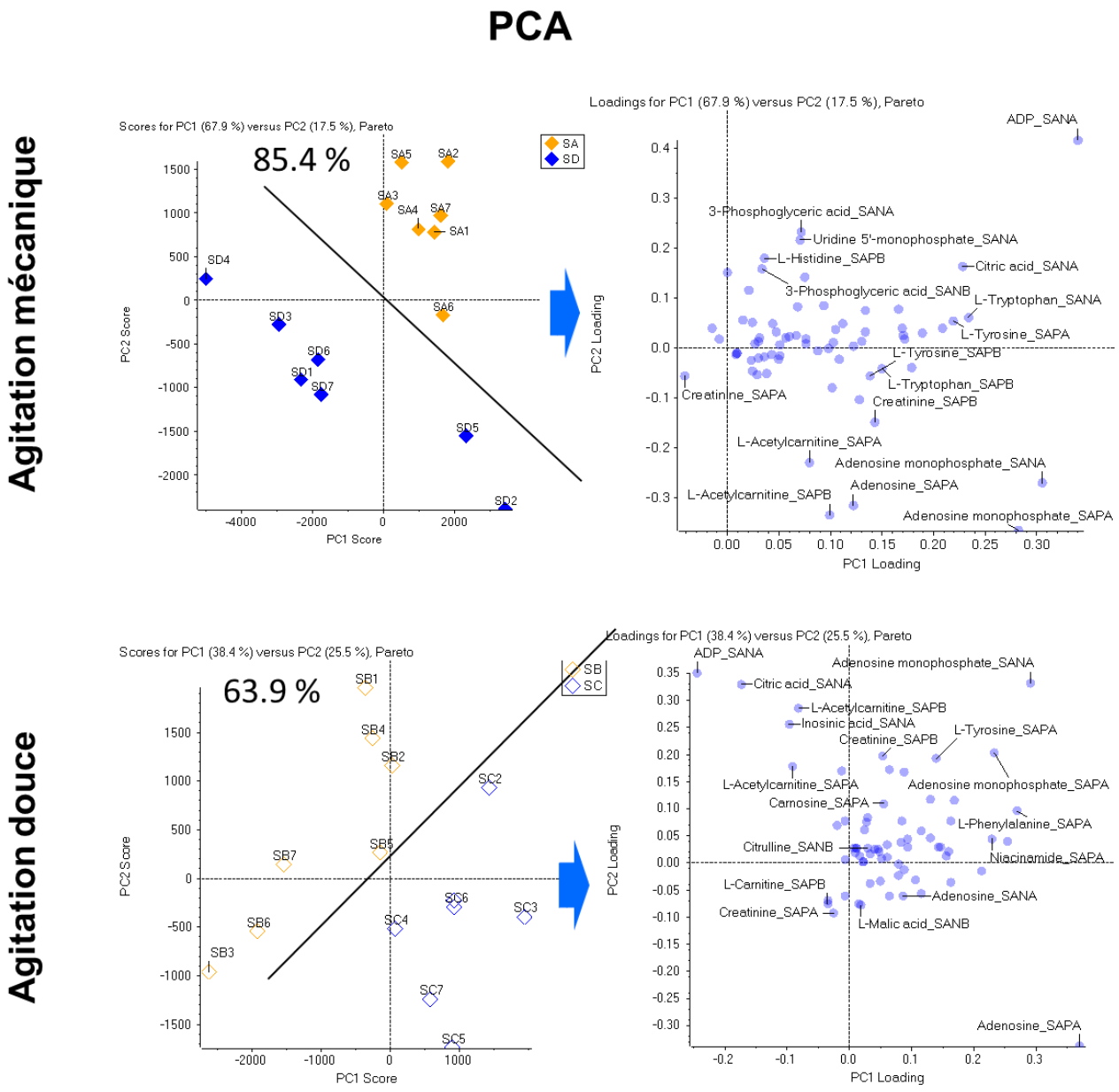


Figure 56: Comparaison entre les ordres d'ajouts des solvants selon la technique d'agitation

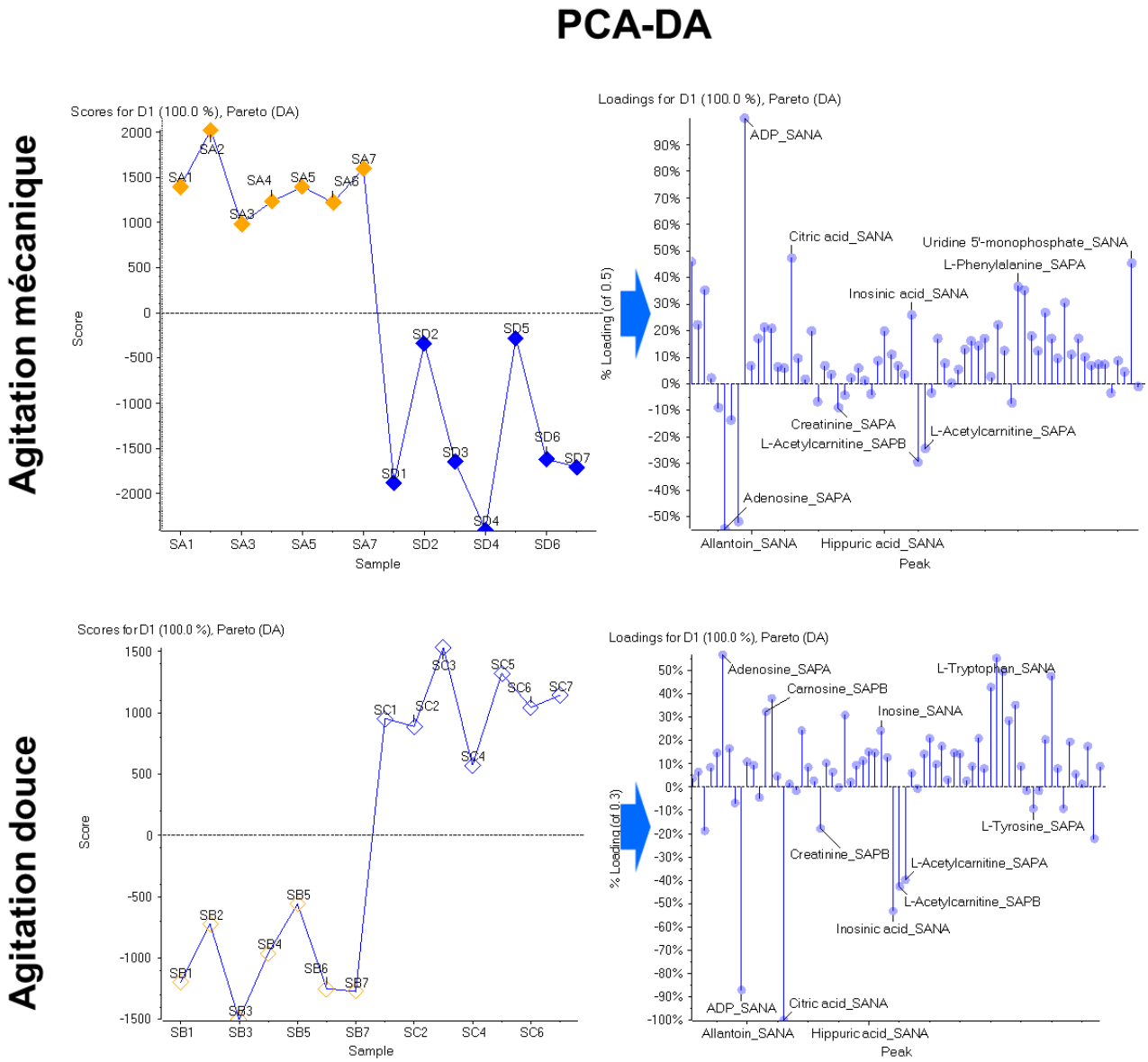


Figure 57: Analyse en composante principale en analyse discriminante (PCA-DA)

Les métabolites ayant été extraits selon un ordre différent d'ajouts des solvants, se pose la question de l'importance du logP dans la répartition de ceux-ci entre les différentes phases. L'importance de l'état d'ionisation dans lequel se trouvent les analytes va aussi influer sur la rétention des métabolites par la colonne chromatographique possédant une phase stationnaire apolaire. Parmi les composés identifiés, 6 composés possèdent un logP positif, ce sont : la phénylacetylglycine, l'acide hippurique, l'acide glycocholique, l'acide cinnamique et l'acide cholique. L'ADP, dont le logP est de -5.54, est majoritairement présente dans les préparations d'échantillons commençant par une extraction dite apolaire. L'adénosine, qui est moins polaire que l'ADP (logP de -2.37) se retrouve dans les préparations inverses. Ceci amène à la conclusion qu'un autre phénomène se produit.

Tableau 3: Classement des métabolites selon leur polarité décroissante à pH acide

	GENERIC_NAME	Formula	Exact Mass	LogP (v.12.01)	LogD at pH=2.70 (v.12.01)	LogD at pH=3.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.22 (v.12.01)
31	NADH	C21H29N7O14P2	665.1248	-4.35 (+/-0.95)	-7.10	-7.27	-8.85	-8.85
38	Uridine diphosphate glucose	C15H24N2O17P2	566.0550	-4.51 (+/-0.83)	-6.45	-6.93	-9.02	-9.03
8	Carnosine	C9H14N4O3	226.1066	-2.17 (+/-0.50)	-5.85	-5.78	-4.83	-4.84
6	ADP	C10H15N5O10P2	427.0294	-2.91 (+/-0.77)	-5.54	-5.66	-8.19	-8.26
16	Glycerophosphocholine	C8H20NO6P	257.1028	-5.63 (+/-0.62)	-5.04	-5.04	-5.03	-5.03
25	L-Histidine	C6H9N3O2	155.0695	-1.27 (+/-0.35)	-4.79	-4.78	-3.83	-3.86
23	L-Carnitine	C7H15NO3	161.1052	-4.52 (+/-0.73)	-4.41	-4.34	-3.92	-3.92
12	Citrulline	C6H13N3O3	175.0957	-1.53 (+/-0.35)	-4.15	-4.09	-4.03	-4.04
21	L-Acetylcarnitine	C9H17NO4	203.1158	-4.15 (+/-0.41)	-4.01	-3.93	-3.55	-3.55
24	L-Glutamic acid	C5H9NO4	147.0532	-1.43 (+/-0.31)	-4.01	-3.98	-4.94	-4.94
13	Creatine	C4H9N3O2	131.0695	-1.88 (+/-0.64)	-3.91	-3.94	-4.38	-4.38
15	Glutathione	C10H17N3O6S	307.0838	-0.87 (+/-0.74)	-3.52	-3.55	-4.41	-4.44
14	Creatinine	C4H7N3O	113.0589	-1.69 (+/-0.69)	-3.45	-3.30	-1.69	-1.69
36	Sarcosine	C3H7NO2	89.0477	-0.79 (+/-0.28)	-3.36	-3.33	-3.30	-3.30
22	L-Alanine	C3H7NO2	89.0477	-0.68 (+/-0.28)	-3.30	-3.25	-3.19	-3.19
1	3-Phosphoglyceric acid	C3H7O7P	185.9929	-1.88 (+/-0.35)	-3.12	-3.55	-7.55	-7.58
7	Allantoin	C4H6N4O3	158.0440	-2.89 (+/-0.34)	-2.89	-2.89	-3.20	-3.32
37	Uridine 5'-monophosphate	C9H13N2O9P	324.0359	-1.58 (+/-0.50)	-2.50	-2.78	-6.03	-6.07
35	Pyroglutamic acid	C5H7NO3	129.0426	-2.39 (+/-0.27)	-2.46	-2.52	-6.07	-6.10
5	Adenosine	C10H13N5O4	267.0968	-1.02 (+/-0.51)	-2.37	-2.10	-1.03	-1.03
19	Inosine	C10H12N4O5	268.0808	-2.32 (+/-0.56)	-2.34	-2.33	-2.38	-2.42
4	Adenosine monophosphate	C10H14N5O7P	347.0631	-0.22 (+/-0.58)	-2.32	-2.32	-4.64	-4.67
30	L-Tyrosine	C9H11NO3	181.0739	0.38 (+/-0.30)	-2.22	-2.18	-2.15	-2.17
11	Citric acid	C6H8O7	192.0270	-1.72 (+/-0.40)	-2.21	-2.44	-7.47	-7.47
27	L-Methionine	C5H11NO2S	149.0510	0.37 (+/-0.41)	-2.20	-2.16	-2.15	-2.16
20	Inosinic acid	C10H13N4O8P	348.0471	-1.02 (+/-0.63)	-1.95	-2.21	-5.49	-5.54
3	Adenine	C5H5N5	135.0545	-0.03 (+/-0.27)	-1.80	-1.55	-0.03	-0.03
39	Uridine	C9H12N2O6	244.0695	-1.61 (+/-0.44)	-1.61	-1.61	-1.63	-1.65
29	L-Tryptophan	C11H12N2O2	204.0899	1.04 (+/-0.31)	-1.53	-1.50	-1.47	-1.47
28	L-Phenylalanine	C9H11NO2	165.0790	1.11 (+/-0.29)	-1.47	-1.43	-1.41	-1.43
26	Malic acid	C4H6O5	134.0215	-1.26 (+/-0.31)	-1.41	-1.52	-6.01	-6.01
33	Pantothenic acid	C9H17NO5	219.1107	-0.85 (+/-0.60)	-0.86	-0.88	-4.35	-4.43
32	Niacinamide	C6H6N2O	122.0480	-0.11 (+/-0.24)	-0.82	-0.60	-0.11	-0.11
2	5'-Methylthioadenosine	C11H15N5O3S	297.0896	0.67 (+/-0.58)	-0.67	-0.41	0.67	0.67
34	Phenylacetylglycine	C10H11NO3	193.0739	0.18 (+/-0.56)	0.06	-0.04	-3.54	-3.55
18	Hippuric acid	C9H9NO3	179.0582	0.31 (+/-0.53)	0.26	0.21	-3.35	-3.38
17	Glycocholic acid	C26H43NO6	465.3090	1.49 (+/-0.47)	1.38	1.30	-2.22	-2.24
10	Cinnamic acid	C9H8O2	148.0524	2.41 (+/-0.32)	2.40	2.39	-0.99	-1.10
9	Cholic acid	C24H40O5	408.2876	2.61 (+/-0.28)	2.61	2.61	-0.51	-0.67

Tableau 4: Classement des métabolites selon leur polarité décroissante à pH basique

	GENERIC_NAME	Formula	Exact Mass	LogP (v.12.01)	LogD at pH=2.70 (v.12.01)	LogD at pH=3.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.00 (v.12.01)	LogD at pH=8.22 (v.12.01)
38	Uridine diphosphate glucose	C15H24N2O17P2	566.0550	-4.51 (+/-0.83)	-6.45	-6.93	-9.02	-9.03
31	NADH	C21H29N7O14P2	665.1248	-4.35 (+/-0.95)	-7.10	-7.27	-8.85	-8.85
6	ADP	C10H15N5O10P2	427.0294	-2.91 (+/-0.77)	-5.54	-5.66	-8.19	-8.26
1	3-Phosphoglyceric acid	C3H7O7P	185.9929	-1.88 (+/-0.35)	-3.12	-3.55	-7.55	-7.58
11	Citric acid	C6H8O7	192.0270	-1.72 (+/-0.40)	-2.21	-2.44	-7.47	-7.47
35	Pyroglutamic acid	C5H7NO3	129.0426	-2.39 (+/-0.27)	-2.46	-2.52	-6.07	-6.10
37	Uridine 5'-monophosphate	C9H13N2O9P	324.0359	-1.58 (+/-0.50)	-2.50	-2.78	-6.03	-6.07
26	Malic acid	C4H6O5	134.0215	-1.26 (+/-0.31)	-1.41	-1.52	-6.01	-6.01
20	Inosinic acid	C10H13N4O8P	348.0471	-1.02 (+/-0.63)	-1.95	-2.21	-5.49	-5.54
16	Glycerophosphocholine	C8H20NO6P	257.1028	-5.63 (+/-0.62)	-5.04	-5.04	-5.03	-5.03
24	L-Glutamic acid	C5H9NO4	147.0532	-1.43 (+/-0.31)	-4.01	-3.98	-4.94	-4.94
8	Carnosine	C9H14N4O3	226.1066	-2.17 (+/-0.50)	-5.85	-5.78	-4.83	-4.84
4	Adenosine monophosphate	C10H14N5O7P	347.0631	-0.22 (+/-0.58)	-2.32	-2.32	-4.64	-4.67
15	Glutathione	C10H17N3O6S	307.0838	-0.87 (+/-0.74)	-3.52	-3.55	-4.41	-4.44
33	Pantothenic acid	C9H17NO5	219.1107	-0.85 (+/-0.60)	-0.86	-0.88	-4.35	-4.43
13	Creatine	C4H9N3O2	131.0695	-1.88 (+/-0.64)	-3.91	-3.94	-4.38	-4.38
12	Citrulline	C6H13N3O3	175.0957	-1.53 (+/-0.35)	-4.15	-4.09	-4.03	-4.04
23	L-Carnitine	C7H15NO3	161.1052	-4.52 (+/-0.73)	-4.41	-4.34	-3.92	-3.92
25	L-Histidine	C6H9N3O2	155.0695	-1.27 (+/-0.35)	-4.79	-4.78	-3.83	-3.86
34	Phenylacetylglycine	C10H11NO3	193.0739	0.18 (+/-0.56)	0.06	-0.04	-3.54	-3.55
21	L-Acetylcarnitine	C9H17NO4	203.1158	-4.15 (+/-0.41)	-4.01	-3.93	-3.55	-3.55
18	Hippuric acid	C9H9NO3	179.0582	0.31 (+/-0.53)	0.26	0.21	-3.35	-3.38
7	Allantoin	C4H6N4O3	158.0440	-2.89 (+/-0.34)	-2.89	-2.89	-3.20	-3.32
36	Sarcosine	C3H7NO2	89.0477	-0.79 (+/-0.28)	-3.36	-3.33	-3.30	-3.30
22	L-Alanine	C3H7NO2	89.0477	-0.68 (+/-0.28)	-3.30	-3.25	-3.19	-3.19
19	Inosine	C10H12N4O5	268.0808	-2.32 (+/-0.56)	-2.34	-2.33	-2.38	-2.42
17	Glycocholic acid	C26H43NO6	465.3090	1.49 (+/-0.47)	1.38	1.30	-2.22	-2.24
30	L-Tyrosine	C9H11NO3	181.0739	0.38 (+/-0.30)	-2.22	-2.18	-2.15	-2.17
27	L-Methionine	C5H11NO2S	149.0510	0.37 (+/-0.41)	-2.20	-2.16	-2.15	-2.16
14	Creatinine	C4H7N3O	113.0589	-1.69 (+/-0.69)	-3.45	-3.30	-1.69	-1.69
39	Uridine	C9H12N2O6	244.0695	-1.61 (+/-0.44)	-1.61	-1.61	-1.63	-1.65
29	L-Tryptophan	C11H12N2O2	204.0899	1.04 (+/-0.31)	-1.53	-1.50	-1.47	-1.47
28	L-Phenylalanine	C9H11NO2	165.0790	1.11 (+/-0.29)	-1.47	-1.43	-1.41	-1.43
10	Cinnamic acid	C9H8O2	148.0524	2.41 (+/-0.32)	2.40	2.39	-0.99	-1.10
5	Adenosine	C10H13N5O4	267.0968	-1.02 (+/-0.51)	-2.37	-2.10	-1.03	-1.03
9	Cholic acid	C24H40O5	408.2876	2.61 (+/-0.28)	2.61	2.61	-0.51	-0.67
32	Niacinamide	C6H6N2O	122.0480	-0.11 (+/-0.24)	-0.82	-0.60	-0.11	-0.11
3	Adenine	C5H5N5	135.0545	-0.03 (+/-0.27)	-1.80	-1.55	-0.03	-0.03
2	5'-Methylthioadenosine	C11H15N5O3S	297.0896	0.67 (+/-0.58)	-0.67	-0.41	0.67	0.67

Les données n'ont jusqu'alors subi aucune correction des signaux par des standards internes. Pour l'analyse non-ciblée et non supervisée décrite dans la première partie, il est préférable de minimiser l'incidence des corrections sur le modèle, afin de ne pas biaiser le modèle dès le début. Dès lors que les analyses sont traitées de façon ciblée, la correction par un standard interne de préparation d'échantillon doit être envisagée afin de garantir l'homogénéité de la préparation d'échantillon. La variabilité de l'extraction D (AqM) a été mise en évidence précédemment. Elle n'est cependant pas corrélée à la variabilité du signal du standard interne marqué (adénosine $^{13}C5$) présent dans le solvant d'extraction (méthanol). L'aire sous la courbe varie selon le type de chromatographie et le mode d'ionisation. Une aire plus importante concernant aussi bien le mode positif que le mode négatif est d'ailleurs observée.

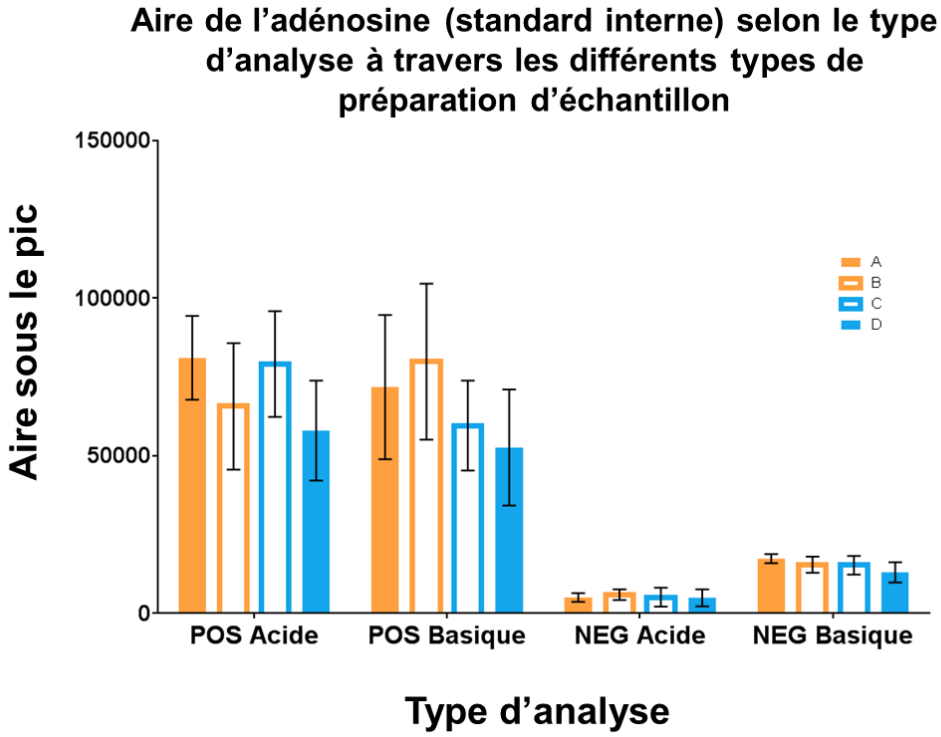


Figure 58: Représentation des variations d'intensité du standard interne par type d'analyse et selon la préparation d'échantillon. A et B sont des extractions pour lesquelles la première étape d'extraction liquide-liquide est dite « organique » (couleur orange) et les préparations d'échantillons C et D sont dites « aqueuses » (couleur bleue). A et D sont agités par une méthode mécanique alors que B et C sont agités par Thermomixer et cette agitation est qualifiée de « douce »

Les standards internes chromatographiques marqués sont ajoutés lors de la reconstitution de l'échantillon dans le solvant adapté à la chromatographique liquide (même solvant pour toutes les injections acides ou basiques). Lors d'études quantitatives, il apparaît qu'un standard est ajouté pour chaque espèce afin de corriger les erreurs dues à la variabilité de l'ionisation appelée aussi communément « suppression ionique » [14-16]. Dans la pratique, il est financièrement et pratiquement impossible d'obtenir un standard marqué pour chaque métabolite analysé. C'est pourquoi deux ou trois standards internes marqués

sont utilisés pour chaque condition d'ionisation et de chromatographie. Un standard marqué se trouve dans la région du temps mort, car cette région possède une compétition à l'ionisation (variation très importante) en chromatographie liquide en phase inverse due à de nombreux composés très polaires qui ne sont pas retenus par la phase stationnaire. Les standards internes chromatographiques garantissent en outre la reproductibilité de la séparation au travers de la séquence analytique. Ceci est très important par exemple lors d'analyses non ciblées par PCA, car les variables sont comparées selon leur temps de rétention et, si celui-ci varie de façon trop importante, le modèle considérera un même pic chromatographique comme appartenant à deux composés différents.

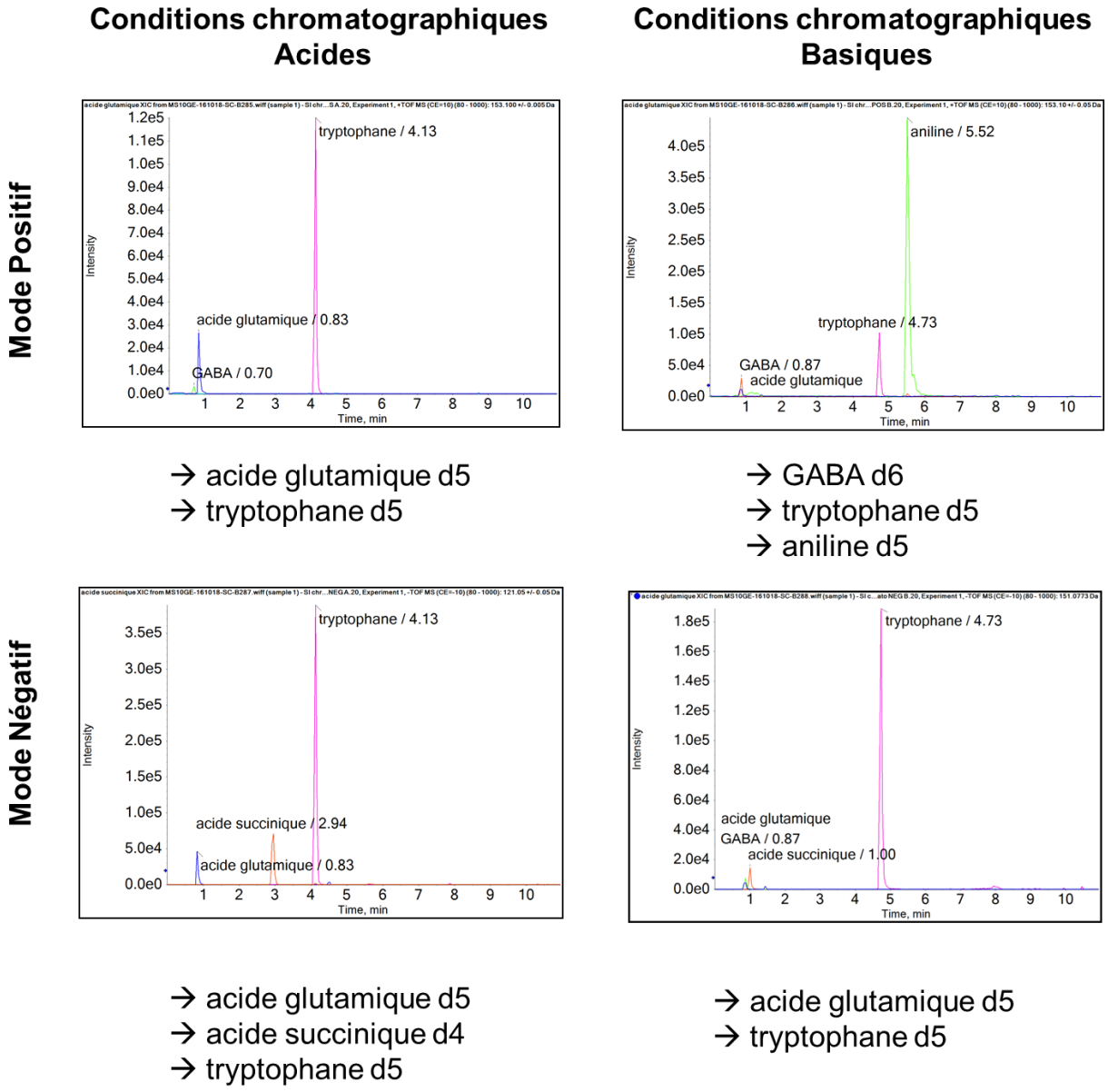


Figure 59: Choix des standards internes marqués pour la correction de l'aire des métabolites selon les conditions MS et chromatographiques

La variation de l'aire des étalons internes, tout au long de la séquence analytique a été étudiée. Il se trouve que, dans les conditions acides et avec une ionisation en mode positif, l'aire de l'acide glutamique marqué possède une très grande variabilité, contrairement au tryptophane qui ne subit que peu de variation d'intensité de l'aire tout au long de cette même séquence.

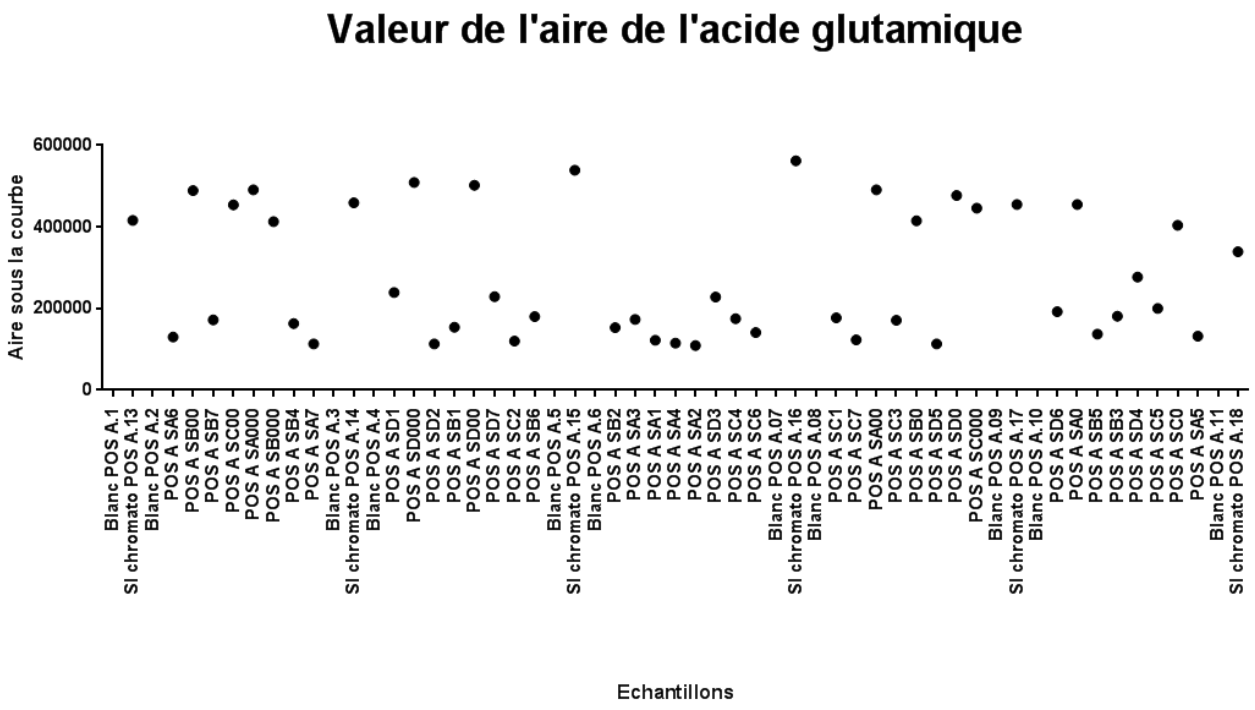


Figure 60: Variation de l'intensité de l'aire pour l'acide glutamique marqué tout au long de la séquence analytique

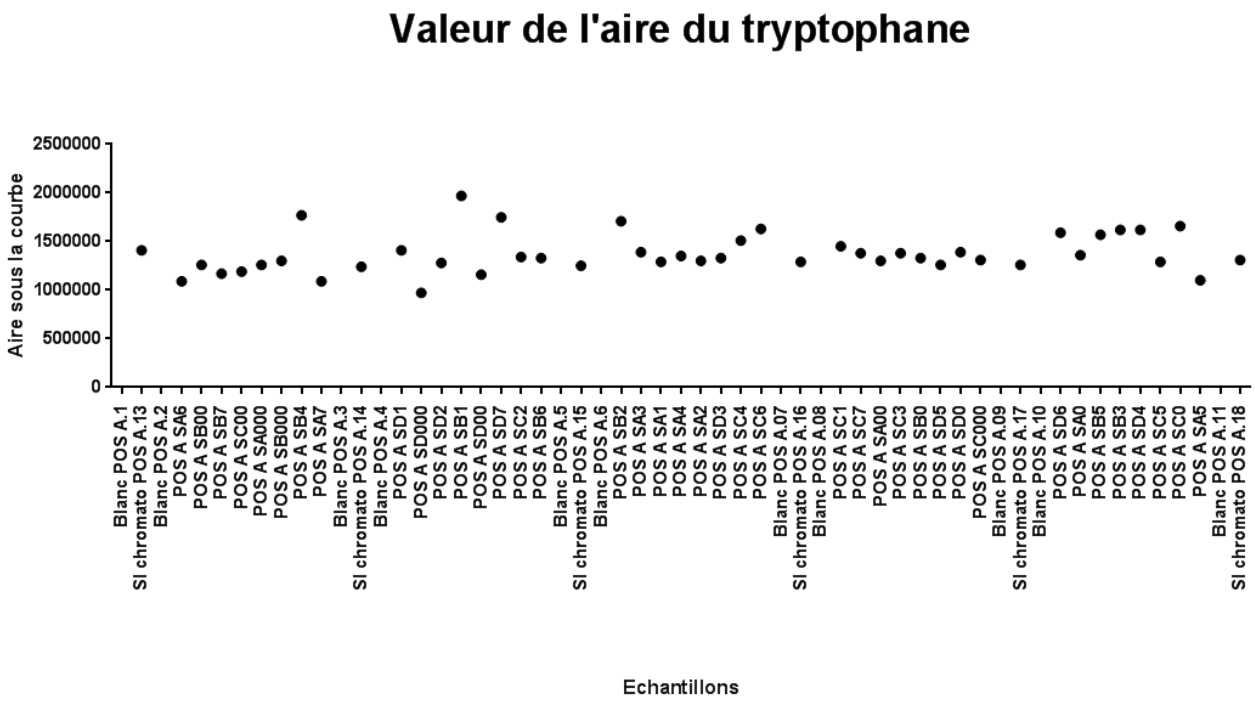


Figure 61: Variation de l'intensité de l'aire pour le tryptophane marqué tout au long de la séquence analytique

Lorsque les données sont regroupées selon le type d'échantillon (blanc versus échantillon), il est clairement observé que l'intensité du signal sous l'aire du pic est plus importante lorsqu'il s'agit d'un blanc plutôt que d'un échantillon réel. Certains parleront de la notion de suppression ionique alors qu'est préféré dans cette thèse le terme de compétition d'ionisation. En effet, si l'on regarde uniquement le signal de l'analyte d'intérêt, on voit que celui-ci diminue, c'est pourquoi une suppression est envisagée, cependant, il n'est pas tenu compte du courant ionique total qui, lui, ne diminue pas. Il y a plus d'espèces à ioniser par la source, c'est pourquoi une compétition entre les espèces est réalisée, et non pas un effet suppresseur de la source en elle-même.

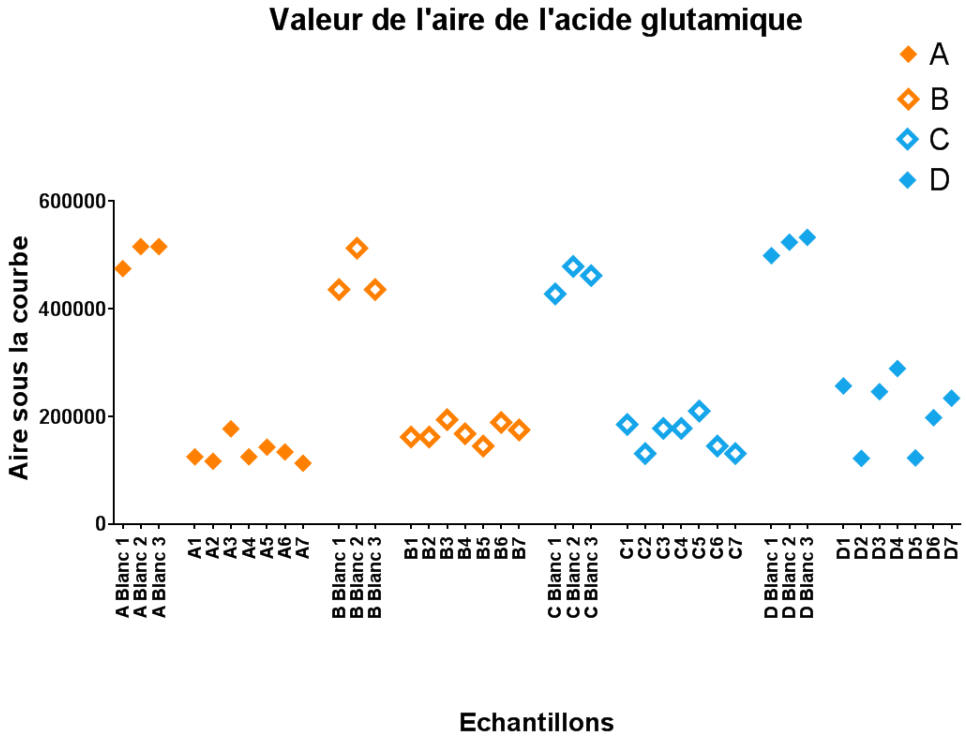


Figure 62: Aire de l'acide glutamique marqué selon le type d'échantillon. A et B sont des extractions pour lesquelles la première étape d'extraction liquide-liquide est dite « organique » (couleur orange) et les préparations d'échantillons C et D sont dites « aqueuses » (couleur bleue). A et D sont agités par une méthode mécanique alors que B et C sont agités par Thermomixer et cette agitation est qualifiée de « douce »

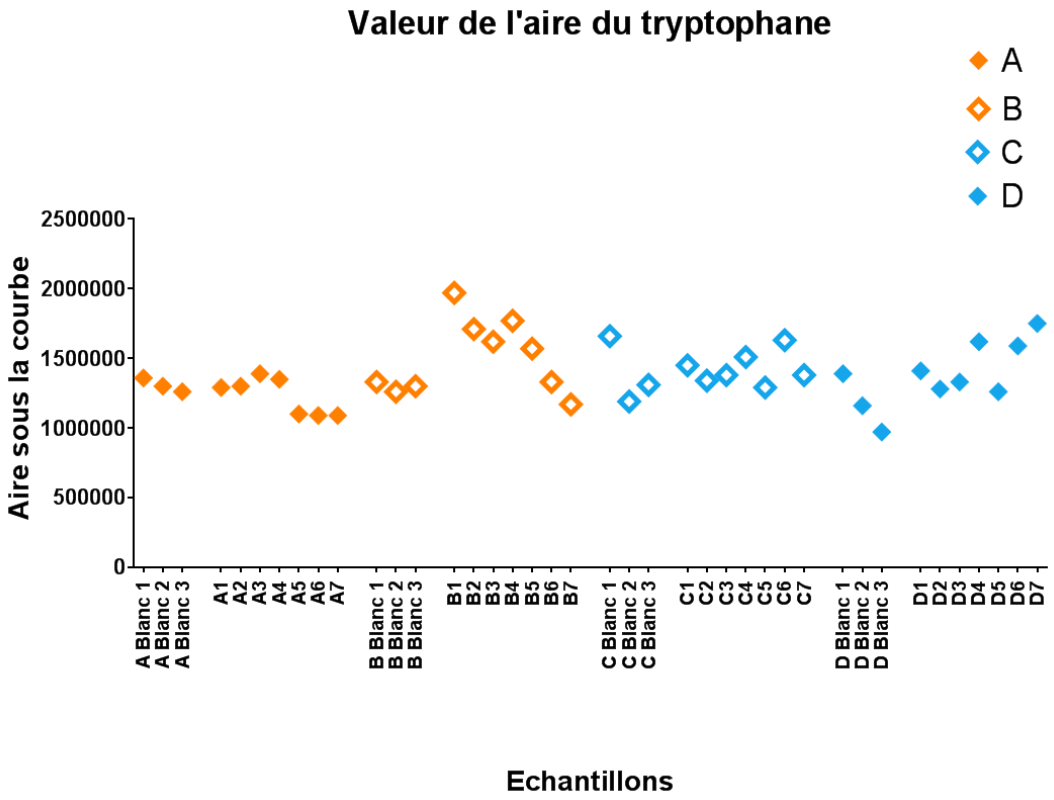


Figure 63: Aire du tryptophane marqué selon le type d'échantillon. A et B sont des extractions pour lesquelles la première étape d'extraction liquide-liquide est dite « organique » (couleur orange) et les préparations d'échantillons C et D sont dites « aqueuses » (couleur bleue). A et D sont agités par une méthode mécanique alors que B et C sont agités par Thermomixer et cette agitation est qualifiée de « douce »

Les variations de l'acide glutamique sont donc provoquées par la compétition d'ionisation des espèces présentes dans la source dans le volume mort de la séquence chromatographique. Le GABA n'est pas mis en évidence, mais la tendance à la compétition est la même que pour l'acide glutamique. De même, l'aniline ou encore l'acide succinique ne sont que peu sujets à ces variations. Ces composés sont retenus par la colonne et subissent une variation d'intensité moins importante. Il est d'ailleurs postulé que les composés proches au niveau des temps de rétention vont subir les mêmes variations d'ionisation, c'est pourquoi le rationnel de n'utiliser que quelques standards chromatographiques est avancé. Les valeurs d'intensité d'aire obtenues sous la courbe sont corrigées par le standard chromatographique le plus proche du point de vue du temps de rétention.

Les données suivantes sont corrigées à la fois par le standard interne marqué (par l'adénosine) ainsi que par le standard chromatographique marqué le plus proche du point de vue du temps de rétention.

L'analyse en composante principale supervisée et non supervisée de l'ensemble des variables (68 variables) est à nouveau envisagée ainsi que l'analyse selon les 39 métabolites.

L'explication du modèle par les composantes principales PC1 et PC2 en analyse non supervisée ne permet pas d'obtenir une image claire concernant la séparation des différents types d'échantillons. L'utilisation de la composante principale PC3 versus PC1 malgré la diminution faible du score (de 59.4% à 52.5%) permet la mise en évidence d'une discrète séparation selon le type d'agitation (mécanique versus douce). Cette observation se rapporte aussi aux statistiques des 39 métabolites. La valeur des logD est ajoutée à la suite du nom du métabolite. Cependant, aucune corrélation n'est observée entre le logD et la répartition des métabolites selon l'extraction première polaire ou apolaire.

Une variable manquante qui aurait pu être un élément dans l'explication du modèle est l'ATP : en effet, l'ATP est un élément souvent étudié dans les années 60 afin de déterminer la stabilité des poches sanguines prélevées en vue d'une transfusion ultérieure [17, 18]. L'ATP est sujet à dégradation en ADP par une réaction exergonique faisant intervenir des hexokinases se trouvant dans le cytosol cellulaire [18]. Leur nombre, plus important dans les échantillons à la fois par agitation douce et extraction primaire polaire, pourrait être dû à la présence d'enzymes encore actives dans l'échantillon.

Cependant, il est connu que les nucléotides dérivés de l'adénine sont particulièrement sensibles aux variations de température [19]. D'ailleurs les solutions stock des nucléotides de l'adénine doivent être préparées dans des conditions de températures basses [20].

L'ADP se trouve principalement dans la fraction apolaire au moyen de l'agitation mécanique, ce qui est tout l'opposé de l'AMP et l'adénosine. Il pourrait donc y avoir une dégradation dans la première phase d'extraction de la préparation d'échantillon, favorisant la dégradation non pas au travers de mécanismes enzymatiques, mais purement physicochimiques, ceci par la présence à la fois de molécules d'eau connues pour dégrader les liaisons phosphoester et phosphoanhydre de haute énergie. Ce phénomène de dégradation pourrait être corrélé à l'agitation douce pendant plus d'une heure à 4°C. Ceci pourrait aussi être le cas pour l'inosine et l'acide inosinique, ou plus communément pour l'inosine monophosphate (IMP).

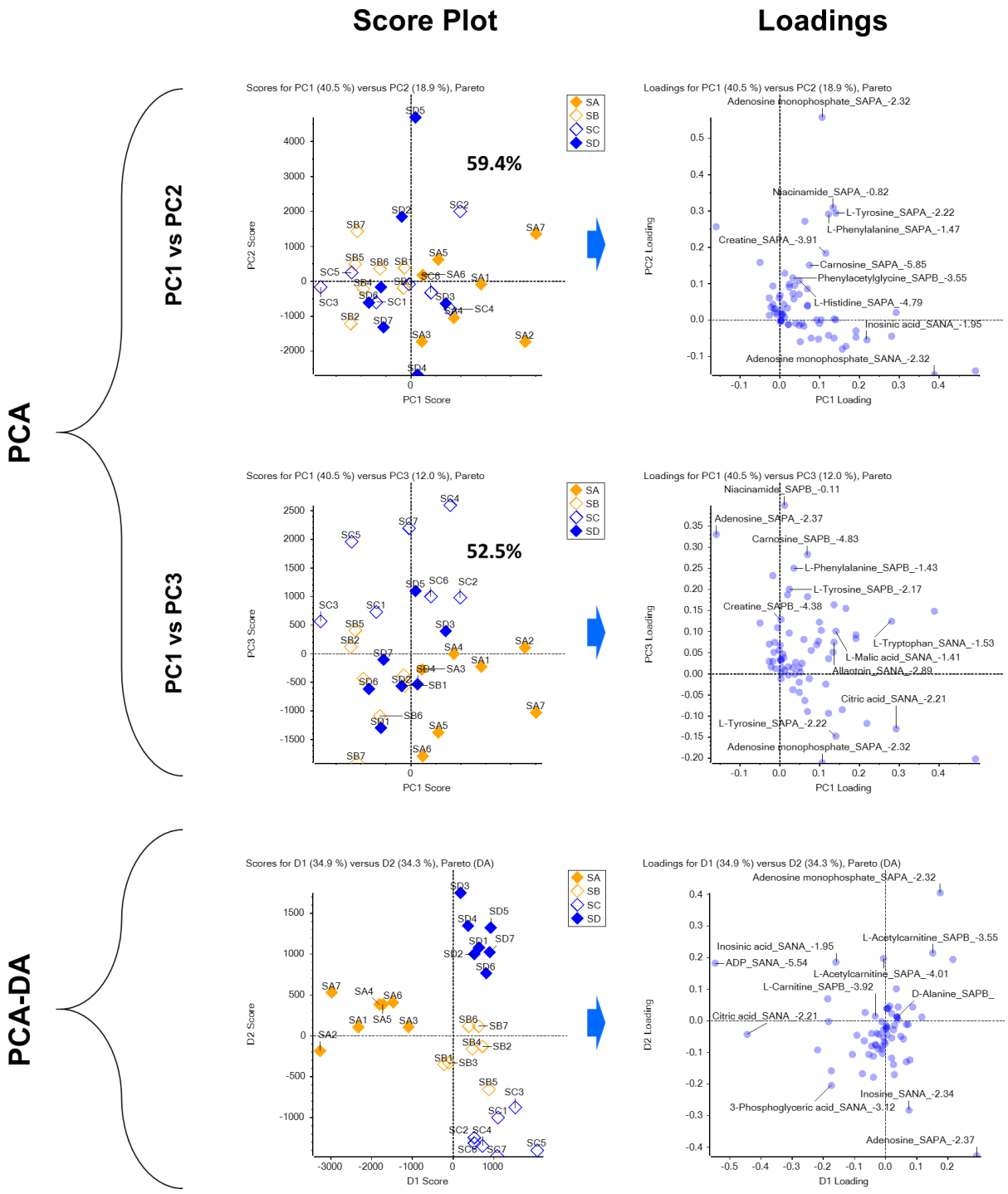


Figure 64: Analyse en composante principale supervisée et non supervisée des 68 variables identifiées, extraites et corrigées par le standard interne marqué et par les standards chromatographiques marqués. A et B sont des extractions pour lesquelles la première étape d'extraction liquide-liquide est dite « organique » (couleur orange) et les préparations d'échantillons C et D sont dites « aqueuses » (couleur bleue). A et D sont agités par une méthode mécanique alors que B et C sont agités par Thermomixer et cette agitation est qualifiée de « douce »

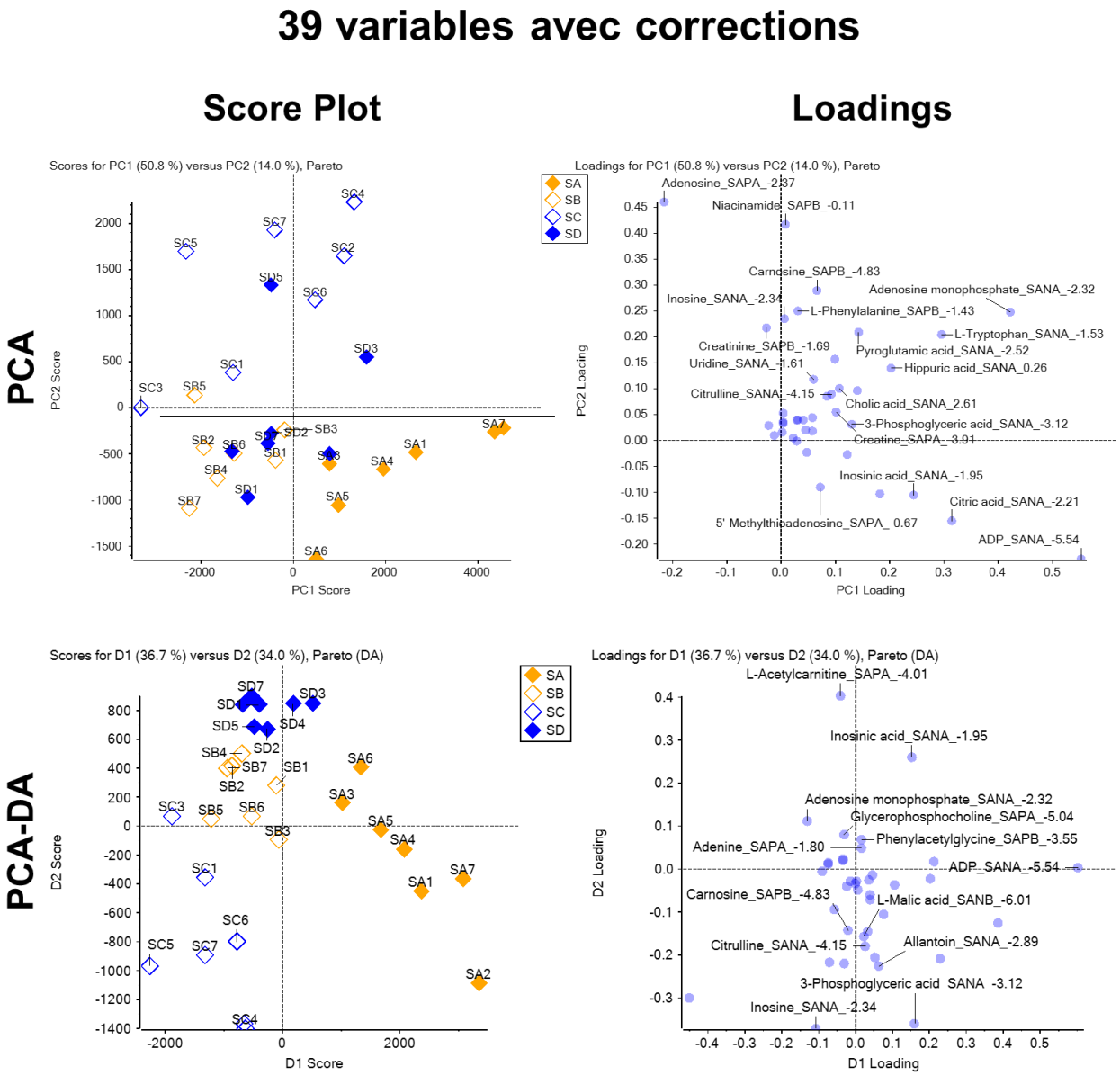


Figure 65: Analyse en composante principale supervisée et non supervisée des 39 métabolites identifiés, extraits et corrigés par le standard interne marqué et par les standards chromatographiques marqués. A et B sont des extractions pour lesquelles la première étape d'extraction liquide-liquide est dite « organique » (couleur orange) et les préparations d'échantillons C et D sont dites « aqueuses » (couleur bleue). A et D sont agités par une méthode mécanique alors que B et C sont agités par Thermomixer et cette agitation est qualifiée de « douce »

6.4. Conclusion et perspectives

La méthode qui semble la plus adaptée dans le cas des métabolites polaires identifiés est la méthode A, qui comprend une première extraction avec un mélange « eau ; méthanol ; chloroforme » et une agitation mécanique brève à l'aide de billes de verre pour accéder au contenu intracellulaire.

L'approche globale et non supervisée des données met en évidence la présence de protéines, interférents non-désirés, de la fraction polaire extraite à l'aide de la méthode C (AqD) effectuée par une première extraction, à l'aide d'un mélange eau-chloroforme pendant une heure à 4°C, avec une agitation douce. Ceci n'aurait pas été mis en évidence si une vision uniquement ciblée avait fait l'objet de cette étude.

L'agitation douce à 4°C avec des solvants apolaires B (OrgD) semble aussi corrélée à une dégradation des métabolites, principalement les nucléotides liés à l'adénine (adénosine, AMP, ADP) et l'hypoxanthine (inosine, IMP).

Les préparations d'échantillons utilisant l'agitation douce (B et C) et exigeant de ce fait un temps de préparation long (plus de 2heures) quels que soient les solvants d'extraction, ne devraient pas être utilisées : il s'agit d'éviter les dégradations physicochimiques qui peuvent se produire en solution. Il est établi que le métabolisme cellulaire doit être stoppé le plus rapidement possible, et sans dégradation par cycles de congélation/décongélation, mais ceci semble aussi être adapté à la méthode de préparation d'échantillon.

Concernant les méthodes rapides par agitation mécanique et sans extractions successives A et D, il semble que la méthode D révèle une plus grande variabilité d'extraction des métabolites. Ceci peut être corrigé par les standards internes, mais il subsiste cependant un doute quant à la reproductibilité de la méthode de préparation.

Les standards internes se révèlent essentiels pour corriger des variations d'ionisation et d'extraction et permettre le suivi de la qualité de la séparation chromatographique tout au long de la séquence analytique. Cependant, il reste toujours une question quant à la compétition des différents constituants, et à l'effet matrice qui en découle par augmentation de la quantité de molécules ionisées dans un intervalle de temps très court, notamment dans le temps mort. C'est pourquoi la séparation par chromatographie liquide des métabolites reste le cheval de bataille de toute procédure analytique ayant pour but d'améliorer la séparation des métabolites. Ceci est d'autant plus vrai que le mode SWATH est utilisé en spectrométrie de masse, car il permet d'inclure une dimension supplémentaire dans l'identification des métabolites et des fragments y référant en diminuant la complexité des spectres obtenus par des fenêtres fragmentées.

Les approches statistiques utilisées telles que l'analyse en composante principale, de façon supervisée et non supervisée, permettent de caractériser les préparations d'échantillons tout d'abord du point de vue de la méthode d'extraction employée (agitation douce versus agitation mécanique) mais aussi de différencier les phases premières d'ajouts des solvants en vue de l'extraction des métabolites polaires.

L'utilisation de la spectrométrie de masse en haute résolution et selon le mode des fenêtres variables (SWATH mode), donne une information qualitative (spectres MS/MS) et quantitative (QUAL/QUANT) des échantillons analysés sur les ions précurseurs ou les ions fragments. Elle permet en outre d'obtenir toute l'information disponible mais augmente cependant la complexité des spectres obtenus. Ceci rend l'identification plus compliquée, mais permet de revenir sur les données à postériori, si une hypothèse autre que celle de départ devait être abordée.

Concernant les perspectives, l'ATP devrait être étudié de façon ciblée dans ce set de données, afin de déterminer son rôle et sa variabilité d'intensité sous la courbe selon la préparation d'échantillons effectuée. Il pourrait être un marqueur de la dégradation des nucléotides, et donc une marque de qualité concernant celle-ci.

L'analyse des variables sous forme de groupe (PCVG) pourrait aussi être effectuée dans le but de déterminer les tendances d'un groupe de variables à expliquer le modèle.

L'identification des métabolites dans une procédure de type non-ciblé et par une approche globale liée à la spectrométrie de masse (SWATH vs SRM), n'exige pas de développement de méthode lié au mode SRM mais cependant, de par le nombre de métabolites plus important détecté, de nécessiter une base de données fiables et précises pour identifier ces mêmes métabolites.

L'analyse globale des données réalisée en première partie de ce travail peut aussi être envisagée selon les différentes fenêtres SWATH obtenues, afin de réduire le bruit provoqué par certaines fenêtres. On pourrait par exemple rassembler toutes les fenêtres SWATH d'intérêt et exclure celles qui comprennent les protéines ou autres contaminants.

7. Références Partie 2 chapitre 2

1. Masson, P., et al., *Optimization and Evaluation of Metabolite Extraction Protocols for Untargeted Metabolic Profiling of Liver Samples by UPLC-MS.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2010. **82**(18): p. 7779-7786.
2. Mushtaq, M.Y., et al., *Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome.* Phytochem. Anal., 2014. **25**(4): p. 291-306.
3. Lee, D.Y., et al., *Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma.* Anal. Bioanal. Chem., 2014. **406**(28): p. 7275-7286.
4. Folch-Pi, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.* J. Biol. Chem., 1957. **226**: p. 497-509.
5. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
6. Oppenheim, R.D., et al., *BCKDH: the missing link in apicomplexan mitochondrial metabolism is required for full virulence of Toxoplasma gondii and Plasmodium berghei.* PLoS pathogens, 2014. **10**(7): p. e1004263.
7. Systems, P., *Understanding Additives: Heparin.* LabNotes a newsletter from BD Diagnostics, 2004. **14**(1).
8. MacRae, J.I., et al., *Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite Plasmodium falciparum.* BMC Biol., 2013. **11**: p. 67, 10 pp.
9. Lee, D.Y. and O. Fiehn, *High quality metabolomic data for Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Methods, 2008. **4**: p. 7.
10. Lee do, Y. and O. Fiehn, *Metabolomic response of Chlamydomonas reinhardtii to the inhibition of target of rapamycin (TOR) by rapamycin.* J Microbiol Biotechnol, 2013. **23**(7): p. 923-31.
11. Rafiei, A. and L. Sleno, *Comparison of peak-picking workflows for untargeted liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry metabolomics data analysis.* Rapid Commun. Mass Spectrom., 2015. **29**(1): p. 119-127.
12. Wada, Y., *Advanced analytical methods for hemoglobin variants.* J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2002. **781**(1-2): p. 291-301.
13. Gika, H.G., I.D. Wilson, and G.A. Theodoridis, *LC-MS-based holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives.* J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2014. **966**: p. 1-6.
14. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(11): p. 942-950.
15. Gustavsson, S.A., et al., *Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents.* J. Chromatogr. A, 2001. **937**(1-2): p. 41-47.
16. Annesley, T.M., *Ion suppression in mass spectrometry.* Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2003. **49**(7): p. 1041-1044.
17. Beutler, E. and O. Duron, *Blood preservation--relative capacities of hexoses, hexitols, and ethanol to maintain red cell ATP levels during storage.* Transfusion (Philadelphia), 1966. **6**(6): p. 537-42.
18. Oski, F.A. and J.L. Naiman, *RED CELL METABOLISM IN THE PREMATURE INFANT. I. ADENOSINE TRIPHOSPHATE LEVELS, ADENOSINE TRIPHOSPHATE STABILITY, AND GLUCOSE CONSUMPTION.* Pediatrics, 1965. **36**: p. 104-12.

19. Jimmerson, L.C., et al., *A LC-MS/MS Method for Quantifying Adenosine, Guanosine and Inosine Nucleotides in Human Cells.* Pharm. Res., 2016: p. Ahead of Print.
20. Aragon-Martinez, O.H., et al., *A novel method for measuring the ATP-related compounds in human erythrocytes.* Tohoku J. Exp. Med., 2014. **233**(3): p. 205-214.

8. Partie 3 - Analyse non-ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/SWATH-MS) des variations d'expression métabolique de cellules d'algues exposées à différentes concentrations de cuivre

8.1. Introduction

Les connaissances obtenues au niveau de la préparation d'échantillons (libération du contenu intracellulaire, conditions d'extraction liquide-liquide des métabolites) peuvent être appliquées de façon concrète et précise à une problématique biologique et environnementale. Il est important de spécifier qu'il n'y a pas de compartiment cellulaire mis en évidence lors de cette étude. En effet, les métabolites identifiés ou mis en évidence peuvent provenir des différents compartiments de la cellule d'algue.

Analyse des cellules d'algues par LC-MS

Au cours des années, l'intérêt pour cette algue n'a cessé de croître dans le domaine économique et dans celui de l'écotoxicologie [1, 2]. *Merchant et al* a mis en évidence en 2007 le séquençage du génome et ses rôles clés dans l'évolution [3].
Le métabolome de *Chlamydomonas reinhardtii* a été décrit par Bölling et Fiehn en 2005 en condition de privation de nutriments [4], ou encore par Matthew at al en 2009 [5]. Les données métabolomiques obtenues ont été améliorées toujours par Fiehn en 2008 [6].Toutefois, les analyses ont été réalisées en couplant la chromatographie gazeuse à la spectrométrie de masse. L'intérêt principal de la chromatographie liquide est dû à l'absence d'une étape de dérivatisation des métabolites.

Récemment, *Jamers et al* a effectué une approche globale de l'effet du cuivre sur cette algue. Cependant, il a été conclu que les différences au niveau métabolomique requéraient une méthode plus sensible que la RMN. La spectrométrie de masse pourrait donc y jouer son rôle [1].

Analyse non-ciblée pour la recherche de métabolites polaires

De nombreuses études se focalisent sur un ou plusieurs métabolites qui sont propres à la problématique biologique posée, comme par exemple les phytochélatines ou encore le glutathion, éléments connus pour être des indicateurs de stress oxydatif. Ces approches permettent à la fois de simplifier le processus analytique et possèdent l'avantage d'obtenir

des résultats précis et fidèles, mais restreignent le champ des observations et peuvent mener à manquer des éléments clés du modèle. L'approche non-ciblée, quant à elle, a l'avantage d'une vision globale mais peut conduire à des raisonnements erronés, car toutes les conditions ne sont pas maîtrisées. Ainsi, des faux positifs seront provoqués par la présence de contaminants. Les métabolites polaires sont présents à des étapes clés des processus biologiques, typiquement, celui de l'acide citrique (TCA ou Krebs).

Les librairies et bases de données liées à l'identification des métabolites

Le principal facteur limitant pour l'identification des données obtenues est l'accès à des bases de données précises et étendues. Leur nombre restreint fait aussi problème. Une large base de données nommée BinBase a été développée par Fiehn et Kind en 2008. Cependant celle-ci se révèle utile uniquement pour les analyses GC-MS (Basées sur l'impact électronique). HMDB, bien que développée pour des métabolites humains, possède des composés qui sont largement répandus dans d'autres espèces, comme les acides aminés et les acides organiques. L'identification est la pierre angulaire de toute étude métabolomique, mais nécessite des moyens importants comme la haute résolution, et la fragmentation des métabolites. C'est pourquoi une technique transversale comme la chromatographie liquide apporte une dimension supplémentaire à l'aide du temps de rétention.

Les enjeux des concentrations de cuivre dans l'environnement et l'utilisation de *Chlamydomonas reinhardtii* comme modèle biologique

Le cuivre est présent de plus en plus dans les eaux de surface et les eaux souterraines depuis l'avènement de l'industrialisation [7]. Le cuivre, sous sa forme libre, est un polluant provenant principalement de l'activité humaine, notamment par l'utilisation des pesticides [8].

Les effets du cuivre au niveau du génome ont été décrits en 2006 par Jamers et al [9]. Le cuivre est un élément essentiel, ce qui signifie que des faibles quantités s'avèrent nécessaires au maintien des processus biologiques qui garantissent l'activité de la cellule [9]. Il existe des phénomènes de régulation de l'entrée et sortie de cet élément qui, en quantité trop importante, provoque notamment des dommages oxydatifs par la production de ROS (reactive oxygen species) [10]. De plus, l'absence de cuivre se révèle tout aussi délétère sur la croissance cellulaire, car le cuivre est nécessaire pour une fonction optimale de certaines enzymes [9, 11]. Les études décrivant la mort des cellules due à la

présence d'une quantité trop importante de cuivre ont déjà été menées [1, 9, 12-15]. L'intérêt est de déterminer s'il existe un seuil de tolérance pendant lequel la cellule met en jeu des processus métaboliques pour préserver son intégrité et ses fonctions cellulaires, malgré l'augmentation toxique des concentrations de cuivre. Ceci est donc réalisé en incubant des cellules d'algues dans leur phase de croissance, avec du cuivre à des concentrations libres croissantes pendant 48h. Ceci a aussi été réalisé avec des doses supérieures de cuivre, mais l'incubation n'a duré que 2h car les cellules n'auraient pas toléré ce niveau de concentration sur une durée plus longue.

8.2. Matériel et méthodes

La culture des algues et l'exposition au cuivre ont été réalisées par le docteur Séverine Le Faucheur et par Rebecca Beauvais-Flueck (doctorante), dans le département de F.-A Forel des Sciences de l'Environnement et de l'Eau du laboratoire du Professeur Vera Slaveykova. Les analyses par ICP-MS ont été effectuées par le docteur Séverine Le Faucheur.

Produits chimiques

L'acétonitrile et le méthanol sont fournis par VWR, l'acide formique par Merck, et le chloroforme par Sigma-Aldrich. L'eau Ultrapure est produite à l'aide d'un système Milli-Q Integral system de Merck Milipore.

Algues et conditions de culture

Les algues vertes unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard (strain CPCC 11) proviennent du centre de culture physiologique canadien. (CPCC, Département de Biologie de l'Université de Waterloo, ON, Canada). Elles sont cultivées dans des conditions axéniques. Elles sont diluées 4x dans un milieu TAP à pH 7 (TRIS-acétate-phosphate) dont la composition est décrite en annexe, sous des conditions d'illumination constantes à 70 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (tubes blancs fluorescents froids). Une agitation constante est effectuée par un rotor à 100rpm, et la température est maintenue à 20°C. Avant l'exposition des algues aux expériences, celles-ci ont été acclimatées à ces conditions de culture pendant au moins 3 générations.

Milieu expérimental

Exposition à court terme, 2h :

Les expériences à court terme ont été réalisées soit dans un milieu avec une seule concentration de cuivre (0.5 x 10-6 M – mesurée précisément) soit dans un milieu simplifié qui diffère de la composition du milieu utilisé pour l'exposition à long terme [16]. Le milieu expérimental a été préparé en ajoutant du cuivre à partir d'une solution stock diluée de sulfate de cuivre. ($CuSO_4$, 5 H_2O, 0.1 mol/L, Fluka analytical, Suisse).

Exposition à long terme, 48h

Les expositions ont été réalisées avec quatre concentrations différentes de cuivre (concentrations de 1.12 x 10-6 M (control) à 5.9 x 10-9 M (Cu3) – mesurées précisément) (Tableau 5). 24 h avant les expériences d'exposition, le milieu a été préparé par l'addition d'un volume précis de Cu et d'EDTA à partir d'une solution stock de milieu TAP (4x). Les solutions stocks de cuivre ont été préparées en diluant du $CuSO_4$, 5 H_2O dans 0.01 M HNO_3 et Na_2EDTA, 2 H_2O dans de l'eau MiliQ, Fluka analytical, Suisse).
Les calculs spécifiques ont été réalisés avec MINEQL+ [17]. Le jour des expériences, 3 x 10 mL de milieu expérimental ont été collectés et acidifiés a 2% HNO_3 (suprapur, Merck, Darmstadt, Allemagne) afin d'être analysé ultérieurement par ICP-MS (Agilent 7700, Morges, Suisse).

Tableau 5: Concentrations de cuivre (ajouté) et d'EDTA prévues pour les conditions d'exposition. L'EDTA permet de maintenir une quantité de Cu^{2+} libre constant dans le milieu expérimental.

	[Cu] (mol/L)	EDTA (mol/L)
Ctrl 2h	-	-
CuA 2h	5.00×10^{-7}	-
Ctrl 48h	1.57×10^{-6}	3.36×10^{-5}
Cu1 48h	2.15×10^{-5}	5.28×10^{-5}
Cu2 48h	7.15×10^{-5}	1.03×10^{-4}
Cu3 48h	1.00×10^{-4}	1.23×10^{-4}

Echantillons biologiques et cadre d'exposition pour l'étude des métabolites polaires et apolaires

Les algues ont été exposées en triplicas en augmentant la concentration de cuivre dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu expérimental. Les conditions d'illumination sont maintenues constantes à 110 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (tubes blancs fluorescents froids). Une agitation constante est effectuée par un rotor à 100 rpm et la température est maintenue à 20°C (voir en annexe). Les cultures expérimentales ont été inoculées avec une population de départ de densité exacte de 1 x 10^5 cellules/mL (mesurée précisément). Les expositions ont duré 2h et 48h. La densité d'algues après période d'exposition a été mesurée à l'aide d'un instrument BD Accuri C6 Flow Cytometer avec Accuri CSampler et BD Accuri C6 Software 264.15 for l'acquisition et l'analyse des données (BD Biosciences, San Jose, USA). Trois échantillons par condition ont été prélevés pour l'analyse des métabolites par LC-MS (figure 66).

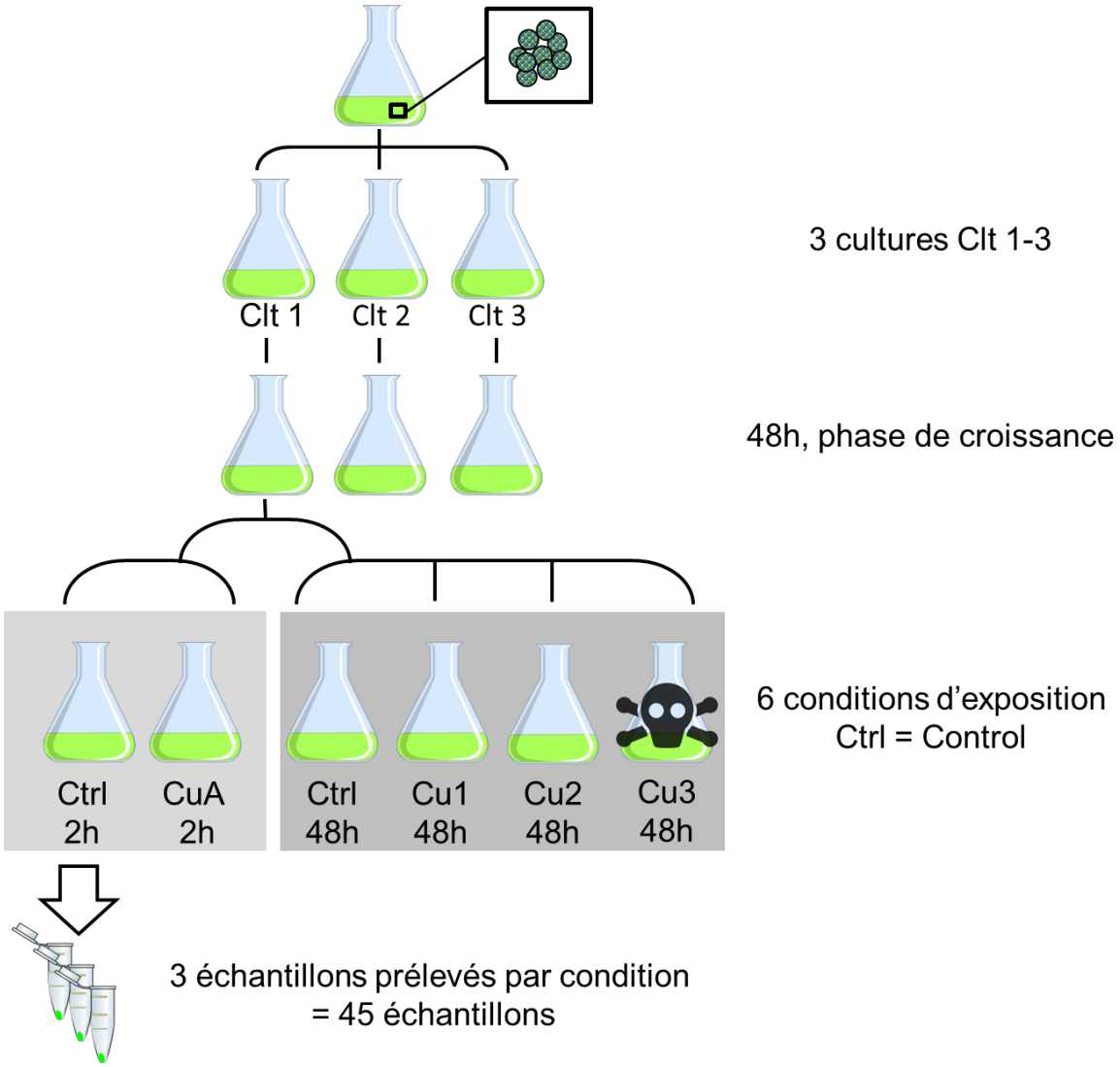


Figure 66: Conditions d'exposition au cuivre des algues. Les deux première étapes (3 cultures Clt1-3 et 48h phase de croissance) comprennent les conditions pré-analytiques afin de conditionner les algues. Chaque culture a ensuite été divisée en 6 pour effectuer les expérimentations (gris clair sur 2 heures et gris foncé sur 3 heures)

Détermination du Cu intracellulaire

Pour la détermination du cuivre intracellulaire, 50 mL d'algues exposées ont été collectés et traités de la façon suivante :

1. Ajout de 4 mL of EDTA 100 mM (concentration finale : 1 mM) for 10 min
2. Centrifugation (10 min; 4000 rpm; 20°C)
2. Surnageant prélevé et ajout de 20 mL de milieu simplifié
3. Centrifugation (5 min; 3000 rpm; 20°C)
4. Surnageant prélevé et ajout de 20 mL de milieu simplifié
5. Centrifuge (5 min; 3000 rpm; 20°C)
6. Surnageant prélevé
7. Ajout de 200 µL of HNO_3 suprapur and chauffage pendant 1 h at 90°C
8. Ajout de 9.8 mL of H_20 pour l'analyse par ICP-MS

Préparation d'échantillons

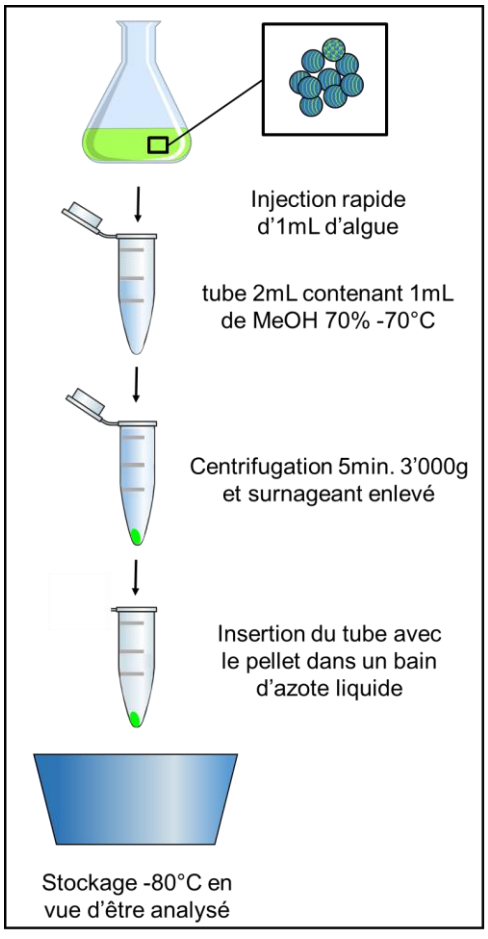


Figure 67: Prélèvement de l'échantillon et prétraitement

1 mL est injecté directement dans un tube de 2 mL contenant du méthanol froid (70% -70°C). afin de stopper rapidement l'activité métabolique. Le tube est ensuite centrifugé

pendant 5 min à 3'000 g et le surnageant est enlevé. Le tube contenant le pellet d'algues est ensuite inséré dans un bain d'azote liquide et stocké à -80°C en vue d'être analysé dans un second temps.

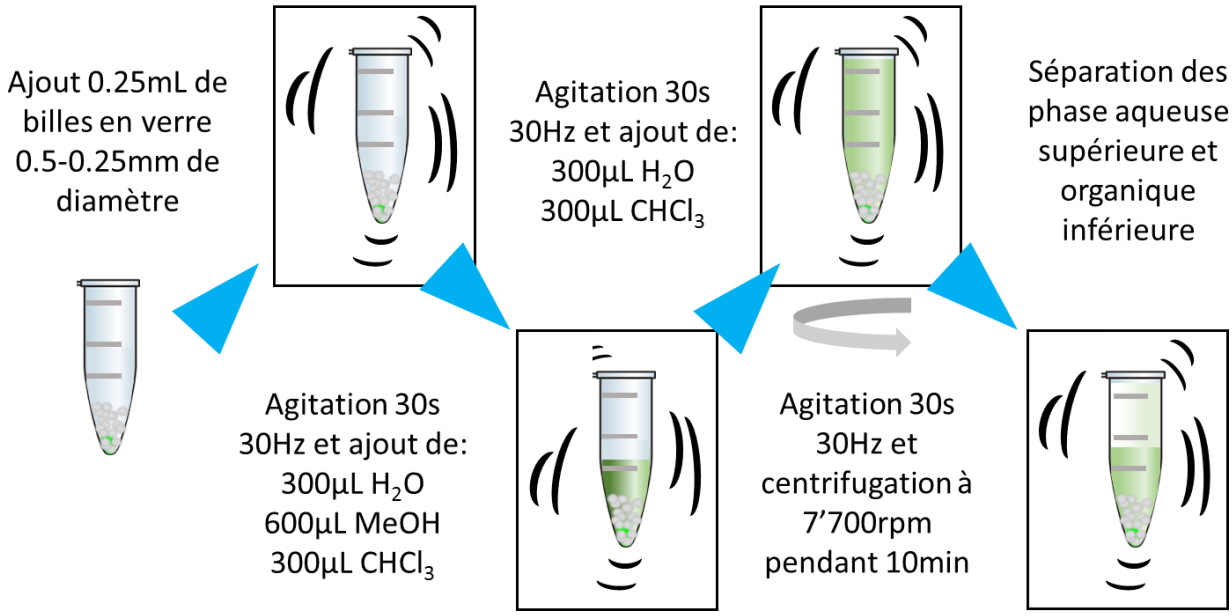


Figure 68: Préparation d'échantillon

0.25 mL de billes en verre d'un diamètre de 0.5-0.25 mm sont ajoutés directement dans le tube contenant le pellet d'algues. Le tube est ensuite agité pendant 30 secondes à 30 Hz afin de lyser les cellules d'algues. 300 µL d'H_2O, 300 µL de $CHCl_3$ ainsi que 600 uL de MeOH sont ajoutés, ceci suivi d'une étape d'agitation. Ensuite, 300 µL d'H_2O et de $CHCl_3$ sont ajoutés dans le tube, et celui-ci est agité. L'acide cholique d5 et l'adénosine $^{13}C_5$ sont présents dans le méthanol à raison de 5 µg/mL. Enfin, les phases sont séparées à 7'700 rpm, à l'aide d'une centrifugeuse thermostatée à 4°C. 1 mL de la phase aqueuse supérieure est prélevé, puis 400 µL de la phase inférieure organique. Les phases sont évaporées dans une centrifugeuse à vide.

Les extraits sont ensuite reconstitués dans 50 µL avec un mélange MeOH ; H_2O (2 ;8) contenant 6 standards internes chromatographiques : GABA d_6 tryptophane d_4 acide succinique d_4, Acetaminophen, verapamil, diclofenac.

Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique à ultra haute performance est réalisée sur un système dual UHPLC UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Germany) configuré avec deux pompes binaires à gradient à haute pression. La condition acide contient une phase

mobile A : 5 mM ammonium formate tamponné à un pH 3 avec de l'acide formique et B : MeOH. La condition basique est pour A : 5 mM ammonium acétate et tamponné à pH 8.0 avec de l'hydroxyde d'ammonium et B : MeOH. La phase mobile B est de 0% la première minute, puis augmente jusqu'à atteindre 100% en 20 minutes, cette valeur est maintenue pendant 3 minutes, puis est suivie par le retour aux conditions de départ en 0.1 minute. Pendant cette période, la seconde colonne est équilibrée aux conditions initiales, ce qui représente un gain de temps et une meilleure stabilité des conditions de départ. Les colonnes utilisées proviennent de Waters, T3 Xselect HSS XP, C_{18}, 5µm, 2.1 mm x 150 mm avec une colonne de garde SecurityGuard (Phenomenex, Torrance, CA) et un filtre approprié de catégorie C_{18}. Le débit est de 300 µL/min, les échantillons sont gardés à 6°C dans l'autosampler, et les colonnes sont thermostatées à 40°C.

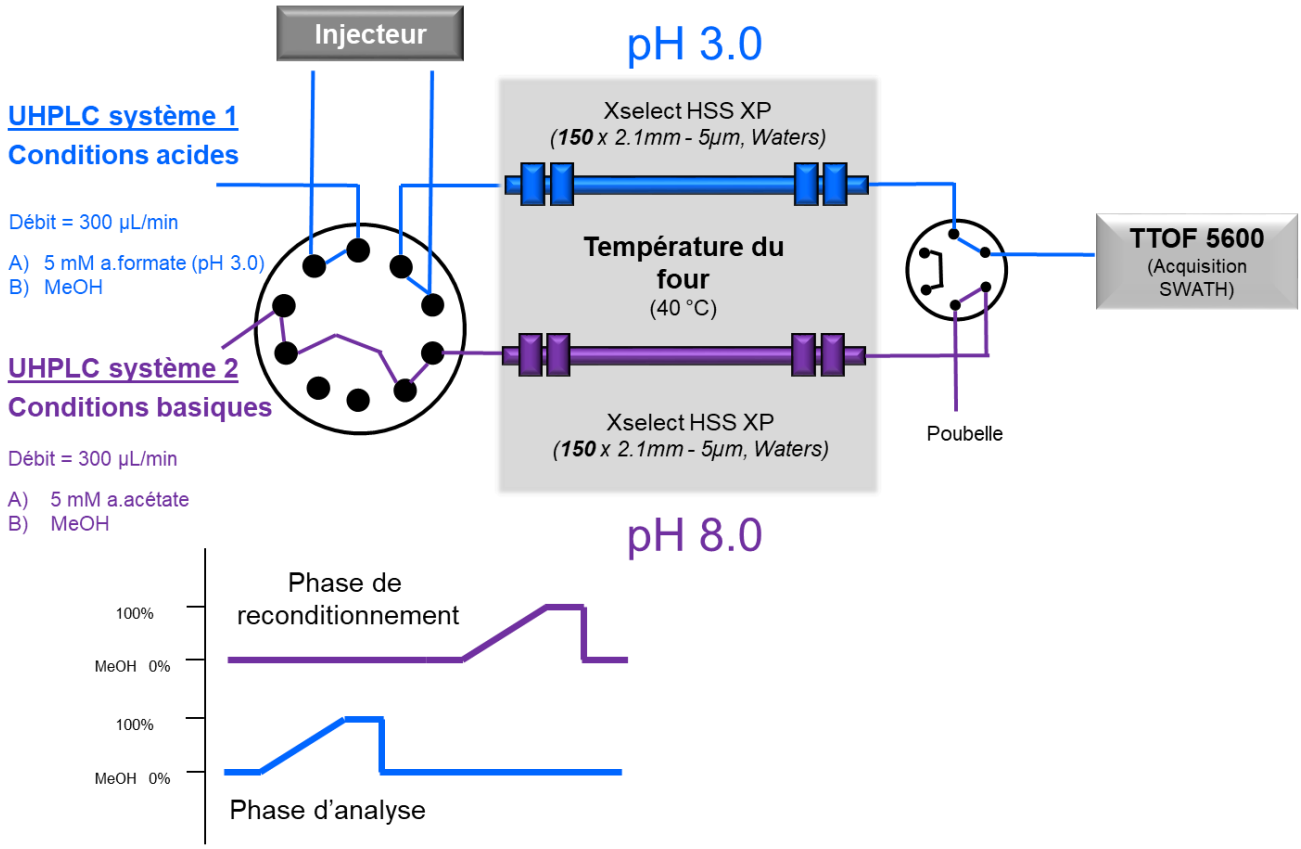


Figure 69: Système chromatographique travaillant en mode dual avec deux systèmes de pompes connectées via des systèmes multiports permettant d'injecter les échantillons sur les deux systèmes avec un temps de reconditionnement optimal entre deux injections

Paramètres de spectrométrie de masse

Un TTOF 5600 produit par ABSciex (Concord, CA) est opéré suivant deux types d'expériences. Tout d'abord une analyse TOF-MS sur un rang de masse de *m/z* 80-800 est effectuée pendant 50 ms, suivie par 24 expériences SWATH de 30 unités chacune, en partant de 80 *m/z* à 800 *m/z,* avec un temps d'accumulation de 50 ms. Les ions produits sont détectés à partir de 50 *m/z* à 800 *m/z*. Le temps de cycle est de 1.3 s.

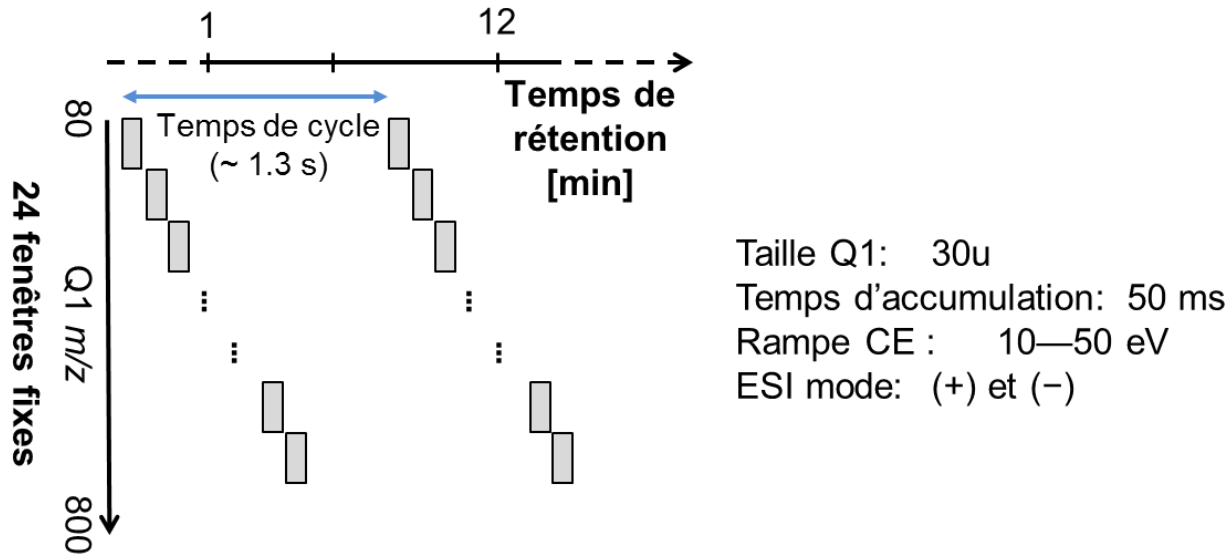


Figure 70: Paramètres liés à la spectrométrie de masse

La source est de type électrospray et les paramètres sont : GS1 50psi, GS2 50psi, curtain plate 25psi. Les paramètres de source sont : 500°C 5200V et -4800V pour le mode négatif. Le spectromètre est calibré automatiquement tous les 3 échantillons en MS et MS/MS. Le spectromètre de masse est contrôlé via le logiciel Analyst 1.7 TF.

Traitement des données

Les données sont traitées à l'aide des logiciels ABSciex, Concord (CA). Le logiciel PeakView permet de visualiser les spectres, de faire l'extraction des masses, et est lié à l'utilisation de MasterView pour la recherche dans la librairie. La libraire de haute qualité développée en interne est intégrée au logiciel LibraryView. Le logiciel MultiQuant permet l'extraction des transitions, et donc l'obtention des aires sous les pics pour une analyse quantitative. Enfin, les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel MarkerView. Pour plus de clarté dans la présentation des résultats, la séquence a été divisée en deux parties.

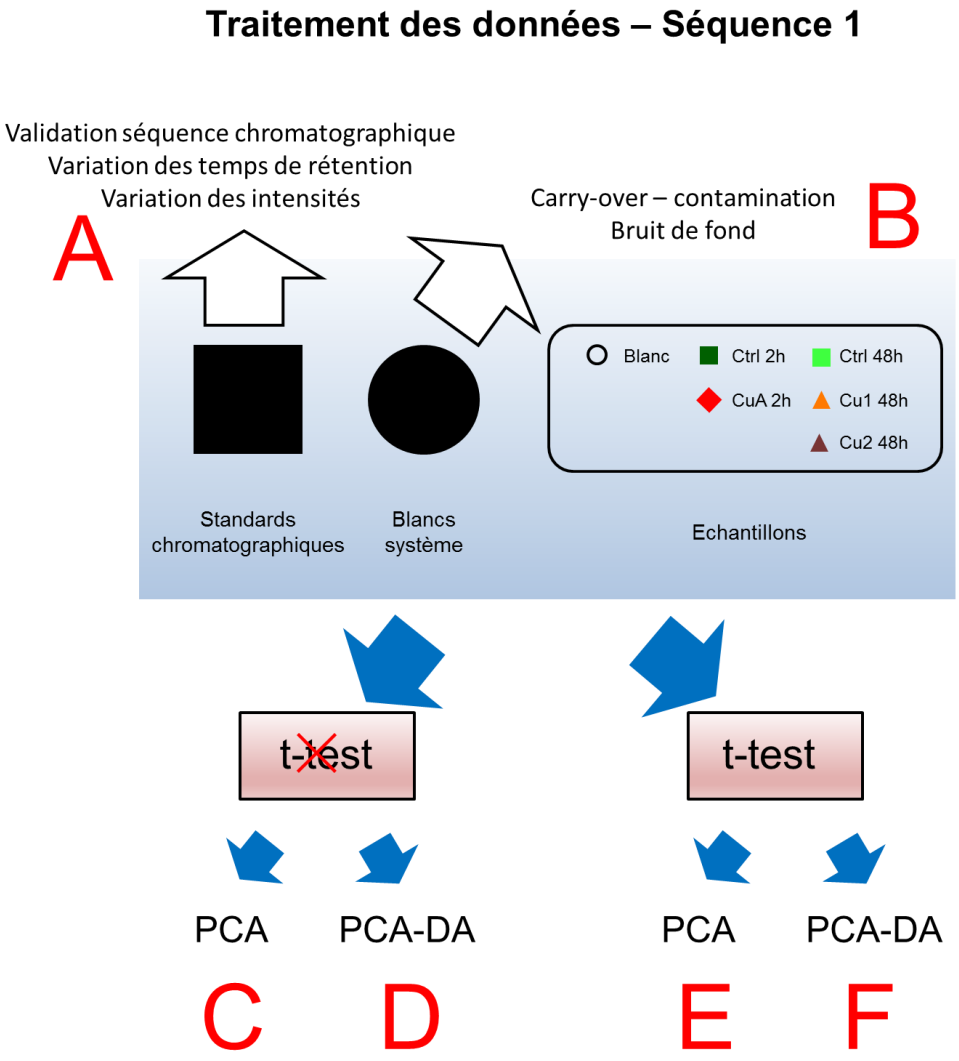


Figure 71: Séquence 1 de la procédure du traitement des données

Les données sont d'abord traitées dans leur ensemble. La séquence 1 reprend donc l'ensemble des données obtenues tout au long de la séquence analytique. Ce modèle est repris pour les 4 conditions analytiques, à savoir : la séquence chromatographique acide et basique en mode positif, ainsi que la séquence basique en mode positif et négatif. Pour des raisons pratiques et techniques, une première séquence en mode positif, alternant le mode acide et basique, est effectuée (voir conditions chromatographiques) suivie par une séquence en mode négatif. En effet, le système ne permet pas l'analyse des deux modes en parallèle, et la calibration prendrait trop de temps sur la séquence analytique, si le système devait à chaque fois purger, rééquilibrer la source, et calibrer dans le mode opposé (particularité de la calibration externe des systèmes ABSciex).

La première étape A consiste à valider la séquence chromatographique, à déterminer la variation des temps de rétention et d'intensité, à l'aide des standards chromatographiques qui ont été insérés au début, pendant et à la fin de la séquence. Ce standard chromatographique est un même et seul vial qui est injecté à chaque fois.

L'étape B, par l'analyse des blancs (H_2O ;MeOH, 8 ;2) permet de mettre en évidence la présence éventuelle d'intéreférents, et donc un carry-over, ainsi que le bruit de fond engendré par les phases mobiles et le système chromatographique. L'insertion de séquences, blanc/SI chromato/blanc, tout au long de la procédure analytique, permet aussi de diminuer la présence de carry-over, et donc l'impact sur le traitement statistique.
Les étapes C et D ne comportent pas de traitement préalable des données par un t-test, et celles-ci sont analysées respectivement en analyse non-supervisée et supervisée par analyse discriminatoire.

Les étapes E et F contiennent une étape supplémentaire par l'application d'un t-test. Les données des standards chromatographiques sont utilisées pour le t-test (4 premiers et 4 derniers échantillons de la séquence) afin de supprimer les variables ayant une valeur $p < 0.05$, et donc différentes entre le premier et dernier groupe des standards internes de la séquence. Une valeur de $p<0.05$ implique que les hypothèses sont différentes, alors que c'est le même échantillon. Ces variables ne répondent pas au critère que les échantillons sont similaires. Celles-ci sont supprimées. Elles proviennent de la présence d'interférents du système pendant la séquence chromatographique et peuvent représenter un biais lors d'analyses statistiques. Les échantillons ont toutefois été analysés de façon randomisée, et l'ordre est différent entre le mode positif et négatif, ce qui devrait diminuer l'apparition de biais.

Les étapes C à F permettent d'observer la répartition et la séparation des groupes. La comparaison entre CD et EF va indiquer si l'utilisation d'un t-test représente une différence dans l'explication du modèle.

Le traitement des données selon séquence 2 est illustré sur la figure suivante.

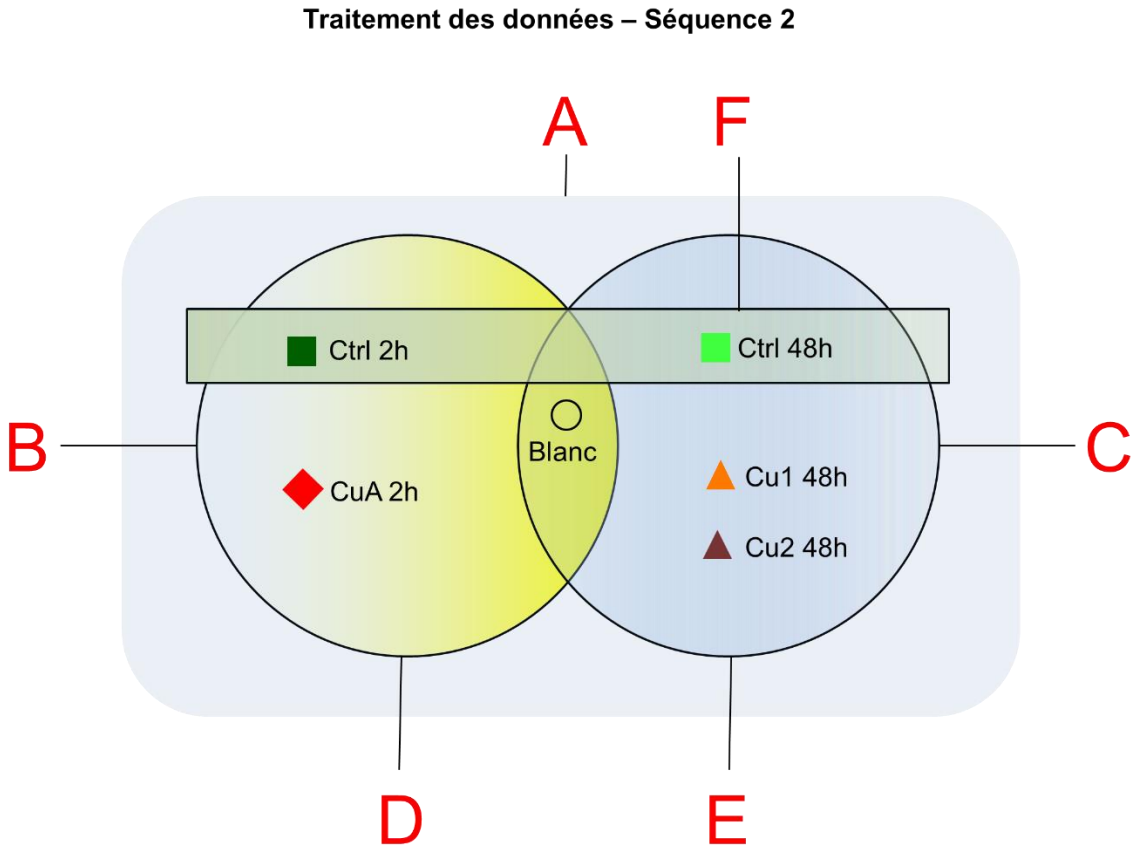


Figure 72: Séquence 2 de la procédure de traitement des données

La séquence 2 s'intéresse plus particulièrement aux échantillons et aux marqueurs ou métabolites obtenus selon l'hypothèse biologique appliquée. Toutes les étapes sont analysées par PCA et PCA-DA, un chiffre suit la lettre correspondant à l'étape selon la séquence illustrée ci-dessus dans la nomenclature ultérieure des figures (par exemple D.1, D.2).

L'étape A analyse les échantillons dans leur ensemble. Les échantillons blancs sont des blancs dits techniques car ils ont suivi toute la procédure de préparation d'échantillons. Il n'y a pas de blancs biologiques comprenant le milieu de culture dans lequel les algues ont été cultivées (milieu TAP). Cette étape détermine quelles variables appartiennent aux algues et quelles variables sont présentes dans les blancs et sont donc des contaminants. Cette étape permet aussi une première visualisation de l'ensemble des données ainsi que de la similarité, ou non, des groupes de variables.

L'étape B correspond au set de données comprenant l'exposition au cuivre pendant 2 heures, et les blancs. Il permet de déterminer à quel point les échantillons blancs sont séparés des échantillons biologiques.

L'étape C répond au même processus que l'étape B, mais sur les échantillons pour lesquels l'exposition au cuivre a été menée pendant 48 heures.

L'étape D s'intéresse aux variables et donc aux métabolites qui sont différents selon la concentration de cuivre. Cette étape est la plus importante du point de vue de la recherche de molécules présentant une variation suivant la concentration de cuivre libre dans le milieu de culture des algues.

L'étape E est similaire à l'étape D mais pour une durée plus longue (48 heures). L'avantage de ce design d'expérience est la présence de deux concentrations pour lesquelles le cuivre est augmenté. Ceci permet de déterminer une évolution dans l'expression des métabolites.

Enfin, l'étape F compare les différents contrôles qui sont utilisés pour cette étude. Ceux-ci devraient être similaires : outre le temps supplémentaire, il n'y a pas de modifications qui ont été opérées pour ces échantillons.

Procédure pour l'extraction des pics « peak-picking » et inclusion en tant que variables

Les pics sont tout d'abord extraits de toutes les expériences, avec un temps de rétention minimum de 1min par le logiciel MarkerView. Une liste de pics est donc obtenue après ce traitement, et importée dans le logiciel. Une étape d'alignement et de filtre est effectuée selon une tolérance de masse et de temps de rétention. Ces paramètres sont très importants, car une tolérance de masse trop petite définira deux pics comme étant des variables différentes, si cette valeur est supérieure à la valeur établie. Elle ne peut en outre pas être trop élevée, car deux pics appartenant à des molécules différentes pourraient être assimilés à un seul pic, et être le résultat d'une perte d'information. Il en est de même avec le temps de rétention. La variabilité de celui-ci dépend de la stabilité et de la reproductibilité du système.

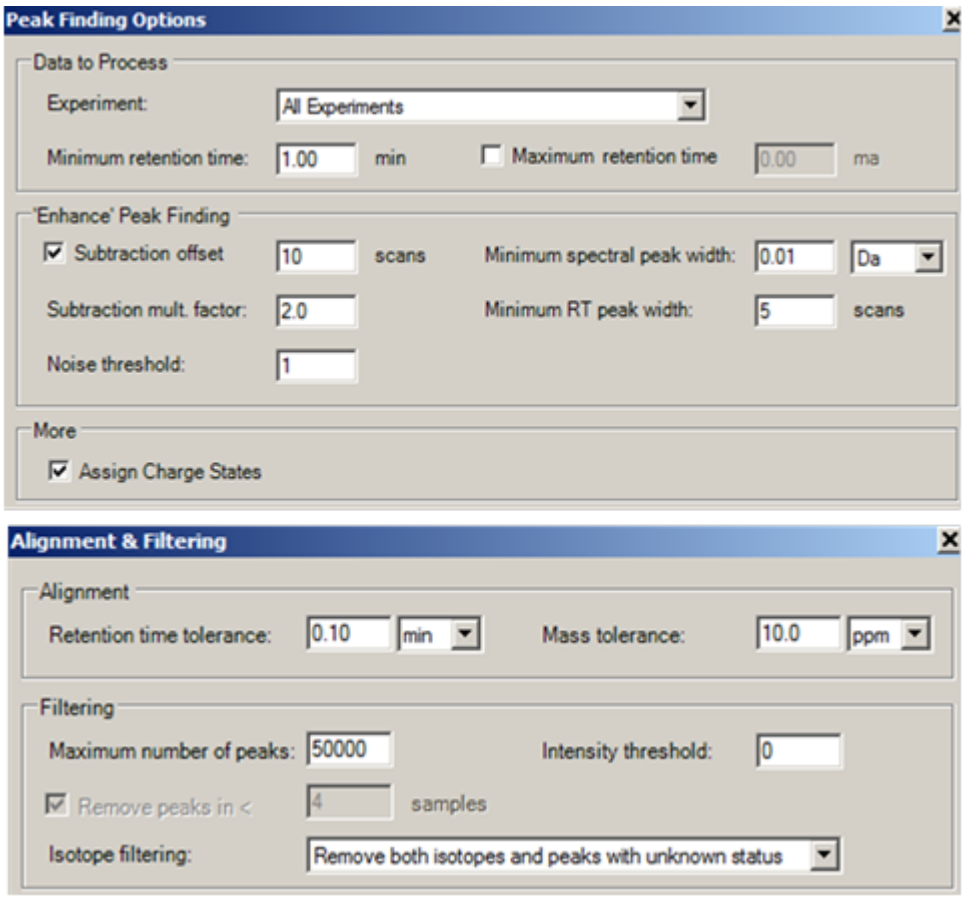


Figure 73: Paramètres utilisés pour l'extraction et l'alignement des pics

Paramètres utilisés pour l'analyse en composantes principales en condition supervisée et non-supervisée

L'analyse en composante principale est appliquée sans réaliser une pondération, et selon une mise à l'échelle selon la loi de Pareto (voir figure 74)

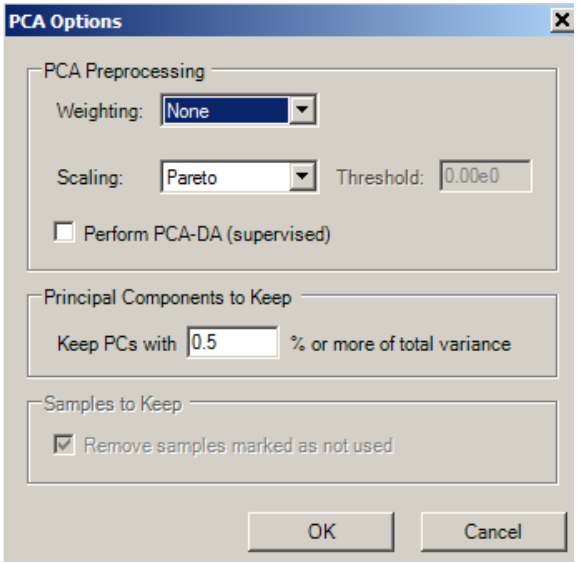


Figure 74: Options pour la PCA du logiciel MarkerView

L'analyse en composante principale par groupement de variables (PCVG) est effectuée selon les paramètres illustrés sur la figure suivante.

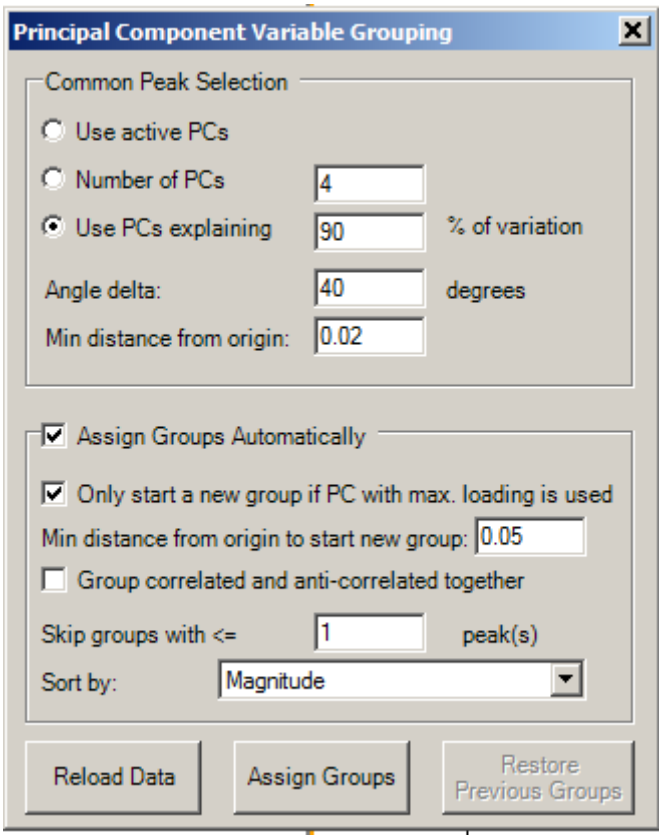


Figure 75: Option de la PCVG du logiciel MarkerView

Paramètres utilisés pour l'identification des métabolites par le logiciel MasterView

Le logiciel MasterView dans PeakView permet la recherche de métabolites ou, selon les paramètres utilisés, la recherche de composés présents dans une librairie de référence.

Les paramètres sont décrits dans la figure 76 (calculs) 77 (recherche librairie) et 78 (Paramètres de confiance).

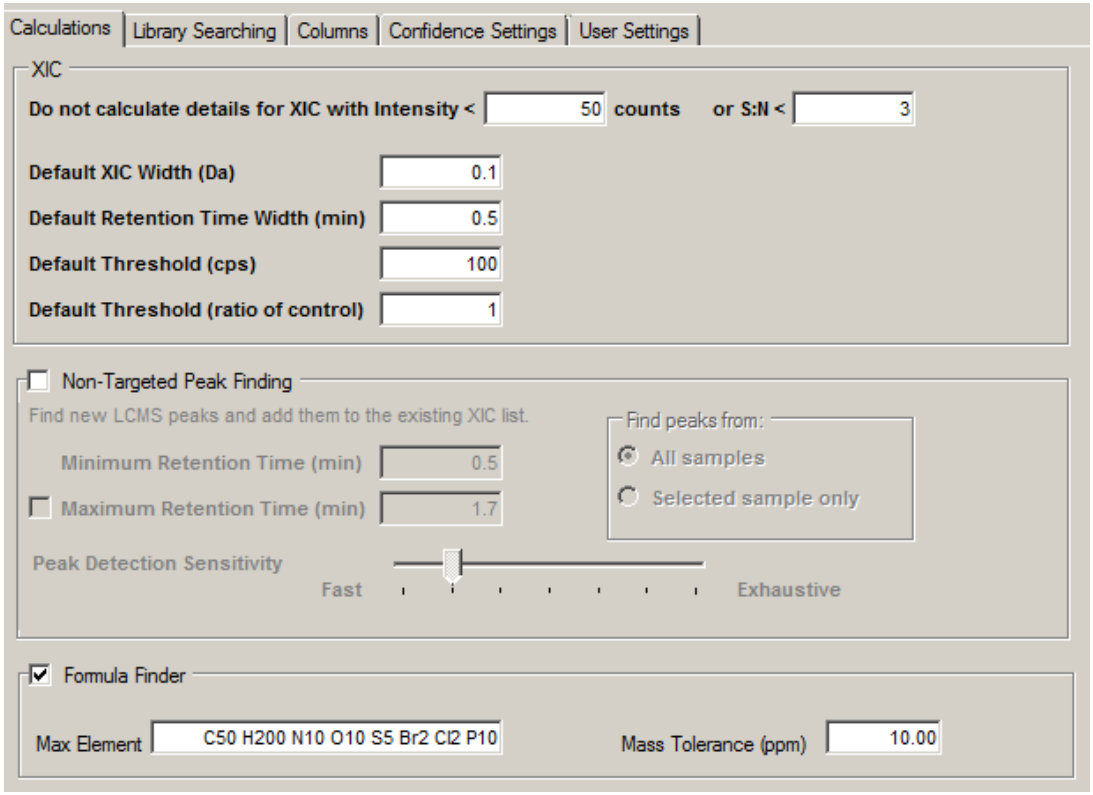


Figure 76: Paramètres utilisés du logiciel MasterView - Calculs

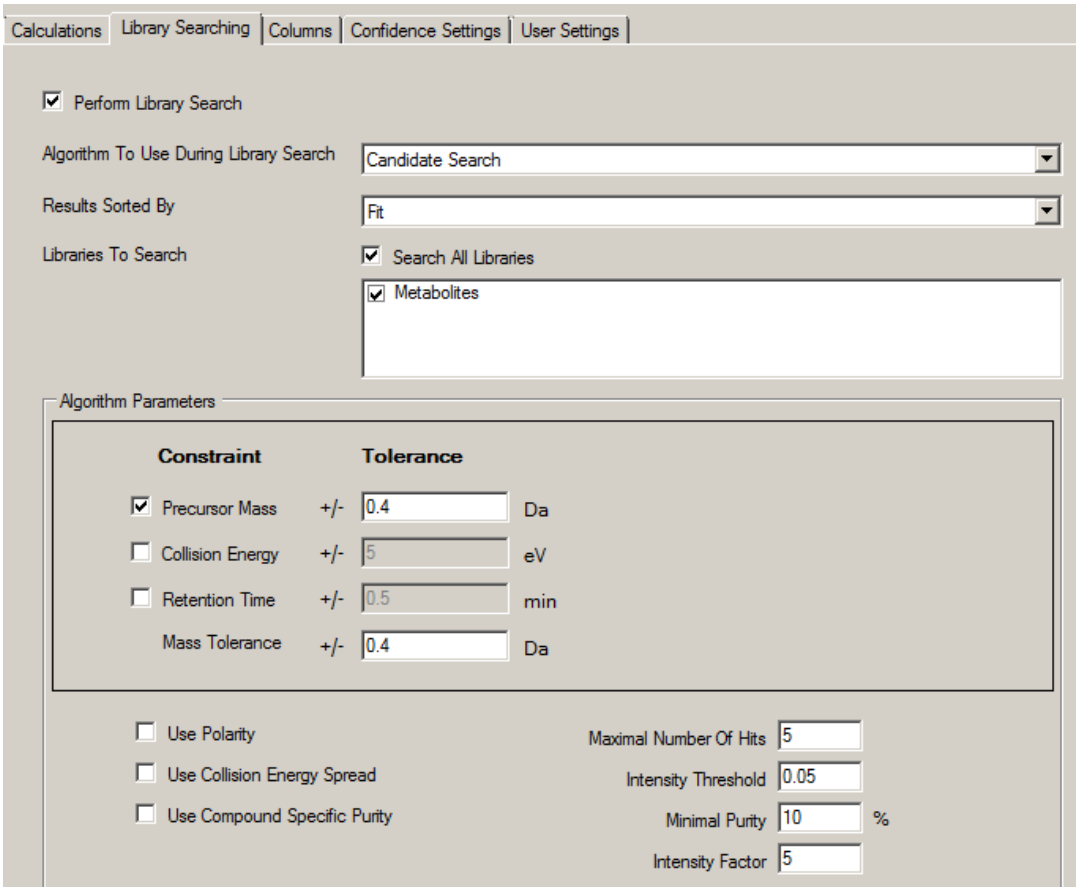


Figure 77: Paramètres utilisés du logiciel MasterView – Recherche librairie

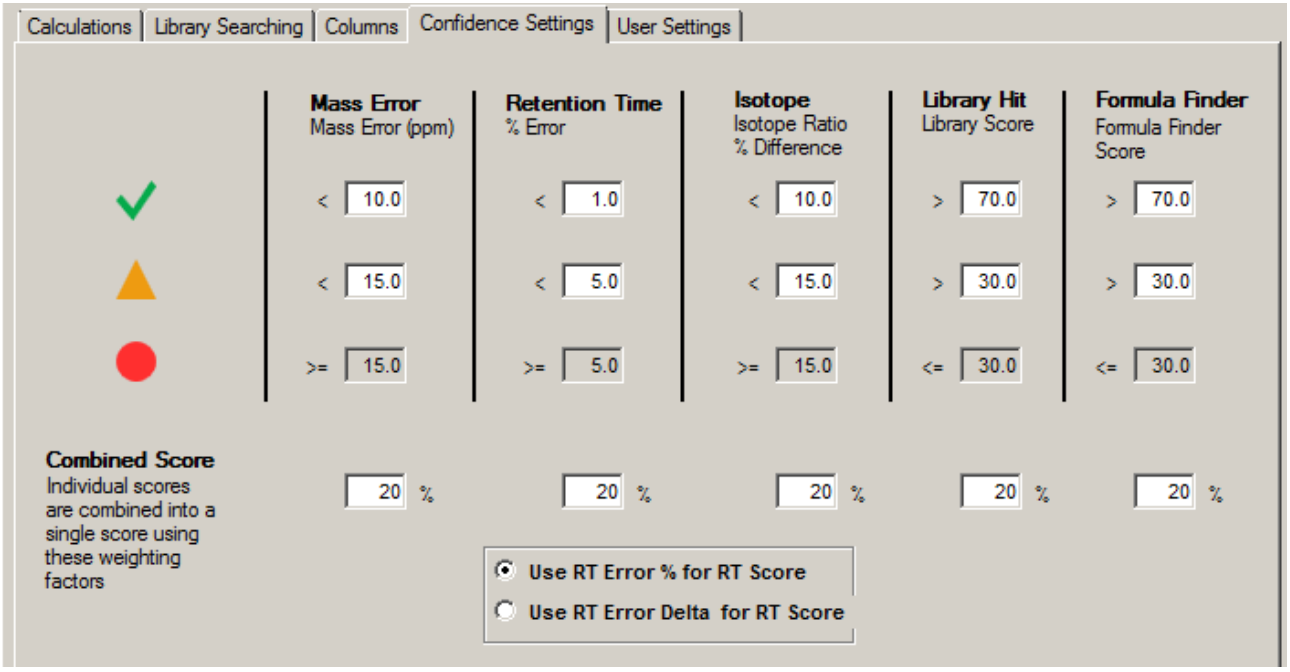


Figure 78: Paramètres utilisés du logiciel MasterView – Paramètres de confiance

8.3. Résultats et discussion

Le tableau 6 ci-dessous résume les concentrations attendues et mesurées de cuivre dans le milieu expérimental avant exposition des algues.

Tableau 6: Résultats des concentrations de cuivre mesurées dans le milieu expérimental avant exposition au cuivre

	[Cu] (mol/L) attendu	[Cu] (mol/L) mesuré (n=3)	[Cu2+] (mol/L) calculé
Ctrl 2h	-	$(0.15 +/- 0.02) \times 10^{-6}$	7.3×10^{-8}
CuA 2h	5.00×10^{-7}	$(0.50 +/- 0.01) \times 10^{-6}$	2.4×10^{-7}
Ctrl 48h	1.57×10^{-6}	$(1.12 +/- 0.01) \times 10^{-6}$	8.3×10^{-11}
Cu1 48h	2.15×10^{-5}	$(3.29 +/- 0.03) \times 10^{-5}$	6.2×10^{-10}
Cu2 48h	7.15×10^{-5}	$(7.50 +/- 0.03) \times 10^{-5}$	1.21×10^{-8}
Cu3 48h	1.00×10^{-4}	$(1.04 +/- 0.02) \times 10^{-4}$	

Les concentrations de cuivre mesurées dans le milieu expérimental sont similaires aux concentrations attendues à l'exception du Cu1 48h, pour lequel le niveau mesuré était supérieur. A partir des valeurs mesurées il est possible de calculer les concentrations de cuivre libre, qui se situent dans une gamme allant de $8.3\ 10^{-11}$ M à $2.4\ 10^{-7}$ M.

Tableau 7: Densité cellulaire après exposition au cuivre pendant 2h et 48h

Densité de cellules après exposition [cells/mL]					
Culture n°	Ctrl 2h	CuA 2h	Ctrl 48h	Cu1 48h	Cu2 48h
1	1.81E+06	1.42E+06	3.32E+06	2.72E+06	4.62E+05
2	1.42E+06	1.99E+06	3.33E+06	3.16E+06	4.47E+05
3	1.42E+06	2.00E+06	3.33E+06	2.68E+06	7.67E+05
Moyenne	1.55E+06	1.80E+06	3.33E+06	2.85E+06	5.58E+05

La croissance cellulaire n'est pas perturbée en ce qui concerne les expositions à court terme (tableau 7). Cette croissance est cependant particulièrement altérée avec l'augmentation croissante du cuivre menant jusqu'à la mort des cellules exposées à la concentration la plus élevée de cuivre (Cu3). L'inhibition est de 4.5% pour le Cu1 et de 52% pour le Cu2 (tableau 8).

Tableau 8: Croissance et inhibition

Facteur de croissance et pourcentage d'inhibition de croissance de *C. reihnardtii* exposée au cuivre			
Exposition	Moyenne [h^{-1}]	Ecart-type	% inhibition
Ctrl 48h	0.073	0.001	-
Cu1 48h	0.069	0.002	4.5 ± 0.1
Cu3 48h	0.035	0.006	52.2 ± 0.1
Cu2 48h	-	-	-

La concentration du cuivre intracellulaire a été mesurée par ICP-MS. Cette valeur double lorsque les algues sont exposées pendant 2h en passant d'une concentration de cuivre libre de 7.3 10^{-8} à 2.4 10^{-7}, soit environ trois fois plus concentrée (tableau 9). En ce qui concerne l'exposition de 48h, la concentration intracellulaire est corrélée à l'augmentation de la concentration de cuivre libre dans le milieu extracellulaire. Ces valeurs indiquent que le cuivre est accumulé dans la cellule d'algue et que la croissance est diminuée lors de l'augmentation du cuivre. Les algues se trouvent dans un état intermédiaire entre une croissance dans des conditions standards et une croissance dans des conditions toxiques (mort cellulaire). Cet état intermédiaire est le but recherché pour l'étude métabolomique, car ce sont les processus métaboliques qui interviennent dans les conditions étudiées.

Tableau 9: Concentrations intracellulaires après exposition au cuivre

Concentration de Cu intracellulaire contenu dans *C. reinhartdii* exposé au cuivre		
Exposition	Moyenne [amol/cell]	Ecart-type
Ctrl 2h	41	5
CuA 2h	81	12
Ctrl 48h	32	1
Cu1 48h	81	11
Cu2 48h	993	346

Analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide

Les résultats sont tout d'abord analysés dans leur ensemble et les figures suivantes (figure 79 et 80) présentent les résultats obtenus selon le groupe d'échantillons allant de la complexité la plus faible à la complexité la plus grande. Malgré la vision d'ensemble réductrice, plusieurs zones sont d'un intérêt particulier pour cette étude, notamment au tout début du gradient chromatographique, aux alentours de 1.5 minutes, vers 6 minutes ainsi qu'à la fin du gradient vers 16 minutes. La heat map est une coupe transversale de la figure précédente. Une zone particulièrement intense est à noter pour la concentration de cuivre 2 (Cu2) très proche du temps mort du système chromatographique (1.3 minutes). Les molécules se trouvant dans cette zone sont peu ou pas retenues, et un effet de compétition d'ionisation peut survenir.

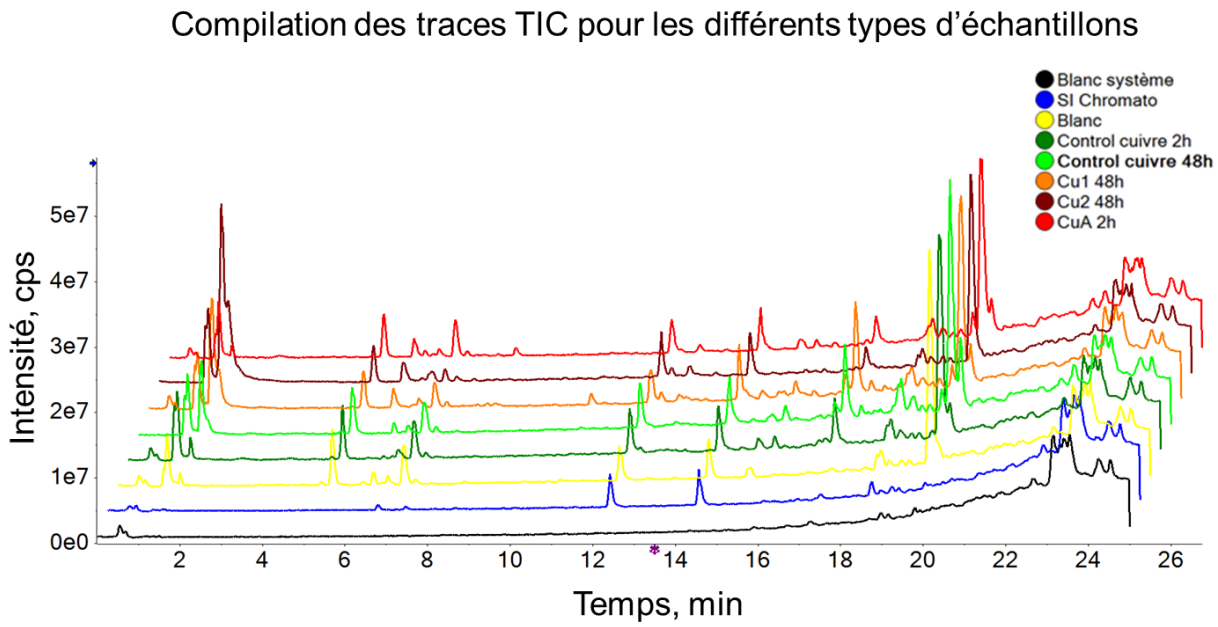


Figure 79: Chromatogramme total des ions (TIC), traces des échantillons analysés en mode positif et dans des conditions chromatographiques acides

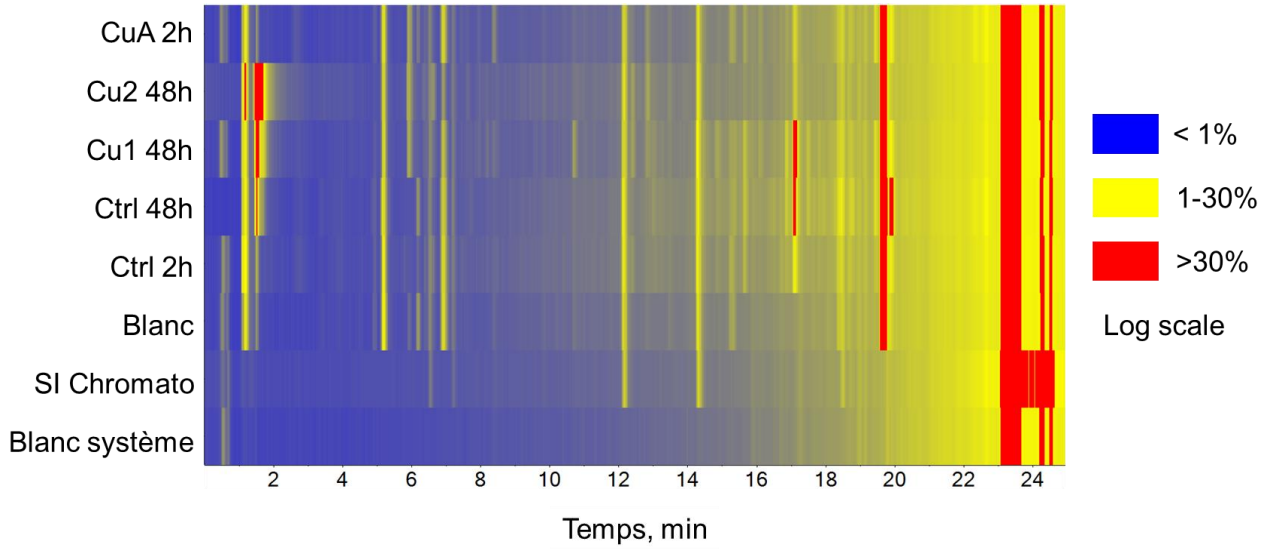


Figure 80: Heat map des traces chromatographiques (TIC) des différents types d'échantillons analysés en mode positif et dans des conditions chromatographiques acides

Séquence 1, analyses statistiques globales

La séquence 1 s'intéresse à la globalité des résultats et à la fiabilité de ceux-ci par rapport aux différents moyens mis en place tout au long de la procédure analytique (standards internes, randomisation de la séquence analytique, standards chromatographiques, blancs systèmes)

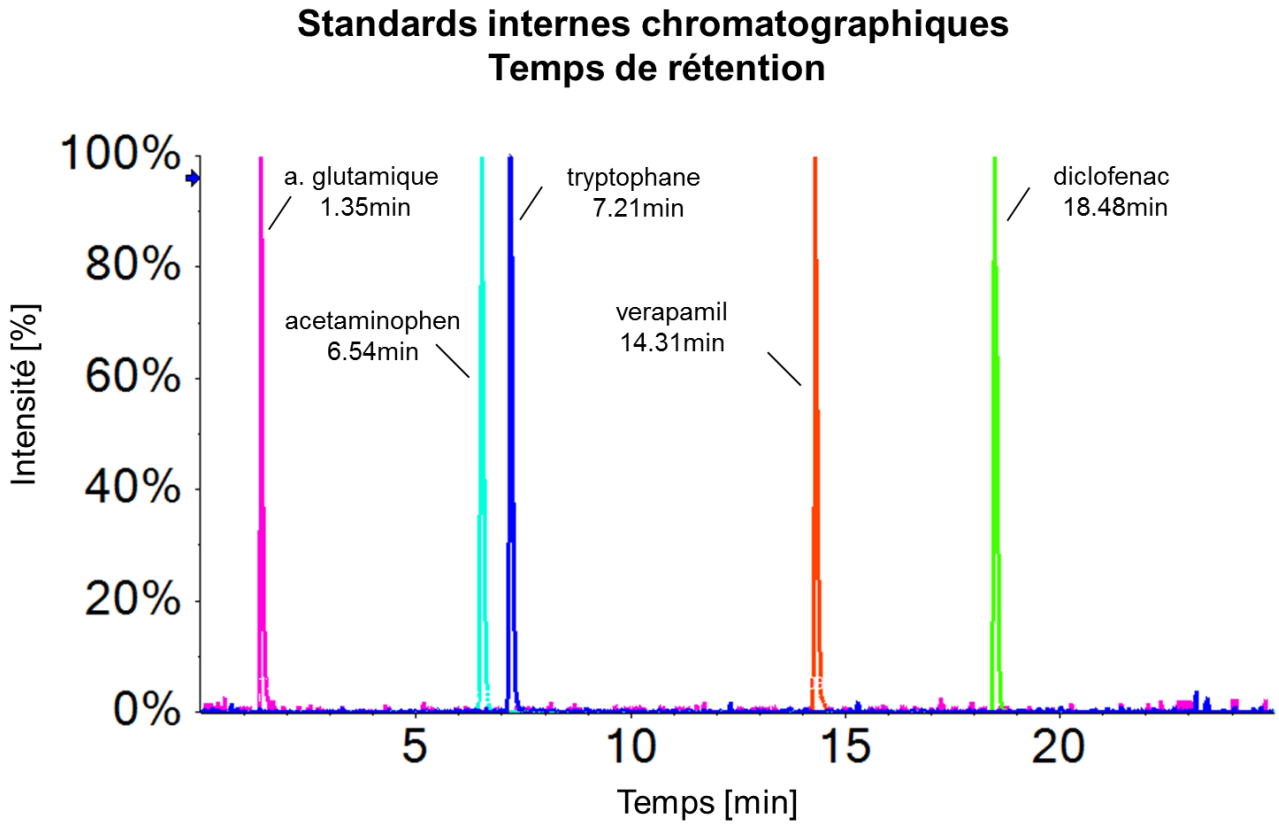


Figure 81: Chromatogramme des standards internes corrigés à 100% de l'intensité maximale

Les standards internes utilisés sont choisis de façon à être répartis tout au long de la séquence chromatographique. Ce sont des composés soit exogènes et non présents dans le milieu de culture reproduit en laboratoire, soit des composés marqués. L'acétaminophen, le vérapamil et le diclofénac sont des composés pharmaceutiques. Le tryptophane et l'acide glutamique sont des métabolites endogènes avec des composés marqués. Ils doivent présenter une différence de masse suffisamment grande pour ne pas masquer les isotopes des métabolites endogènes (min 3 unités supplémentaire) si une correction d'ionisation par ces standards était envisagée.

Le groupe A représente l'étude des standards chromatographiques qui permettent de garantir la stabilité du système analytique. Pour ce faire, différents éléments sont pris en compte.

Tout d'abord, la rétention ne doit pas être modifiée durant la séquence, sachant que la séquence analytique pour le mode positif représente plus de 48 heures de mesure, il est essentiel de s'intéresser aux variations des temps de rétention des standards chromatographiques. Ceux-ci sont présents dans la phase de reconditionnement des échantillons. La phase de reconstitution pure est aussi injectée entre un set d'analyse d'échantillons (échantillons - blanc - SI chromato - blanc - échantillons). La figure 82, graphique 1 illustre l'erreur du temps de rétention observée tout au long de la séquence analytique. Elle permet de situer l'erreur à ± 1.8 secondes (0.03 minutes).

Le graphique 2 de la figure 82 s'intéresse à l'évolution de l'erreur *m/z*. Une variation pourrait provenir d'une mauvaise calibration de l'instrument ou d'un problème technique rencontré pendant la séquence analytique. La variation du temps de rétention, ainsi que de l'erreur *m/z*, sont des paramètres qui seront utilisés par la suite pour l'extraction des variables par le logiciel MarkerView. C'est pourquoi il est essentiel de connaître ces valeurs.

La résolution de masse est inchangée (graphique 3) à travers la séquence analytique, cependant la hauteur du pic ainsi que son aire sous la courbe sont en augmentation (graphique 4 et 5).

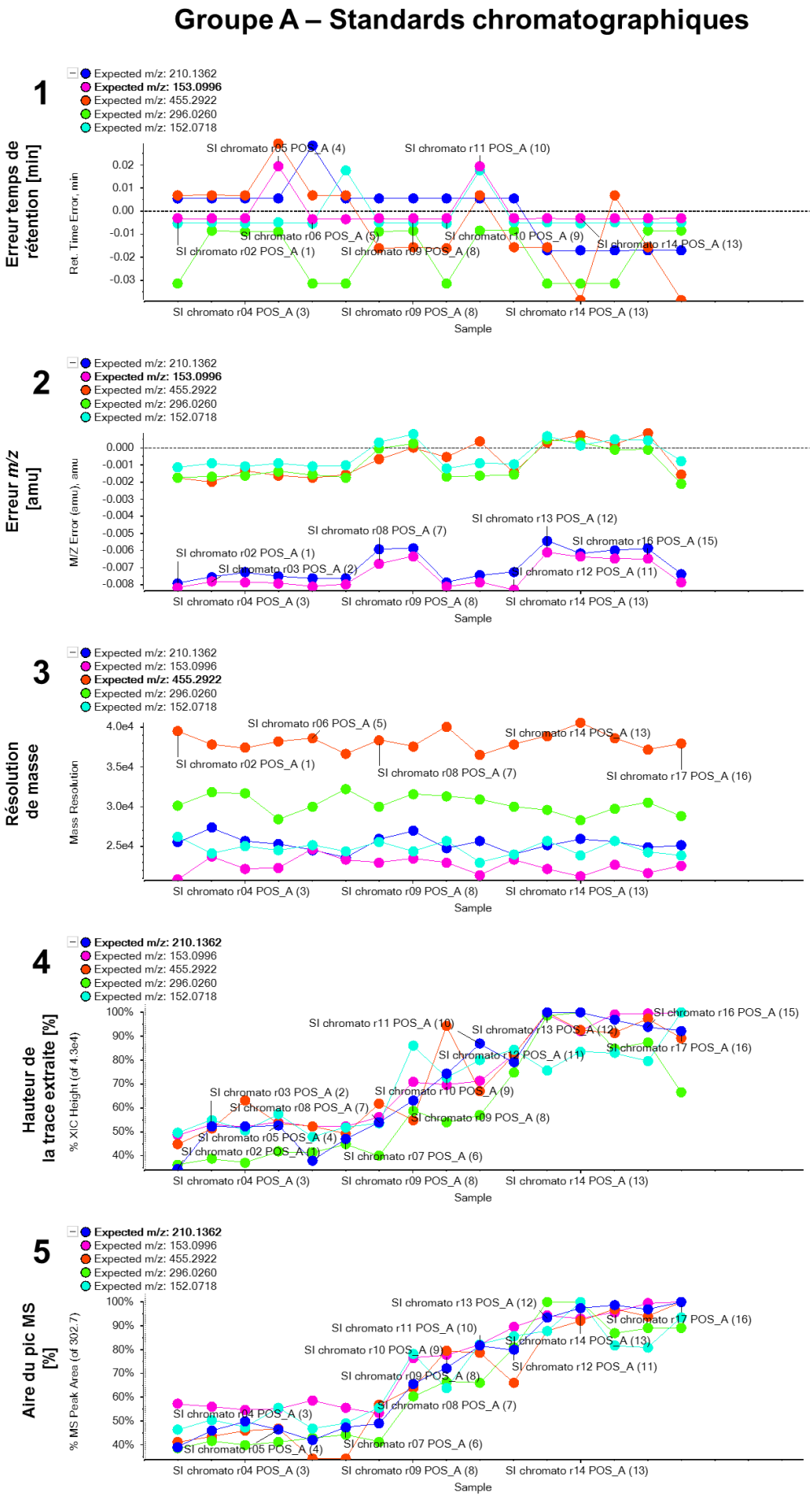


Figure 82: Groupe A représentant les paramètres statistiques à prendre en compte lors de l'utilisation de standards chromatographiques

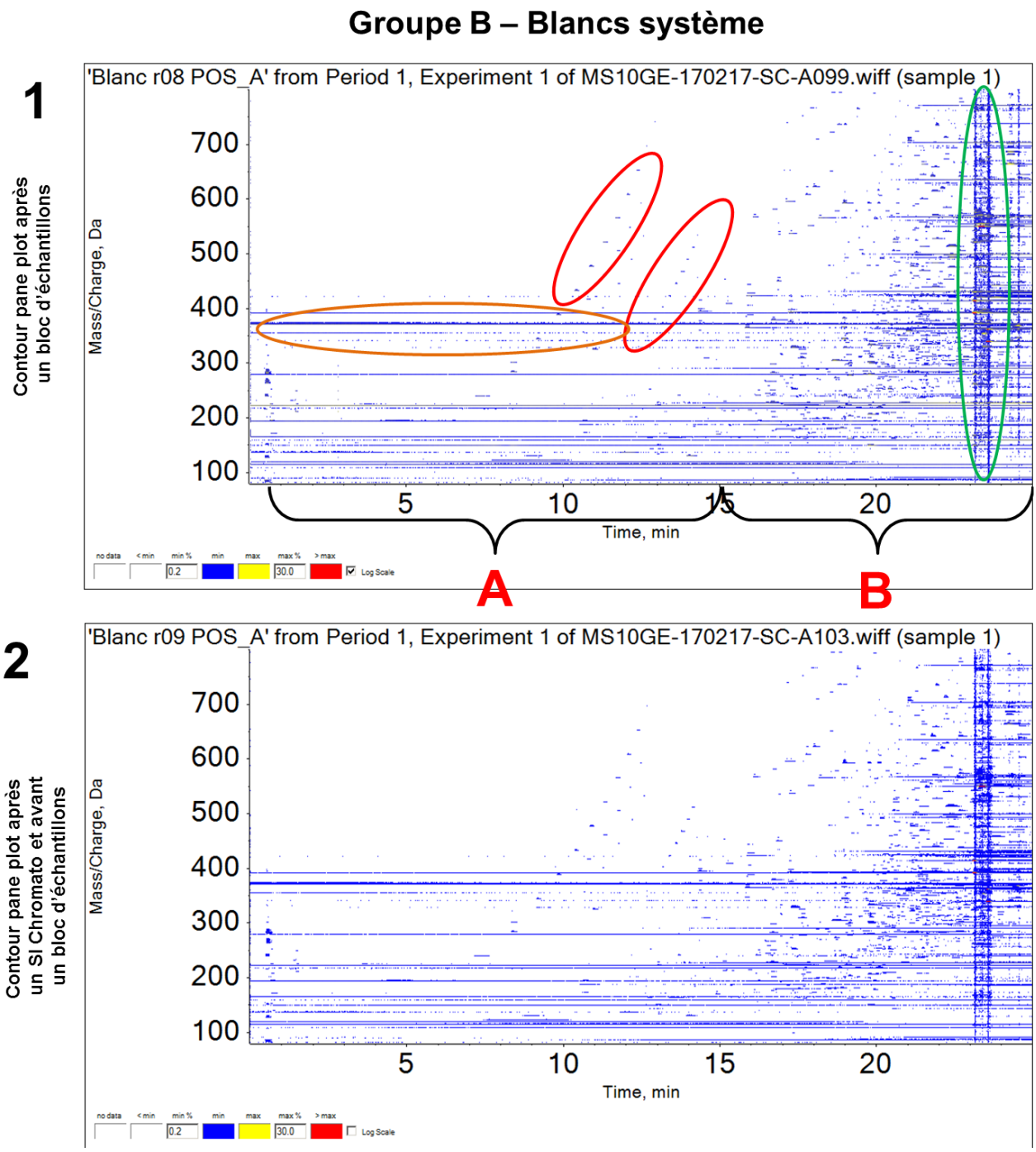


Figure 83: Groupe B, blancs système illustrant la présence d'interférents, le carry-over ainsi que le bruit de fond

Le groupe B de la première séquence est utilisé pour déterminer les contaminants provenant du système et ceux favorisant le bruit de fond. Le cercle orange (figure 83 graphique 1) met en évidence un ion présent tout au long de la séquence chromatographique, et qui appartient potentiellement au spectromètre de masse. En effet, les périodes A et B sont respectivement les périodes majoritairement polaire et apolaire (augmentation de la concentration de la phase mobile apolaire). Les éléments apparaissant dans la partie B peuvent provenir de plusieurs sources. Ce sont soit des composés apolaires élués grâce à l'augmentation de la force éluante (accumulation

pendant la phase de reconditionnement (ou dans la phase mobile polaire) soit provenant directement de la phase mobile apolaire. Une dernière hypothèse est qu'ils seraient ionisés plus fortement par la source car la phase mobile est plus volatile. Les cercles rouges mettent en évidence des contaminations par des polymères, car la rétention est augmentée de façon linéaire selon l'augmentation de la masse avec une différence équivalente. Enfin, le cercle vert apparaît lors de la chute brusque de la concentration de phase mobile apolaire et du retour aux conditions chromatographiques initiales.

La comparaison qualitative, et très globale, entre le contour pane plot à la fin d'un set d'analyses d'échantillons (figure 83, graphique 1) et avant un set d'analyses d'échantillons (figure 83, graphique 2) ne présente pas de pics supplémentaires qui indiqueraient un fort carry-over.

Pour les groupes C et D, les données analysées par PCA, mais sans t-test préalable, montrent une séparation entre les échantillons et les autres espèces (SI chromato, blanc système). La séparation entre les échantillons est discutée par la suite en excluant les SI chromato ainsi que les blancs systèmes. Il y a cependant un regroupement des variables appartenant à l'expérience de 2 h, contrairement à l'expérience de 48 h. La composante principale 1 versus la 3 améliore la représentation de cet effet. D'ailleurs, l'exposition à la concentration numéro 2 de cuivre pendant 48 h (triangles bruns) se démarque des autres groupes. Les variables 210.1 *m/z* et 419.2 *m/z* qui appartiennent à la même espèce ([M+H] et [2M+H], temps de rétention similaires) ont été exclues, et la PCA effectuée une nouvelle fois, afin de comprendre l'impact de ces variables sur l'analyse statistique. Celles-ci sont propres au Cu2, car il n'y a plus de séparation par la suite. Cette suppression a ensuite été réalisée pour la variable 430.3 *m/z,* mais cette fois le score a diminué. L'explication de ce phénomène sera discutée par la suite. Les groupes C et D (PCA et PCA-DA) présentent tous les deux une séparation des différentes catégories d'échantillons. Les variables sont extraites dans le traitement des données selon la séquence 2, axée sur les modifications dues à l'exposition des algues au cuivre.

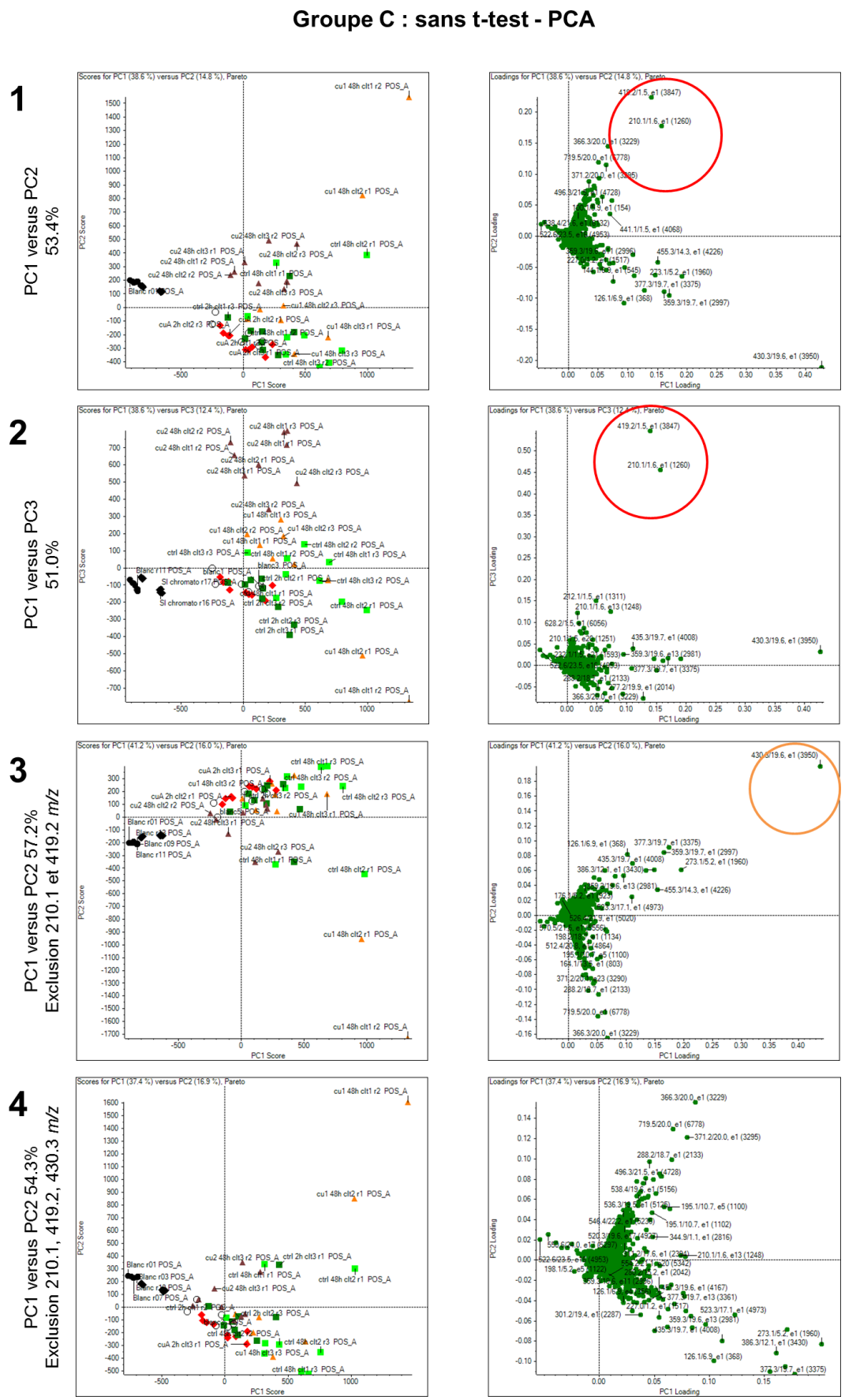


Figure 84: Séquence 1 Groupe C représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Groupe D : sans t-test – PCA-DA

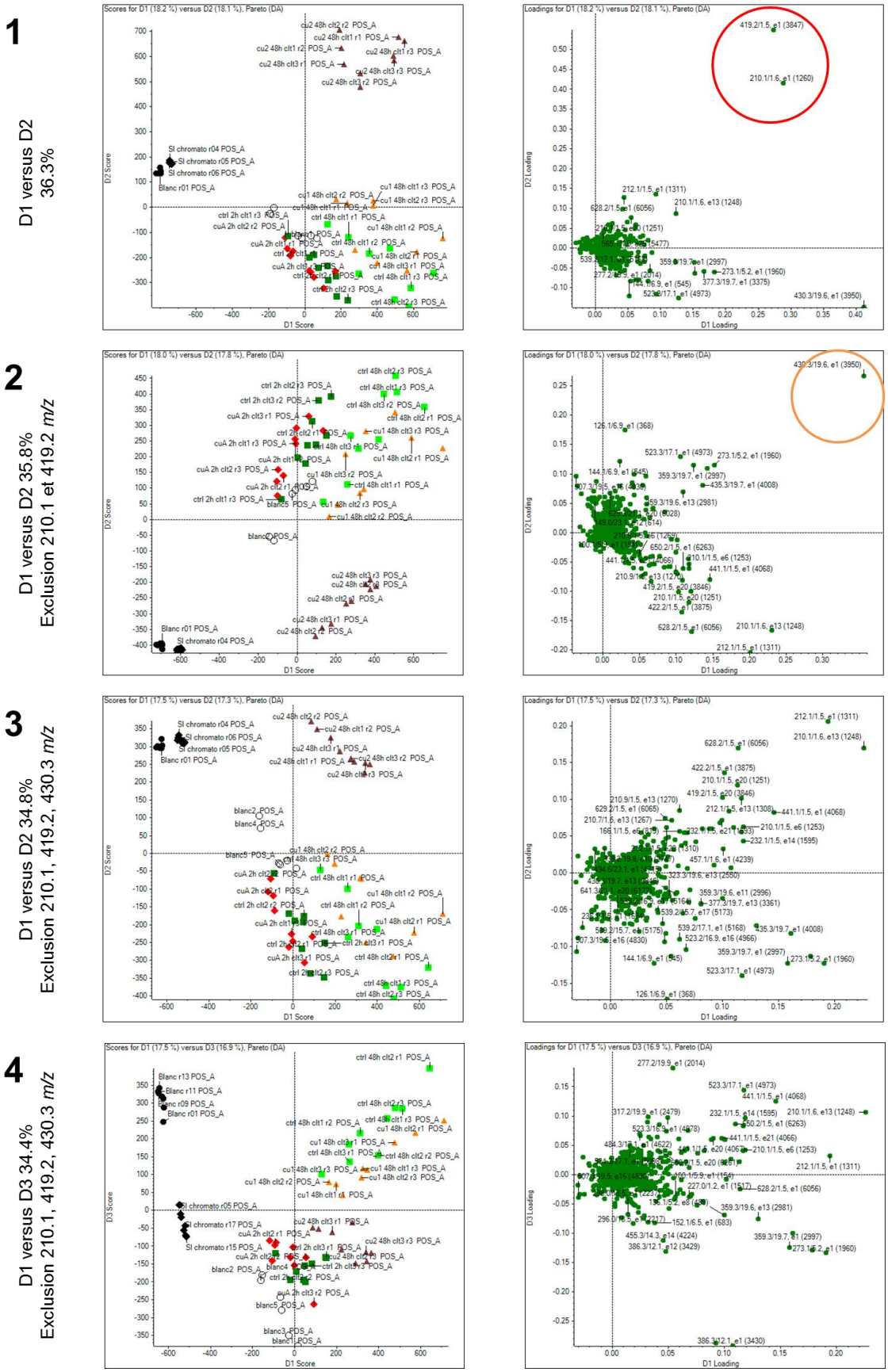


Figure 85: Séquence 1 groupe D, représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Les groupes E et F (PCA et PCA-DA) reprennent les mêmes processus que ceux effectués pour les groupes C et D, mais cette fois un test de Student est appliqué à l'ensemble des variables. Celui-ci conduit à l'hypothèse que les variables du début et de la fin de la séquence soient similaires à 95%. Si la valeur p du test est inférieure à 5% (0.05) elle indique que les variables sont différentes. Dans ce but, les même vials contenant les standards internes chromatographiques ont été injectés de façon répétée au début et à la fin de la séquence analytique (minimum quatre fois). Une étude de l'ensemble des pics exclus est décrite dans la figure suivante. Un total de14% des pics a été exclu, pour une valeur p inférieure à 0.05 pour les conditions chromatographiques acides, avec une analyse en mode positif, et selon les paramètres d'extractions décrits précédemment. La séquence chromatographique comprend un plateau juste avant la fin de la séquence séparative et le retour aux conditions de départ. Elle est souvent décrite comme une phase de nettoyage, car celle-ci contient une grande quantité de phase organique permettant l'élution des composés fortement retenus. Elle se déroule entre 21 et 24 minutes chromatographiques, ou 22 et 25 minutes pour le temps observé. Parmi les variables ayant une valeur p inférieure à 0.05, 5% sur 16% se trouvant dans cette phase plateau ont été exclus, ce qui représente près du tiers des variables obtenues dans cette partie de la séquence.

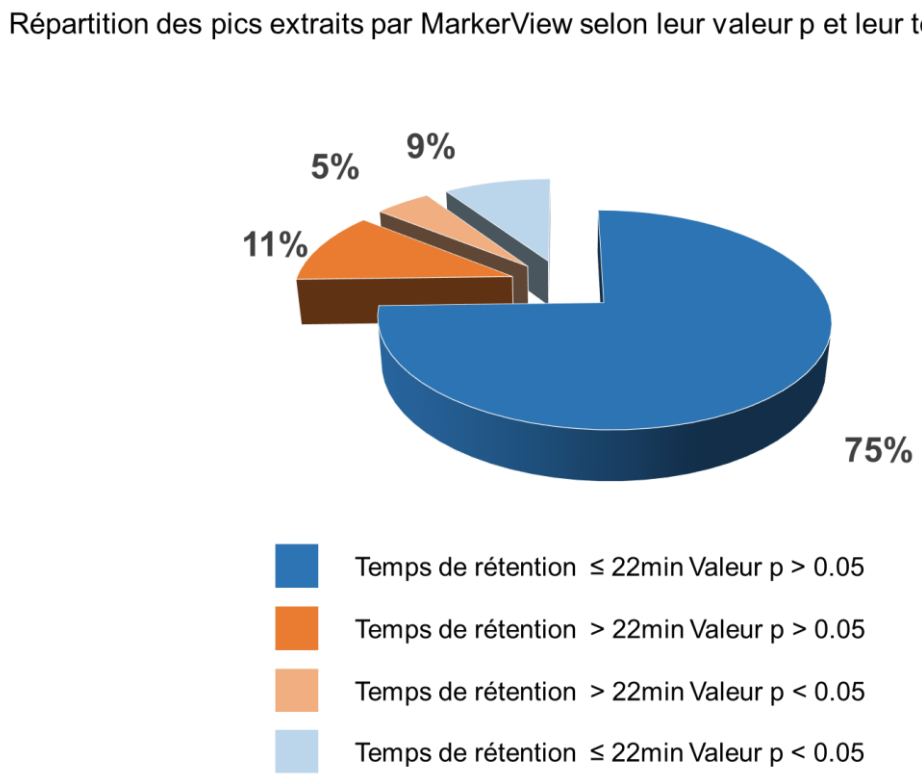


Figure 86: Exclusion des pics selon le test de Student corrélé à une valeur p inférieure à 0.05 selon la séquence de pics extrait des conditions chromatographiques acides et analysé en mode positif

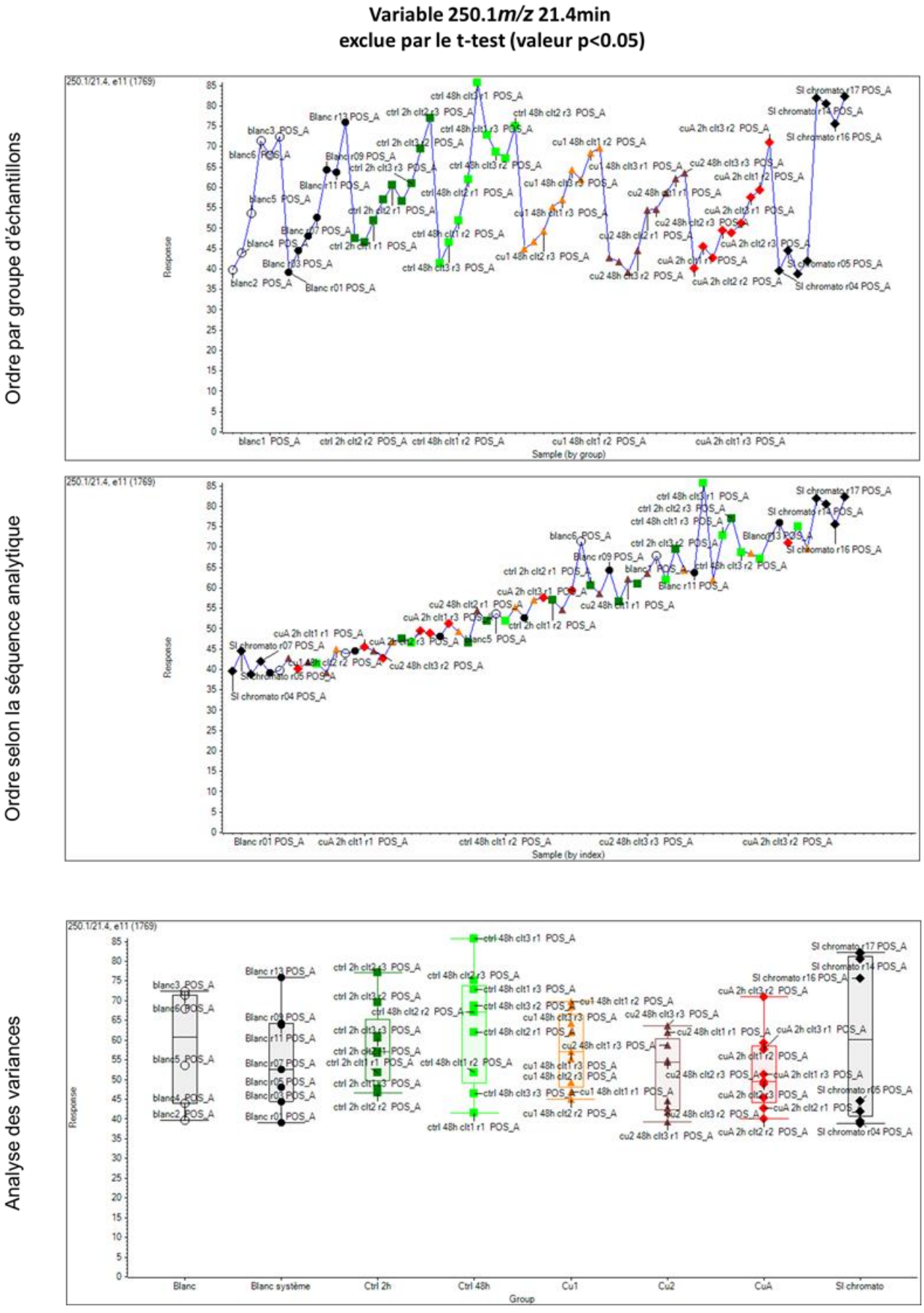


Figure 87: Variable 250.1 *m/z* et au temps de rétention 21.4 min, exclue selon le test de Student

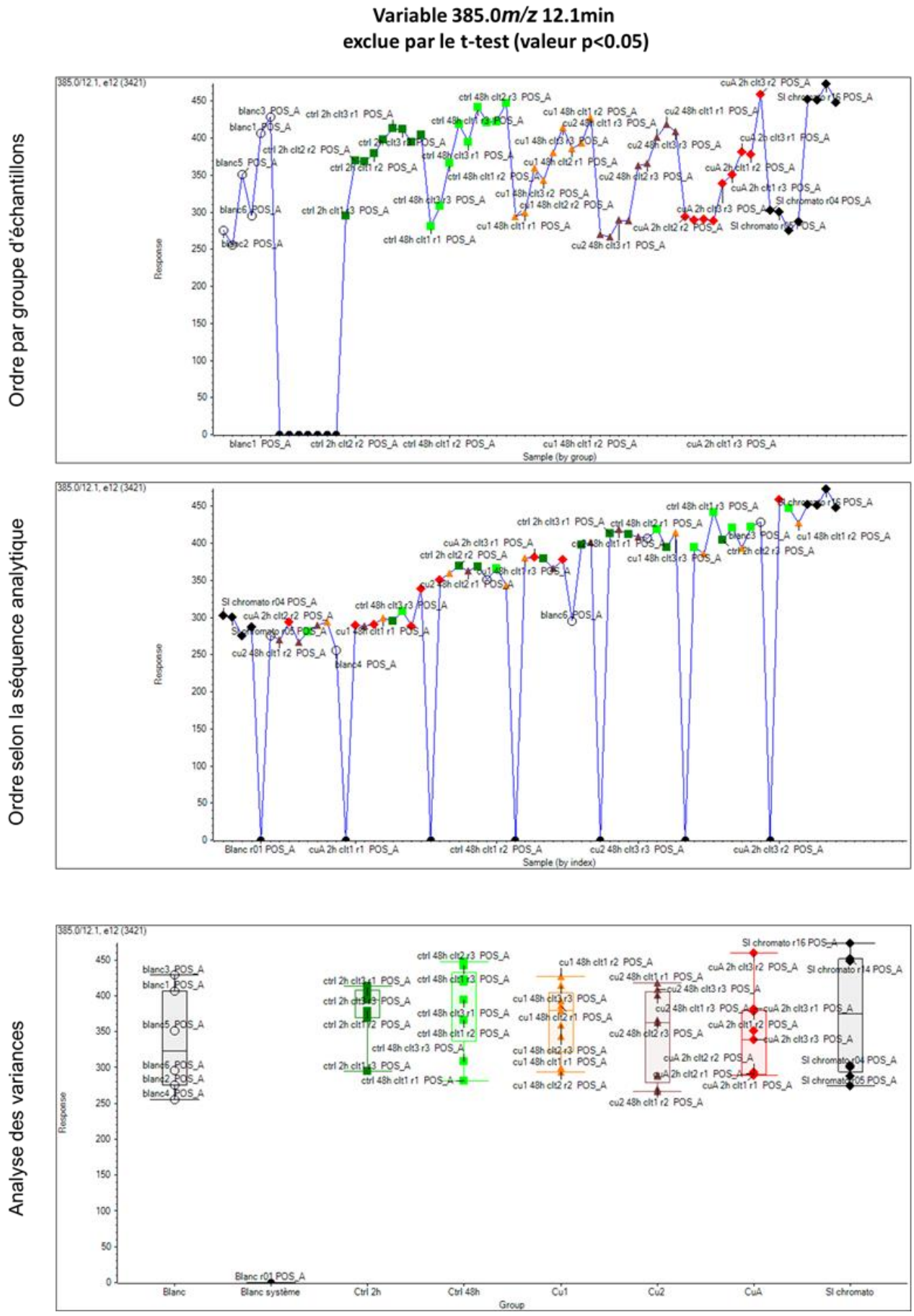


Figure 88: Variable 385.0 *m/z* et au temps de rétention 12.1 min, exclue selon le test de Student

Les figures 87 et 88 illustrent deux situations rencontrées lors de l'exclusion des variables par le test de Student selon les 4 premières et 4 dernières analyses de la séquence analytique, en conditions chromatographiques acides et analysées en mode positif.

La figure 88 est un exemple d'augmentation d'intensité d'une variable tout au long de la séquence analytique. Le groupe utilisé pour réaliser le test de Student montre bien une séparation des SI chromato, avant et après la séquence, dans le graphique illustrant l'analyse des variances. La variable ayant un *m/z* de 250.1, un temps de rétention de 21.4 min et appartenant à l'expérience MS 11, peut être exclue des variables d'intérêt car elle ne présente pas d'explication statistique. En outre, sa présence dans tous les échantillons est probablement due à une contamination de la colonne par la phase mobile. C'est pourquoi cette variable tend à se répéter sur tous les types d'échantillons (SI chromato, Blanc système, Echantillons).

La variable 385.0 *m/z* avec un temps de rétention de 12.1 min et extraite de l'expérience 12 (figure 88), possède les mêmes caractéristiques que la variable précédente. Cependant celle-ci n'est pas exprimée dans les échantillons blancs systèmes. Cette variable, bien que peu informative pour les résultats de l'exposition au cuivre (présence dans le SI chromato, contamination du solvant de reconstitution) est par contre essentielle pour la séparation des blancs systèmes par rapport aux autres échantillons analysés. Cette variable sera malgré tout supprimée par l'application du test de Student car l'intensité entre le début et la fin de la séquence a varié.

Il en est de même pour la variable qui a été évoquée au début de la séquence 1 (voir figure 89). La variable 430.3 *m/z*, 16.9 min et provenant de l'expérience MS 1 (TOF-MS) est exclue par le test de Student, bien que permettant la séparation des SI Chromato et blancs systèmes du reste des échantillons. Cette variable est apportée probablement par la contamination des échantillons lors de la préparation car elle est aussi présente dans les blancs de préparation d'échantillons. Elle ne doit pas être utilisée par la suite en tant que variable explicative de l'exposition des algues à des concentrations croissantes de cuivre, mais garde son importance dans l'analyse globale des données.

Variable 430.3*m/z* 16.9min
exclue par le t-test (valeur p=0.026)

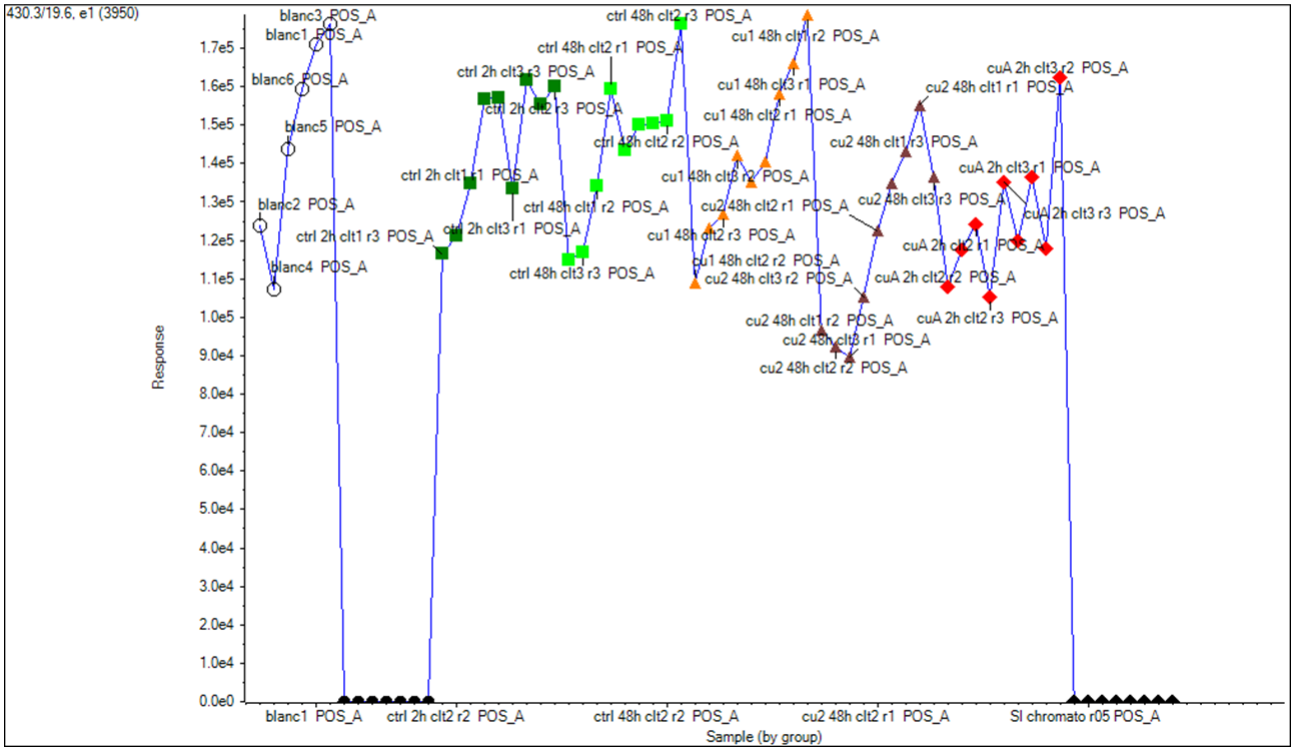


Figure 89: Variable 430.3 *m/z* et au temps de rétention 16.9 min, exclue selon le test de Student

Les groupes E et F (figure 90 et 91) illustrent l'ensemble des données après la suppression des variables ne répondant pas à l'hypothèse émise par le test de Student (les variables sont similaires à 95%, la valeur p est supérieure à 0.05).

Le groupe E, en analyse non supervisée, illustre à son tour la séparation des groupes, avec un score équivalent au groupe C de 53.4%. Le score d'explication de la PCA selon PC1 et PC2 n'est donc pas impacté par la suppression des variables.

Le groupe F, qui se trouve être le groupe parallèle au D avec une analyse des données en PCA-DA, c'est-à-dire de façon supervisée, montre une augmentation du score obtenu, 42.9% contre 36.3% pour le groupe D.

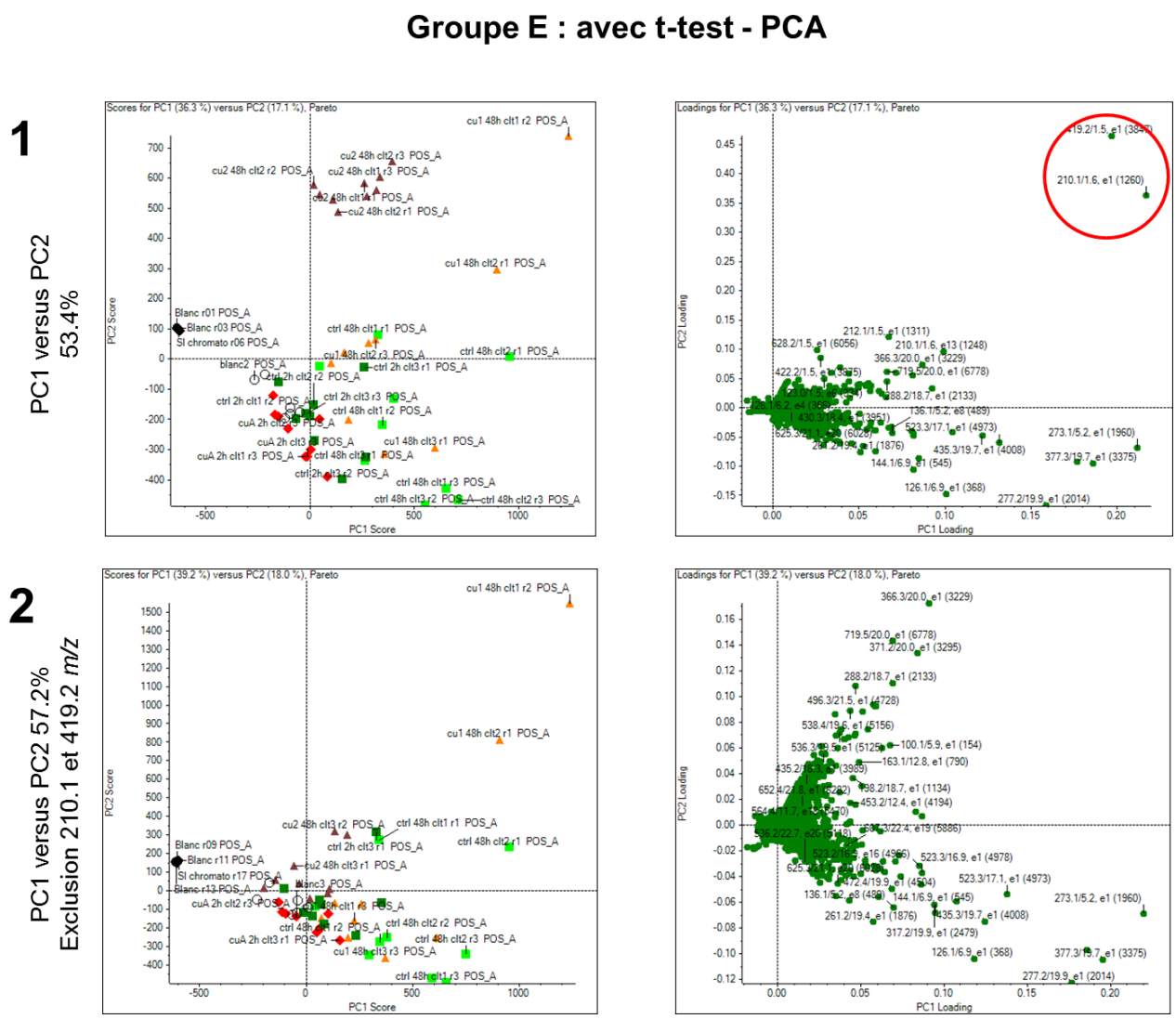


Figure 90: Séquence 1 groupe E représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

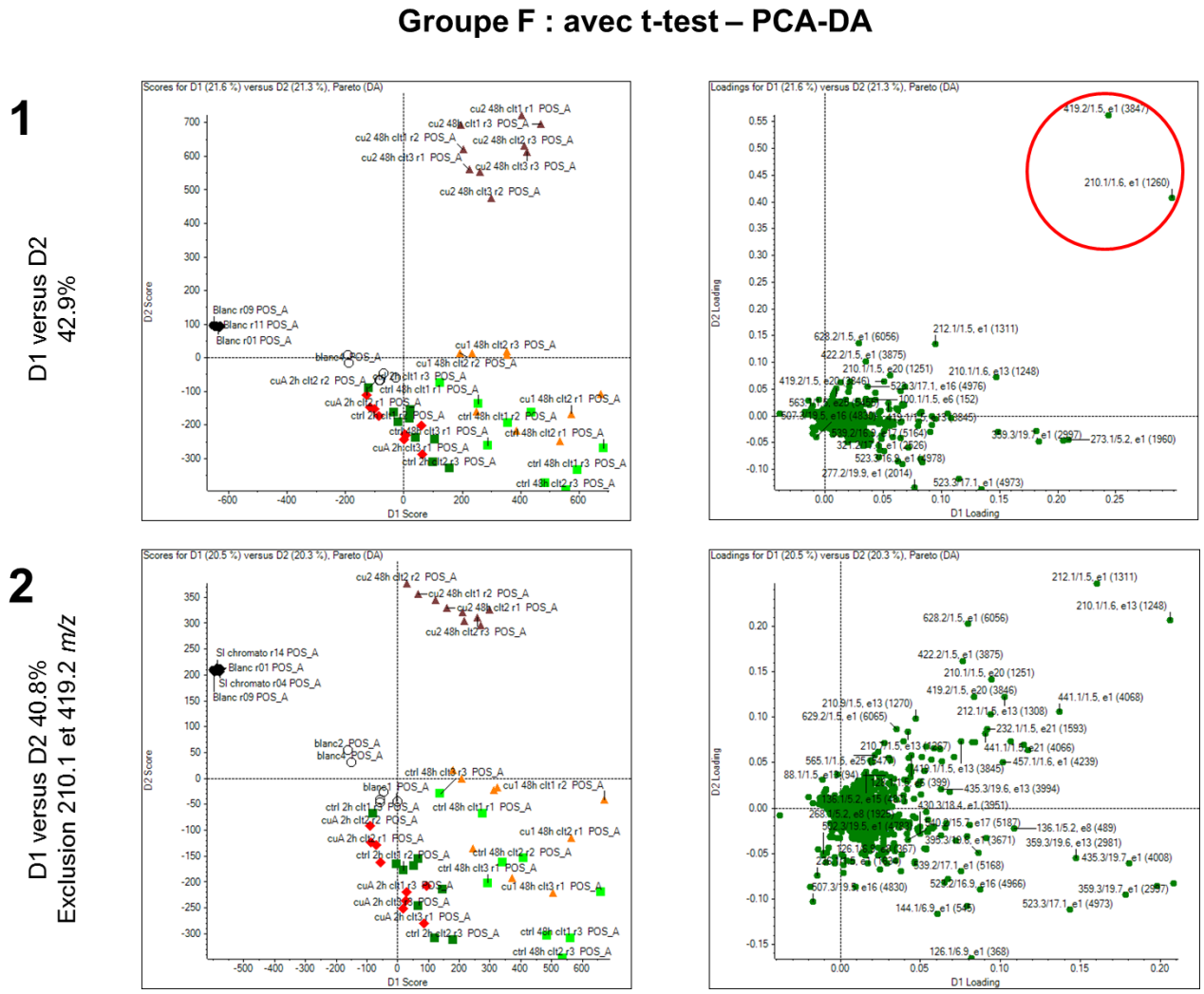


Figure 91: Séquence 1 groupe F représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Les données et résultats obtenus avec et sans test de Student sont similaires, et ne présentent que peu de différences en termes de séparation et de score. C'est pourquoi les données analysées par la suite n'ont pas subi de test de Student. Les variables extraites sont utilisées dans leur intégralité pour les analyses par PCA et PCA-DA.

La séquence 2 du traitement statistique des données obtenues permet de s'intéresser au cœur de cette étude, c'est-à-dire quelles sont les espèces d'intérêt, qui montrent les variations au niveau des molécules polaires de faible poids moléculaire et, par extension, au niveau métabolique.

Séquence 2, analyses statistiques des résultats de l'exposition au cuivre

La séquence 2 traite les données obtenues pour les algues exposées aux diverses concentrations de cuivre libre dans le milieu de culture. Les données sont systématiquement présentées selon l'analyse en composante principale supervisé (PCA-DA) et non supervisée (PCA).

L'analyse de l'ensemble des données est représentée par le groupe A. On s'attendrait à un regroupement des contrôles à 2 h et 48 h, car les conditions, outre le temps, sont les mêmes. Il en va de même pour les concentrations croissantes de cuivre, avec un étirement de la représentation pour le groupe CuA, celui présentant la concentration la plus élevée. En ce qui concerne l'analyse non-supervisée (figure 92), le groupe Cu2 (triangles violets) est séparé par les mêmes variables que celles mentionnées précédemment dans la séquence 1, et qui sont les *m/z* 201.1 et 419.2 *m/z*. Il est observé une diminution de la séparation lorsque ces variables sont supprimées. En effet, les différents groupes (control, cuivre, standards et blancs) ne sont plus séparés par l'analyse statistique.

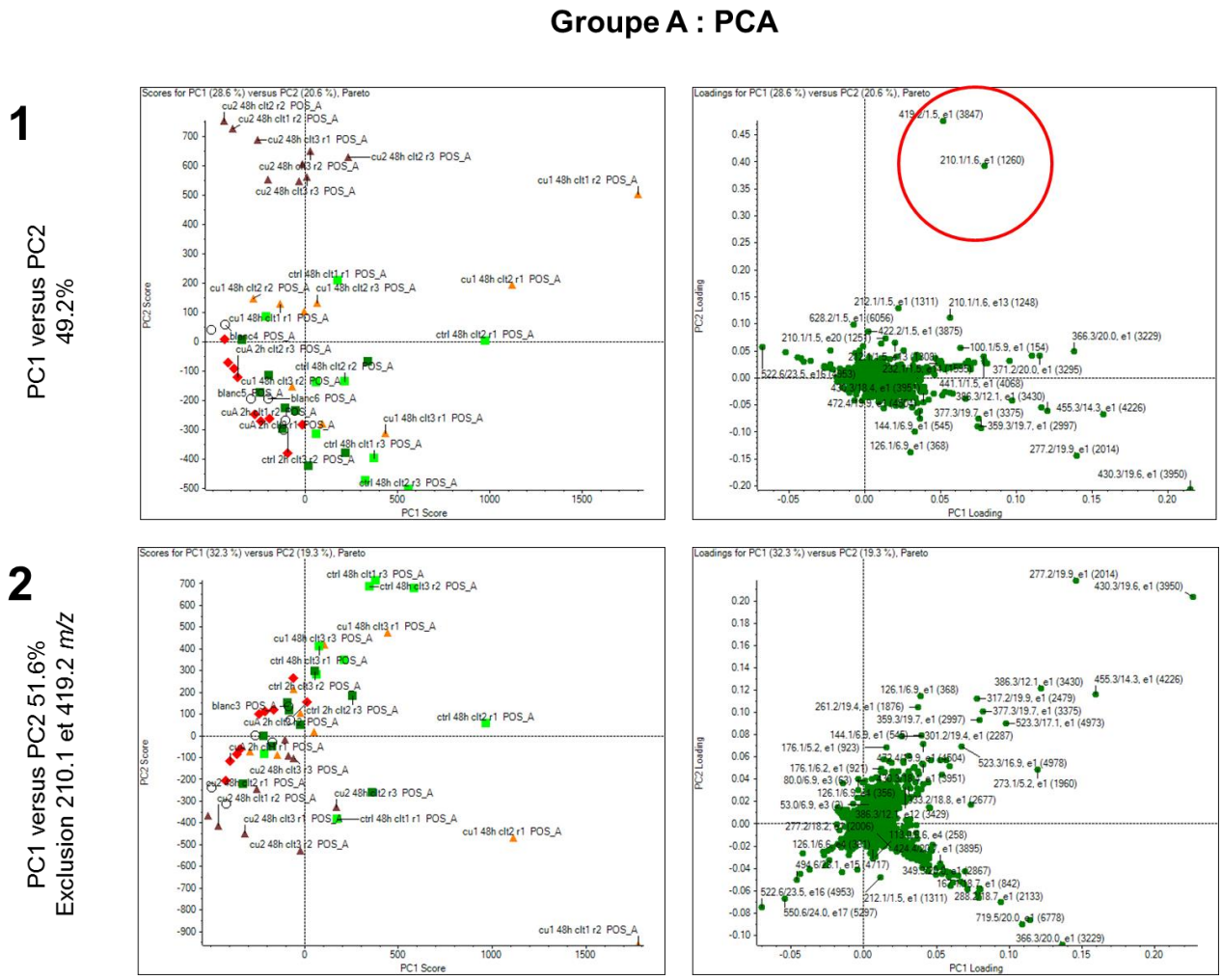


Figure 92: Séquence 2 groupe A – PCA représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Pour l'analyse supervisée (figure 93), trois groupes sont présentés de façon distincte avec d'une part les expositions de 2h (ctrl 2h et CuA 2h), d'autre part les contrôles 48h avec la concentration de cuivre 1 (ctrl 48h et Cu1) et enfin un ensemble de données formant à elles seules un groupe qui a été exposé à la concentration de cuivre 2 (Cu2). L'analyse des groupes appartenant aux expositions respectives permettra de mettre en évidence les variables spécifiques.

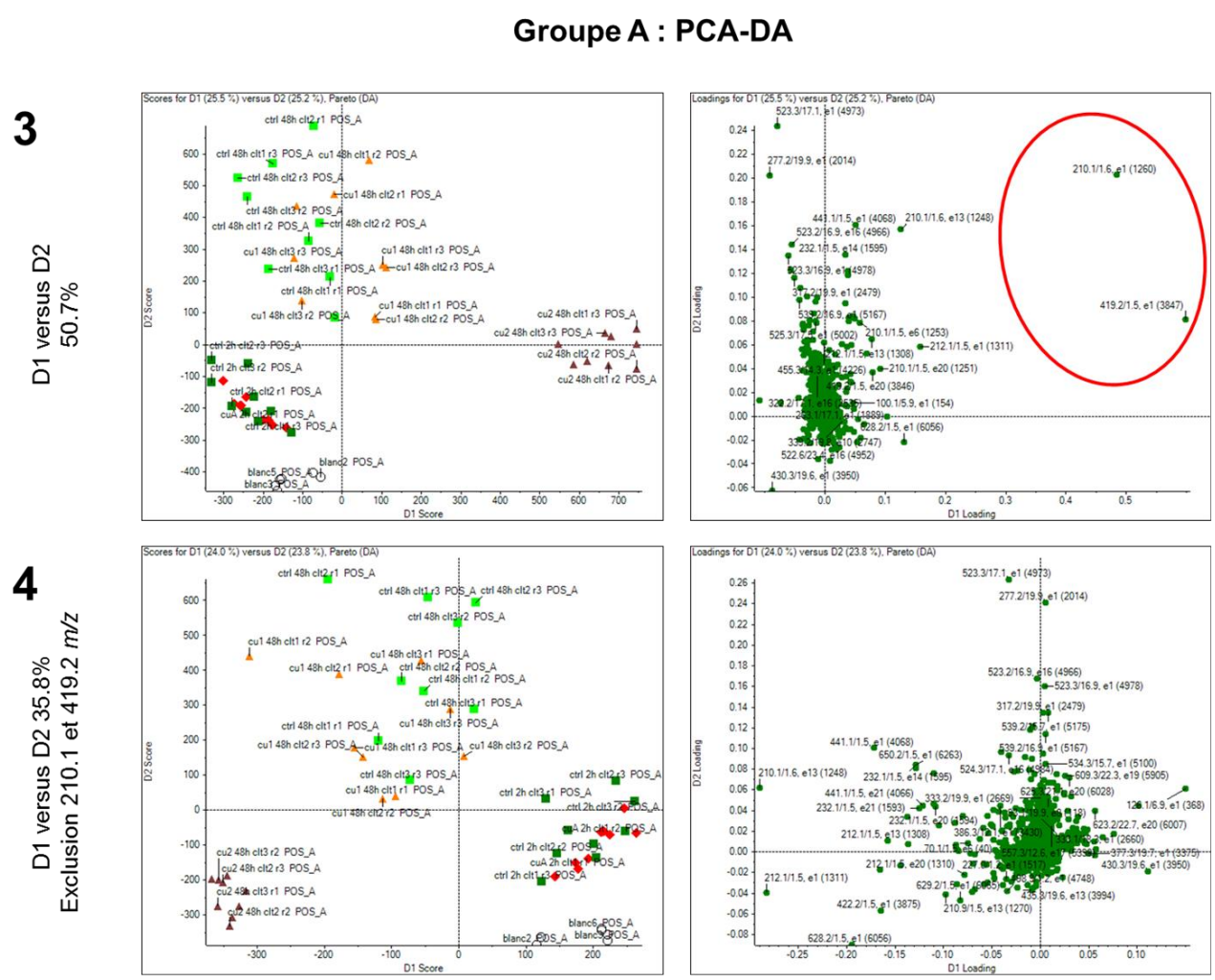


Figure 93: Séquence 2 groupe A - PCA-DA représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Le groupe B, représenté par la figure de la page suivante, reprend les données propres à l'exposition au cuivre pendant 2h ainsi que les blancs techniques. Le groupe contrôle (Ctrl 2h, carrés vert foncé), le groupe exposé à une concentration de cuivre supérieure (CuA 2h, diamants rouges) et les blancs (blanc, cercles noirs) ne semblent pas particulièrement se différencier selon l'analyse en composante principale non supervisée. Une faible répartition est effectuée par PC1 (axe vertical) malgré un score de 43.7%.

Groupe B

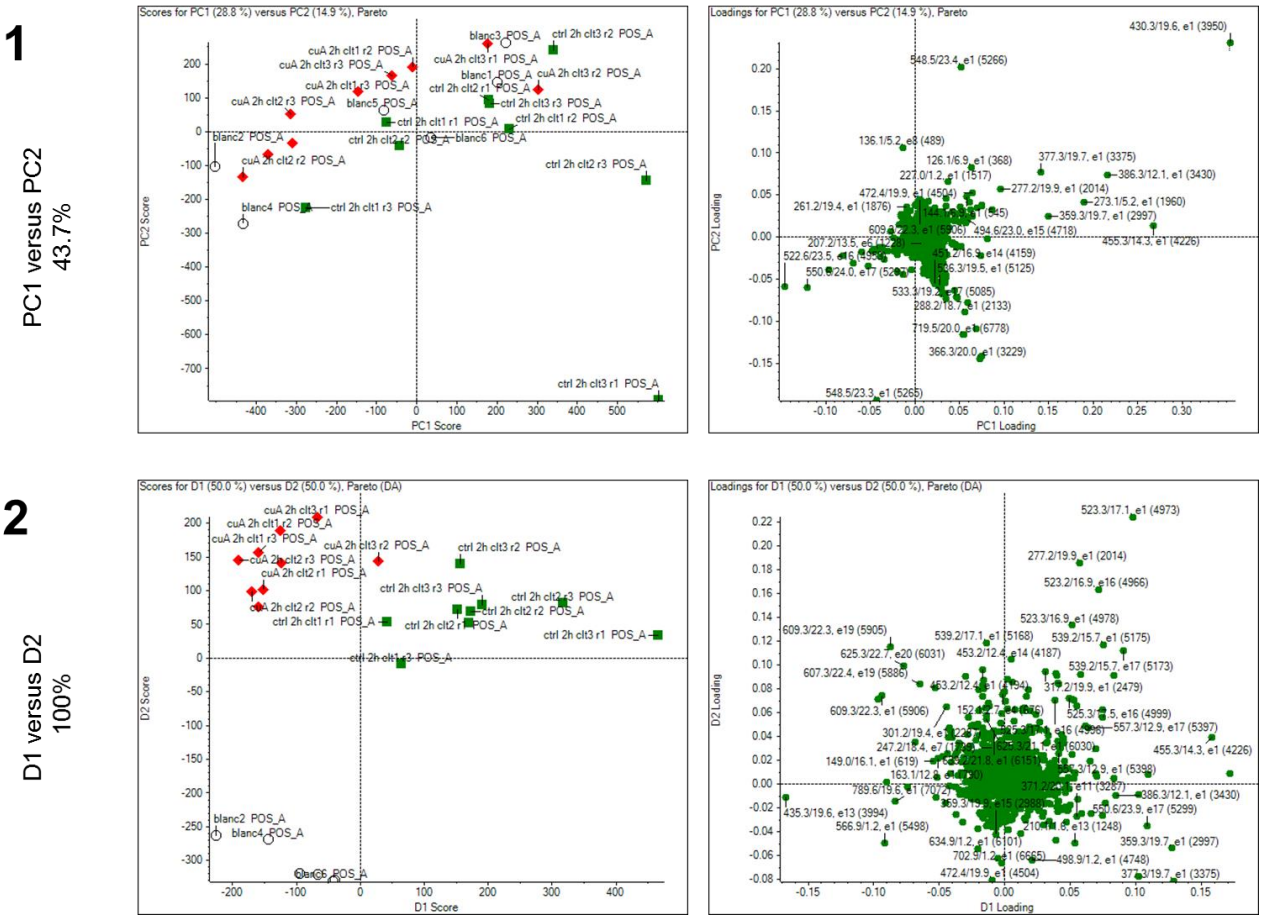


Figure 94: Séquence 2 groupe B représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Les variables qui se répartissent entre les deux conditions de concentration de cuivre libre seront présentées de façon plus détaillée au groupe D.

Il est important de noter qu'il n'y a pas d'effet de variabilité observé selon la culture d'algues (réplicats biologiques, 3 cultures parallèles, clt1, clt2, clt3). La variabilité biologique entre les cultures est suffisamment faible pour que celle-ci ne soit pas séparée par l'analyse statistique. Les réplicats techniques (3 par cultures) se répartissent de façon homogène dans la visualisation de l'analyse statistique.

Groupe C

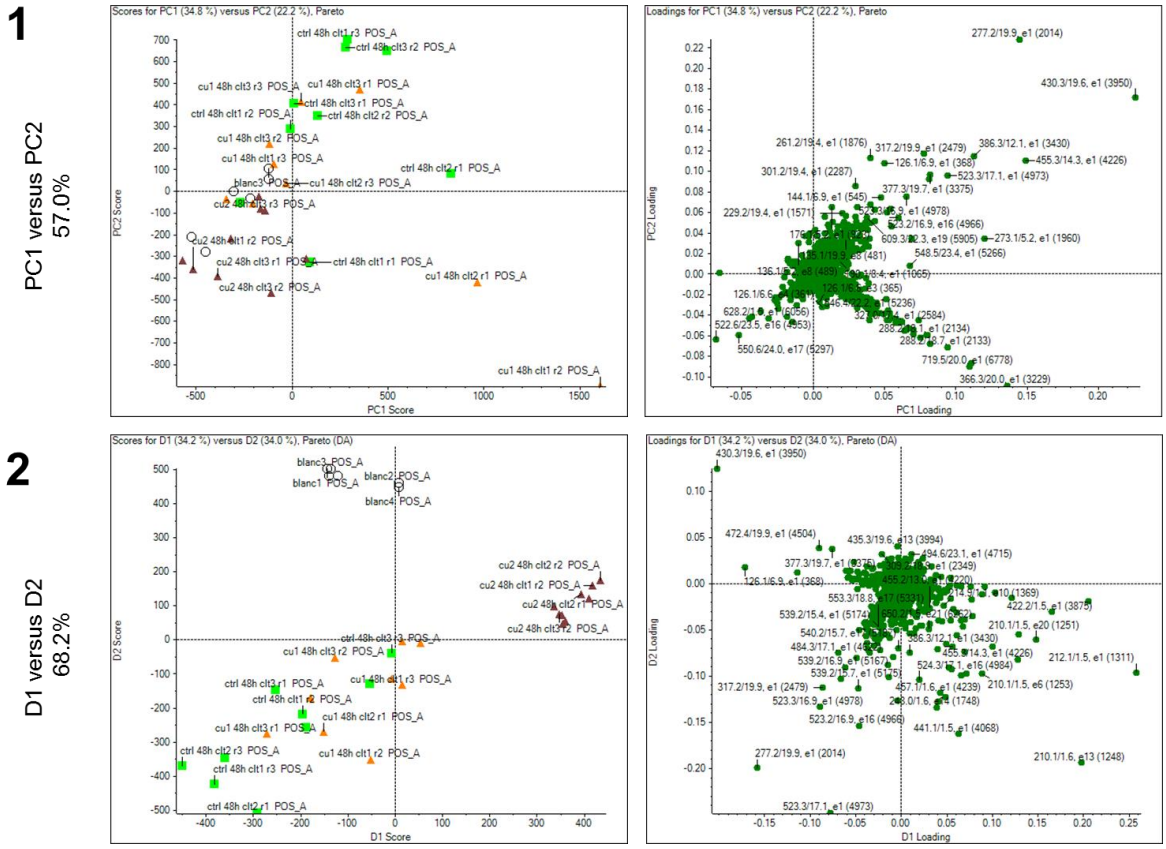


Figure 95: Séquence 2 groupe C représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Le groupe C reprend les données de l'exposition au cuivre pendant 48 heures ainsi que les blancs techniques. Le score de l'analyse non supervisée est de 57%. Cependant, la séparation des différents groupes n'est pas clairement représentée dans ce graphique (graphique 1, figure 95). L'analyse supervisée tend à nouveau (groupe A – PCA-DA) à joindre les échantillons contrôles (carrés vert clair) et cuivre 1 (triangles orange). Le groupe de cuivre 2 est à nouveau distinct du reste des échantillons (triangles violets). Les variables représentées par le graphique des loadings selon un rapport *m/z*, un temps de rétention et une expérience MS, sont exploitées par la suite dans le groupe E.

Le groupe suivant reprend uniquement les échantillons de l'expérimentation se déroulant sur une durée de 2h. C'est la suite du groupe B mais en supprimant cette fois les échantillons blancs qui sont des blancs techniques et ne sont introduits que lors de la préparation d'échantillons au cours du processus analytique.

Groupe D

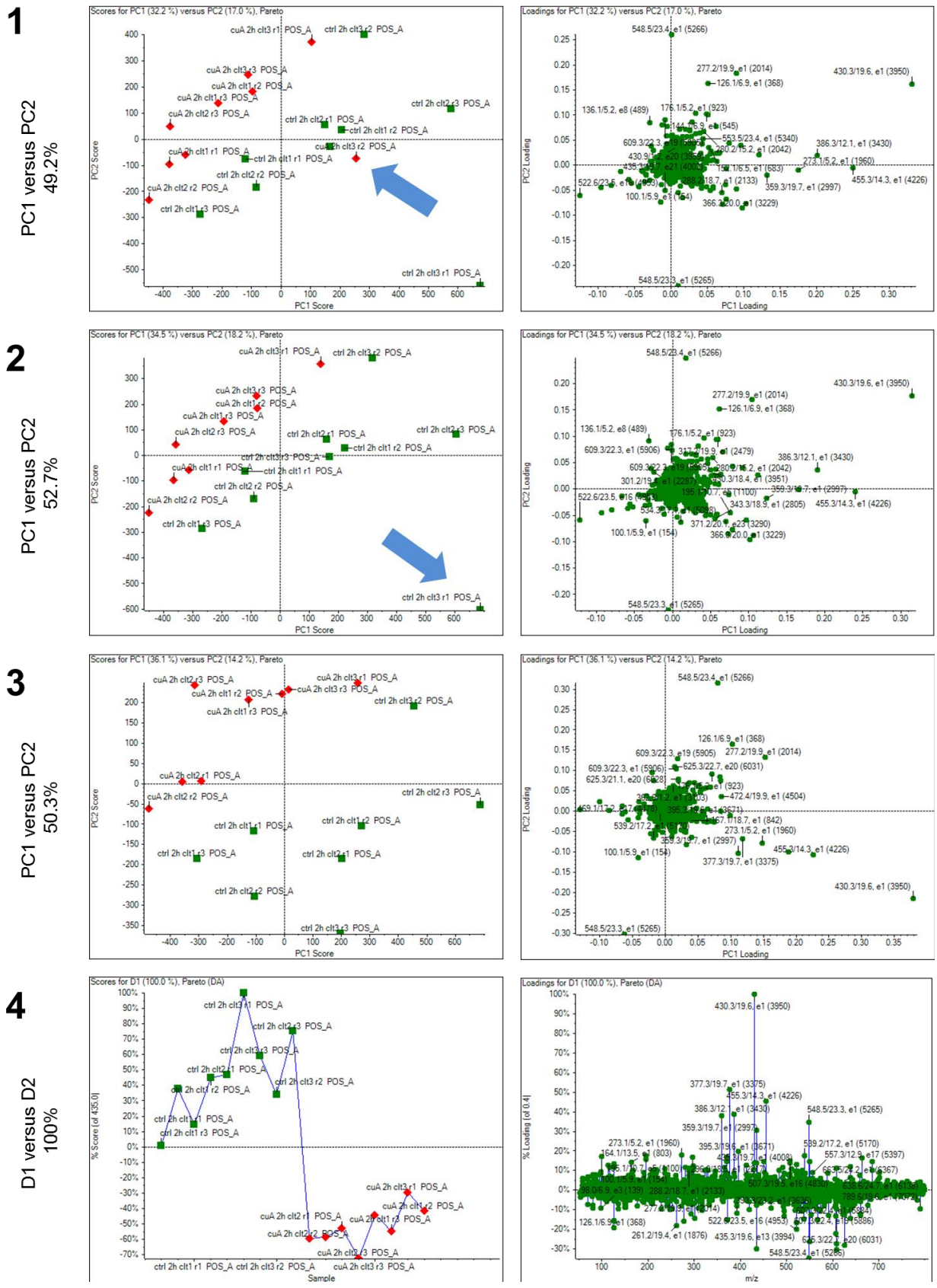


Figure 96: Séquence 2 groupe D représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Le groupe D présenté à la figure 96, est traité en plusieurs étapes par analyse supervisée. En effet, dans le graphique 1 un diamant rouge appartenant au groupe CuA est présent parmi les échantillons contrôles (carrés vert foncé). Cet élément est supprimé, ce qui permet d'augmenter le score de la PCA, qui passe de 49.2% à 52.7%. Un autre échantillon est séparé du groupe et à nouveau exclu pour éviter que les variables d'intérêts ne soient liées uniquement à cet élément (graphique 2, figure 96). Le score cette fois s'en trouve diminué, car l'analyse statistique ne comprend plus cet élément qui permet de visualiser cette analyse.

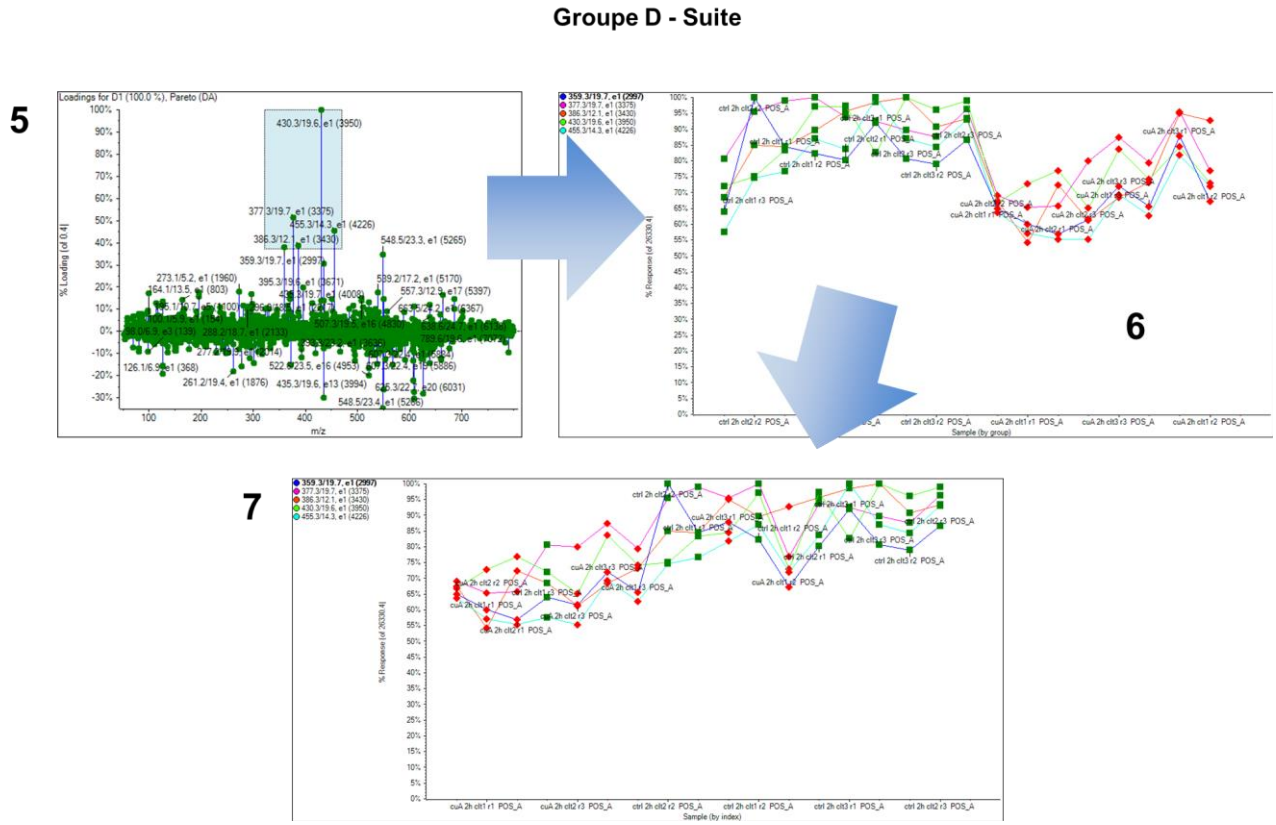


Figure 97: Groupe D suite, extraction des variables liées à la PCA-DA et visualisation de celles-ci selon leur intensité normalisée en % de l'intensité la plus importante.

Cinq variables sont sélectionnées à partir de l'analyse en composante supervisée (PCA-DA, figure 97, rectangle bleu) et représentées selon leur intensité dans chaque échantillon, puis réparties selon le groupe auquel elles appartiennent. Les variables semblent expliquer la séparation entre le groupe contrôle (ctrl 2h, carrés vert foncé) et le groupe exposé au cuivre (CuA 2h, diamant rouges). Cependant, si les échantillons sont répartis selon leur ordre dans la séquence analytique, il est possible d'observer que les échantillons CuA interviennent plutôt dans le début de la séquence analytique, alors que les échantillons contrôles sont répartis à la fin de celle-ci. Il est donc possible d'observer la lente augmentation d'intensité et de poser l'hypothèse que la séparation des groupes n'est pas liée à l'intensité de ces variables, mais bien à un problème d'accumulation de ces composés au cours de la séquence analytique. Le fait de n'avoir que deux conditions

analytiques pour l'exposition de 2h a un effet délétère sur les analyses statistiques. En effet, l'identification de conditions « on-off » peut amener à de nombreuses erreurs au niveau des conclusions biologiques tirées de ces analyses.

Le groupe E est la suite de l'analyse déjà réalisée du groupe C, mais avec cette fois l'absence des blancs techniques pour l'analyse statistique. Le but est de déterminer les variables d'intérêt qui permettent de séparer le modèle, et qui seraient donc potentiellement des biomarqueurs dans l'explication de ces variations au niveau métabolomique. Le groupe E est représenté à la figure suivante et analysé selon une approche non-supervisée (graphique 1) et supervisée (graphique 2)

Groupe E

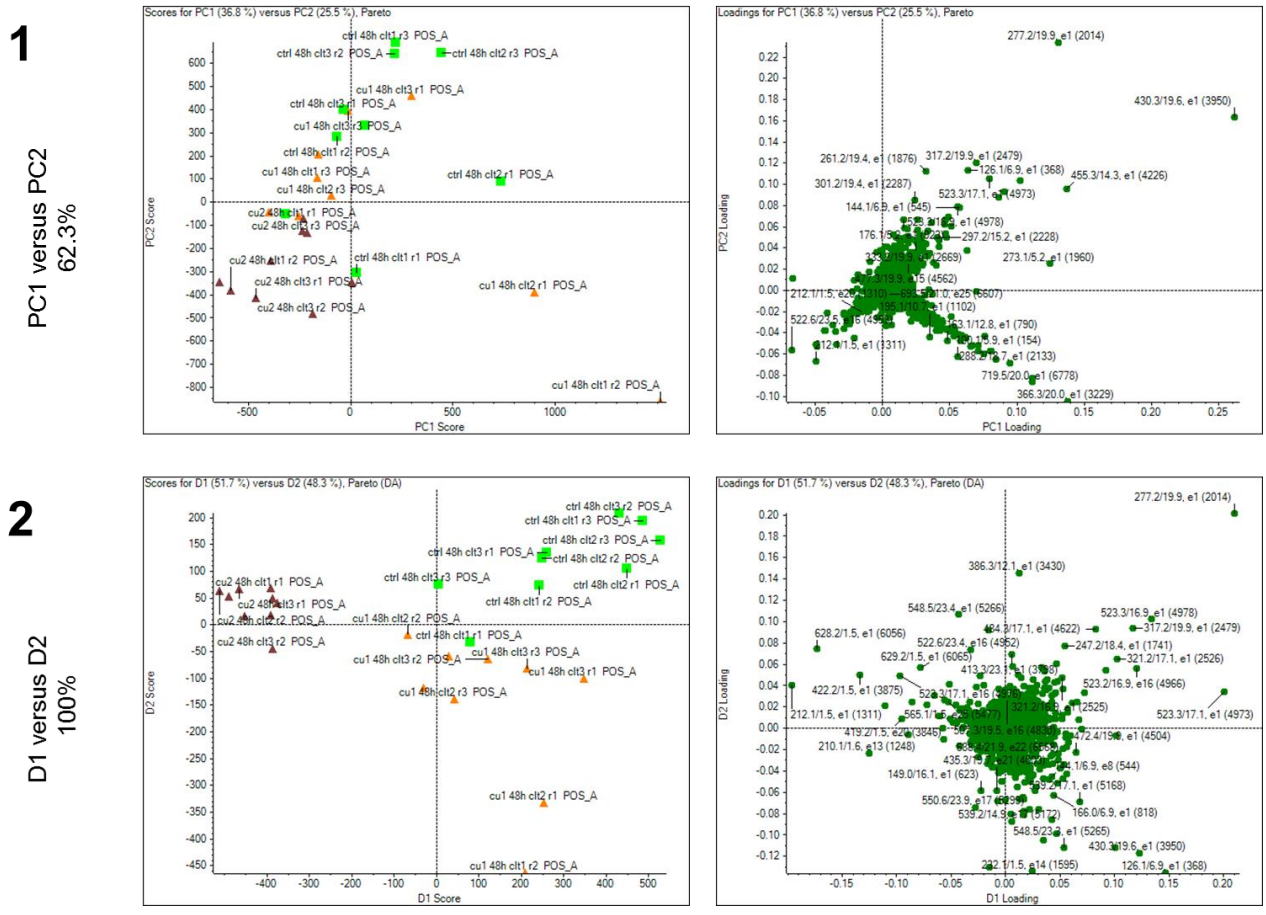


Figure 98: Séquence 2 groupe E représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

La PCA (graphique 1 figure 98), permet de présenter un regroupement des variables appartenant au groupe Cu2. Le score est de 62.3%. Le groupe Cu2 est une combinaison des composantes principales 1 et 2 (PC1 et PC2). Les groupes contrôles et Cu1 sont à nouveau regroupés. La PCA-DA (graphique 2 figure 98) montre aussi ce phénomène de séparation.

Les variables sont ensuite réparties selon des groupes en utilisant la propriété du logiciel MarkerView qui permet d'assembler les variables ayant un profil similaire [18]. La PCVG (graphique 4, figure 99) est tirée directement de la représentation précédente par PCA-DA (graphique 3, figure 99). Sept groupes sont formés et le groupe appartenant aux variables du centre de la représentation est exclu d'office. En effet, ces variables n'ont que peu d'impact dans la séparation des groupes d'échantillons, et donc ne sont pas pertinentes pour les analyses suivantes. Sachant qu'il y a plus de 7'000 variables qui sont utilisées dans ce modèle, il paraît impossible de s'intéresser à chacune d'elles. C'est pourquoi le but est de réduire au maximum, et aux plus pertinentes d'entre elles, le nombre de variables à exploiter par la suite.

Pour cela, le groupe 1 (carrés vert clair) qui se situe dans même la direction que les échantillons contrôles (graphique 3 figure 99) est extrait et présenté selon le graphique 4 de la figure 99. La tendance montre une évolution négative de l'intensité de ces variables lors de la concentration d'exposition croissante des algues au cuivre. Ces variables sont donc moins exprimées dans le groupe Cu2. Les groupes Ctrl et Cu1 sont proches mais distincts. Une séparation marquée est réalisée pour le groupe Cu2 par une nette diminution de l'intensité des variables (graphique 5 figure 99). Ces représentations ont déjà été exploitées dans des publications précédentes [19, 20].

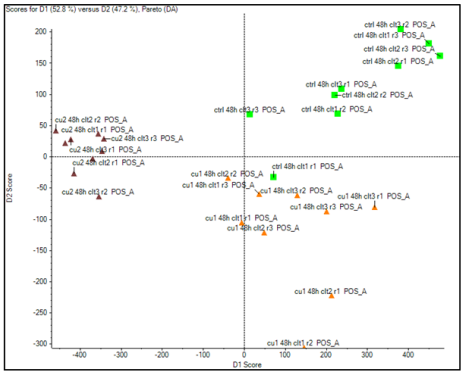
Dans cette optique, le groupe 2 est à son tour extrait (graphique 6 figure 99) car il tend vers les échantillons Cu2. La représentation des variables liées à ce groupe augmente d'intensité dans les échantillons de Cu2.

Les autres groupes ont été traités mais ne montrent pas de tendance claire pour la séparation des différents groupes d'échantillons. Un groupe de variables supplémentaires a été évalué en choisissant une sélection manuelle des variables (rectangle bleu, graphique 7, figure 100) Celles-ci sont représentées dans la graphique 8 de la figure 100.

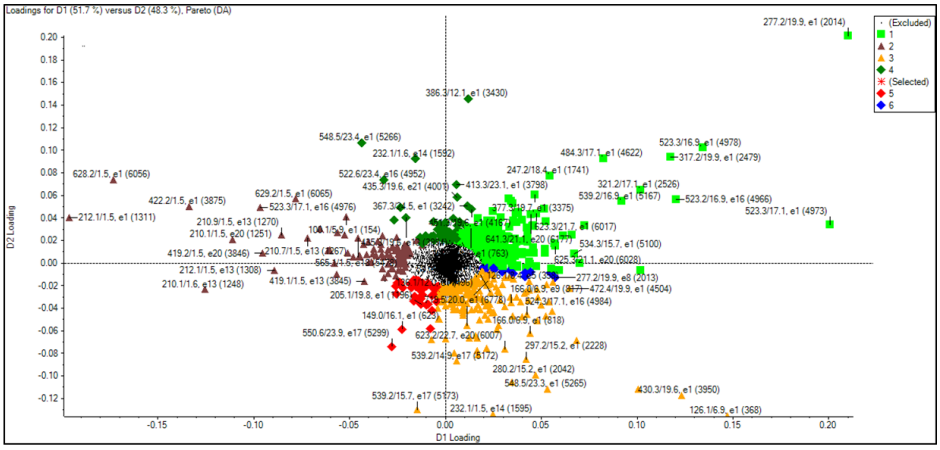
Toutes les variables extraites des groupes 1,2 et de la sélection manuelle sont ajoutées à une liste d'intérêt. Elles sont analysées plus en détail, et le but final est de déterminer l'identité de ces molécules.

Groupe E - Suite

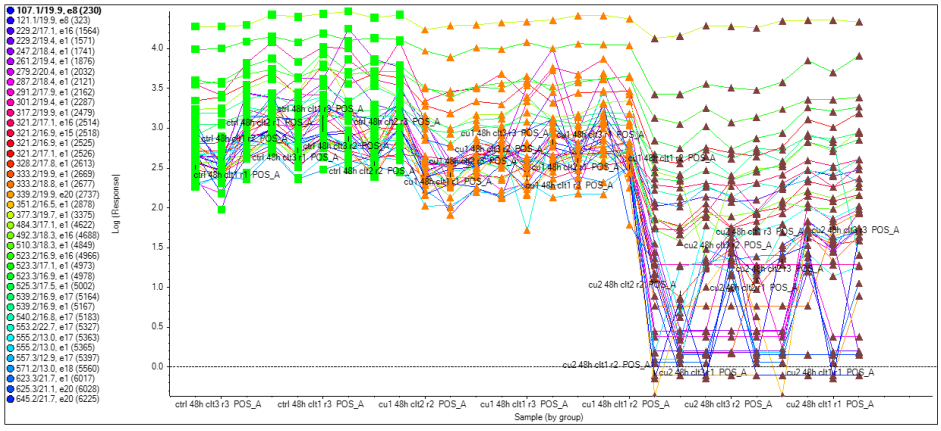
3 PCA-DA



4 PCVG à partir de la PCA-DA



5 Groupe 1 Diminution d'expression



6 Groupe 2 Augmentation d'expression

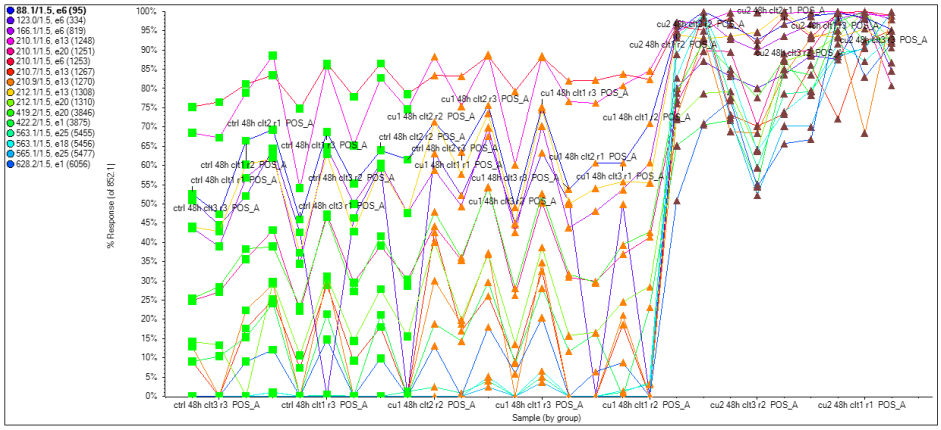


Figure 99: Séquence 2 groupe E suite représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Groupe E - Suite

7 PCVG à partir de la PCA-DA

8 Plot profile de la sélection

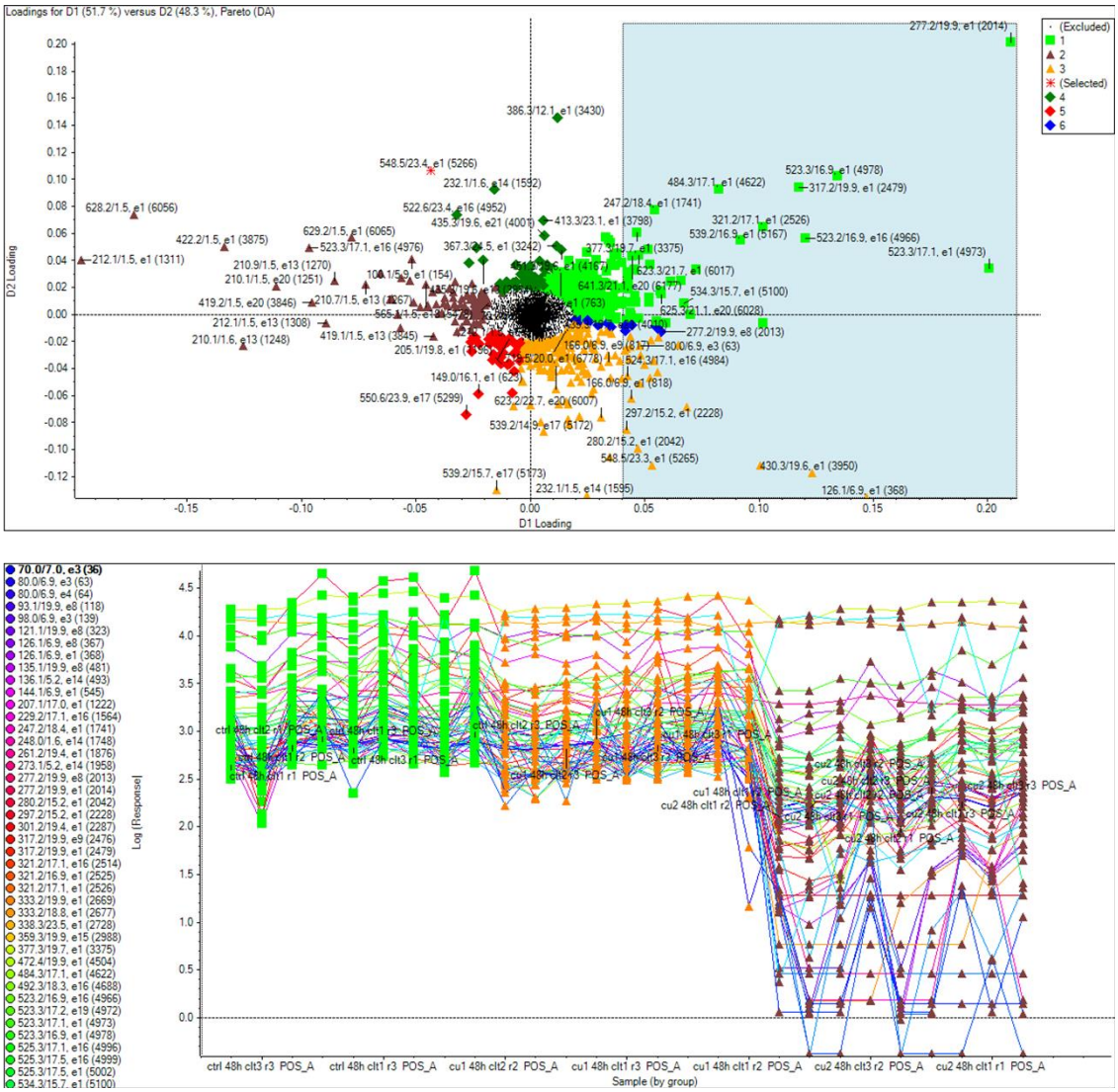


Figure 100: Séquence 2 groupe E suite représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Depuis le début des représentations statistiques, une séparation entre les expositions durant 2 heures et 48 heures a été observée. Les échantillons contrôles des deux expérimentations ne devraient cependant pas présenter de différences car, hormis le temps d'exposition, ils sont dans un milieu de culture et de conditions semblables. C'est pour cette raison que le groupe F compare ces deux types d'échantillons. La PCA révèle une répartition homogène des deux groupes dans la représentation statistique non supervisée (graphique 1 figure 101). La PCA-DA révèle une plus grande homogénéité dans les échantillons de l'expérimentation de 2h, contrairement à celle de 48h. De plus, les variables séparant ces deux types d'échantillons sont davantage exprimées pour l'exposition de 48h.

L'hypothèse serait que la durée d'expérimentation va influer sur la variabilité biologique des échantillons. Il est donc important de séparer les expérimentations portant sur une adaptabilité de la réponse métabolique des algues pendant un laps de temps plus grand, et la réponse métabolomique en cas de conditions de stress élevé sur un court laps de temps.

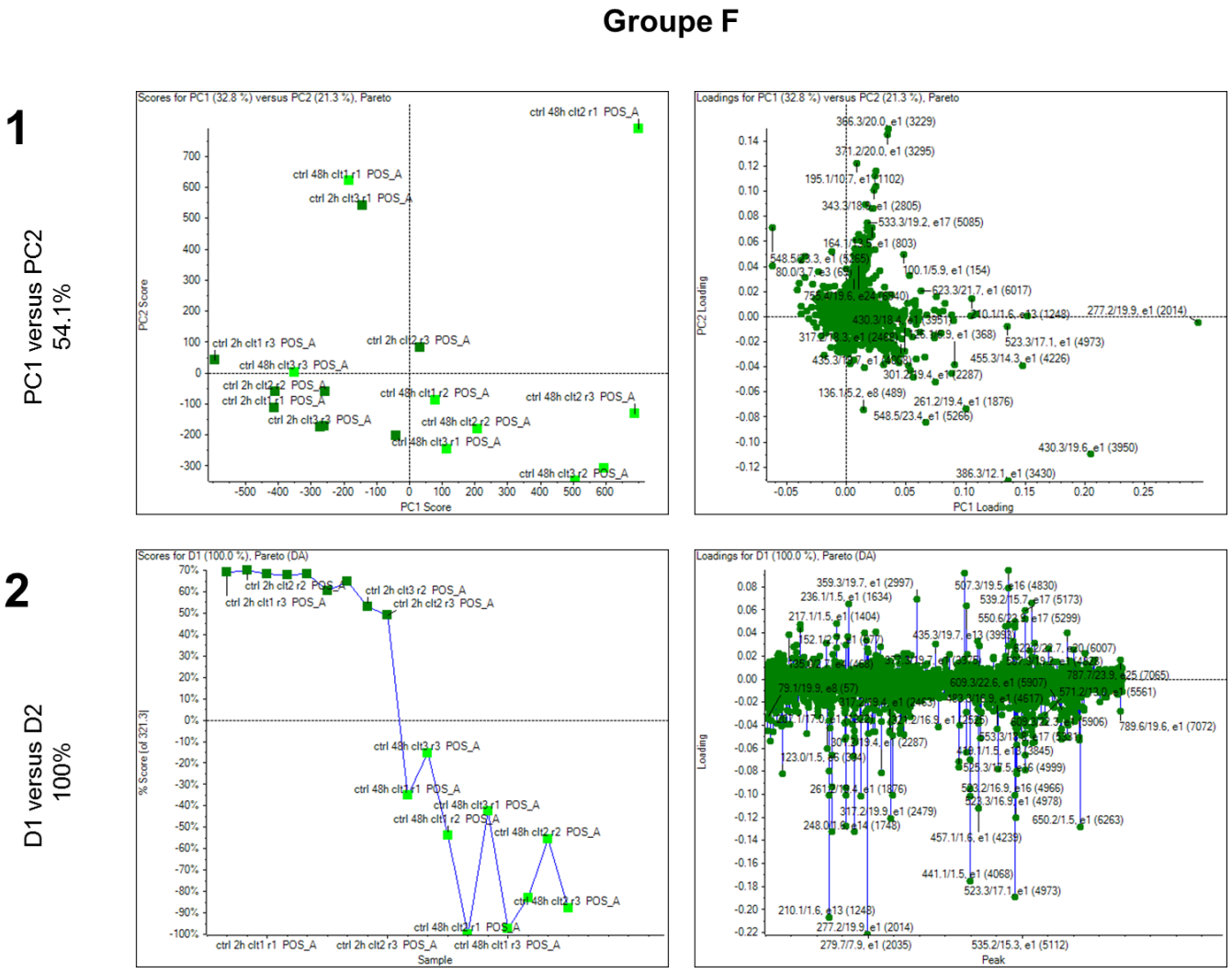


Figure 101: Séquence 2 groupe F représentations statistiques des échantillons à gauche (scores) et des variables à droite (loadings) des analyses réalisées en mode positif et selon des conditions chromatographiques acides

Les variables mises en évidence par cette représentation (graphique 2 figure 101) peuvent amener à des conclusions biologiques et doivent faire l'objet d'analyses plus approfondies.

Identification des variables mises en évidence par l'analyse statistique pour les échantillons exposés au cuivre pendant 48h

92 variables ont été extraites des analyses statistiques effectuées. Le détail de celles-ci peut être consulté en annexe. Le nombre de variables est réduit à 22 en éliminant tout d'abord les variables ayant un temps de rétention et des valeurs de *m/z* équivalents (en jaune sur le tableau). Les variables utilisées appartiennent uniquement à des fenêtres SWATH (expérience à partir du numéro 2, voir tableau 10. Ces variables sont ensuite retenues seulement si elles appartiennent à la fenêtre Q1 déterminée. En effet si un *m/z* est inférieur à la fenêtre de masse sélectionnée, cela indique que c'est un fragment provenant d'un autre composé précurseur. Les composés sélectionnés, mais provenant de l'expérience 1, c'est-à-dire TOF-MS, ne contiennent pas d'information structurale de la molécule. En outre, si cette molécule est vraiment essentielle pour le modèle, elle aura aussi été extraite dans la fenêtre d'intérêt SWATH.

Tableau 10: Fenêtres SWATH

Expérience MS n°	Fenêtre SWATH [*m/z*]
2	80-110
3	109-140
4	139-170
5	169-200
6	199-230
7	229-260
8	259-290
9	289-320
10	319-350
11	349-380
12	379-410
13	409-440
14	439-470
15	469-500
16	499-530
17	529-560
18	559-590
19	589-620
20	619-650
21	649-680
22	679-710
23	709-740
24	739-770
25	769-800

Le tableau ci-dessus résume les fenêtres utilisées pour l'aquisition MS. Ce sont des fenêtres fixes avec 31 Da de largeur. Un recouvrement de 1 dalton est effectué avec les fenêtres adjacentes. Une variable déterminée dans la liste d'intérêt est notée par exemple de la manière suivante : 300/12.5 e20. Cela fait référence à un *m/z* de 300, déterminé à un temps de rétention de 12.5 minutes et extrait de l'expérience MS 20. L'expérience MS 20 laisse passer en Q1 les ions ayant un *m/z* allant de 619 à 650. Cet ion est donc forcément un fragment d'une molécule ayant une masse supérieure. Le but de la recherche est de trouver la molécule parente qui est importante pour la recherche de biomarqueurs. L'identification du *m/z* 300 n'a pas d'intérêt premier, car il peut appartenir à de nombreuses molécules.

Tableau 11: Variables sélectionnées pour une recherche de formules moléculaires

Index	Nom du pic	Expérience MS	Groupe	*m/z*	Temps de rétention	Type de pic (selon le logiciel MarkerView)	Remarque / Proposition de formule moléculaire
80	557.3/12.9, e17 (5397)	17	1	557.2547	12.9	[M+H]+	Isotope de 555.2411*m/z*
78	555.2/13.0, e17 (5363)	17	1	555.2411	13.0	[M+K]+, [M+H]+ (517.2638)	Composé Chloré pas de formule proposée
84	571.2/13.0, e18 (5560)	18	1	571.2152	13.0	[M+H]+	Composé Chloré pas de formule proposée
67	537.2/14.4, e17 (5139)	17	1	537.2292	14.4	[M+K]+, [M+H]+ (499.2544)	Composé Chloré pas de formule proposée
72	540.2/16.8, e17 (5183)	17	1	540.2282	16.9	[M+NH4]+, [M+H]+ (523.2490)	Adduit de 523.2490*m/z* ou Isotope de 539.2226*m/z*
59	523.2/16.9, e16 (4966)	16	1	523.2490	16.9	[M+H]+, [M+NH4]+ (540.2282), [M+CH3OH+H]+ (555.2207)	Proposition de formule: C20H43O13P (-2.7;9.8;5.8) ou [M+Na]+
68	539.2/16.9, e17 (5164)	17	1	539.2226	16.9	[M+H]+	Proposition de formule : C23H34N6O7S (1.8;-3.8;3.1) ou [M+K]+
64	525.3/17.5, e16 (4999)	16	1	525.2671	17.5	[M+H]+, [M+NH4]+ (542.2456), [M+CH3OH+H]+ (557.2381)	Proposition de formule : C26H35N7O5 (1.1;-4.4;-9.3)
76	553.3/18.8, e17 (5331)	17	1	553.2982	18.8	[M+NH4]+, [M+H]+ (536.3344)	Proposition de formule : C20H47N10P3S (1.5;-2.9;1.8)
90	625.3/21.1, e20 (6028)	20	1	625.2643	21.1	[M+H]+, [M+Na]+ (647.2468), [M+K]+ (663.2364)	Proposition de formule : C28H48N6P4S (2.5;2.2;0.1)
87	623.3/21.7, e20 (6011)	20	1	623.2501	21.7	[M+H]+, [M+Na]+ (645.2311)	Proposition de formule : C29H47N4OP5 (-1.7;-6.7;4.4)
92	645.2/21.7, e20 (6225)	20	1	645.2317	21.7	[M+Na]+, [M+H]+ (623.2516)	Adduit sodium de 623.2501*m/z*
75	553.2/22.7, e17 (5327)	17	1	553.2438	22.7	[M+CH3OH+H]+, [M+H]+ (521.2554), [M+NH4]+ (538.2571), [M+K]+ (559.2349)	Proposition de formule: C32H40O4S2 (-7.4;4.9) ! Faible intensité
63	525.3/17.1, e16 (4996)	16	3	525.2577	17.1	[M+H]+, [M+K]+ (563.1812)	Isotope de 523.2515*m/z*
86	609.3/22.3, e19 (5905)	19	3	609.2697	22.3	[M+H]+, [M+Na]+ (631.2517), [M+CH3OH+H]+ (641.2636)	Proposition de formule : C38H40O3P2 (1.9;-3.4;8.0)
85	607.3/22.4, e19 (5886)	19	3	607.2559	22.4	[M+H]+, [M+Na]+ (629.2373), [M+CH3OH+H]+ (639.2470), [M+K]+ (645.2306)	Proposition de formule : C30H48N2O3P4 (-4.2;6.7)
73	540.2/15.7, e17 (5187)	17	6	540.2491	15.7	[M+H]+	Isotope de 539.2464*m/z*
31	277.2/19.9, e8 (2013)	8	6	277.2162	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (299.1973), [M+K]+ (315.1631)	Aucune proposition de formule moléculaire !
39	317.2/19.9, e9 (2476)	9	6	317.2083	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (339.1902), [M+K]+ (355.1615), [2M+Na]+ (655.3902), [2M+K]+ (671.3534)	Proposition de formule : C16H24N6O (-4.2;6.7)
88	623.3/21.4, e20 (6014)	20	6	623.2512	21.4	[M+H]+, [M+NH4]+ (640.3189), [M+Na]+ (645.2334), [M+CH3OH+H]+ (655.2759)	Variable équivalente à 623.2501*m/z*
19	210.1/1.5, e6 (1253)	6	2	210.0787	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (232.0611), [M+K]+ (248.0352), [2M+K]+ (457.1084)	Aucune proposition de formule moléculaire ! / C9H12N3OP (MasterView)
82	563.1/1.5, e18 (5456)	18	2	563.0850	1.5	[M+H]+	Aucune proposition de formule moléculaire !

Le tableau 6 résume les différentes variables mises en évidence par les analyses statistiques pour l'exposition au cuivre de 48h, et tirées de la PCVG du groupe E de la séquence 2.

Les variables ont été introduites dans le logiciel MasterView pour une comparaison des spectres expérimentaux avec ceux contenus dans la librairie. Malheureusement, aucune identification n'a pu être déterminée.

Les cases jaunes pour les ions 523 et 623 *m/z* font référence à des espèces de types $[M+H]^+$. En effet, des adduits sont aussi présents dans la liste. Parmi eux, l'adduit $[M+NH_4]^+$ pour l'ion 523 *m/z* et un adduit sodium pour l'ion 623 *m/z*. La présence d'adduits dans la liste sélectionnée est une preuve de la qualité de ces variables pour l'explication du traitement statistique. En effet, les adduits se comportent de la même manière et vont eux aussi aider à séparer l'analyse statistique effectuée en composante principale.

Les cases grises mettent en évidence des temps de rétention proches avec une différence inférieure à 0.1 minute, ce qui évoque la possibilité d'adduits.

Le logiciel MarkerView propose une assignation des *m/z* s'il trouve d'autres ions qui pourraient leur être associés. Cependant, ce logiciel n'est pas spécialisé dans l'identification des *m/z* et peut proposer des assignations erronnées. C'est pourquoi le logiciel Formula Finder est utilisé afin de déterminer une formule moléculaire.

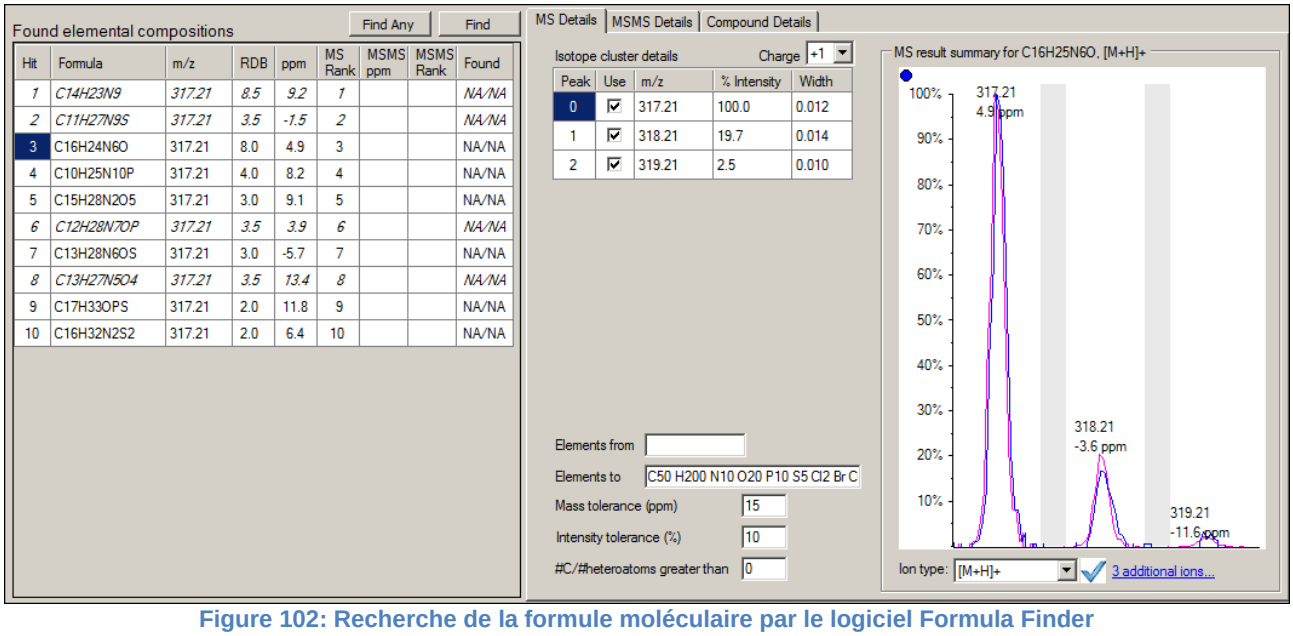


Figure 102: Recherche de la formule moléculaire par le logiciel Formula Finder

Les *m/z* 555 et 557 appartiennent au même composé qui est doit être un composé chloré au vu de l'abondance isotopique. Cependant, aucune identification n'a pu être réalisée pour ces composés. Il est en de même pour les *m/z* 571 et 573. La différence de masse étant de 16, il pourrait s'agir d'une perte d'oxygène. Le *m/z* 555 peut faire référence au $[M+Na]^+$ et le *m/z* 571 à $[M+K]^+$. Aucun *m/z* ayant la même répartition d'abondance isotopique n'est identifié pour un $[M+H]^+$ de 533 *m/z*. La figure suivante illustre les spectres de masse obtenus pour ces deux espèces.

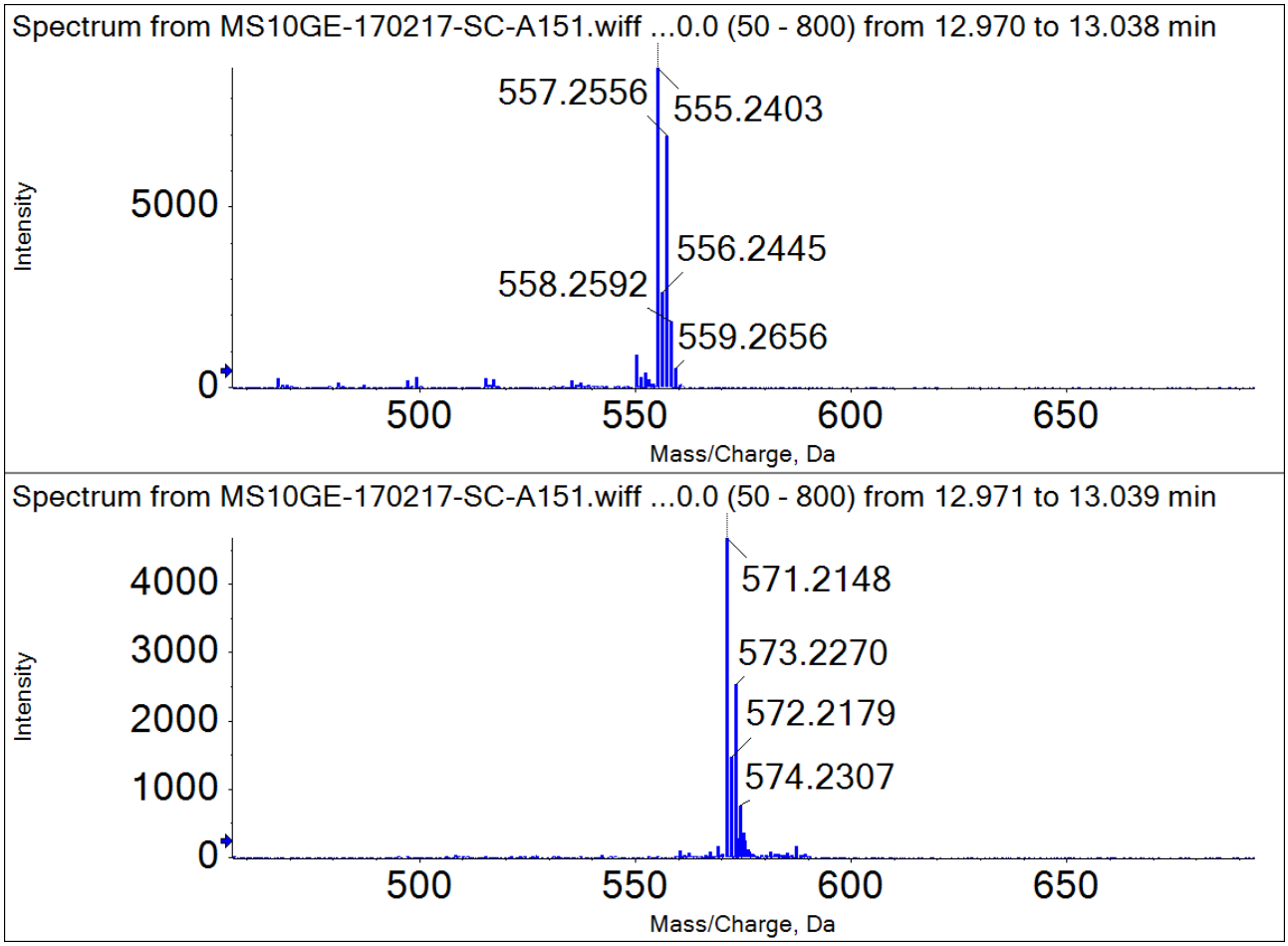


Figure 103: Spectres des *m/z* 555.2 et 571.2

La variable 210.1 peut être identifiée selon la formule moléculaire de $C_7H_{15}NO_4S$. Cette formule fait référence au MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), un tampon couramment utilisé. Le milieu de culture contient du 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.

L'absence d'identification formelle des variables exprimées par les analyses statistiques ne permet pas de mettre en évidence de molécule ou métabolite à partir des variables décelées. C'est pourquoi le risque existe que ces variables soient dues à un biais méthodologique induit lors de l'expérimentation. Par exemple, le cuivre pourrait être contaminé et donc amener à un résultat erroné, ou alors une étape de pipetage supplémentaire pourrait apporter une quantité croissante de contaminants.

Tant que les molécules ne seront pas formellement identifiées, il n'est pas possible de conclure à une mise en évidence de biomarqueurs. L'augmentation de la concentration de ceux-ci peut aussi avoir d'autres influences qui n'auraient pas été détectées à ce jour. Il est enfin important de rappeler que la préparation d'échantillons ne permet pas de séparer un compartiment cellulaire spécifique, et regroupe l'ensemble les petites molécules présentes dans l'algue.

Bien que des douzaines de gènes codent pour des protéines impliquées dans la régulation du cuivre, trois protéines semblent être suffisamment abondantes. Celles-ci sont les plastocyanines localisées dans le chloroplaste, les ferroxydases dans la membrane plasmique, ainsi que les cytochromes oxydases dans les mitochondries [21]. Les plastoyanines sont impliquées dans le transport des électrons dans la photosynthèse, les ferroxydases dans la haute affinité de la prise du fer, et les cytochromes oxydases dans les fonctions respiratoires des mitochondries [22]. Il faudrait donc comparer les métabolites associés à ces cascades avec la liste des variables identifiées. Enfin, parmi les variables identifiées, nombre d'entre elles semblent contenir au moins une molécule de chlore, qui est un élément rarement présent dans les métabolites biologiques.

Le manque de librairie de qualité alliant la haute résolution à la fragmentation, et à des conditions expérimentales décrites, péjore le travail de recherche et d'identification des variables obtenues. Ce thème sera abordé de façon plus détaillée dans le chapitre 4.

Enfin, il est important de noter l'avantage de l'utilisation du SWATH pour des recherches non ciblées. En effet, il est toujours possible de retravailler les données sans pour autant subir une perte d'information. Cette méthode d'acquisition évite aussi de devoir mener une nouvelle série d'analyses. Par exemple, si une hypothèse venait à émerger concernant une voie métabolique particulière, les données peuvent être étudiées selon ce nouvel angle d'approche. Il est aussi possible d'identifier les adduits, car l'analyse ne se résume

pas à deux transitions unitaires (de type SRM, QqQ). L'apport de la haute résolution pour l'identification des fragments, ainsi que de l'abondance isotopique, permet de déterminer dans le meilleur des cas, une formule moléculaire. Tous ces avantages ont cependant un coût en ce qui concerne la complexité des données, à cause de l'acquisition de spectres de fragments composites. Cela peut mener à des conclusions erronées. C'est pourquoi l'utilisation d'une technique transversale telle que la chromatographie liquide est essentielle pour amener une dimension supplémentaire à l'analyse. La problématique de la rétention des composés polaires est abordée dans le chapitre 3.

Un problème rencontré lors des analyses SWATH est lié à l'utilisation de standards marqués de composés endogènes qui se retrouvent dans la même fenêtre SWATH, et qui ne peuvent donc plus être quantifiés (fragments identiques). Les métabolites ont en outre souvent des formes similaires (exemple guanosine/desoxyguanosine) avec une différence de masse faible, mais présentant des ions fragments similaires. Il est donc extrêmement important d'être vigilant dans le traitement des données et de favoriser les fragments les plus spécifiques aux molécules d'intérêt. La variation de la taille des fenêtres SWATH est abordée dans la partie 4 de cette thèse.

Identification des métabolites via la base de données AMML

Les données ont été insérées dans le logiciel Masterview qui est une sous-unité du logiciel PeakView. Ce logiciel permet, via une base de données développée en interne, d'attribuer un score d'identification des métabolites selon plusieurs critères. Les détails du développement de cette base de données peuvent être consultés à la référence [23]. Les paramètres et les particularités de ce logiciel sont résumés dans le chapitre introductif de la thèse. Cette base de données est de haute qualité car, étant effectuée à l'aide de la haute résolution, elle permet la comparaison des spectres expérimentaux avec des spectres de référence. Les ions fragments, de même que leur abondance, sont exploités dans cette partie. La détermination des isotopes, ainsi que l'erreur de masse, sont autant de critères qui garantissent une identification de qualité. L'identification des molécules est réalisée sur un minimum de deux pics. Malheureusement, les pics ne présentant pas de fragmentation (SIM/SIM) sont écartés, sauf s'ils sont retrouvés dans le mode opposé qui, lui, possède des fragments, et dont le temps de rétention est similaire.

Les temps de rétention sont d'ailleurs connus pour l'ensemble de la librairie, et le même système chromatographique a été utilisé (colonnes, phases mobiles). Cette possibilité n'a cependant pas été utilisée dans le cas présent.

L'ensemble des métabolites identifiés est illustré dans les figure 104 pour le mode positif, et 105 pour le mode négatif. Le pourcentage indiqué à coté de chaque métabolite est le taux d'identification de ce métabolite parmi les réplicats biologiques et techniques.

Les éléments marqués en jaune sont les standards ajoutés lors de la reconstitution des échantillons. L'acétaminophen et le vérapamil devraient obtenir un taux de 100% dans le cas idéal, pour le mode positif, et uniquement l'acétaminophen obtiendrait ce score pour le mode négatif. Les composés qui sont mis en évidence en bleu sont ceux présents uniquement dans les échantillons. Ceux qui ne sont pas bleutés se trouvent aussi dans les blancs techniques.

Les métabolites qui apparaissent en rouge se trouvent être présents à la fois dans le mode positif et négatif. L'acide glychocholique et pyroglutamique sont identifiés dans les blancs pour le mode négatif, mais uniquement dans les échantillons pour le mode positif.

Blancs	% sur n=6 réplicats
2-Piperidinone	83%
2-Pyrrolidinone	100%
Acetaminophen	100%
Adenine	83%
Betaine	17%
Glycerophosphocholine	67%
Niacinamide	67%
Phthalic acid	17%
Senecioic acid	17%
Verapamil	17%

Ctrl 2h	% sur n=9 réplicats
2-Piperidinone	78%
2-Pyrrolidinone	78%
5'-Methylthioadenosine	22%
Acetaminophen	89%
Adenine	56%
Adenosine monophosphate	67%
Betaine	33%
Glycerophosphocholine	56%
Glycocholic acid	11%
Hippuric acid	11%
L-Carnitine	22%
L-Proline	44%
Niacinamide	89%
Phthalic acid	56%
Pyroglutamic acid	22%
Verapamil	67%

CuA	% sur n=9 réplicats
2-Piperidinone	67%
2-Pyrrolidinone	67%
5'-Methylthioadenosine	22%
Acetaminophen	67%
Adenine	67%
Adenosine monophosphate	89%
Betaine	33%
Glycerophosphocholine	11%
L-Arginine	11%
Niacinamide	33%
Phthalic acid	44%
Senecioic acid	22%
Verapamil	100%

Ctrl 48h	% sur n=9 réplicats
2-Piperidinone	56%
2-Pyrrolidinone	56%
3-Phenylbutyric acid	11%
5'-Methylthioadenosine	44%
Acetaminophen	78%
Adenine	56%
Adenosine monophosphate	100%
Alpha-Linolenic acid	56%
Betaine	56%
Glycerophosphocholine	67%
Glycocholic acid	33%
L-Arginine	11%
L-Carnitine	33%
L-Proline	22%
Niacinamide	44%
Phthalic acid	56%
Pyroglutamic acid	11%
Senecioic acid	22%
Theobromine	11%
Verapamil	67%

Cu1	% sur n=9 réplicats
2-Piperidinone	89%
2-Pyrrolidinone	78%
5'-Methylthioadenosine	67%
7-Ketocholesterol	11%
Acetaminophen	100%
Adenine	78%
Adenosine monophosphate	89%
Alpha-Linolenic acid	44%
Betaine	56%
Glycerophosphocholine	78%
Glycocholic acid	56%
L-Arginine	22%
L-Carnitine	11%
L-Norleucine	22%
L-Proline	33%
L-Tyrosine	11%
Niacinamide	89%
Phthalic acid	78%
Verapamil	89%

Cu2	% sur n=9 réplicats
2-Piperidinone	44%
2-Pyrrolidinone	56%
5'-Methylthioadenosine	11%
Acetaminophen	67%
Adenine	67%
Adenosine monophosphate	67%
Betaine	11%
Glycerophosphocholine	33%
Glycocholic acid	33%
L-Carnitine	11%
L-Proline	11%
Niacinamide	44%
Phthalic acid	33%
Theobromine	11%
Verapamil	56%

Figure 104: Idenfication par le logiciel MasterView de mode d'acquisition positif avec une chromatographie acide

Les métabolites identifiés pour chacun des groupes d'échantillons en ce qui concerne le mode positif sont présentés à la figure ci-dessus (figure 104). Le nombre de réplicats est de 9 (trois cultures et trois prélèvements par culture, réplicats biologiques et techniques) et celui-ci est de 6 en ce qui concerne les blancs.

Concernant les scores d'identification des standards internes, le vérapamil semble être plus difficilement identifiable par la librairie que l'acétaminophen, les scores étant plus élevés pour ce dernier. Aucune explication ne peut être donnée sur ce point, car les conditions de traitement par l'algorithme du logiciel MasterView sont équivalentes pour tous les échantillons. Une possibilité pourrait être la complexité des spectres obtenus dans les fenêtres SWATH de référence. Bien qui l'algorithme utilisé pour la recherche libraire soit « fit » (voir détails du logiciel, chapitre 1), l'augmentation du bruit de fond diminue le score, et donc la probabilité de détection de l'analyte.

Blancs	% sur n=6 réplicats
1,11-Undecanedicarboxylic acid	56%
2-Chlorobenzoic acid	11%
2-Hydroxycaproic acid	11%
3-Methyladipic acid	22%
Acetaminophen	67%
Adenine	56%
Azelaic acid	67%
Glycocholic acid	22%
Hexadecanedioic acid	33%
L-Phenylalanine	22%
m-Chlorobenzoic acid	67%
Pyroglutamic acid	56%
Sebacic acid	67%
Suberic acid	67%
Tetradecanedioic acid	22%
Undecanedioic acid	67%
Urocanic acid	11%

Ctrl 2h	% sur n=9 réplicats
1,11-Undecanedicarboxylic acid	44%
2-Hydroxycaproic acid	11%
3-Hydroxybenzoic acid	33%
3-Methyladipic acid	44%
5-Phenylvaleric acid	11%
6-Hydroxynicotinic acid	11%
Acetaminophen	100%
Adenine	89%
Adenosine monophosphate	100%
Aminoadipic acid	22%
Azelaic acid	100%
Citric acid	22%
Guanosine	89%
Hexadecanedioic acid	56%
L-Glutamic acid	22%
L-Phenylalanine	56%
L-Tryptophan	11%
L-Tyrosine	44%
m-Chlorobenzoic acid	100%
Methylglutaric acid	33%
Sebacic acid	100%
Suberic acid	100%
Sucrose	56%
Tetradecanedioic acid	67%
Undecanedioic acid	100%
Uridine	100%

CuA	% sur n=9 réplicats
1,11-Undecanedicarboxylic acid	44%
2,2-Dimethylsuccinic acid	44%
2-Hydroxybutyric acid	44%
3-Hydroxybenzoic acid	44%
3-Methyladipic acid	44%
4-Hydroxyproline	44%
Acetaminophen	100%
Adenine	67%
Adenosine monophosphate	100%
Azelaic acid	100%
Guanosine	44%
Hexadecanedioic acid	89%
L-Phenylalanine	22%
m-Chlorobenzoic acid	67%
Methylglutaric acid	11%
Sebacic acid	100%
Suberic acid	100%
Sucrose	22%
Tetradecanedioic acid	33%
Traumatic acid	22%
Undecanedioic acid	100%
Uridine	100%
Urocanic acid	22%

Ctrl 48h	% sur n=9 réplicats
2-Ethyl-2-Hydroxybutyric acid	11%
2-Hydroxycaproic acid	11%
2-Methylglutaric acid	11%
3-Hydroxybenzoic acid	11%
3-Methyladipic acid	22%
4-Hydroxybenzoic acid	11%
Acetaminophen	100%
Adenine	89%
Adenosine	11%
Adenosine monophosphate	100%
Azelaic acid	100%
Citric acid	11%
Deoxyguanosine	11%
Hexadecanedioic acid	44%
Hippuric acid	11%
L-Glutamic acid	56%
L-Phenylalanine	78%
L-Tryptophan	33%
L-Tyrosine	22%
m-Chlorobenzoic acid	100%
Methylglutaric acid	22%
Mevalonic acid	11%
Sebacic acid	100%
Suberic acid	89%
Tetradecanedioic acid	44%
Traumatic acid	11%
Undecanedioic acid	100%
Uridine	78%
Urocanic acid	11%

Cu2	% sur n=9 réplicats
1,11-Undecanedicarboxylic acid	44%
2,2-Dimethylsuccinic acid	11%
2-Methylglutaric acid	33%
3-Methyladipic acid	22%
4-Hydroxy-3-methylbenzoic acid	11%
5-Phenylvaleric acid	11%
Acetaminophen	100%
Adenine	100%
Adenosine monophosphate	89%
Azelaic acid	100%
Citric acid	33%
Glyceric acid	11%
Guanosine	33%
Hexadecanedioic acid	78%
Hippuric acid	11%
L-Phenylalanine	22%
L-Tryptophan	22%
L-Tyrosine	33%
m-Chlorobenzoic acid	78%
Methylglutaric acid	33%
p-Anisic acid	11%
Pimelic acid	22%
Sebacic acid	100%
Suberic acid	100%
Tetradecanedioic acid	44%
trans-Cinnamic acid	11%
Undecanedioic acid	100%
Uridine	100%
Uridine diphosphate glucose	56%

Cu1	% sur n=9 réplicats
1,11-Undecanedicarboxylic acid	11%
2-Hydroxycaproic acid	11%
3-Hydroxybenzoic acid	11%
3-Methyladipic acid	44%
4-Hydroxybenzoic acid	11%
Acetaminophen	100%
Adenine	100%
Adenosine monophosphate	100%
Azelaic acid	100%
Citric acid	22%
Hexadecanedioic acid	56%
Hippuric acid	33%
L-Glutamic acid	44%
L-Phenylalanine	44%
L-Tryptophan	22%
L-Tyrosine	22%
m-Chlorobenzoic acid	100%
Methylglutaric acid	67%
Sebacic acid	100%
Suberic acid	100%
Succinic acid	11%
Tetradecanedioic acid	56%
Undecanedioic acid	100%
Uridine	100%
Uridine diphosphate glucose	11%

Figure 105: Idenfication par le logiciel MasterView de mode d'acquisition négatif avec une chromatographie acide

L'acétaminophen est mieux identifié par l'analyse en mode négatif que par l'analyse en mode positif. Les scores sont de 100% pour tous les échantillons, sauf pour les blancs dont le score est de 67% (4 sur 6). Il est reconnu que les analyses en mode négatif produisent moins de bruit, et donc permettent une meilleure identification. Le nombre de composés est aussi augmenté pour ce mode d'analyse. De nombreux composés sont cependant identifiés dans 1 ou 2 échantillons. Ceci pourrait impliquer une variabilité d'expression de ces métabolites entre les différents échantillons du même groupe.

La figure suivante (figure 106) reprend uniquement les composés identifiés dans les échantillons pour le mode positif. Ils sont au nombre de 14.

n°	Résumé des composés présents dans les échantillons biologiques Mode Positif
1	3-Phenylbutyric acid
2	5'-Methylthioadenosine
3	7-Ketocholesterol
4	Adenosine monophosphate
5	Alpha-Linolenic acid
6	Glycocholic acid
7	Hippuric acid
8	L-Arginine
9	L-Carnitine
10	L-Norleucine
11	L-Proline
12	L-Tyrosine
13	Pyroglutamic acid
14	Theobromine

Figure 106: Mode positif, métabolites identifiés

La figure suivante (figure 107) illustre uniquement les composés identifiés dans les échantillons pour le mode négatif. Leur nombre est plus important que pour le mode positif et est de 25 composés. Le total est de 26 composés identifiés (3 composés sont communs) pour le mode positif et négatif des analyses utilisant une chromatographie liquide dans des conditions acides.

n°	Résumé des composés présents dans les échantillons biologiques Mode Négatif
1	2,2-Dimethylsuccinic acid
2	2-Ethyl-2-Hydroxybutyric acid
3	2-Methylglutaric acid
4	3-Hydroxybenzoic acid
5	4-Hydroxybenzoic acid
6	4-Hydroxyproline
7	5-Phenylvaleric acid
8	6-Hydroxynicotinic acid
9	Adenosine
10	Adenosine monophosphate
11	Aminoadipic acid
12	Citric acid
13	Deoxyguanosine
14	Guanosine
15	Hippuric acid
16	L-Glutamic acid
17	L-Tryptophan
18	L-Tyrosine
19	Methylglutaric acid
20	Mevalonic acid
21	Succinic acid
22	Sucrose
23	Traumatic acid
24	Uridine
25	Uridine diphosphate glucose

Figure 107: Mode négatif, métabolites identifiés

Trois composés sont identifiés en mode positif et négatif, il s'agit de l'adénosine monophosphate, l'acide hippurique ainsi que la l-tyrosine.

	n°	Nom du métabolite	Masse du précurseur [Da]	Ion produit [Da]	Fenêtre SWATH n°
Composés présents dans les échantillons	1	3-Phenylbutyric acid_POS	165.1	105.07	4
	2	5'-Methylthioadenosine_POS	298.10	136.06	9
	3	7-Ketocholesterol_POS	401.34	383.33	12
		7-Ketocholesterol_POS_2	401.34	365.32	
	4	Adenosine monophosphate_POS	248.07	136.06	7
		Adenosine monophosphate_POS_2	248.07	119.03	
	5	Alpha-Linolenic acid_POS	279.23	67.05	8
	6	Glycocholic acid_POS	466.32	412.28	14
	7	Hippuric acid_POS	180.07	105.03	5
		Hippuric acid_POS_2	180.07	77.04	
	8	L-Arginine_POS	175.12	70.07	5
	9	L-Carnitine_POS	162.11	103.04	4
	10	L-Norleucine_POS	132.10	86.10	3
		L-Norleucine_POS_2	132.10	69.07	
	11	L-Proline_POS	116.07	70.06	3
	12	L-Tyrosine_POS	182.08	136.08	5
	13	Pyroglutamic acid_POS	130.05	84.04	3
	14	Theobromine_POS	181.07	138.07	5
Composés présents dans les blancs	15	2-Piperidinone_BL_POS	100.08	56.05	2
	16	2-Pyrrolidinone_BL_POS	86.06	69.03	2
	17	Acetaminophen_BL_POS	152.07	110.06	4
	18	Adenine_BL_POS	136.06	119.04	3
	19	Betaine_BL_POS	118.09	58.07	3
	20	Glycerophosphocholine_BL_POS	258.11	104.11	7
	21	Niacinamide_BL_POS	123.06	80.05	3
	22	Phthalic acid_BL_POS	167.03	149.02	4
	23	Senecioic acid_BL_POS	101.06	83.05	2
	24	Verapamil_BL_POS	455.29	165.09	14

Figure 108: Résumé des transitions et fenêtres SWATH du mode positif utilisés pour l'extraction des aires sous la courbe des pics chromatographiques

Les transitions utilisées pour la création de la méthode de quantification par le logiciel MultiQuant sont illustrées par la figure 108 pour le mode positif et 109 pour le mode négatif.

Des métabolites ont été mis en évidence par la couleur orange. La particularité de ceux-ci repose sur l'existence de composés ayant les mêmes fragments. En effet le 3 et le 4-hydroxybenzoic ne peuvent être différenciés par l'analyse MS, et il en est de même pour l'acide m et 2-chlorobenzoïque. Bien que la guanosine et la déoxyguanosine possèdent des masses différentes, elles se trouvent malheureusement dans la même fenêtre SWATH. Les fragments sont identiques. Seul un fragment est propre à la déoxyguanosine et c'est le 176.06Da. Ce fragment est cependant de faible intensité. Tous les métabolites identifiés ont été introduits dans le processus de quantification.

	n°	Nom du métabolite	Masse du précurseur [Da]	Ion produit [Da]	Fenêtre SWATH n°
Composés présents dans les échantillons	1	2,2-Dimethylsuccinic acid_NEG	145.05	101.06	4
	2	2-Ethyl-2-Hydroxybutyric acid_NEG	131.07	85.07	3
	3	2-Methylglutaric acid_NEG	145.05	101.06	4
	4	3-Hydroxybenzoic acid_NEG	137.02	93.03	3
	5	4-Hydroxybenzoic acid_NEG	137.02	93.03	3
	6	4-Hydroxyproline_NEG	130.05	128.04	3
		4-Hydroxyproline_NEG_2	130.05	84.05	
	7	5-Phenylvaleric acid_NEG	177.09	159.08	5
	8	6-Hydroxynicotinic acid_NEG	138.02	94.03	3
	9	Adenosine_NEG	266.09	134.05	8
	10	Adenosine monophosphate_NEG	346.06	134.05	10
	11	Aminoadipic acid_NEG	160.06	142.05	4
	12	Citric acid_NEG	191.02	111.01	5
	13	Deoxyguanosine_NEG	266.09	150.04	8
		Deoxyguanosine_NEG_2	266.09	176.06	
	14	Guanosine_NEG	282.08	150.04	8
	15	Hippuric acid_NEG	178.05	134.06	5
	16	L-Glutamic acid_NEG	146.05	128.04	4
	17	L-Tryptophan_NEG	203.08	116.05	6
	18	L-Tyrosine_NEG	180.07	163.04	5
	19	Methylglutaric acid_NEG	145.05	101.06	4
	20	Mevalonic acid_NEG	147.07	89.02	4
	21	Succinic acid_NEG	117.02	99.01	3
	22	Sucrose_NEG	341.11	179.06	10
	23	Traumatic acid_NEG	227.13	183.14	6
	24	Uridine_NEG	243.06	110.02	7
	25	Uridine diphosphate glucose_NEG	565.05	323.03	18
Composés présents dans les blancs	26	1,11-Undecanedicarboxylic acid_BL_NEG	243.16	225.15	7
	27	2-Chlorobenzoic acid_BL_NEG	154.99	111.00	4
	28	2-Hydroxycaproic acid_BL_NEG	131.07	85.07	3
	29	3-Methyladipic acid_BL_NEG	159.07	115.08	4
	30	Acetaminophen_BL_NEG	150.06	107.04	4
	31	Adenine_BL_NEG	134.05	107.04	3
	32	Azelaic acid_BL_NEG	187.10	125.10	5
	33	Glycocholic acid_BL_NEG	464.30	402.30	14
	34	Hexadecanedioic acid_BL_NEG	285.21	223.21	8
	35	L-Phenylalanine_BL_NEG	164.07	147.05	4
	36	m-Chlorobenzoic acid_BL_NEG	154.99	111.00	4
	37	Pyroglutamic acid_BL_NEG	128.03	82.03	3
	38	Sebacic acid_BL_NEG	201.11	139.11	6
	39	Suberic acid_BL_NEG	173.08	111.08	5
	40	Tetradecanedioic acid_BL_NEG	257.18	239.17	7
	41	Undecanedioic acid_BL_NEG	215.13	197.12	6
	42	Urocanic acid_BL_NEG	137.04	93.05	3

Figure 109: Résumé des transitions et fenêtres SWATH du mode positif utilisés pour l'extraction des aires sous la courbe des pics chromatographiques

La nomenclature mise en place et présentée dans les figures 108 et 109 fait office de référence pour la suite du traitement des données. Les lettres BL indiquent que le composé a été identifié dans les échantillons blancs. Si le nom du métabolite n'est pas suivi des lettres BL, il s'agit d'un métabolite identifié uniquement dans les échantillons.

L'intégration des aires sous la courbe de tous les échantillons et de tous les métabolites sont contrôlés. Il a été nécessaire de lisser les données afin d'améliorer l'intégration de l'aire sous la courbe. C'est le log des valeurs obtenues qui est utilisé pour les représentations suivantes et traité à l'aide du logiciel Prism.

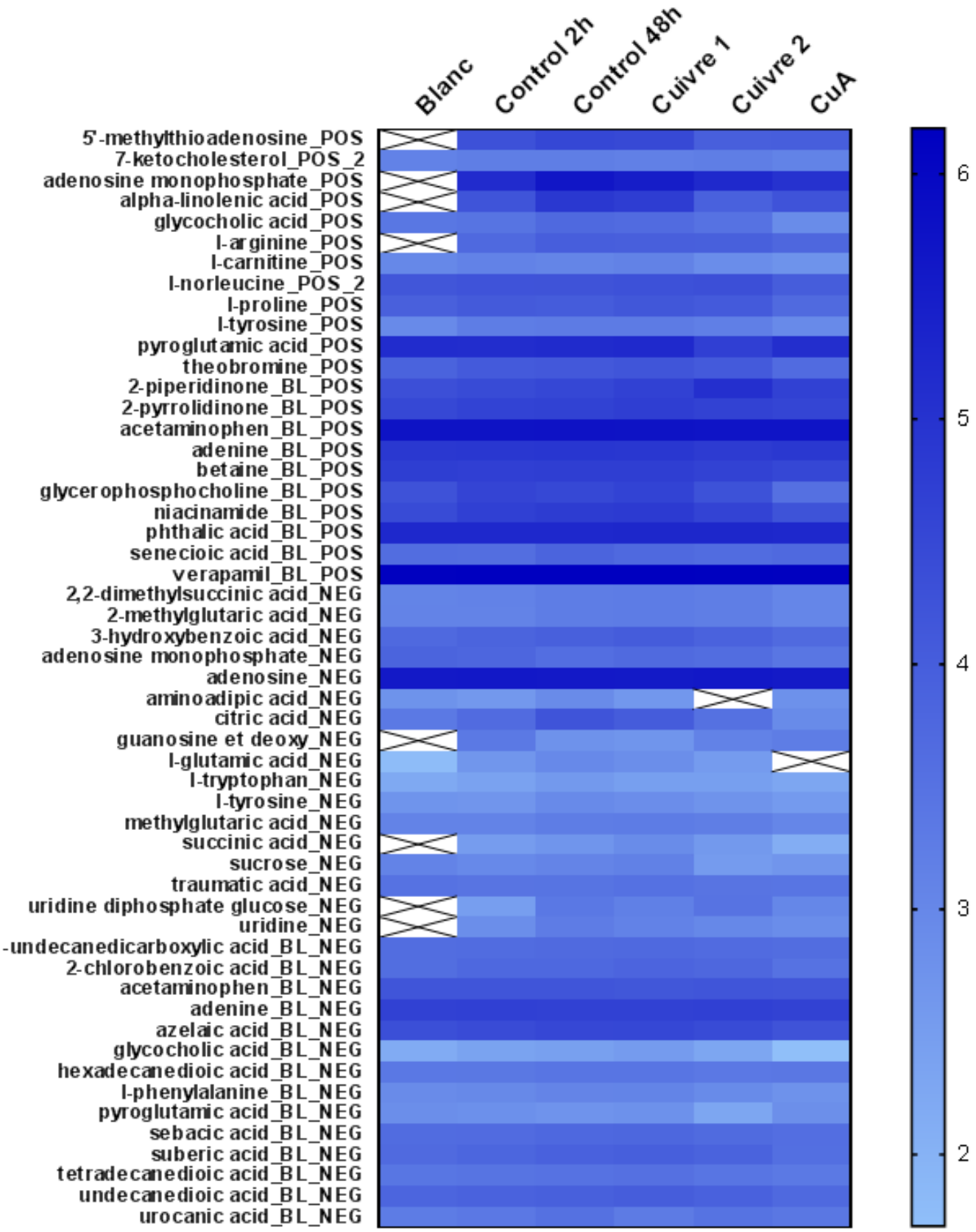


Figure 110: Heat map du logarithme de la moyenne des aires sous la courbe

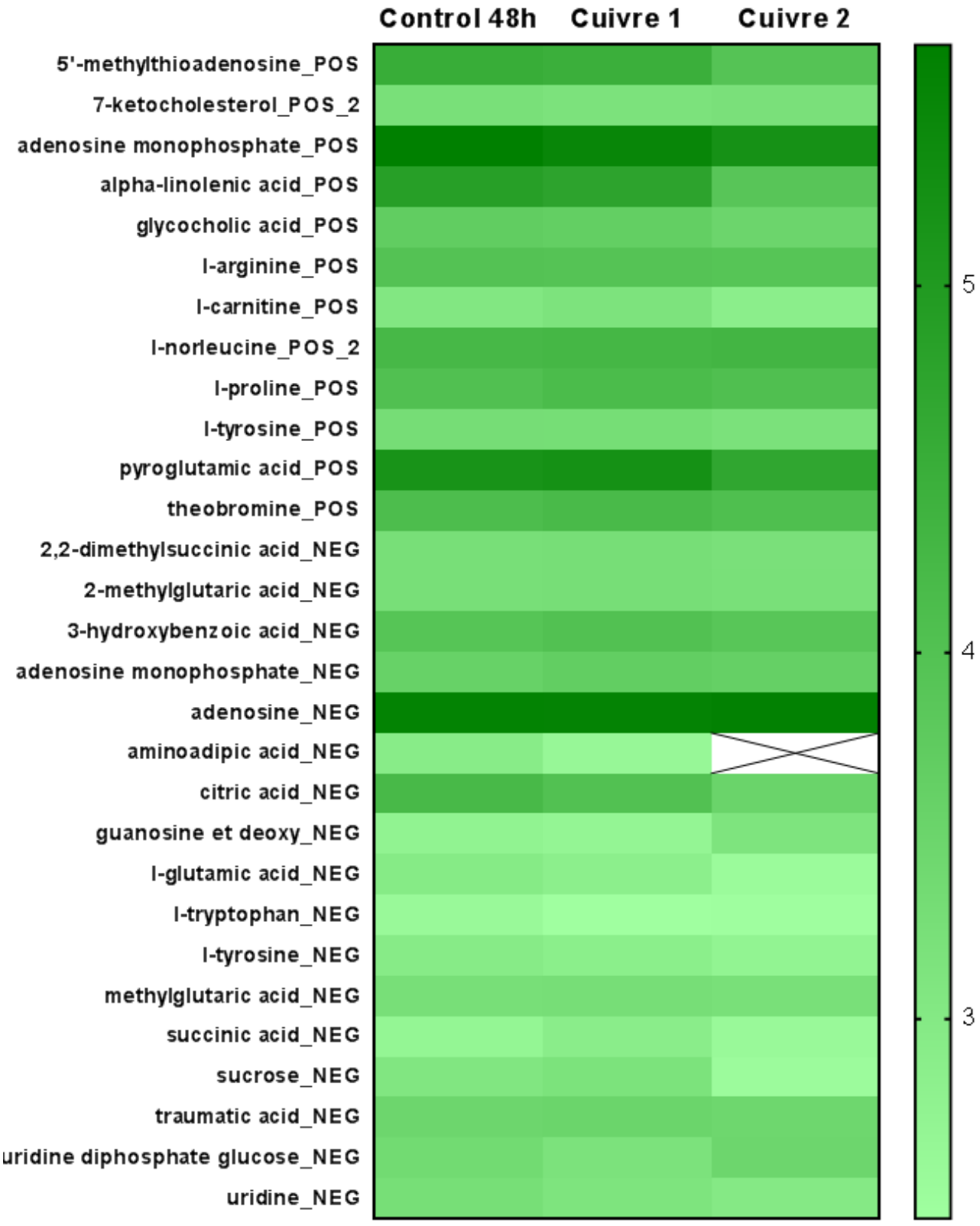


Figure 111: Heat du groupe d'échantillons appartenant à l'exposition au cuivre d'une durée de 48h

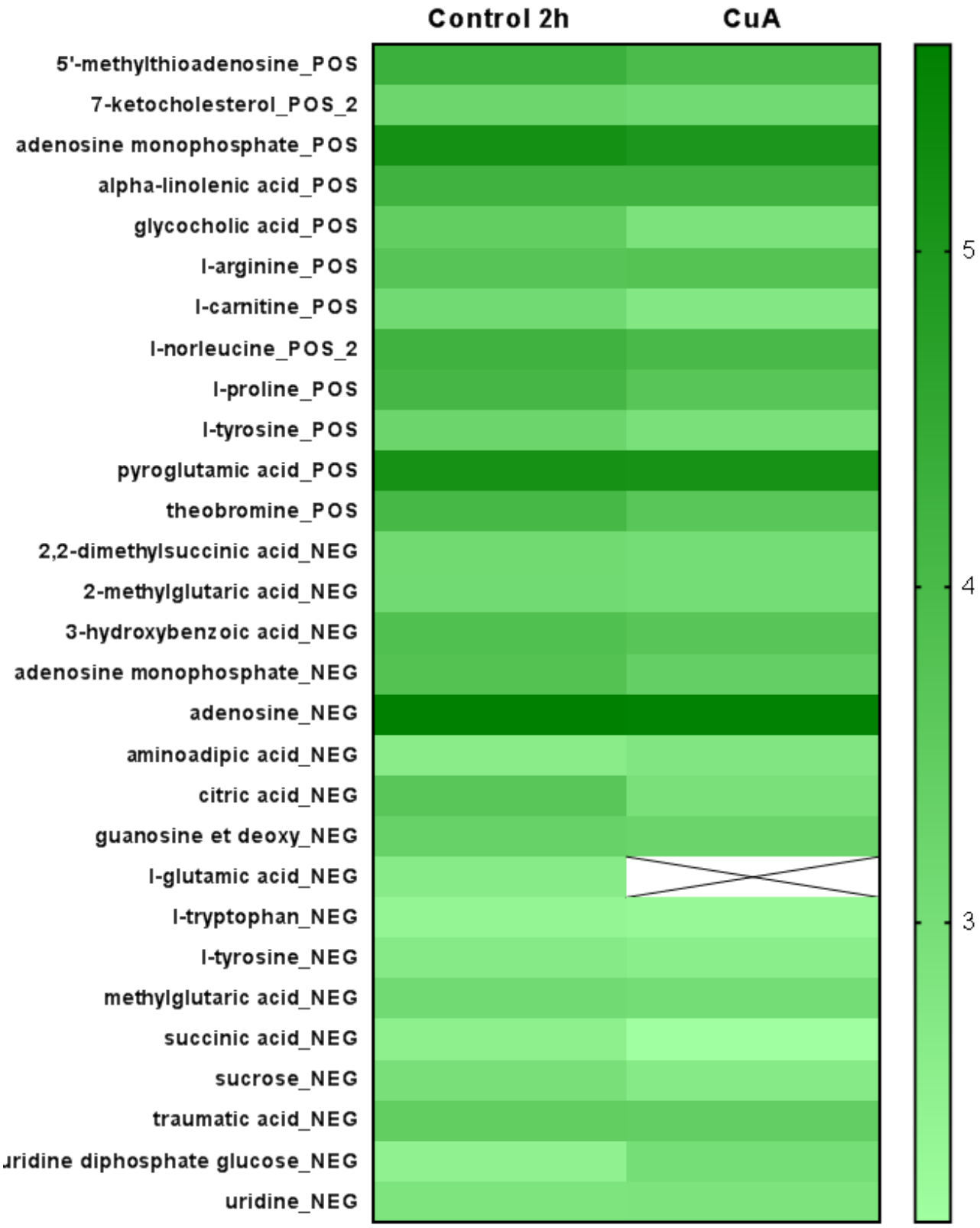


Figure 112: Heat map du groupe d'échantillons appartenant à l'exposition au cuivre d'une durée de 2h

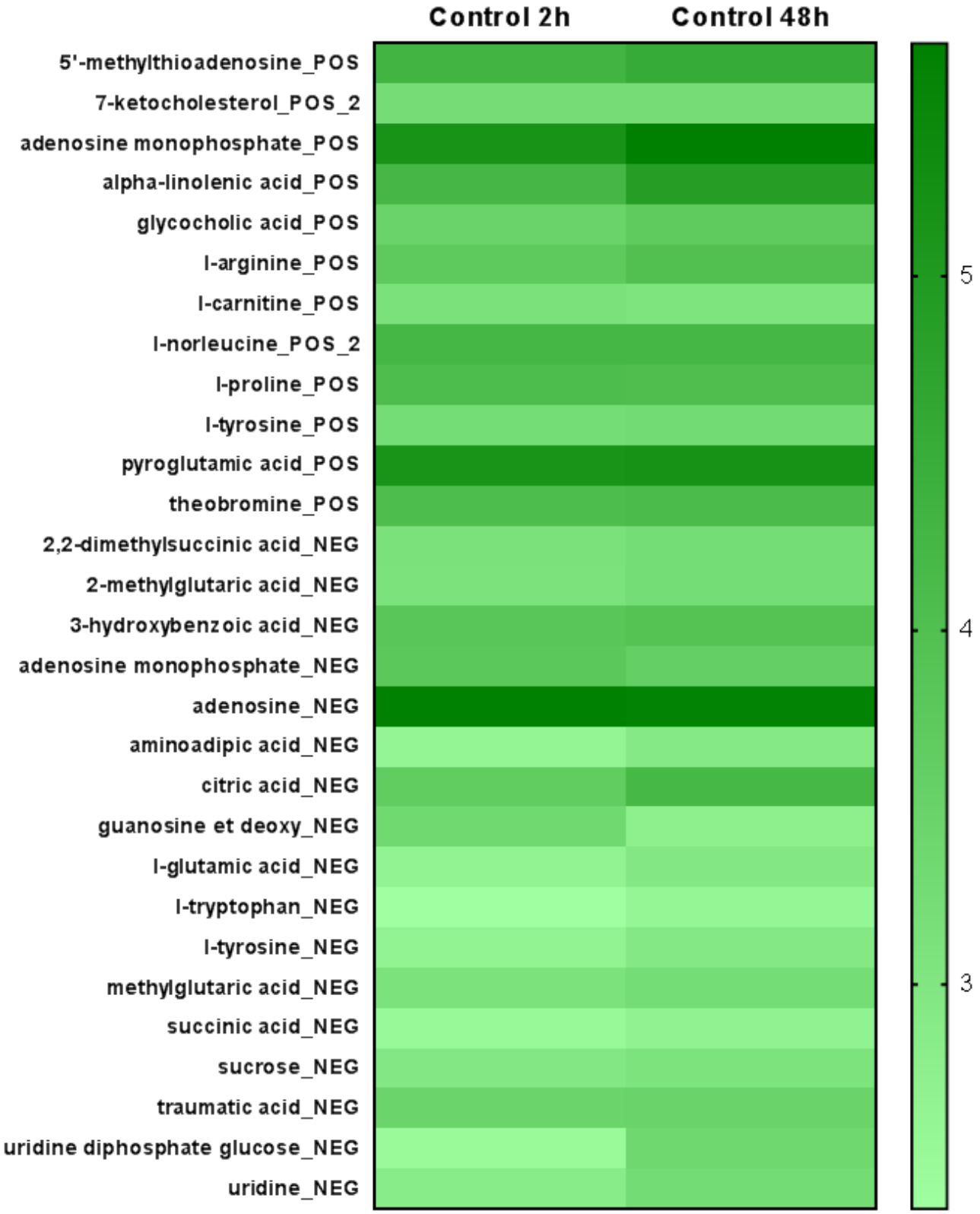


Figure 113: Heat map des groupes d'échantillons contrôles des expositions au cuivre de 2h et 48h

La figure 110 reprend l'ensemble des données obtenues pour tous les métabolites et tous les échantillons. Il est déjà possible de mettre en évidence les standards internes (vérapamil et acétaminophen) qui possèdent des valeurs constantes à travers tous les échantillons. Il en est de même pour l'adénine et l'adénosine. Une représentation graphique de chacun des métabolites est présentée par la suite. Les figures 111 et 112 se réfèrent aux deux types d'exposition au cuivre (respectivement 2 heures et 48 heures) La figure 113 compare les deux contrôles des deux temps d'exposition au cuivre.

Les métabolites ont été répartis en 5 groupes selon leur profil. Le premier groupe, illustré à la figure 114, rassemble les métabolites pour lesquels l'aire sous la courbe semble constante quel que soit le type d'échantillon. Il regroupe de façon cohérente les différents standards (acétaminophen POS et NEG ainsi que le vérapamil POS), mais aussi de nombreux composés présents dans les échantillons blancs. C'est le cas de l'acide phtalique, de l'adénine (POS et NEG) ainsi que de l'acide hexadécanoïque. De façon plus surprenante, il est en outre composé du 7-kétocholestérol, de l'acide 1,11-undecanedicarboxylique, de l'adénosine ainsi que de l'acide traumatique.

Le groupe suivant (figure 115) compte neuf métabolites ayant un comportement particulier. Ceux-ci sont absents (ou en très faible quantité pour l'acide glutamique) des échantillons blancs. Une diminution de l'aire sous la courbe est observée pour l'adénosine monophosphate, le 5'methylthioadénosine et l'acide glutamique. Cette diminution est constatée quel que soit le temps d'expérimentation. A l'inverse, l'expression de l'uridine diphosphate glucose est augmentée par la concentration croissante de cuivre dans le milieu de culture. L'acide alphalinoléique et l'uridine sont augmentés en 2 heures mais diminués en 48 heures. La guanosine/deoxygunosine obtient un profil opposé (augmentation 48h, diminution 2h). Enfin, l'acide succinique passe par une augmentation lors de l'exposition au Cu1, mais subit une diminution globale dans les deux cas. L'arginie est légèrement augmentée pour Cu1 (variabilité importante) et finit par diminuer globalement pour le temps d'exposition de 48 heures, mais augmente lors de l'exposition de 2 heures.

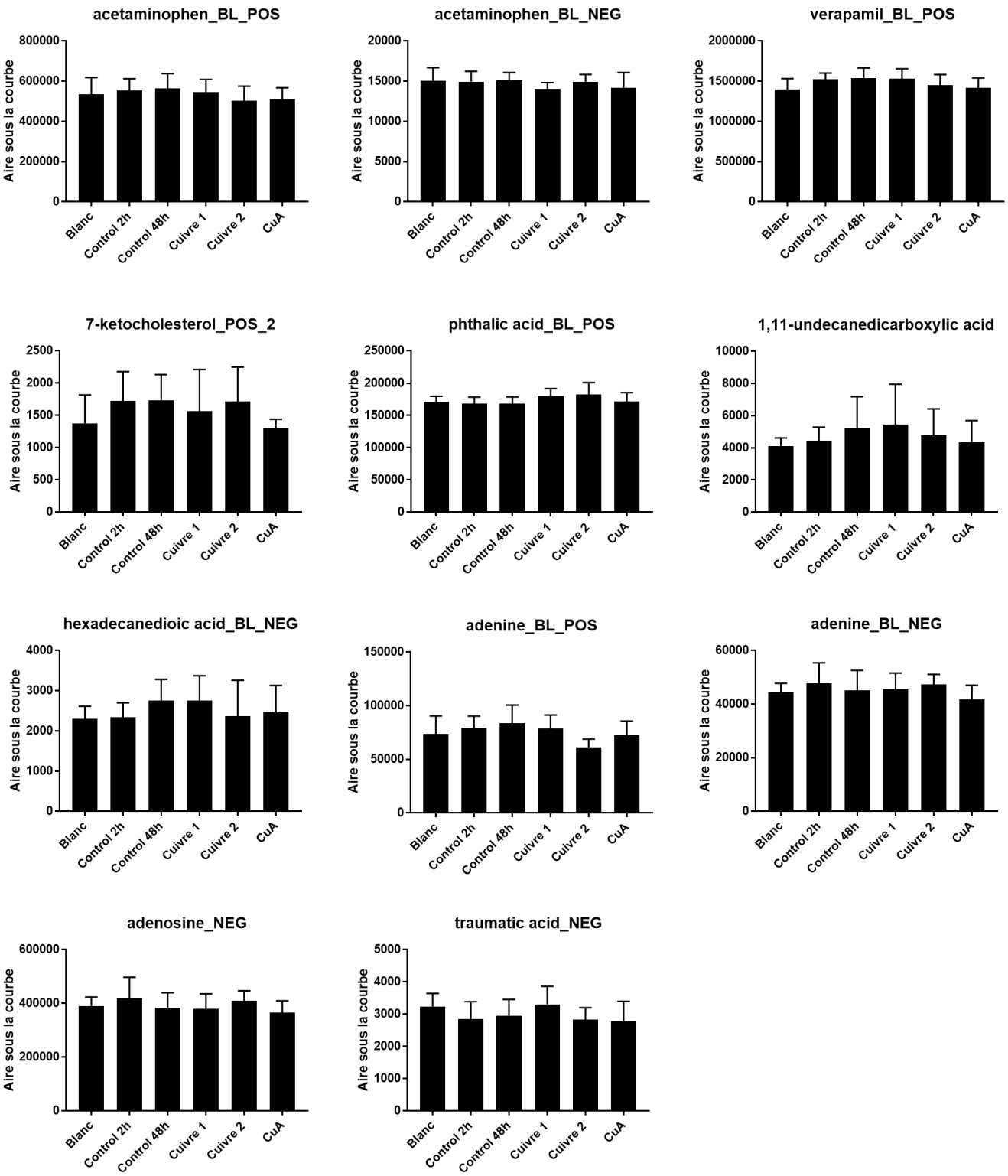


Figure 114: Groupe 1, Graphiques des métabolites à intensité constante

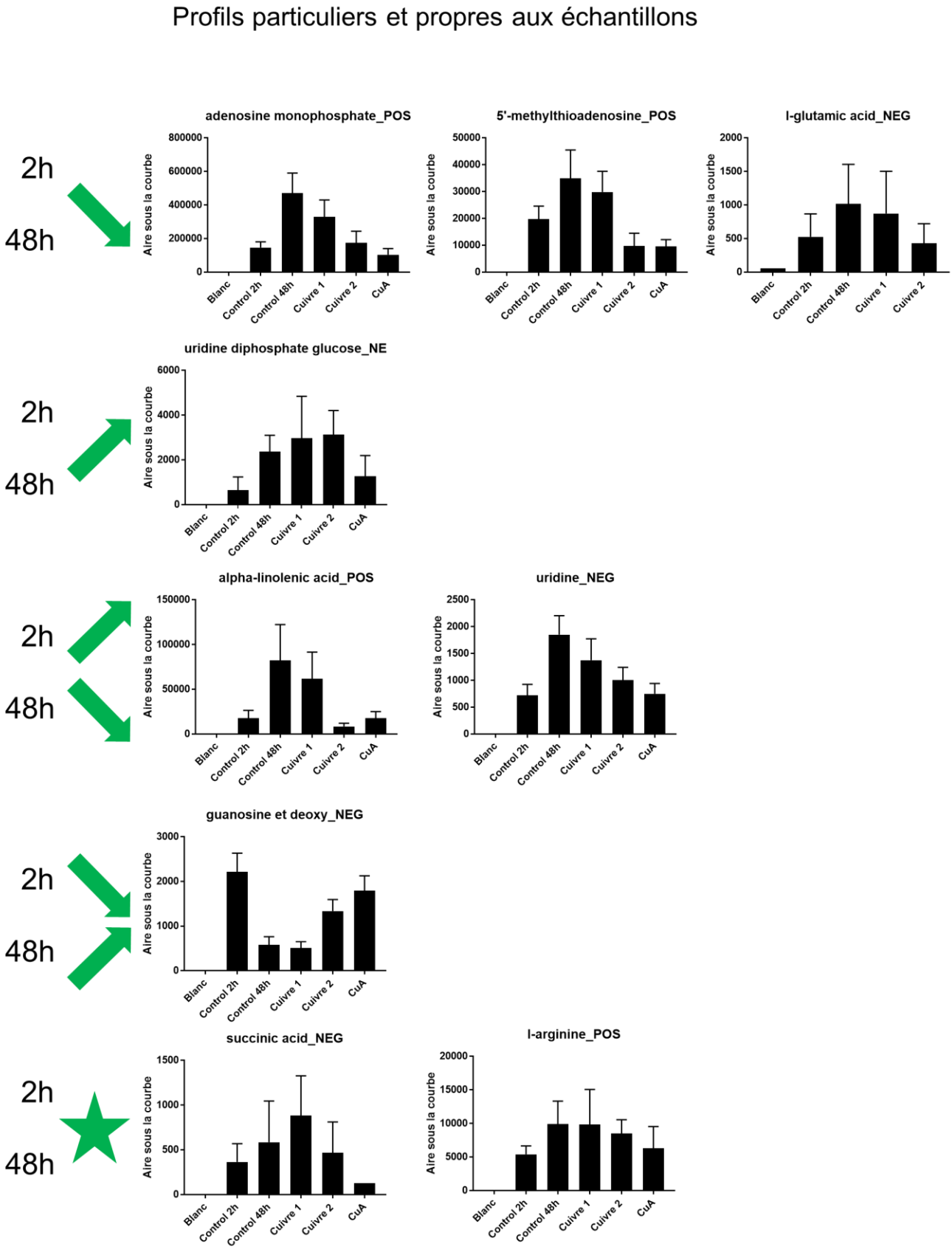


Figure 115: Groupe 2, graphiques des métabolites à profils particuliers

Le groupe 3, repris à la figure 116, met en évidence une diminution propre à l'exposition au cuivre pendant 48 heures et à la concentration de cuivre 2. Ceci est valable pour l'acide pyroglutamique (POS et NEG) ainsi que pour l'acide aminoadipique et le sucrose.

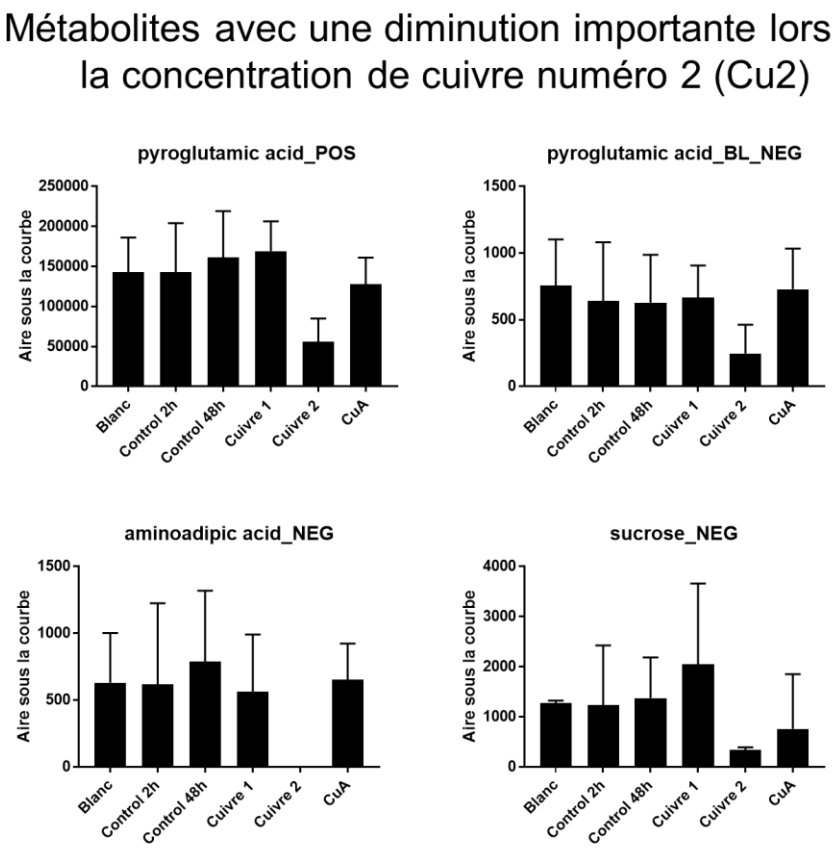


Figure 116: Groupe 3 graphiques des métabolites présentant une diminution importante lors de l'exposition à la concentration de cuivre 2

Les figures 117 et 118 regroupent l'ensemble des métabolites restants. Il n'est pas possible d'en extraire une information suffisamment fiable, car la variabilité de ceux-ci est trop importante. Les groupes ont été formés selon l'identification réalisée, ou non, dans les blancs. Ils sont ensuite séparés par mode d'acquisition (POS, NEG) puis par ordre alphabétique.

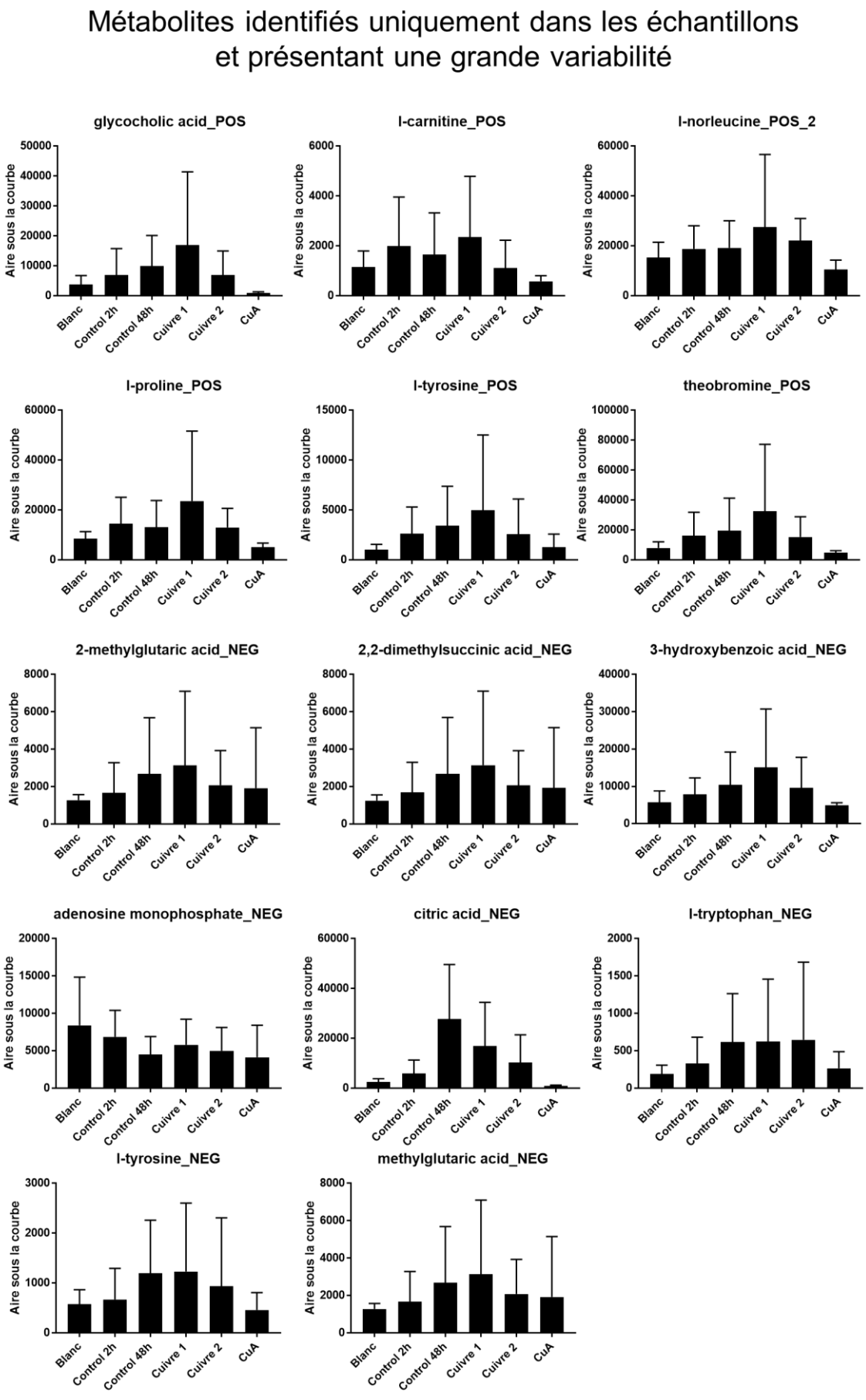


Figure 117: groupe 4, graphiques des métabolites identifiés uniquement dans les échantillons et présentant une grande variabilité

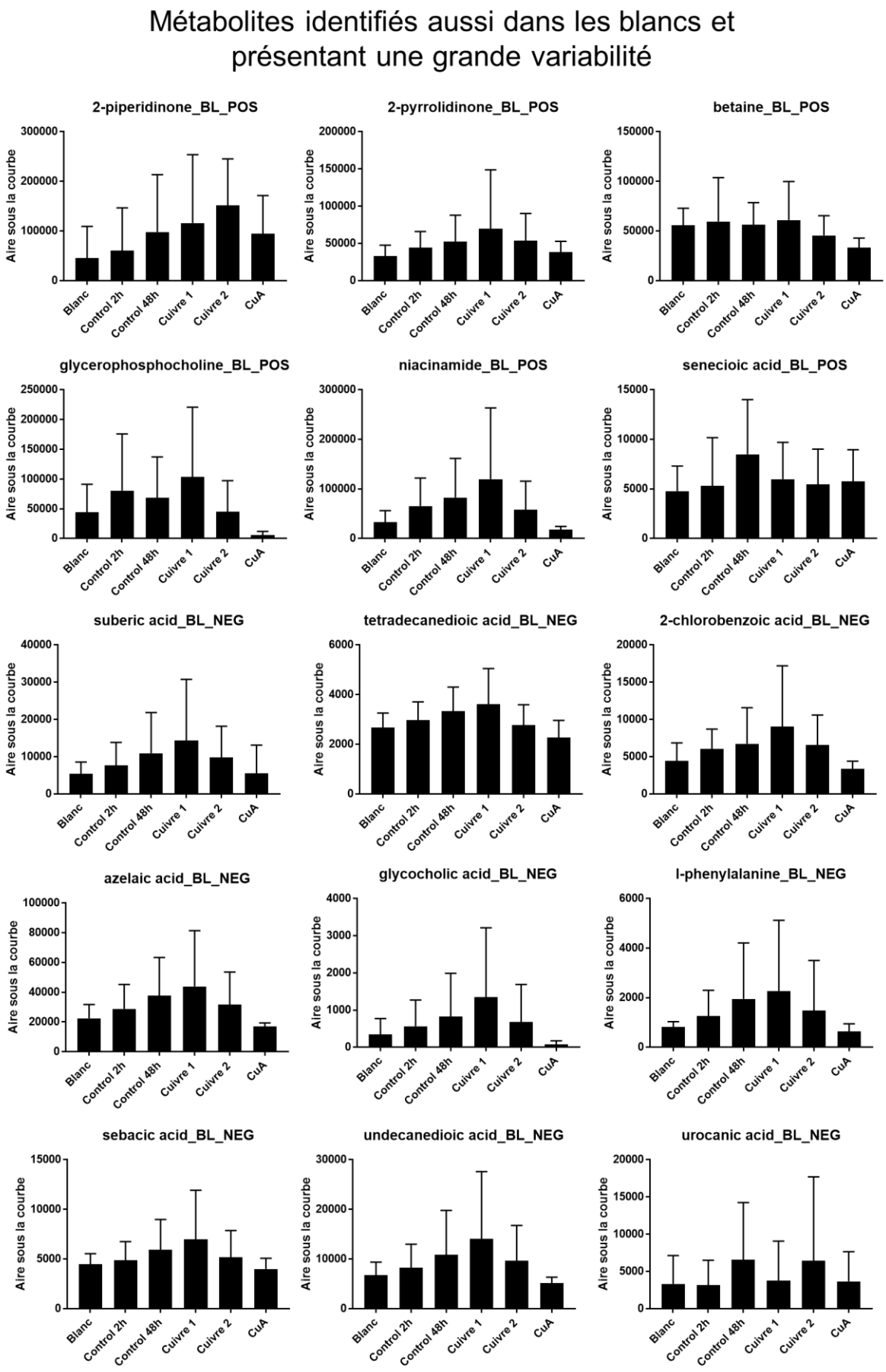


Figure 118: , graphiques des métabolites identifiés dans les blancs et présentant une grande variabilité groupe 5

Les résultats ont ensuite été traités en tenant compte du nombre de cellules. Les données ont donc été corrigées en rapportant l'aire sous la courbe au même nombre de cellules, soit 10^5 cellules. Les facteurs de correction sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12: Facteurs de correction utilisés pour la normalisation des résultats à 10^5 cellules

Culture n°	Ctrl 2h	CuA 2h	Ctrl 48h	Cu1 48h	Cu2 48h
1	18	14	33	27	5
2	14	20	33	32	4
3	14	20	33	27	8

Les résultats sont ensuite répartis selon trois classes, vert, orange et rouge. Les métabolites dans la classe verte sont ceux qui sont absents dans les échantillons blancs. La classe orange est intermédiaire, les métabolites sont aussi présents dans les blancs. Ces composés sont retenus si l'aire sous la courbe (AUC) est supérieure d'un facteur 5 pour 2 valeurs ou plus. Enfin la classe rouge comporte des métabolites qui n'ont pas pu être séparés en termes d'AUC par rapport aux blancs. Ces différentes catégories sont représentées en annexe (tableau 16) Enfin, une transformation logarithmique a été effectuée.

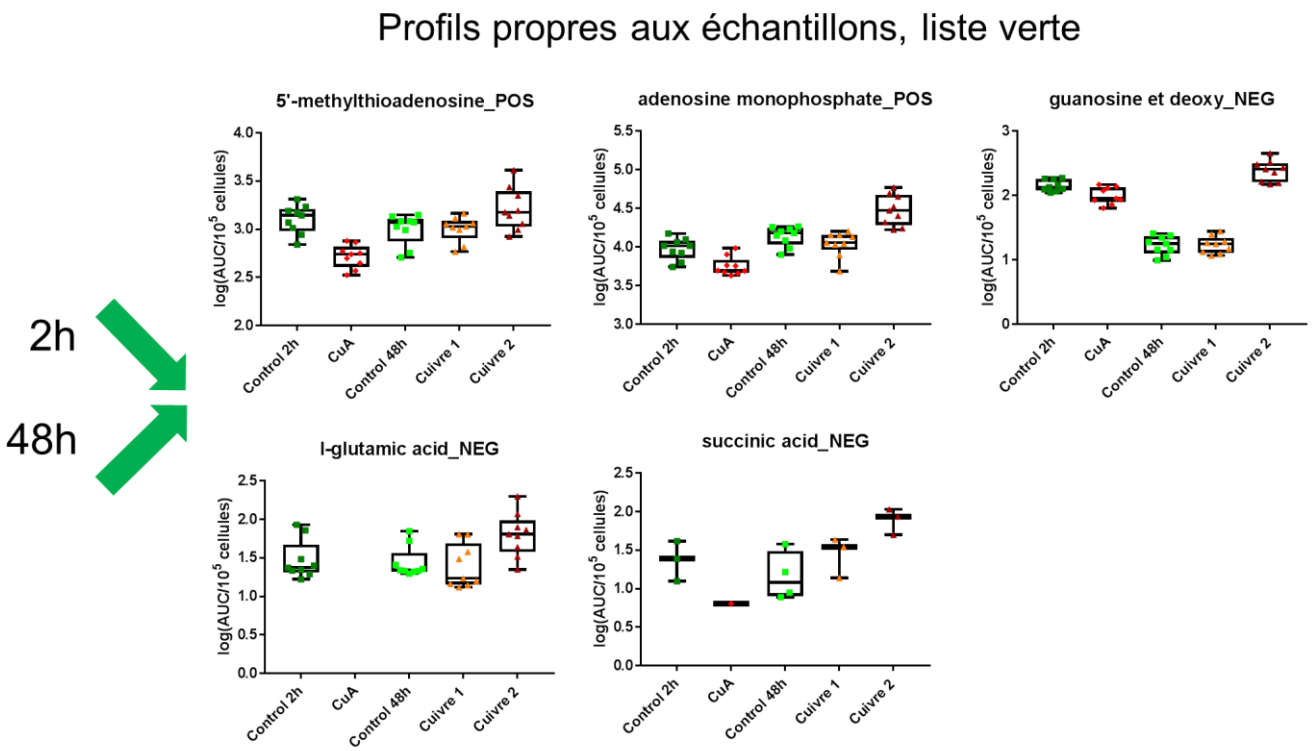


Figure 119: Métabolites présents uniquement dans les échantillons

Le 5'méthylthioadénosine, l'adénosine monophosphate, la guanosine/déoxyguanosine, l'acide glutamique ainsi que l'acide succinique présentent une diminution des

concentrations en 2 heures d'exposition, mais une augmentation des concentrations des métabolites lors de l'exposition pendant 48 heures.

Les résultats concernant l'exposition de 2 heures ne changent pas, car ceux-ci comportent le même nombre de cellules. Cependant les résultats corrigés pour l'exposition au cuivre 2 sont particulièrement modifiés, car la densité cellulaire est fortement diminuée, comme décrit précédemment. La variabilité biologique observée pour l'exposition au cuivre 2 est déjà importante avant la normalisation par le nombre de cellules. Le fait de normaliser augmente davantage cette variabilité, ce qui diminue d'autant la capacité d'interprétation des résultats.

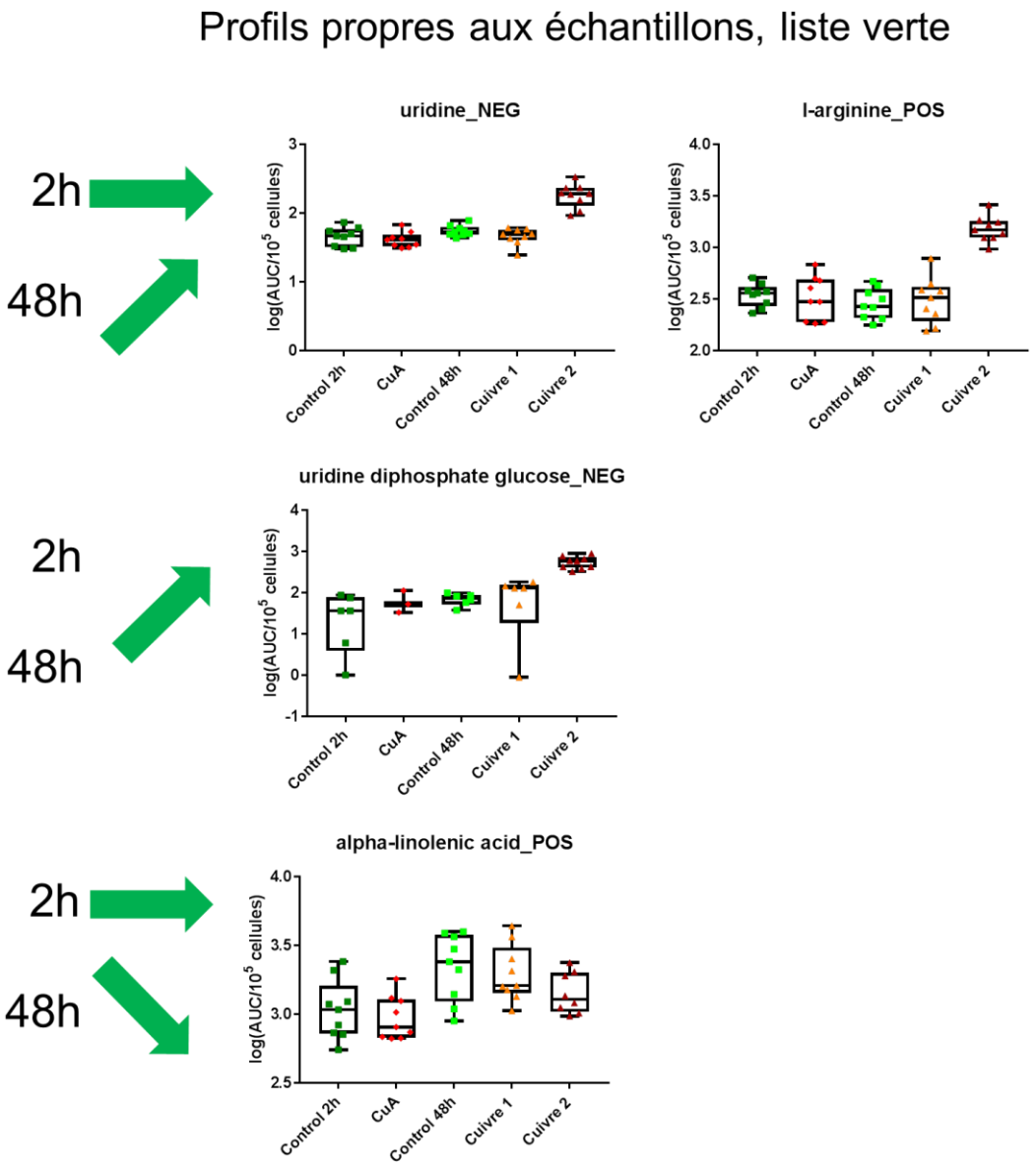


Figure 120: Suite de la figure 119, métabolites présents uniquement dans les échantillons

Profils intermédiaires, liste orange

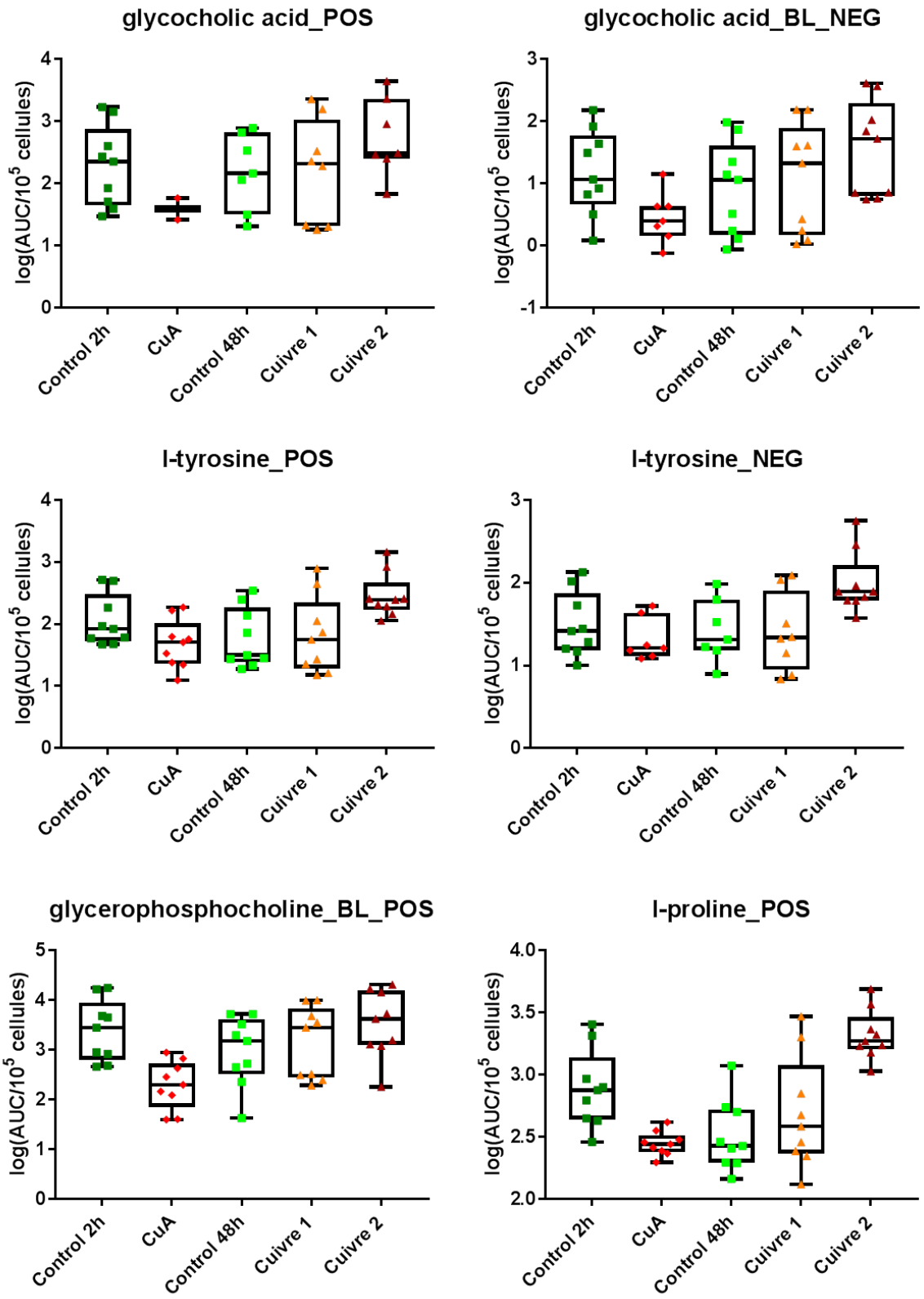


Figure 121: Métabolites présents également dans les échantillons blancs, mais pour lesquels une supériorité d'AUC d'un facteur de 5 a été mise en évidence

Profils intermédiaires, liste orange (suite)

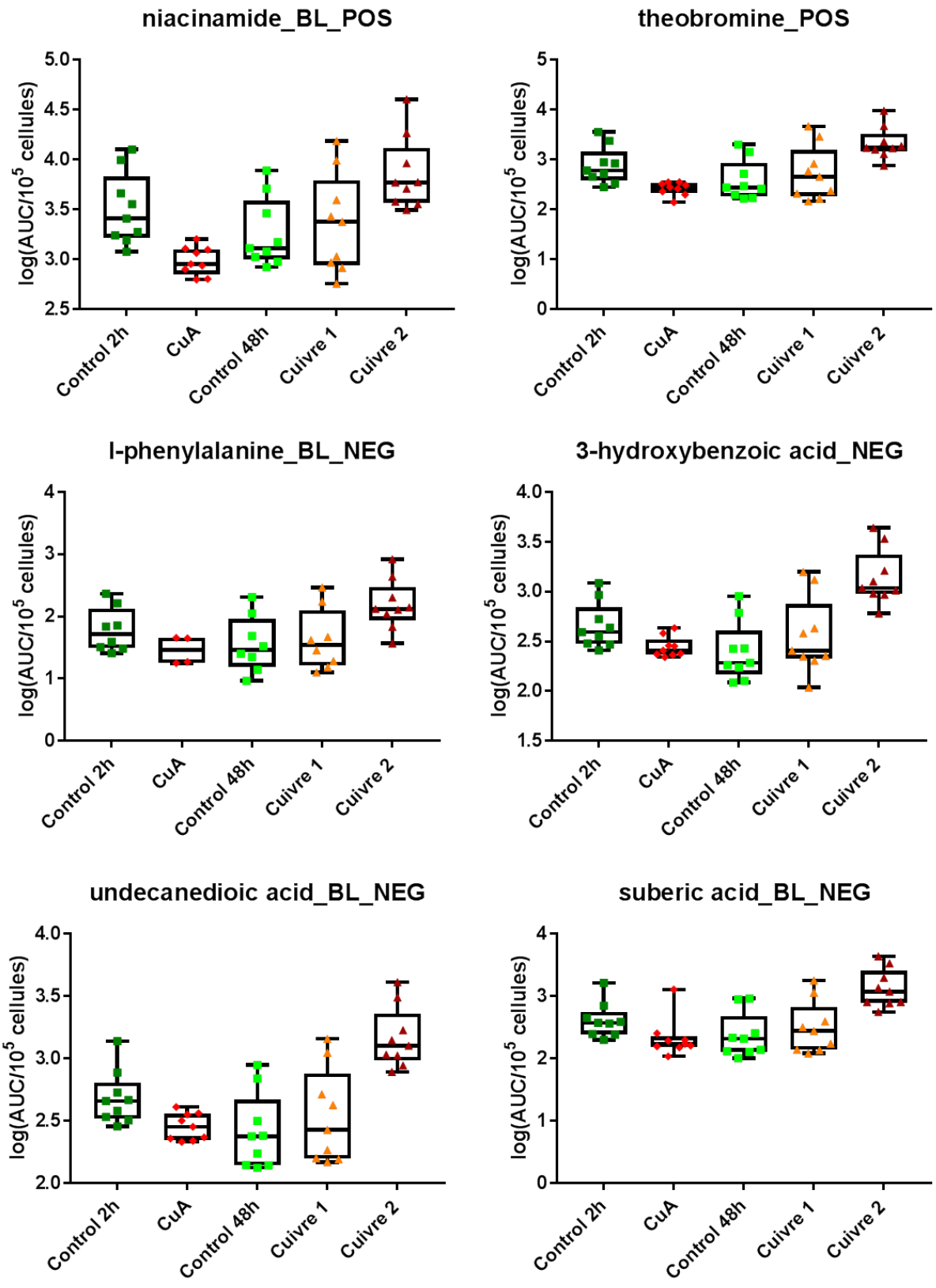


Figure 122: Suite, métabolites présents également dans les échantillons blancs mais pour lesquels une supériorité d'AUC d'un facteur de 5 a été mise en évidence

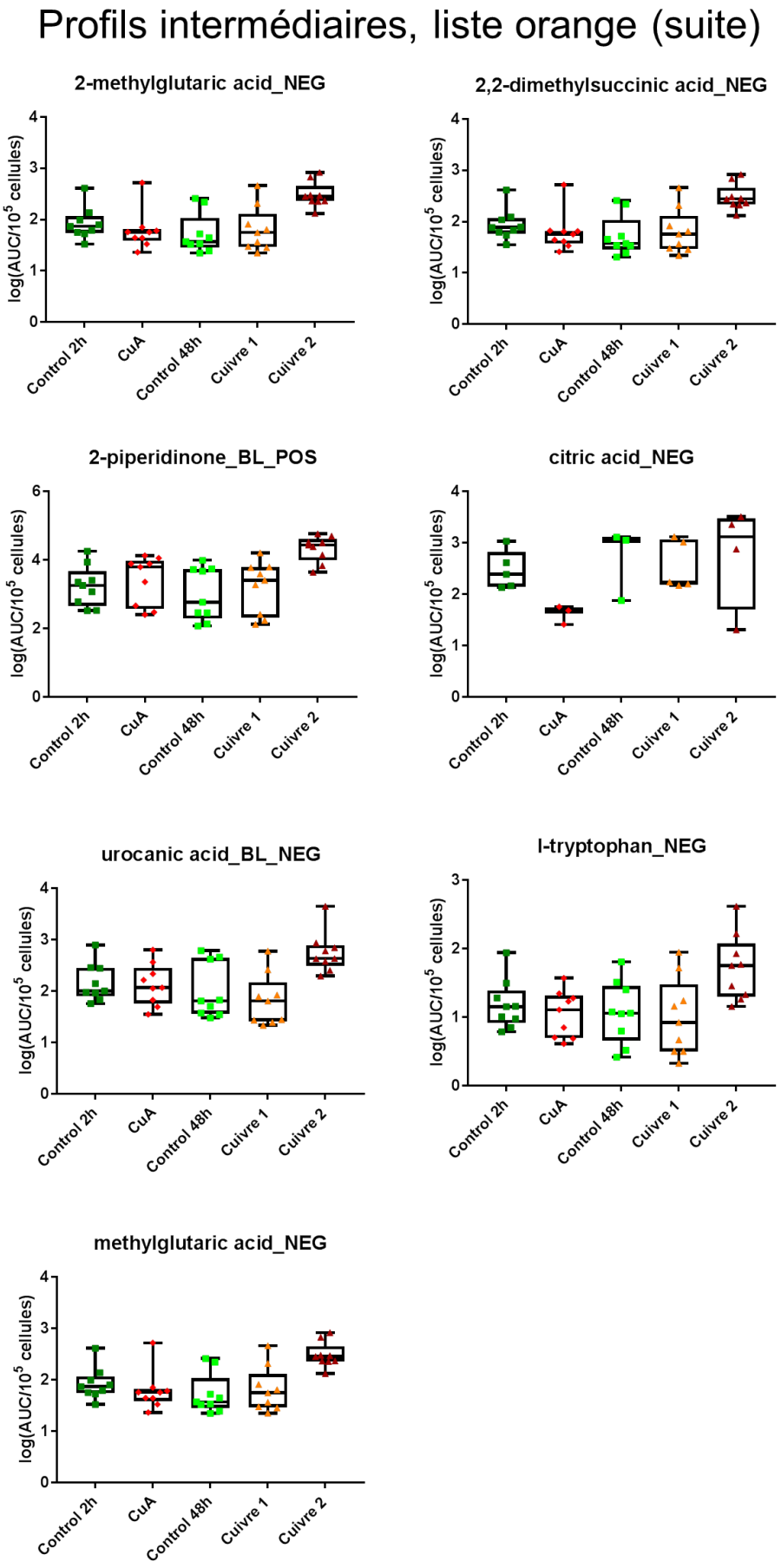


Figure 123: Suite, métabolites présents également dans les échantillons blancs, mais pour lesquels une supériorité d'AUC d'un facteur de 5 a été mise en évidence

Les profils intermédiaires montrent une diminution des concentrations des métabolites pendant l'exposition brève de 2 heures et une augmentation progressive des concentrations de ces mêmes métabolites pendant une exposition de plus longue durée. Ceci dénote une adaptation du système à l'agent perturbateur. La correction par le nombre de cellules est un élément essentiel pour pouvoir comparer les résultats obtenus. Cependant cette correction induit aussi un biais qui devrait être corrigé par un standard interne afin de normaliser les résultats. Cette étude est exploratoire, et une quantification plus spécifique des métabolites mis en évidence doit être effectuée afin de confirmer les résultats obtenus dans ce chapitre. Une étude cinétique des métabolites, avec de nombreux points de mesure, peut se révéler plus informative pour comprendre l'évolution du métabolisme de façon plus détaillée. Enfin l'étude d'exposition brève apporte l'avantage de ne pas impacter sur le facteur de croissance des cellules, mais ne donne pas d'information quant à l'état dans lequel se trouvent les cellules (mort cellulaire).

8.4. Conclusions et perspectives

Deux approches ont été utilisées pour traiter le même set de données obtenues par LC-SWATH-MS. Cette étude a été menée sur les variations observées pendant une exposition de courte durée (2h) et sur une période plus longue (48h). Les approches sont de type global et spécifique.

L'utilisation de l'analyse en composante principale de façon supervisée et non-supervisé a permis de représenter sous forme de graphique la séparation des différents groupes d'échantillons. Il est observé une séparation nette lors de l'exposition de 48h entre la concentration de cuivre 2 et les deux concentrations précédentes (contrôle et cuivre 1). L'application de la PCVG a réparti les variables selon des groupes, et l'étude des variables obtenues a permis de se limiter à quelques variables essentielles. L'étude sur un temps de 2 h n'a pas donné de résultats concluants à cause d'un biais involontaire inclus dans l'ordre de traitement des échantillons dans la séquence analytique (regroupement au début ou à la fin des échantillons du même type). Enfin, des valeurs *m/z* avec des temps de rétention ont été mises en évidence, toutefois aucune identification formelle de marqueur n'a été obtenue.

L'approche plus spécifique s'est cantonnée à traiter uniquement des métabolites identifiés selon une base de données développée à l'intérieur du laboratoire. Neuf métabolites ont

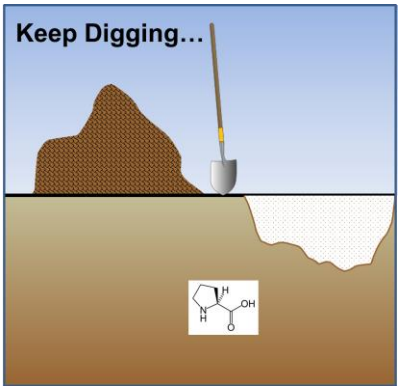
été identifiés comme ayant une variation de leur concentration selon les concentrations de cuivre. Il s'agit de l'adénosine monophasphate, du 5'methylthioadénosine, de l'acide glutamique, de l'uridine diphosphate glucose, de l'acide alphalinoléique, de l'uridine, de la guanosine/deoxygunosine (non séparées par MS) de l'arginine et de l'acide succinique. Cette liste n'est pas exhaustive. Il existe une grande variabilité biologique pour de nombreux composés, ce qui ne permet pas de les intégrer aux métabolites d'intérêt. La librairie en outre n'a pas été développée à la base pour l'identification de métabolites d'algues. Bien que certains métabolites soient communs aux deux espèces (animale et végétale), cette librairie n'est pas directement adaptée à l'identification de composés provenant du règne végétal.

L'approche globale au travers d'une analyse en composante principale a permis de mettre en évidence plus de 7000 variables extraites (*m/z*, temps de rétention, expérience MS) des chromatogrammes. Un regard critique a été apporté quant au traitement statistique de ce set donné. Il est important de mentionner que 7000 variable, ne signifie pas 7000 substances, car celles-ci peuvent être, par exemple, des fragments ou des adduits. Les bases d'une extraction de qualité de l'information statistique ne peuvent être entreprises sans une connaissance préalable fiable et précise du système analytique. Il est essentiel de connaître les limitations et les possibilités offertes par les instruments employés. Cette partie du chapitre a donc étudié l'ensemble des caractéristiques du système (variabilité du temps de rétention, qualité de rétention du système chromatographique, contaminations du système, variations des intensités) avant d'élaborer une interprétation statistique des données. L'interprétation statistique et les répercussions sur la qualité des données sont elles aussi analysées par l''utilisation du test de Student. De nombreuses substances ont une intensité qui augmente entre le début et la fin de la séquence analytique. C'est avec précaution que des variables doivent être exclues pour permettre de supprimer un maximum de variables parasites tout en gardant les variables essentielles à l'explication statistique de la répartition des différents groupes en analyse par composante principale.

Dans cette partie, l'analyse par composante principale n'a été effectuée que sur un set restreint de données. En effet, les autres conditions analytiques n'ont pas été exploitées (chromatographie acide et détection MS en mode négatif, chromatographie basique mode positif et détection MS en mode négatif). Il faudrait donc avoir l'ensemble du traitement de ces données. Des compléments d'analyses statistiques par des bio-informaticiens,

spécialisés dans le traitement des données, pourraient apporter un regard différent sur les conclusions obtenues.

Il n'y a pas eu d'identification des métabolites présents dans la chromatographie basique en mode positif et négatif. Il serait donc utile, afin d'étoffer la liste obtenue, d'appliquer l'identification des métabolites à ce set de données.



8.5. Références partie 3 chapitre 2

1. Jamers, A., et al., *Copper toxicity in the microalga Chlamydomonas reinhardtii: an integrated approach.* BioMetals, 2013. **26**(5): p. 731-740.
2. Jamers, A., R. Blust, and W. De Coen, *Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena?* Aquat. Toxicol., 2009. **92**(3): p. 114-121.
3. Merchant, S.S., et al., *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions.* Science (Washington, DC, U. S.), 2007. **318**(5848): p. 245-251.
4. Boelling, C. and O. Fiehn, *Metabolite profiling of Chlamydomonas reinhardtii under nutrient deprivation.* Plant Physiol., 2005. **139**(4): p. 1995-2005.
5. Matthew, T., et al., *The metabolome of Chlamydomonas reinhardtii following induction of anaerobic H2 production by sulfur depletion.* J. Biol. Chem., 2009. **284**(35): p. 23415-23425.
6. Lee, D.Y. and O. Fiehn, *High quality metabolomic data for Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Methods, 2008. **4**: p. 7.
7. Hong, S., et al., *History of ancient copper smelting pollution during Roman and Medieval times recorded in Greenland ice.* Science (Washington, D. C.), 1996. **272**(5259): p. 246-9.
8. Arnal, N., et al., *Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides.* Ecotoxicol. Environ. Saf., 2011. **74**(6): p. 1779-1786.
9. Jamers, A., et al., *Effect of copper exposure on gene expression profiles in Chlamydomonas reinhardtii based on microarray analysis.* Aquat. Toxicol., 2006. **80**(3): p. 249-260.
10. Pinto, E., et al., *Heavy metal-induced oxidative stress in algae.* J. Phycol., 2003. **39**(6): p. 1008-1018.
11. Bertoni, G., *Global analysis of copper responsiveness in Chlamydomonas.* Plant Cell, 2011. **23**(4): p. 1188.
12. Khobot'ev, V.G., et al., *Copper uptake by algae from copper-containing compounds and the effect of this process on their salt metabolism.* Gidrobiol. Zh., 1976. **12**(1): p. 40-6.
13. Melegari, S.P., et al., *Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga Chlamydomonas reinhardtii.* Aquat. Toxicol., 2013. **142-143**: p. 431-440.
14. Roberg, M., *Metabolic physiology of green algae. II. Action of iron, zinc and copper salts.* Jahrb. Wiss. Bot., 1932. **76**: p. 311-32.
15. Zhang, L.P., et al., *Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Cell Physiol, 2008. **49**(3): p. 411-9.
16. Beauvais-Fluck, R., V.I. Slaveykova, and C. Cosio, *Transcriptomic and Physiological Responses of the Green Microalga Chlamydomonas reinhardtii during Short-Term Exposure to Subnanomolar Methylmercury Concentrations.* Environ. Sci. Technol., 2016. **50**(13): p. 7126-7134.
17. Westall, J.C., *MINEQL: A COMPUTER PROGRAM FOR THE CALCULATION OF CHEMICAL EQUILIBRIUM COMPOSITION OF AQUEOUS SYSTEMS*. 1976: MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, WATER QUALITY LABORATORY, CAMBRIDGE,MA. 1976.

18. Ivosev, G., L. Burton, and R. Bonner, *Dimensionality Reduction and Visualization in Principal Component Analysis.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2008. **80**(13): p. 4933-4944.
19. Mohamed, R., et al., *Comprehensive Analytical Strategy for Biomarker Identification based on Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and New Candidate Confirmation Tools.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2009. **81**(18): p. 7677-7694.
20. Bonner, R. and G. Hopfgartner, *SWATH acquisition mode for drug metabolism and metabolomics investigations.* Bioanalysis, 2016. **8**(16): p. 1735-1750.
21. Merchant, S.S., et al., *Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in Chlamydomonas.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2006. **1763**(7): p. 578-594.
22. Page, M.D., et al., *Two Chlamydomonas CTR Copper Transporters with a Novel Cys-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation.* The Plant Cell, 2009. **21**(3): p. 928-943.
23. Bruderer, T., *Accurate mass spectral libraries and predicted liquid chromatography retention times in bioanalysis and data independent metabolomics*. 2016.

9. Conclusions et perspectives du chapitre 2

Le chapitre 2 a permis de mettre l'accent sur l'importance de la maîtrise des premières étapes analytiques pour obtenir des résultats solides lors d'analyses métabolomiques sur des cellules.

Tout d'abord, l'optimisation de la lyse cellulaire a été menée dans des conditions de robustesse de membrane extérieure par l'utilisation d'un organisme unicellulaire tel que l'algue Chlamydomonas. Ensuite, l'étude des préparations d'échantillons et leur impact sur les métabolites extraits selon une technique d'agitation couplée à une extraction liquide-liquide a été réalisée. Enfin il a été effectué une analyse métabolomique construite à partir des bases établies dans les parties 1 et partie 2 sur des cellules d'algues cultivées dans un milieu contenant une concentration de cuivre croissante.

En chromatographie liquide en phase inverse, l'accent est mis sur deux portions de temps critiques dans un gradient chromatographique : la zone aux alentours du temps mort et la zone de fin de gradient. Le temps mort contient souvent un grand nombre de composés polaires, car n'ayant peu ou pas d'affinité avec la phase stationnaire apolaire. La zone de fin de gradient au contraire, par l'augmentation de la force éluante de la phase mobile va permettre d'éluer un grand nombre de composés apolaires, et parfois aussi des contaminants tels que les phtalates menant à une augmentation du bruit. C'est pourquoi les futures analyses métabolomiques de composés polaires par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide devraient mener à une amélioration de la rétention de ce type de composés permettant à la fois une meilleure identification et une meilleure quantification.

L'utilisation du SWATH pour les études métabolomiques doit être aussi envisagée. Le SWATH apporte une quantité d'informations très grande, mais il a aussi été démontré qu'une mauvaise gestion de la taille des fenêtres pouvait être délétère pour une étude métabolomique.

10. Remerciements

Je remercie tout particulièrement monsieur Pasquier, les responsables et le personnel de l'abattoir de Meinier pour m'avoir ouvert les portes d'un monde que je ne connaissais pas, et pour m'avoir permis de prélever les échantillons de sang et de foie de bovins. Un grand merci aux vétérinaires du service de la santé et des affaires vétérinaires de Genève (SCAV), au Docteur König et à monsieur Romand, qui ont eu la gentillesse de prélever les différents échantillons. Ils ont aussi contribué à me remémorer mes cours d'anatomie. Je les remercie tous pour leur disponibilité et leur professionnalisme.

Le professeur Vera Slaveykova m'a permis d'obtenir des échantillons d'algues de qualité pour mes différentes recherches. Je remercie tout particulièrement le Docteur Séverine Le Faucheur avec qui j'ai collaboré, ainsi que le Docteur Giulia Cheloni et Rebecca (doctorante). Je remercie enfin le Docteur Ron Bonner pour son expertise dans l'utilisation du logiciel MarkerView.

11. Annexes

Tableau 13: Composition chimique du milieu de culture des algues en mol/L

	TAP x 4 (mol/L)	Simplified exposure media - LT	Exposure media - LT	Exposure media – ST
pH	7	7	7	7
Phosphate				
KH_2PO_4	1.01E-04	1.01E-04	1.01E-04	1e-4
K_2HPO_4	1.49E-04	1.49E-04	1.49E-04	
Ammonium				
NH_4NO_3	1.68E-03	1.68E-03	1.68E-03	5e-6
$CaCl_2$, 2 H_2O	8.50E-05	8.50E-05	8.50E-05	8.2e-4
$MgSO_4$, 7 H_2O	1.02E-04	1.02E-04	1.02E-04	3.6e-4
Métaux				
H_3BO_3	4.75E-05	-	4.75E-05	
$ZnSO_4$, 7 H_2O	1.90E-05	-	1.90E-05	
$MnCl_2$, 4 H_2O	6.25E-05	-	6.25E-05	
$FeSO_4$, 7 H_2O	4.50E-06	-	4.50E-06	
$CoCl_2$, 6 H_2O	1.67E-06	-	1.67E-06	
$CuSO_4$, 5 H_2O	1.57E-06	-	1.57E-06	
$(NH4)_6Mo_7O_{24}$,4 H_2O	2.23E-06	-	2.23E-06	
Na_2EDTA, 2 H_2O	3.36E-05	-	3.36E-05	
TRIS acetate				
CH_3COOH	4.30E-03	-	-	
TRIS	5.00E-03	-	-	
MOPS		10e-3	10e-3	
$NaHCO_3$				2.8e-4

Tableau 14: Variables identifiées par le traitement de données à l'aide du logiciel MarkerView

Index	Nom du pic	Expérience	Groupe	*m/z*	Temps de rétention	Type de pic (selon le logiciel MarkerView)
1	70.0/7.0, e3 (36)	3	3	70.0280	7.0	[M+H]+
2	80.0/6.9, e3 (63)	3	3	80.0128	7.0	[M+H]+
3	80.0/6.9, e4 (64)	4	3	80.0128	7.0	[M+H]+
4	88.1/1.5, e6 (95)	6	2	88.0750	1.5	[M+H]+
5	93.1/19.9, e8 (118)	8	1	93.0690	19.9	[M+H]+, [2M+H]+ (185.1320), [2M+K]+ (223.0969)
6	98.0/6.9, e3 (139)	3	3	98.0235	6.9	[M+H]+
7	107.1/19.9, e8 (230)	8	1	107.0847	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (129.0694), [2M+H]+ (213.1638)
8	121.1/19.9, e8 (323)	8	1	121.1009	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (143.0848), [2M+H]+ (241.1950), [2M+NH4]+ (258.2262), [2M+K]+ (279.1592)
9	123.0/1.5, e6 (334)	6	2	123.0091	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (144.9917), [2M+NH4]+ (262.0530)
10	126.1/6.9, e8 (367)	8	3	126.0551	6.9	[M+H]+
11	126.1/6.9, e1 (368)	1	3	126.0552	6.9	[M+H]+
12	135.1/19.9, e8 (481)	8	1	135.1159	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (157.1011)
13	136.1/5.2, e14 (493)	14	3	136.0617	5.2	[M+NH4]+, [M+H]+ (119.0351)
14	144.1/6.9, e1 (545)	1	3	144.0663	6.9	[M+H]+, [M+Na]+ (166.0479), [M+K]+ (182.0213), [2M+Na]+ (309.1056), [2M+K]+ (325.0704)
15	166.1/1.5, e6 (819)	6	2	166.0517	1.5	[M+K]+, [M+H]+ (128.1057)
16	207.1/17.0, e1 (1222	1	1	207.1378	17.0	[M+H]+, [2M+Na]+ (435.2353), [2M+K]+ (451.2307)
17	210.1/1.6, e13 (1248	13	2	210.0777	1.6	[M+H]+, [M+Na]+ (232.0600), [M+K]+ (248.0335), [2M+H]+ (419.1498), [2M+Na]+ (441.1319), [2M+K]+ (457.1066)
18	210.1/1.5, e20 (1251	20	2	210.0783	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (232.0604), [M+K]+ (248.0340), [2M+Na]+ (441.1322), [2M+K]+ (457.1075)
19	210.1/1.5, e6 (1253)	6	2	210.0787	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (232.0611), [M+K]+ (248.0352), [2M+K]+ (457.1084)
20	210.7/1.5, e13 (1267	13	2	210.6843	1.5	[M+H3]+3
21	210.9/1.5, e13 (1270	13	2	210.9194	1.5	[M+H]+
22	212.1/1.5, e13 (1308	13	2	212.0741	1.5	[M+H]+, [M+K]+ (250.0327), [2M+H]+ (423.1504)
23	212.1/1.5, e20 (1310	20	2	212.0759	1.5	[M+H]+
24	212.1/1.5, e1 (1311)	1	2	212.0782	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (234.0585), [M+K]+ (250.0328), [2M+H]+ (423.1493), [2M+Na]+ (445.1292)
25	229.2/17.1, e16 (156	16	1	229.1581	17.1	[M+H]+
26	229.2/19.4, e1 (1571	1	1	229.1584	19.4	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (261.1843)
27	247.2/18.4, e1 (1741	1	1	247.1716	18.4	[M+H]+, [M+Na]+ (269.1512), [M+K]+ (285.1338), [2M+NH4]+ (510.3434)
28	248.0/1.6, e14 (1748	14	3	248.0340	1.6	[M+K]+, [M+H]+ (210.0783)
29	261.2/19.4, e1 (1876	1	1	261.1850	19.4	[M+H]+, [2M+NH4]+ (538.3506)
30	273.1/5.2, e14 (1958	14	3	273.1206	5.2	[M+H]+, [M+Na]+ (295.1015)
31	277.2/19.9, e8 (2013	8	6	277.2162	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (299.1973), [M+K]+ (315.1631)
32	277.2/19.9, e1 (2014	1	1	277.2164	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (299.1984), [M+K]+ (315.1637), [2M+H]+ (553.4262)
33	279.2/20.4, e1 (2032	1	1	279.2319	20.4	[M+H]+
34	280.2/15.2, e1 (2042	1	3	280.1566	15.3	[M+H]+, [M+NH4]+ (297.1833), [M+Na]+ (302.1365), [M+K]+ (318.1104)
35	287.2/18.4, e1 (2121	1	1	287.1641	18.4	[M+H]+, [M+Na]+ (309.1426), [M+K]+ (325.1155)
36	291.2/17.9, e1 (2162	1	1	291.1960	17.9	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (323.2207)
37	297.2/15.2, e1 (2228	1	3	297.1833	15.3	[M+NH4]+, [M+H]+ (280.1566)
38	301.2/19.4, e1 (2287	1	1	301.1774	19.4	[M+H]+, [2M+NH4]+ (618.3494)
39	317.2/19.9, e9 (2476	9	6	317.2083	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (339.1902), [M+K]+ (355.1615), [2M+Na]+ (655.3902), [2M+K]+ (671.3534)
40	317.2/19.9, e1 (2479	1	1	317.2091	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (339.1911), [M+K]+ (355.1643), [2M+H]+ (633.4106), [2M+Na]+ (655.3926), [2M+K]+ (671.3639)
41	321.2/17.1, e16 (251	16	1	321.2045	17.1	[M+CH3OH+H]+, [M+H]+ (289.1795)
42	321.2/16.9, e15 (251	15	1	321.2052	16.9	[M+H]+
43	321.2/16.9, e1 (2525	1	1	321.2080	16.9	[M+CH3OH+H]+, [M+H]+ (289.1802)
44	321.2/17.1, e1 (2526	1	1	321.2082	17.1	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (353.2282)
45	328.2/17.8, e1 (2613	1	1	328.2486	17.8	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (360.2744)
46	333.2/19.9, e1 (2669	1	1	333.1832	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (355.1637), [2M+NH4]+ (682.4293)
47	333.2/18.8, e1 (2677	1	1	333.2042	18.8	[M+H]+, [M+Na]+ (355.1850), [2M+NH4]+ (682.4285)
48	338.3/23.5, e1 (2728	1	6	338.3420	23.5	[M+H]+, [M+Na]+ (360.3239), [M+K]+ (376.2969), [2M+H]+ (675.6760), [2M+Na]+ (697.6573)
49	339.2/19.9, e20 (273	20	1	339.1904	19.9	[M+H]+, [2M+H]+ (677.3724), [2M+NH4]+ (694.4273)
50	351.2/16.5, e1 (2878	1	1	351.2149	16.5	[M+H]+, [M+NH4]+ (368.2631), [M+Na]+ (373.2180)
51	359.3/19.9, e15 (298	15	3	359.2880	19.9	[M+H]+
52	377.3/19.7, e1 (3375	1	1	377.3002	19.7	[M+H]+, [2M+H]+ (753.5841)
53	419.2/1.5, e20 (3846	20	2	419.1502	1.5	[2M+H]+, [M+H]+ (210.0810)
54	422.2/1.5, e1 (3875)	1	2	422.1542	1.5	[M+H]+
55	472.4/19.9, e1 (4504	1	3	472.3574	19.9	[M+H]+
56	484.3/17.1, e1 (4622	1	1	484.2651	17.1	[M+NH4]+, [M+H]+ (467.2045), [M+CH3OH+H]+ (499.2536)
57	492.3/18.3, e16 (468	16	1	492.3322	18.3	[M+H]+
58	510.3/18.3, e1 (4849	1	1	510.3434	18.3	[2M+NH4]+, [M+H]+ (247.1716)
59	523.2/16.9, e16 (496	16	1	523.2490	16.9	[M+H]+, [M+NH4]+ (540.2282), [M+CH3OH+H]+ (555.2207)
60	523.3/17.2, e19 (497	19	1	523.2507	17.2	[M+H]+, [M+NH4]+ (540.2283), [M+CH3OH+H]+ (555.2208)
61	523.3/17.1, e1 (4973	1	1	523.2508	17.1	[M+H]+, [M+NH4]+ (540.2338), [M+Na]+ (545.2337), [M+K]+ (561.2116)
62	523.3/16.9, e1 (4978	1	1	523.2535	16.9	[M+H]+, [M+Na]+ (545.2587)
63	525.3/17.1, e16 (499	16	3	525.2577	17.1	[M+H]+, [M+K]+ (563.1812)
64	525.3/17.5, e16 (499	16	1	525.2671	17.5	[M+H]+, [M+NH4]+ (542.2456), [M+CH3OH+H]+ (557.2381)
65	525.3/17.5, e1 (5002	1	1	525.2690	17.5	[M+H]+
66	534.3/15.7, e1 (5100	1	1	534.2926	15.7	[M+H]+
67	537.2/14.4, e17 (513	17	1	537.2292	14.4	[M+K]+, [M+H]+ (499.2544)
68	539.2/16.9, e17 (516	17	1	539.2226	16.9	[M+H]+
69	539.2/16.9, e1 (5167	1	1	539.2270	16.9	[M+H]+
70	539.2/15.4, e1 (5174	1	1	539.2477	15.4	[M+H]+
71	539.2/15.7, e1 (5175	1	1	539.2485	15.7	[M+H]+
72	540.2/16.8, e17 (518	17	1	540.2282	16.9	[M+NH4]+, [M+H]+ (523.2490)
73	540.2/15.7, e17 (518	17	6	540.2491	15.7	[M+H]+
74	548.5/23.3, e1 (5265	1	3	548.5039	23.3	[M+NH4]+, [M+H]+ (531.4756), [M+Na]+ (553.4584), [M+K]+ (569.4330)
75	553.2/22.7, e17 (532	17	1	553.2438	22.7	[M+CH3OH+H]+, [M+H]+ (521.2554), [M+NH4]+ (538.2571), [M+K]+ (559.2349)
76	553.3/18.8, e17 (533	17	1	553.2982	18.8	[M+NH4]+, [M+H]+ (536.3344)
77	555.2/15.7, e1 (5360	1	3	555.2219	15.7	[M+H]+
78	555.2/13.0, e17 (536	17	1	555.2411	13.0	[M+K]+, [M+H]+ (517.2638)
79	555.2/13.0, e1 (5365	1	1	555.2416	13.0	[M+H]+
80	557.3/12.9, e17 (539	17	1	557.2547	12.9	[M+H]+
81	563.1/1.5, e25 (5455	25	2	563.0819	1.5	[M+H]+
82	563.1/1.5, e18 (5456	18	2	563.0850	1.5	[M+H]+
83	565.1/1.5, e25 (5477	25	2	565.0800	1.5	[M+H]+
84	571.2/13.0, e18 (556	18	1	571.2152	13.0	[M+H]+
85	607.3/22.4, e19 (588	19	3	607.2559	22.4	[M+H]+, [M+Na]+ (629.2373), [M+CH3OH+H]+ (639.2470), [M+K]+ (645.2306)
86	609.3/22.3, e19 (590	19	3	609.2697	22.3	[M+H]+, [M+Na]+ (631.2517), [M+CH3OH+H]+ (641.2636)
87	623.3/21.7, e20 (601	20	1	623.2501	21.7	[M+H]+, [M+Na]+ (645.2311)
88	623.3/21.4, e20 (601	20	6	623.2512	21.4	[M+H]+, [M+NH4]+ (640.3189), [M+Na]+ (645.2334), [M+CH3OH+H]+ (655.2759)
89	623.3/21.7, e1 (6017	1	1	623.2516	21.7	[M+H]+, [M+Na]+ (645.2317), [M+K]+ (661.2260)
90	625.3/21.1, e20 (602	20	1	625.2643	21.1	[M+H]+, [M+Na]+ (647.2468), [M+K]+ (663.2364)
91	628.2/1.5, e1 (6056)	1	2	628.2260	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (650.2062), [M+H+K]2+ (333.5896)
92	645.2/21.7, e20 (622	20	1	645.2317	21.7	[M+Na]+, [M+H]+ (623.2516)

Tableau 15: Variables identifiées et triées par le traitement de données à l'aide du logiciel MarkerView

Index	Nom du pic	Expérience	Groupe	*m/z*	Temps de rétention	Type de pic (selon le logiciel MarkerView)
58	510.3/18.3, e1 (4849)	1	1	510.34	18.3	[2M+NH4]+, [M+H]+ (247.1716)
43	321.2/16.9, e1 (2525)	1	1	321.21	16.9	[M+CH3OH+H]+, [M+H]+ (289.1802)
11	126.1/6.9, e1 (368)	1	3	126.06	6.9	[M+H]+
33	279.2/20.4, e1 (2032)	1	1	279.23	20.4	[M+H]+
54	422.2/1.5, e1 (3875)	1	2	422.15	1.5	[M+H]+
55	472.4/19.9, e1 (4504)	1	3	472.36	19.9	[M+H]+
65	525.3/17.5, e1 (5002)	1	1	525.27	17.5	[M+H]+
66	534.3/15.7, e1 (5100)	1	1	534.29	15.7	[M+H]+
69	539.2/16.9, e1 (5167)	1	1	539.23	16.9	[M+H]+
70	539.2/15.4, e1 (5174)	1	1	539.25	15.4	[M+H]+
71	539.2/15.7, e1 (5175)	1	1	539.25	15.7	[M+H]+
77	555.2/15.7, e1 (5360)	1	3	555.22	15.7	[M+H]+
79	555.2/13.0, e1 (5365)	1	1	555.24	13.0	[M+H]+
52	377.3/19.7, e1 (3375)	1	1	377.30	19.7	[M+H]+, [2M+H]+ (753.5841)
16	207.1/17.0, e1 (1222)	1	1	207.14	17.0	[M+H]+, [2M+Na]+ (435.2353), [2M+K]+ (451.2307)
29	261.2/19.4, e1 (1876)	1	1	261.19	19.4	[M+H]+, [2M+NH4]+ (538.3506)
38	301.2/19.4, e1 (2287)	1	1	301.18	19.4	[M+H]+, [2M+NH4]+ (618.3494)
26	229.2/19.4, e1 (1571)	1	1	229.16	19.4	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (261.1843)
36	291.2/17.9, e1 (2162)	1	1	291.20	17.9	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (323.2207)
44	321.2/17.1, e1 (2526)	1	1	321.21	17.1	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (353.2282)
45	328.2/17.8, e1 (2613)	1	1	328.25	17.8	[M+H]+, [M+CH3OH+H]+ (360.2744)
14	144.1/6.9, e1 (545)	1	3	144.07	6.9	[M+H]+, [M+Na]+ (166.0479), [M+K]+ (182.0213), [2M+Na]+ (309.1056), [2M+K]+ (325.0704)
24	212.1/1.5, e1 (1311)	1	2	212.08	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (234.0585), [M+K]+ (250.0328), [2M+H]+ (423.1493), [2M+Na]+ (445.1292)
27	247.2/18.4, e1 (1741)	1	1	247.17	18.4	[M+H]+, [M+Na]+ (269.1512), [M+K]+ (285.1338), [2M+NH4]+ (510.3434)
32	277.2/19.9, e1 (2014)	1	1	277.22	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (299.1984), [M+K]+ (315.1637), [2M+H]+ (553.4262)
35	287.2/18.4, e1 (2121)	1	1	287.16	18.4	[M+H]+, [M+Na]+ (309.1426), [M+K]+ (325.1155)
40	317.2/19.9, e1 (2479)	1	1	317.21	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (339.1911), [M+K]+ (355.1643), [2M+H]+ (633.4106), [2M+Na]+ (655.3926), [2M+K]+ (671.3639)
46	333.2/19.9, e1 (2669)	1	1	333.18	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (355.1637), [2M+NH4]+ (682.4293)
47	333.2/18.8, e1 (2677)	1	1	333.20	18.8	[M+H]+, [M+Na]+ (355.1850), [2M+NH4]+ (682.4285)
48	338.3/23.5, e1 (2728)	1	6	338.34	23.5	[M+H]+, [M+Na]+ (360.3239), [M+K]+ (376.2969), [2M+H]+ (675.6760), [2M+Na]+ (697.6573)
62	523.3/16.9, e1 (4978)	1	1	523.25	16.9	[M+H]+, [M+Na]+ (545.2587)
89	623.3/21.7, e1 (6017)	1	1	623.25	21.7	[M+H]+, [M+Na]+ (645.2317), [M+K]+ (661.2260)
91	628.2/1.5, e1 (6056)	1	2	628.23	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (650.2062), [M+H+K]2+ (333.5896)
34	280.2/15.2, e1 (2042)	1	3	280.16	15.3	[M+H]+, [M+NH4]+ (297.1833), [M+Na]+ (302.1365), [M+K]+ (318.1104)
50	351.2/16.5, e1 (2878)	1	1	351.21	16.5	[M+H]+, [M+NH4]+ (368.2631), [M+Na]+ (373.2180)
61	523.3/17.1, e1 (4973)	1	1	523.25	17.1	[M+H]+, [M+NH4]+ (540.2338), [M+Na]+ (545.2337), [M+K]+ (561.2116)
37	297.2/15.2, e1 (2228)	1	3	297.18	15.3	[M+NH4]+, [M+H]+ (280.1566)
56	484.3/17.1, e1 (4622)	1	1	484.27	17.1	[M+NH4]+, [M+H]+ (467.2045), [M+CH3OH+H]+ (499.2536)
74	548.5/23.3, e1 (5265)	1	3	548.50	23.3	[M+NH4]+, [M+H]+ (531.4756), [M+Na]+ (553.4584), [M+K]+ (569.4330)
19	210.1/1.5, e6 (1253)	6	2	210.08	1.5	[M+H]+, [M+Na]+ (232.0611), [M+K]+ (248.0352), [2M+K]+ (457.1084)
31	277.2/19.9, e8 (2013)	8	6	277.22	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (299.1973), [M+K]+ (315.1631)
39	317.2/19.9, e9 (2476)	9	6	317.21	19.9	[M+H]+, [M+Na]+ (339.1902), [M+K]+ (355.1615), [2M+Na]+ (655.3902), [2M+K]+ (671.3534)
63	525.3/17.1, e16 (4996)	16	3	525.26	17.1	[M+H]+, [M+K]+ (563.1812)
59	523.2/16.9, e16 (4966)	16	1	523.25	16.9	[M+H]+, [M+NH4]+ (540.2282), [M+CH3OH+H]+ (555.2207)
64	525.3/17.5, e16 (4999)	16	1	525.27	17.5	[M+H]+, [M+NH4]+ (542.2456), [M+CH3OH+H]+ (557.2381)
75	553.2/22.7, e17 (5327)	17	1	553.24	22.7	[M+CH3OH+H]+, [M+H]+ (521.2554), [M+NH4]+ (538.2571), [M+K]+ (559.2349)
68	539.2/16.9, e17 (5164)	17	1	539.22	16.9	[M+H]+
73	540.2/15.7, e17 (5187)	17	6	540.25	15.7	[M+H]+
80	557.3/12.9, e17 (5397)	17	1	557.25	12.9	[M+H]+
67	537.2/14.4, e17 (5139)	17	1	537.23	14.4	[M+K]+, [M+H]+ (499.2544)
78	555.2/13.0, e17 (5363)	17	1	555.24	13.0	[M+K]+, [M+H]+ (517.2638)
72	540.2/16.8, e17 (5183)	17	1	540.23	16.9	[M+NH4]+, [M+H]+ (523.2490)
76	553.3/18.8, e17 (5331)	17	1	553.30	18.8	[M+NH4]+, [M+H]+ (536.3344)
82	563.1/1.5, e18 (5456)	18	2	563.09	1.5	[M+H]+
84	571.2/13.0, e18 (5560)	18	1	571.22	13.0	[M+H]+
85	607.3/22.4, e19 (5886)	19	3	607.26	22.4	[M+H]+, [M+Na]+ (629.2373), [M+CH3OH+H]+ (639.2470), [M+K]+ (645.2306)
86	609.3/22.3, e19 (5905)	19	3	609.27	22.3	[M+H]+, [M+Na]+ (631.2517), [M+CH3OH+H]+ (641.2636)
87	623.3/21.7, e20 (6011)	20	1	623.25	21.7	[M+H]+, [M+Na]+ (645.2311)
90	625.3/21.1, e20 (6028)	20	1	625.26	21.1	[M+H]+, [M+Na]+ (647.2468), [M+K]+ (663.2364)
88	623.3/21.4, e20 (6014)	20	6	623.25	21.4	[M+H]+, [M+NH4]+ (640.3189), [M+Na]+ (645.2334), [M+CH3OH+H]+ (655.2759)
92	645.2/21.7, e20 (6225)	20	1	645.23	21.7	[M+Na]+, [M+H]+ (623.2516)

Tableau 16: Classement des métabolites identifiés pour l'étude des valeurs d'AUC corrigées par la densité cellulaire

Absent dans les échantillons blancs	Présent dans les échantillons blancs avec min 2 valeurs AUC échantillon > AUC x5 du blanc	Présent dans les échantillons blanc avec valeurs AUC échantillons ≤ AUC x5 du blanc
5'-methylthioadenosine_POS	glycocholic acid_POS	7-ketocholesterol_POS_2
adenosine monophosphate_POS	l-proline_POS	l-carnitine_POS
alpha-linolenic acid_POS	l-tyrosine_POS	l-norleucine_POS_2
l-arginine_POS	theobromine_POS	pyroglutamic acid_POS
guanosine et deoxy_NEG	2-piperidinone_BL_POS	2-pyrrolidinone_BL_POS
l-glutamic acid_NEG	glycerophosphocholine_BL_POS	acetaminophen_BL_POS
succinic acid_NEG	niacinamide_BL_POS	adenine_BL_POS
uridine diphosphate glucose_NEG	2,2-dimethylsuccinic acid_NEG	betaine_BL_POS
uridine_NEG	2-methylglutaric acid_NEG	phthalic acid_BL_POS
	3-hydroxybenzoic acid_NEG	senecioic acid_BL_POS
	citric acid_NEG	verapamil_BL_POS
	l-tryptophan_NEG	adenosine monophosphate_NEG
	l-tyrosine_NEG	adenosine_NEG
	methylglutaric acid_NEG	aminoadipic acid_NEG
	glycocholic acid_BL_NEG	sucrose_NEG
	l-phenylalanine_BL_NEG	traumatic acid_NEG
	suberic acid_BL_NEG	1,11-undecanedicarboxylic acid_BL_NEG
	undecanedioic acid_BL_NEG	2-chlorobenzoic acid_BL_NEG
	urocanic acid_BL_NEG	acetaminophen_BL_NEG
		adenine_BL_NEG
		azelaic acid_BL_NEG
		hexadecanedioic acid_BL_NEG
		pyroglutamic acid_BL_NEG
		sebacic acid_BL_NEG
		tetradecanedioic acid_BL_NEG

Chapitre 3

Séparation par chromatographie liquide et quantification par monitoring de réactions sélectionnées (SRM) des métabolites polaires dans les érythrocytes

Table des matières - Chapitre 3

1. Introduction générale du chapitre 3 211
1.1. Séparation des métabolites polaires par chromatographie liquide 211
1.2. Quantification des métabolites polaires et développement de méthodes pour l'analyse par spectrométrie de masse 213
1.3. Les cascades biologiques d'intérêt pour la compréhension des systèmes biologiques . 214
1.4. La malaria et le processus de développement du parasite 216
2. Etudes menées dans ce chapitre 219
2.1. Première étude - section 3 partie 1 - Comparaison des rétentions des métabolites polaires par chromatographie liquide en phase inverse, HILIC et par paire d'ions 219
2.2. Seconde étude – section 4 partie 2 - Quantification absolue et relative par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des hépatocytes et érythrocytes sains et parasités par P.falciparum 220
2.3. Troisième étude – section 5 partie 3 - Etude du recouvrement d'extraction et quantification absolue par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des érythrocytes sains et parasités par P.falciparum 220
2.4. Références de l'introduction du chapitre 3 221
3. Partie 1 – Comparaison des rétentions des métabolites polaires par chromatographie liquide en phase inverse, par chromatographie liquide d'interaction hydrophile et par paire d'ions 223
3.1. Introduction 223
Sous-partie 1- Etude préliminaire de la rétention en phase inverse par l'utilisation d'un agent de paire d'ions 223
Sous-partie 2 - Choix des métabolites d'intérêt et étude de leur rétention en phase inverse avec et sans agent de paire d'ions 223
Sous-partie 3 - Etude de la chromatographie liquide d'interaction hydrophile sur un nombre restreint de métabolites 224
3.2. Matériel et méthodes 224
Sous-partie 1- paire d'ions comparée à la phase inverse 224
Sous-partie 2 – paire d'ions comparée à la phase inverse pour un nombre défini de composés . 225
Sous-partie 3 - HILIC 226
3.3. Résultats et discussion 228
Comparaison des chromatogrammes des métabolites sur une colonne C18 avec et sans paire d'ions 228
Etude de la chromatographie liquide d'interaction hydrophile sur un nombre restreint de métabolites 233
3.4. Conclusions et perspectives partie 1 chapitre 3 235
3.5. Références de la partie 1 du chapitre 3 236

4. Partie 2 - Quantification absolue et relative par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des hépatocytes et érythrocytes sains et parasités par P. falciparum 237
4.1. Introduction 237
Généralités 237
La recherche en Suisse 237
Enjeux et recherche en métabolomique 237
Etudes menées dans la partie 2 238
4.2. Matériel et méthode 238
Standards 238
Préparation d'échantillon 239
Chromatographie liquide 240
Spectrométrie de masse 240
4.3. Résultats et discussion 241
4.4. Conclusion et perspectives partie 2 chapitre 3 246
4.5. Références partie 2 chapitre 3 249
5. Partie 3 – Etude du recouvrement d'extraction et quantification absolue par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des érythrocytes sains et parasités par P.falciparum 251
5.1. Introduction 251
Analyse du recouvrement des composés selon la préparation d'échantillons 251
Sélection des métabolites et détermination des conditions optimales d'analyse par spectrométrie de masse 251
L'importance du standard interne chromatographique pour la correction des variations d'ionisation lors de l'électronébulisation par la source 252
Quantification absolue des métabolites présents dans des globules rouges sains et infectés ayant subi ou non une préparation d'échantillon préalable par saponification 252
5.2. Matériel et méthode 253
Choix des métabolites d'intérêt et étude de leur rétention en phase inverse avec et sans agent de paire d'ions 253
Liste des composés 254
Préparation d'échantillon pour l'étude du recouvrement 255
Préparation d'échantillon des globules rouges 256
Types d'échantillons 257
Chromatographie liquide 259
Spectrométrie de masse 259
Traitement des données 259
5.3. Résultats et discussion 260

Sélection des métabolites et détermination des conditions optimales d'analyse par spectrométrie de masse 260

L'importance du standard interne chromatographique pour la correction des variations d'ionisation lors de l'électronébulisation par la source 260

Analyse du recouvrement des composés selon la préparation d'échantillon 262

Quantification absolue des métabolites présents dans des globules rouges sains et infectés ayant subi ou non une préparation d'échantillon préalable par saponification 266

5.4. Conclusion et perspectives Partie 3 Chapitre 3 271

5.5. Références partie 3 chapitre 3 273

6. Conclusions et perspectives du chapitre 3 275

7. Remerciements 278

8. Références 279

9. Annexes 280

1. Introduction générale du chapitre 3

1.1. Séparation des métabolites polaires par chromatographie liquide

La chromatographie liquide repose sur la séparation des analytes selon leur affinité et donc selon les équilibres successifs (plateau) entre la phase stationnaire et la phase mobile. Les composés qui ne sont pas retenus, et donc détectés en premier lieu, sont ceux qui ne possèdent pas d'affinité pour la phase stationnaire et sont directement élués par la phase mobile. Le temps mort d'un système chromatographique est le temps nécessaire à la phase mobile pour traverser sans phénomène de rétention aucun, tout le système analytique depuis l'injecteur jusqu'au détecteur (ici un spectromètre de masse).

Les métabolites polaires sont peu retenus par des méthodes standards comme la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) [1]. On retrouve souvent un grand nombre de ces composés dans les temps morts en RPLC [2]. Ceci représente un inconvénient majeur pour la quantification des métabolites polaires qui peut amener à des variations d'intensités dues à la compétition à l'ionisation des espèces chimiques présentes. La sensibilité de la méthode de quantification peut aussi être potentiellement affectée par des composés ayant déjà une faible capacité d'ionisation, s'ils se retrouvent en présence d'espèces fortement ionisables. L'ionisation par électrospay (ESI) dans la source dépend du composé et de sa concentration.

La chromatographie en phase normale pourrait être utilisée dans ce cas, mais pose des problèmes de toxicité, car elle nécessite l'utilisation de solvants apolaires toxiques comme l'hexane. Récemment, avec l'émergence du terme « HILIC » pour chromatographie liquide d'interactions hydrophiles, une nouvelle voie s'est ouverte pour l'analyse des composés polaires, comme étant la solution à une faible rétention obtenue en phase inverse. Le terme HILIC peut être utilisé à plus grande échelle, en référence à une quantité de techniques employant une phase stationnaire polaire avec une phase mobile hydro-organique (ou polaire organique) [1]. Les principaux mécanismes de rétention sont la répartition des analytes dans un environnement hydrophile, ainsi que les faibles interactions électrostatiques [3, 4]. La phase stationnaire est de la silice greffée de groupements polaires tels qu'amine, amide ou diol. Cette technique peut être définie comme permettant de combler le manque entre la chromatographie non aqueuse en

phase normale et la chromatographie aqueuse en phase inverse [1]. C'est pourquoi cette technique est employée de façon combinée, dans de nombreuses études métabolomiques avec la phase inverse, en admettant que ces techniques soient complémentaires [5-8].
L'avantage de l'utilisation de la HILIC est la possibilité de travailler avec des systèmes HPLC standards sans avoir besoin d'utiliser des systèmes UPLC ou UHPLC. La proportion de solvant organique étant élevée, la viscosité s'en trouve réduite et les pressions rencontrées sont moins grandes. La proportion de phase aqueuse ne dépasse généralement pas 60%. Cette technique demande cependant des temps de rééquilibrations élevés et de longs développements de méthodes pour trouver une phase stationnaire adaptée à la problématique rencontrée.

Une technique plus ancienne datant des années 1970 est l'utilisation de la chromatographie liquide additionnée d'un agent de paire d'ions. Ces agents augmentent la capacité de rétention du système et des analytes chargés de façon opposée, en agissant à la fois sur la phase stationnaire et sur les analytes [9]. Cependant, ces composés tendent à être retenus de façon quasi permanente à la phase stationnaire, et il devient très difficile dès lors de retrouver les conditions de départ dans lesquelles la colonne chromatographique se trouvait avant l'utilisation de ces composés [9]. Les agents de paire d'ions typiques sont des alkyl sulfonate ou alkyl ammonium. Les composés ayant de longues chaînes ne sont pas compatibles avec la spectrométrie de masse, car ils sont peu volatils. Les agents de paire d'ions doivent être utilisés avec précaution, car ils peuvent polluer la source d'ionisation et diminuer l'intensité du signal. Ensuite, les agents de paire d'ions peuvent perturber le processus menant à la vaporisation et à la formation d'ions dans la source, due à la formation de liaisons entre l'analyte et l'agent de paire d'ions [10]. En effet, ils peuvent provoquer une suppression ionique préjudiciable à la sensibilité de la méthode [11].

La RPLC utilisée avec des agents de paire d'ions a été démontrée comme étant une méthode de séparation adaptée à l'analyse d'une large gamme de métabolites polaires, chargés négativement ou positivement, tels que les nucléotides, les sucres avec un groupement phosphate ou encore les acides carboxyliques [12-18] .

1.2. Quantification des métabolites polaires et développement de méthodes pour l'analyse par spectrométrie de masse

Les méthodes de quantification reposent sur l'utilisation d'un triple quadrupôle (notés QqQ) avec une sélection du précurseur dans le premier quadrupôle (Q1), une fragmentation dans le second (q2), et une sélection d'un ion produit par fragmentation dans le dernier quadrupôle (Q3). Q1 et Q3 sont en mode fixe, et les fenêtres sont par définition unitaires. Le second quadrupôle (q2) sert uniquement à conduire l'ion sélectionné et à effectuer la fragmentation à l'aide d'un gaz qui est généralement de l'azote. Ce mode est illustré dans la figure ci-dessous. Cette méthode est extrêmement sensible. Les expériences sont menées en série, et permettent une excellente sélection des ions d'intérêt. C'est une méthode de choix robuste et économique. Bien que la calibration des quadrupôles Q1 et Q3 doive être contrôlée par précaution avant chaque série d'analyses, celle-ci n'est sujette à variation que tous les 6 mois et jusqu'à 1 an environ. Cet avantage est très important en comparaison avec l'utilisation des TOF, car ceux-ci doivent être calibrés régulièrement tout au long d'une séquence, ou alors les analyses doivent être recalibrées post-acquisition, moyennant l'utilisation de standards dans les échantillons.

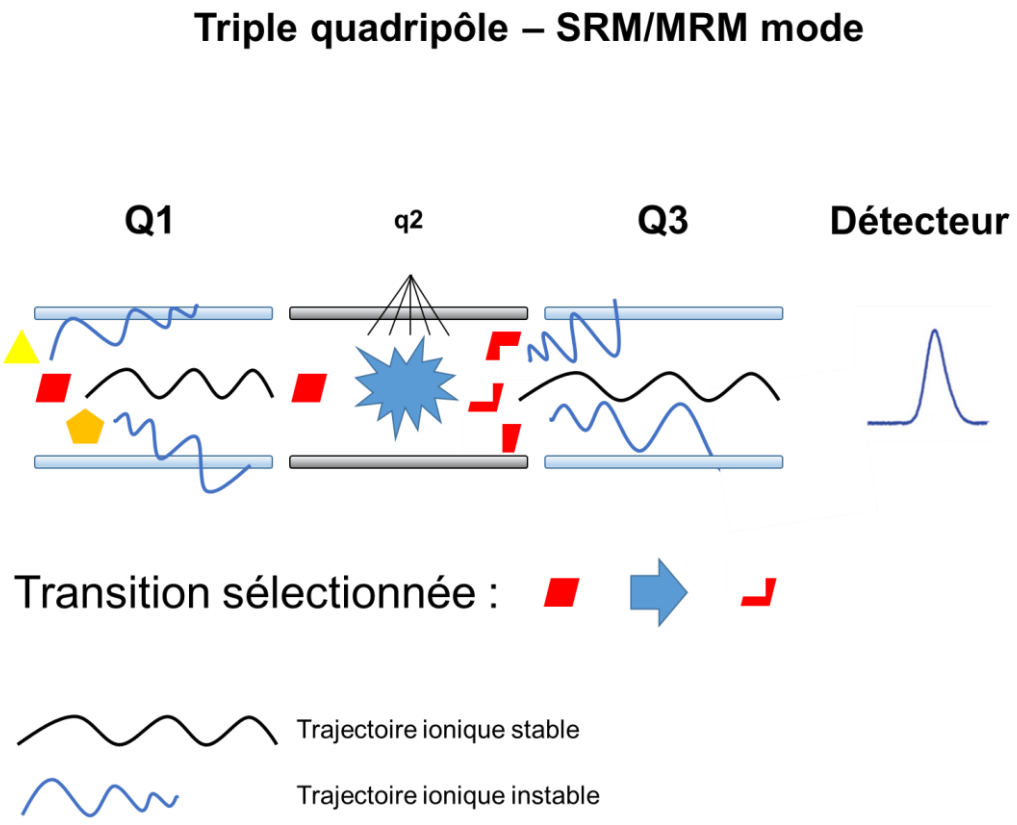


Figure 124: F de réactions sélectionnées (SRM, selected reaction monitoring)

Le nombre de transitions définies est cependant limité, car la durée du cycle ne doit pas dépasser 1/10 à 1/12 du temps d'élution du pic chromatographique, afin d'avoir au moins 10 spectres, et donc 10 points sur le pic correspondant au composé d'intérêt.

Le but final de ce chapitre est de quantifier de façon absolue des métabolites choisis précisément pour leur implication dans des cascades biologiques d'intérêt. Les globules rouges d'origine humaine constituent la matrice utilisée pour ces analyses.

La publication de Sana *et al* en 2013 [19] résume une étude relative, non-ciblée et ciblée, du plasmodium, avec pour technique séparative l'utilisation de la chromatographie liquide et gazeuse. L'identification et la validation des métabolites restent cependant une difficulté. La séparation et l'extraction des nucéotides et co-facteurs dans les globules rouges, par paire d'ions et détection UV, a déjà été investiguée il y a plus de 30 ans par Stocci *et al* [20].

1.3. Les cascades biologiques d'intérêt pour la compréhension des systèmes biologiques

Les métabolites font partie d'un système complexe, dynamique et en perpétuel changement. Les interactions entre les différents composants d'une cascade biologique, (à savoir : les métabolites, les protéines, les co-facteurs ainsi que les énergies mises en jeu) vont influer sur l'activation d'une cascade ou d'une autre, lorsque le système rencontre une perturbation ou une modification des concentrations des espèces présentes. Un exemple de réseau métabolique du *P. falciparum* est présenté dans la figure suivante.

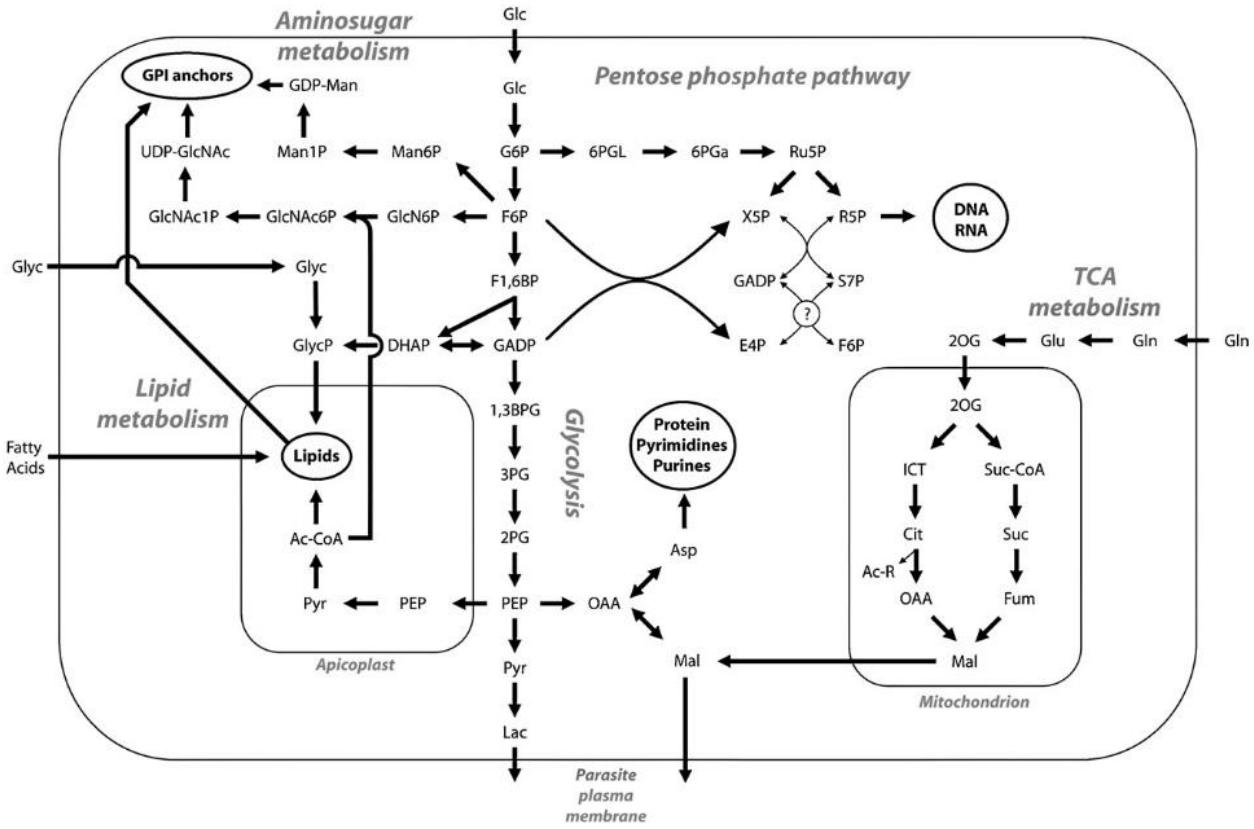


Figure 125: Carte intégrée du flux du cabone à travers la cascade du réseau métabolique de *Plasmodium falciparum* adapté de [21] avec autorisation. Abréviations: Glc, glucose;G6P,glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; F1,6BP, fructose-1,6-bisphosphate;DHAP,dihydroxy-acetonephosphate; GADP, glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate; Pyr, pyruvate; Lac, lactate; Ac-CoA, acetyl-CoA; Ac-R, either acetate or acetyl-CoA; GlycP, glycerol-3-phosphate; Glyc, glycerol; Man6P, mannose-6-phosphate; Man1P, mannose1-phosphate; GDP-Man, GDP-mannose; GlcN6P, glucosamine-6-phosphate; GlcNAc6P, N-acetyl-glucosamine-6-phosphate; GlcNAc1P, N-acetyl-glucosamine-1-phosphate; UDP-GlcNAc, UDP-N-acetyl-glucosamine; 6PGL, 6-phosphoglucono-□-lactone; 6PGa, 6-phosphogluconate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; Asp, aspartate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; 2OG, 2-oxoglutarate; ICT, isocitrate; Cit, citrate; OAA, oxaloacetate; Mal, malate; Suc-CoA, succinyl-CoA; Suc, succinate; Fum, fumarate; GPI, glycophosphatidylinosito

Les organelles, importantes pour le métabolisme de la cellule eucaryote, sont les mitochondries ainsi que le cytosol. Le cycle de l'acide citrique, le catabolisme des acides aminés ou encore la phosphorylation oxydative se déroulent dans les mitochondries. La glycolyse, la voie des pentoses phosphates (pentose phosphate pathway, PPP), la biosynthèse des acides gras ainsi que la gluconéogenèse ont lieu dans le cytosol.

Le cycle de l'acide citrique (TCA ou cycle de Krebs) est particulièrement ciblé en métabolomique. C'est en effet le cœur des cascades métaboliques de la cellule eucaryote et le centre de production d'énergie et de provision d'intermédiaires essentiels pour la synthèse de macromolécules [22].

1.4. La malaria et le processus de développement du parasite

Le cycle de développement du parasite responsable de la malaria ou paludisme (*plasmodium* sp) se déroule en deux phases. Il existe une phase sexuée qui est présente chez le moustique et une phase asexuée chez l'humain. Chez l'humain, le développement se fait en deux étapes successives par l'infection des cellules hépatiques, suivie de la phase sanguine où le parasite va se développer dans les globules rouges de l'hôte. Ceci mènera à la destruction du globule rouge et à la libération des schizontes dans la circulation sanguine (voir figures suivantes).

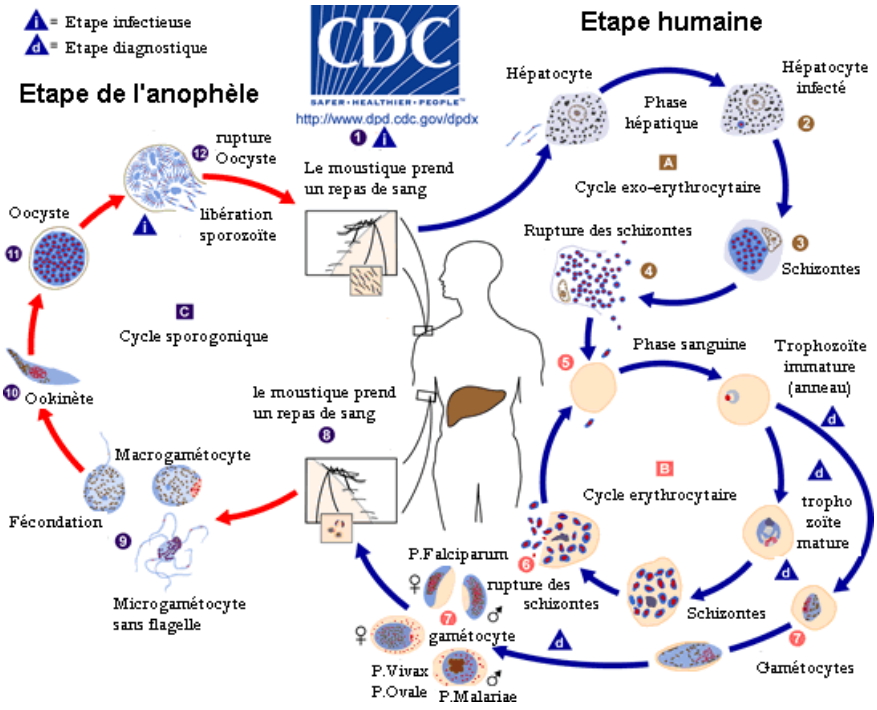


Figure 126: Cycle biologique du parasite responsable de la malaria, tiré de [23]

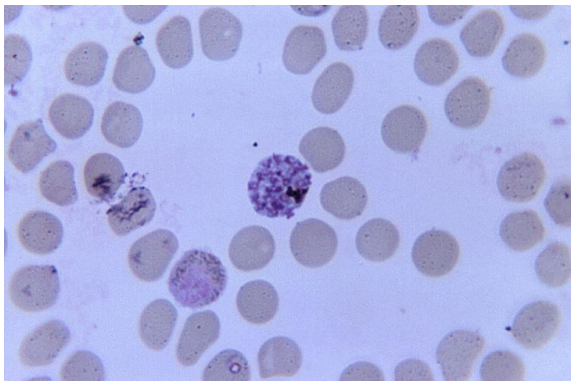


Figure 127: Globules rouges infectés par des schizontes, tiré de [24]

Dans le cas de la malaria, l'étude métabolomique comme approche analytique dans l'étude des cascades biologiques impliquant un organisme pathogène, est essentielle. En effet, il existe une connexion intrinsèque entre l'hôte et le parasite, ce qui rend cette étude d'autant plus importante. Les parasites de types apicomplexes, bien que possédant le set complet de gènes codants pour le cycle de Krebs, souffrent d'un manque d'enzymes mitochondriales complexes, nécessaires pour la production d'acétylCoA à partir de pyruvate, permettant l'oxydation des intermédiaires glycolytiques dans le cycle de Krebs [22].

2. Etudes menées dans ce chapitre

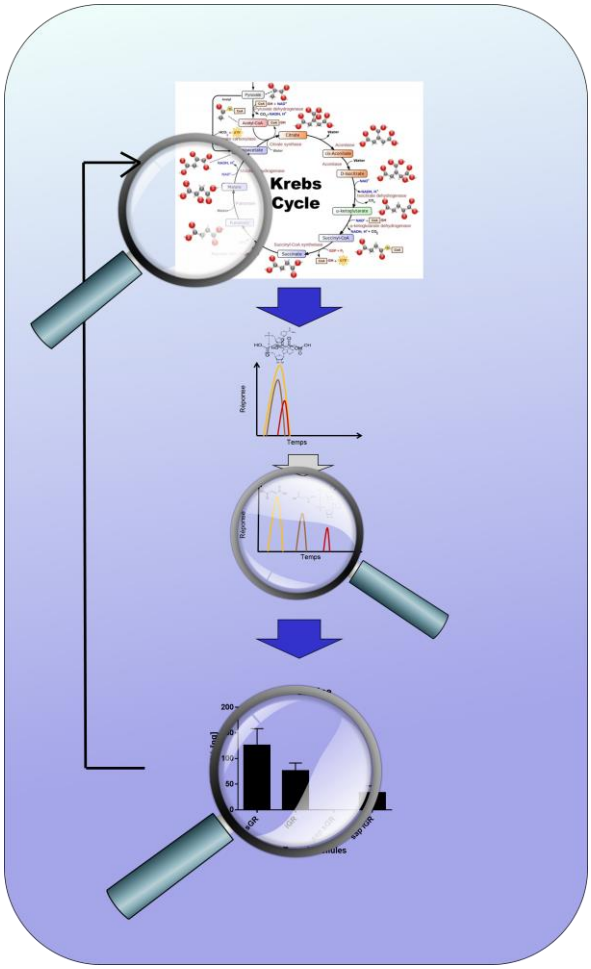


Figure 128: Résumé des études menées dans ce chapitre

2.1. Première étude - section 3 partie 1 - Comparaison des rétentions des métabolites polaires par chromatographie liquide en phase inverse, HILIC et par paire d'ions

La première étude de ce chapitre consiste en l'analyse de la séparation des métabolites polaires par chromatographie liquide. L'utilisation d'un agent de paire d'ions pour augmenter la rétention est utilisé dans un premier temps en comparaison avec la chromatographie en phase inverse. La chromatographie liquide d'interaction hydrophile est envisagée dans un second temps, afin de compléter les possibilités de séparation des métabolites polaires. Ces études sont exploitées sur un nombre discret de métabolites ayant un intérêt dans les cascades métaboliques, comme celles des pentoses phosphates, du cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) ou de la glycolyse.

2.2. Seconde étude – section 4 partie 2 - Quantification absolue et relative par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des hépatocytes et érythrocytes sains et parasités par *P.falciparum*

La seconde étude est menée toujours sur un nombre restreint de métabolites. Ceux-ci sont quantifiés de façon absolue et relative dans différents types de matrices, à savoir des globules rouges sains ou infectés par le parasite responsable de la malaria (*p. falciparum*) ainsi que dans des cellules hépatiques particulières (HepG2).

2.3. Troisième étude – section 5 partie 3 - Etude du recouvrement d'extraction et quantification absolue par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des érythrocytes sains et parasités par *P.falciparum*

La troisième étude s'intéresse au développement de la méthode ciblée, par spectrométrie de masse couplée à la chromatographe liquide, ainsi qu'au recouvrement d'extraction des métabolites polaires lors de la préparation d'échantillon. Enfin, cette étude quantifie un nombre important de métabolites présents dans des globules rouges infectés par le *P. falciparum*.

2.4. Références de l'introduction du chapitre 3

1. Jandera, P., *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review.* Analytica Chimica Acta, 2011. **692**(1-2): p. 1-25.
2. Cai, X., et al., *Analysis of highly polar metabolites in human plasma by ultra-performance hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry.* Anal. Chim. Acta, 2009. **650**(1): p. 10-15.
3. Alpert, A.J., *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds.* J. Chromatogr., 1990. **499**: p. 177-96.
4. Alpert, A.J., et al., *Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates.* J. Chromatogr. A, 1994. **676**(1): p. 191-202.
5. Gika, H.G., G.A. Theodoridis, and I.D. Wilson, *Hydrophilic interaction and reversed-phase ultra-performance liquid chromatography TOF-MS for metabonomic analysis of Zucker rat urine.* J. Sep. Sci., 2008. **31**(9): p. 1598-1608.
6. Zhang, T., et al., *Evaluation of Coupling Reversed Phase, Aqueous Normal Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2012. **84**(4): p. 1994-2001.
7. Nzoughet, J.K., et al., *Hydrophilic interaction (HILIC) and reverse phase liquid chromatography (RPLC)-high resolution MS for characterizing lipids profile disruption in serum of anabolic implanted bovines.* Metabolomics, 2015. **11**(6): p. 1884-1895.
8. Tang, D.-Q., et al., *HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS.* Mass Spectrom. Rev., 2016. **35**(5): p. 574-600.
9. Cecchi, T., *Theoretical Models of Ion Pair Chromatography: A Close Up of Recent Literature Production.* J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2015. **38**(3): p. 404-414.
10. Gustavsson, S.A., et al., *Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents.* J. Chromatogr. A, 2001. **937**(1-2): p. 41-47.
11. Takino, M., S. Daishima, and K. Yamaguchi, *Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents.* Anal. Sci., 2000. **16**(7): p. 707-711.
12. Coulier, L., et al., *Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.* Analytical chemistry, 2006. **78**(18): p. 6573-82.
13. Luo, B., et al., *Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry.* J. Chromatogr. A, 2007. **1147**(2): p. 153-164.
14. Huck, J.H.J., et al., *Profiling of pentose phosphate pathway intermediates in blood spots by tandem mass spectrometry: Application to transaldolase deficiency.* Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2003. **49**(8): p. 1375-1380.
15. Tuytten, R., et al., *Short capillary ion-pair high-performance liquid chromatography coupled to electrospray (tandem) mass spectrometry for the simultaneous analysis of nucleoside mono-, di- and triphosphates.* Rapid Commun. Mass Spectrom., 2002. **16**(12): p. 1205-1215.
16. Kumar, B., et al., *Interaction between sulphur mobilization proteins SufB and SufC: Evidence for an iron-sulphur cluster biogenesis pathway in the apicoplast of Plasmodium falciparum.* Int. J. Parasitol., 2011. **41**(9): p. 991-999.

17. Knee, J.M., et al., *A novel ion pairing LC/MS metabolomics protocol for study of a variety of biologically relevant polar metabolites.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013. **936**: p. 63-73.
18. Laourdakis, C.D., et al., *Comprehensive quantitative analysis of purines and pyrimidines in the human malaria parasite using ion-pairing ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 2014. **967**(0): p. 127-133.
19. Sana, T.R., et al., *Global mass spectrometry based metabolomics profiling of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* PloS one, 2013. **8**(4): p. e60840.
20. Stocchi, V., et al., *Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells.* Anal. Biochem., 1985. **146**(1): p. 118-24.
21. Olszewski, K.L. and M. Llinas, *Central carbon metabolism of Plasmodium parasites.* Molecular and biochemical parasitology, 2011. **175**(2): p. 95-103.
22. Oppenheim, R.D., et al., *BCKDH: the missing link in apicomplexan mitochondrial metabolism is required for full virulence of Toxoplasma gondii and Plasmodium berghei.* PLoS pathogens, 2014. **10**(7): p. e1004263.
23. *Biologie de la Malaria*. [cited 2017 may 15th]; Available from: https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/.
24. *Globules rouges infectés*. [cited 2017 may 16th]; Available from: https://pixnio.com/science/microscopy-images/malaria-plasmodium/simian-blood-sample-revealed-the-presence-of-a-mature-simian-malarial-schizont-and-gametocyte.

3. Partie 1 – Comparaison des rétentions des métabolites polaires par chromatographie liquide en phase inverse, par chromatographie liquide d'interaction hydrophile et par paire d'ions

3.1. Introduction

Cette partie du chapitre 3 traite de l'étude de la rétention des métabolites polaires. Elle est elle-même divisée en trois sous-parties. Dans le chapitre précédent, a été démontrée l'importance de la séparation des métabolites polaires. Ceux-ci se retrouvent en effet souvent dans le temps mort, ce qui péjore leur détection et leur quantification ultérieure. Leur identification pose elle aussi un problème lors d'analyses non-ciblées n'utilisant pas le monitoring de réactions sélectionnées.

Sous-partie 1- Etude préliminaire de la rétention en phase inverse par l'utilisation d'un agent de paire d'ions

Les métabolites ciblés étant principalement polaires, une méthode alternative [1] est prise en compte afin d'améliorer les paramètres chromatographiques, comme le temps de rétention, l'aspect du pic chromatographique, la largeur du pic à mi-hauteur, ou encore la résolution. Plus de 500 composés ont été analysés en chromatographie liquide pour la création d'une base de données interne. Cette étude est une approche préliminaire à la paire d'ions. Ces composés sont à leur tour injectés sur une colonne en phase inverse contenant cette fois un agent de paire d'ions, et les facteurs de rétention sont comparés.

Sous-partie 2 - Choix des métabolites d'intérêt et étude de leur rétention en phase inverse avec et sans agent de paire d'ions

Les métabolites polaires sont souvent des acides organiques contenant une fonction carboxylique. Ceci rend ces composés particulièrement polaires, et leur rétention sera diminuée en chromatographie liquide en phase inverse. Tout d'abord, un certain nombre de métabolites sont sélectionnés pour une étude de rétention. Ceux-ci proviennent de plusieurs cascades biologiques, telles que le cycle de l'acide citrique (TCA) ou encore la voie des pentoses phosphates, (PPP). La partie précédente comparait des facteurs de rétention. Cependant, ces analyses préliminaires sont réalisées sur des colonnes

différentes et des gradients différents. C'est pourquoi cette sous-partie analyse les données dans des conditions parfaitement similaires. Les transitions, ainsi que les paramètres de sources, sont optimisés pour ces composés.

Sous-partie 3 - Etude de la chromatographie liquide d'interaction hydrophile sur un nombre restreint de métabolites

La HILIC est largement répandue pour effectuer l'analyse des composés polaires [2-5]. Une étude sur un petit nombre de composés est réalisée. Ceci permet d'avoir un regard critique sur une première approche de la HILIC et sur son utilité pour la problématique envisagée.

3.2. Matériel et méthodes

Sous-partie 1- paire d'ions comparée à la phase inverse

Phase inverse

La séparation chromatographique à ultra haute performance est réalisée sur un système dual UHPLC UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Allemagne). Les conditions chromatographiques basiques sont pour A : solution aqueuse à 5mM ammonium acétate et tamponnée à pH 8.0 avec de l'hydroxyde d'ammonium et B : MeOH. Les conditions chromatographiques acides sont pour A : solution aqueuse 5mM ammonium formate ajustée à pH 3.0 avec de l'acide formique et B : MeOH. La colonne utilisée provient de Waters, T3 Xselect HSS XP, C_{18}, 5 µm, 2.1 mm x 150 mm avec une colonne de garde SecurityGuard (Phenomenex, Torrance, CA, USA) et un filtre approprié de catégorie C_{18}. Le débit est de 300 µL/min. La phase mobile B est de 0% la première minute, puis augmente, jusqu'à atteindre 100% en 20 minutes, cette valeur est maintenue pendant 3 minutes, puis est suivie par le retour aux conditions de départ en 0.1 minute. Les échantillons sont gardés à 6°C dans l'autosampler, et la colonne est thermostatée à 40°C.

Un Triple TOF 5600 de ABSciex est utilisé. L'analyse est composée tout d'abord d'une expérience TOF MS scan, suivie par 10 TOF MS/MS scans sur une gamme de masse allant de 50 – 1000 *m/z*. Le temps d'accumulation pour chaque expérience est de 71 ms, avec un temps de cycle de 810 ms. L'énergie de collision appliquée est de 45 eV, utilisant

un écart d'énergie de collision de ± 35 eV. La tension appliquée est de 5300 V, -4300 V avec un DP de ± 70 Volts, et une température de source de 450°C. Le curtain gas est de 25 GS1 et GS2 de 40.
Ces conditions analytiques proviennent de la thèse de Tobias Bruderer défendue en 2016 [6].

Paire d'ions

La séparation chromatographique à ultra haute performance est réalisée sur un système dual UHPLC UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Germany. La séparation est effectuée sur une colonne Inertsil ODS-3 2.1x150 mm (5 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile A est : H_2O + 10 mM hexylamine avec un pH ajusté à 6.3 avec de l'acide acétique. La phase mobile B contient 90% MeOH + 10% H_2O + 10 mM d'ammonium acétate à un pH de 8.5 ajusté avec de l'ammoniac. Le gradient appliqué est le suivant : 0% pendant 3 min., 0% à 100 %B en 10 min et plateau pendant 3 min., suivi de la rééquilibration du système pendant 10 minutes. Le débit est de 400 µL/min, et le volume injecté est de 10 µL.

Un 4000 QTrap de ABSciex est utilisé en mode SRM, et l'analyse est effectuée en mode négatif. Le temps d'accumulation pour chaque transition est de 50 ms, et le temps de cycle varie selon le nombre de transitions. L'énergie de collision appliquée est de -30 eV. La tension appliquée est de -4800 V, avec un DP de -20 Volts, et une température de source de 450°C. Le curtain gas est de 10, GS1 et GS2 de 40.

Sous-partie 2 – paire d'ions comparée à la phase inverse pour un nombre défini de composés

Phase inverse

Les analyses chromatographiques en phase inverse ont été réalisées sur une colonne Inertsil ODS-3 2.1x150 mm (5 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile A à pH 3 est : H_2O + 0.1% FA et à pH8 : H_2O + 10 mM d'ammonium acétate ajusté avec de l'ammoniac. La phase mobile B contient du MeOH. Le gradient appliqué est le suivant : 0% pendant 3 min. 0-100 %B en 10 min, et plateau pendant 3 min. suivi de la rééquilibration du système pendant 4 minutes à 700 µL/min. Le débit est de 450 µL/min et le volume injecté est de 10 µL.

Paire d'ions

La séparation est réalisée sur une colonne Inertsil ODS-3 2.1x150 mm (2 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile A est : H_2O + 10 mM hexylamine avec un pH ajusté à 6.3 avec de l'acide acétique. La phase mobile B contient : 90% MeOH + 10% H_2O + 10 mM d'ammonium acétate à un pH de 8.5 ajusté avec de l'ammoniac. Le gradient appliqué est le suivant : 0% B pendant 3 min. 100-0 %B en 10 min et plateau pendant 3min. suivi de la rééquilibration du système pendant 10minutes. Le débit est de 250 µL/min et le volume injecté est de 10 µL.

Un 4000 QTrap de ABSciex est utilisé en mode SRM, et l'analyse est effectuée en mode négatif. Le temps d'accumulation pour chaque transition est de 50ms. L'énergie de collision appliquée est de -30 eV. La tension appliquée est de -4800 V, avec un DP de -20 Volts et une température de source de 450°C. Le curtain gas est de 10, GS1 et GS2 de 40.

Sous-partie 3 - HILIC

La colonne HILIC Synchronis de ThermoFisher a été sélectionnée comme étant le meilleur choix, selon la littérature et selon des analyses préliminaires, avec une colonne de type amide. Le protocole établi par ThermoFisher a été suivi. C'est pourquoi des conditions de pH de 6.3 ont été utilisées (voir l'arbre de décision en annexe, 153)

Conditions chromatographiques

La séparation est réalisée sur une colonne ThermoFisher Synchronis HILIC 100x2.1 mm (1.7 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile A est : H_2O + 50 mM ammonium acétate avec un pH ajusté à 6.3 avec de l'acide acétique. La phase mobile B contient de l'ACN. Le gradient appliqué est le suivant : 95% B pendant 1min. 95-80%B en 8 min. 80-40%B en 2 minutes, et plateau pendant 3 min. suivi de la rééquilibration du système pendant 10 minutes. Le débit est de 600 µL/min et le volume injecté est de 2 µL. La concentration des standards est de 10 µg/mL.

Spectrométrie de masse

Les analyses ont été effectuées en mode négatif sur un triple quadrupôle de type 4000 QTRAP® AB Sciex, Concord, Canada. Le temps d'accumulation pour chaque transition est de 50 ms. L'énergie de collision appliquée est variable selon chaque composé, tout comme le DP ainsi que le CXP. Ces paramètres ont été optimisés. La tension appliquée est de -4500 V, avec une température de source de 450°C. Le curtain gas est de 10, GS1 et GS2 de 50. La liste complète des transitions se trouve en annexe. Certains métabolites ne se fragmentent pas, et donc une analyse SIM/SIM est par conséquent effectuée.

Standards utilisés :

Le glycerol 3-phosphate, le glucose 6 phosphate, l'acide fumarique, la l-valine, la leucine l'acide glutamique, l'acide l-aspartique, l'acide malique, la l-alanine l'acide citrique, l'acide 4-aminobutyrique, la l-isoleucine, le d-glucose, le fructose 6-phophate, le d ribose 5-phosphate, l'acétylCoA, l'acide 3-phosphoglycerique, l'acide pyruvique proviennent du fournisseur Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). L'acide succinique et le d-lactic acid sont fournis par la maison Alfa-Aeser (Haverhill, Massachusetts, USA).

Table 3: 20 composés et leur formule moléculaire

Compound name	Molecular formula
Glycerol 3-phosphate	C3H9O6P
Glucose 6-phosphate	C6H13O9P
fumaric acid	C4H4O4
l-leucine	C6H13NO2
l-valine	C5H11NO2
l-glutamic acid	C5H9NO4
l-aspartic acid	C4H7NO4
malic acid	C4H6O5
l-alanine	C3H7NO
Succinic acid	C4H6O4
citric acid	C6H8O7
4-Aminobutyric acid	C4H9NO2
l-isoleucine	C6H13NO2
d-glucose	C6H12O6
fructose 6-phosphate	C6H13O9P
d-lactic acid	C3H6O3
D-Ribose 5-phosphate	C5H11O8P
3-phosphoglyceric acid	C3H7O7P
AcetylCoA	C23H38N7O17P3S
Pyruvic acid	C3H4O3

3.3. Résultats et discussion

Comparaison des chromatogrammes des métabolites sur une colonne C18 avec et sans paire d'ions

La comparaison des facteurs de rétention (k') de 72 métabolites obtenus par IP-LC et RPLC, permet de mettre en évidence une rétention plus importante pour 70 composés grâce à l'utilisation d'un agent d'appariement d'ions.

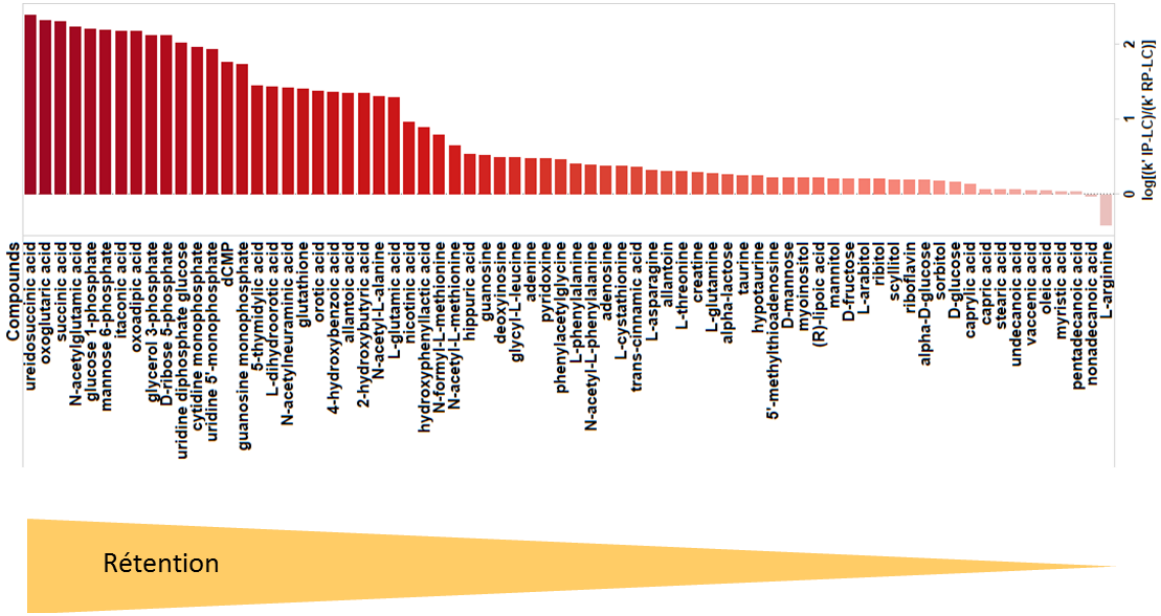


Figure 129: Comparaison des facteurs de rétention de 72 composés en phase inverse (RPLC) et phase inverse avec paire d'ions (IP-LC)

20 composés présentés selon leur chromatogramme en phase inverse simple (RPLC) et avec un agent de paire d'ions (IP-LC) sont illustrés par la figure suivante. La phase inverse avec un agent de paire d'ions augmente la rétention de ces composés (figure 130). Ces résultats démontrent l'intérêt de la paire d'ions dans le cas des métabolites polaires.

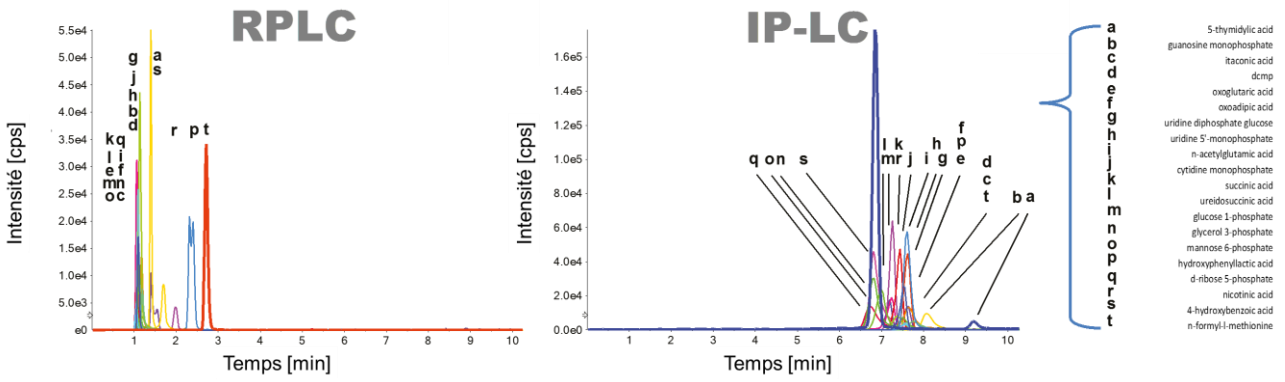


Figure 130: Chromatogramme de 20 métabolites en phase inverse (RPLC) et phase inverse avec un agent de paire d'ions (IP-LC)

Il est cependant important de noter que les gradients chromatographiques et les colonnes chromatographiques sont différentes. C'est pourquoi, à la suite de ces résultats, est présentée une analyse comprenant les mêmes colonnes (avec un diamètre interne différent et donc un débit différent) mais avec des conditions de gradient similaires.

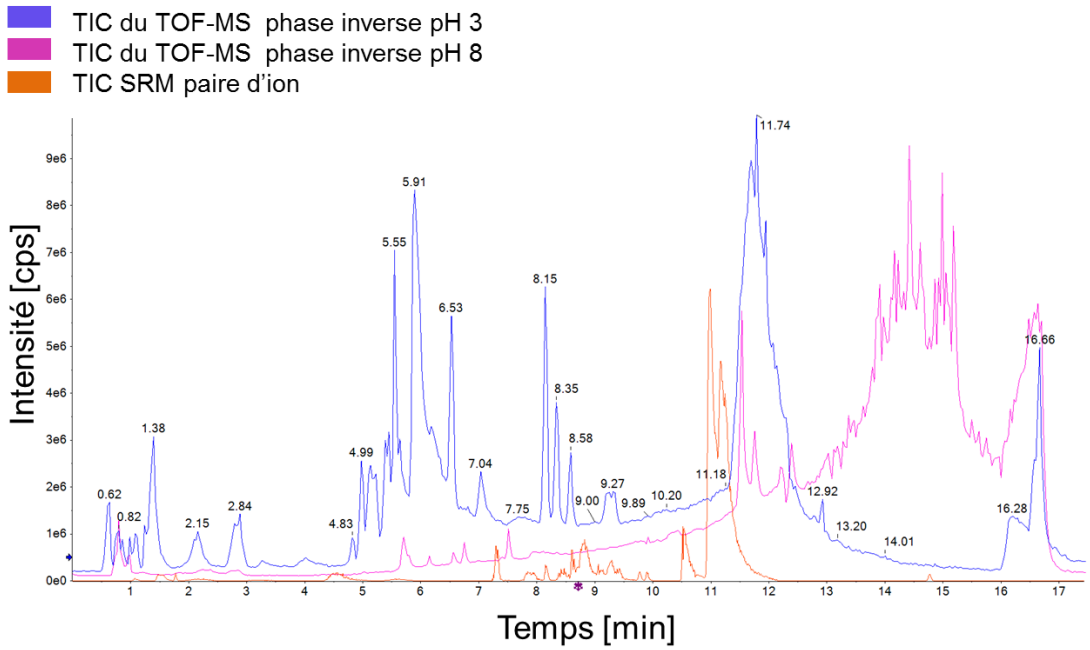


Figure 131: TIC obtenus selon les trois conditions chromatographiques à savoir, paire d'ions, phase inverse avec un pH de 3 et un pH de 8

Les métabolites analysés étant principalement polaires, une rapide recherche a été effectuée sur les possibilités existantes dans le but de de permettre une meilleure rétention. La paire d'ions peut contaminer un instrument, et une colonne doit être dédiée à cette application, car elle se trouve ensuite modifiée de façon permanente. Les analyses ont été effectuées sur des instruments différents et avec des modes qui leur sont propres, ceci explique les différences d'intensité obtenues pour le courant total illustré sur la figure ci-dessus.

Les valeurs des temps de rétention se trouvent en annexe (tableau 23). La paire d'ions améliore de façon importante la rétention des composés particulièrement acides. La figure suivante permet de mettre en évidence l'amélioration en termes de rétention que procure l'utilisation de la paire d'ions. En effet, sur un nombre de 27 composés pour lesquels un facteur de rétention a pu être calculé, ce facteur est plus grand pour 15 d'entre eux avec l'utilisation de la paire d'ions. Sur le total des analytes, soit 50, la paire d'ions montre une augmentation des facteurs de rétention pour 34 d'entre eux, soit 68% des composés.

L'acide pyruvique et le NADPH ne sont détectés dans aucune analyse. Ceci est probablement dû à une dégradation rapide des composés. L'acide pyruvique est particulièrement réactif à l'air, et se conserve uniquement sous atmosphère protectrice.

En ce qui concerne les analyses en mode inverse à pH 3 et 8, il y a une très faible rétention des composés à pH 8. En effet, aucun composé n'élue pendant la phase gradient. Les composés se trouvent soit dans le temps mort ou très proche de celui-ci, soit dans la phase plateau avec 100% de phase organique. Les métabolites étant principalement acides, ceux-ci se trouvent sous forme déprotonnée et auront moins d'affinités pour la phase stationnaire. Ces derniers n'ont pas été pris en compte pour l'analyse des facteurs de rétention.

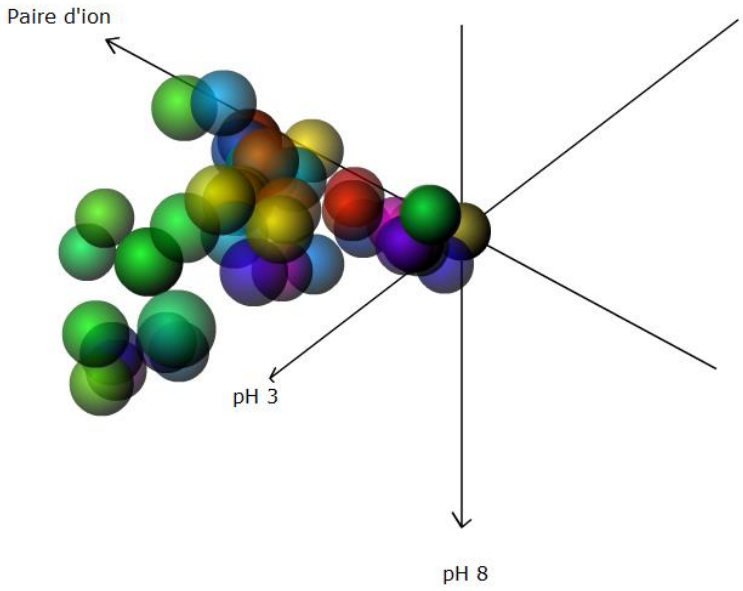


Figure 132: Comparaison des facteurs de rétention liés à la chromatographique en phase inverse à pH 3 et pH 8 ainsi que à l'analyse en phase inverse avec paire d'ions

Le pH 8 augmente la rétention de deux composés uniquement, à savoir l'arginine et le FAD. La différence constatée entre le facteur de rétention à pH 3, et celui obtenu avec la paire d'ions bien qu'étant plus grand pour 13 composés, est minime. Ces différences sont illustrées sur le tableau suivant (tableau 17). Les facteurs de rétention les plus grands sont en gris pour chaque composé. La paire d'ions comporte cependant un désavantage qui s'avère être un tailing important pour certains des analytes, en particulier les nucléotides.

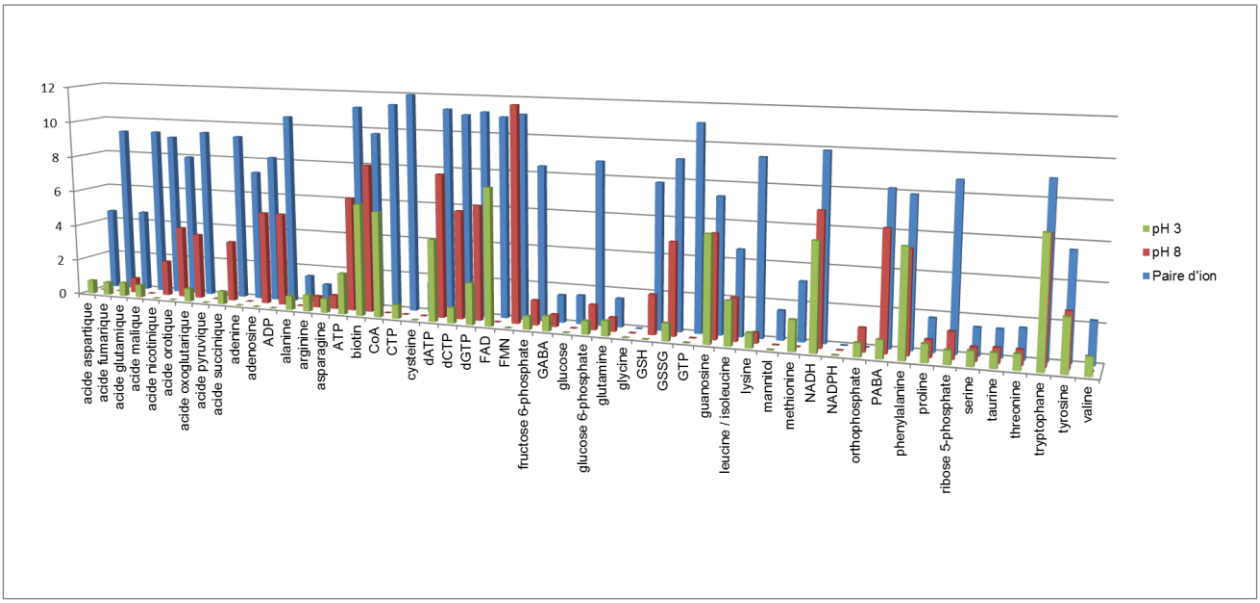


Figure 133: Comparaison des facteurs de rétention liés à la chromatographique en phase inverse à pH 3 et pH 8 ainsi qu'à l'analyse en phase inverse avec paire d'ions, représentation complémentaire du même set de données que dans la figure précédente.

Tableau 17: Valeurs des facteurs de rétention pour les 3 systèmes testés. Les cases grisées représentent le facteur de rétention le plus grand et n signifie que la valeur est manquante (pas d'ionisation)

	Facteur de rétention k'		
	Paire d'ion	Phase inverse pH 3	Phase inverse pH 8
acide aspartique	0.76	n	0.05
acide fumarique	0.88	n	0.01
acide glutamique	0.76	0.31	0.07
acide malique	0.88	n	0.00
acide nicotinique	0.88	0.71	n
acide orotique	0.86	0.86	n
acide oxoglutarique	0.89	0.84	0.03
acide pyruvique	n	n	n
acide succinique	0.88	0.83	0.03
adenine	0.85	n	n
adenosine	0.87	0.89	n
ADP	0.90	0.89	n
alanine	0.28	n	0.09
arginine	0.00	0.10	0.23
asparagine	0.29	0.25	0.10
ATP	0.90	0.91	0.69
biotin	0.89	0.93	0.88
CoA	0.91	n	0.88
CTP	0.91	n	0.07
cysteine	0.35	n	n
dATP	0.90	0.93	0.84
dCTP 1	0.90	0.90	0.17
dGTP	0.90	0.91	0.69
FAD	0.90	n	0.90
FMN	0.90	0.95	n
fructose 6-phosphate	0.87	0.58	0.03
GABA	0.28	0.15	0.12
glucose	0.31	n	n
glucose 6-phosphate	0.88	0.58	0.03
glutamine	0.30	0.25	0.13
glycine	n	n	n
GSH	0.86	0.73	n
GSSG	0.88	0.89	0.25
GTP	0.90	n	n
guanosine	0.85	0.90	0.88
leucine / isoleucine	0.77	0.75	0.70
lysine	0.89	0.00	0.11
mannitol	0.31	n	n
methionine	0.66	n	0.57
NADH	0.89	0.92	0.88
NADPH	n	n	n
orthophosphate	n	0.54	0.03
PABA	0.87	0.91	0.28
phenylalanine	0.86	0.89	0.88
proline	0.39	0.38	0.26
ribose 5-phosphate	0.88	0.60	0.03
serine	0.27	0.22	0.10
taurine	0.26	0.28	0.10
threonine	0.33	0.28	0.13
tryptophane	0.88	0.91	0.89
tyrosine	0.81	0.80	0.75
valine	0.52	n	0.28

Etude de la chromatographie liquide d'interaction hydrophile sur un nombre restreint de métabolites

Bien que l'utilisation de la paire d'ions offre un avantage certain en termes de rétention, l'utilisation de la HILIC semble prometteuse pour la séparation des molécules polaires. C'est pourquoi l'utilisation de ce type de séparation chromatographique est étudiée.

La figure suivante illustre le chromatogramme obtenu avec les meilleures conditions LC déterminées, ceci en suivant le processus de décision élaboré par le fournisseur de la colonne (en annexe, figure 153). Une augmentation supplémentaire d'ammonium acétate est suggérée pour améliorer les conditions de forme de pics (processus similaire à la paire d'ions). Cependant, pour des raisons techniques, cette augmentation ne peut pas être effectuée (concentration de sel trop grande).

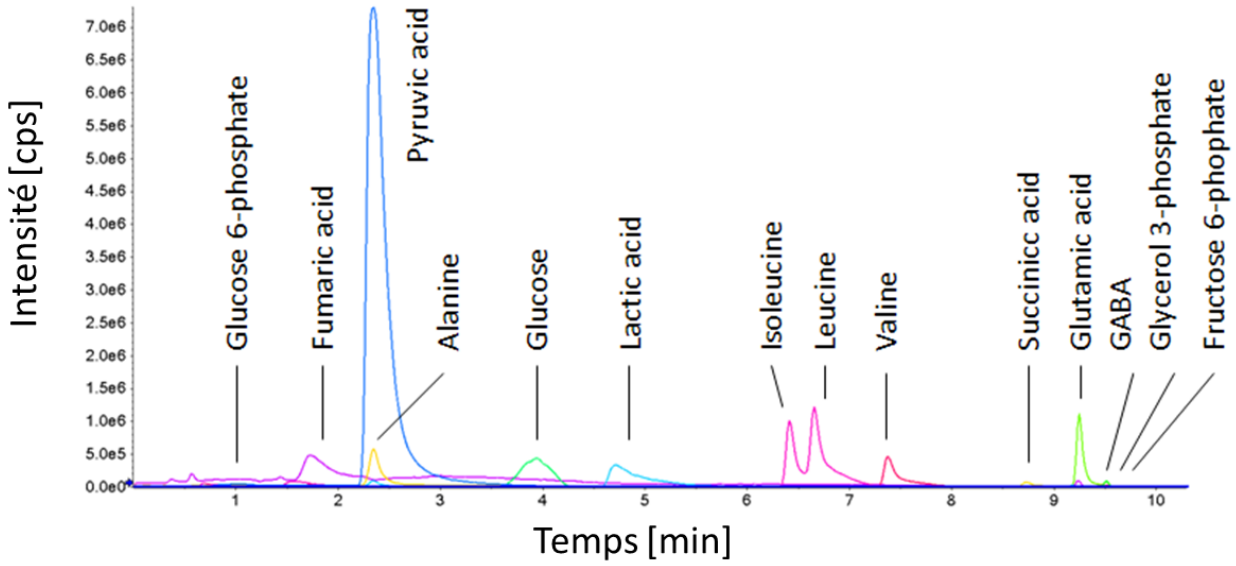


Figure 134: Chromatogramme de 0-10min des traces extraites (XIC)

Le tableau suivant résume les paramètres chromatographiques extraits pour ces 20 composés analysés par HILIC.

Les d-ribose 5 phosphate et l'acétylCoA ont une intensité de signa faible. Le glycérol 3-phosphate, fructose 6-phosphate et le d-ribose 5-phosphate co-éluent, tout comme l'acide glutamique et le GABA. Les acides malique, citrique et 3-phophoglycerique possèdent une forme de pic trop mauvaise (plus de 2 minutes de largeur de pic à la base). La largeur de pic à la base est de plus de 30 secondes pour la majorité des métabolites avec un étirement (tailing).

Tableau 18: Résultats obtenus pour 19 métabolites séparés par HILIC

Métabolites	Aire sous la courbe	Intensité [cps]	Temps de rétention [min]	Largeur du pic [min]
Glycerol 3-phosphate	7.48E+04	1.13E+04	9.68	1.03
Glucose 6-phosphate	6.12E+04	2.68E+04	0.98	0.16
Fumaric acid	7.24E+06	4.18E+05	1.76	1.23
L-Leucine	9.49E+06	1.28E+06	6.6	0.79
L-Valine	4.46E+06	4.71E+05	7.32	1
L-Glutamic acid	3.63E+05	7.18E+04	9.45	0.39
L-Alanine	4.42E+06	6.59E+05	2.35	0.58
Succinic acid	4.85E+06	1.79E+06	9.24	0.19
Gamma-Aminobutyric acid	3.79E+05	2.12E+05	9.48	0.3
L-Isoleucine	6.56E+06	1.09E+06	6.37	0.23
D-Glucose	1.03E+07	4.97E+05	3.91	1.51
Fructose 6-phosphate	1.47E+05	2.00E+04	9.69	1.54
D-Lactic acid	7.57E+06	3.40E+05	4.74	1.63
D-Ribose 5-phosphate	3.82E+04	5.91E+03	9.66	0.52
AcetylCoA	2.95E+03	1.78E+03	9.32	0.16
pyruvic acid	2.04E+08	2.41E+07	2.38	0.72
Malic acid	Mauvaise forme de pic			
Citric acid				
3-phophoglyceric acid				

Les résultats présentés dans cette thèse sont ceux pour lesquels la meilleure chromatographie a été obtenue pour une majorité de composés. La chromatographie liquide d'interaction hydrophile n'a pas donné les résultats attendus, et le but n'était pas de développer plus spécifiquement cette méthode. Les analyses n'ont pas été poursuivies avec cette approche chromatographique. Cette méthode a cependant donné de très bons résultats, pour des composés pharmaceutiques par exemple [7]. Une revue récente (2016) résume les différentes applications de la HILIC-MS en métabolomique [2]. Cette technique est utilisée dans la plupart des cas sur un nombre réduit de composés et convient très bien pour les acides aminés ou les métabolites contenant un groupe amine [2]. Les acides organiques sont traités de façon individuelle ou groupés comme pour l'acide orotique [8] ou l'acide mévalonique [9]. Les mécanismes de rétention de la HILIC font encore l'objet de publications récentes [10], et les types de phases stationnaires étant multiples [11], il a été choisi de rester sur une approche plus conventionnelle, et de se concentrer sur le développement lié à la quantification de ces métabolites polaires. La HILIC est prometteuse [12] et souvent citée comme méthode orthogonale, mais nécessite encore des investigations. La reproductibilité de la HILIC est souvent un paramètre critique en HILIC, ainsi l'étude d'Ivanisevic en 2013 [13] fait mention d'un décalage d'une minute dans le temps de rétention pour une analyse métabolomique de plus de 60 heures. L'étude métabolomique menée dans le chapitre précédent (chapitre 2 partie 3) montre une

variation de moins de 1.8 s sur plus de 48 h d'analyse. Une étude sur les métabolites du carbone central, souvent ciblés en métabolomique a été réalisée en 2006 par Bajad et al [14].

3.4. Conclusions et perspectives partie 1 chapitre 3

L'utilisation de la paire d'ions pour augmenter la rétention des métabolites polaires est une technique robuste et facilement applicable à un grand nombre de métabolites d'intérêt. Le but final de l'augmentation de la rétention et de la séparation, en optimisant les conditions, est de permettre ultérieurement une quantification absolue de ces composés. Sur 129 métabolites, le facteur de rétention est augmenté pour 128 d'entre eux. Le facteur de rétention de 50 composés polaires, provenant de cascades métabolomique importantes (cycle de Kreb, voie des pentoses, phosphates), analysés en RPLC à pH 3 et pH 8 ainsi qu'en PL-LC a été effectué. Sur un nombre de 27 composés pour lesquels un facteur de rétention a pu être calculé, ce facteur est plus grand pour 15 d'entre eux avec l'utilisation de la paire d'ions. Sur le total des analytes (soit 50), la paire d'ions montre une augmentation des facteurs de rétention pour 34 d'entre eux, soit 68% des composés.

L'analyse par HILIC de 19 métabolites polaires comprenant notamment des acides aminés et des métabolites impliqués dans le cycle de l'acide citrique, montre une largeur de pic pour plus de la moitié (10 métabolites) de plus de 30 secondes.

La chromatographie liquide par appariement d'ion peut cependant souffrir d'une suppression de signal augmentée, due à la présence de l'agent de paire d'ions, dans la phase mobile. L'agent de paire d'ions peut contaminer l'instrument utilisé, et provoquer une perte de signal et une augmentation du bruit de fond. C'est pourquoi il faut dédier un instrument uniquement à ce type d'analyses.

La HILIC offre l'avantage de pouvoir être couplée à de nombreux instruments MS et de permettre une bonne ionisation grâce à une grande proportion de phase organique dans la phase mobile. Elle souffre cependant du manque de stabilité des temps de rétention lors de séquences d'analyse de plusieurs jours, demande un long temps de rééquilibration, et ne présente pas une forme de pic adéquate observée dans cette étude. La technique HILIC demande la mise en place de nombreuses études préalables et de développements de méthodes, c'est pourquoi elle n'est pas retenue dans cette thèse.

3.5. Références de la partie 1 du chapitre 3

1. Coulier, L., et al., *Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.* Analytical chemistry, 2006. **78**(18): p. 6573-82.
2. Tang, D.-Q., et al., *HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS.* Mass Spectrom. Rev., 2016. **35**(5): p. 574-600.
3. Cubbon, S., et al., *Metabolomic applications of HILIC-LC-MS.* Mass Spectrom. Rev., 2010. **29**(5): p. 671-684.
4. Pesek, J.J., et al., *Analysis of hydrophilic metabolites in physiological fluids by HPLC-MS using a silica hydride-based stationary phase.* J. Sep. Sci., 2009. **32**(13): p. 2200-2208.
5. Gao, J., et al., *Robust analysis of underivatized free amino acids in soil by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr. A, 2016. **1449**: p. 78-88.
6. Bruderer, T., *Accurate mass spectral libraries and predicted liquid chromatography retention times in bioanalysis and data independent metabolomics*. 2016.
7. Periat, A.C., *Utilisation de la chromatographie d'interaction hydrophile pour l'analyse de composés d'intérêt pharmaceutique*. 2015.
8. D'Apolito, O., et al., *Orotic acid quantification in dried blood spots and biological fluids by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry.* J. Sep. Sci., 2010. **33**(6-7): p. 966-973.
9. Nelson, D., N. Xu, and J. Carlson, *Semi-automated quantification of methylmalonic acid in human serum by LC-MS/MS.* Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2012. **72**(6): p. 441-446.
10. Jandera, P. and P. Janas, *Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review.* Anal. Chim. Acta, 2017. **967**: p. 12-32.
11. Jandera, P., *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review.* Analytica Chimica Acta, 2011. **692**(1-2): p. 1-25.
12. Laemmerhofer, M., *HILIC and mixed-mode chromatography: the rising stars in separation science.* J. Sep. Sci., 2010. **33**(6-7): p. 679-680.
13. Ivanisevic, J., et al., *Toward 'Omic Scale Metabolite Profiling: A Dual Separation-Mass Spectrometry Approach for Coverage of Lipid and Central Carbon Metabolism.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2013. **85**(14): p. 6876-6884.
14. Bajad, S.U., et al., *Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr. A, 2006. **1125**(1): p. 76-88.

4. Partie 2 - Quantification absolue et relative par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des hépatocytes et érythrocytes sains et parasités par *P. falciparum*

4.1. Introduction

Généralités

La malaria est induite par un parasite appelé *P. falciparum*. L'infection par ce parasite provoque de sévères symptômes pouvant mener jusqu'à la mort. L'étude de la malaria est l'une des priorités de l'OMS. En effet, on déplore plus d'un demi-million de décès à travers le monde impliquant ce parasite [1].

La recherche en Suisse

L'initiative suisse impliquée dans l'étude des systèmes biologiques nommée SystemX (The Swiss Initiative in Systems Biology) regroupe, entre autres, un pôle de recherche sur la malaria. Ce programme est nommé MalarX et offre la possibilité à plusieurs groupes de recherche suisses de collaborer selon leur domaine de compétences, afin de développer de nouvelles connaissances sur le parasite et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques [2].

Enjeux et recherche en métabolomique

La compréhension des modifications métabolomiques des globules rouges (GR) infectés par le parasite ouvre de nouvelles voies d'exploration vers la recherche de cibles thérapeutiques potentielles. De nombreuses études ont été menées sur le parasite [3-16]. D'ailleurs le métabolisme de celui-ci a fait l'objet d'une thèse entière par Olszewski en 2011 [9]. L'importance du glutathion dans les fonctions et le métabolisme du parasite sont étudiées elles aussi [11]. Des cascades traitées de façon ciblée ont été investiguées, comme par exemple le métabolisme du carbone central, effectué de façon globale [6, 17, 18] ou plus ciblé sur certains composés [15, 19-21]. Les folates [7, 22-24], le rôle des

purines, pyrimidines et nucléosides [10, 25, 26], certains acides aminés comme l'isoleucine [27] ou encore la spermidine [15] font eux aussi l'objet de publications. Des revues plus générales sur la métabolomique sont publiées par Sana en 2013 [28], Sengupta en 2011 et 2015 [29, 30], et Vincent en 2015 [28-31]. Les analyses sont réalisées principalement sur le sang de patients infectés ou sur les cellules de foie. L'urine est récoltée elle aussi afin de déterminer des biomarqueurs.

Etudes menées dans la partie 2

Ces études sont réalisées sur du sang total ou du plasma. Elles proposent de s'intéresser directement au parasite sous sa forme libre ou intra-érythrocytaire. C'est pourquoi des globules rouges de donneurs sont analysés à la fois sous la forme saine et la forme infectée par le parasite après incubation dans un milieu de culture. Les cellules hépatiques ne sont pas épargnées par l'infection du parasite *P. falciparum* et celles-ci peuvent faire office d'hôte au parasite en dormance, pouvant se réactiver à tout moment. C'est pourquoi cette étude s'intéresse aux cellules HepG2 qui sont des cellules de lignées cancéreuses facilement parasitées et cultivables, car possédant des propriétés de défenses diminuées par rapport à des cellules saines. Cette étude n'a pas été menée jusqu'à obtenir des cellules parasitées, mais s'intéresse au nombre de cellules nécessaires pour une étude métabolomique robuste pouvant être menée dans un second temps.

4.2. Matériel et méthode

Standards

Tous les métabolites quantifiés dans cette partie de chapitre proviennent de différents fournisseurs : Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne), Axon Lab AG (Baden, Suisse), Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), and Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide glutamique-d_5, le tryptophane-d_5, l'adénosine-$^{13}C_5$, l'acide adipique-$^{13}C_6$ et l'acide cholique-d_4 ont été obtenu chez Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA). L'acide succinique-d_4 provient de Sigma-Aldrich. Le méthanol, l'acétonitrile et l'ammonium acétate proviennent de Fisher Scientific, l'acide formique de Merck, le chloroforme (HPLC) et l'acide hydrochlorique (37 %) de Sigma-Aldrich.

Préparation d'échantillon

La préparation d'échantillon est représentée à la figure suivante

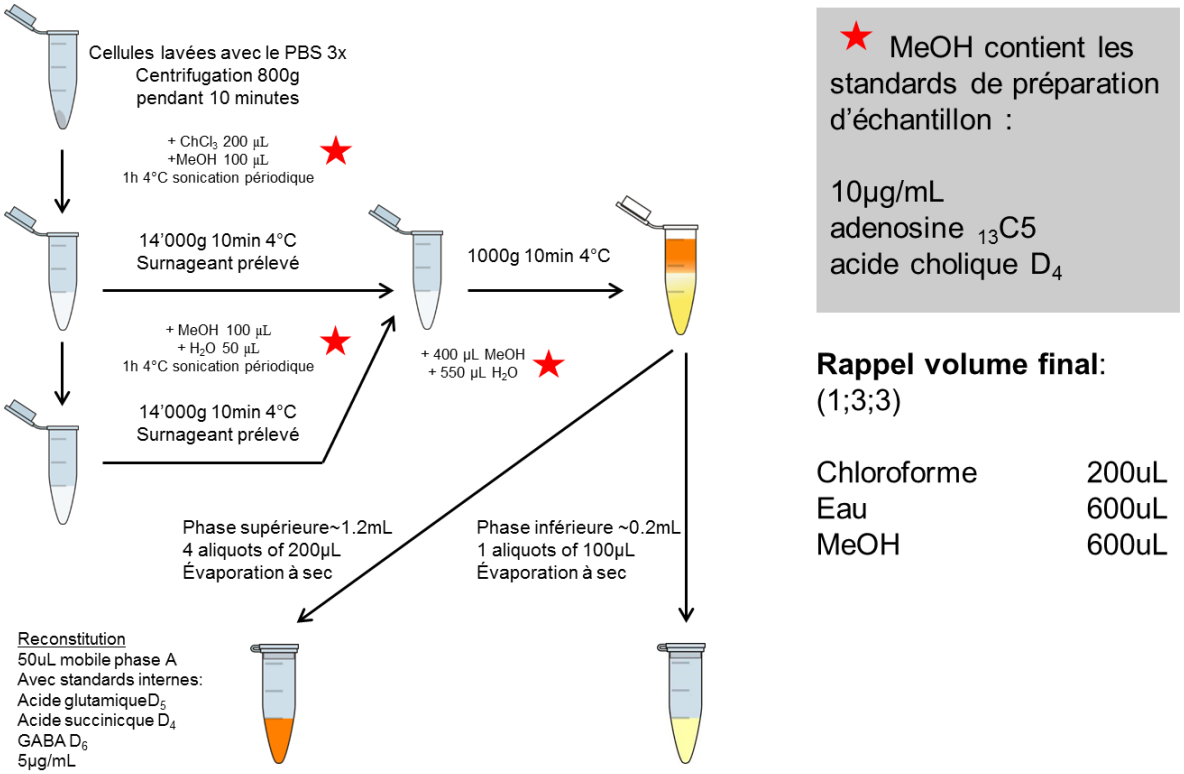


Figure 135: préparation d'échantillon

Les cellules récoltées après incubation avec le parasite (ou des globules rouges sains) sont lavées trois fois avec du tampon PBS afin d'enlever tout reste de milieu de culture. Les cellules sont ensuite extraites une première fois à l'aide d'un mélange de solvants (MeOH ; $CHCl_3$, 200 µL ; 100 µL), sous agitation constante pendant une heure à 4°C. Après 30 minutes d'agitation, une brève étape de sonication est intégrée (3 min). L'échantillon est centrifugé, le surnageant récolté, et une seconde étape d'extraction est effectuée comme précédemment avec un mélange MeOH, H_2O (100 µL ; 50 µL). L'échantillon est centrifugé à 14'000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant prélevé est additionné à celui récolté précédemment. 400 µL de MeOH et 550 µL d'H_2O sont ajoutés au tube et celui-ci est centrifugé pendant 10 min à 1000 g et 4°C afin de réaliser la séparation des phases (polaire et apolaire). La phase supérieure apolaire et la phase inférieure polaire sont prélevées et transférées dans des tubes pour subir une évaporation à sec. La figure 136 résume ensuite les étapes de reconstitution en vue de l'analyse par LC-MS

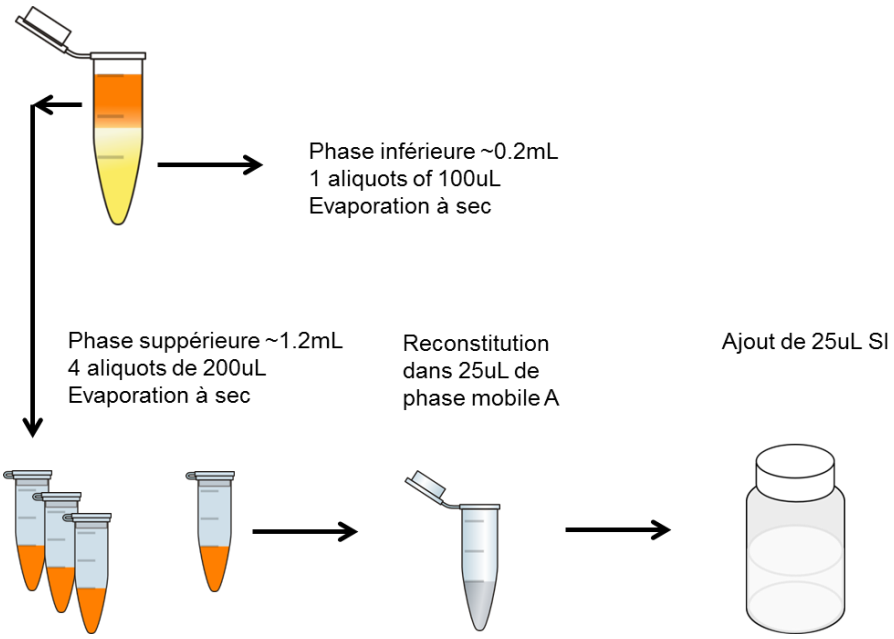


Figure 136 : Séparation des phases et reconstitution en vue de l'analyse LC-MS

Chromatographie liquide

L'instrument utilisé est un UltiMate 3000 RSLC de Dionex. La séparation est réalisée sur une colonne Inertsil ODS-3 2.1x150 mm (5 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile A est : H_2O + 10 mM Hexylamine avec un pH ajusté à 6.3 avec de l'acide acétique. La phase mobile B contient : 90% MeOH + 10% H_2O + 10 mM d'ammonium acétate à un pH de 8.5 ajusté avec de l'ammoniac. Le gradient appliqué est le suivant : 0% B pendant 3 min. 0-100 %B en 10 min et plateau pendant 3 min., suivi de la rééquilibration du système pendant 10 min. Le débit est de 400 µL/min et le volume injecté est de 10 µL.

Spectrométrie de masse

Les analyses ont été effectuées en mode négatif sur un triple quadrupôle de type 4000 QTRAP® AB Sciex, (Concord, Canada). Le temps d'accumulation pour chaque transition est de 50 ms. L'énergie de collision appliquée est variable selon chaque composé, tout comme le DP ainsi que le CXP. Le temps de cycle de la période est de 700 ms. Les analyses sont effectuées en schedulded SRM. Ce mode tient compte des temps de rétention qui ont été déterminés préalablement. Ceci permet d'avoir un plus grand nombre de transitions et de répartir les fenêtres selon les différents composés à analyser. Ces paramètres ont été optimisés et sont disponibles en annexe (tableau 25). La tension appliquée est de -4500 V, avec une température de source de 450°C. Le curtain gas est de 10 psi, GS1 et GS2 de 50 psi. La liste complète des transitions se trouve en annexe

(tableau 25). Certains métabolites sont analysés en mode SIM/SIM. Ceci concerne des métabolites pour lesquels les fragments sont de moins de 50 Da, ou pour lesquels aucune transition Q1/Q3 n'a été jugée favorable (limite de détection trop élevée, problèmes d'interférences par d'autres molécules).

4.3. Résultats et discussion

La figure 137 représente la quantification absolue de 19 métabolites dans des globules rouges sains et infectés. Les valeurs ont été corrigées par les standards internes ajoutés lors de la préparation d'échantillon et les standards internes chromatographiques, puis ramenées au même nombre de cellules. En effet, le nombre de cellules est de 10^9 pour les globules rouges sains, et de 10^7 pour les globules rouges infectés avec une parasitémie de 94%. La quantification est réalisée par trois courbes de calibration externe sur plus de deux ordres de grandeur, et une exactitude comprise entre ± 25%. Cette valeur est déterminée par trois courbes de calibration utilisées en tant que contrôle qualité.

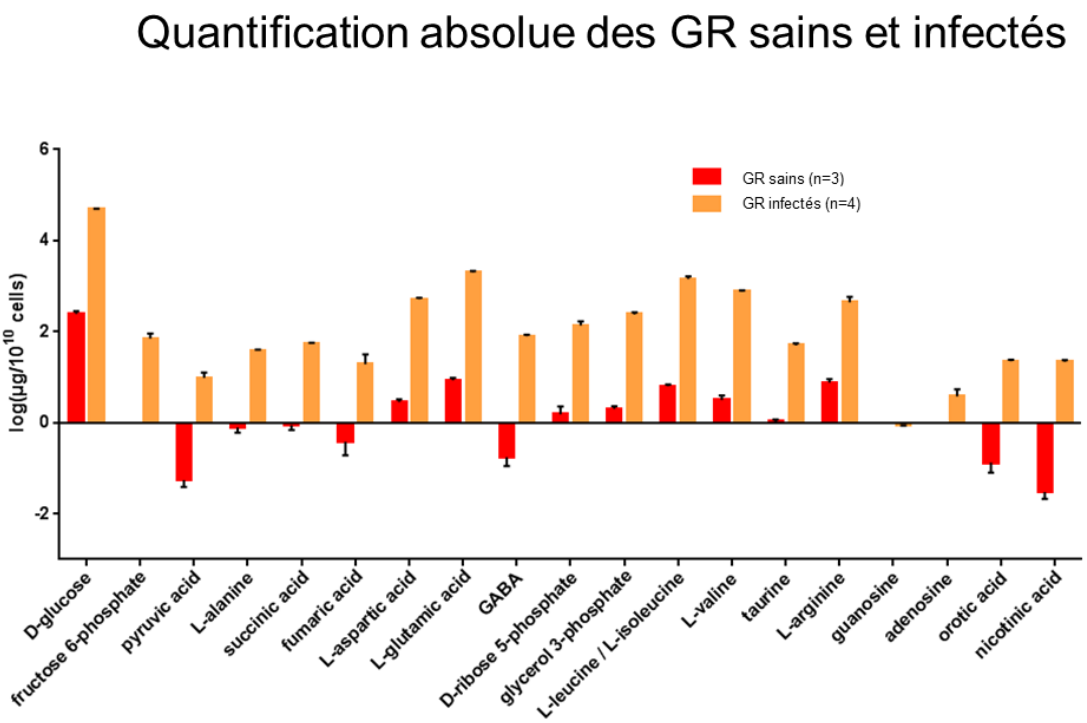


Figure 137: Quantification absolue de 19 métabolites dans des globules rouges sains et infectés corrigés par le nombre de cellules et les standards internes de référence à chaque métabolite

Les quantités obtenues ainsi que l'écart-type sont résumés dans le tableau suivant. Les globules rouges ne possèdent pas de mitochondries, c'est pourquoi il n'est pas étonnant de constater des quantités très faibles de GABA. Il en est de même pour l'acide orotique qui est un intermédiaire dans la voie de synthèse des purines et pyrimidines propre au

parasite. La leucine et l'isoleucine ne peuvent être quantifiées séparément car ces molécules co-éluent et n'ont pas de fragments spécifiques à l'une ou l'autre espèce. La quantité de tous ces métabolites est augmentée dans les globules rouges infectés. En effet, le matériel biologique présent dans le parasite est supérieur en comparaison avec des globules rouges sains. Les globules rouges infectés contiennent d'ailleurs des parasites sous forme de mérozoïtes. Ceux-ci se sont répliqués jusqu'aux limites physiques du nombre de parasites pouvant être contenus dans le globule rouge. Une étude de Olszewski sur les variations des expressions métaboliques rencontrées lors de l'infection par le parasite a été publiée en 2009 [12]. Le parasite ne possède pas, ou n'utilise pas, le cycle de l'acide citrique pour obtenir de l'énergie. Ceci en fait un faible consommateur d'oxygène, mais un grand utilisateur de glucose [9, 19]. La taille du globule rouge augmente par la pression de l'augmentation des parasites à l'intérieur de la cellule. Le parasite est incapable d'effectuer la biosynthèse des acides aminés. Il va tout d'abord utiliser l'hémoglobine de l'hôte, puis les acides aminés à partir de l'espace extracellulaire [12]. La taille du globule rouge augmentée (ce qui augmente le matériel biologique) ceci couplé au fait que le parasite va amener des acides aminés pour son développement, est cohérent avec les résultats obtenus.

Tableau 19: Valeurs de masse obtenue pour les globules rouges sains et infectés par *P. falciparum*

	Globules rouges		Globules rouges infectés par *P.falciparum*	
	Moyenne [µg/10^{10} cellules]	Ecart-type	Moyenne [µg/10^{10} cellules]	Ecart-type
glycerol 3-phosphate	2.04	0.28	239.96	23.92
fumaric acid	0.45	0.31	21.39	10.09
l-leucine / l-isoleucine	6.31	0.57	1436.55	201.29
l-valine	3.21	0.72	752.10	62.78
l-glutamic acid	8.58	1.05	2012.25	148.17
l-aspartic acid	2.87	0.37	515.48	42.11
l-alanine	0.81	0.23	38.30	2.50
succinic acid	0.91	0.21	55.03	2.28
GABA	0.19	0.09	79.71	6.80
d-glucose	246.93	34.98	49395.00	1110.00
fructose 6-phosphate	0.00	0.00	72.37	17.61
d-ribose 5-phosphate	1.61	0.56	138.54	27.63
pyruvic acid	0.06	0.02	9.97	2.65
nicotinic acid	0.03	0.01	21.70	1.75
taurine	1.06	0.11	50.53	5.64
l-arginine	7.68	1.48	448.64	122.26
guanosine	non detecté		0.93	0.06
adenosine	non detecté		3.98	1.24
orotic acid	0.15	0.06	22.40	1.71
adenosine C13	31.40	1.57	3249.68	113.17

La quantification absolue des cellules hépatiques de lignées HepG2 est un test qui permet de déterminer la quantité minimale de cellules nécessaire à une étude métabolomique ultérieure sur des cellules hépatiques parasitées. En effet, le nombre de cellules qui seront alors disponibles pour une analyse métabolomique étant très limité, il est important d'obtenir plus d'informations quant à la faisabilité de la méthode et des limites de détection avant de réaliser des expériences in vivo. Les quantités ne sont donc pas ramenées au même nombre de cellules, mais directement comparées sous forme de log et sont présentées dans la figure 138.

En conditions idéales, un log de 1 devrait être présent entre les différentes concentrations. Ceci n'est cependant pas le cas dans cette étude. Plusieurs hypothèses sont donc abordées. Tout d'abord, il peut s'agir de problèmes liés à la préparation d'échantillons et à la difficulté de compter le nombre de cellules. Une autre possibilité concerne aussi la réalisation des courbes de calibration, qui est rendue plus difficile lorsque trois ordres de grandeurs sont présents.
La quantité de glucose mesurée est très grande, et constante entre les différents types d'échantillons (> 10000 ng). Il a été établi que les cellules hépatiques n'avaient pas subi trois cycles de lavages avec le tampon PBS, mais un seul cycle. Le glucose présent dans le milieu de culture a contaminé les analyses.

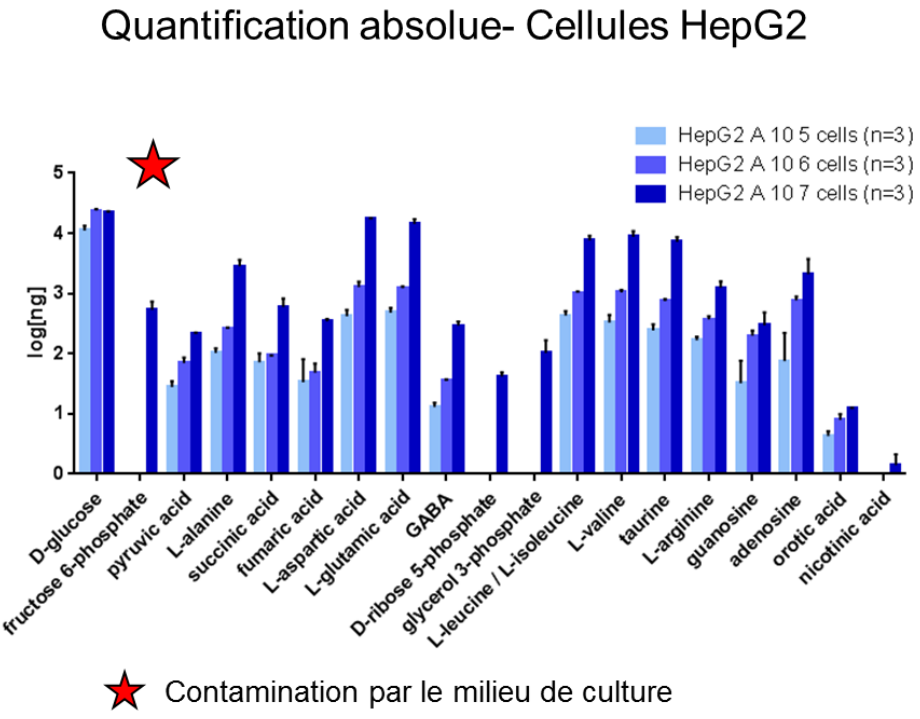


Figure 138: Quantification absolue de 19 métabolites dans différentes quantités de cellules hépatiques HepG2

Le tableau 19 présente les résultats des masses obtenues pour les cellules HepG2 à 3 niveaux de densité cellulaire. Il est possible de déterminer le nombre de cellules hépatiques nécessaires pour une quantification absolue ultérieure de cellules hépatiques parasitées par le *P. falciparum* lors d'une étude in vivo sur des souris ou des singes. Cette quantité est estimée à un minimum de 10^6 cellules (tableau 20). Cela dépend toutefois des métabolites ciblés. En effet, à 10^5 cellules, 15 métabolites sur 19 peuvent être quantifiés. Cette valeur est augmentée à 16 métabolites à 10^6 cellules, et à 10^7 cellules tous les métabolites peuvent être quantifiés. Toutefois le nombre de cellules est limité pour des raisons pratiques, car le but final est de réaliser ces études sur des animaux, et la quantité de cellules hépatiques obtenue est faible (~10^6 cellules).

Les données signalées par une couleur orange font référence à des valeurs en dessous de la limite inférieure de quantification. Celles-ci sont donc à prendre avec précaution car l'exactitude de 25% ne peut être garantie.

Tableau 20: Résultats des masses en ng obtenues pour les cellules HepG2 à 3 niveaux de densité cellulaire

	HepG2 A 10 5 cells r1-3 [ng]			HepG2 A 10 6 cells r1-3 [ng]			HepG2 A 10 7 cells r1-3 [ng]		
glycerol 3-phosphate							153.64	59.75	119.61
fumaric acid	15.48	81.95	31.54	43.87	70.65	33.01	328.15	329.87	377.56
L-leucine / L-isoleucine	406.01	516.84	388.96	980.45	1064.79	1008.69	8136.70	6176.08	8636.91
L-valine	330.35	443.65	260.27	921.33	1066.53	1107.79	9961.05	6789.39	9652.48
L-glutamic acid	517.22	557.97	391.67	1141.42	1268.59	1284.50	15614.77	11561.17	16111.87
L-aspartic acid	481.19	487.90	318.70	1024.64	1351.39	1514.11	16917.46	16714.11	17688.59
L-alanine	114.84	117.47	85.78	265.34	255.79	257.81	3162.01	2136.27	3339.48
succinic acid	55.77	99.28	69.98	92.54	90.18	88.57	741.10	401.52	695.34
GABA	14.07	14.87	11.22	35.85	35.77	31.02	325.82	242.40	309.25
D-glucose	9748.45	13859.81	9895.83	21792.32	25202.64	24959.49	22833.47	20634.71	22180.88
fructose 6-phosphate							761.50	426.16	468.44
D-ribose 5-phosphate							46.63	34.48	42.85
pyruvic acid	24.48	33.44	27.94	62.31	59.19	84.06	219.48	197.75	213.06
nicotinic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.87	1.53
taurine	264.24	299.93	192.29	689.91	778.15	774.10	8130.52	5977.70	7767.58
L-arginine	167.24	189.84	151.95	332.56	379.15	408.87	1430.54	920.77	1410.64
guanosine	32.24	77.40	14.62	161.08	231.61	197.35	206.71	231.63	522.12
adenosine	77.53	220.12	25.61	635.74	871.91	788.40	1405.64	1571.74	4035.04
orotic acid	3.94	4.22	5.09	6.14	8.28	8.86	12.41	11.38	12.58

Les résultats normalisés en nombre de cellules hépatiques et sanguines ne peuvent pas être directement comparés. En effet, la taille d'une cellule hépatique n'est pas comparable à la taille d'une cellule sanguine. De plus, le matériel intracellulaire n'est pas le même. Enfin, les cellules sanguines sont unitaires et vivent dans un milieu contrôlé alors que les cellules hépatiques vivent en réseau.

Les concentrations obtenues à nombre égal de cellules présentent une augmentation d'un facteur 2-3 dans les érythrocytes infectés, en comparaison aux globules rouges sains, pour la phénylalanine, la glutamine, la créatine, la thréonine, l'asparagine, l'alphalactone, le myoinositol et l'uridine diphosphate et le glucose (figure 139). Le glutathion n'a pas été

déterminé dans les globules rouges infectés. Il serait judicieux de connaître la concentration en glutathion oxydé (GSSG) afin de déterminer un stress oxydatif engendré par le parasite. Le n-acétyl-l-méthionine, l'acide 5-thymidilique, la cytidine monophosphate, la 5'methylthioadénosine, l'uridine 5'monophosphate, la guanosine monophosphate et la n-acétyl-l-alanine sont présents uniquement dans les globules rouges infectés et proviennent du parasite. Ceci est dû soit à une limite de détection trop haute, à une particularité appartenant au parasite et à des cascades métabolites précises soit à une absence de cette voie dans les globules rouges (par exemple par l'absence de mitochondries). L'uridine, l'acide n-acétylneuraminique, l'hypotaurine, l'acide hydroxyphénylactique et l'acide n-acétylglutarique ont été détectés dans les cellules hépatiques uniquement. Enfin, l'acide uréidosuccinique n'est détecté ni dans les cellules hépatiques, ni dans les globules rouges sains.

L'acide ureidosuccinique est un produit intermédiaire dans la biosynthèse des pyrimidines [32]. Le métabolisme des purines et pyrimidines s'avère être une cible pour un petit nombre de substances actives contre le *P falciparum* et les autres parasites humains à apicoplaste [25, 26]. En effet, la cascade métabolique des purines et pyrimidines chez *Plasmodium* est distincte de celle utilisée par ses hôtes humains.

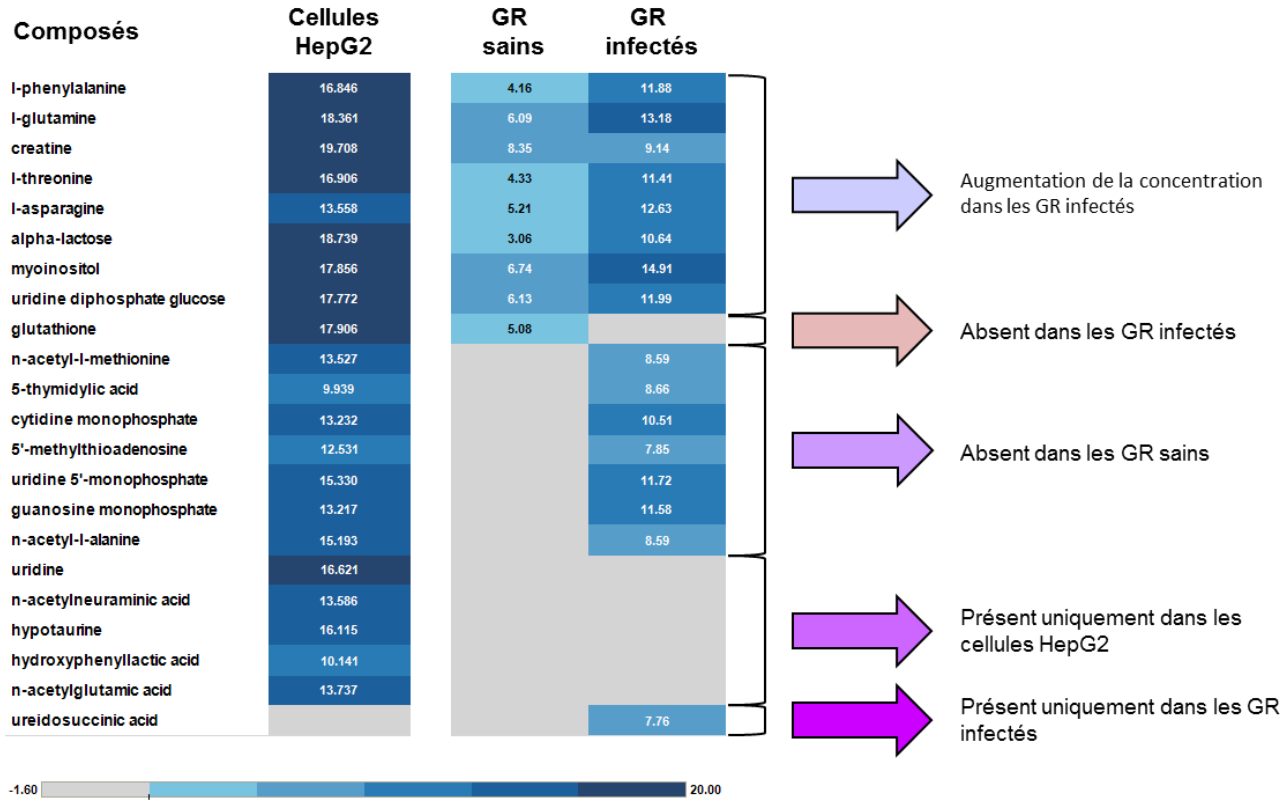


Figure 139: Heat map de la quantification relative de 22 métabolites dans les cellules hépatiques HepG2, les globules rouges sains et infectés par le parasite *P. falciparum*

Les métabolites présents dans les globules rouges infectés et sains sont représentés selon leur augmentation relative dans la figure suivante. Cette variation est augmentée jusqu'à un maximum de quatre fois pour le myoinositol.

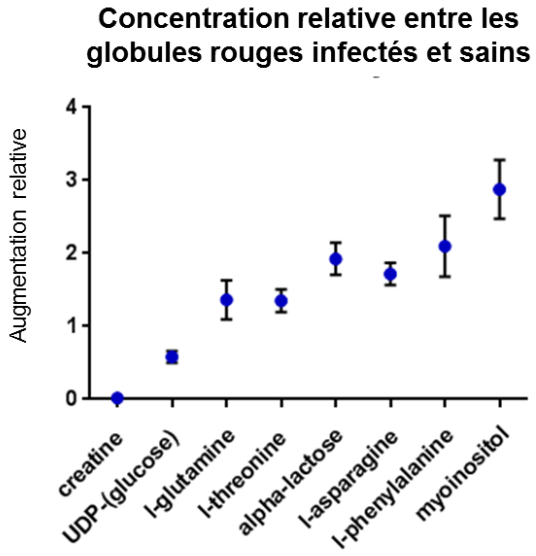


Figure 140: Représentation de l'augmentation relative des métabolites présents dans les globules rouges sains et infectés mentionnée dans la figure précédente sous la forme de heat map

Le myoinositol est un composé cyclique contenant de nombreuses fonctions alcool et jouant un rôle de messager secondaire dans les cellules en tant que myoinositol phosphate. C'est aussi un isomère du glucose. Les transitions utilisées sont cependant différentes (179 Da → 89 Da pour le glucose et 179Da→ 87Da pour le myoinositol).

4.4. Conclusion et perspectives partie 2 chapitre 3

Un nombre restreint de métabolites a été quantifié de façon absolue dans des échantillons de globules rouges sains et infectés par le parasite responsable de la malaria (*P. falciparum*). L'augmentation des quantités d'acides aminés a été mise en évidence ainsi que l'existence de métabolites inhérents à la présence du parasite, comme le GABA (absence de mitochondries dans les globules rouges). Il reste cependant une question relative à la normalisation des échantillons. Les données ont été corrigées selon le nombre de cellules (érythrocytes). Les globules rouges infectés possèdent cependant un volume plus important dû à la parasitémie intra-érythrocytaire élevée qui va jusqu'aux contraintes physiques et chimiques maximales que peut supporter un globule rouge.

La quantification absolue sur plusieurs ordres de grandeur (densité de cellules hépatiques de 3 log) a permis de déceler l'existence de variabilités de préparation d'échantillon

(numération précise de cellules). Ce paramètre, ajouté à la variabilité biologique, peut prétériter la précision des résultats obtenus lors de la quantification. Le but était cependant de déterminer le nombre de cellules hépatiques nécessaires pour une quantification absolue ultérieure de cellules hépatiques parasitées par le *P. falciparum* lors d'une étude in vivo sur des souris ou des singes. Cette quantité est estimée dans le cas présent à 10^6 cellules. Ce nombre est limité pour des raisons pratiques, car le but final est de réaliser ces études sur des animaux, et la quantité de cellules hépatiques obtenue est faible. Ce résultat est préliminaire et peut être affiné en améliorant les paramètres de préparation d'échantillon, et en utilisant un spectromètre de masse plus sensible (5500 ou 5600 QTrap ABSciex).

La quantification absolue nécessite de posséder des standards des substances quantifiées, et demande un long processus de développement de méthode (droites de calibration, répétabilité, stabilité du système chromatographique). La quantification relative paraît plus aisée à mettre en place. Toutefois, pour des résultats fiables, il est nécessaire d'utiliser une dimension supplémentaire comme le temps de rétention.

4.5. Références partie 2 chapitre 3

1. WHO, *World Malaria Report 2015*. 2015. p. 280.
2. *MalarX, la médecine systémique de la malaria*. juillet 2014 [cited 2017 5 juin]; Available from: http://www.systemsx.ch/fr/projets/research-technology-and-development-projects/malarx/.
3. Mehrotra, S., et al., *Adenine metabolism in Plasmodium falciparum.* Exp. Parasitol., 2010. **125**(2): p. 147-151.
4. Huthmacher, C., et al., *Antimalarial drug targets in Plasmodium falciparum predicted by stage-specific metabolic network analysis.* BMC Syst. Biol., 2010. **4**: p. No pp. given.
5. Chiappino-Pepe, A., et al., *Bioenergetics-based modeling of Plasmodium falciparum metabolism reveals its essential genes, nutritional requirements, and thermodynamic bottlenecks.* PLoS Comput Biol, 2017. **13**(3): p. e1005397.
6. Olszewski, K.L., et al., *Branched tricarboxylic acid metabolism in Plasmodium falciparum.* Nature (London, U. K.), 2010. **466**(7307): p. 774-778.
7. Nzila, A., et al., *Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to Plasmodium.* Trends Parasitol., 2005. **21**(7): p. 334-339.
8. Cohen, A., A. Dum, and N. Azas, *A Decade of Plasmodium falciparum Metabolic Pathways of Therapeutic Interest to Develop New Selective Antimalarial Drugs.* Mini-Rev. Med. Chem., 2013. **13**(9): p. 1340-1347.
9. Olszewski, K.L., *Dissecting the Metabolism of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum*. 2011. p. 168 pp.
10. Cassera, M.B., et al., *Erythrocytic adenosine monophosphate as an alternative purine source in Plasmodium falciparum.* J. Biol. Chem., 2008. **283**(47): p. 32889-32899.
11. Becker, K., et al., *Glutathione - functions and metabolism in the malarial parasite Plasmodium falciparum.* Biol. Chem., 2003. **384**(4): p. 551-566.
12. Olszewski, K.L., et al., *Host-parasite interactions revealed by Plasmodium falciparum metabolomics.* Cell Host Microbe, 2009. **5**(2): p. 191-199.
13. Klonis, N., D.J. Creek, and L. Tilley, *Iron and heme metabolism in Plasmodium falciparum and the mechanism of action of artemisinins.* Curr. Opin. Microbiol., 2013. **16**(6): p. 722-727.
14. Pei, Y., et al., *Plasmodium pyruvate dehydrogenase activity is only essential for the parasite's progression from liver infection to blood infection.* Mol Microbiol, 2010. **75**(4): p. 957-71.
15. Gottwald, A.M., *Spermidine metabolism in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax*. 2004. p. No pp. given.
16. Nepveu, F. and F. Turrini, *Targeting the redox metabolism of Plasmodium falciparum.* Future Med. Chem., 2013. **5**(16): p. 1993-2006.
17. Olszewski, K.L. and M. Llinas, *Central carbon metabolism of Plasmodium parasites.* Mol. Biochem. Parasitol., 2011. **175**(2): p. 95-103.
18. Olszewski, K.L. and M. Llinas, *Extraction of hydrophilic metabolites from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes for metabolomic analysis.* Methods in molecular biology (Clifton, N J), 2013. **923**: p. 259-66.
19. Bulusu, V., V. Jayaraman, and H. Balaram, *Metabolic fate of fumarate, a side product of the purine salvage pathway in the intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum.* J. Biol. Chem., 2011. **286**(11): p. 9236-9245.

20. Lian, L.-Y., et al., *Glycerol: an unexpected major metabolite of energy metabolism by the human malaria parasite.* Malar. J., 2009. **8**: p. No pp. given.
21. Preuss, J., E. Jortzik, and K. Becker, *Glucose-6-phosphate metabolism in Plasmodium falciparum.* IUBMB Life, 2012. **64**(7): p. 603-611.
22. Hyde, J.E. and I.B. Muller, *Targeting folate metabolism in the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Curr. Enzyme Inhib., 2012. **8**(2): p. 150-169.
23. Nzila, A., et al., *Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy.* Trends Parasitol., 2005. **21**(6): p. 292-298.
24. Salcedo-Sora, J.E. and S.A. Ward, *The folate metabolic network of Falciparum malaria.* Mol. Biochem. Parasitol., 2013. **188**(1): p. 51-62.
25. Cassera, M.B., et al., *Purine and pyrimidine pathways as targets in Plasmodium falciparum.* Curr. Top. Med. Chem. (Sharjah, United Arab Emirates), 2011. **11**(16): p. 2103-2115.
26. Hyde, J.E., *Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites.* Curr. Drug Targets, 2007. **8**(1): p. 31-47.
27. Istvan, E.S., et al., *Validation of isoleucine utilization targets in Plasmodium falciparum.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2011. **108**(4): p. 1627-1632, S1627/1-S1627/16.
28. Sana, T.R., et al., *Global mass spectrometry based metabolomics profiling of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60840.
29. Sengupta, A., et al., *Liver metabolic alterations and changes in host intercompartmental metabolic correlation during progression of malaria.* J. Parasitol. Res., 2011: p. 901854, 14 pp.
30. Sengupta, A., et al., *Metabolomic analysis of urine samples of vivax malaria in-patients for biomarker identification.* Metabolomics, 2015: p. Ahead of Print.
31. Vincent, I.M. and M.P. Barrett, *Metabolomic-based strategies for anti-parasite drug discovery.* J. Biomol. Screening, 2015. **20**(1): p. 44-55, 12 pp.
32. Wishart, D.S., et al., *HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013.* Nucleic Acids Res., 2013. **41**(D1): p. D801-D807.

5. Partie 3 – Etude du recouvrement d'extraction et quantification absolue par chromatographie liquide de paire d'ions et monitoring de réactions sélectionnées des métabolites polaires présents dans des érythrocytes sains et parasités par *P.falciparum*

5.1. Introduction

Cette partie est directement liée à la partie précédente (partie 2) de ce chapitre 3. Le thème du recouvrement et celui de la préparation d'échantillon sont abordés tout comme l'ajout de métabolites pour une quantification dans les globules rouges sains et infectés par le parasite *P. falciparum*.

Analyse du recouvrement des composés selon la préparation d'échantillons

La préparation d'échantillons fait intervenir une extraction liquide-liquide largement utilisée, et principalement évoquée par Bligh and Dyer [1, 2]. Une comparaison des méthodes d'extraction a déjà été étudiée par le laboratoire de Fiehn, mais les conclusions reposent uniquement sur une analyse GC pour les métabolites polaires [3]. Ce type d'extraction mène à deux phases non miscibles, et celles-ci sont prélevées selon les composés d'intérêts. Afin d'évaluer la répartition des métabolites ciblés dans la phase qui sera analysée par la suite (phase aqueuse), une étude préliminaire était nécessaire. Cette étude comporte l'analyse des métabolites à 3 niveaux de concentration ainsi que la comparaison des concentrations finales retrouvées avec des standards n'ayant pas subi la préparation d'échantillons.

Sélection des métabolites et détermination des conditions optimales d'analyse par spectrométrie de masse

Tout d'abord, les métabolites ont été triés selon leurs propriétés physicochimiques telle que leur polarité. Seuls les métabolites polaires ont été retenus. Ensuite, une recherche de la possibilité de commander des standards a été effectuée. Une fois les standards reçus, ceux-ci ont été analysés de façon préliminaire par spectrométrie de masse, à l'aide d'un triple quadrupôle en mode balayage Q1, afin de déterminer si ces molécules ionisaient de façon adéquate la masse exacte du précurseur, et de détecter la présence possible d'adduits. Puis une analyse en mode balayage des ions fragments pour déterminer des

transitions Q1 et Q3 a été réalisée, suivie par l'optimisation des paramètres DP, CE et CXP.

L'importance du standard interne chromatographique pour la correction des variations d'ionisation lors de l'électronébulisation par la source

Les méthodes traditionnelles de quantification absolue par LC-MS font intervenir un standard interne par composé. Cette approche est réalisable sur un nombre restreint de composés à quantifier, mais devient très coûteuse et compliquée lorsque le nombre de métabolites est important. En effet, il faut s'assurer que le standard interne comporte plusieurs carbones ou hydrogènes marqués, car une différence d'une unité *m/z* fausserait les résultats par l'augmentation du signal due aux isotopes du composé non marqué. Trois standards internes sont donc utilisés, au début, au milieu et à la fin de la séquence chromatographique. Les aires sous la courbe (AUC) des métabolites sont corrigées selon le standard le plus proche du point de vue du temps de rétention. Cette hypothèse repose sur l'idée que les effets provoqués par la matrice sont négligeables, ceci grâce à l'utilisation de la préparation d'échantillon. On suppose en outre qu'une suppression éventuelle du signal est la même dans l'entourage du standard. L'élution des composés intervient tout au long de la séquence chromatographie d'une durée de 16 minutes.

Quantification absolue des métabolites présents dans des globules rouges sains et infectés ayant subi ou non une préparation d'échantillon préalable par saponification

De par l'émergence des techniques « omiques » un intérêt grandissant est apparu pour l'étude des globules rouges, notamment pour les changements métabolomiques [4]. L'état métabolique des globules rouges est intéressant du point de vue de la conservation du sang pour les transfusions, mais aussi dans le cas de maladies telles que la malaria. Après développement du parasite, les cellules infectées par le parasite (*P. falciparum*) ont été récoltées et ont subi soit une lyse cellulaire à l'aide de saponine, soit aucune lyse cellulaire, le but étant de comprendre la contribution de la matrice (les cellules sanguines) sur les métabolites retrouvés lors des analyses. La saponification va agir sur la membrane cellulaire, et plus particulièrement sur les lipides qui la composent.

5.2. Matériel et méthode

Choix des métabolites d'intérêt et étude de leur rétention en phase inverse avec et sans agent de paire d'ions

Cette technique de paire d'ions est donc appliquée sur des composés présentant un intérêt tout particulier en métabolomique ainsi que dans l'étude du programme MalarX dédié à des recherches sur la malaria [5]. La sélection des métabolites s'est faite selon deux sources différentes, tout d'abord selon une publication de Roe en 2011 [6] et ensuite, selon un modèle bioinformatique développé par Anush Chiappino au sein du groupe de recherche du Prof. Vassili Hatzimanikatis à l'EPFL [7]. Ce modèle porte sur l'étude des flux métaboliques. Une comparaison a été effectuée entre les métabolites de ces deux sources et ceux présents dans la librairie développée en interne. Le résultat montre que 161 métabolites provenant de l'une ou l'autre source étaient présents dans cette librairie. Cela implique que des standards sont disponibles, que les fragments sont connus, et les temps de rétention déjà étudiés.

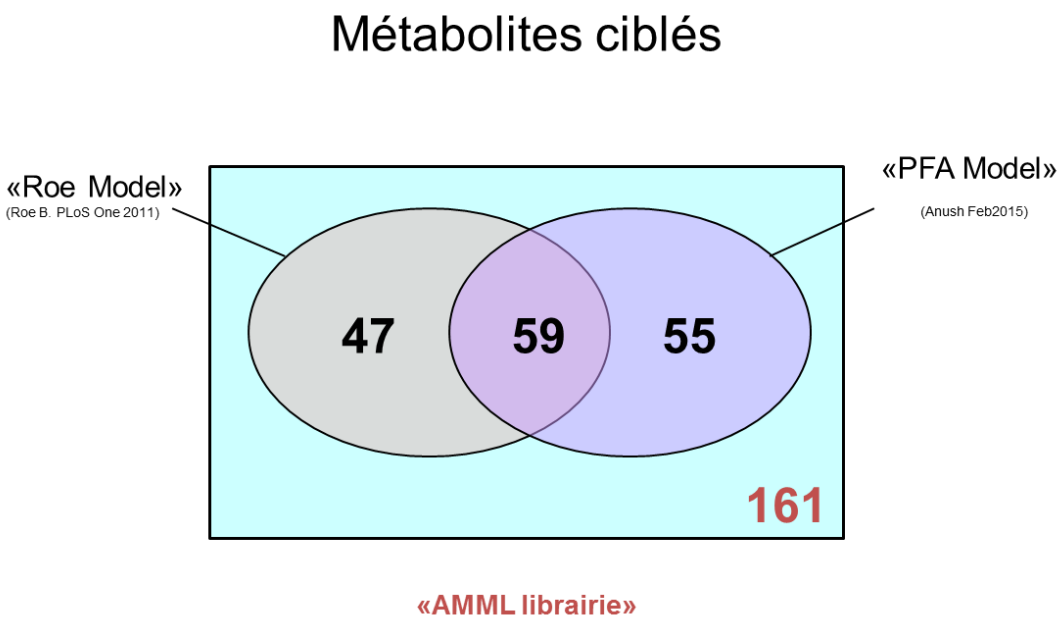


Figure 141: Provenance des 161 métabolites ciblés pour une analyse métabolomique selon deux modèles. Les deux modèles (Roe [6] et le modèle PFA d'Anush Chappino) ont été mis en commun et comparés pour déterminer que 161 métabolites candidats étaient présents dans la base de données interne AMML.

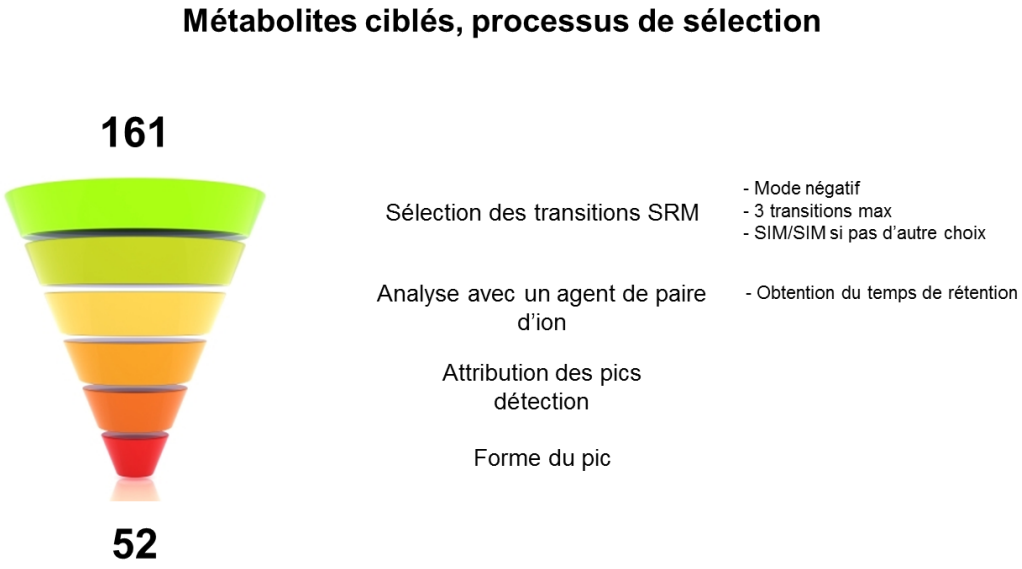


Figure 142: Processus de sélection des métabolites pour une étude par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide en phase inverse à partir des 161 métabolites candidats de départ.

Une étape de sélection a eu lieu pour finalement arriver à l'étude de 52 métabolites. Les métabolites ont été analysés en mode négatif, 3 transitions au maximum ont été retenues par composé en fonction de l'intensité des fragments. Pour un certain de nombre de composés, aucune fragmentation n'est réalisée, c'est pourquoi le mode SIM/SIM est utilisé (*m/z* similaire pour Q1 et Q3). Les paramètres d'énergie de collision, de DP ainsi que de CXP sont optimisés afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de l'analyse MS. Les composés sont ensuite séparés par chromatographie liquide afin d'obtenir leur temps de rétention.

Liste des composés

Alanine, arginine, asparagine, aspartate, cystéine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, serine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine, ADP, ATP, CTP, dATP, dCTP, dGTP, UTP, GTP, NAD+, NADH, NADP, NADPH, glutathion, glutathion disulfide, FAD, FMN, pyridoxal phosphate, pyridoxamine, cholestérol, putrescine, 2-oxoglutarate, biotine, CoA, 4-aminobenzoate, orthophosphate, spermidine, acide malique, mannitol, glucose 6-phosphate, acide fumarique, acide gamma-aminobutyrique, glycerol 3-phosphate, acide succinique, glucose, fructose 6-phosphate, ribose 5-phosphate, acide pyruvique, acide nicotinique, adénine, acide orotique, adénosine, taurine, guanosine. Parmi ces composés, certains ne sont pas adaptés à l'analyse en mode négatif. C'est pourquoi à partir de 63 composés,

uniquement 52 sont analysés. Tous les métabolites quantifiés dans cette partie de chapitre proviennent de différents fournisseurs : Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Alfa Aesar (Karlsruhe,Allemagne), Axon Lab AG (Baden, Suisse), Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), and Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide glutamique-d_5, le tryptophane-d_5, l'adénosine-$^{13}C_5$, l'acide adipique-$^{13}C_6$ et l'acide cholique-d_4 ont été obtenu chez Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA). L'acide succinique-d4 provient de Sigma-Aldrich. Le méthanol, l'acétonitrile et l'ammonium acétate proviennent de Fisher Scientific, l'acide formique de Merck, le chloroforme (HPLC) et l'acide hydrochlorique (37 %) de Sigma-Aldrich.

Préparation d'échantillon pour l'étude du recouvrement

Une solution mère comportant 54 composés à des concentrations différentes est utilisée (voir tableaux 25 et 26 en annexe). Il y a quatre concentrations de départ selon le composé, afin d'adapter le facteur de réponse, et de ne pas être dans une zone où le détecteur est saturé (concentration élevée est équivalente à C1, tableau 25 en annexe). Cette solution est analysée directement, ou répartie dans des tubes en quantités différentes (1, 0.1 et 0.01 mL). Ces tubes sont tous évaporés à sec. La moitié passe par la préparation d'échantillons, alors que l'autre moitié est reconstituée dans le solvant d'analyse contenant les standards internes chromatographiques (acide glutamique-d_5, GABA-d_6, acide succinique-d_4). Dans la préparation d'échantillon menant à deux phases séparées, et dans le choix de la quantité de solvant de reconstitution, on tient compte de cet aspect. La figure ci-dessous illustre de façon détaillée la préparation d'échantillon.

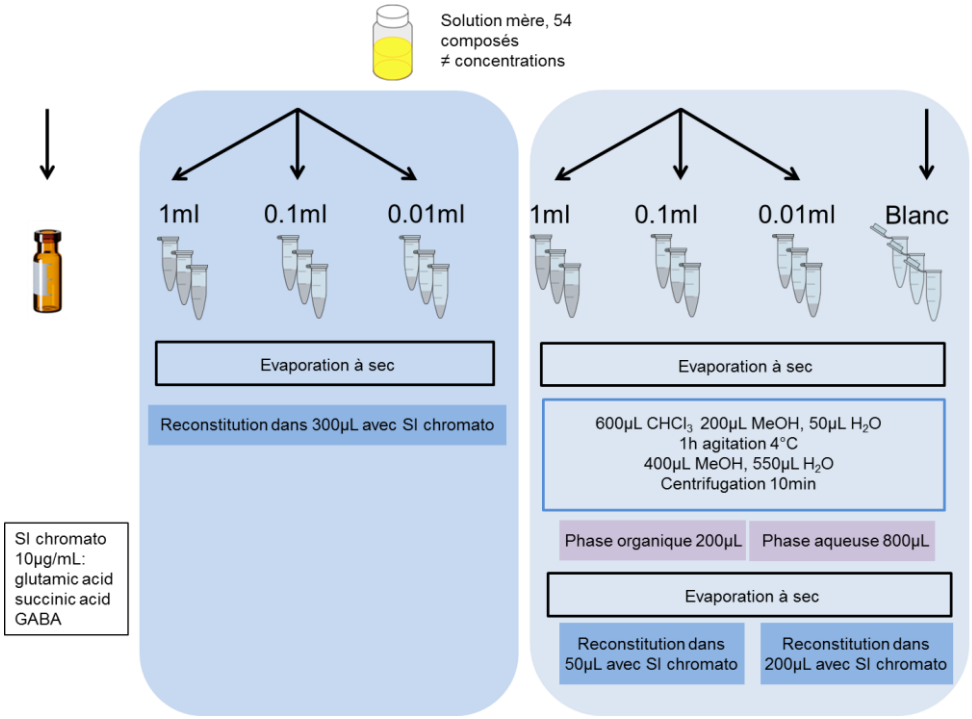


Figure 143: Préparation d'échantillon pour l'étude du recouvrement

Préparation d'échantillon des globules rouges

La figure 144 illustre la préparation d'échantillon décrite ci-dessous, celle-ci a été modifiée et adaptée à partir de la référence [2].

La phase précédant le traitement des échantillons comporte une étape de purification par Percoll des parasites. La Culture A possède une parasitémie évaluée à 95%, B à 93% et C à 95%, retour à la culture pendant 3 h jusqu'à la phase schizontes (38-42 h post invasion) Le nombre de cellules par échantillons est de 10^6 cellules.

Les cellules sanguines récoltées après culture sont lavées 3 fois avec du tampon PBS afin d'enlever toute trace de milieu de culture, et sont ensuite centrifugées. Le pellet de cellules est stocké à -80°C en vue de la préparation et de l'analyse ultérieure. La première phase consiste à l'extraction par du chloroforme et du méthanol. Les cellules sont agitées avec ce mélange pendant 1 h. A 30 min d'agitation, les tubes subissent une étape de sonication dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes. Le tube est centrifugé, puis le surnageant est prélevé et mis de côté. Cette étape est critique, du fait que les cellules se trouvent à la surface du liquide, et ne forment pas forcément un agglomérat. Il est donc important de ne pas prélever les cellules. La seconde étape est une extraction par un mélange eau et méthanol. A nouveau une étape de sonication est effectuée. Le mélange est centrifugé. Les surnageants sont réunis, et un mélange méthanol-eau est ajouté afin d'obtenir deux

phases non miscibles après une étape de centrifugation. Les phases sont ensuite prélevées de façon consécutive, d'abord la phase aqueuse supérieure, puis la phase inférieure organique, ceci en traversant le disque qui se trouve à l'interface des deux phases. Les deux phases sont enfin évaporées à sec. Seule la phase aqueuse a été employée.

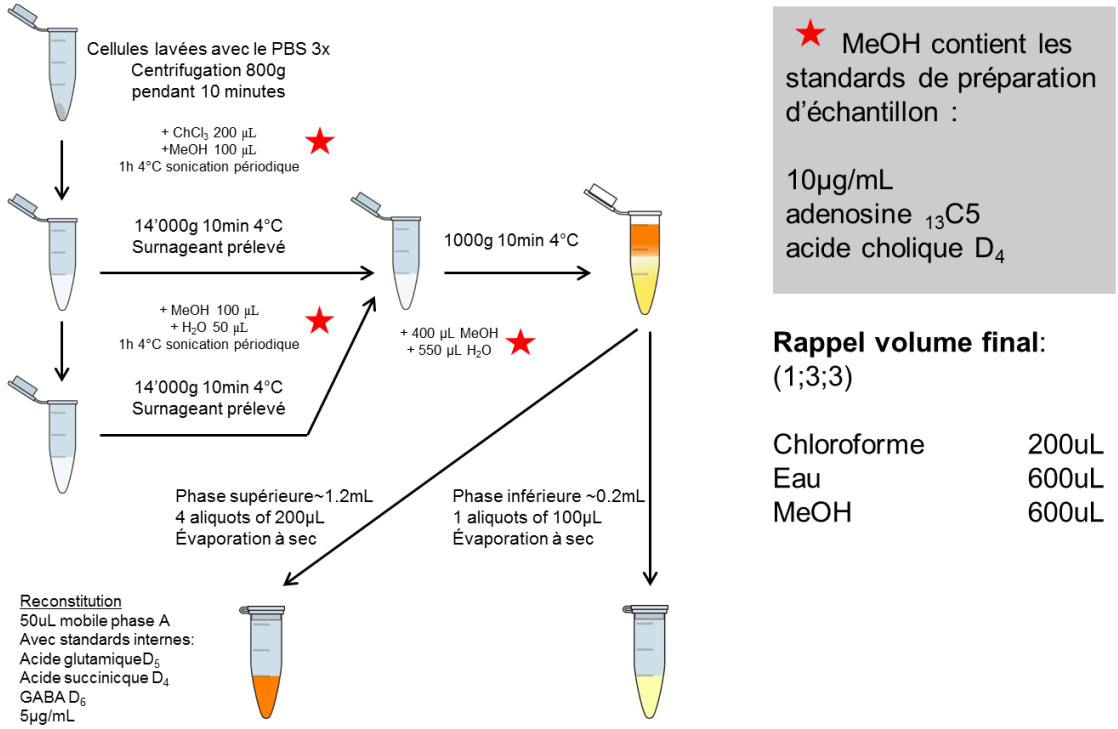


Figure 144: préparation d'échantillon des cellules sanguines

Types d'échantillons

Les échantillons fournis ont subi deux traitements différents (voir figure 145). Trois cultures séparées de cellules sanguines (nommées A B et C) ont été soit infectées avec le parasite *P. falciparum*, soit uniquement incubées séparément pendant le même temps, et ont subi les mêmes changements de milieu que les cellules infectées. Ensuite, après développement du parasite, les cellules infectées ont été récoltées et ont subi, pour certaines, une lyse cellulaire à l'aide de saponine, ou pour d'autres, aucune lyse cellulaire, le but étant de comprendre la contribution de la matrice (les cellules sanguines) sur les métabolites retrouvés lors des analyses.

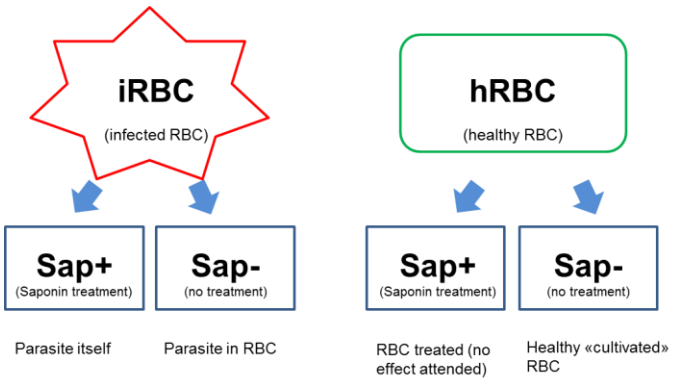


Figure 145: Type de préparations d'échantillons des globules rouges sains (hRBC) et infectés par le *P. falciparum* (iRBC). Les globules rouges subissent (Sap+) ou non (Sap-) une saponification afin de lyser la membrane cellulaire.

La préparation d'échantillon mène à deux phases séparées comme exposé précédemment. Deux standards internes de propriétés différentes sont donc ajoutés. Ceux-ci sont : l'adénosine $^{13}C_5$ pour la phase aqueuse, et l'acide cholique-d_4 pour la phase organique. La figure ci-dessous illustre les échantillons analysés.

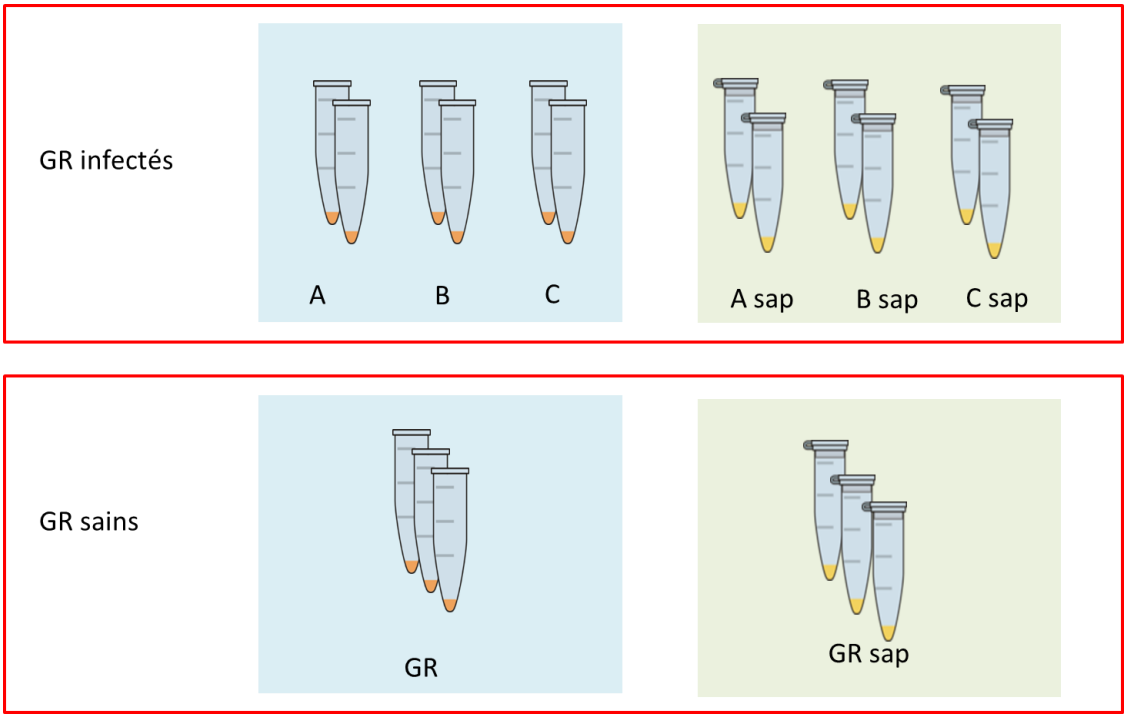


Figure 146: Nombre d'échantillons et répartition des différentes cultures. A, B et C sont des réplicats biologiques de cultures de globules rouges menées en parallèle. Ces cultures sont soit récoltées, soit subissent une étape supplémentaire de saponification afin de lyser la membrane cellulaire du globule rouge.

Pour les globules rouges infectés, saponifiés ou non, le nombre d'échantillons est de 6 (n=6) alors que pour les globules rouges sains le nombre d'échantillons est de 3 (n=3)

Chromatographie liquide

L'instrument utilisé est un UltiMate 3000 RSLC de Dionex, La séparation est réalisée sur une colonne Inertsil ODS-3 2.1x150 mm (2 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile A est : H_2O + 10 mM hexylamine avec un pH ajusté à 6.3 avec de l'acide acétique. La phase mobile B contient : 90% MeOH + 10% H_2O + 10 mM d'ammonium acétate à un pH de 8.5 ajusté avec de l'ammoniac. Le gradient appliqué est le suivant : 0% B pendant 3 min. 0-100 % B en 10 min et plateau pendant 3min, suivi de la rééquilibration du système pendant 10 minutes. Le débit est de 250 µL/min et le volume injecté est de 10 µL.

Spectrométrie de masse

Les analyses ont été effectuées en mode négatif sur un triple quadrupôle de type 4000 QTRAP® AB Sciex, Concord, Canada. Le temps d'accumulation pour chaque transition est de 50 ms. L'énergie de collision appliquée est variable selon chaque composé, tout comme le DP ainsi que le CXP. Le temps de cycle de la période est de 700 ms. Les analyses sont effectuées en schedulded SRM. Ce mode tient compte des temps de rétention qui ont été déterminés préalablement. Ceci permet d'avoir un plus grand nombre de transitions et de répartir les fenêtres selon les différents composés à analyser. Ces paramètres ont été optimisés et sont disponibles en annexe (tableaux 25-27). La tension appliquée est de -4500 V, avec une température de source de 450°C. Le curtain gas est de 10 psi, GS1 et GS2 de 50 psi. La liste complète des transitions se trouve en annexe (tableaux 25-27). Certains métabolites sont analysés en mode SIM/SIM. Ceci concerne des métabolites pour lesquels les fragments sont de moins de 50 Da, ou pour lesquels aucune transition Q1/Q3 n'a été jugée favorable (limite de détection trop élevée, problèmes d'interférences par d'autres molécules). Ceci concerne les composés suivants **:** alanine, cystéine, leucine, lysine, proline, valine.

Traitement des données

Les spectres sont traités à l'aide des logiciels PeakView, MarkerView d'ABSciex, (Concord, Canada) et Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA)

5.3. Résultats et discussion

Sélection des métabolites et détermination des conditions optimales d'analyse par spectrométrie de masse

La liste complète des métabolites sélectionnés, ainsi que les transitions optimisées se trouvent en annexe (tableaux 25-27).

L'importance du standard interne chromatographique pour la correction des variations d'ionisation lors de l'électronébulisation par la source

Les standards internes chromatographiques sont ajoutés lors de la reconstitution de l'échantillon dans le solvant adapté à la chromatographie utilisée, généralement la phase mobile A. Cependant, le volume injecté étant très faible en comparaison du débit de phase mobile, celui-ci n'a que peu d'influence sur la séparation et la forme des pics. Il faut en outre faire attention à ce que le solvant de reconstitution soit adapté aux composés analysés car ceci peut avoir une influence sur leur solubilisation, et donc sur leur concentration. Ces standards internes chromatographiques ont deux rôles principaux, le premier étant de garantir la qualité de la colonne et la séparation chromatographique, en ayant un temps de rétention stable et reproductible à travers de longues séquences d'analyses. Le second rôle concerne la correction des intensités dues aux variations d'ionisation par compétition d'ions provenant de la matrice.

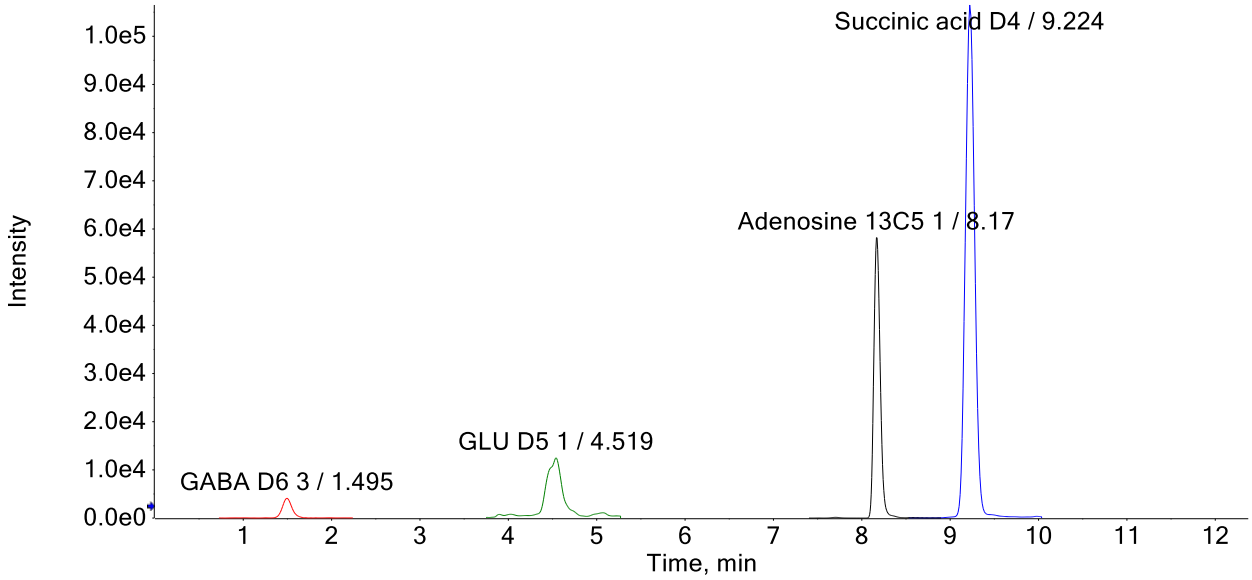


Figure 147: Chromatogramme des traces extraites pour les standards chromatographqiques ainsi que l'adénosine $^{13}C_5$

Un exemple est illustré ci-dessus (figure 148), qui prend pour analyte l'adénosine $^{13}C_5$. Le standard interne chromatographique qui élue, le plus proche en termes de temps chromatographique du composé d'intérêt, soit l'adénosine $^{13}C_5$, est l'acide succinique. Une rapide étude a été réalisée sur n=3 échantillons blancs (blancs techniques) ayant subi la même préparation d'échantillon. La valeur attendue est de 10 µg/mL indiquée en pointillé sur le graphique suivant.

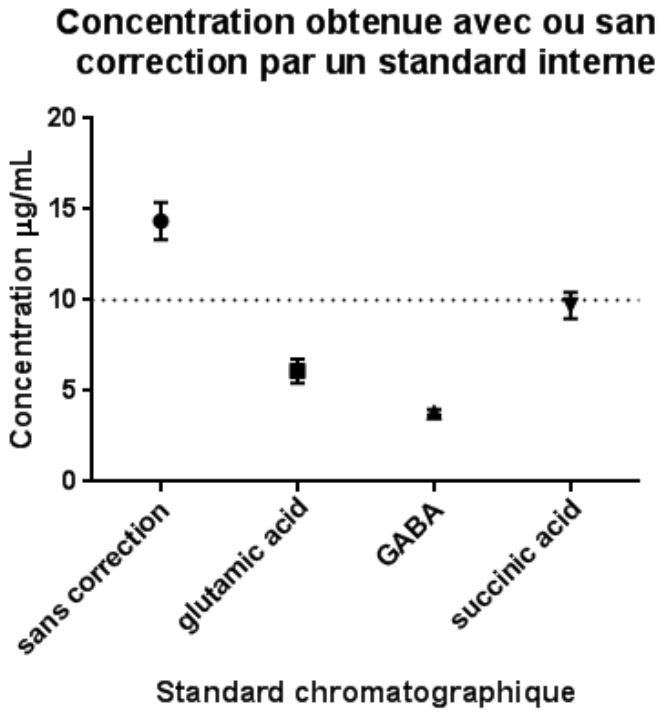


Figure 148: Concentration de l'adénosine $^{13}C_5$ selon le standard interne chromatographique utilisé pour la correction due aux variations d'ionisation.

La figure 148 illustre l'importance du choix du standard interne chromatographique le mieux adapté afin de corriger un effet éventuel lors de l'ionisation du composé. La valeur de concentration obtenue pour l'adénosine varie de près de 150% à moins de 50%. C'est pourquoi dans le cas du standard interne (adénosine $^{13}C_5$) le meilleur choix de standard chromatographique pour corriger les variations d'ionisations entre les échantillons est l'acide succinique-d_4. Ceci montre que le standard chromatographique le plus adapté pour corriger l'aire sous la courbe d'un métabolite est celui qui se trouve le plus proche du point de vue du temps de rétention.

Analyse du recouvrement des composés selon la préparation d'échantillon

Le recouvrement est effectué sur trois domaines de concentration avec un ordre de grandeur de différence (faible, moyenne, haute concentration). Les échantillons sont réalisés en triplicata pour chaque concentration avec une préparation d'échantillon complète pour chacun d'entre eux. Les valeurs sont ensuite corrigées suivant celles obtenues sans séparation de phases. L'aire corrigée par le standard interne (adénosine $^{13}C_5$) des pics obtenus pour la phase aqueuse est ensuite comparée à la valeur obtenue sans préparation d'échantillon. Seules 26 substances sont répertoriées pour le recouvrement, car ceci concerne les substances présentes ensuite dans les échantillons analysés. Le domaine de grandeur est respecté pour 17 substances, et celles-ci se retrouvent au niveau des trois concentrations utilisées dans le tableau 21. En rose, orange et vert se trouvent les valeurs obtenues et les statistiques qui y font référence, respectivement à une concentration faible, moyenne et haute. 9 substances ont pu être analysées uniquement dans les concentrations moyennes et hautes. Les résultats qualitatifs des observations sont présentés en annexe par le tableau 27.

Tableau 21: Valeurs des recouvrements obtenus pour chaque concentration, faible / moyenne / haute et par analyte dans la phase aqueuse

	Low concentration			Medium concentration			High concentration			Average low concentration (n=3)	Standard deviation	Coefficient of variation	Average medium concentration (n=3)	Standard deviation	Coefficient of variation	Average high concentration (n=3)	Standard deviation	Coefficient of variation	Average total (n=9)	Standard deviation total (n=9)
alanine	116.3	103.1	99.8	96.6	87.9	70.8	90.6	103.4	92.7	106.4	8.7	8%	85.1	13.1	15%	95.6	6.8	7%	95.7	12.6
arginine	96.5	124.9	108.1	74.2	69.8	42.8	97.2	114.9	105.2	109.8	14.3	13%	62.3	17.0	27%	105.8	8.9	8%	92.6	25.8
asparagine	95.4	127.8	102.4	106.6	134.6	98.6	102.3	121.4	105.2	108.5	17.0	16%	113.3	18.9	17%	109.6	10.3	9%	110.5	13.9
aspartic acid	78.8	97.8	77.3	110.2	115.6	87.3	102.4	108.9	95.0	84.6	11.4	14%	104.4	15.0	14%	102.1	7.0	7%	97.0	13.7
glutamic acid	95.8	117.5	90.7	129.2	140.8	104.6	94.7	110.2	90.4	101.3	14.2	14%	124.9	18.5	15%	98.4	10.4	11%	108.2	17.9
glutamine	139.1	119.3	126.7	46.3	66.4	86.6	104.7	114.6	95.9	128.4	10.0	8%	66.4	20.2	30%	105.1	9.4	9%	100.0	29.7
glycine	112.8	160.8	112.5	85.0	104.9	75.3	98.0	131.1	113.3	128.7	27.8	22%	88.4	15.1	17%	114.1	16.6	15%	110.4	25.1
proline	221.7	235.6	218.4	68.1	73.0	63.2	89.4	102.9	90.2	225.2	9.1	4%	68.1	4.9	7%	94.1	7.6	8%	129.2	73.2
serine	64.2	106.7	89.9	99.7	92.3	73.4	96.1	118.0	83.9	86.9	21.4	25%	88.5	13.6	15%	99.3	17.3	17%	91.6	16.4
threonine	98.6	108.9	92.2	68.7	68.2	58.4	98.3	105.6	102.6	99.9	8.4	8%	65.1	5.8	9%	102.2	3.7	4%	89.0	18.8
valine	45.4	68.4	51.0	63.4	61.2	52.2	78.8	76.0	63.3	54.9	12.0	22%	58.9	5.9	10%	72.7	8.3	11%	62.2	11.3
GABA	47.1	73.5	89.2	77.5	90.5	63.0	78.1	116.5	111.3	69.9	21.3	30%	77.0	13.7	18%	102.0	20.9	20%	83.0	21.9
orotic acid	94.6	106.1	86.7	76.9	87.5	76.8	95.5	95.7	90.6	95.8	9.8	10%	80.4	6.2	8%	93.9	2.9	3%	90.0	9.4
taurine	103.9	156.9	109.7	104.2	102.8	77.6	108.2	124.2	108.5	123.5	29.1	24%	94.9	15.0	16%	113.6	9.1	8%	110.7	21.1
GSH	49.7	61.5	43.7	66.1	71.3	68.9	75.3	81.3	67.5	51.6	9.0	18%	68.8	2.6	4%	74.7	6.9	9%	65.0	11.9
FAD	111.3	131.7	106.2	80.3	90.9	80.7	93.0	104.1	102.7	116.4	13.5	12%	83.9	6.0	7%	99.9	6.0	6%	100.1	16.2
mannitol	104.8	98.0	95.3	69.5	52.4	55.2	81.4	88.1	77.3	99.4	4.9	5%	59.0	9.2	16%	82.3	5.4	7%	80.2	18.5
GSSG				76.0	81.4	81.3	95.2	103.2	96.4				79.5	3.1	4%	98.3	4.3	4%	88.9	10.8
D-glucose				109.1	92.1	91.0	81.9	111.3	88.7				97.4	10.1	10%	94.0	15.4	16%	95.7	11.8
ADP				89.7	98.2	93.7	89.3	97.4	89.4				93.9	4.3	5%	92.0	4.7	5%	92.9	4.1
ATP				73.5	88.1	73.9	95.7	104.8	100.6				78.5	8.3	11%	100.3	4.6	5%	89.4	13.4
CTP				72.9	81.8	71.6	93.3	100.2	97.5				75.4	5.6	7%	97.0	3.5	4%	86.2	12.5
dATP				84.3	96.5	84.9	94.5	110.1	104.1				88.6	6.8	8%	102.9	7.9	8%	95.7	10.2
dCTP				79.0	97.7	86.2	97.2	106.3	106.4				87.6	9.4	11%	103.3	5.3	5%	95.5	11.0
GTP				87.4	97.1	86.5	96.9	105.8	105.0				90.4	5.9	6%	102.5	4.9	5%	96.4	8.2
NADH				100.7	89.7	98.6	71.5	85.6	60.6				96.3	5.8	6%	72.6	12.5	17%	84.4	15.7

Les graphiques suivants illustrent les recouvrements obtenus pour chaque domaine de concentration. Les valeurs obtenues pour les concentrations faibles sont, dans la majeure partie des cas, plus faibles que les valeurs obtenues pour les autres concentrations. Il faut savoir que le bruit de fond va jouer un rôle prépondérant lorsque le signal est faible, et donc diminuer l'aire utilisée pour le calcul de la concentration. De plus, une concentration trop élevée risque de saturer le détecteur, et la concentration obtenue sera sous-estimée en comparaison de la valeur réelle.

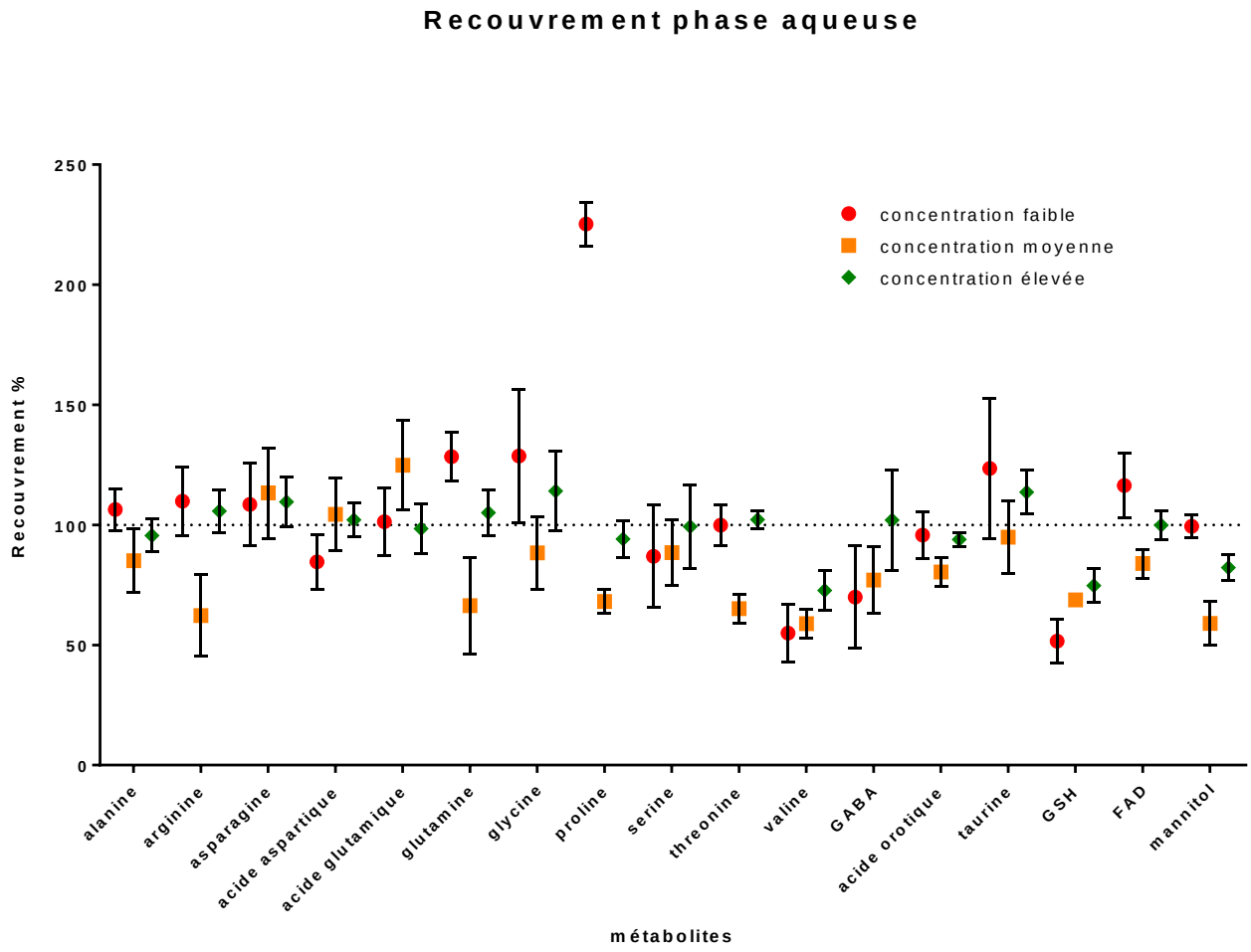


Figure 149: Recouvrement de 17 métabolites comportant 3 ordres de grandeur

Les valeurs sont réparties sur deux figures différentes (figure 149 ou 150) selon le domaine de grandeur évalué (2 ou 3 ordres de grandeur).

9 composés n'ont cependant pas pu être évalués sur trois ordres de grandeur, car le domaine de concentration utilisé n'était pas suffisamment élevé pour permettre cette évaluation. Ces composés sont illustrés dans la figure suivante.

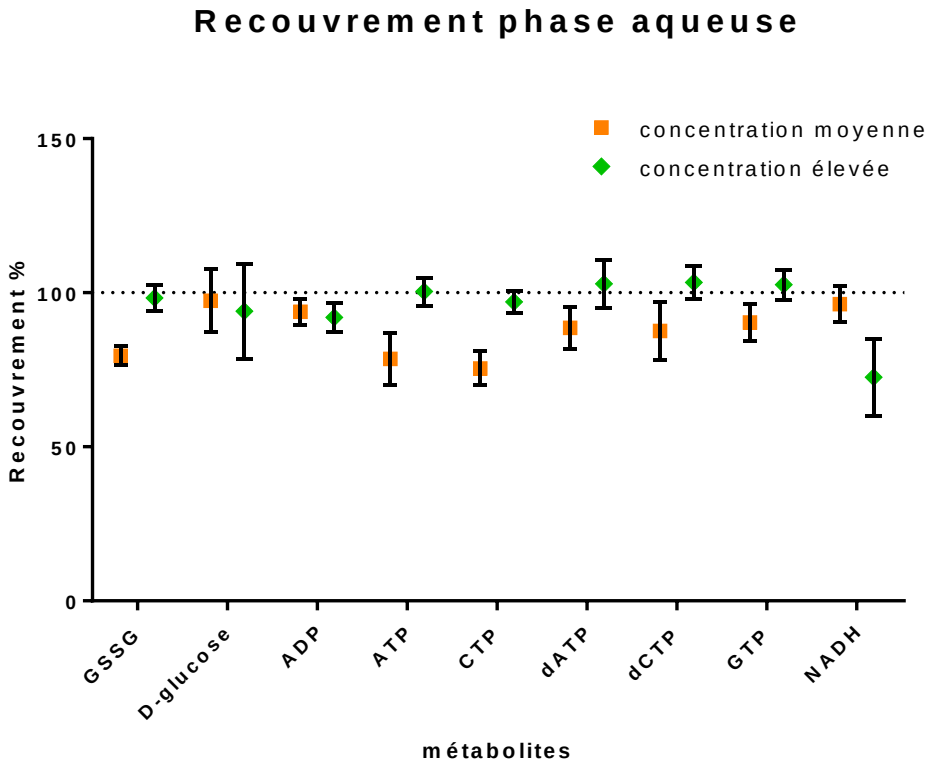


Figure 150: Recouvrement de 9 substances comportant 2 ordres de grandeur

Tableau 22: Valeurs de recouvrement pour les concentrations hautes

	Average high concentration (n=3)	Standard deviation	Coefficient of variation
alanine	95.6	6.8	7%
arginine	105.8	8.9	8%
asparagine	109.6	10.3	9%
aspartic acid	102.1	7.0	7%
glutamic acid	98.4	10.4	11%
glutamine	105.1	9.4	9%
glycine	114.1	16.6	15%
proline	94.1	7.6	8%
serine	99.3	17.3	17%
threonine	102.2	3.7	4%
valine	72.7	8.3	11%
GABA	102.0	20.9	20%
orotic acid	93.9	2.9	3%
taurine	113.6	9.1	8%
GSH	74.7	6.9	9%
FAD	99.9	6.0	6%
mannitol	82.3	5.4	7%
GSSG	98.3	4.3	4%
D-glucose	94.0	15.4	16%
ADP	92.0	4.7	5%
ATP	100.3	4.6	5%
CTP	97.0	3.5	4%
dATP	102.9	7.9	8%
dCTP	103.3	5.3	5%
GTP	102.5	4.9	5%
NADH	72.6	12.5	17%

Les valeurs de recouvrement vont de 72% pour le NADH à 114% pour la glycine. Le GSH, la valine ainsi que le NADH obtiennent un recouvrement particulièrement bas. Ceci est probablement dû pour le NADH, ainsi que pour le GSH, à la faible stabilité de ces composés et à leur sensibilité aux variations de température. En effet, ils ne se trouvent pas dans la phase organique, contrairement à la valine qui est aussi retrouvée dans la phase organique. Le coefficient de variation est supérieur à 10% pour 7 substances (acide glutamique, glycine, sérine, valine, GABA, glucose et NADH.

Quantification absolue des métabolites présents dans des globules rouges sains et infectés ayant subi ou non une préparation d'échantillon préalable par saponification

Le tableau 23 résume les masses obtenues pour les différents types de préparation d'échantillons (globules rouges sains (hRBC) et infectés par le *P. falciparum* (iRBC), globules rouges subissant (Sap+) ou non (Sap-) une saponification afin de lyser la membrane cellulaire). Les globules rouges sains ayant subi une saponification ne comportent pas de valeur de masse, ce qui est cohérent avec le fait qu'ils ont subi une saponification. Afin d'obtenir le profil métabolique spécifique au parasite, il est nécessaire d'isoler le matériel provenant de la cellule hôte et du parasite. Les saponines sont utilisées à cet effet pour lyser la membrane cellulaire de l'hôte [8]. Cependant, l'étape relativement longue de saponification prolonge l'état non physiologique dans lequel se trouvent les cellules. Ceci peut donc mener à des biais. Les quantités obtenues des globules rouges infectés saponifiés sont toujours inférieures à celles des globules infectés n'ayant pas subi de saponification.

La quantité de cellules sanguine est la même (10^6 cellules) et les cellules sanguines saines ont suivi exactement le même processus que les cellules sanguines infectées (à l'exception de l'infection et du Percoll). Cette étape n'avait pas été prise en compte dans l'étude menée à la partie précédente de ce chapitre.

Tous les acides aminés quantifiés sont en concentration plus faible dans les iRBC que dans les hRBC, sauf en ce qui concerne l'acide glutamique (1209 ng ±23% pour 1035ng ±23%). La taurine, l'acide orotique, le FAD sont également augmentés dans les iRBC. Des augmentations de ces composés ont été observées dans la quantification précédemment réalisée (partie 2, chapitre 3, figure 139). Le GSH est quant à lui aussi diminué dans les globules rouges infectés (partie 2, chapitre 3, figure 141). Ces résultats sont cependant contradictoires avec ceux obtenus précédemment (partie 2, chapitre 3, figure 139), pour l'alanine, l'arginine, l'acide aspartique et la valine. L'acide glutamique (son anion le glutamate) ainsi que la taurine sont impliqués dans la cascade biologique de formation du glutathion. Le glutathion permet de diminuer le stress oxydatif engendré par le parasite. L'acide orotique est un intermédiaire dans la voie de synthèse des purines et pyrimidines propre au parasite. Cette voie est fortement sollicitée. Ces points ont été précédemment discutés dans la partie 2 au point 4.3

.

Tableaux 23: Masses obtenues pour la quantification des globules rouges sains et infectés ayant subi ou non une saponification. Les valeurs en rouge correspondent à des masses déterminées hors de la limite inférieure de quantification. La masse fait référence à une quantité de 10^6 cellules sanguines.

	alanine		arginine		asparagine		acide aspartique		glutamine		acide glutamique	
	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]
hRBC n=3	125	26%	176	16%	152	33%	180	17%	871	39%	1035	23%
iRBC n=6	76	21%	143	19%	50	28%	105	22%	65	45%	1209	23%
sap iRB n=6	34	40%	38	25%	15	48%	31	33%	n.d		294	27%

	glycine		methionine		serine		threonine		tyrosine		valine	
	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]
hRBC n=3	124	30%	46	19%	68	15%	69	40%	63	20%	54	22%
iRBC n=6	30	8%	13	24%	27	5%	15	30%	27	12%	18	16%
sap iRB n=6	n.d		n.d		20	11%	n.d		n.d		8	23%

	acide orotique		taurine		GSH		FAD		GSSG		ATP		CTP		dATP		GTP	
	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]	Moyenne [ng]	CV [%]
hRBC n=3	5	16%	20	12%	753	65%	5	14%	1844	29%	506	21%	212	5%	240	5%	472	6%
iRBC n=6	12	13%	39	29%	393	13%	6	11%	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d	
sap iRB n=6	8		20		192	16%	5		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d	

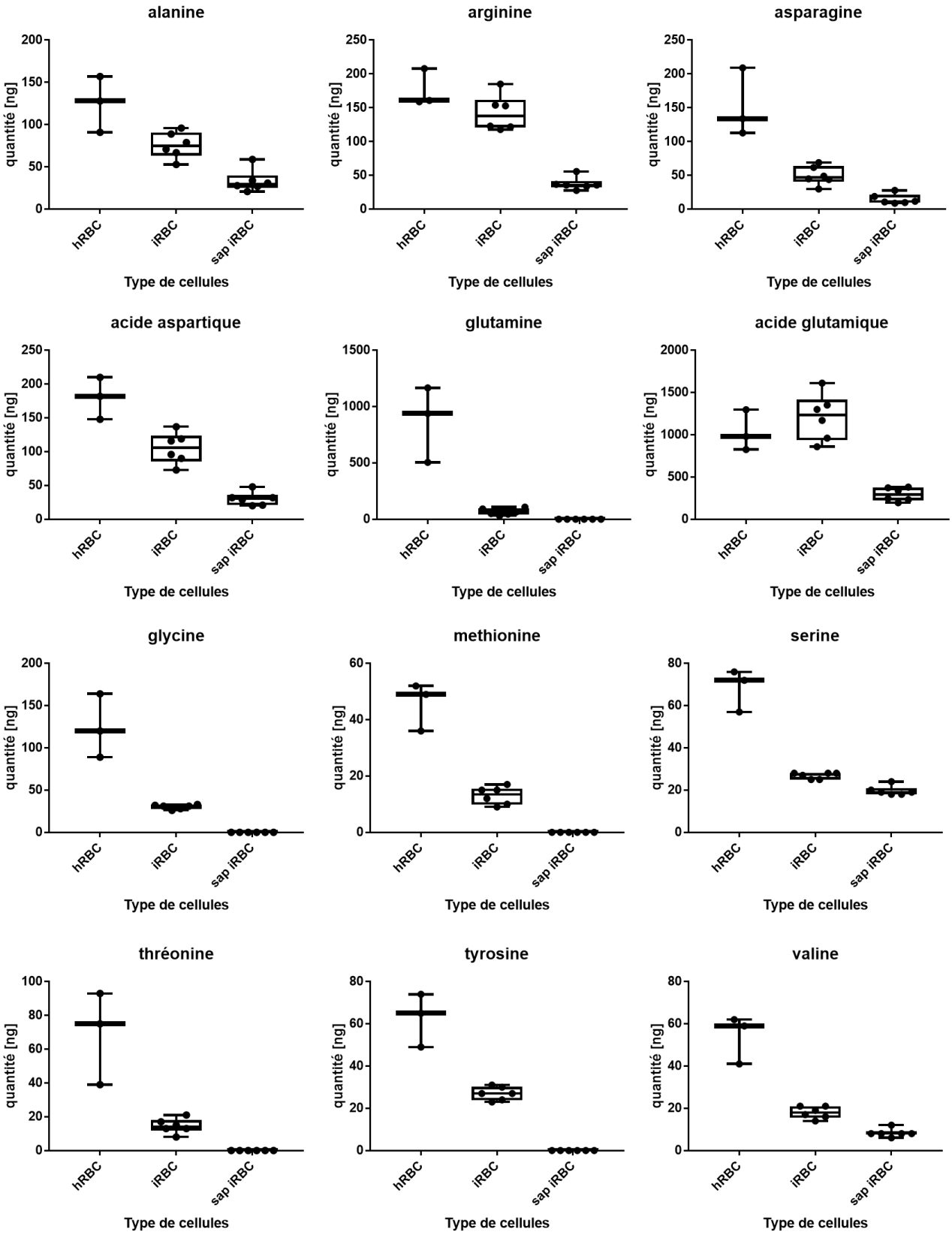


Figure 151: Ensemble des représentations graphiques de la quantification des acides aminés dans les globules rouges sains (hRBC), infectés (iRBC) et infectés ayant subi une étape de saponification (sap iRBC). Les écarts comprennent la valeur minimale et la valeur maximale

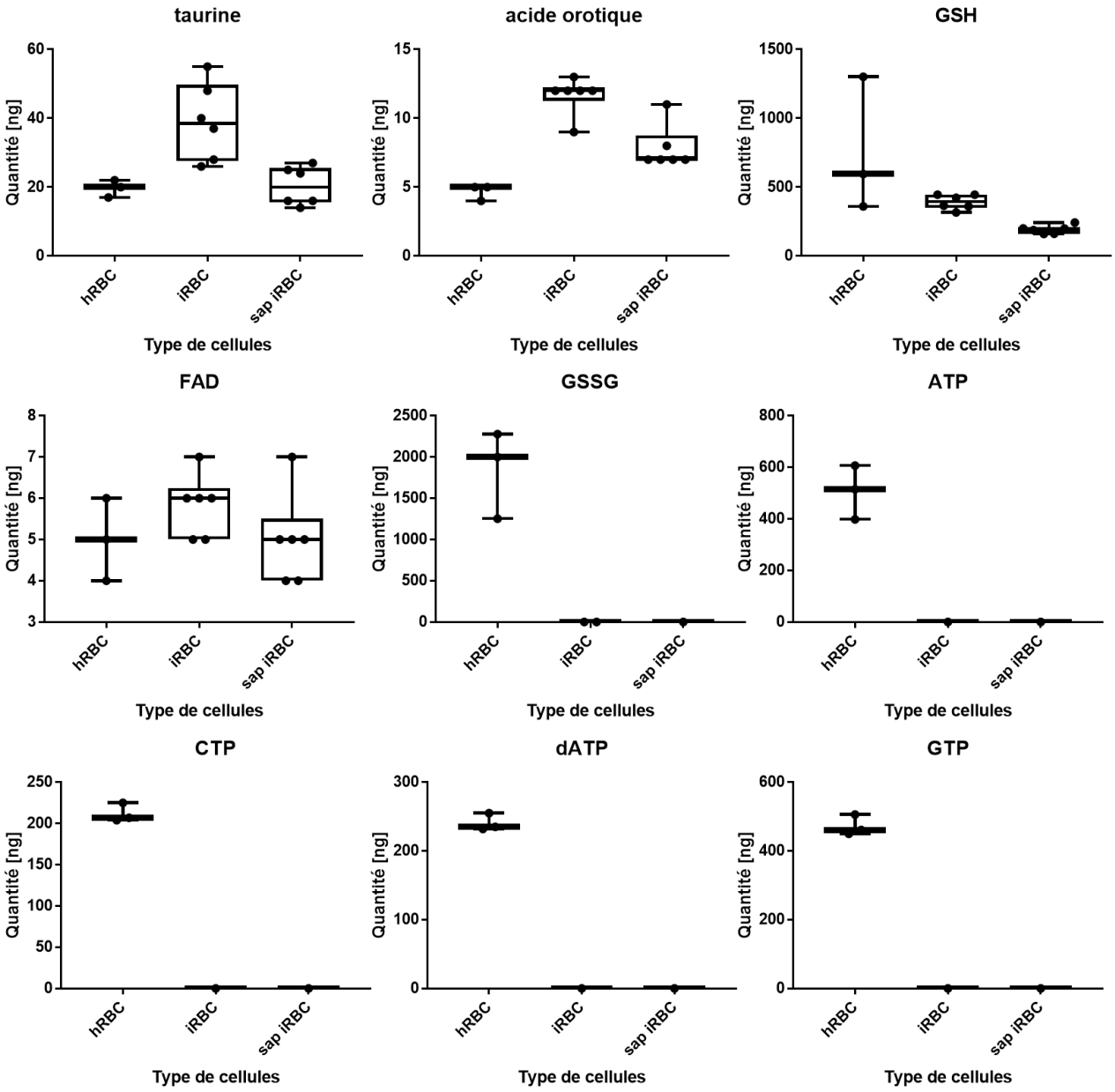


Figure 152: Ensemble des représentations graphiques de la quantification de métabolites dans les globules rouges sains (hRBC), infectés (iRBC) et infectés ayant subi une étape de saponification (sap iRBC). Les écarts comprennent la valeur minimale et la valeur maximale

Le GSSG, l'ATP, la CTP, le dATP et le GTP n'ont pas pu être quantifiés dans les globules rouges infectés (saponifiés ou non) car aucun pic correspondant à ces métabolites n'a été détectés. Ces pics sont cependant présents dans les globules rouges sains. On s'attendrait toutefois à une présence de GSSG augmentée due à la présence du parasite et au stress oxydatif qu'il impose à la cellule hôte.

La quantification absolue mène à de nombreuses questions. En effet, qu'est-ce qui est réellement quantifié et est-ce que la valeur obtenue est corrélée à l'état dans lequel la cellule se trouve ? La quantification relative ne pose pas cette question, car c'est la

modification de la concentration ou de la masse, suite à des conditions différentes, qui va être interprétée et non la quantité en elle-même. La variabilité biologique est un phénomène réel qui prend tout son sens lors d'une quantification absolue. De nombreux biais peuvent intervenir et fausser les résultats obtenus. Le globule rouge infecté par le parasite fait principalement office d'enveloppe, et le matériel intracellulaire présent est minime en comparaison avec la quantité importante de parasites. L'étape de saponification a été envisagée pour déterminer si la quantité d'un métabolite était la même dans un globule rouge infecté ayant subi une étape de saponification pour supprimer l'enveloppe cellulaire, ou sans cette même étape. Il s'avère que la quantité observée est très inférieure. Deux hypothèses peuvent être formulées : soit l'étape de saponification entraîne la perte de métabolites, soit les métabolites proviennent en majorité de l'enveloppe cellulaire de l'hôte (pas de métabolites quantifiés dans les globules rouges sains saponifiés).

Les courbes de calibrations ont été établies avec des standards hydro-organiques. Ils ne sont donc pas sujets à un éventuel effet matrice provenant de l'échantillon [9]. Cependant, la préparation d'échantillons diminue les interactions dues à la matrice grâce à l'extraction liquide-liquide. Une étude d'un éventuel effet matrice pourrait être investiguée par l'utilisation de l'infusion de standards post-colonne [10].

L'utilisation de standards marqués pour quantifier un grand nombre de métabolites s'avère impossible. De plus, la présence de standards marqués peut influer sur l'ionisation du composé lui-même et induire de ce fait aussi un biais [11]. C'est pourquoi un nombre restreint de métabolites marqués, se trouvant tout au long de la séquence chromatographique, a été utilisé pour corriger les AUC des métabolites quantifiés.

Les résultats sont exprimés en ng/10^6 cellules. Cependant, la taille d'une cellule infectée par le parasite est supérieure à celle d'un globule rouge sain (voir tableau 23). C'est pourquoi une erreur peut être issue de cette observation. La correction des résultats par le nombre de cellules est nécessaire. Dans le cas présent, le nombre de cellules était similaire et les données n'ont donc pas été corrigées. Le volume pourrait aussi être envisagé afin de normaliser les résultats, mais la concentration de globules rouges varie d'un individu à l'autre. La méthode utilisant la lyophilisation des cellules à températures basses (< 4°C) peut amener une réponse adéquate afin de quantifier les cellules en poids sec de matière biologique.

5.4. Conclusion et perspectives Partie 3 Chapitre 3

52 métabolites sont sélectionnés pour une quantification absolue par LC-MS, dans des globules rouges sains et infectés par le parasite *P. falciparum*. Les paramètres de spectrométrie de masse ont été optimisés, afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la méthode (transitions, CE, DP, CXP, temps de rétention). Une méthode de quantification en SRM, avec des fenêtres d'acquisition pendant la séquence chromatographique, est créée (schedulded SRM). Ceci permet de quantifier un nombre plus grand de métabolites et de réduire le temps de cycle.

Les standards internes utilisés pour corriger les effets d'ionisation entre les échantillons dans la séquence analytique, sont présent à des temps différents tout au long de la séquence chromatographique. L'utilisation d'un nombre élevé de standards marqués (un par métabolite) n'est pas envisageable et peut diminuer la capacité d'ionisation du composé quantifié. C'est pourquoi un nombre restreint de standards marqués (trois marqués et un standard interne), a été utilisé. Ces standards chromatographiques sont ajoutés lors de la reconstitution de l'échantillon, et sont à concentration égale dans tous les échantillons.

Une étude de recouvrement des métabolites présents, dans les matrices utilisées (globules rouges sains et infectés), lors de la préparation d'échantillons, montre que la répartition des métabolites sélectionnés est principalement dans la phase aqueuse (>50%). Cette étude apporte un aspect nouveau dans la maîtrise des étapes intervenants dans la préparation d'échantillon. La méthode souffre toutefois d'un manque de reproductibilité, entre les différents niveaux de concentrations (faible, moyenne, élevée).

21 métabolites, dont 12 acides aminés, ont été quantifiés dans les globules rouges sains ou infectés, et ayant subi ou non une étape de saponification. La quantité déterminée a augmenté pour quatre composés, lorsque les globules présentaient une infection par le parasite *P. falciparum*. Ces composés sont l'acide glutamique, la taurine, l'acide orotique et le FAD. Une grande variabilité biologique des mesures a été observée. C'est pourquoi l'utilisation d'un nombre de réplicats biologiques, et techniques, doit être envisagée (>3 réplicats biologiques). L'utilisation des globules comme matrice, pour la quantification des métabolites, est particulièrement adaptée à la problématique de la malaria.

L'étape de saponification entraîne une perte conséquente de matériel, et bien qu'elle permette de différencier les métabolites provenant de l'hôte (l'érythrocyte) ou du parasite, elle apporte une étape supplémentaire. Cette étape peut mener à une modification du métabolisme et biaiser les valeurs obtenues.

La quantification absolue est soumise à de nombreuses variations (biologiques, techniques). Contrairement à la quantification relative, la quantification absolue est soumise à de nombreuses contraintes. En effet, il est nécessaire de posséder les standards des métabolites quantifiés afin d'établir une courbe de calibration. Il faut, de plus, s'assurer d'une normalisation du signal et des effets matrices. Enfin, une maîtrise parfaite des étapes comprises dans la préparation d'échantillons, est incontournable (recouvrement, dégradation, perte de matériel, précipitation des protéines, arrêt rapide du métabolisme).

Enfin, la normalisation des échantillons par le nombre de cellules (infectées ou saines) peut amener à une conclusion erronée. La taille des globules rouges infectés est supérieure à celle des globules rouges sains.

La quantification absolue de ces métabolites apporte un regard supplémentaire pour l'étude des flux impliqués lors de l'infection par le parasite responsable de la malaria.

5.5. Références partie 3 chapitre 3

1. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
2. Oppenheim, R.D., et al., *BCKDH: the missing link in apicomplexan mitochondrial metabolism is required for full virulence of Toxoplasma gondii and Plasmodium berghei.* PLoS pathogens, 2014. **10**(7): p. e1004263.
3. Lee, D.Y., et al., *Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma.* Anal. Bioanal. Chem., 2014. **406**(28): p. 7275-7286.
4. Nemkov, T., et al., *Metabolomics in transfusion medicine.* Transfusion, 2016. **56**(4): p. 980-93.
5. *MalarX, la médecine systémique de la malaria*. juillet 2014 [cited 2017 5 juin]; Available from: http://www.systemsx.ch/fr/projets/research-technology-and-development-projects/malarx/.
6. Roe, B., et al., *Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23641.
7. Chiappino-Pepe, A., et al., *Bioenergetics-based modeling of Plasmodium falciparum metabolism reveals its essential genes, nutritional requirements, and thermodynamic bottlenecks.* PLoS Comput Biol, 2017. **13**(3): p. e1005397.
8. Olszewski, K.L. and M. Llinas, *Extraction of hydrophilic metabolites from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes for metabolomic analysis.* Methods in molecular biology (Clifton, N J), 2013. **923**: p. 259-66.
9. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS.* Anal. Chem., 2003. **75**(13): p. 3019-3030.
10. Boettcher, C., et al., *Evaluation of Matrix Effects in Metabolite Profiling Based on Capillary Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry.* Anal. Chem., 2007. **79**(4): p. 1507-1513.
11. Han, W. and L. Li, *Matrix effect on chemical isotope labeling and its implication in metabolomic sample preparation for quantitative metabolomics.* Metabolomics, 2015. **11**(6): p. 1733-1742.

6. Conclusions et perspectives du chapitre 3

L'utilisation de la paire d'ions en chromatographie liquide en phase inverse a permis d'améliorer la rétention des métabolites polaires. Sur 129 métabolites analysés en RPLC et IP-LC, le facteur de rétention est augmenté pour 128 d'entre eux en IP-LC. Le facteur de rétention de 50 composés polaires, provenant de cascades métabolomiques importantes (cycle de Kreb, voie des pentoses, phosphates), analysés en RPLC à pH 3 et pH 8, ainsi qu'en RP-LC, a été réalisé. Sur un nombre de 27 composés pour lesquels un facteur de rétention a pu être calculé, ce facteur est plus grand pour 15 d'entre eux avec l'utilisation de la paire d'ions. Sur le total des analytes (soit 50), la paire d'ions montre une augmentation des facteurs de rétention pour 34 d'entre eux, soit 68% des composés. Enfin, l'analyse par HILIC de 19 métabolites polaires comprenant notamment des acides aminés et des métabolites impliqués dans le cycle de l'acide citrique, montre une largeur de pic de plus de 30 secondes pour plus de la moitié d'entre eux (10 métabolites).

Une fois établie la méthode de séparation par chromatographie liquide par paire d'ions, 19 métabolites ont été quantifiés de façon absolue, par étalonnage externe dans des globules rouges soit sains, soit infectés par le parasite responsable de la malaria, puis sur des cellules hépatiques en quantités croissantes (10^5-10^7 cellules), afin de déterminer la quantité minimale nécessaire pour une étude métabolomique ultérieure. Une quantification relative, sans droite d'étalonnage, concerne 22 composés (augmentation d'un facteur 2-3 dans les érythrocytes infectés, en comparaison avec les globules rouges sains, pour la phénylalanine, la glutamine, la créatine, la thréonine, l'asparagine, l'alphalactone, le myoinositol et l'uridine diphosphate et le glucose). Une augmentation des quantités d'acides aminés a été mise en évidence dans les globules rouges infectés par rapport aux globules rouges sains. En outre, l'existence de métabolites inhérents à la présence du parasite, comme le GABA (absence de mitochondries dans les globules rouges) a été confirmée. Concernant la quantification sur les cellules hépatiques, le choix s'est porté sur une quantité de 10^6 cellules.

Enfin, une étude plus approfondie du recouvrement d'extraction, et une étude plus robuste sur des globules rouges infectés et sains, est effectuée sur 54 métabolites avec une optimisation des paramètres des sources (CE, DP, CXP). 21 métabolites, dont 12 acides aminés, ont été quantifiés dans les globules rouges sains ou infectés, et ayant subi ou non

une étape de saponification. La quantité déterminée a augmenté pour quatre composés, lorsque les globules présentaient une infection par le parasite *P. falciparum*. Ces composés sont l'acide glutamique, la taurine, l'acide orotique et le FAD.

La HILIC, bien que très largement utilisée, et souvent pour ses propriétés de rétention des molécules polaires, n'a cependant pas donné satisfaction dans les études, certes restreintes, de ce chapitre. C'est pourquoi une étape de quantification absolue des métabolites polaires a été menée, en utilisant les propriétés chromatographiques de la phase inverse avec un agent de paire d'ions. La SRM en spectrométrie de masse a été utilisée pour ses propriétés sélectives, sensibles, et spécifiques.

L'agent de paire d'ions, l'hexylamine, est utilisé pour des analyses par spectrométrie de masse en mode négatif. Il faudrait mener ces études avec un agent de paire d'ions positif. Des recherches préliminaires ont montré un intérêt particulier pour L'HFBA (l'acide hydroxyfluorobutique) L'étude du SDS (sodium dodécyl sulfate) pourrait aussi être envisagée.

Il reste cependant une question relative à la normalisation des échantillons. Les données ont été corrigées selon le nombre de cellules (érythrocytes). Les globules rouges infectés possèdent toutefois un volume plus important, dû à la parasitémie intra-érythrocytaire élevée, ainsi qu'aux contraintes physiques et chimiques maximales que peut supporter un globule rouge.

La quantité de matériel biologique, ainsi que la grande variabilité induite par toute expérience sur du matériel biologique, doivent être repensées avant d'envisager des études supplémentaires. En effet, les métabolites étant présents à des concentrations très variables, avec des limites de détection propres à chaque métabolite, ceci couplé à une variabilité de propriétés physicochimiques, rend l'exercice de la quantification absolue d'une large gamme de métabolites très périlleuse, voire impossible, en utilisant un seul système chromatographique, un seul système de détection par spectrométrie de masse, et une seule préparation d'échantillon [1]. De nombreuses plateformes sont d'ailleurs déjà développées dans ce sens-là, mais la demande en matériel biologique de départ reste importante, surtout si l'on veut effectuer les mesures avec des réplicats. Seul un compromis entre le nombre de substances quantifiées et la quantité de matériel biologique nécessaire semble exister [2].

Un intérêt plus ciblé pour l'analyse des flux entre l'hôte et le parasite se développe actuellement [3]. L'analyse par imagerie des globules rouges infectés par le parasite pourrait tendre à apporter de nouvelles informations sur les interactions entre l'hôte et le parasite [4].

7. Remerciements

Je remercie le Professeur Dominique Soldati-Favre du Département de microbiologie et de médecine moléculaire de l'Université de Genève, pour l'obtention des échantillons sanguins infectés et sains analysés dans ce chapitre. Je remercie tout particulièrement le Docteur Paco Pino qui a mené les expériences de cultures cellulaires, ainsi que Rebecca Oppenheim pour son expertise dans ce domaine. Je remercie enfin le donneur de sang (informé) du groupe particulier O^- pour son don à la science.

8. Références

1. Sana, T.R., et al., *Global mass spectrometry based metabolomics profiling of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60840.
2. Wei, R., G.D. Li, and A.B. Seymour, *High-Throughput and Multiplexed LC/MS/MRM Method for Targeted Metabolomics.* Analytical Chemistry, 2010. **82**(13): p. 5527-5533.
3. Olszewski, K.L., *Dissecting the Metabolism of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum*. 2011. p. 168 pp.
4. Esposito, A., et al., *Quantitative Imaging of Human Red Blood Cells Infected with Plasmodium falciparum.* Biophys. J., 2010. **99**(3): p. 953-960.

9. Annexes

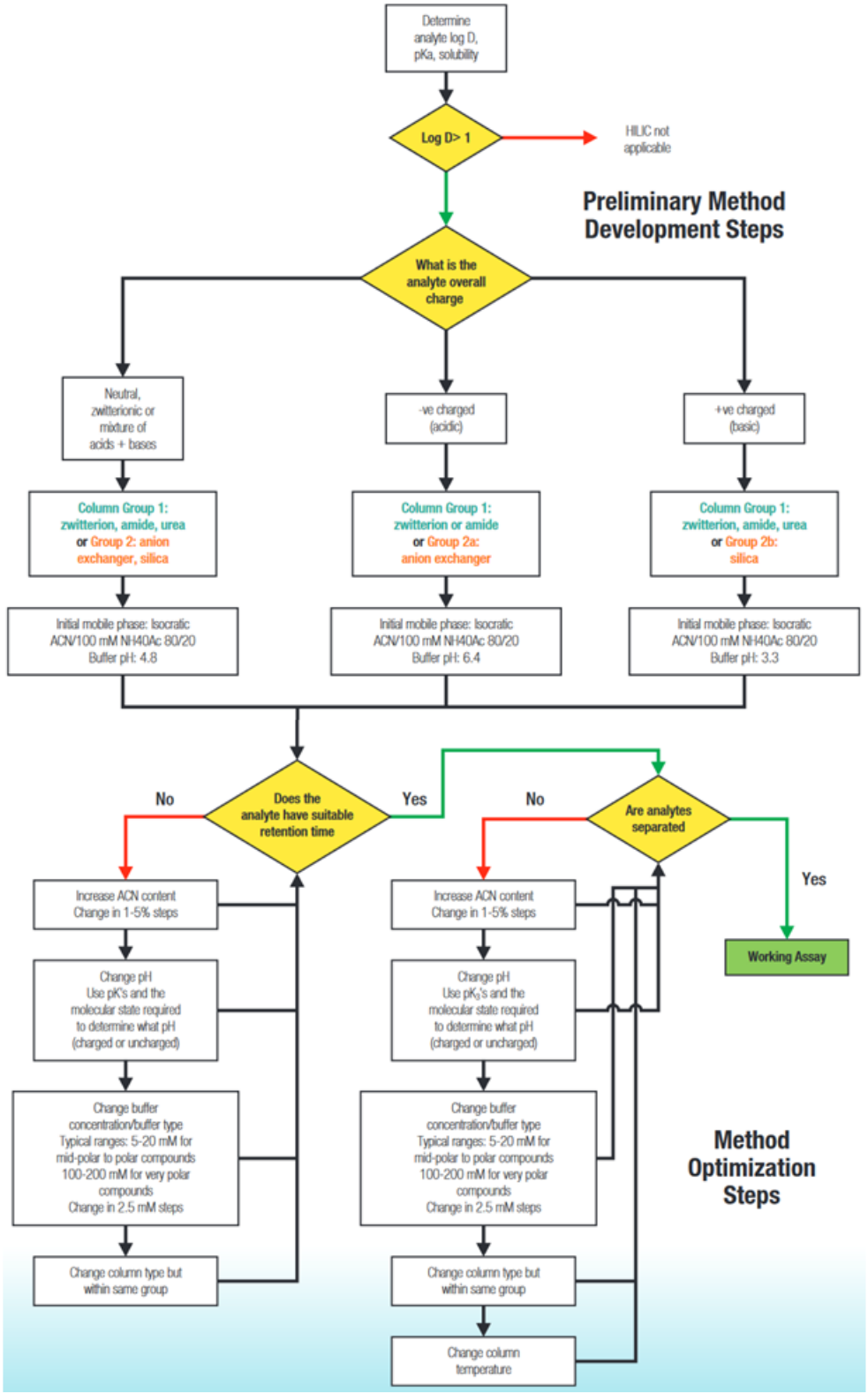


Figure 153: Développement de méthodes fournis pour le choix de la colonne HILIC adaptée à la problématique rencontrée, pas d'amélioration possible de la lisibilité, schéma disponible à l'adresse web : https://www.thermofisher.com/ch/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hilic-hplc-uhplc-columns-information/hilic-method-development.html, consulté le 25.07.2017

Tableau 24: Temps de rétention suivant le type de chromatographie liquide utilisée

Nom	Temps de rétention [min]		
	Paire d'ion	Phase inverse pH 3	Phase inverse pH 8
acide aspartique	4.5	d	0.8
acide fumarique	9.3	a	0.7
acide glutamique	4.6	0.8	0.8
acide malique	9.3	d	0.7
acide nicotinique	9.1	2.0	a
acide orotique	8.0	4.0	d
acide oxoglutarique	9.4	3.7	0.7
acide pyruvique	a	d	d
acide succinique	9.3	3.4	0.7
adenine	7.3	d	d
adenosine	8.2	5.2	a
ADP	10.5	5.1	d
alanine	1.5	d	0.8
arginine	1.1	0.6	0.9
asparagine	1.5	0.8	0.8
ATP	11.2	6.3	2.3
biotin	9.8	8.2	6.2
CoA	11.4	a	5.8
CTP	12.0	d	0.8
cysteine	1.7	d	a
dATP	11.3	7.9	4.5
dCTP	11.0	5.9	0.9
dGTP	11.2	6.3	2.3
FAD	11.0	a	7.5
FMN	11.1	11.7	d
fructose 6-phosphate	8.4	1.4	0.7
GABA	1.5	0.7	0.8
glucose	1.6	d	d
glucose 6-phosphate	8.8	1.4	0.7
glutamine	1.6	0.8	0.8
glycine	d	a	a
GSH	7.9	2.2	d
GSSG	9.1	5.0	1.0
GTP	11.0	a	d
guanosine	7.3	5.6	5.7
leucine / isoleucine	4.6	2.3	2.4
lysine	9.4	0.6	0.8
mannitol	1.6	d	d
methionine	3.2	d	1.6
NADH	9.9	7.0	5.7
NADPH	a	d	d
orthophosphate	a	1.3	0.7
PABA	8.2	6.3	1.0
phenylalanine	7.9	5.4	5.7
proline	1.8	0.9	1.0
ribose 5-phosphate	8.7	1.4	0.7
serine	1.5	0.7	0.8
taurine	1.5	0.8	0.8
threonine	1.6	0.8	0.8
tryptophane	9.0	6.5	6.8
tyrosine	5.6	2.9	2.8
valine	2.2	d	1.0

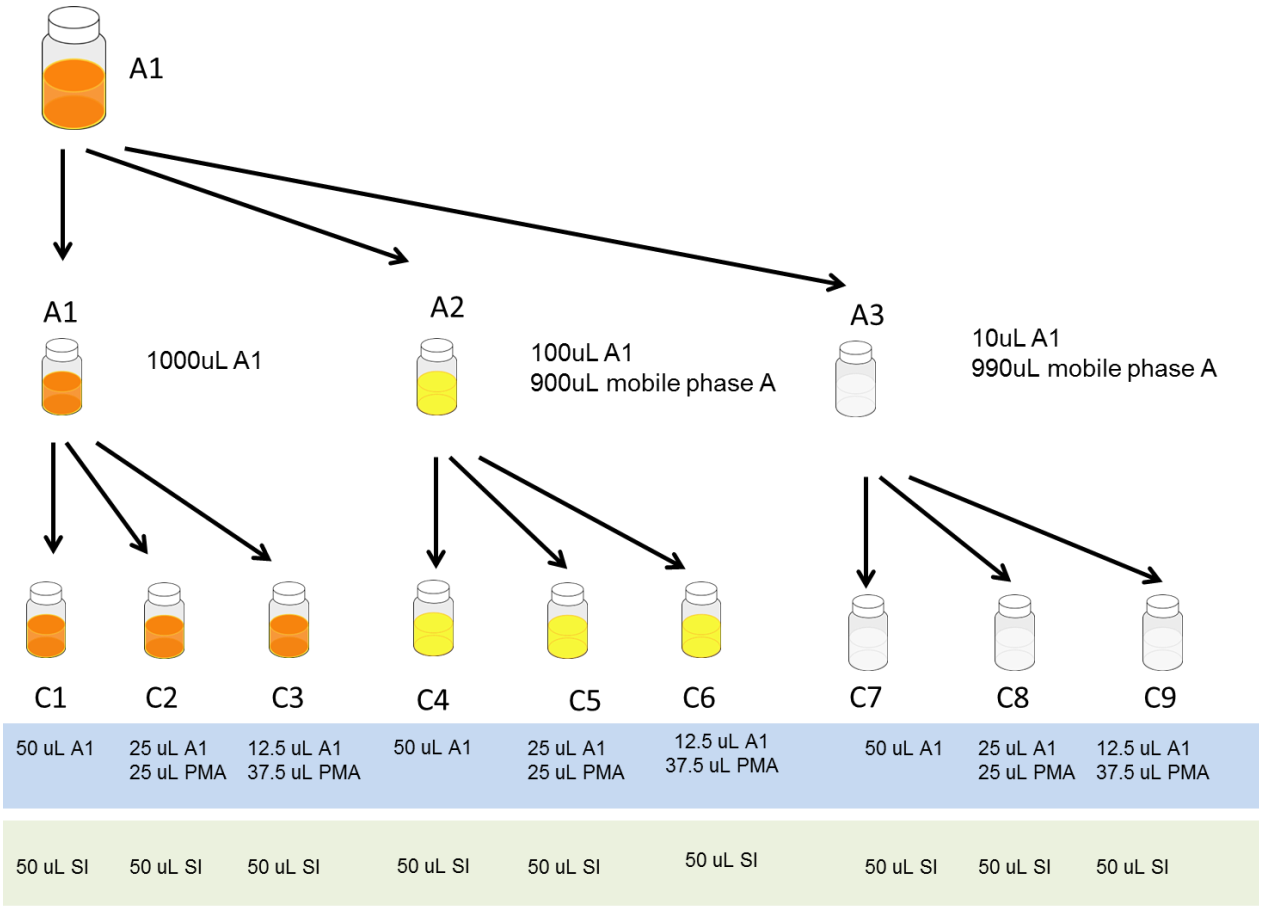


Figure 154: Préparation des solutions de standards pour la droite de calibration

Tableau 25 : Concentration pour les courbes de calibration pour les quatre groupes

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
C01	2	10	25	50
C02	1.5	7.5	18.75	37.5
C03	1	5	12.5	25
C04	0.5	2.5	6.25	12.5
C05	0.2	1	2.5	5
C06	0.15	0.75	1.875	3.75
C07	0.1	0.5	1.25	2.5
C08	0.05	0.25	0.625	1.25
C09	0.02	0.1	0.25	0.5
C10	0.015	0.075	0.1875	0.375
C11	0.01	0.05	0.125	0.25
C12	0.005	0.025	0.0625	0.125

Tableau 26: Répartition des métabolites en quatre groupes de concentration selon leur capacité d'ionisation dans la source

		concentration sol mère mg/mL	concentration finale [ug/mL]
Groupe 1	Mannitol 1	5	2
	Malic acid 1	5	2
	Succinic acid 1	5	2
	Nicotinic acid 1	1	2
	Fumaric acid 1	5	2
	Adenine 1	2	2
	Orotic acid 1	1	2
Groupe 2	Gamma-Aminobutyric acid 1	5	10
	Adenosine 2	5	10
	Glucose 6-phosphate 1	5	10
	L-Proline	5	10
	L-Valine	5	10
	L-Lysine	5	10
	Oxoglutaric acid 1	5	10
	L-Glutamic acid 1	5	10
	Taurine 1	5	10
	D-Glucose 1	5	10
	L-Leucine	5	10
	Biotin 1	1	10
	L-Glycine	5	10
	L-Alanine	5	10
	L-Threonine 1	5	10
	L-Arginine 1	5	10
	D-Ribose 5-phosphate 1	5	10
	L-Serine 2	5	10
	FAD 1	2	10
Groupe 3	Fructose 6-phosphate 3	5	25
	L-Aspartic acid 1	5	25
	L-Asparagine 2	5	25
	Guanosine 1	1	25
	dGTP 1	2	25
	L-Glutamine 1	5	25
	Orthophosphate 2	5	25
	L-Phenylalanine 1	5	25
	dATP 1	2	25
	L-Tyrosine 1	1	25
	NADH 1	2	25
	PABA 1	5	25
	L-Tryptophan 1	5	25
	GSH 1	5	25
	ATP 1	2	25
	ADP 1	2	25
	L-Methionine 1	5	25
	CTP 1	2	25
	L-Cysteine	5	25
Groupe 4	dCTP 1	2	50
	FMN 3	2	50
	GTP 2	5	50
	pyruvic acid 2	5	50
	NADPH 1	2	50
	GSSG 1	2	50
	CoA 1	2	50

Tableau 27: Evaluation du signal obtenu en MS pour les différents métabolites analysés selon le type d'échantillon. La première colonne fait référence aux cultures d'érythrocytes infectées par le parasite, la seconde colonne présente les érythrocytes infectés et ayant subi une étape de saponification, la colonne RBC concerne des globules rouges sains, et RBC sap fait référence à des globules rouges sains saponifiés.

	A B C	A B C sap	RBC	RBC sap
L-Alanine				
L-Arginine 1				
L-Asparagine 3				
L-Aspartic acid 1				
L-Cysteine				
L-Glutamic acid 1				
L-Glutamine 1				
L-Glycine				
L-Proline				
L-Serine 2				
L-Threonine 1				
L-Tryptophan 1				
L-Valine				
Gamma-Aminobutyric acid 1				
D-Glucose 2				
Fructose 6-phosphate 1				
D-Ribose 5-phosphate 1				
Orotic acid 1				
Adenosine 1				
Taurine 1				
Guanosine 1				
ADP 1				
ATP 1				
CTP 1				
dATP 1				
dCTP 1				
GTP 2				
NADH 1				
NADPH 1				
GSH 1				
GSSG 1				
FAD 1				
FMN 1				
Biotin 1				
CoA 1				
PABA 1				
Orthophosphate 1				
Mannitol 1				

Good signal

Poor signal (S/N low)

No signal

Tableau 28: Chapitre 3 partie 2, quantification absolue et relative

Type	Nom	Q1	Q3	Temps de rétention attendu (min)	Début (min)	Fin (min)	CE	CXP	DP
Quantification absolue	Glycerol 3-phosphate	171.0	79.0	7.2	6.4	8.0	-30	-10	-40
	Glycerol 3-phosphate	171.0	63.0	7.2	6.5	8.0	-80	-10	-60
	Glycerol 3-phosphate	171.0	97.0	7.2	6.4	8.0	-20	-15	-40
	Glucose 6-phosphate	259.0	199.0	6.9	6.1	7.6	-20	-10	-20
	Glucose 6-phosphate	259.0	78.8	6.9	6.1	7.6	-46	-10	-40
	Glucose 6-phosphate	259.0	96.8	6.9	6.1	7.6	-20	-10	-40
	Fumaric acid	115.0	71.0	7.5	6.8	8.3	-10	-10	-20
	L-Leucine	130.1	130.1	2.6	1.8	3.4	-10	-10	-40
	L-Valine	116.1	116.1	1.4	0.7	2.2	-10	-10	-40
	L-Glutamic acid	146.1	146.1	2.5	1.7	3.2	-10	-10	-40
	L-Glutamic acid	146.1	128.0	2.5	1.7	3.2	-20	-10	-40
	L-Glutamic acid	146.1	102.1	2.5	1.7	3.2	-20	-10	-40
	L-Aspartic acid	132.0	88.1	2.6	1.8	3.4	-20	-15	-40
	L-Aspartic acid	132.0	114.9	2.6	1.9	3.4	-20	-10	-40
	L-Aspartic acid	132.0	71.1	2.6	1.9	3.4	-20	-10	-40
	L-Alanine	88.0	88.0	1.0	0.2	1.7	-10	-15	-40
	Succinic acid	117.0	73.0	7.5	6.7	8.2	-20	-10	-20
	Succinic acid	117.0	99.0	7.5	6.7	8.2	-20	-15	-40
	Gamma-Aminobutyric acid	102.1	102.1	1.0	0.2	1.7	-10	-10	-40
	Gamma-Aminobutyric acid	102.1	84.1	1.0	0.2	1.7	-10	-15	-40
	D-Glucose	179.1	89.0	1.0	0.2	1.7	-10	-15	-40
	D-Glucose	179.1	71.0	1.0	0.2	1.7	-20	-10	-40
	Fructose 6-phosphate	259.0	79.0	7.2	6.4	7.9	-60	-10	-40
	Fructose 6-phosphate	259.0	97.0	7.2	6.4	7.9	-20	-15	-40
	Fructose 6-phosphate	259.0	169.0	7.2	6.4	7.9	-20	-10	-20
	D-Ribose 5-phosphate	229.0	79.0	7.1	6.4	7.9	-50	-10	-40
	D-Ribose 5-phosphate	229.0	97.0	7.1	6.4	7.9	-20	-15	-40
	D-Ribose 5-phosphate	229.0	139.0	7.1	6.4	7.9	-20	-10	-20
	pyruvic acid	87.0	87.0	5.6	4.8	6.4	-10	-15	-20
	pyruvic acid	87.0	58.8	5.6	4.9	6.4	-8	-15	-10
	pyruvic acid	87.0	43.1	5.6	4.9	6.4	-13	-15	-10
	SMV00035_Nicotinic acid 2	122.0	78.0	7.3	6.5	8.0	-30	-15	-30
	SMV00182_Adenine 1	134.1	107.0	5.8	5.0	6.5	-30	-15	-30
	SMV00164_Taurine 1	124.0	80.0	0.9	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00259_Guanosine 1	282.1	150.0	5.9	5.2	6.7	-30	-15	-30
	SMV00176_Adenosine 1	266.1	134.1	6.8	6.0	7.5	-30	-15	-30
	SMV00126_L-Arginine 1	173.1	131.1	0.7	0.0	1.5	-30	-15	-30
	SMV00253_Orotic acid 1	155.0	111.0	6.1	5.3	6.8	-30	-15	-30
Quantification relative	SMV00168_Pyridoxine 1	168.1	150.1	5.5	4.7	6.2	-30	-15	-30
	SMV00067_D-Fructose 1	179.1	59.0	1.0	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00434_5'-Methylthioadenosine 1	296.1	134.1	8.6	7.8	9.3	-30	-15	-30
	SMV00397_Phenylacetylglycine 1	192.1	74.0	9.0	8.2	9.7	-30	-15	-30
	SMV00223_Glutathione 1	306.1	143.1	6.1	5.3	6.8	-30	-15	-30
	SMV00282_Hippuric acid 3	178.1	77.0	8.6	7.9	9.4	-30	-15	-30
	SMV00207_L-Phenylalanine 2	164.1	103.1	5.9	5.2	6.7	-30	-15	-30
	SMV00214_Ribitol 1	151.1	71.0	1.0	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00165_4-Hydroxybenzoic acid 2	137.0	93.0	6.9	6.1	7.6	-30	-15	-30
	SMV00347_(R)-lipoic acid 2	205.0	65.0	10.6	9.9	11.4	-30	-15	-30
	SMV00153_L-Glutamine 2	145.1	109.0	0.9	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00092_N-Acetyl-L-phenylalanine 1	206.1	164.1	9.2	8.4	10.0	-30	-15	-30
	SMV00278_Ureidosuccinic acid 1	175.0	132.0	7.2	6.4	7.9	-30	-15	-30
	SMV00419_Itaconic acid 2	129.0	85.0	7.6	6.9	8.4	-30	-15	-30
	SMV00437_Allantoic acid 1	175.1	89.0	2.7	2.0	3.5	-30	-15	-30
	SMV00292_Glycyl-L-leucine 2	187.1	143.1	5.4	4.6	6.1	-30	-15	-30
	SMV00530_N-Acetylglutamic acid 1	188.1	128.0	7.4	6.7	8.2	-30	-15	-30
	SMV00160_Creatine 1	130.1	88.0	1.1	0.3	1.8	-30	-15	-30
	SMV00243_L-Threonine 2	118.1	74.0	1.0	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00539_N-Formyl-L-methionine 2	176.0	98.0	7.6	6.9	8.4	-30	-15	-30
	SMV00274_trans-Cinnamic acid 1	147.1	103.1	9.8	9.0	10.5	-30	-15	-30
	SMV00610_N-Acetyl-L-methionine 3	190.1	84.1	8.0	7.2	8.7	-30	-15	-30
	SMV00199_Uridine 1	243.1	110.0	4.0	3.2	4.7	-30	-15	-30
	SMV00236_Sorbitol 2	181.1	71.0	0.9	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00532_L-Dihydroorotic acid 1	157.0	113.0	4.9	4.2	5.7	-30	-15	-30
	SMV00204_Allantoin 2	157.0	114.0	1.1	0.3	1.8	-30	-15	-30
	SMV00074_Deoxyinosine 1	251.1	135.0	5.9	5.2	6.7	-30	-15	-30
	SMV00525_dCMP 1	306.1	79.0	7.7	6.9	8.4	-30	-15	-30
	SMV00084_N-Acetylneuraminic acid 1	308.1	87.0	3.8	3.0	4.5	-30	-15	-30
	SMV00225_Riboflavin 1	375.1	255.1	8.8	8.0	9.5	-30	-15	-30
	SMV00021_L-Cystathionine 2	221.1	134.0	1.0	0.0	1.7	-30	-15	-30
	SMV00432_5-Thymidylic acid 1	321.1	79.0	8.1	7.3	8.8	-30	-15	-30
	SMV00250_Cytidine monophosphate 1	322.0	79.0	7.4	6.6	8.1	-30	-15	-30
	SMV00221_L-Asparagine 3	131.1	70.0	0.9	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00294_Nonadecanoic acid	297.3	297.3	13.8	13.0	14.6	-30	-15	-30
	SMV00503_Uridine 5'-monophosphate 1	323.0	79.0	7.5	6.8	8.3	-30	-15	-30
	SMV00334_Fructose 6-phosphate 3	259.0	139.0	6.8	6.1	7.6	-30	-15	-30
	SMV00047_Guanosine monophosphate 1	362.1	79.0	7.8	7.0	8.5	-30	-15	-30
	SMV00226_Alpha-Lactose 3	341.1	101.0	1.0	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00078_Hypotaurine 1	108.0	64.0	0.9	0.2	1.7	-30	-15	-30
	SMV00251_N-Acetyl-L-alanine 2	130.1	88.0	6.1	5.3	6.8	-30	-15	-30
	SMV00522_Vaccenic acid	281.3	281.3	15.8	15.1	16.6	-30	-15	-30
	SMV00613_Oxoadipic acid 3	159.0	87.1	7.6	6.8	8.3	-30	-15	-30
	SMV00276_Myristic acid	227.2	227.2	14.4	13.7	15.2	-30	-15	-30
	SMV00351_2-Hydroxybutyric acid 2	103.0	57.0	6.0	5.3	6.8	-30	-15	-30
	SMV00254_Oxoglutaric acid 1	145.0	101.0	7.6	6.8	8.3	-30	-15	-30
	SMV00239_Capric acid	171.1	171.1	12.6	11.9	13.4	-30	-15	-30
	SMV00328_Hydroxyphenyllactic acid 2	181.1	135.1	7.6	6.9	8.4	-30	-15	-30
	SMV00162_Caprylic acid	143.1	143.1	11.4	10.7	12.2	-30	-15	-30
	SMV00272_Stearic acid	283.3	283.3	16.9	16.1	17.6	-30	-15	-30
	SMV00091_Pentadecanoic acid	241.2	241.2	14.9	14.1	15.6	-30	-15	-30
	SMV00569_Heptadecanoic acid	269.3	269.3	16.1	15.3	16.8	-30	-15	-30
	SMV00179_Myoinositol 2	179.1	87.0	0.9	0.1	1.6	-30	-15	-30
	SMV00384_Uridine diphosphate glucose 1	565.1	323.0	7.5	6.8	8.3	-30	-15	-30
Standards internes	Succinic acid d4	121.3	77.1	7.5	6.7	8.2	-15	-15	-20
	GABA d6	108.2	90.2	1.0	0.2	1.7	-16	-15	-20
	GABA d6	108.2	62.3	1.0	0.2	1.7	-10	-15	-20
	GABA d6	108.2	108.2	1.0	0.2	1.7	-10	-15	-20
	Adenosine 13C5 1	271.2	134.0	6.8	6.0	7.5	-29	-15	-34
	Adenosine 13C5 2	271.2	107.3	6.8	6.0	7.5	-51	-15	-34
	Adenosine 13C5 3	271.2	92.1	6.8	6.0	7.5	-57	-15	-34
	Glutamic acid 13C 1	151.0	107.2	2.4	1.6	3.1	-20	-15	-35
	Glutamic acid 13C 2	151.0	151.0	2.4	1.6	3.1	-7	-15	-35

Tableau 29: Chapitre 3 partie 3, optimisation des paramètres MS

Nom	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Tr attendu [min]	CE	CXP	DP
L-Alanine	88.0	88.0	1.5	-10	-15	-40
L-Arginine 1	173.1	131.1	1.1	-20	-10	-80
L-Arginine 2	173.1	173.1	1.1	-10	-10	-80
L-Arginine 3	173.1	156.1	1.1	-20	-10	-80
L-Asparagine 1	131.1	113.0	1.5	-10	-10	-60
L-Asparagine 2	131.1	114.0	1.5	-20	-10	-40
L-Asparagine 3	131.1	70.0	1.5	-20	-10	-40
L-Aspartic acid 1	132.0	88.1	4.7	-20	-15	-40
L-Aspartic acid 2	132.0	114.9	4.7	-20	-10	-40
L-Aspartic acid 3	132.0	71.1	4.7	-20	-10	-40
L-Cysteine	120.0	120.0	1.8	-10	-10	-100
L-Glutamic acid 1	146.1	146.1	4.7	-10	-10	-40
L-Glutamic acid 2	146.1	128.0	4.7	-20	-10	-40
L-Glutamic acid 3	146.1	102.1	4.7	-20	-10	-40
L-Glutamine 1	145.1	127.1	1.6	-20	-10	-60
L-Glutamine 2	145.1	109.0	1.6	-20	-10	-60
L-Glutamine 3	145.1	128.0	1.6	-20	-10	-60
L-Glycine	74.0	74.0	1.5	-10	-10	-60
L-Leucine	130.1	130.1	4.7	-10	-10	-40
L-Lysine	145.1	145.1	9.4	-10	-10	-60
L-Methionine 1	148.0	148.0	3.5	-10	-10	-80
L-Methionine 2	148.0	100.0	3.5	-10	-15	-60
L-Phenylalanine 1	164.1	147.1	8.4	-20	-10	-60
L-Phenylalanine 2	164.1	103.1	8.4	-20	-15	-40
L-Phenylalanine 3	164.1	72.0	8.4	-20	-10	-40
L-Proline	114.1	114.1	1.8	-10	-10	-40
L-Serine 1	104.0	104.0	1.5	-10	-10	-60
L-Serine 2	104.0	74.0	1.5	-20	-10	-60
L-Serine 3	104.0	72.0	1.5	-10	-10	-10
L-Threonine 1	118.1	118.1	1.6	-10	-15	-60
L-Threonine 2	118.1	74.0	1.6	-20	-10	-40
L-Threonine 3	118.1	72.0	1.6	-10	-10	-20
L-Tryptophan 1	203.1	116.1	9.2	-20	-10	-60
L-Tryptophan 2	203.1	142.1	9.2	-20	-15	-40
L-Tryptophan 3	203.1	159.1	9.2	-20	-10	-60
L-Tyrosine 1	180.1	163.0	5.9	-20	-10	-60
L-Tyrosine 2	180.1	119.1	5.9	-20	-10	-60
L-Tyrosine 3	180.1	93.0	5.9	-20	-15	-60
L-Valine	116.1	116.1	2.3	-10	-10	-40
Glucose 6-phosphate 1	259.0	79.0	9.1	-60	-10	-40
Glucose 6-phosphate 2	259.0	97.0	9.1	-20	-15	-40
Glucose 6-phosphate 3	259.0	199.0	9.1	-20	-10	-20
Fumaric acid 1	115.0	115.0	9.3	-10	-10	-40
Fumaric acid 2	115.0	71.0	9.3	-10	-10	-20
Gamma-Aminobutyric acid 1	102.1	102.1	1.5	-10	-10	-40
Gamma-Aminobutyric acid 2	102.1	84.1	1.5	-10	-15	-40
Succinic acid 1	117.0	73.0	9.3	-20	-10	-20
Succinic acid 2	117.0	99.0	9.3	-20	-15	-40

Tableau 30: (suite) Chapitre 3 partie 3, optimisation des paramètres MS

Nom	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Tr attendu [min]	CE	CXP	DP
D-Glucose 1	179.1	59.0	1.5	-30	-10	-40
D-Glucose 2	179.1	89.0	1.5	-10	-15	-40
D-Glucose 3	179.1	71.0	1.5	-20	-10	-40
Fructose 6-phosphate 1	259.0	79.0	9.1	-60	-10	-40
Fructose 6-phosphate 2	259.0	97.0	9.1	-20	-15	-40
Fructose 6-phosphate 3	259.0	169.0	9.1	-20	-10	-20
D-Ribose 5-phosphate 1	229.0	79.0	9.2	-50	-10	-40
D-Ribose 5-phosphate 2	229.0	97.0	9.2	-20	-15	-40
D-Ribose 5-phosphate 3	229.0	139.0	9.2	-20	-10	-20
pyruvic acid 1	90.0	61.1	4.6	-10	-10	-10
pyruvic acid 2	90.0	68.8	4.6	-10	-10	-20
pyruvic acid 3	90.0	72.1	4.6	-20	-10	-80
Nicotinic acid 1	122.0	122.0	9.0	-6	-7	-45
Nicotinic acid 2	122.0	78.0	9.0	-6	-7	-45
Adenine 1	134.1	134.1	7.2	-10	-7	-90
Adenine 2	134.1	107.0	7.2	-10	-7	-95
Adenine 3	134.1	92.0	7.2	-10	-7	-90
Adenine 4	134.1	65.0	7.2	-10	-7	-80
Orotic acid 1	155.0	111.0	7.9	-16	-5	-45
Orotic acid 2	155.0	155.0	7.9	-16	-5	-50
Adenosine 1	266.1	266.1	8.1	-18	-7	-50
Adenosine 2	266.1	134.1	8.1	-18	-7	-50
Adenosine 3	266.1	107.0	8.1	-18	-7	-70
Adenosine 4	266.1	92.0	8.1	-18	-7	-75
Taurine 1	124.0	80.0	1.5	-28	-1	-30
Taurine 2	124.0	124.0	1.5	-28	-1	-35
Guanosine 1	282.1	150.0	7.2	-28	-9	-50
Guanosine 2	282.1	282.1	7.2	-28	-9	-50
Guanosine 3	282.1	133.0	7.2	-28	-9	-50
Guanosine 4	282.1	108.0	7.2	-28	-9	-50
ADP 1	426.0	79.0	11.2	-80	-10	-100
ADP 2	426.0	134.1	11.2	-30	-10	-80
ADP 3	426.0	158.9	11.2	-40	-10	-80
ATP 1	506.0	158.9	11.4	-60	-10	-100
ATP 2	506.0	408.0	11.4	-30	-10	-100
ATP 3	506.0	79.0	11.4	-80	-10	-100
CTP 1	482.0	158.9	11.4	-50	-15	-60
CTP 2	482.0	384.0	11.4	-30	-10	-80
CTP 3	482.0	79.0	11.4	-80	-10	-80
dATP 1	490.1	158.8	11.4	-42	-9	-95
dATP 2	490.1	392.1	11.4	-42	-9	-100
dATP 3	490.1	78.6	11.4	-42	-9	-95
dCTP 1	466.3	158.8	11.4	-36	-9	-100
dCTP 2	466.3	368.0	11.4	-36	-9	-90
dCTP 3	466.3	386.2	11.4	-36	-9	-95
dCTP 4	466.3	238.8	11.4	-36	-9	-90
GTP 1	522.4	522.4	11.3	-6	-19	-75
GTP 2	522.4	158.7	11.3	-46	-9	-85
GTP 3	522.4	176.9	11.3	-32	-9	-80

Tableau 31: (Suite) Chapitre 3 partie 3, optimisation des paramètres MS

Nom	Q1 [Da]	Q3 [Da]	Tr attendu [min]	CE	CXP	DP
NADH 1	665.1	665.4	9.9	-16	-10	-110
NADH 2	665.1	158.8	9.9	-75	-10	-110
NADH 3	665.1	78.7	9.9	-95	-10	-110
NADH 4	665.1	408.1	9.9	-45	-10	-125
NADPH 1	372.6	78.8	9.0	-85	-14	-67
NADPH 2	372.6	133.9	9.0	-30	-14	-66
NADPH 3	372.6	211.0	9.0	-29	-14	-66
GSH 1	306.1	143.1	8.0	-30	-20	-40
GSH 2	306.1	128.0	8.0	-30	-10	-40
GSH 3	306.1	272.1	8.0	-20	-10	-40
GSSG 1	612.0	254.0	9.2	-46	-1	-90
GSSG 2	612.0	306.0	9.2	-46	-1	-120
GSSG 3	612.0	483.3	9.2	-46	-1	-100
GSSG 4	612.0	179.0	9.2	-46	-1	-100
FAD 1	784.2	437.1	11.0	-40	-15	-100
FAD 2	784.2	346.1	11.0	-40	-10	-60
FAD 3	784.2	181.0	11.0	-50	-15	-100
FMN 1	455.8	213.0	11.3	-46	-27	-90
FMN 2	455.8	78.8	11.3	-46	-27	-80
FMN 3	455.8	96.8	11.3	-46	-27	-100
Oxoglutaric acid 1	145.0	101.0	9.4	-10	-15	-20
Oxoglutaric acid 2	145.0	57.0	9.4	-20	-10	-20
Oxoglutaric acid 3	145.0	73.0	9.4	-20	-10	-20
Biotin 1	243.1	200.1	9.8	-20	-10	-60
Biotin 2	243.1	166.1	9.8	-20	-10	-60
Biotin 3	243.1	122.1	9.8	-30	-10	-60
CoA 1	766.7	408.1	11.5	-48	-11	-130
CoA 2	766.7	419.1	11.5	-48	-11	-135
CoA 3	766.7	339.1	11.5	-48	-11	-135
PABA 1	136.1	91.8	8.1	-16	-15	-55
PABA 2	136.1	136.1	8.1	-8	-7	-60
Orthophosphate 1	97.1	96.8	8.9	-6	-5	-60
Orthophosphate 2	97.1	78.8	8.9	-6	-5	-55
Orthophosphate 3	97.1	62.7	8.9	-6	-5	-60
Malic acid 1	132.9	132.9	9.3	-6	-7	-55
Malic acid 2	132.9	115.0	9.3	-16	-5	-50
Malic acid 3	132.9	71.0	9.3	-22	-1	-45
Malic acid 4	132.9	73.0	9.3	-26	-1	-45
Mannitol 1	181.1	181.1	1.5	-8	-9	-55
Mannitol 2	181.1	59.0	1.5	-34	-7	-75
Mannitol 3	181.1	71.0	1.5	-30	-1	-75
Mannitol 4	181.1	89.0	1.5	-20	-3	-75
Adenosine 13C5 1	271.2	134.0	8.2	-29	-15	-34
Adenosine 13C5 2	271.2	107.3	8.2	-51	-15	-34
Adenosine 13C5 3	271.2	92.1	8.2	-57	-15	-34
Succinic acid D4	121.3	77.1	9.3	-15	-15	-20
GABA D6 1	108.2	90.2	1.5	-16	-15	-20
GABA D6 3	108.2	108.2	1.5	-10	-15	-20
Cholic acid D4 1	411.9	411.9	14.8	-18	-13	-150
Cholic acid D4 2	411.9	348.3	14.8	-115	-10	-48
GLU D5 1	151.0	151.0	4.5	-8	-9	-50
GLU D5 2	151.0	132.9	4.5	-8	-9	-50

Chapitre 4

Stratégies d'utilisation des fenêtres variables SWATH pour l'amélioration de l'analyse des données métabolomiques

Table des matières - Chapitre 4

1. Introduction générale du chapitre 4 293
1.1. Les processus des études métabolomiques 293
1.2. Utilisation de la haute résolution en métabolomique 295
1.3. Introduction du SWATH 295
1.4. Acquisition dépendante ou indépendante des données : DDA versus DIA 295
1.5. Avantages et inconvénients du SWATH 298
1.6. Fenêtres fixes versus fenêtres variables 299
1.7. swathTUNER 299
2. Etude menée dans ce chapitre 301
3. Références de l'introduction du chapitre 4 303
4. Partie 1: Stratégies analytiques de création des fenêtres SWATH pour l'identification des métabolites polaires 305
4.1. Introduction 305
4.2. Matériel et méthodes 306
Paramètres de spectrométrie de masse 306
Conditions chromatographiques 310
Préparation d'échantillons des globules rouges 311
Paramètres utilisés pour les logiciels MarkerView et MasterView 312
4.3. Résultats et discussion 312
Analyses statistiques préliminaires 312
Identification générale des métabolites selon la méthode SWATH utilisée 315
Identification de 6 métabolites ciblés appartenant au cycle de l'acide citrique 317
Faux-Positifs dans l'identification par le logiciel MasterView 319
Identification spécifique de 64 métabolites selon la méthode SWATH utilisée 322
Scores d'identification librairie des 64 métabolites selon la méthode d'acquisitionSWATH utilisée 326
5. Conclusions et perspectives du chapitre 4 339
6. Références du chapitre 4 341
7. Annexes 343

1. Introduction générale du chapitre 4

1.1. Les processus des études métabolomiques

Le but final d'une étude métabolomique est la découverte d'un ou de plusieurs marqueurs ou biomarqueurs propres à expliquer les modifications observées au niveau du phénotype. La figure suivante représente les interactions entre les différents composés qui donnent lieu à des réponses du réseau métabolique.

La complexité se manifeste sur plusieurs niveaux de rétroactions régulatrices (flèches noires) entre les composants qui régulent le flux primaire d'informations génétiques (flèches rouges) [1]. L'infection virale modifie le flux métabolique à travers certaines parties du réseau.

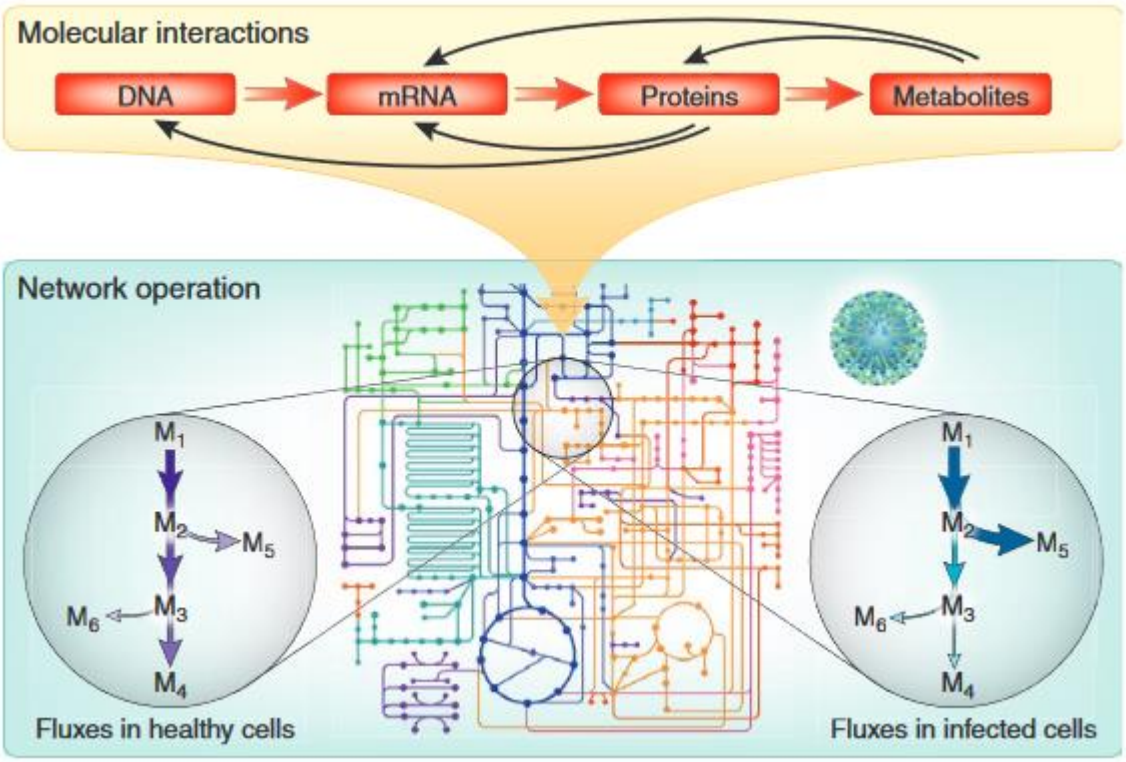


Figure 155: Interactions moléculaires et implications au niveau des flux des métabolites. Tiré de [1]

Le processus analytique contient typiquement une étape pré-analytique, analytique et post-analytique, comme décrit dans la figure suivante. Ce processus est utilisé par la plateforme de métabolomique de l'université de Lausanne. Au niveau de l'acquisition des données, l'approche non-ciblée pour obtenir une information globale et extensive d'informations est souvent effectuée de prime abord, puis suivie d'une étape ciblée.

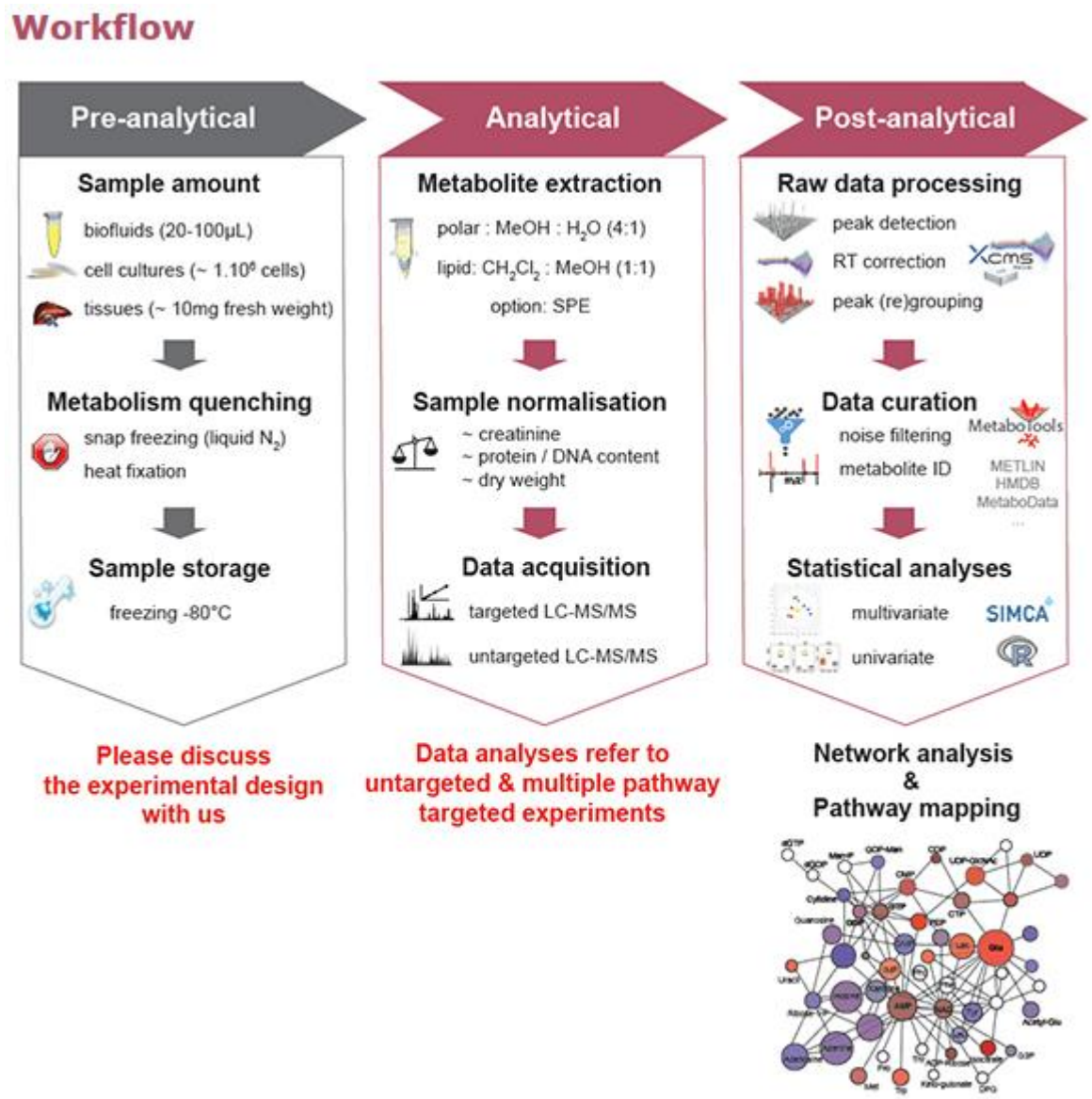


Figure 156: Processus analytique en métabolomique tiré de [2]

La quantification relative ou absolue par méthode dite ciblée se fait généralement sur un nombre restreint et prédéfini de métabolites. Il est préférable de connaître l'identité des métabolites d'intérêts avant d'entamer une procédure de quantification qui nécessite des ressources importantes. C'est pourquoi la haute résolution est largement utilisée dans les études non-ciblées qui précèdent les études ciblées.

1.2. Utilisation de la haute résolution en métabolomique

Le point critique de toute étude métabolomique est la caractérisation et l'identification des molécules mises en évidence. L'utilisation de la haute résolution représente un avantage certain dans ce processus d'identification, en permettant une recherche basée sur la formule chimique et l'utilisation des abondances isotopiques. Ceci est possible si l'erreur de masse est en dessous de 10 ppm. Plus la résolution est grande, plus le nombre de formules chimiques proposées sera réduit. Cependant, la formule chimique seule ne permet pas l'identification formelle d'un métabolite. En effet, les isomères possèdent tous les mêmes formules chimiques. C'est pourquoi une étape de fragmentation apportée par le couplage de deux entités, additionnées d'une cellule de collision, amène une dimension supplémentaire pour l'identification du fait de la présence de fragments de la molécule parente.

Les instruments de haute résolution sont le temps de vol (TOF), le ICR-FT-MS et l'orbitrap. Plus de détails sur ces analyseurs de masse sont présentés dans le chapitre 1.

1.3. Introduction du SWATH

Le SWATH est utilisé depuis quelques années en protéomique [3-7] et, plus récemment, pour la détermination de biomarqueurs [8, 9]. Le premier à avoir utilisé la notion de fenêtres sur un spectromètre de masse à trappe ionique linéaire est Venable *et al.* en 2004, qui a créé 20 fenêtres de 10 *m/z* sur une gamme allant de 900 à 1100 *m/z* [10]. Cette technologie récente est aussi utilisée pour l'identification et le screening de plus petites molécules telles que les canabinoïdes [11], ou pour des analyses toxicologiques [12]. Une étude de cette approche de la détermination qualitative et quantitative de métabolites liés à l'acétaminophen [13] est publiée en 2012. Il existe une analyse métabolomique plus récente (2016) concernant de l'urine [14]. Cette approche est définie comme étant indépendante de l'échantillon analysé (DIA). Elle est donc particulièrement adaptée à l'étude du métabolisme et de la métabolomique [15].

1.4. Acquisition dépendante ou indépendante des données : DDA versus DIA

Le DDA, ou acquisition dépendante des données, est réalisé grâce à l'acquisition d'un premier scan TOF-MS, qui est plus communément nommé le « survey scan », suivi par une série de productions d'ions en rapport avec les ions les plus intenses du survey scan,

ou déterminés par une liste d'inclusion (dependant scan). Le nombre d'ions fragmentés est déterminé en amont. Il existe aussi la possibilité de créer une liste d'exclusion afin d'éviter que des ions contaminants soient fragmentés au détriment d'ions d'intérêt. Ce système dynamique permet la fragmentation de divers ions au cours de la séquence chromatographique. Chaque ion est fragmenté séparément, et l'information de l'ion précurseur est préservée. Le terme IDA, ou acquisition information-dépendante, fait partie de l'acquisition dépendante des données. A l'opposé, il y a l'acquisition indépendante des données, qui comprend le SWATH et le MS^{All}. Le MS^{All}, comme son nom l'indique, va fragmenter tous les ions qui se présentent depuis le premier quadrupôle. Un spectre composite comprenant les fragments de tous les ions sera alors obtenu. Le SWATH, quant à lui, est un compromis entre le MS^{All} et l'IDA. En effet, seul un certain nombre d'ions sont fragmentés, selon la taille de la fenêtre et la gamme de masse déterminée. Cette approche permet de diminuer la complexité du spectre obtenu par rapport au MS^{All}, mais l'information de l'ion précurseur est malgré tout aussi perdue. Le spectre TOF-MS peut donner une probabilité d'ion précurseur selon la gamme de masse utilisée dans le fenêtre SWATH correspondante. Ces différents types d'expériences sont illustrés dans la figure suivante, tirée de la publication de Zhu *et al* [16]

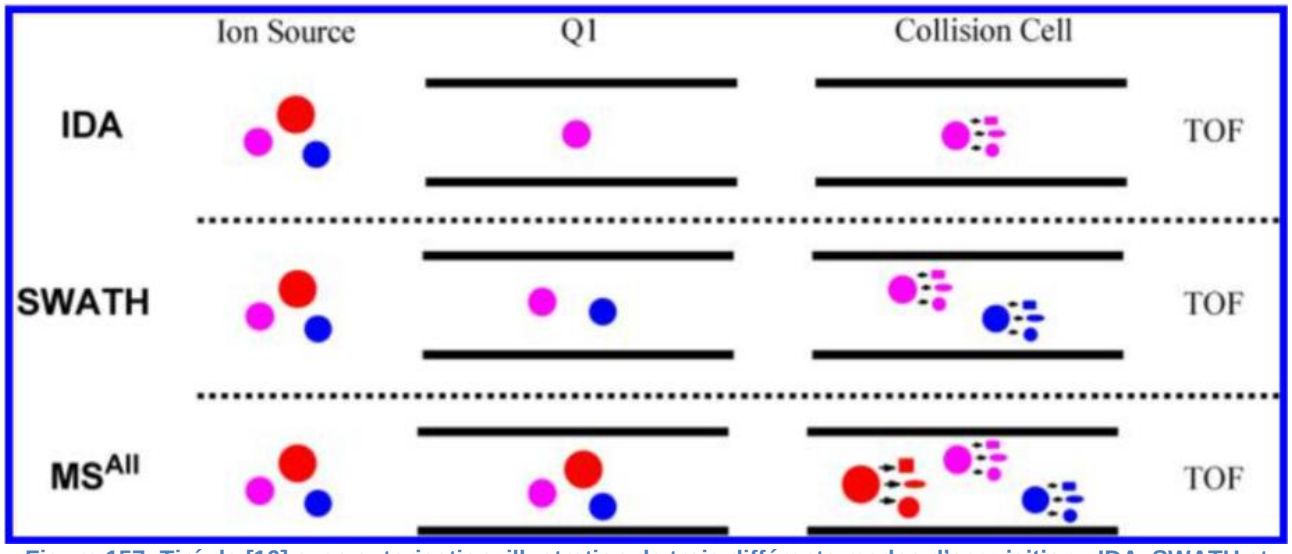


Figure 157: Tiré de [16] avec autorisation, illustration de trois différents modes d'acquisition : IDA, SWATH et MS^{All}

Une comparaison a été effectuée sur des composés identifiés à partir d'un mélange par Arnhard et al [12] à l'aide du logiciel MasterView 1.0 et MicroApp 1.0, tous les deux propriétés de ASciex. Cette étude montre la supériorité du SWATH pour l'identification de composés selon la concentration. Lorsque celle-ci diminue, le SWATH garde un avantage sur le DDA. L'expérience en DDA comprenait une première expérience MS, suivie de trois

expériences dépendantes MS/MS. La limite d'intensité pour les expériences MS/MS était fixée à 50 counts.

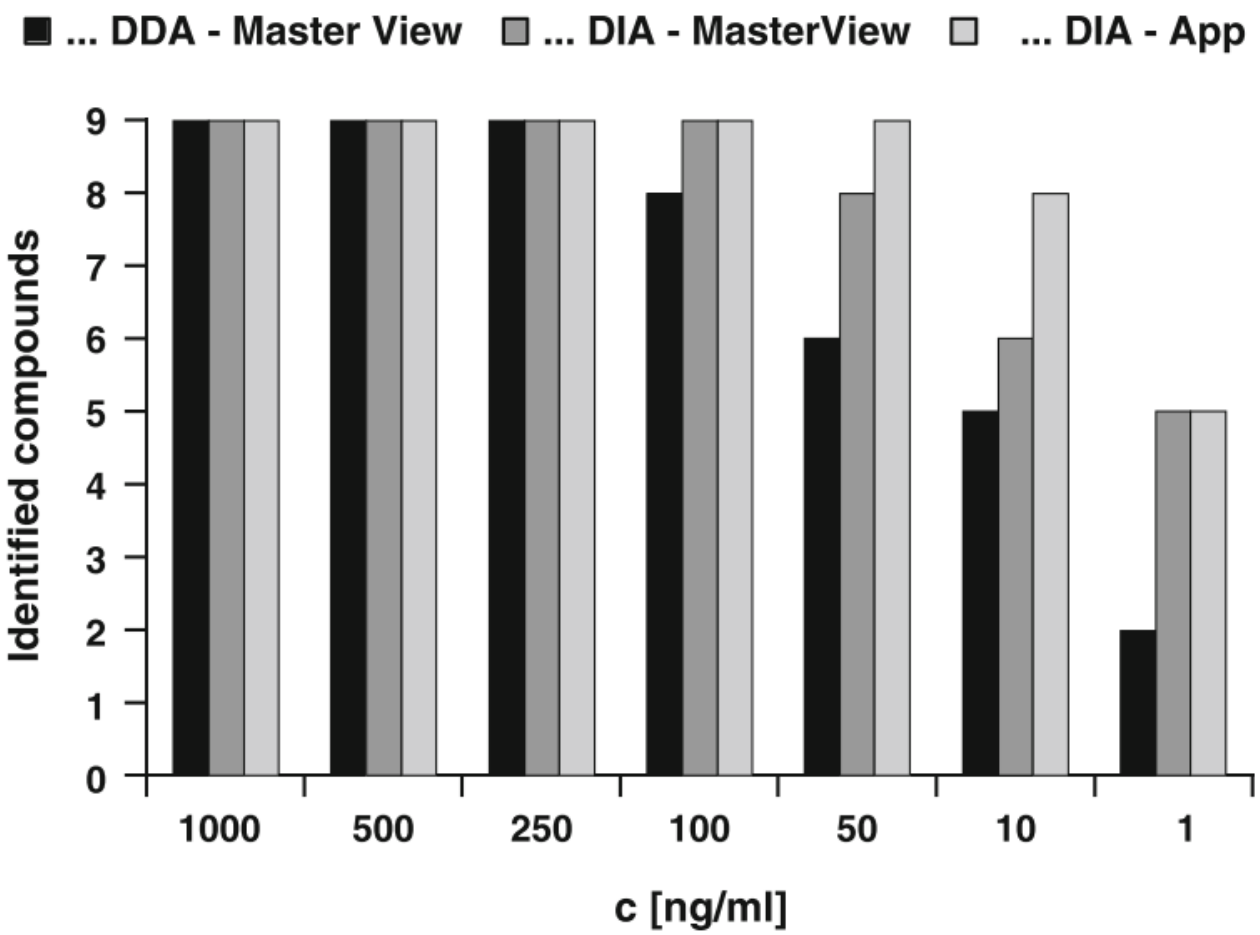


Figure 158: Tiré de [12] avec autorisation, Composés identifiés dans un mélange de substances analysées en LCMS/MS par acquisition de données dépendantes (DDA) ou de données indépendantes (DIA)

Une autre étude similaire a été menée par Roemmelt *et al* [17], cette fois sur un nombre croissant d'analytes qui co-éluent, et avec des acquisitions DDA, comprenant 10 et 20 expériences. Un exemple graphique tiré de cette étude se trouve à la figure suivante (figure 159). Elle montre à son tour un nombre plus important de composés identifiés à l'aide de la méthode SWATH, ceci quel que soit le nombre d'analytes et d'expériences sélectionnés pour le DDA.

L'électrospray n'est pas quantitatif, contrairement à la RMN, et les ions les plus intenses ne sont pas forcément les ions présents dans la plus forte concentration. Le DDA pose donc des problèmes de sélectivité. Une autre difficulté peut, par exemple, concerner la sélection d'adduits pour la fragmentation (dependant scan) qui rend une indentification plus problématique [18] malgré la connaissance de l'ion précurseur.

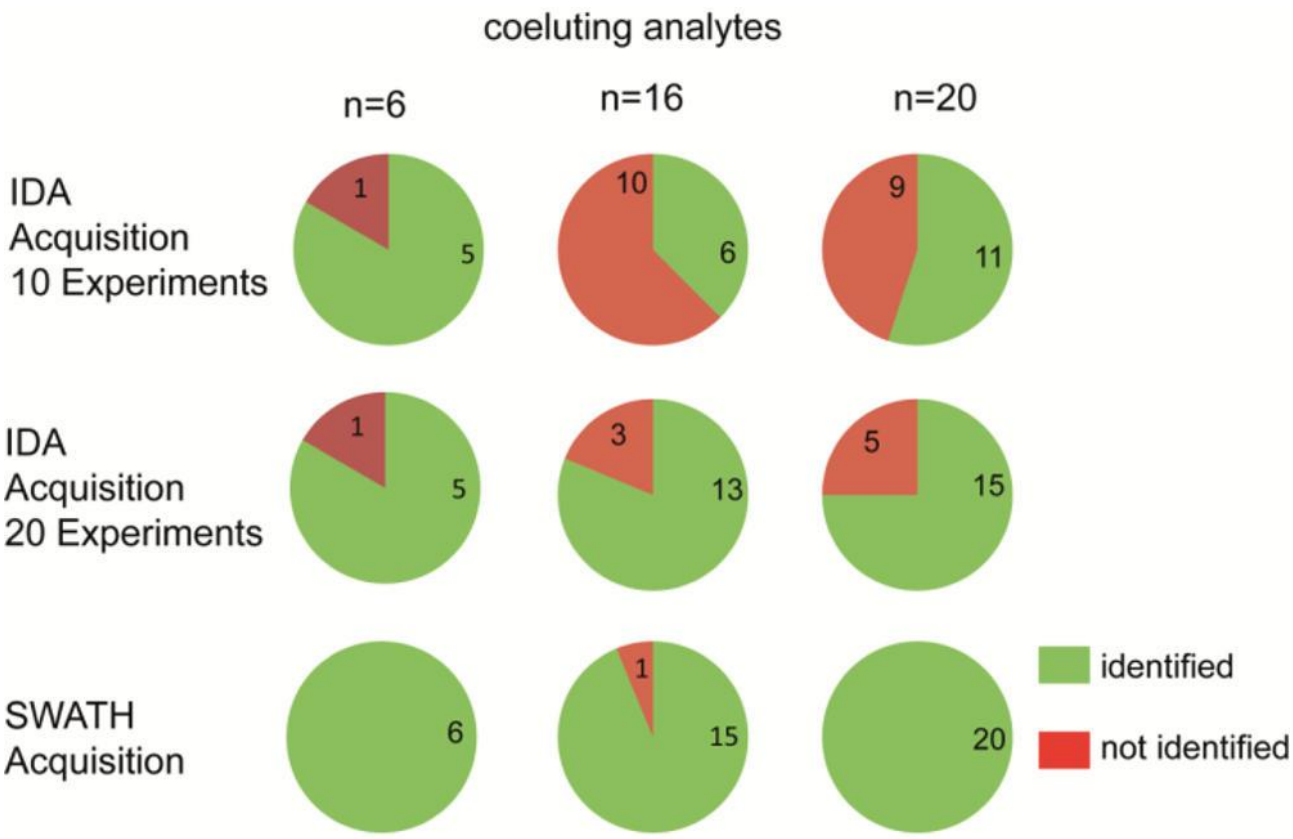


Figure 159: Résultats des expériences de co-élution avec un nombre croissant d'analytes qui co-éluent, et les résultats d'identification selon la méthode d'acquisition. Tiré de [17] avec autorisation

1.5. Avantages et inconvénients du SWATH

Le SWATH permet d'obtenir toute l'information possible provenant d'un échantillon. Une ré-interrogation post-acquisition est toujours possible [15]. Ceci est particulièrement utile pour les analyses forensiques, ou dans le domaine du dopage. Les échantillons n'ont pas besoin d'être ré-analysés, mais les données peuvent à nouveau être traitées selon une problématique ciblée. Ceci est valable, par exemple, pour un composé inconnu lors de l'analyse LC-MS, et qui serait découvert des années plus tard. L'identification des métabolites, bien que rendue plus complexe par la présence de spectres MS/MS composites, est tout à fait appropriée.

Les données SWATH tendent vers une analyse à la fois qualitative et quantitative des métabolites. Les analyses qualitatives ne nécessitent pas de développement de méthode, comme c'est le cas avec les analyses en mode SRM, pratiquées de façon courante actuellement. Il a été démontré que ces analyses sont précises et reproductibles [19, 20]. Les adduits sont eux aussi présents et offrent une identification des métabolites plus formelle et précise.

Comme cité précédemment, la complexité des spectres MS/MS obtenus peut engendrer des résultats erronés (faux-positifs) quant à l'identification des métabolites. Cependant, l'identification repose sur un nombre important de fragments et sur l'intensité de ceux-ci. L'apport de la haute résolution permet de plus de différencier des fragments ayant des rapports *m/z* proches.

La complexité des spectres MS/MS obtenus peut être grande et mener à des difficultés pour le traitement des données. Tous les logiciels ne supportent pas ce type de données. Un logiciel gratuit nommé MSDial [21] permet la déconvolution des spectres SWATH. Il existe en outre le Nested DIA, un type d'instrument développé avec un quadrupôle couplé à un orbitrap, qui conserve l'information du précurseur [22].

1.6. Fenêtres fixes versus fenêtres variables

Les méthodes SWATH actuelles utilisent principalement des fenêtres avec un domaine de masse fixe. Certaines publications combinent une approche dite « globale » avec une approche plus « ciblée » en ajoutant des fenêtres plus petites dans un second temps [13, 15]. L'utilisation de fenêtres variables améliore la sélectivité [14].

1.7. swathTUNER

swathTUNER est un logiciel développé « in house » pour une utilisation en protéomique et métabolomique. Ce logiciel permet d'optimiser la taille des fenêtres qui sont créées selon la complexité de l''échantillon. Les fenêtres sont de taille variable et diminuent la complexité des spectres MS/MS afin d'augmenter le nombre d'identification sur une même séquence.

2. Etude menée dans ce chapitre

Ce chapitre contient une seule partie. Cette partie traite du développement des fenêtres variables pour la création des méthodes SWATH. Pour cela, le même échantillon préparé à partir de globules rouges bovins est analysé de façon répétée, en utilisant des méthodes d'acquisition différentes.

3. Références de l'introduction du chapitre 4

1. Sauer, U. and N. Zamboni, *From biomarkers to integrated network responses.* Nat. Biotechnol., 2008. **26**(10): p. 1090-1092.
2. *Workflow métabolomique*. [cited 2017 june 2017]; Available from: http://www.unil.ch/metabolomics/home/menuinst/workflow.html.
3. Collins, B.C., et al., *Quantifying protein interaction dynamics by SWATH mass spectrometry: application to the 14-3-3 system.* Nat. Methods, 2013. **10**(12): p. 1246-1253.
4. Haverland, N.A., H.S. Fox, and P. Ciborowski, *Quantitative Proteomics by SWATH-MS Reveals Altered Expression of Nucleic Acid Binding and Regulatory Proteins in HIV-1-Infected Macrophages.* J. Proteome Res., 2014. **13**(4): p. 2109-2119.
5. Grobbler, C., et al., *Use of SWATH mass spectrometry for quantitative proteomic investigation of Shewanella oneidensis MR-1 biofilms grown on graphite cloth electrodes.* Syst. Appl. Microbiol., 2015. **38**(2): p. 135-139.
6. Sidoli, S., et al., *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra (SWATH) Analysis for Characterization and Quantification of Histone Post-translational Modifications.* Mol. Cell. Proteomics, 2015. **14**(9): p. 2420-2428.
7. Gillet, L.C., et al., *Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis.* Mol. Cell. Proteomics, 2012. **11**(6): p. O111.016717, 17 pp.
8. Sajic, T., Y. Liu, and R. Aebersold, *Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: Perspectives and clinical applications.* Proteomics: Clin. Appl., 2015. **9**(3-4): p. 307-321.
9. Caron, E., et al., *Precise Temporal Profiling of Signaling Complexes in Primary Cells Using SWATH Mass Spectrometry.* Cell Rep., 2017. **18**(13): p. 3219-3226.
10. Venable, J.D., et al., *Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra.* Nat. Methods, 2004. **1**(1): p. 39-45.
11. Scheidweiler, K.B., M.J.Y. Jarvis, and M.A. Huestis, *Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry.* Anal. Bioanal. Chem., 2015. **407**(3): p. 883-897.
12. Arnhard, K., et al., *Applying 'Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra' (SWATH) for systematic toxicological analysis with liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry.* Anal. Bioanal. Chem., 2015. **407**(2): p. 405-414.
13. Hopfgartner, G., D. Tonoli, and E. Varesio, *High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices.* Anal. Bioanal. Chem., 2012. **402**(8): p. 2587-2596.
14. Zhang, Y., et al., *The Use of Variable Q1 Isolation Windows Improves Selectivity in LC-SWATH-MS Acquisition.* J. Proteome Res., 2015. **14**(10): p. 4359-4371.
15. Bonner, R. and G. Hopfgartner, *SWATH acquisition mode for drug metabolism and metabolomics investigations.* Bioanalysis, 2016. **8**(16): p. 1735-1750.
16. Zhu, X., Y. Chen, and R. Subramanian, *Comparison of Information-Dependent Acquisition, SWATH, and MSAll Techniques in Metabolite Identification Study Employing Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2014. **86**(2): p. 1202-1209.
17. Roemmelt, A.T., et al., *Liquid Chromatography, in Combination with a Quadrupole Time-of-Flight Instrument (LC QTOF), with Sequential Window Acquisition of All*

Theoretical Fragment-Ion Spectra (SWATH) Acquisition: Systematic Studies on Its Use for Screenings in Clinical and Forensic Toxicology and Comparison with Information-Dependent Acquisition (IDA). Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2014. **86**(23): p. 11742-11749.

18. Li, H., et al., *MetDIA: Targeted Metabolite Extraction of Multiplexed MS/MS Spectra Generated by Data-Independent Acquisition.* Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 2016. **88**(17): p. 8757-8764.
19. Moein, M.M., A. El Beqqali, and M. Abdel-Rehim, *Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies.* J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2017. **1043**: p. 3-11.
20. Meyer, M.R. and H.H. Maurer, *Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today?* Anal. Chim. Acta, 2016. **927**: p. 13-20.
21. Tsugawa, H., et al., *MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis.* Nat. Methods, 2015. **12**(6): p. 523-526.
22. Kaufmann, A. and S. Walker, *Nested data independent MS/MS acquisition.* Anal. Bioanal. Chem., 2016. **408**(18): p. 5031-5040.

4. Partie 1: Stratégies analytiques de création des fenêtres SWATH pour l'identification des métabolites polaires

4.1. Introduction

La question s'est posée quant à la réalisation des fenêtres SWATH ainsi que de la largeur de leur gamme *m/z*. Une précédente étude, réalisée par Zhang *et al*.[1], pose déjà cette hypothèse (de taille de fenêtres) en travaillant sur la complexité des spectres SWATH, afin de maximiser les données obtenues, augmentant ainsi la sensibilité de la méthode. A partir de ce modèle, il a été envisagé de continuer l'étude des fenêtres variables avec une problématique axée sur la métabolomique et non la protéomique. En effet, la diversité d'espèces analysées est beaucoup moins vaste en métabolomique qu'en protéomique (voir figure suivante). La taille des fenêtres doit-elle être régie par une recherche globale avec des fenêtres fixes, ou plus spécifique à l'aide de fenêtres variables ? L'identification est-elle améliorée si les fenêtres variables sont construites à partir de la littérature ou d'une librairie ? Ou au contraire, la complexité de l'échantillon prime-t-elle pour la création de ces mêmes fenêtres ? Toutes ces questions ont orienté la façon de créer des méthodes d'acquisition SWATH variables. Cette partie de chapitre compare différentes méthodes, ainsi que les enjeux quant à l'identification par le logiciel MasterView, selon une base de données annotée et créée en interne avec des standards.

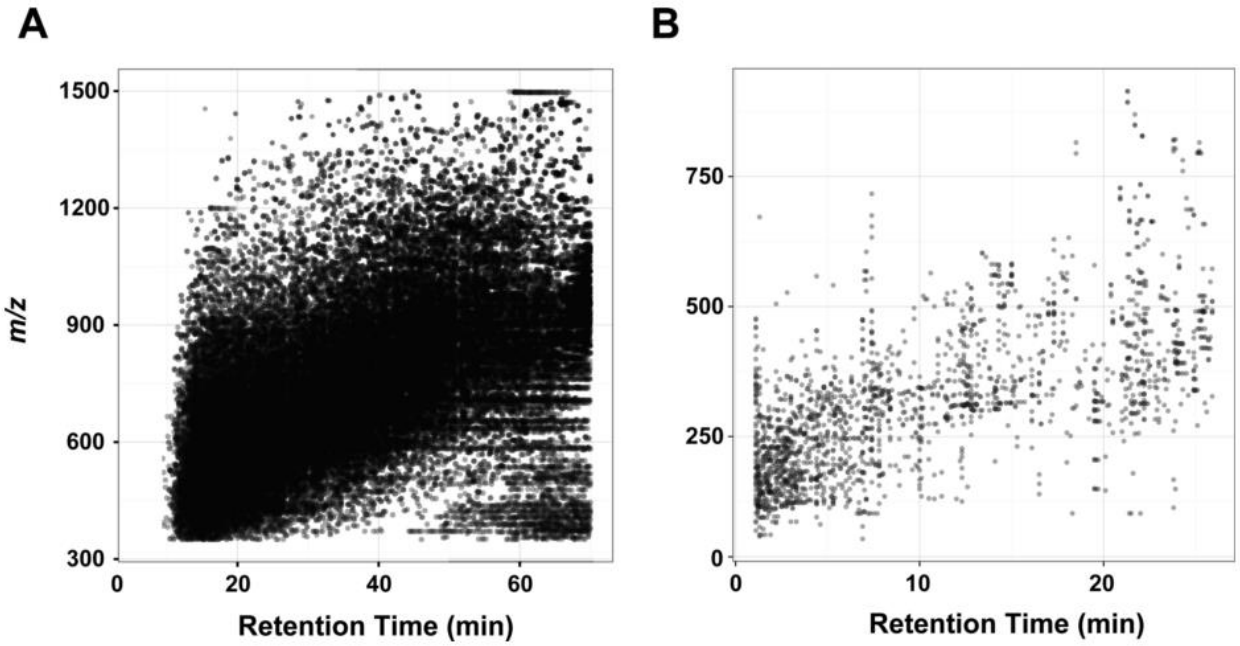


Figure 160: Variables détectées en LC−MS (A) cellules dendritiques dérivées de monocytes humains digérées par la trypsine et (B) échantillons d'urine mis en commun , mode d'ionisation positif, tiré de [1] avec autorisation

4.2. Matériel et méthodes

Paramètres de spectrométrie de masse

Un TTOF 5600 produit par ABSciex (Concord, CA) est opéré suivant deux types d'expériences. Tout d'abord, une analyse TOF-MS sur un rang de masse de *m/z* 80-800 est effectuée. La source est de type électrospray, et les paramètres sont : GS1 50psi, GS2 50 psi, curtain plate 25 psi. Les paramètres de source sont : 500°C 5200V et -4800V pour le mode négatif. Le spectromètre est calibré automatiquement tous les 3 échantillons en MS et MS/MS. Le spectromètre de masse est contrôlé via le logiciel Analyst 1.7 TF.
Les fenêtres SWATH ont été créées en fixant plusieurs paramètres. Les méthodes SWATH sont toutes composées d'une expérience TOF-MS avec une accumulation de 50 ms et de 24 expériences MS/MS avec une accumulation de 50 ms. Ceci donne un temps de cycle de 1.3 s, et amène un minimum de 10 spectres pour un pic chromatographique de plus de 13 secondes ou 0.22 minutes.

Les fenêtres SWATH ont d'abord été créées avec des fenêtres de taille fixe (30 *m/z*). Ceci représente l'usage courant actuel. La taille est volontairement élevée, car il a été décidé d'avoir un nombre fixe de fenêtres soit 24 pour garder un temps de cycle raisonnable en accord avec la chromatographie liquide. Cette méthode sera nommée par la suite SWATHgen (pour générique). Cette méthode est la seule qui ne soit pas basée sur des connaissances préalables. Concernant la création de fenêtres variables, celles-ci ont été créées à l'aide du logiciel SWATHtuner en utilisant un spectre TOF-MS tiré d'une analyse d'un échantillon (SWATHech), ou à partir de données déterminées dans la littérature (voir annexe) nommées SWATHlitt ou encore selon la librairie créée en interne, SWATHlib. Les deux dernières méthodes sont comparables et obéissent à une problématique ciblée en insérant des fenêtres unitaires, soit directement après les 19 fenêtres SWATH, (SWATHcibex) soit en les intégrant à la suite des *m/z* croissants (SWATHcibint). Dans les deux dernières méthodes, les 5 dernières expériences ont été supprimées, réduisant la gamme de *m/z* analysés. Ces cinq fenêtres unitaires correspondent à 5 composés impliqués dans le cycle de l'acide citrique. Ces molécules sont : l'acide malique, fumarique et succinique oxoglutarique, ainsi que l'acide citrique. La figure ci-dessous illustre les différentes méthodes énoncées précédemment.

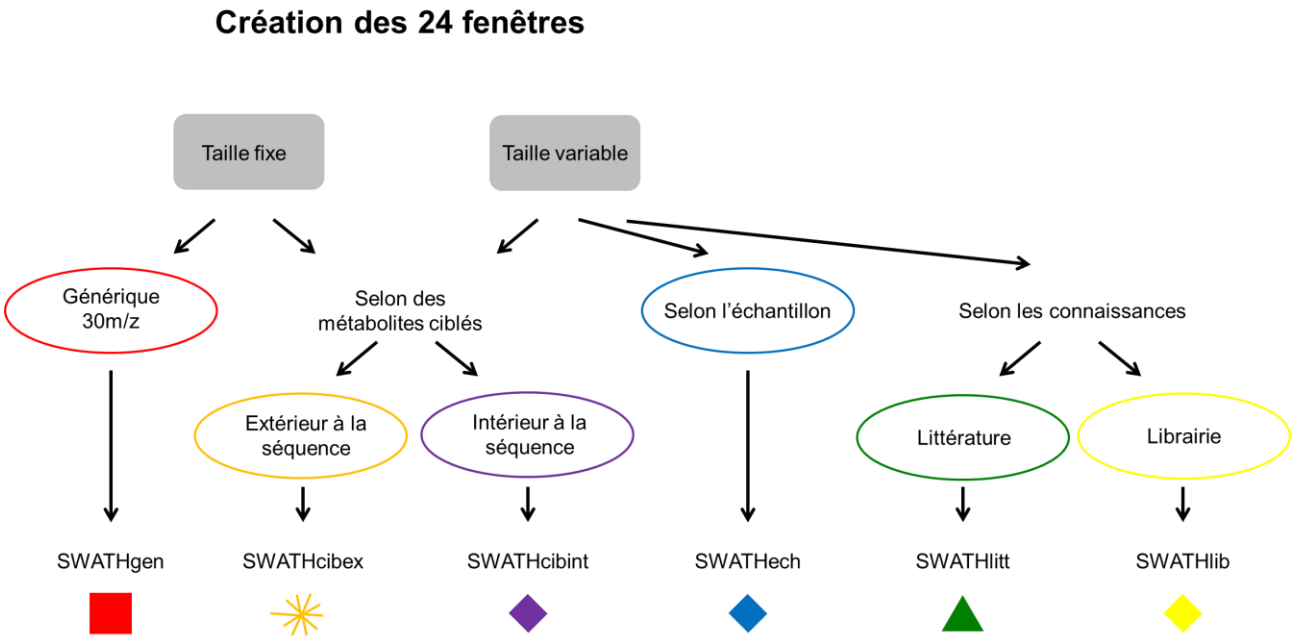


Figure 161 : procédure de création des 24 fenêtres MSMS

Ces fenêtres sont illustrées dans les figures suivantes pour le mode positif. Le détail de celles-ci se trouve en annexe, ainsi que les fenêtres du mode négatif.

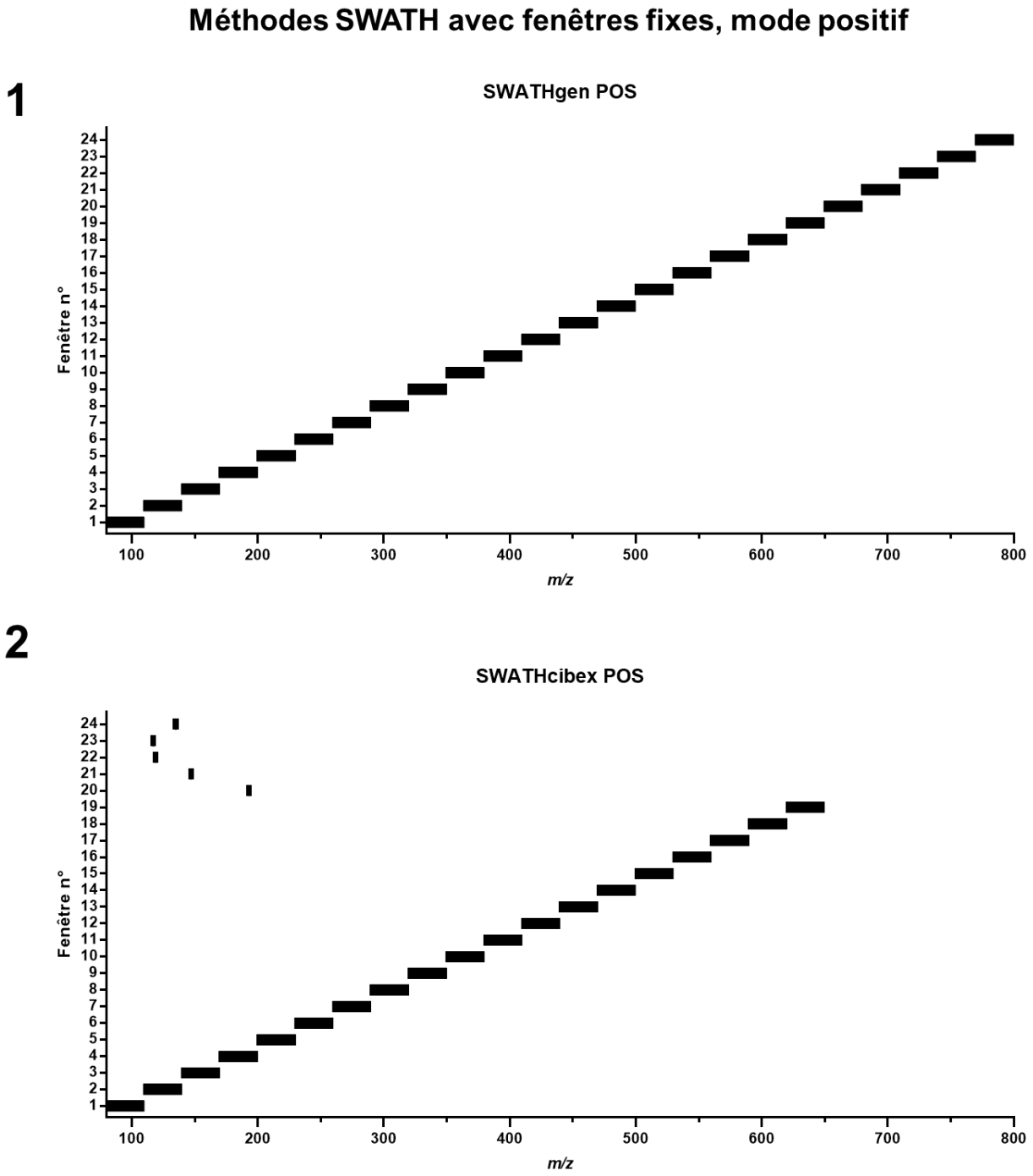


Figure 162: Méthodes SWATH avec des fenêtres de taille équivalente (SWATHgen) ou additionnées de fenêtre unitaires pour les composés ciblés appartenant au cycle de Krebs (acide citrique, malique, succinique, fumarique, oxoglutarique) (SWATHcibex), mode positif

Méthodes SWATH avec fenêtres fixes, insertion de fenêtres discrètes

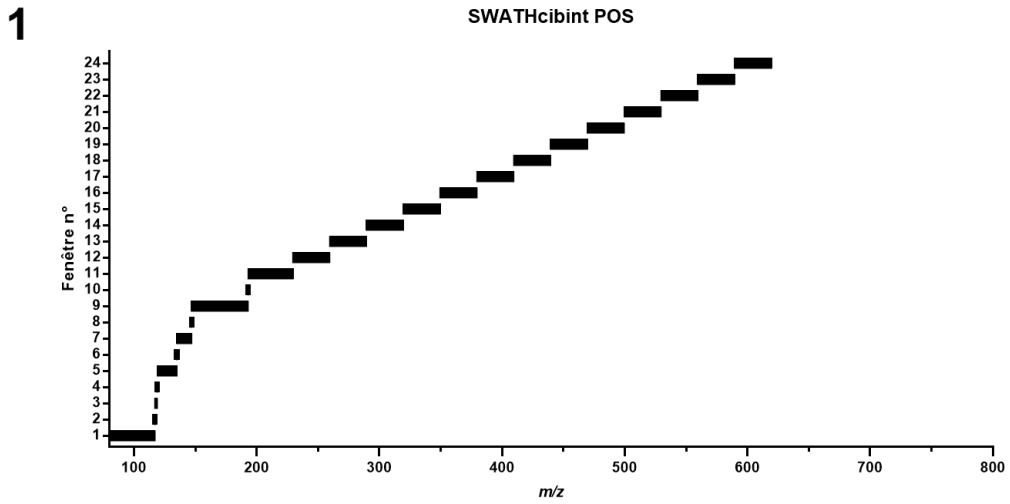


Figure 163: Méthodes SWATH avec intégration des composés d'intérêt appartenant au cycle de l'acide citrique (acide citrique, malique, succinique, fumarique, oxoglutarique) SWATHcibint

Méthodes SWATH avec fenêtres variables selon l'échantillon, mode positif

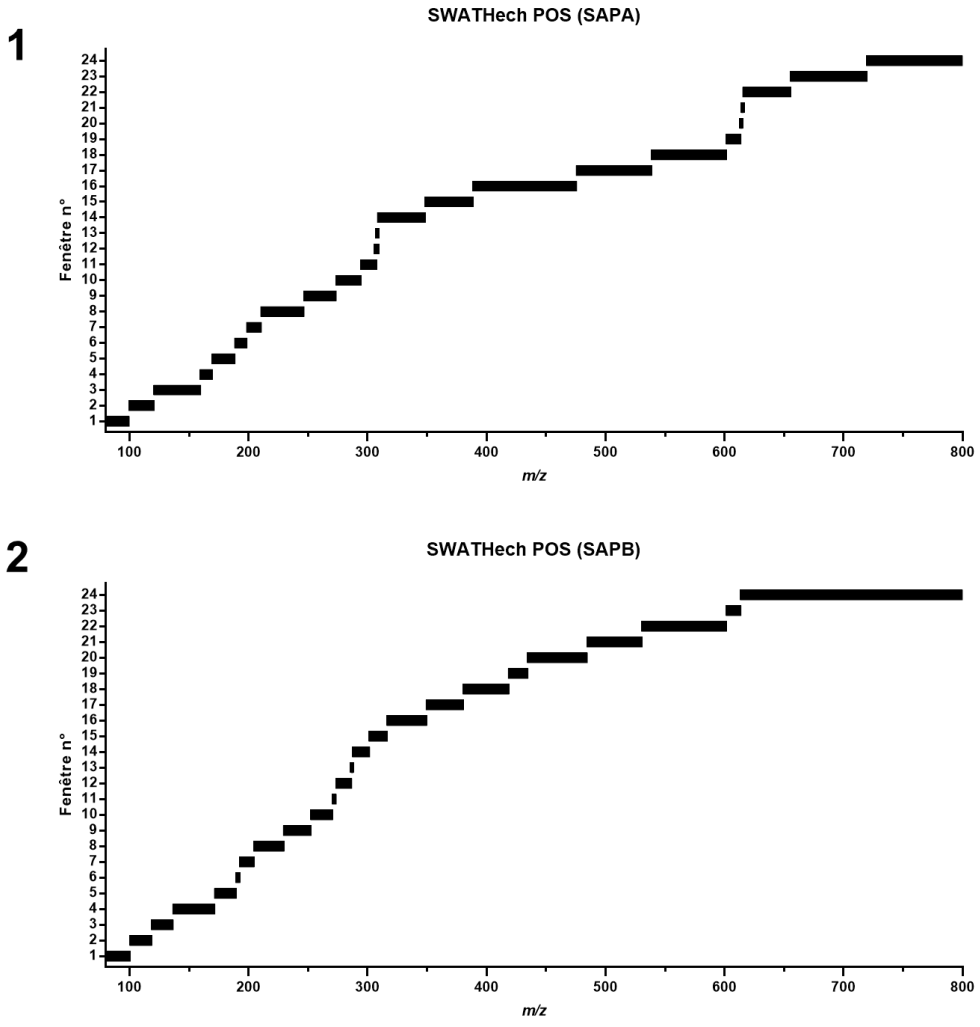


Figure 164: Méthodes SWATH avec fenêtres variables selon l'échantillon et selon la chromatographique acide ou basique SWATHech

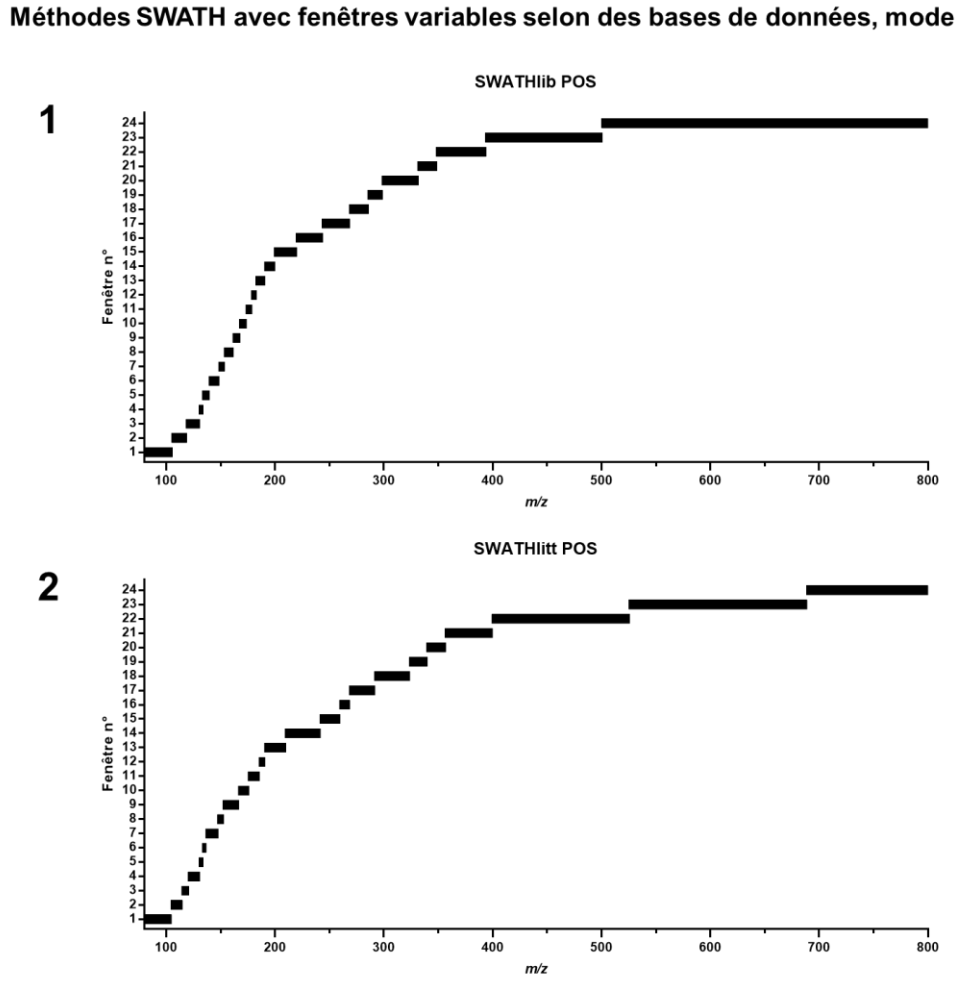


Figure 165: Méthodes SWATH créées à partir des connaissances inclues dans la littérature (SWATHlitt) ou selon la base de données créée en interne AMML (SWATHlib)

Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique à ultra haute performance est réalisée sur un système dual UHPLC UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Germany) configuré avec deux pompes binaires à gradient à haute pression. La condition acide contient une phase mobile A : H2O avec 0.1% d'acide formique et B : MeOH. La condition basique est pour A : 10 mM ammonium acétate et tamponnée à pH 8.0 avec de l'hydroxyde d'ammonium et B : MeOH. La phase mobile B est de 0% la première minute, puis augmente jusqu'à atteindre 100% en 10 minutes ; cette valeur est maintenue pendant 1 minute, puis est suivie par le retour aux conditions de départ en 0.1 minute. Pendant cette période, la seconde colonne est équilibrée aux conditions de départ ce qui représente un gain de temps et une meilleure stabilité de ces conditions. Les colonnes utilisées proviennent de GL Sciences, Inert Sustain, C_{18}, 5µm, 2.1mm x 150mm avec une colonne de garde SecurityGuard (Phenomenex, Torrance, CA) et un filtre approprié de catégorie C_{18}. Le

débit est de 300µL/min, les échantillons sont gardés à 6°C dans l'autosampler, et les colonnes sont thermostatées à 40°C.

Préparation d'échantillons des globules rouges

Les échantillons proviennent de l'abattoir situé à Meinier dans le canton de Genève (Suisse). 1 tube Falcon de 50 mL est prélevé par animal et contient 300 µL d'une solution d'héparine sodique vendue en officine, contenant 5 mL à 5'000 UI/mL (Heparin FRESENIUS, Fresenius Medical Care (Suisse) AG, 6370 Oberdorf NW, lot n°0H001, exp 08.2017). Les données obtenues font référence à 15-30 UI par mL de sang [2]. Les tubes sont héparinés à 30UI par mL de sang. Le sang obtenu provient des artères carotides et des jugulaires des animaux. Ceci est donc à la fois un sang veineux et artériel. Les tubes sont ensuite retournés 2 fois afin de permettre à l'héparine de se répartir dans le sang prélevé. Ils ont été ensuite entreposés dans la chambre froide de l'abattoir. Après transport, le même jour, les tubes ont été à nouveau agités et stockés dans un réfrigérateur à 4°C. 30 mL sang hépariné à 30 UI/mL ont été centrifugés pendant 30 minutes à 1200 g à 4°C.Une partie du culot a été prélevé (10 mL). Les globules rouges ont été répartis à raison de 200 µL dans des tubes eppendorf safe-lock de 2 mL. Les tubes ont ensuite été rapidement plongés dans une solution d'azote liquide et maintenus dans ces conditions, le temps de procéder à la préparation d'échantillons. 12 échantillons ont été ainsi préparés.

0.25 mL de billes en verre d'un diamètre de 0.5-0.25 mm sont ajoutés directement dans le tube contenant les cellules sanguines. Le tube est ensuite agité pendant 30 secondes à 30 Hz afin de lyser les érythrocytes. 300 µL d'H_2O, 300 µL de $CHCl_3$ ainsi que 600µL de MeOH sont ajoutés suivit d'une étape d'agitation. Ensuite, 300 µL d'H_2O et de $CHCl_3$ sont ajoutés dans le tube et celui-ci est agité. L'acide cholique d5 et l'adénosine $^{13}C5$ sont présents dans le méthanol à raison de 5µg/mL. Enfin, les phases sont séparées à 7'700 rpm à l'aide d'une centrifugeuse thermostatée à 4°C. 1mL de la phase aqueuse supérieure est prélevé ainsi que 400 µL de la phase inférieure organique. Les phases sont évaporées dans une centrifugeuse à vide.

Les extraits sont ensuite reconstitués dans 50 µL avec un mélange MeOH ; H_2O (2 ;8) contenant 6 standards internes chromatographiques : GABA-d_6, tryptophane-d_4. acide succinique-d_4, acetaminophen, verapamil, diclofenac. Ils sont ensuite mis en commun dans le même vial qui sera injecté.

Paramètres utilisés pour les logiciels MarkerView et MasterView

4.3. Résultats et discussion

Analyses statistiques préliminaires

Le même échantillon a été analysé selon toutes les méthodes d'acquisition, c'est pourquoi l'expérience TOF-MS doit être semblable pour toutes les expériences. Une analyse en composante principale est donc réalisée à l'aide du logiciel MarkerView. Un t-test a été effectué, et les données pour lesquelles la valeur p est inférieure à 0.05, ont été supprimées afin de ne pas engendrer de biais lors de l'analyse. L'analyse en composante principale supervisée et non supervisée montre que les données ne peuvent pas être séparées. Ceci indique que les analyses suivantes peuvent être considérées comme reflétant uniquement les variations provenant des expériences MS/MS.

PCA et PCA-DA de l'expérience MS n°1 (TOF-MS)

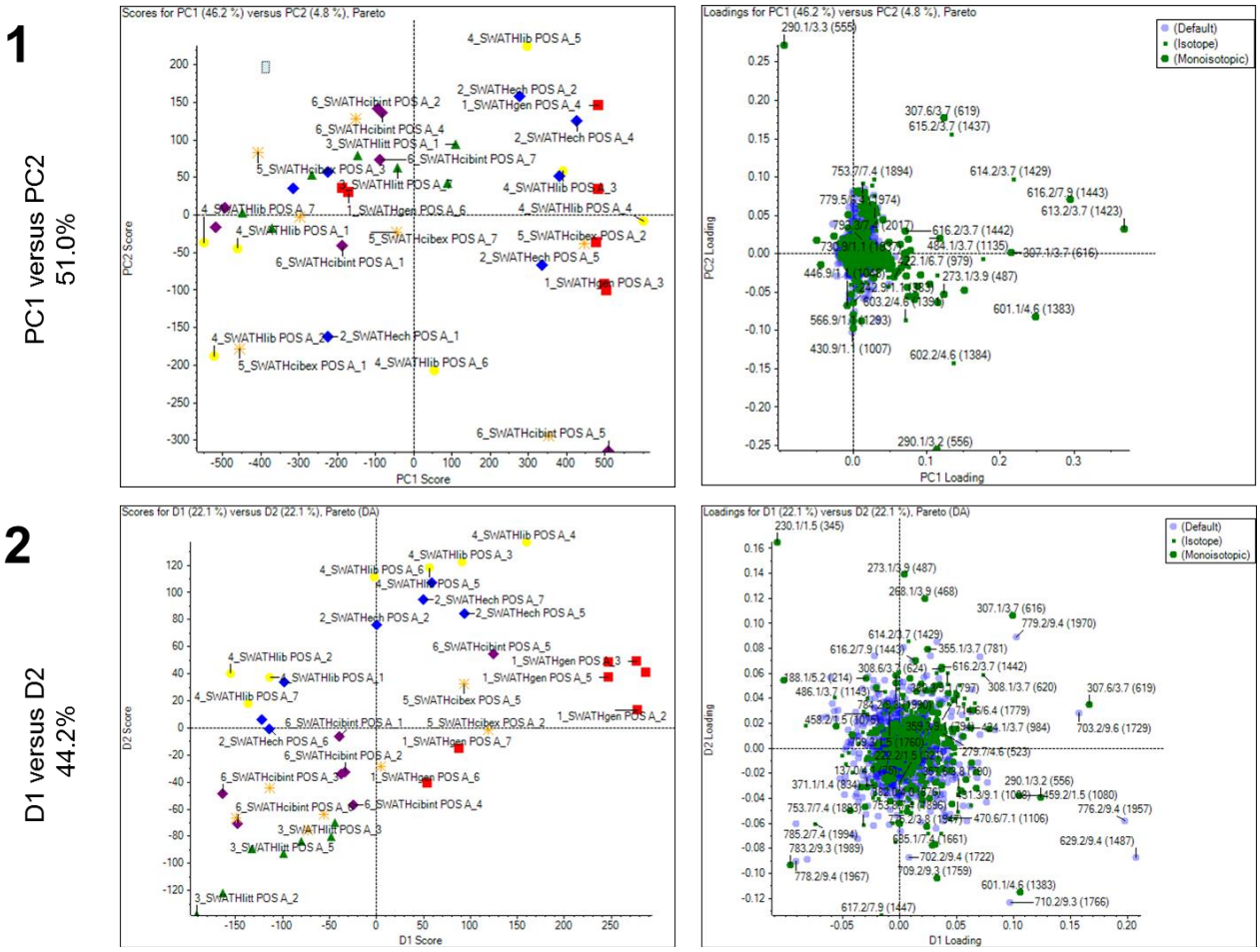


Figure 166: Analyse en composante principale de l'expérience 1 (TOF-MS) Les analyses sont effectuées en mode positif avec une chromatographie en conditions acides

Les expériences MS/MS (2 à 25) sont séparées des blancs et des SI chromato autant en analyse par composante principale non supervisée que supervisée (figure 167)

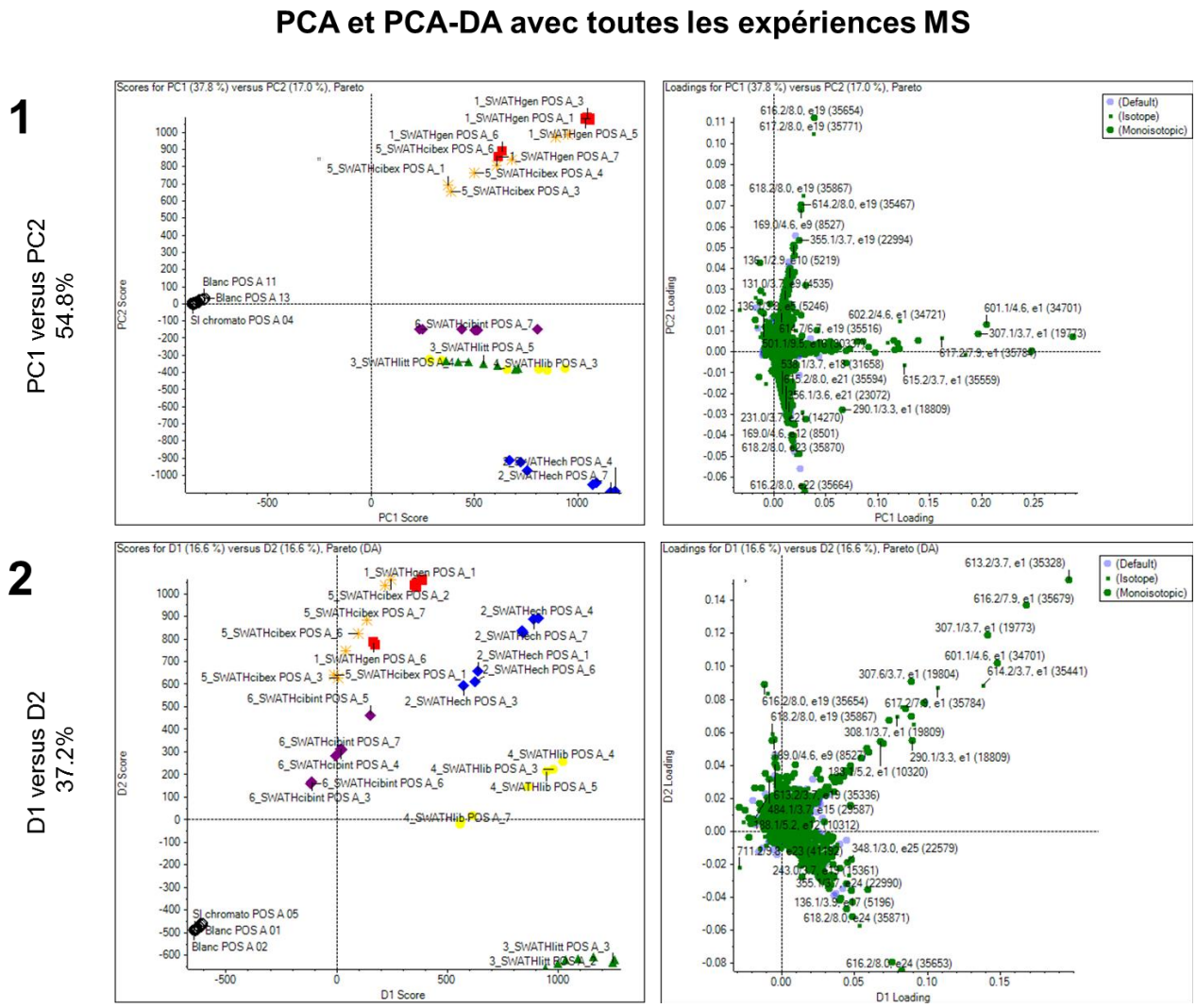


Figure 167: Analyse en composante principale supervisée et non supervisée (PCA et PCA-DA) de toutes les expériences MS/MS (2 à 25). Les analyses sont effectuées en mode positif avec une chromatographie en conditions acides

Les expériences MS/MS sont séparées selon trois axes en analyse non supervisée (figure 167 – 1). Les méthodes SWATH générique et ciblée externe sont regroupées (SWATHgen, SWATHCibex). Il en est de même pour les méthodes SWATHlib, SWATHlitt, ainsi que SWATHCibint (librairie, littérature et ciblé interne). La méthode SWATHech (échantillon) est séparée de toutes les autres. Il en est de même pour l'analyse en composante principale supervisée. L'extraction des variables est référencée selon : la valeur *m/z* extraite, le temps de rétention et l'expérience à laquelle elle appartient.

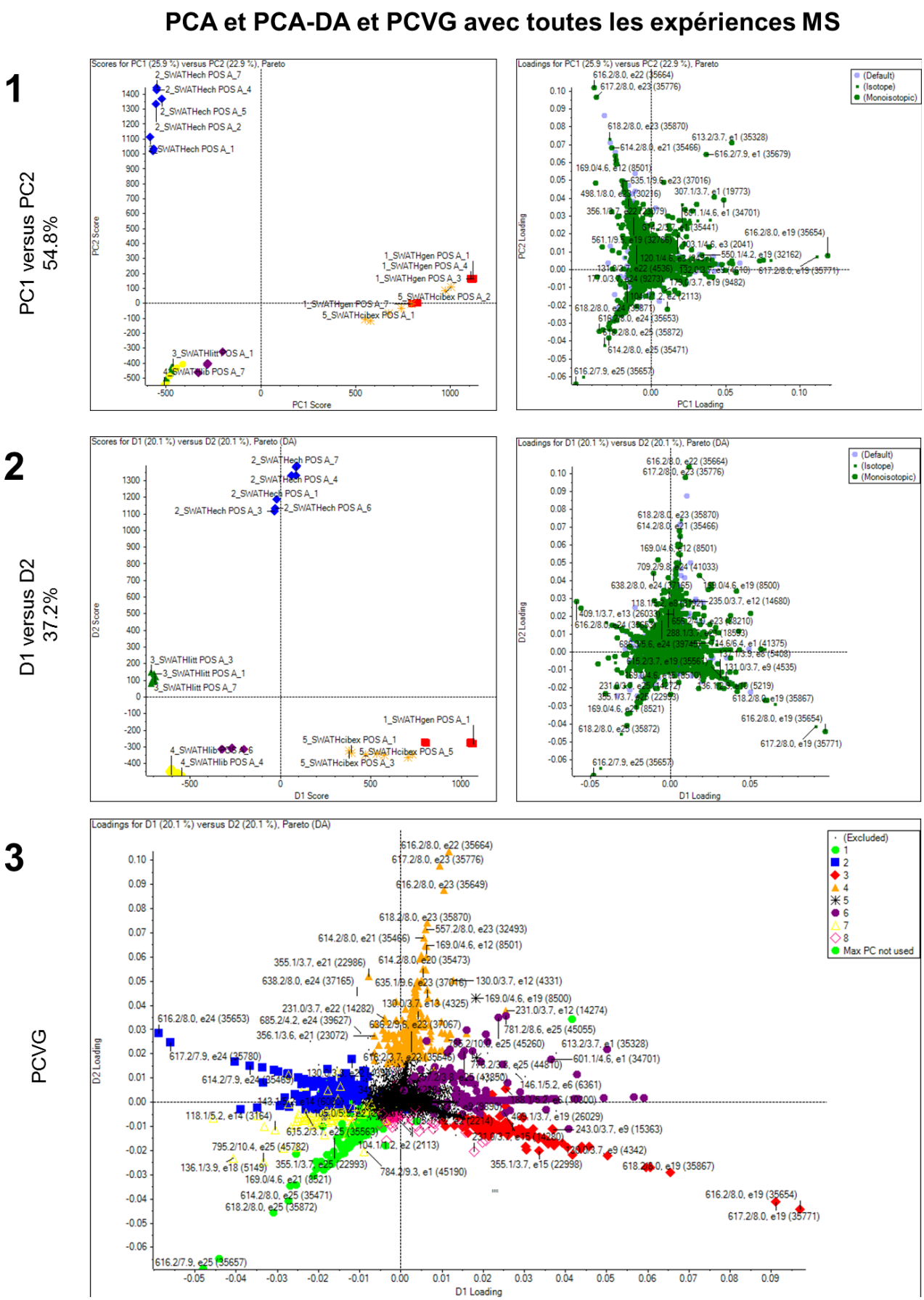


Figure 168: Analyse en composante principale supervisée et non supervisée (PCA et PCA-DA) de toutes les expériences MS/MS (2 à 25). Le troisième graphique représente l'analyse en composante principale par groupement de variables (PCVG) Les analyses sont effectuées en mode positif avec une chromatographie en conditions acides

Les expériences MS/MS 2-19 sont semblables pour les méthodes SWATHgen et SWATH cibex, c'est pourquoi ces méthodes sont regroupées selon l'analyse en composante principale. Les fenêtres SWATH pour la méthode SWATHlitt et SWATHlib sont, quant à elles, aussi proches. En effet, les fenêtres sont de petite taille dans les masses allant de 100 à 300 *m/z,* puis sont de plus en plus grandes. La méthode SWATHech, quant à elle, tient compte de la complexité de l'échantillon. On peut remarquer 3 paliers pour lesquels les fenêtres SWATH sont de plus petite taille, tout d'abord aux alentours de 200 *m/z,* puis 325 *m/z* et enfin 625 *m/z* (figure 164-1).

Identification générale des métabolites selon la méthode SWATH utilisée

Une identification des métabolites dans les analyses selon les méthodes SWATHech et SWATHgen est effectuée. Chaque identification est vérifiée manuellement. Les métabolites ayant une identification à l'aide de la masse exacte extraite, des isotopes, et de l'identification de confirmation des spectres MS/MS, sont retenus. Le détail est présenté dans la partie « matériel et méthode ». La liste y figurant est ensuite triée selon le nombre de fois qu'un métabolite est identifié dans une même série. Ainsi, par exemple, si un métabolite est identifié dans moins de deux analyses similaires, celui-ci est supprimé de la liste. Ceci amène à une liste finale de 46 composés identifiés dans l'une et/ou l'autre méthode, sur les 7 réplicats que compte chaque méthode. La liste détaillée se trouve en annexe. Les identifications ont été menées uniquement sur le mode négatif avec des conditions chromatographiques acides. Cette liste est ensuite sauvegardée sous forme de fichier .csv, et importée pour l'analyse de l'ensemble des méthodes par le logiciel MasterView. Les résultats sont illustrés sous forme de box plot à la figure 169 et les résultats détaillés apparaissent sous forme de tableau. La valeur n°2 de la méthode SWATHech a été supprimée, car selon le test de Gubbs effectué à l'aide du logiciel Prism, cette valeur est incohérente. La méthode SWATHech montre une identification relativement plus grande. Elle présente surtout une variabilité plus faible que les autres méthodes lors de l'identification.

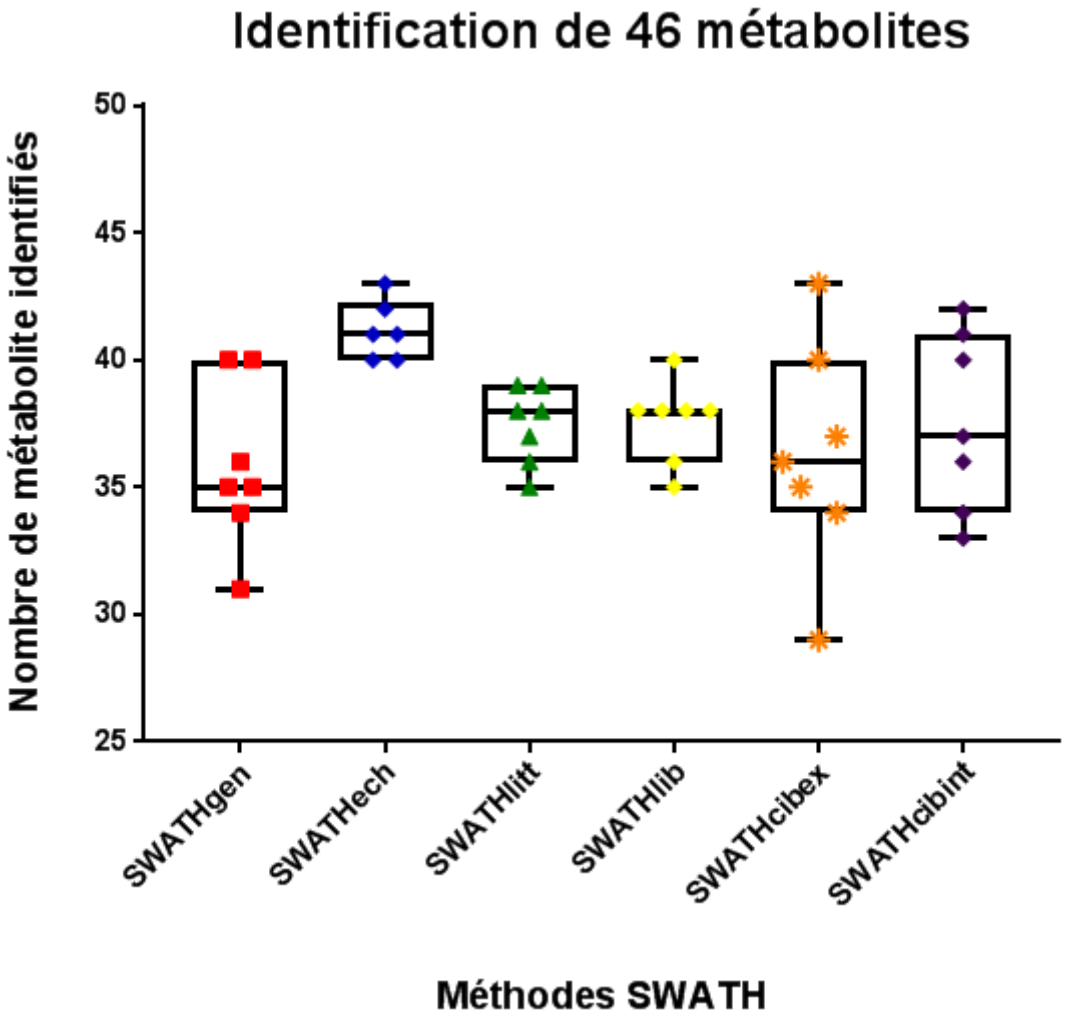


Figure 169: Box plot du nombre de métabolites identifiés sur un total de 46 métabolites recherchés selon la méthode de création des fenêtres SWATH (n=7). Analyses en mode négatif selon des conditions chromatographiques acides

Le tableau 12 ci-dessous résume les valeurs d'identification obtenues selon chaque méthode SWATH

Tableau 32 : Nombre de métabolites identifiés sur un total de 46 métabolites recherchés selon la méthode de création des fenêtres SWATH, analyses en mode négatif selon des conditions chromatographiques acides

Nombre de métabolites identifiés sur une liste de 46 composés, analyses mode négatif conditions acides						
Analyse n°	1_SWATHgen	2_SWATHech	3_SWATHlitt	4_SWATHlib	5_SWATHcibex	6_SWATHcibint
1	36	41	37	38	29	40
2	31	43	39	36	43	37
3	35	40	38	35	37	33
4	34	34	36	38	40	36
5	40	41	39	38	36	34
6	35	40	35	40	34	41
7	40	42	38	38	35	42
Moyenne	36	41	37	38	36	38
Ecart-type	3	1	1	1	4	3

Identification de 6 métabolites ciblés appartenant au cycle de l'acide citrique

Une problématique liée à l'identification de métabolites précis a aussi été évoquée. En effet, des fenêtres unitaires ont été créées pour deux types de méthodes : SWATHcibex et SWATHcibint. Ces méthodes comportent toutes les deux 5 fenêtres unitaires pour des composés d'intérêt du cycle de l'acide citrique. La méthode SWATHcibint intègre ces fenêtres directement dans l'ensemble des fenêtres SWATH selon le *m/z,* ou alors ces fenêtres unitaires sont directement ajoutées à la fin des expériences SWATHgen (voir figure 162-2 et 163). Ces composés sont l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide malique, l'acide succinique et l'acide oxoglutarique. Ces deux derniers composés n'ont cependant pas été extraits des analyses. Ils sont soit absents, soit présents en trop faible concentration pour obtenir une identification. Les méthodes « générique » et « basée sur la complexité de l'échantillon » semblent mener à des résultats similaires à ceux qui proviennent de l'insertion de fenêtres de taille unitaire externe (SWATHcibex). Les méthodes SWATHgen et SWATHech ont l'avantage en outre de balayer toute la gamme de *m/z* allant de 80-800, contrairement à la méthode ciblée pour laquelle les expériences 20-25 ont été supprimées, afin d'y insérer les fenêtres unitaires, le nombre total de fenêtres MS/MS étant fixé à 24.

La méthode SWATHlitt semble présenter un taux d'identification beaucoup plus bas que les autres méthodes. Il en est de même pour la méthode SWATHcibint, qui devrait avoir un taux d'identification de 3 sur 3, puisqu'elle comporte des fenêtres unitaires spécifiquement pour ces métabolites. Cependant, les résultats ne vont pas dans ce sens (figure 170).

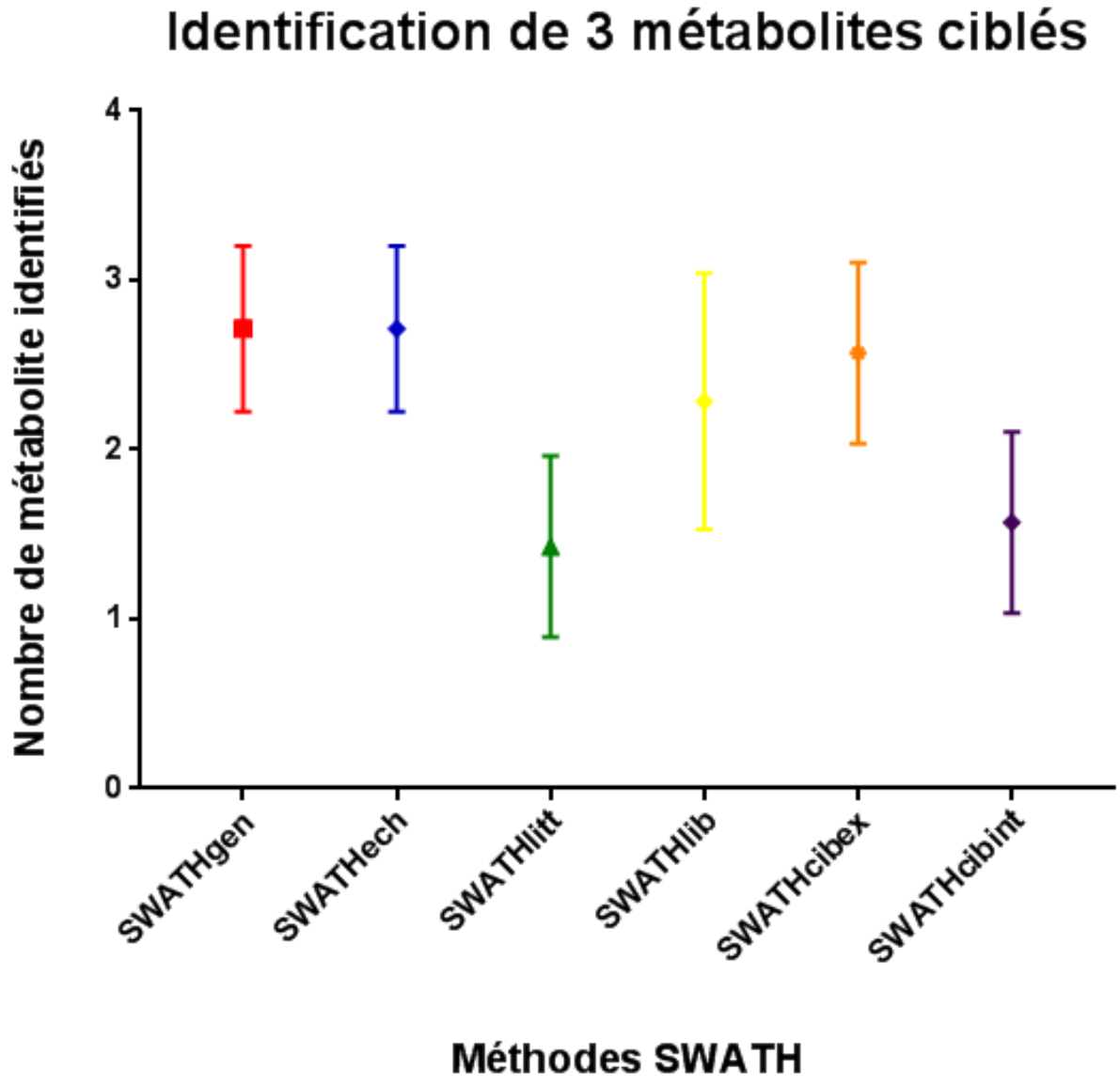


Figure 170: Box plot du nombre de métabolites identifiés sur un total de 6 métabolites recherchés spécifiquement pour leur implication dans le cycle de Krebs (n=3). Analyses en mode négatif selon des conditions chromatographiques acides

Le tableau 13 ci-dessous résume les valeurs d'identification obtenues selon chaque méthode SWATH

Tableau 33: Nombres de métabolites identifiés sur un total de 46 métabolites recherchés selon la méthode de création des fenêtres SWATH. Analyses en mode négatif selon des conditions chromatographiques acides

Nombre de métabolites du TCA identifiés (sur 5 composés), analyses mode négatif conditions acides						
Analyse n°	1_SWATHgen	2_SWATHech	3_SWATHlitt	4_SWATHlib	5_SWATHcibex	6_SWATHcibint
1	3	3	1	2	2	2
2	3	3	2	3	2	1
3	2	3	1	1	3	2
4	3	2	2	2	3	2
5	3	2	1	3	3	1
6	2	3	1	3	3	2
7	3	3	2	2	2	1
Moyenne	3	3	1	2	3	2
Ecart-type	0	0	0	1	0	0

Faux-Positifs dans l'identification par le logiciel MasterView

Les données ont été analysées afin de déterminer les faux-positifs d'identification, mentionnées dans la partie précédente. Il apparaît que l'identification de l'acide citrique est le point critique. En effet sa valeur $[M-H]^-$ est de 191.02 Da. Ce composé élue en chromatographique acide à 3.45 min. De par la création de fenêtres possédant une unité *m/z* de superposition entre chaque fenêtre SWATH, l'acide citrique peut être extrait soit dans l'expérience 11 allant de 182-192 *m/z*, soit dans l'expérience 12 allant de 191 à 210 *m/z*. Le logiciel MasterView réalise l'identification sur l'expérience 12. L'intensité des fragments appartenant à l'acide citrique est trop faible, et l'identification ne se fait pas correctement. Ceci explique donc le faible taux d'identification, pour ce métabolite, par les méthodes SWATHlitt et SWATHcibint. La solution serait d'augmenter le recouvrement *m/z* entre deux fenêtres SWATH à 1.5 *m/z* ou de créer des fenêtres unitaires supplémentaires, si une problématique ciblée, entre autres sur un certain nombre de composés, est rencontrée.

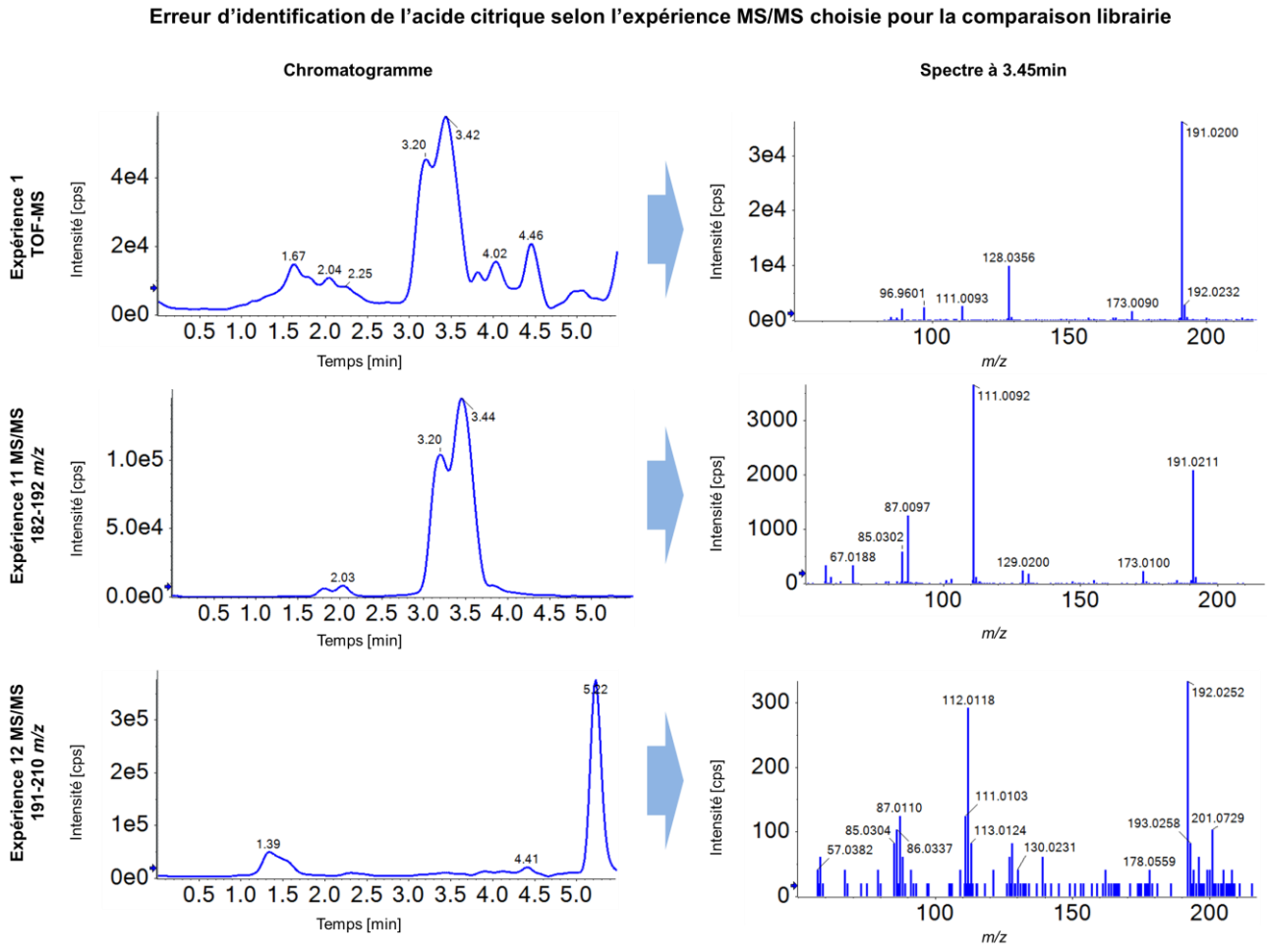


Figure 171: Expérience 1 (TOF-MS), 11 et 12 d'une analyse par la méthode SWATHlitt, au temps de rétention de l'acide citrique, ainsi que le spectre correspondant à ce temps de rétention (3.45min)

L'acide isocitrique en recherche de confirmation sur l'ensemble des composés de la librairie est identifié en tant que faux positif. En effet, il manque deux fragments au spectre expérimental (voir figure 172). Le logiciel MasterView considère cependant son identification comme conforme, et propose l'acide isocitrique comme métabolite identifié. Il faut être particulièrement vigilant à ce cas de figure. C'est pourquoi les métabolites identifiés ont été contrôlés un à un, et les faux-positifs ont été supprimées. Les composés ne présentant pas de fragments pour un domaine d'ion produit allant de 50-800 *m/z* ont eux aussi été enlevés, car l'identification ne peut se faire que par l'utilisation du temps de rétention, ou alors par une identification dans le mode opposé, avec plusieurs fragments et une extraction du temps de rétention de celui-ci.

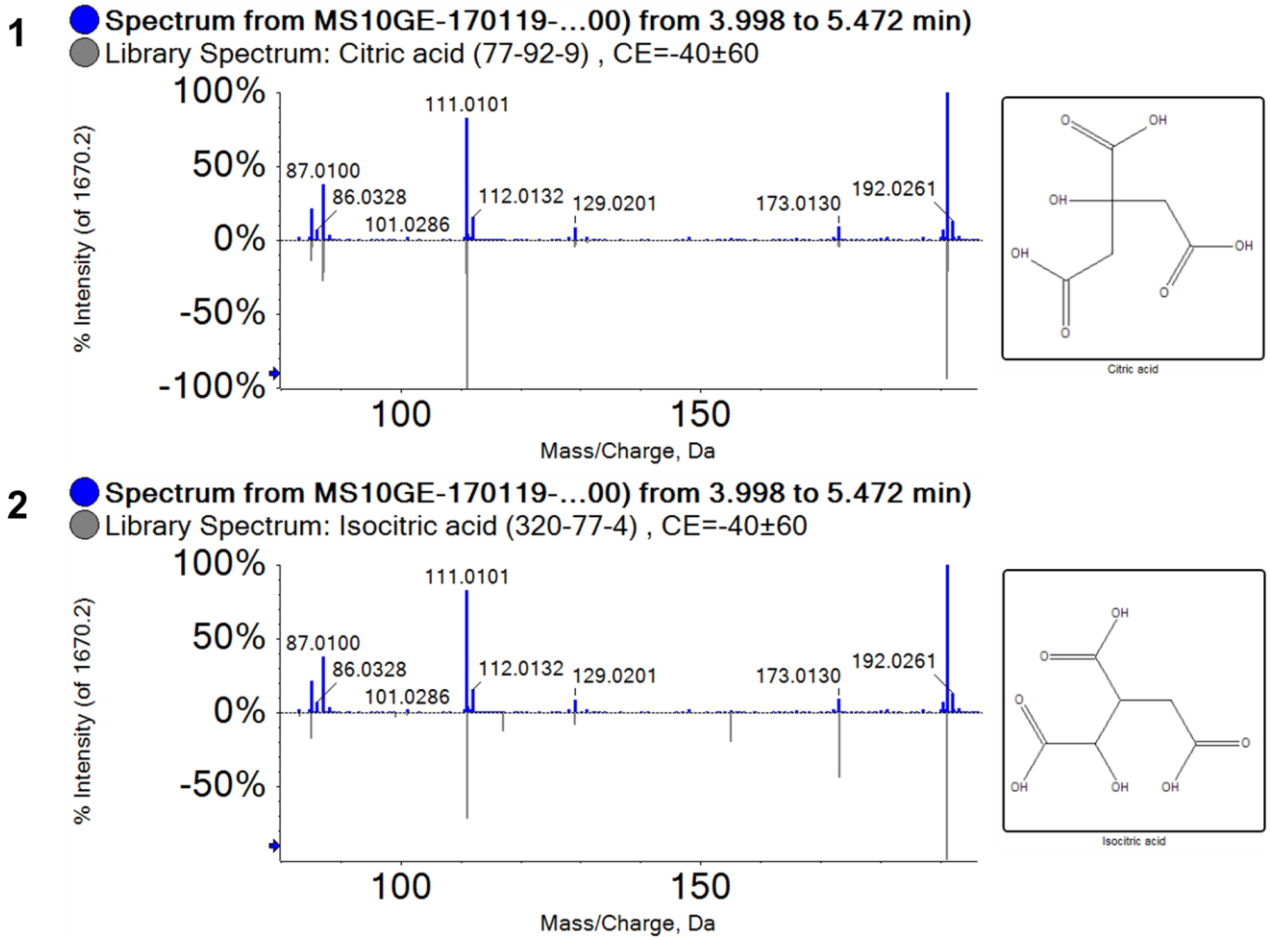


Figure 172: Comparaison de l'identification de l'acide citrique (1) et isocitrique (2)

L'identification des métabolites qui co-éluent peut s'avérer extrêmement difficile, même avec la présence de standards. En effet, en analyse SWATH, la présence d'un fragment peut être due à la fragmentation d'un autre précurseur, et induire une identification faussée. Cet exemple est illustré par le cas du glucose 1-phosphate et glucose 6-phosphate à la figure 173. En outre, l'intensité des fragments pourrait tendre vers l'identification du glucose 6-phosphate. Cependant, il n'est pas exclu que l'intensité soit due au fragment d'un autre ion précurseur, ou alors à la variabilité d'intensité lors de la fragmentation elle-même. C'est pourquoi, dans ce cas de figure, aucune hypothèse ne peut être préférée de façon certaine. Seul l'ajout d'une dimension séparative supplémentaire, comme la mobilité ionique, pourrait justifier de l'identification de l'un ou l'autre métabolite.

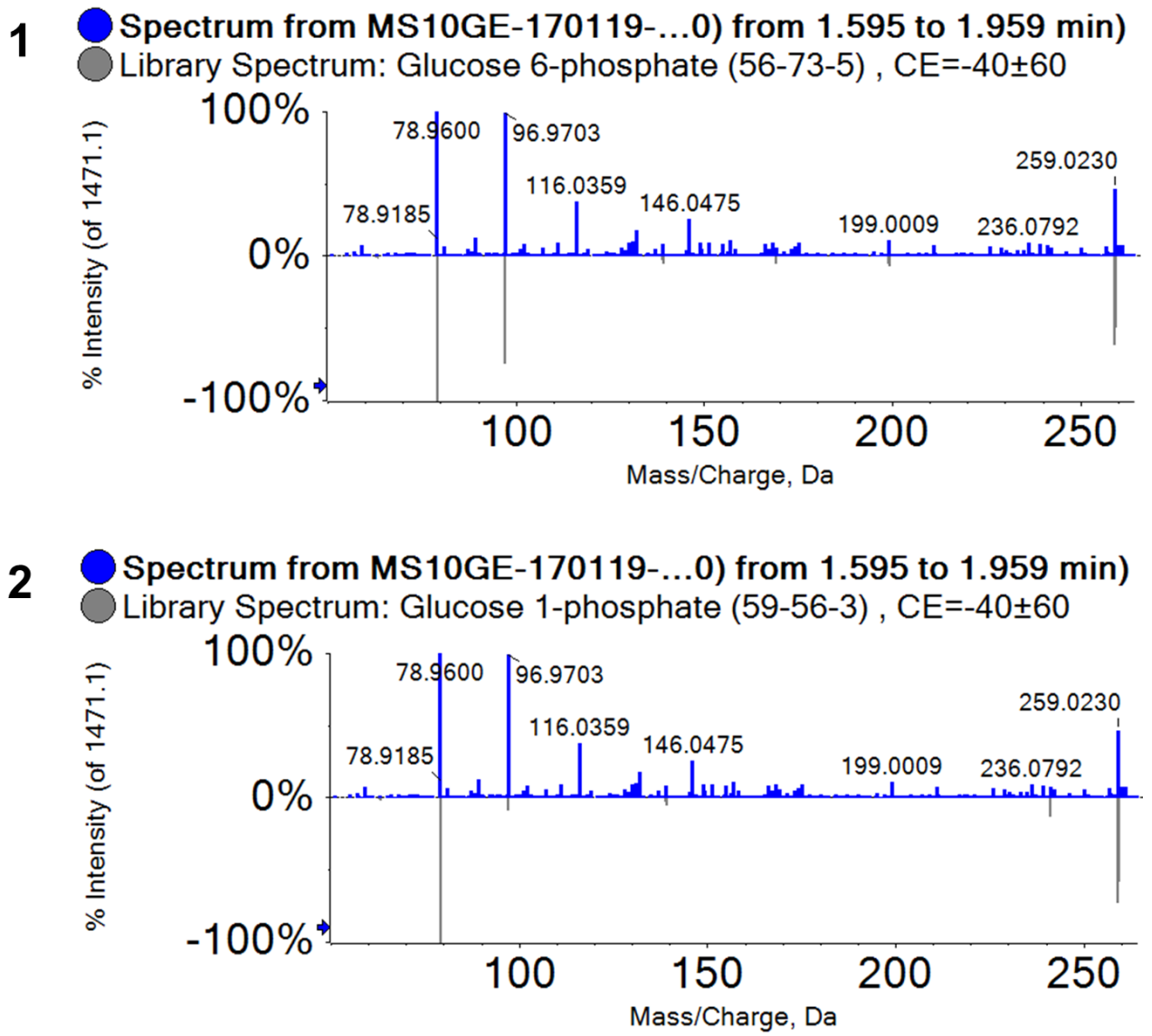


Figure 173: Spectre du glucose 1-phosphate (1) et du glucose 6-phosphate (2), comparaison avec le spectre de référence

Ce cas de figure est aussi rencontré pour ce qui concerne la tyrosine, qui comporte des formes différentes en ortho et para (voir figure 174). Ces composés sont toutefois facilement séparés par chromatographie liquide. La présence de standards est cependant nécessaire afin de les différencier. Les fragments 107 et 136 semblent cependant mêlés au bruit, ce qui tendrait à l'identification, dans ce cas présent, de la forme para (l-tyrosine).

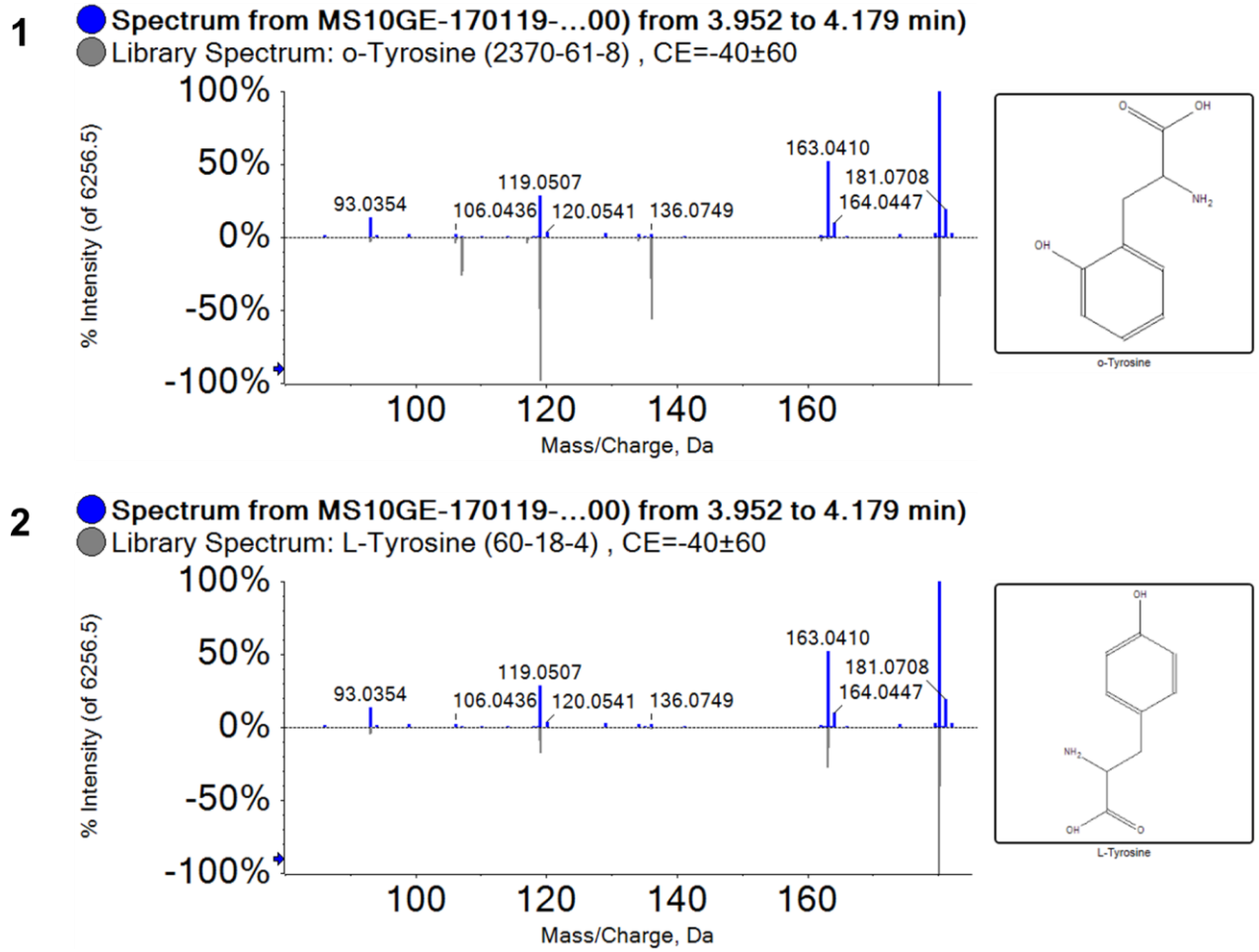


Figure 174: Spectre de l'o-tyrosine (1) et p-tyrosine (l-tyrosine) (2), comparaison avec le spectre de référence

Identification spécifique de 64 métabolites selon la méthode SWATH utilisée

Une identification des métabolites dans les analyses selon les méthodes SWATHgen, SWATHech, SWATHlitt et SWATHlib est effectuée. Chaque identification est vérifiée manuellement, et les métabolites ayant une identification à l'aide de la masse exacte extraite, des isotopes, et de l'identification de confirmation des spectres MS/MS, sont retenus. La liste complète se trouve à la figure 175. Le détail est présenté dans la partie « matériel et méthode ». Cette liste est ensuite triée selon le nombre de fois qu'un métabolite est identifié dans une même série. Ainsi, par exemple, si un métabolite est identifié dans moins de deux analyses similaires, celui-ci est supprimé de la liste.

La méthode SWATHgen identifie 36 métabolites, la méthode SWATHech, 46, la méthode SWATHlitt 54 métabolites, et la méthode SWATHlib 55 (figure 175). Le nombre maximal de métabolites identifiés selon la base de données développée en interne est donc effectué par la méthode SWATHlib. Ceci est cohérent avec le fait que la taille des fenêtres SWATH est créée selon la liste présente dans la librairie interne.

n°	SWATHgen	SWATHech	SWATHlitt	SWATHlib
1	3-Methyladipic acid	(R)-3-Hydroxybutyric acid	2,2-Dimethylsuccinic acid	(R)-3-Hydroxybutyric acid
2	3-Phosphoglyceric acid	3-Hydroxybutyric acid	(R)-3-Hydroxybutyric acid	2,2-Dimethylsuccinic acid
3	6-Phosphogluconic acid	3-Methyladipic acid	2-Furoic acid	2,4-Dihydroxybenzoic acid
4	Adenine	3-Phosphoglyceric acid	2-Methylglutaric acid	2,6-Dihydroxybenzoic acid
5	Adenosine	4-Hydroxybenzoic acid	3-Hydroxybutyric acid	2-Furoic acid
6	Adenosine monophosphate	Adenine	3-Methyladipic acid	2-Methylglutaric acid
7	Adenosine triphosphate	Adenosine	3-Phosphoglyceric acid	3-Hydroxybenzoic acid
8	ADP	Adenosine triphosphate	6-Phosphogluconic acid	3-Hydroxybutyric acid
9	Allantoin	Allantoin	Adenine	3-Methyladipic acid
10	Azelaic acid	Azelaic acid	Adenosine	3-Phosphoglyceric acid
11	Carnosine	Carnosine	Adenosine monophosphate	6-Phosphogluconic acid
12	Cinnamic acid	Cinnamic acid	Adenosine triphosphate	Adenine
13	Citric acid	Citric acid	ADP	Adenosine
14	dGTP	dGTP	Allantoic acid	Adenosine monophosphate
15	Flavin Mononucleotide	D-Lactic acid	Allantoin	Adenosine triphosphate
16	Fumaric acid	D-Ribose 5-phosphate	Azelaic acid	ADP
17	Glutathione	Flavin Mononucleotide	Carnosine	Allantoin
18	Hippuric acid	Fructose 6-phosphate	Cinnamic acid	Azelaic acid
19	Hydroxyphenyllactic acid	Fumaric acid	dGTP	Carnosine
20	Inosine	Galactonic acid	D-Lactic acid	Cinnamic acid
21	Inosinic acid	Gluconic acid	Dodecanedioic acid	Citric acid
22	Isovalerylglycine	Glucose 1-phosphate	D-Ribose 5-phosphate	dGTP
23	L-Glutamic acid	Glucose 6-phosphate	Flavin Mononucleotide	D-Lactic acid
24	L-Histidine	Glutathione	Fructose 6-phosphate	Dodecanedioic acid
25	L-Malic acid	Glyceric acid	Fumaric acid	D-Ribose 5-phosphate
26	L-Phenylalanine	Glycocholic acid	Galactonic acid	Flavin Mononucleotide
27	L-Tryptophan	Hydroxyphenyllactic acid	Gluconic acid	Fructose 6-phosphate
28	L-Tyrosine	Inosine	Glucose 1-phosphate	Fumaric acid
29	Malic acid	Inosinic acid	Glucose 6-phosphate	Galactonic acid
30	Pimelic acid	Isovalerylglycine	Glyceric acid	Gluconic acid
31	Sebacic acid	Ketoleucine	Glycocholic acid	Glucose 1-phosphate
32	Suberic acid	L-Glutamic acid	Hippuric acid	Glucose 6-phosphate
33	trans-Cinnamic acid	L-Histidine	Hydroxyphenyllactic acid	Glutathione
34	Uridine	L-Malic acid	Inosine	Glyceric acid
35	Uridine 5'-monophosphate	L-Phenylalanine	Inosinic acid	Glycocholic acid
36	Uridine diphosphate glucose	L-Tryptophan	Isovalerylglycine	Hippuric acid
37		L-Tyrosine	L-Glutamic acid	Hydroxyphenyllactic acid
38		Malic acid	L-Histidine	Inosine
39		Mannose 6-phosphate	L-Malic acid	Inosinic acid
40		Phenylacetylglycine	L-Phenylalanine	Isovalerylglycine
41		Pimelic acid	L-Tryptophan	L-Glutamic acid
42		Salicylic acid	L-Tyrosine	L-Histidine
43		Suberic acid	Malic acid	L-Malic acid
44		trans-Cinnamic acid	Mannose 6-phosphate	L-Phenylalanine
45		Uridine	Methylglutaric acid	L-Threonine
46		Uridine diphosphate glucose	Phenylacetylglycine	L-Tyrosine
47			Pimelic acid	Malic acid
48			Sebacic acid	Mannose 6-phosphate
49			Suberic acid	Phenylacetylglycine
50			Tetradecanedioic acid	Pimelic acid
51			trans-Cinnamic acid	Tetradecanedioic acid
52			Uridine	trans-Cinnamic acid
53			Uridine 5'-diphosphate	Uridine
54			Uridine 5'-monophosphate	Uridine 5'-monophosphate
55				Uridine diphosphate glucose

Figure 175: Métabolites identifiés selon la méthode d'acquisition SWATH

Ceci amène à une liste finale de 64 composés identifiés dans l'une et/ou l'autre méthode sur les 7 réplicats que compte chaque méthode. La liste détaillée se trouve ci-dessous. Les méthodes ciblées n'ont pas été utilisées pour créer cette liste, car elles sont le résumé d'autres méthodes.

Liste commune des 4 méthodes SWATHgen, ech, litt et lib	
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Glucose 1-phosphate
2,2-Dimethylsuccinic acid	Glucose 6-phosphate
2,4-Dihydroxybenzoic acid	Glutathione
2,6-Dihydroxybenzoic acid	Glyceric acid
2-Furoic acid	Glycocholic acid
2-Methylglutaric acid	Hippuric acid
3-Hydroxybenzoic acid	Hydroxyphenyllactic acid
3-Hydroxybutyric acid	Inosine
3-Methyladipic acid	Inosinic acid
3-Phosphoglyceric acid	Isovalerylglycine
4-Hydroxybenzoic acid	Ketoleucine
6-Phosphogluconic acid	L-Glutamic acid
Adenine	L-Histidine
Adenosine	L-Malic acid
Adenosine monophosphate	L-Phenylalanine
Adenosine triphosphate	L-Threonine
ADP	L-Tryptophan
Allantoic acid	L-Tyrosine
Allantoin	Malic acid
Azelaic acid	Mannose 6-phosphate
Carnosine	Methylglutaric acid
Cinnamic acid	Phenylacetylglycine
Citric acid	Pimelic acid
dGTP	Salicylic acid
D-Lactic acid	Sebacic acid
Dodecanedioic acid	Suberic acid
D-Ribose 5-phosphate	Tetradecanedioic acid
Flavin Mononucleotide	trans-Cinnamic acid
Fructose 6-phosphate	Uridine
Fumaric acid	Uridine 5'-diphosphate
Galactonic acid	Uridine 5'-monophosphate
Gluconic acid	Uridine diphosphate glucose

Figure 176: Liste résumée de tous les métabolites identifiés au travers des 4 méthodes SWATH, SWATHgen, SWATHech, SWATHlib et SWATHlitt

Le nombre de composés identifiés selon chaque méthode SWATH est présenté dans la figure et le tableau suivants.

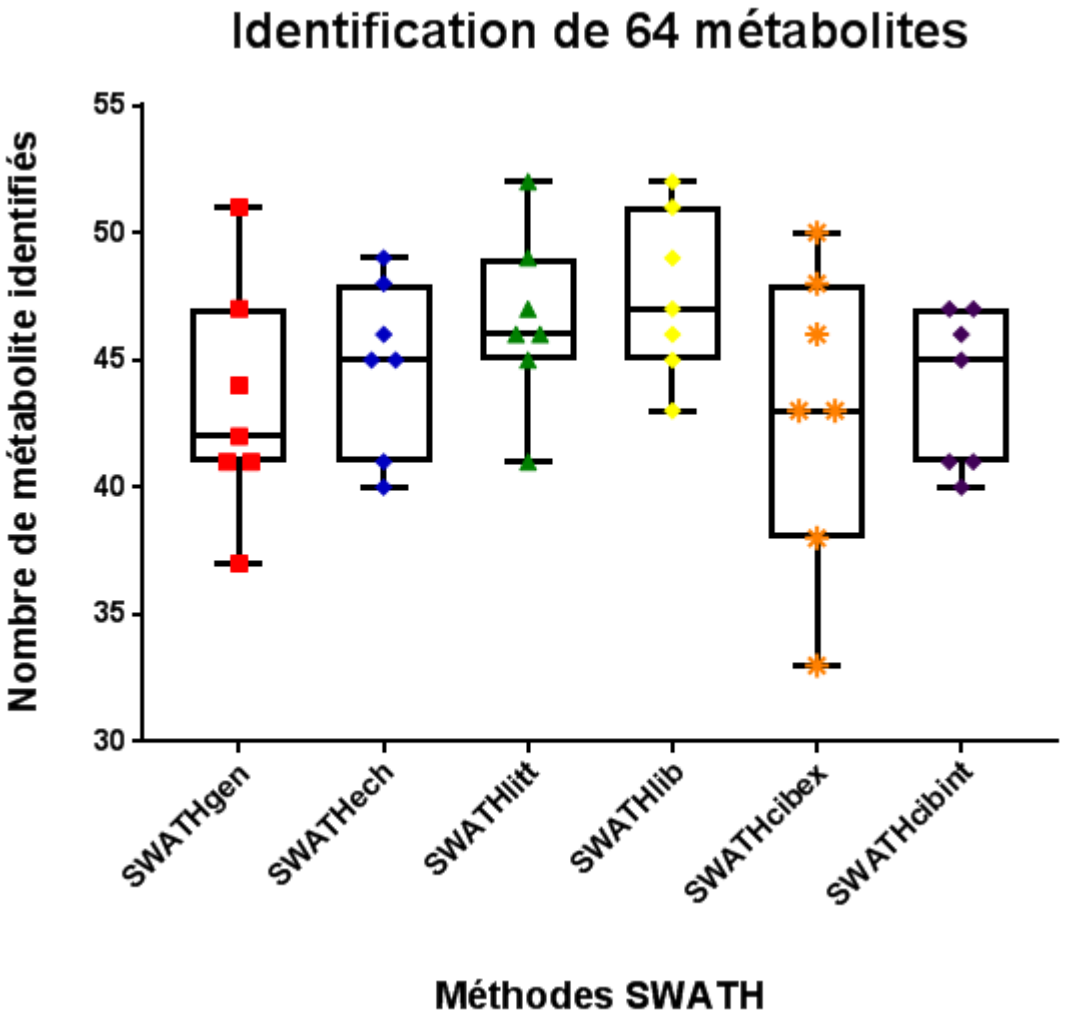


Figure 177: Box plot du nombre de métabolites identifiés sur un total de 64 métabolites recherchés selon la méthode de création des fenêtres SWATH. Analyses en mode négatif selon des conditions chromatographiques acides

Le tableau 14 ci-dessous résume les valeurs d'identification obtenues selon chaque méthode SWATH

Tableau 34: Nombres de métabolites identifiés sur un total de 64 métabolites recherchés selon la méthode de création des fenêtres SWATH. Analyses en mode négatif selon des conditions chromatographiques acide

Nombre de métabolites identifiés sur une liste combinée de 64 composés analyses mode négatif conditions acides						
Analyse n°	1_SWATHgen	2_SWATHech	3_SWATHlitt	4_SWATHlib	5_SWATHcibex	6_SWATHcibint
1	41	45	45	47	33	47
2	37	46	52	43	50	45
3	41	41	49	46	43	41
4	44	40	46	45	48	41
5	51	48	46	51	43	40
6	42	45	41	52	46	47
7	47	49	47	49	38	46
Moyenne	43	45	47	48	43	44
Ecart-type	4	3	3	3	5	3

La moyenne de la méthode SWATHlib, concernant les métabolites identifiés, selon le tableau 30, est la plus élevée. Toutes les méthodes sont néanmoins relativement semblables. Il est étonnant de noter que la variabilité d'identification est grande pour la même méthode, et avec l'injection du même échantillon. Ceci démontre que des améliorations peuvent encore être effectuées, et que les résultats obtenus pour une identification doivent toujours être investigués plus en détail.

Il est faut noter que, pour une identification en rapport avec une librairie, le meilleur moyen de créer les fenêtres variables, est celui qui est en accord avec cette même librairie,cela dans le but de maximiser l'identification des métabolites présents dans cette base de données. Lorsque la problématique n'est pas établie, et que des études préliminaires sont recommandées, une analyse qui se fait en créant des fenêtres de taille équivalente permet de couvrir l'ensemble des métabolites. Ce processus n'exige pas de développement de méthode en amont. Si le but est d'obtenir un maximum de variables, tout en gardant une approche non ciblée, la création de méthodes en accord avec la complexité de l'échantillon est importante, car elle va permettre de répartir les ions de façon équivalente entre les fenêtres. De ce fait, la complexité des spectres obtenus diminuera, ce qui favorisera le processus d'identification. Enfin, dans l'optique d'obtenir des spectres de qualité pour un certain nombre de composés d'intérêt, l'utilisation de fenêtres unitaires de haute résolution, ceci à la suite des expériences SWATH, est la procédure la plus indiquée.

Scores d'identification librairie des 64 métabolites selon la méthode d'acquisitionSWATH utilisée

Les scores d'identification pour chaque métabolite, et selon la méthode SWATH, sont illustrés dans la figure suivante. La figure d'après (figure 179) représente le même set de données, mais avec, pour l'axe des abscisses, la masse des métabolites et les scores des identifications librairie de chaque méthode d'acquisition SWATH.

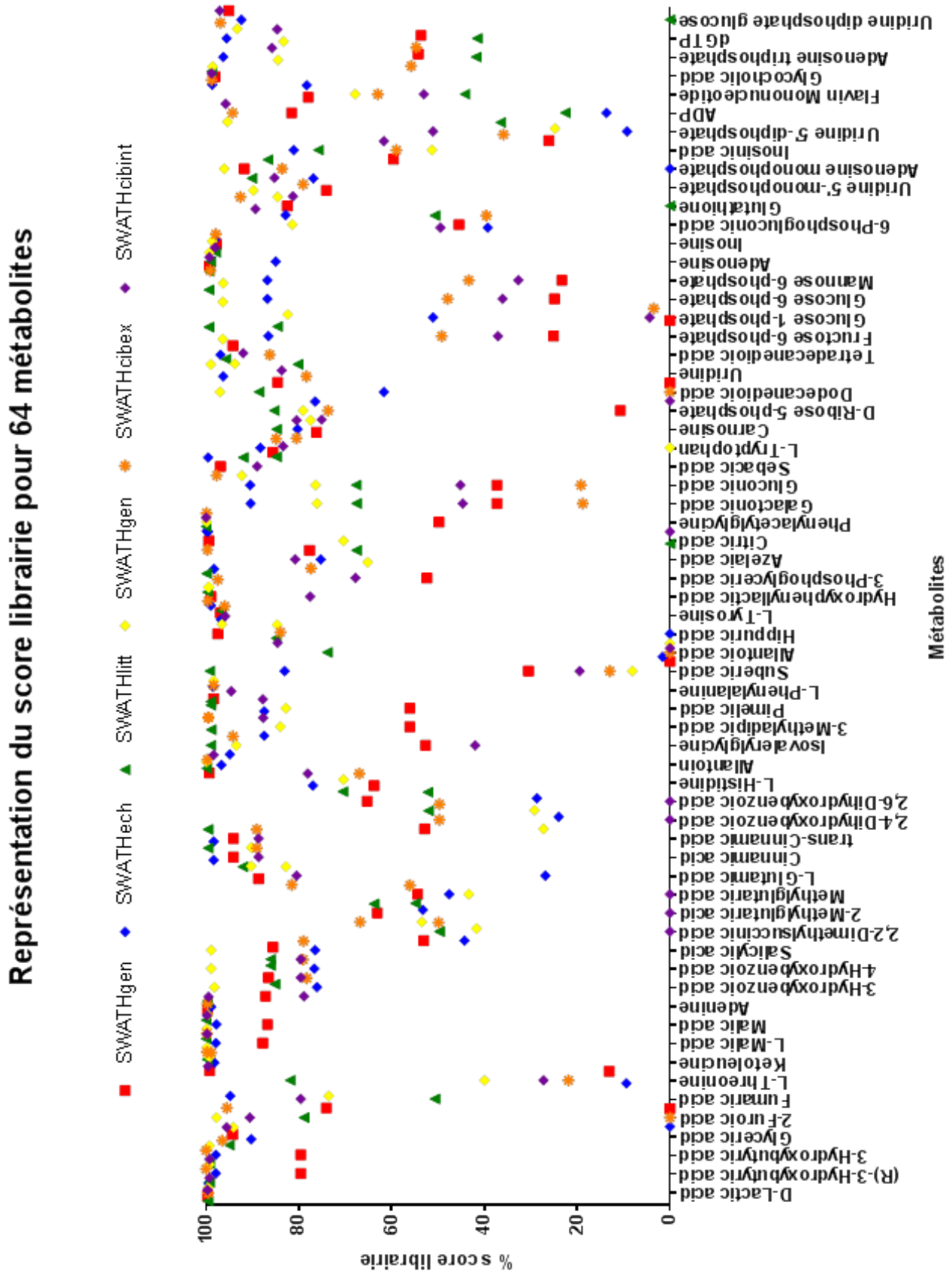


Figure 178: Représentation du score librairie selon 64 métabolites identifiés, la recherche est effectuée par le logiciel MasterView sur la liste des 64 métabolites en mode « confirmation de recherche » et « fit »

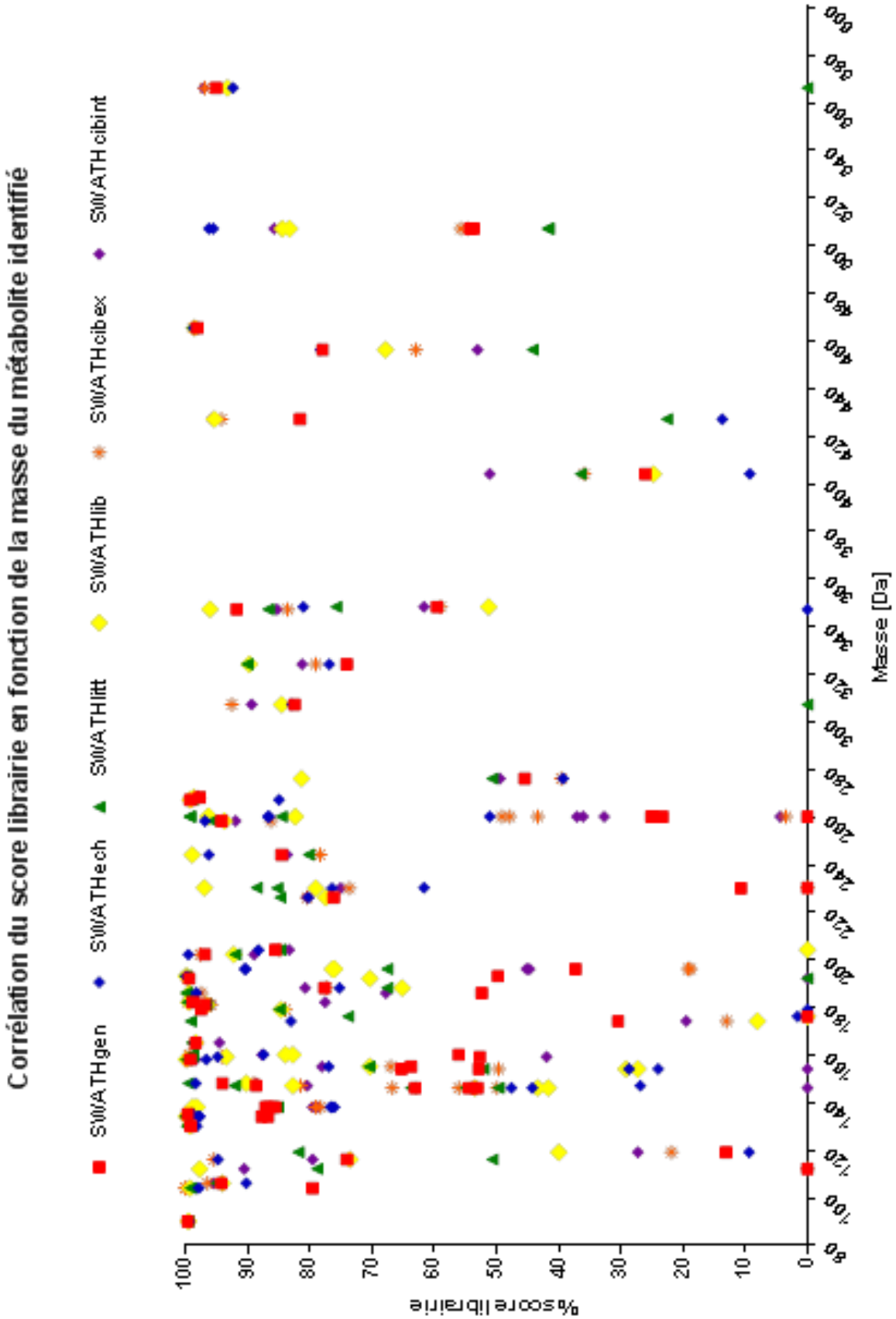


Figure 179: Représentation du score librairie selon les masses des 64 métabolites identifiés, la recherche est effectuée par le logiciel MasterView sur la liste des 64 métabolites en mode « confirmation de recherche » et « fit »

Tableau 35: Moyenne des scores d'identification selon la librairie (n=7) et le coefficient de variation (CV) en % pour les 64 métabolites identifiés selon les six méthodes d'acquisition SWATH

Nom du métabolite	Masse exacte [Da]	SWATHgen		SWATHech		SWATHlitt		SWATHlib		SWATHcibex		SWATHcibint	
		Moyenne des scores (n=7)	CV [%]	Moyenne des scores (n=7)	CV [%]	Moyenne des scores (n=7)	CV [%]	Moyenne des scores (n=7)	CV [%]	Moyenne des scores (n=7)	CV [%]	Moyenne des scores (n=7)	CV [%]
D-Lactic acid	90.0	99.7	0%	99.5	0%	99.6	0%	99.6	0%	99.5	0%	99.7	0%
(R)-3-Hydroxybutyric acid	104.0	79.6	1%	97.9	2%	99.2	2%	99.3	1%	100.0	0%	99.3	2%
3-Hydroxybutyric acid	104.0	79.6	1%	97.9	2%	99.2	2%	99.3	1%	100.0	0%	99.3	2%
Glyceric acid	106.0	94.3	4%	90.3	6%	95.0	6%	94.1	7%	96.5	4%	95.6	4%
2-Furoic acid	112.0	0.0	0%	0.0	0%	78.9	28%	97.8	2%	0.0	0%	90.6	12%
Fumaric acid	116.0	74.1	5%	94.8	2%	50.7	48%	73.6	17%	95.5	2%	79.6	19%
L-Threonine	119.1	13.1	140%	9.4	127%	81.9	41%	40.0	33%	21.9	78%	27.3	37%
Ketoleucine	130.1	99.2	1%	98.2	2%	99.8	0%	99.3	1%	98.9	2%	99.6	1%
L-Malic acid	134.0	87.8	5%	97.9	4%	100.0	0%	99.9	0%	99.8	0%	99.8	0%
Malic acid	134.0	86.8	6%	97.8	4%	100.0	0%	99.9	0%	99.8	0%	99.8	0%
Adenine	135.1	99.7	0%	98.9	0%	99.7	0%	99.6	0%	99.7	0%	99.5	0%
3-Hydroxybenzoic acid	138.0	87.2	6%	76.1	10%	85.2	7%	98.2	1%	78.3	15%	78.9	8%
4-Hydroxybenzoic acid	138.0	86.6	6%	76.7	11%	86.1	7%	98.9	0%	79.1	14%	79.6	7%
Salicylic acid	138.0	85.6	6%	76.5	11%	86.1	7%	98.9	0%	79.0	14%	79.6	7%
2,2-Dimethylsuccinic acid	146.1	53.1	26%	44.3	36%	49.7	29%	41.7	57%	49.9	30%	0.0	0%
2-Methylglutaric acid	146.1	63.1	23%	53.3	34%	63.8	15%	53.5	44%	66.8	22%	0.0	0%
Methylglutaric acid	146.1	54.4	25%	47.6	35%	54.9	25%	43.4	54%	56.1	20%	0.0	0%
L-Glutamic acid	147.1	88.7	4%	26.9	29%	92.1	3%	82.8	6%	81.5	3%	80.5	8%
Cinnamic acid	148.1	94.1	1%	98.4	1%	99.6	0%	90.3	2%	89.1	3%	88.7	2%
trans-Cinnamic acid	148.1	94.1	1%	98.4	1%	99.6	0%	90.3	2%	89.1	3%	88.7	2%
2,4-Dihydroxybenzoic acid	154.0	52.9	47%	24.0	118%	52.1	87%	27.3	121%	49.7	65%	0.0	0%
2,6-Dihydroxybenzoic acid	154.0	65.3	18%	28.7	93%	52.2	87%	29.2	111%	49.7	65%	0.0	0%
L-Histidine	155.1	63.8	23%	77.0	12%	70.5	17%	70.4	24%	67.0	23%	78.1	16%
Allantoin	158.0	99.3	0%	96.7	2%	99.9	0%	99.9	0%	99.7	0%	98.4	1%
Isovalerylglycine	159.1	52.7	0%	94.9	11%	99.0	0%	93.5	12%	94.2	13%	42.0	39%
3-Methyladipic acid	160.1	56.1	87%	87.5	16%	98.9	1%	84.0	41%	99.5	1%	87.7	13%
Pimelic acid	160.1	56.1	87%	87.5	16%	99.0	1%	82.8	41%	99.5	1%	87.8	13%
L-Phenylalanine	165.1	98.4	0%	98.5	0%	99.0	0%	98.4	0%	98.4	1%	94.6	10%
Suberic acid	174.1	30.5	62%	83.1	15%	99.2	0%	8.1	119%	13.0	78%	19.5	97%
Allantoic acid	176.1	0.0	0%	1.6	245%	73.9	41%	0.0	0%	0.0	0%	0.0	0%
Hippuric acid	179.1	97.5	1%	0.0	0%	84.9	4%	84.7	2%	84.0	3%	84.6	2%
L-Tyrosine	181.1	96.9	1%	96.8	1%	96.7	1%	96.6	1%	96.0	1%	95.9	1%
Hydroxyphenyllactic acid	182.1	98.9	1%	99.0	1%	99.7	0%	99.5	0%	99.6	0%	77.6	6%
3-Phosphoglyceric acid	186.0	52.4	42%	98.3	2%	99.9	0%	99.4	0%	97.5	2%	67.8	37%
Azelaic acid	188.1	77.7	26%	75.3	24%	67.6	20%	65.2	25%	77.4	27%	80.8	25%
Citric acid	192.0	99.4	0%	99.6	0%	0.0	0%	70.4	16%	99.7	0%	0.0	0%
Phenylacetylglycine	193.1	49.8	0%	99.9	0%	100.0	0%	99.9	0%	99.9	0%	100.0	0%
Galactonic acid	196.1	37.3	27%	90.4	6%	67.6	9%	76.1	15%	18.8	20%	44.7	28%
Gluconic acid	196.1	37.3	27%	90.5	6%	67.7	9%	76.4	15%	19.2	19%	45.2	27%
Sebacic acid	202.1	96.9	3%	99.6	0%	92.0	5%	92.3	3%	97.7	1%	89.0	4%
L-Tryptophan	204.1	85.6	5%	88.3	5%	84.8	6%	0.0	0%	84.9	6%	83.4	4%
Carnosine	226.1	76.2	10%	80.3	8%	84.8	2%	77.5	8%	80.5	6%	80.5	7%
D-Ribose 5-phosphate	230.0	10.7	97%	76.5	7%	85.3	4%	79.1	7%	73.7	9%	75.1	6%
Dodecanedioic acid	230.2	0.0	0%	61.7	67%	88.6	28%	97.0	1%	0.0	0%	0.0	0%
Uridine	244.1	84.6	12%	96.3	1%	80.2	5%	99.0	1%	78.4	13%	83.7	8%
Tetradecanedioic acid	258.2	94.2	5%	96.9	2%	95.7	5%	93.8	8%	86.3	25%	92.0	10%
Fructose 6-phosphate	260.0	25.1	15%	86.6	6%	99.4	0%	96.4	1%	49.2	11%	37.1	30%
Glucose 1-phosphate	260.0	0.0	0%	51.1	13%	84.6	8%	82.4	9%	3.5	158%	4.4	164%
Glucose 6-phosphate	260.0	24.9	14%	86.8	6%	99.4	0%	96.4	1%	47.9	11%	36.1	30%
Mannose 6-phosphate	260.0	23.3	14%	86.8	6%	99.3	0%	96.3	1%	43.4	11%	32.7	32%
Adenosine	267.1	99.3	0%	85.0	41%	99.0	1%	99.3	0%	99.1	0%	99.3	0%
Inosine	268.1	97.8	1%	98.0	1%	97.9	1%	98.7	0%	97.9	0%	98.1	0%
6-Phosphogluconic acid	276.0	45.5	31%	39.3	90%	50.7	56%	81.4	27%	39.6	56%	49.5	72%
Glutathione	307.1	82.5	10%	82.9	11%	0.0	0%	84.6	10%	92.6	4%	89.4	7%
Uridine 5'-monophosphate	324.0	74.1	2%	76.9	9%	90.1	12%	89.8	9%	79.1	11%	81.3	12%
Adenosine monophosphate	347.1	91.8	3%	0.0	0%	86.7	4%	96.1	5%	83.6	3%	85.3	4%
Inosinic acid	348.0	59.6	19%	81.1	7%	75.8	14%	51.3	17%	59.0	22%	61.7	20%
Uridine 5'-diphosphate	404.0	26.1	114%	9.3	193%	36.5	72%	24.8	89%	35.9	83%	51.1	20%
ADP	427.0	81.6	7%	13.7	66%	22.6	24%	95.4	1%	94.3	3%	95.8	1%
Flavin Mononucleotide	456.1	78.0	41%	78.3	24%	44.2	80%	67.9	51%	63.0	65%	53.1	76%
Glycocholic acid	465.3	98.1	0%	98.7	0%	98.8	0%	98.6	0%	98.8	0%	98.8	0%
Adenosine triphosphate	507.0	54.3	79%	96.3	3%	41.8	115%	84.5	41%	55.8	80%	85.8	29%
dGTP	507.0	53.7	80%	95.6	3%	41.6	115%	83.3	41%	54.7	80%	84.7	30%
Uridine diphosphate glucose	566.1	95.1	2%	92.4	3%	0.0	0%	93.3	2%	96.9	2%	97.1	0%

La figure représentant l'ensemble des métabolites (figure 178) a été divisée afin que chaque métabolite soit présent sur un seul graphique. Ceci permet de visualiser les modifications des scores librairie selon la méthode d'acquisition SWATH utilisée (SWATHgen, SWATHech, SWATHlitt, SWATHlib, SWATHcibex, SWATHcibint). Les graphiques ont été groupés selon l'évolution des scores librairie.

Le premier groupe (figure 180) concerne 10 métabolites pour lesquels le score est maximal selon toutes les méthodes d'acquisition. Cela signifie que toutes les méthodes utilisées (6 méthodes) sont équivalentes pour l'identification de ces 10 métabolites. Ces métabolites sont : l'adénine, l'adénosine, l'allantoin, la carnosine, l'acide lactique, l'acide glycocholique, l'inosine, la ketoleucine, la phénylalanine et la tyrosine. Les valeurs aberrantes n'ont pas été testées, selon Dixon, et elles sont présentes dans les graphiques. C'est le cas notamment de la phénylalanine.

Le second groupe comporte les graphiques de 15 métabolites pour lesquels une seule méthode varie des cinq autres (voir figure 181). Il s'agit de l'acide (R)-3-hydroxybutyrique, l'acide 2-méthylglutarique, l'acide 2,2-diméthylsuccinique, l'acide 3-hydroxybutyrique, l'AMP, le D-ribose 5-phosphate, le glutathion, l'acide hippurique, l'acide hydroxyphényllactique, l'acide glutamique, l'acide malique, le tryptophane, l'acide l-malique, la phénylacétylglycine et l'UDG. Le score libraire pour l'identification est diminué pour trois métabolites (< 80% contre >97% pour les autres méthodes). La méthode SWATHech ne peut pas identifier deux métabolites (AMP et acide hippurique). Pour l'acide glutamique, le score est diminué par rapport aux autres méthodes. Le glutathion et l'UDG ne sont pas identifiés par la méthode SWATHlitt, et le tryptophane n'est pas repéré par la méthode SWATHlib. SWATHcibint n'obtient pas de score de 0, ni de diminution de celui-ci par rapport aux autres méthodes. Enfin SWATHcibex n'identifie pas l'acide 2,2 diméthylsuccinique et le 2-méthyglutarique, le score est diminué pour l'acide hydroxyphényllactique, en comparaison avec des scores obtenus pour les autres méthodes d'acquisition.

Le groupe 3 est composé de 12 métabolites, les scores d'identification sont très variables et il n'est pas possible de différencier ces méthodes (figure 182).

Le groupe 4 est composé de métabolites pour lesquels le comportement du score est variable et intermédiaire (ni 0% ni 100%), selon certaines méthodes d'acquisitions.

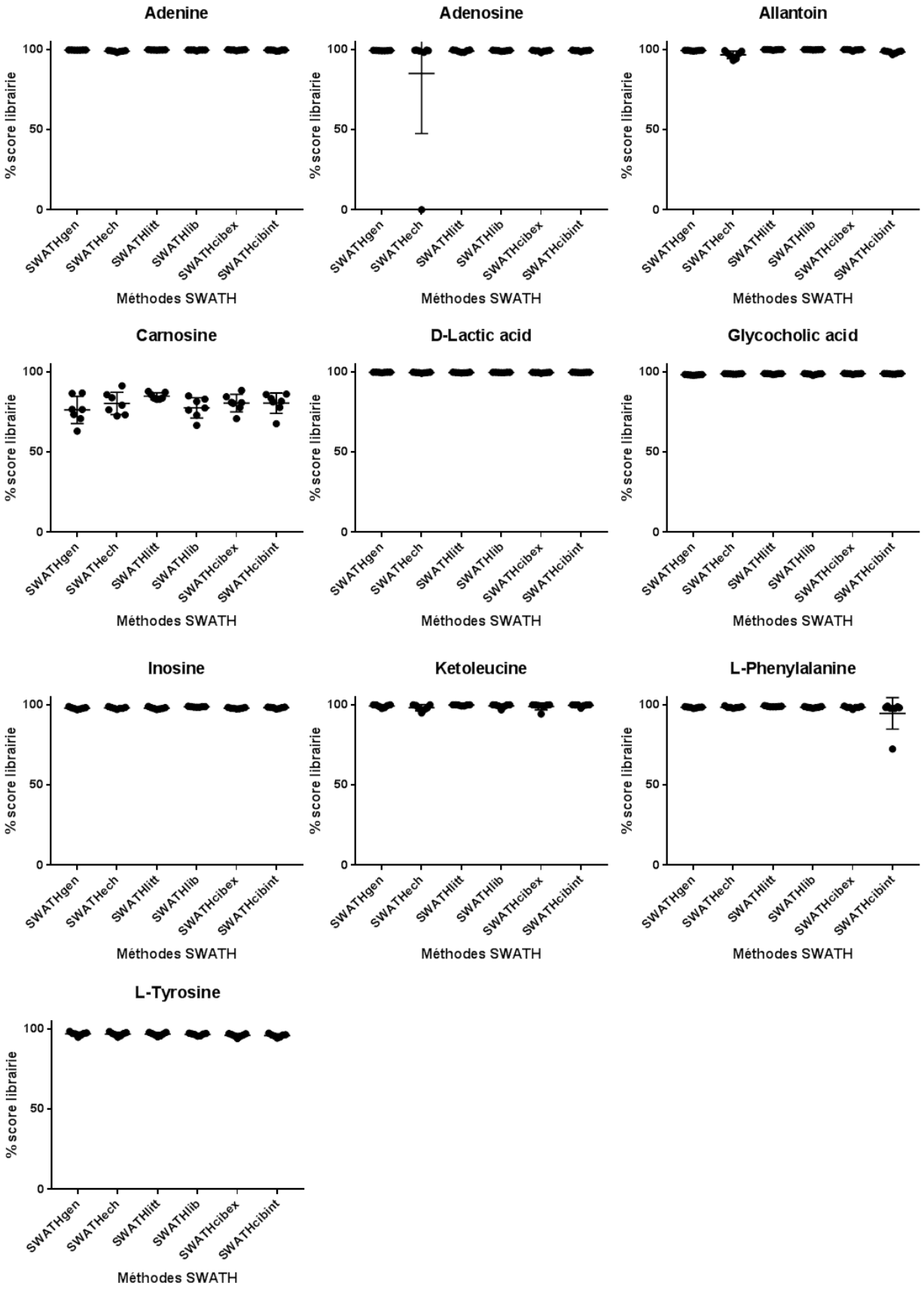


Figure 180 : Groupe 1, graphiques des scores d'identification selon la librairie pour 10 métabolites présentant une identification maximale pour toutes les méthodes d'acquisition utilisées

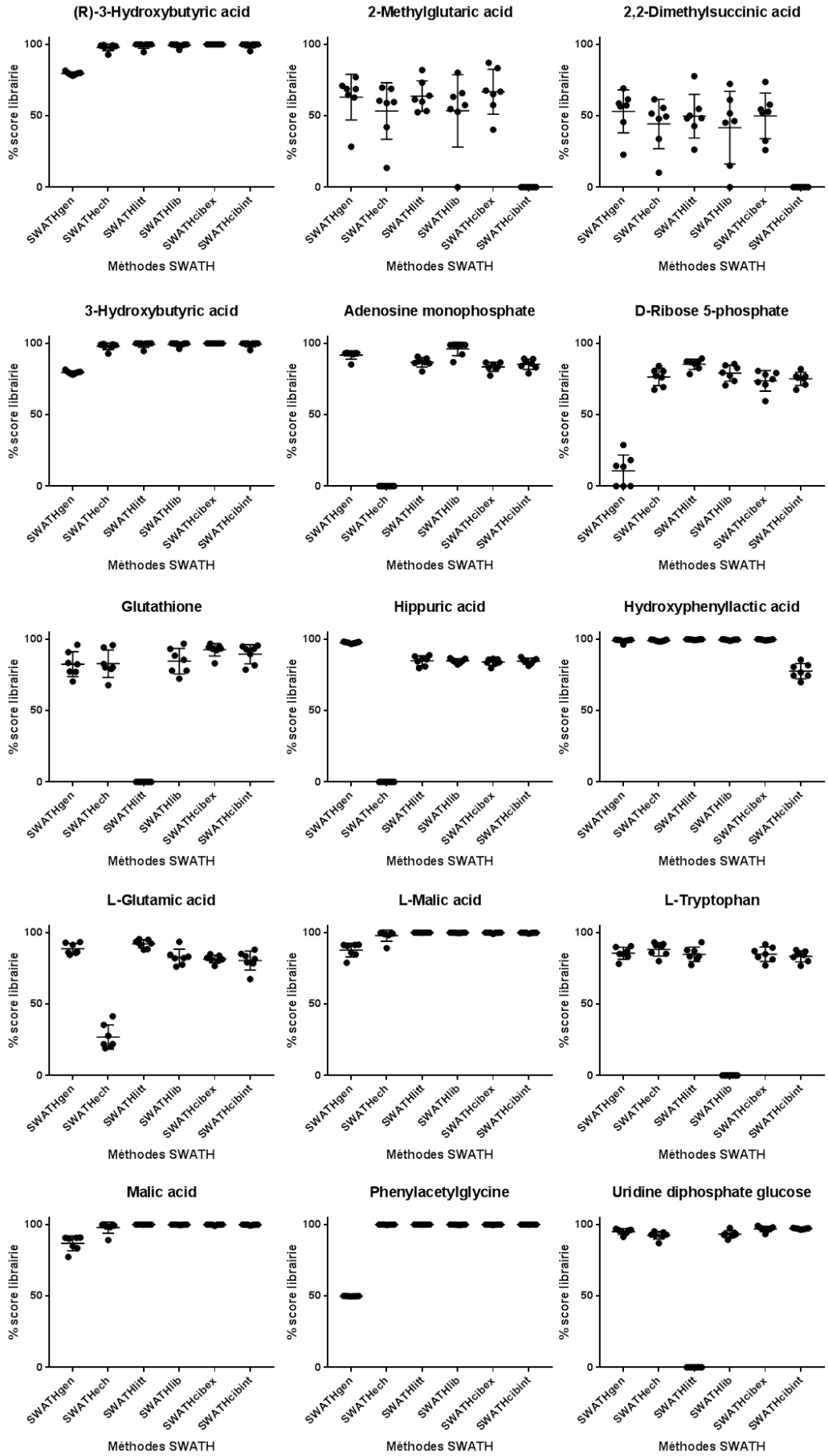


Figure 181 : Groupe 2, graphiques des scores d'identification selon la librairie pour 15 métabolites présentant un score d'identification similaire pour toutes les méthodes d'acquisition utilisées, à l'exception d'une méthode.

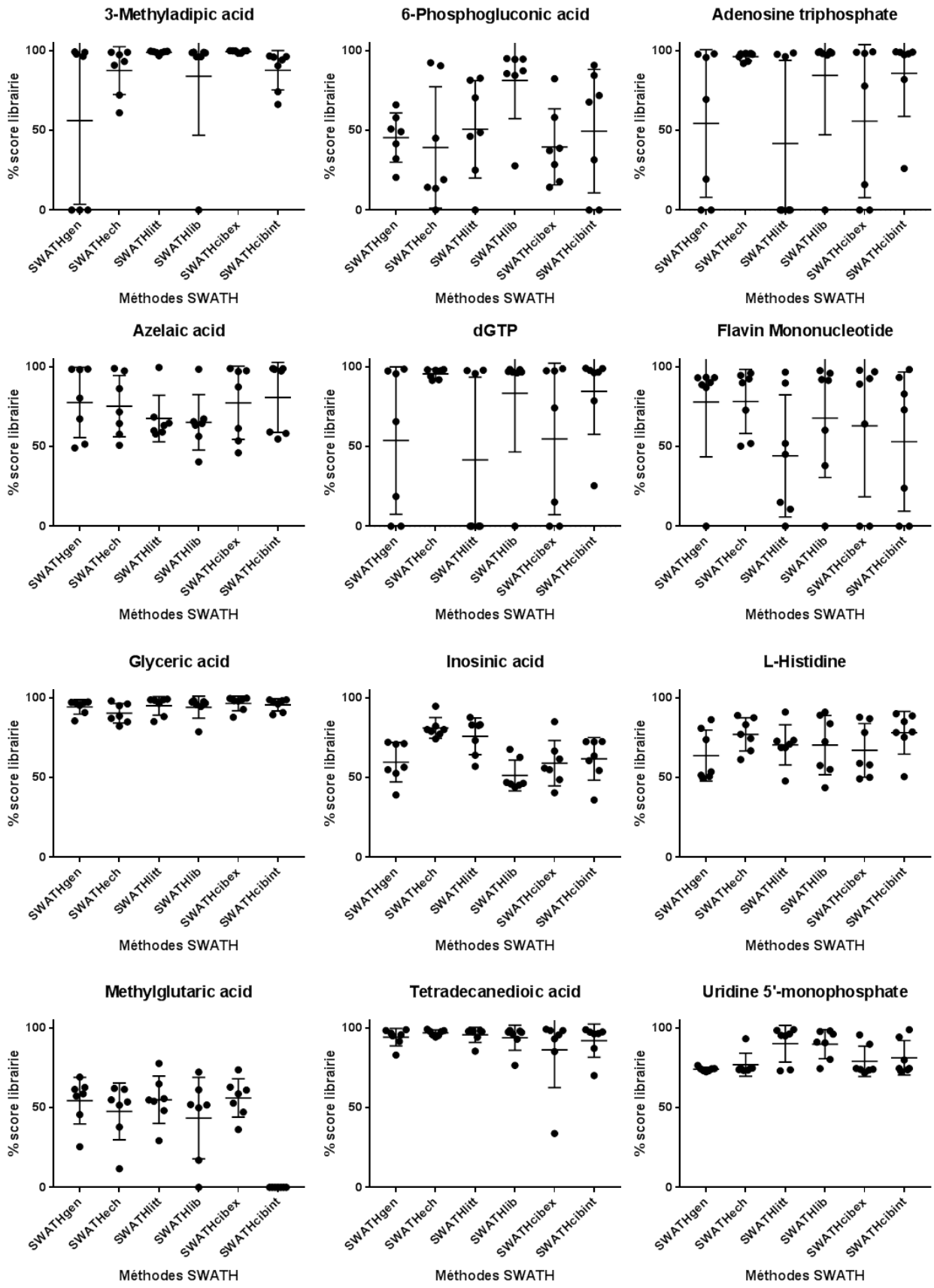


Figure 182 : Groupe 3, graphiques des scores d'identification selon la librairie pour 12 métabolites présentant un score d'identification similaire pour toutes les méthodes d'acquisition, ainsi qu'une plus grande variabilité en comparaison du groupe 1 (~0%).

L'acide allantoïque n'est identifié que selon la méthode d'acquisition SWATHlitt.

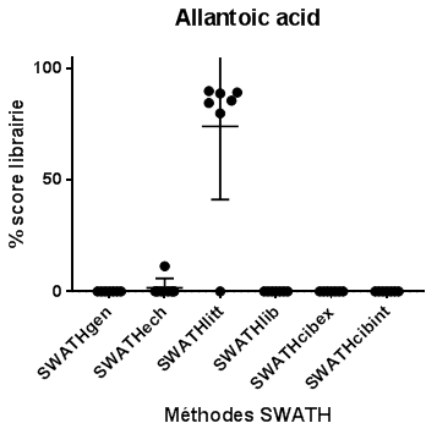


Figure 183: Graphique des scores d'identification librairie selon les méthodes d'acquisition SWATH pour l'acide allantoïque

Le cas de l'ADP, du fructose 6P et de l'acide gluconique, provenant du groupe 4 seront développés (figure 183).

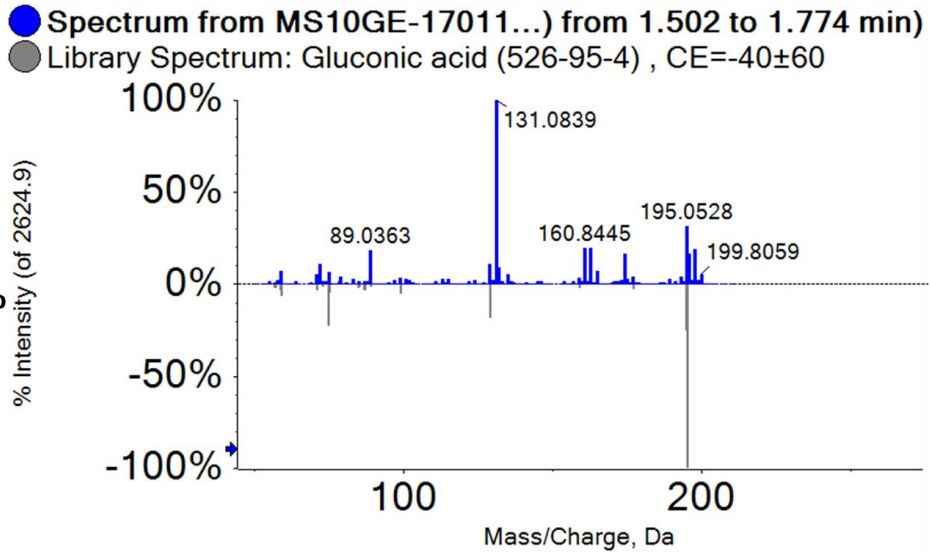


Figure 184: Métabolites étudiés pour leur variation du score d'identification selon la méthode d'acquisition SWATH utilisée

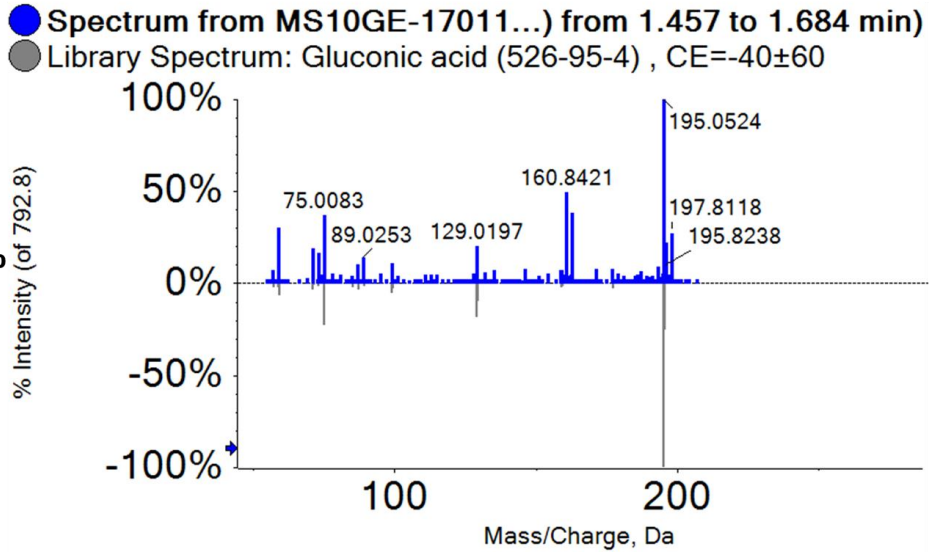
Les variations des scores d'identification pour l'ADP, ainsi que pour le fructose 6P, sont dues à l'identification de faux positifs. Il s'avère que la masse de ces composés se trouve dans le recouvrement de 1 m/z entre deux fenêtres SWATH. Le logiciel, ne sachant pas gérer cette particularité, va utiliser la fenêtre inadéquate pour mener l'identification. Le métabolite sera donc déterminé dans la mauvaise fenêtre. En ce qui concerne l'acide gluconique, les variations dans les scores d'identification librairie obtenus sont dues à la présence d'autres espèces dans la même fenêtre SWATH, ce qui diminue le score d'identification. Ce phénomène est représenté à la figure suivante.

Comparaison des scores librairie des spectres expérimentaux de l'acide gluconique (195 m/z)

SWATHcibex Score de 22.5%



SWATHech Score de 92.2%



La présence d'un fragment de m/z de 131.08 diminue comparativement l'intensité des fragments appartenant à l'acide gluconique et diminue le score d'identification en passant d'une moyenne de 92.5 ± 6% à un score de 19.2 ± 19%. C'est pourquoi la taille des fenêtres SWATH va modifier les scores d'identification librairie selon la complexité du spectre obtenu. La complexité (et le bruit) du spectre ne peut changer qu'en réalisant une adaptation de la taille de la fenêtre SWATH à la problématique rencontrée.

La figure 179 illustre le fait que de nombreux ions identifiés se trouvent dans la gamme de masse de 80-220 *m/z*.

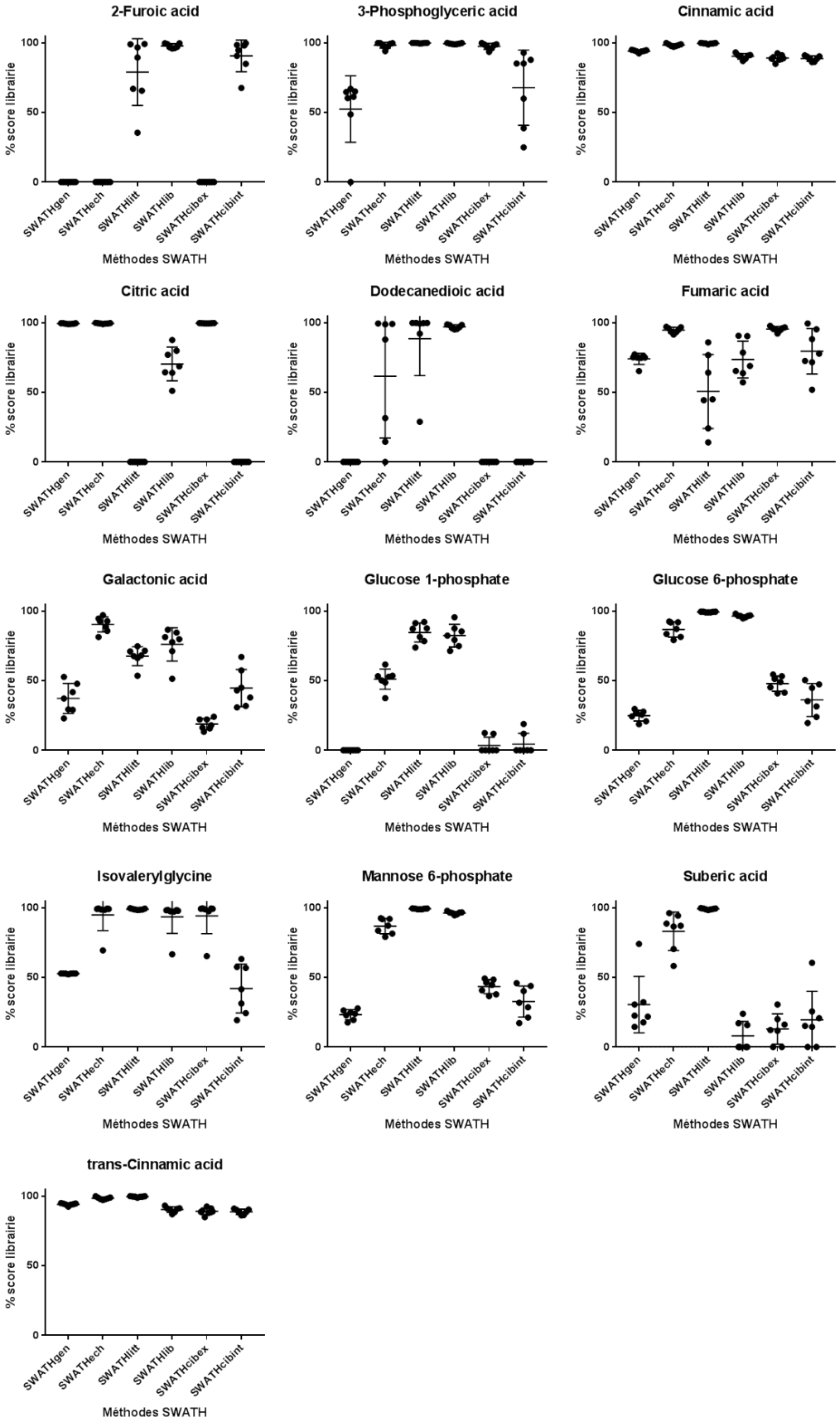


Figure 185: Groupe 4, graphiques des scores d'identification selon la librairie pour 13 métabolites présentant un score d'identification différent selon les méthodes d'acquisition.

Enfin, le groupe 5 est un mélange de comportements du score d'identification librairie. La figure 186 présente les graphiques des métabolites concernés.

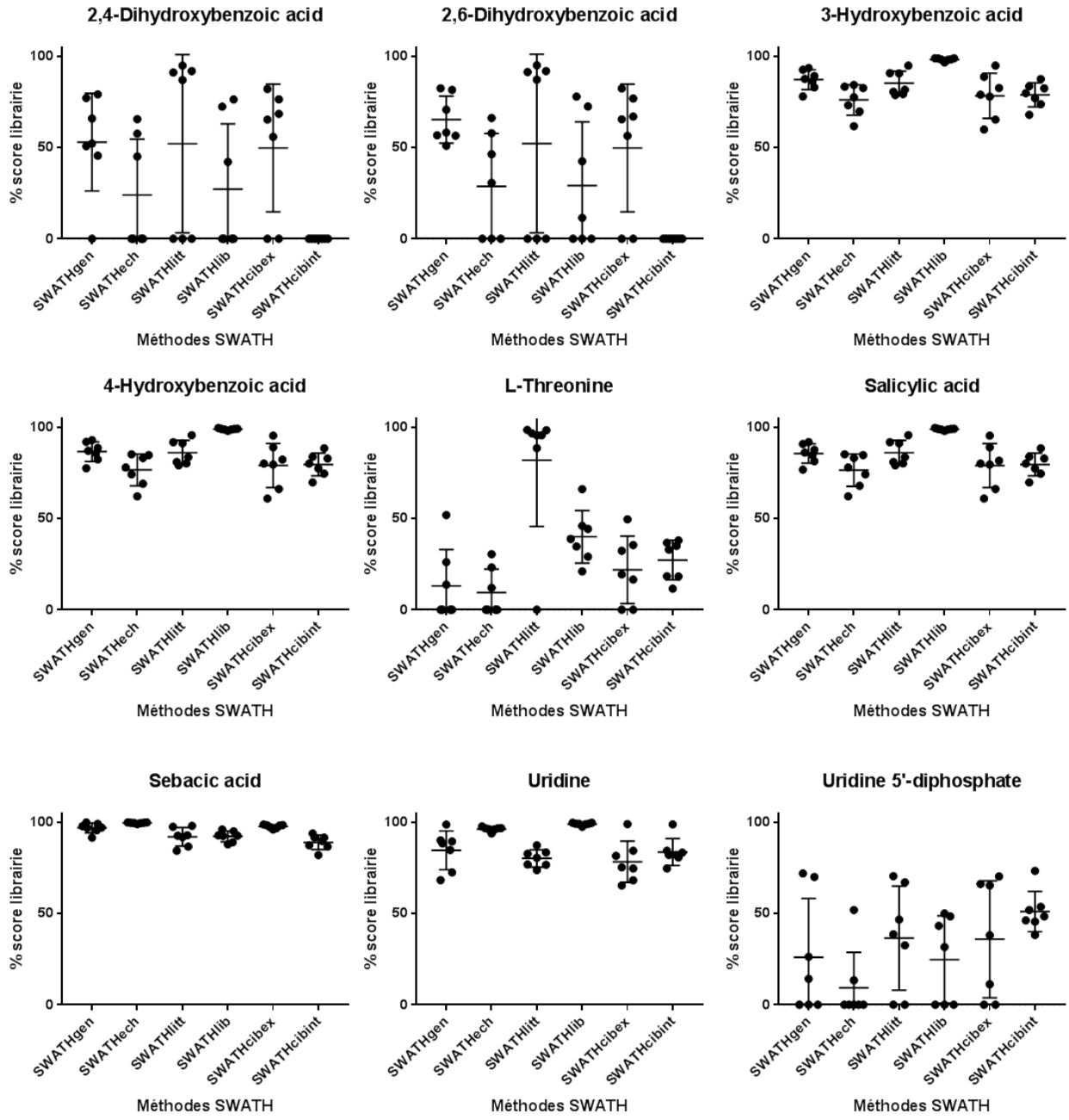


Figure 186: Groupe 5, graphiques des scores d'identification selon la librairie pour 9 métabolites présentant un score d'identification variable selon les méthodes d'acquisition.

5. Conclusions et perspectives du chapitre 4

Plusieurs approches ont été envisagées pour la création de fenêtres SWATH. Il s'avère que la recherche librairie des données acquises, selon des fenêtres génériques, et selon des fenêtres adaptées à l'échantillon (SWATHgen et SWATHech), mène à l'identification de 46 métabolites. Cette liste, lorsqu'elle est insérée dans la plage de recherche de MasterView, amène à la conclusion que la méthode basée sur l'échantillon (SWATHech) donne le meilleur résultat (une moyenne de 41.2 métabolites trouvés sur 46 recherchés). Si on étend cette recherche de base aux méthodes SWATHgen, SWATHech, SWATHlib et SWATHlitt pour la détermination du nombre de métabolites trouvés, on obtient un nombre de 64 métabolites uniques identifiés. Dans ce cas présent, c'est la méthode SWATHlib qui obtient le meilleur score avec une moyenne de 47.6 métabolites identifiés. Une problématique ciblée sur 6 métabolites appartenant au cycle de Krebs a été étudiée. En effet, deux méthodes dites « ciblées » étaient créées spécifiquement pour cette approche. Il s'avère que ces approches souffrent d'un problème lié au logiciel, qui ne sélectionne pas de manière judicieuse la fenêtre à exploiter.

La création de méthodes SWATH à fenêtres variables offre un avantage en termes d'identification, si elle est élaborée selon la problématique posée. Par exemple, les fenêtres unitaires intégrées dans la méthode peuvent être insérées dans le but de cibler spécifiquement un nombre restreint de métabolites. Cependant, dans le cadre d'une identification en fonction de connaissances préétablies, dans une base de données telle qu'une librairie, il est avantageux de créer une méthode adaptée à ces connaissances, afin d'en améliorer l'identification. Il existe peu de logiciels, qui permettent de traiter les données produites par les méthodes d'acquisition SWATH, sauf, par exemple, MSDial qui est actuellement open source [3].

L'alignement des fragments est déjà largement utilisé en protéomique, notamment via les logiciels Open SWATH et mProphet, ou encore Skyline [4, 5]. Ceci permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité des ions fragments utilisés pour l'identification.

Les instruments utilisés dans le domaine de la spectrométrie de masse permettent de réaliser des analyses selon de nombreux modes.

. Malheureusement, les logiciels d'acquisition des données et de traitement de ces mêmes données ne supportent pas autant d'informations. En effet, le schedulded variable SWATH, c'est-à-dire la création de fenêtres variant de taille, à la fois selon l'axe *m/z,* et selon le temps de rétention, serait une avancée majeure dans l'acquisition des données. Une esquisse de cette possibilité a été développée par T. Bruderer [1], qui contourne les propriétés de création des méthodes d'acquisition, et sépare l'analyse chromatographique en quatre méthodes d'acquisition en série. Il y a cependant une rupture dans l'acquisition, et une possible perte d'information lors du passage d'une méthode à l'autre. Le but serait donc d'avoir un logiciel capable de supporter des fenêtres variables selon la complexité de l'échantillon tout au long de la séquence chromatographique. Les avancées en métabolomique basculent de plus en plus de l'analyse ciblée vers la métabolomique non ciblée [6]. C'est grâce à des technologies comme le SWATH que ces avancées sont possibles.

Il reste donc encore de nombreux défis à relever, tant au niveau du développement de logiciels capables de supporter des données de plus en plus complexes qu'en termes de possibilités d'identification.

6. Références du chapitre 4

1. Zhang, Y., et al., *The Use of Variable Q1 Isolation Windows Improves Selectivity in LC-SWATH-MS Acquisition.* J Proteome Res, 2015. **14**(10): p. 4359-71.
2. Systems, P., *Understanding Additives: Heparin.* LabNotes a newsletter from BD Diagnostics, 2004. **14**(1).
3. Tsugawa, H., et al., *MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis.* Nat. Methods, 2015. **12**(6): p. 523-526.
4. Roest, H.L., et al., *OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data.* Nat. Biotechnol., 2014. **32**(3): p. 219-223.
5. Bilbao, A., et al., *Processing strategies and software solutions for data-independent acquisition in mass spectrometry.* Proteomics, 2015. **15**(5-6): p. 964-980.
6. Rochat, B., *From targeted quantification to untargeted metabolomics: Why LC-high-resolution-MS will become a key instrument in clinical labs.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2016: p. Ahead of Print.

7. Annexes

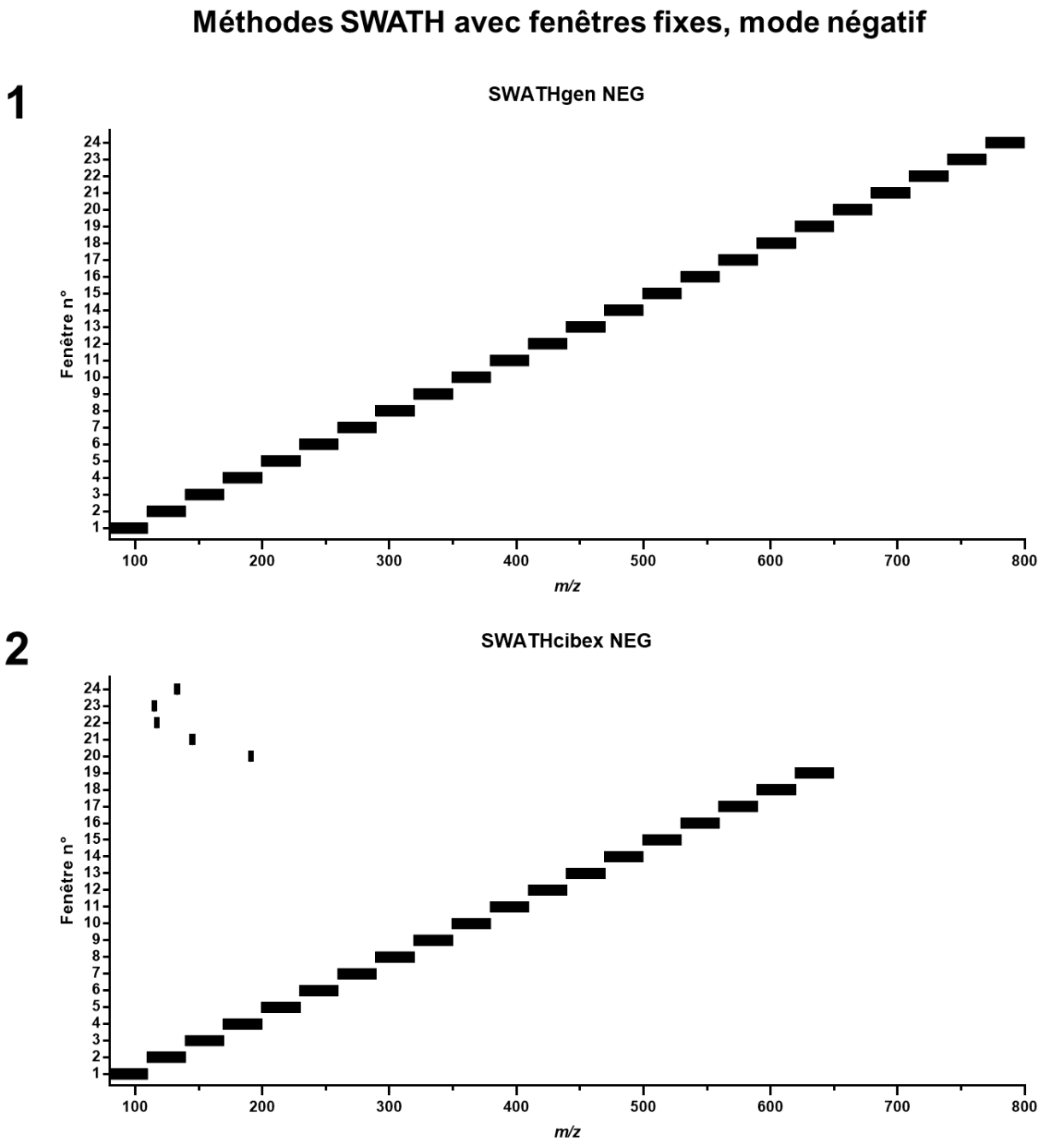


Figure 187: Méthodes SWATH avec des fenêtres de taille équivalente (SWATHgen) ou additionnées de fenêtres unitaires pour les composés ciblés appartenant au cycle de Krebs (acide citrique, malique, succinique, fumarique, oxoglutarique) (SWATHcibex) mode négatif

Méthodes SWATH avec fenêtres variables selon des bases de données, mode négatif

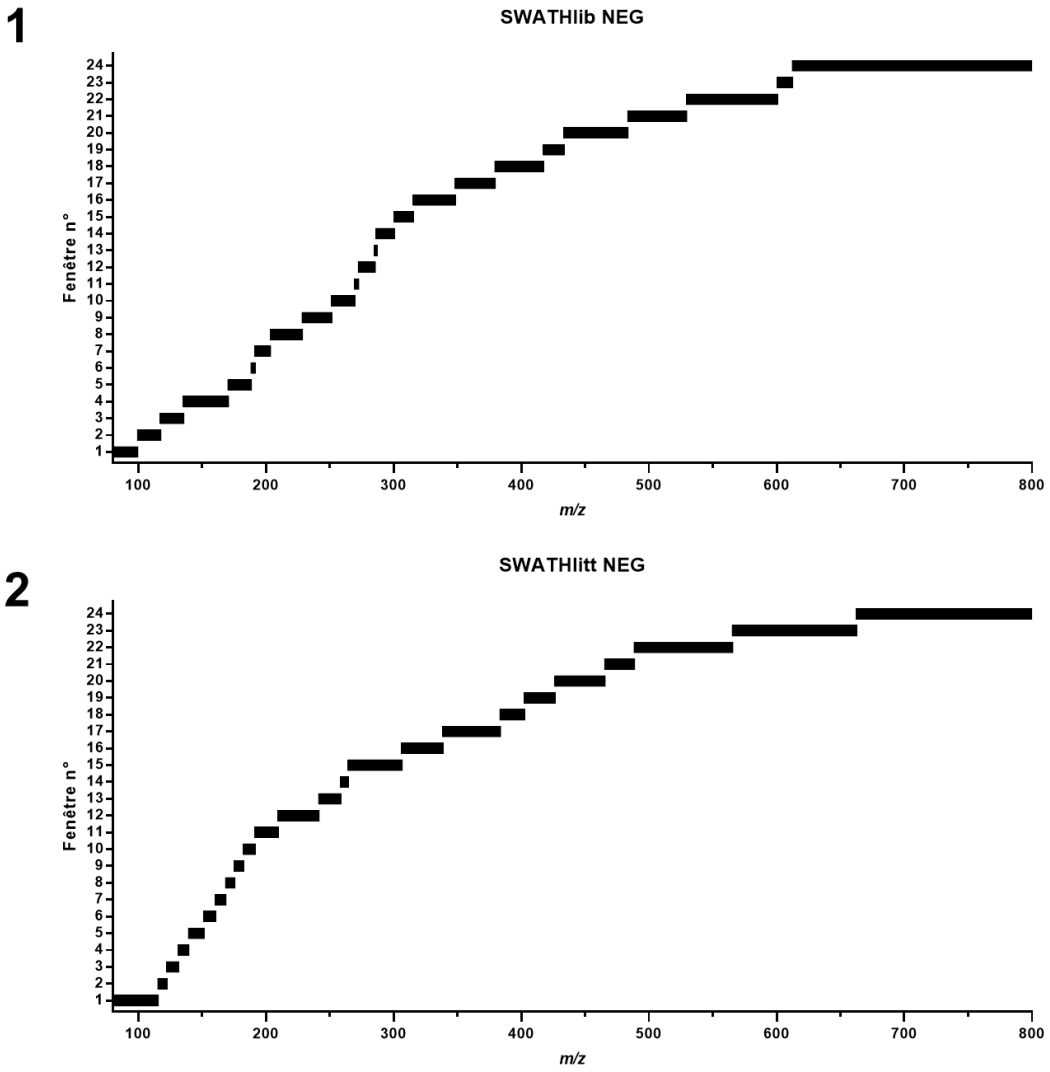


Figure 188: Méthodes SWATH créées à partir des connaissances inclues dans la littérature (SWATHlitt) ou selon la base de données créée en interne AMML (SWATHlib) mode négatif

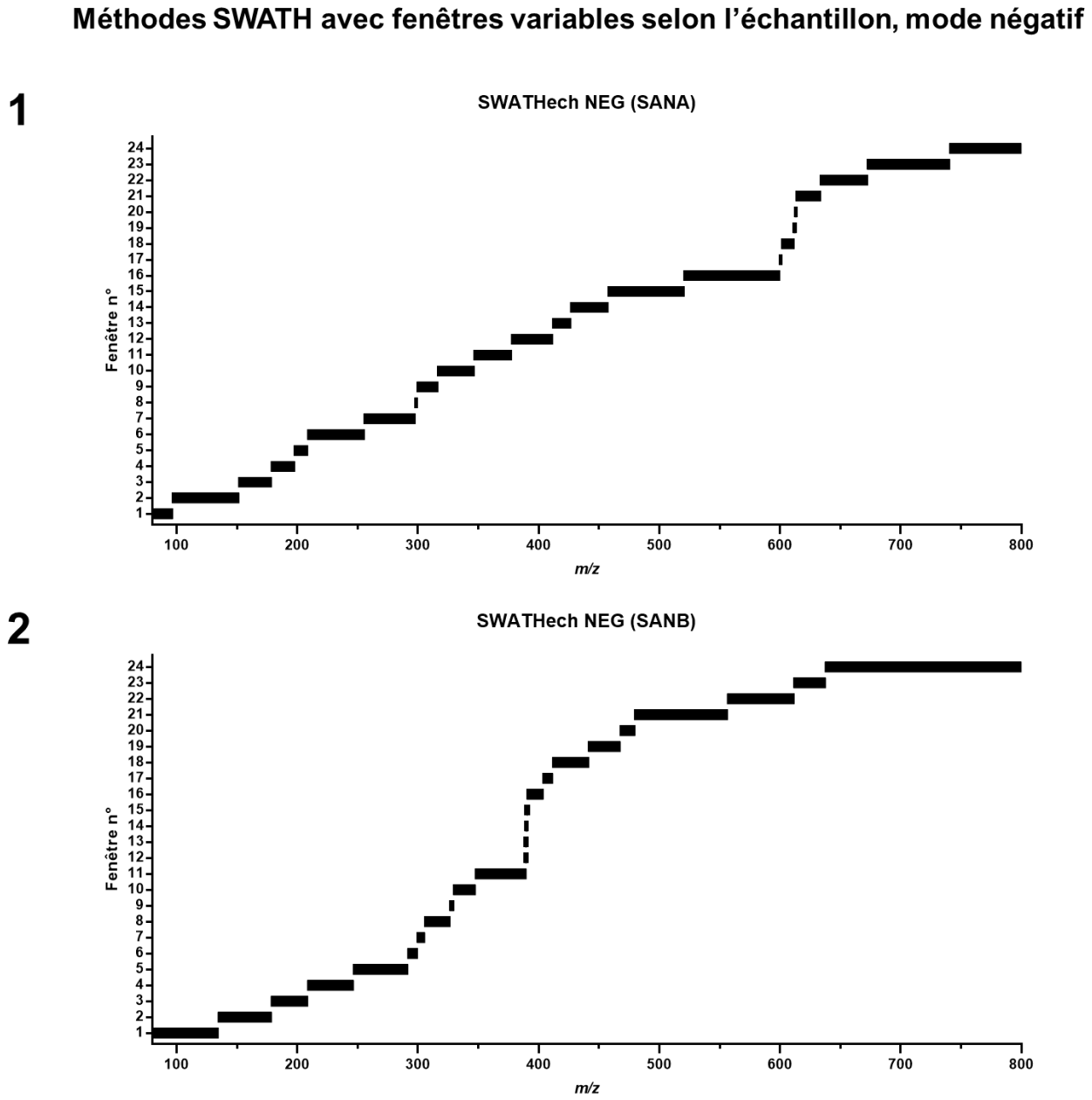


Figure 189: : Méthodes SWATH avec fenêtres variables selon l'échantillon et selon la chromatographie acide ou basique SWATHech, mode négatif

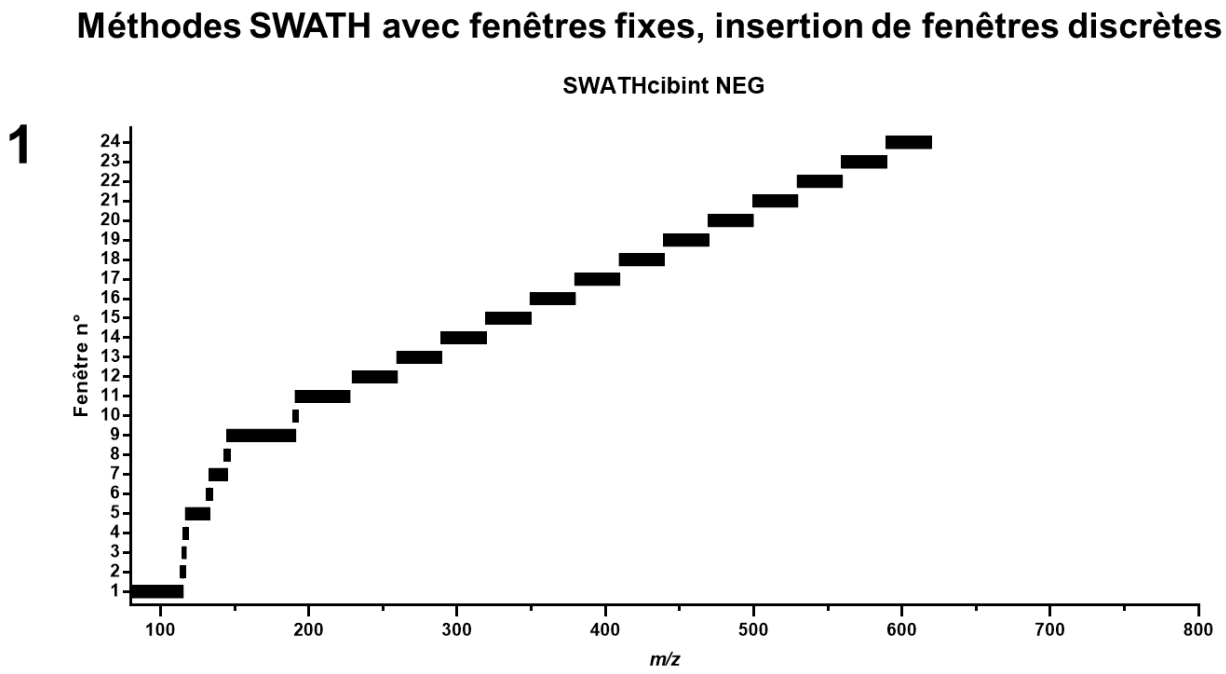


Figure 190: Méthode SWATH avec intégration des composés d'intérêt appartenant au cycle de l'acide citrique (acide citrique, malique, succinique, fumarique, oxoglutarique) SWATHcibint mode négatif

Tableau 36: Valeurs pour la création des fenêtres SWATH en mode positif

Méthode SWATHgen (générique) POS			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	110	30
3	109	140	31
4	139	170	31
5	169	200	31
6	199	230	31
7	229	260	31
8	259	290	31
9	289	320	31
10	319	350	31
11	349	380	31
12	379	410	31
13	409	440	31
14	439	470	31
15	469	500	31
16	499	530	31
17	529	560	31
18	559	590	31
19	589	620	31
20	619	650	31
21	649	680	31
22	679	710	31
23	709	740	31
24	739	770	31
25	769	800	31

Méthode SWATHcibex (ciblé externe) POS			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	110	30
3	109	140	31
4	139	170	31
5	169	200	31
6	199	230	31
7	229	260	31
8	259	290	31
9	289	320	31
10	319	350	31
11	349	380	31
12	379	410	31
13	409	440	31
14	439	470	31
15	469	500	31
16	499	530	31
17	529	560	31
18	559	590	31
19	589	620	31
20	619	650	31
21	192.5	193.5	1
22	146.5	147.5	1
23	118.5	119.5	1
24	116.5	117.5	1
25	134.5	135.5	1

Méthode SWATHech SAPA (échantillon) POS ACIDE			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	100	20
3	99	121	22
4	120	160	40
5	159	170	11
6	169	189	20
7	188	199	11
8	198	211	13
9	210	247	37
10	246	274	28
11	273	295	22
12	294	308	14
13	307	308	1
14	307	309	2
15	308	349	41
16	348	389	41
17	388	476	88
18	475	539	64
19	538	602	64
20	601	614	13
21	613	615	2
22	614	616	2
23	615	656	41
24	655	720	65
25	719	800	81

Méthode SWATHech SAPB (échantillon) POS BASIQUE			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	101	21
3	100	119	19
4	118	137	19
5	136	172	36
6	171	190	19
7	189	193	4
8	192	205	13
9	204	230	26
10	229	253	24
11	252	271	19
12	270	274	4
13	273	287	14
14	286	288	2
15	287	302	15
16	301	317	16
17	316	350	34
18	349	381	32
19	380	419	39
20	418	435	17
21	434	485	51
22	484	531	47
23	530	602	72
24	601	614	13
25	613	800	187

Méthode SWATHlitt (littérature) POS			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	105	25
3	104	115	11
4	114	121	7
5	120	131	11
6	130	134	4
7	133	137	4
8	136	148	12
9	147	153	6
10	152	167	15
11	166	176	10
12	175	186	11
13	185	191	6
14	190	210	20
15	209	242	33
16	241	260	19
17	259	269	10
18	268	292	24
19	291	324	33
20	323	340	17
21	339	357	18
22	356	400	44
23	399	526	127
24	525	689	164
25	688	800	112

Méthode SWATHlib (librairie) POS			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	106	26
3	105	119	14
4	118	131	13
5	130	134	4
6	133	140	7
7	139	149	10
8	148	154	6
9	153	162	9
10	161	168	7
11	167	174	7
12	173	179	6
13	178	183	5
14	182	191	9
15	190	200	10
16	199	220	21
17	219	244	25
18	243	269	26
19	268	286	18
20	285	299	14
21	298	332	34
22	331	349	18
23	348	394	46
24	393	501	108
25	500	800	300

Méthode SWATHcibint (ciblé interne) POS			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	117.5	37.5
3	116.5	117.5	1
4	116.5	119.5	3
5	118.5	119.5	1
6	118.5	135.5	17
7	134.5	135.5	1
8	134.5	147.5	13
9	146.5	147.5	1
10	146.5	193.5	47
11	192.5	193.5	1
12	192.5	230	37.5
13	229	260	31
14	259	290	31
15	289	320	31
16	319	350	31
17	349	380	31
18	379	410	31
19	409	440	31
20	439	470	31
21	469	500	31
22	499	530	31
23	529	560	31
24	559	590	31
25	589	620	31

Tableau 37: Valeurs pour la création des fenêtres SWATH en mode négatif

Méthode SWATHgen (générique) NEG			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	110	30
3	109	140	31
4	139	170	31
5	169	200	31
6	199	230	31
7	229	260	31
8	259	290	31
9	289	320	31
10	319	350	31
11	349	380	31
12	379	410	31
13	409	440	31
14	439	470	31
15	469	500	31
16	499	530	31
17	529	560	31
18	559	590	31
19	589	620	31
20	619	650	31
21	649	680	31
22	679	710	31
23	709	740	31
24	739	770	31
25	769	800	31

Méthode SWATHcibex (ciblé externe) NEG			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	110	30
3	109	140	31
4	139	170	31
5	169	200	31
6	199	230	31
7	229	260	31
8	259	290	31
9	289	320	31
10	319	350	31
11	349	380	31
12	379	410	31
13	409	440	31
14	439	470	31
15	469	500	31
16	499	530	31
17	529	560	31
18	559	590	31
19	589	620	31
20	619	650	31
21	190.5	191.5	1
22	144.5	145.5	1
23	116.5	117.5	1
24	114.5	115.5	1
25	132.5	133.5	1

Méthode SWATHech SANA (échantillon) NEG ACIDE			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	97	17
3	96	152	56
4	151	179	28
5	178	198	20
6	197	209	12
7	208	256	48
8	255	298	43
9	297	300	3
10	299	317	18
11	316	347	31
12	346	378	32
13	377	412	35
14	411	427	16
15	426	458	32
16	457	521	64
17	520	600	80
18	599	602	3
19	601	612	11
20	611	613	2
21	612	614	2
22	613	634	21
23	633	673	40
24	672	741	69
25	740	800	60

Méthode SWATHech SANB (échantillon) NEG BASIQUE			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	135	55
3	134	179	45
4	178	209	31
5	208	247	39
6	246	292	46
7	291	300	9
8	299	306	7
9	305	327	22
10	326	330	4
11	329	348	19
12	347	390	43
13	389	390	1
14	389	390	1
15	389	391	2
16	390	391	1
17	390	404	14
18	403	412	9
19	411	442	31
20	441	468	27
21	467	480	13
22	479	557	78
23	556	612	56
24	611	638	27
25	637	800	163

Méthode SWATHlitt (littérature) NEG			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	116	36
3	115	123	8
4	122	132	10
5	131	140	9
6	139	152	13
7	151	161	10
8	160	169	9
9	168	176	8
10	175	183	8
11	182	192	10
12	191	210	19
13	209	242	33
14	241	259	18
15	258	265	7
16	264	307	43
17	306	339	33
18	338	384	46
19	383	403	20
20	402	427	25
21	426	466	40
22	465	489	24
23	488	566	78
24	565	663	98
25	662	800	138

Méthode SWATHlib (librairie) NEG			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	100	20
3	99	118	19
4	117	136	19
5	135	171	36
6	170	189	19
7	188	192	4
8	191	204	13
9	203	229	26
10	228	252	24
11	251	270	19
12	269	273	4
13	272	286	14
14	285	287	2
15	286	301	15
16	300	316	16
17	315	349	34
18	348	380	32
19	379	418	39
20	417	434	17
21	433	484	51
22	483	530	47
23	529	601	72
24	600	613	13
25	612	800	188

Méthode SWATHcibint (ciblé interne) NEG			
Expérience n°	*m/z* début	*m/z* fin	Largeur *m/z*
2	80	115.5	35.5
3	114.5	115.5	1
4	114.5	117.5	3
5	116.5	117.5	1
6	116.5	133.5	17
7	132.5	133.5	1
8	132.5	145.5	13
9	144.5	145.5	1
10	144.5	191.5	47
11	190.5	191.5	1
12	190.5	228	37.5
13	229	260	31
14	259	290	31
15	289	320	31
16	319	350	31
17	349	380	31
18	379	410	31
19	409	440	31
20	439	470	31
21	469	500	31
22	499	530	31
23	529	560	31
24	559	590	31
25	589	620	31

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

Table des matières - Chapitre 5

1. Introduction générale du chapitre 5 355
1.1. Les enjeux de la préparation d'échantillons pour les métabolites polaires 355
1.2. La séparation par chromatographie liquide des métabolites polaires et leur quantification 356
1.3. L'utilisation du SWATH et des fenêtres variables pour l'augmentation de la sélectivité et l'amélioration de l'identification 357
1.4. La place des bases de données en métabolomique 358
1.5. Approche holistique de la mise en évidence d'un phénotype 359
1.6. Le mythe de la stratégie unique pour l'analyse métabolomique complète et exhaustive 361
1.7. Vers une approche quantitative et qualitative de l'analyse des métabolites 361
1.8. La métabolomique au service de la médecine personnalisée 362

1. Introduction générale du chapitre 5

Ce chapitre résume les points importants abordés dans cette thèse. Cette conclusion ne se veut pas exhaustive, mais permet de cibler les éléments essentiels qui ont été mis en évidence au travers des différents chapitres. Une conclusion plus détaillée est présente à la fin de chaque chapitre, et pour chaque partie traitée. Les paragraphes 1.1 à 1.3 sont des conclusions et perspectives plus générales portant sur les chapitres 2 à 4. Les paragraphes suivants (1.4 à 1.9) ouvrent la discussion sur des thèmes plus variés liés à la métabolomique, tels que la place des bases de données ou les perspectives en rapport avec la médecine personnalisée.

1.1. Les enjeux de la préparation d'échantillons pour les métabolites polaires

La préparation d'échantillons, testée dans le cadre de cette thèse, repose sur l'extraction liquide-liquide des métabolites à l'aide d'une étape de lyse cellulaire. Les cellules d'algues sont utilisées comme modèle, comportant une membrane cellulaire robuste pour déterminer la meilleure façon de récupérer le contenu intracellulaire.

En vue de déterminer la qualité d'extraction des métabolites polaires de quatre préparations d'échantillons basées sur l'extraction liquide-liquide par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide, plusieurs types de matrices (algues, cellules hépatiques et cellules sanguines) ont été testées. Les métabolites polaires appartiennent à une large gamme de composés (propriétés physico-chimiques, molécules acides, neutres, basiques) ce qui rend difficile l'extraction de l'ensemble de ces composés. Il a été déterminé que la rapidité de préparation d'échantillon était essentielle afin d'éviter la dégradation des métabolites polaires sensibles. La première extraction liquide-liquide des érythrocytes à l'aide d'un mélange polaire (eau-méthanol) favorise l'extraction de protéines solubles telles que l'hémoglobine. La présence de cette protéine n'est pas souhaitée. La première stratégie, à la fois exploratoire et globale, donne des informations générales sur la qualité des préparations d'échantillons. Cette approche a été effectuée avec l'utilisation statistique des analyses en composantes principales supervisées et non-supervisées. Cependant une seconde stratégie, selon laquelle des métabolites polaires sont identifiés sur la base de la librairie AMML, a été utilisée. Les préparations d'échantillons sont différenciées par analyse statistique pour déterminer la répartition des métabolites

identifiés. Bien que cette dernière stratégie ne repose que sur un nombre restreint de métabolites (39), elle permet néanmoins d'obtenir une tendance et des informations précieuses sur la qualité des préparations d'échantillon testées. Les meilleurs paramètres déterminés ont ensuite été appliqués à une étude d'exposition d'algues à différentes concentrations de cuivre libre dans le milieu extracellulaire. Neuf métabolites ont été identifiés comme ayant une variation de leur concentration selon les concentrations de cuivre. Il s'agit de l'adénosine monophasphate, du 5'methylthioadénosine, de l'acide glutamique, de l'uridine diphosphate glucose, de l'acide alphalinoléique, de l'uridine, de la guanosine/deoxyguanosine (non séparées par MS) de l'arginine et de l'acide succinique.

1.2. La séparation par chromatographie liquide des métabolites polaires et leur quantification

La chromatographie liquide en phase inverse est la technique la plus largement utilisée. Elle a prouvé sa robustesse, sa reproductibilité, et ses capacités générales séparatives. Ses mécanismes de séparation sont extensivement étudiés. Cependant, en ce qui concerne les métabolites polaires, cette méthode se révèle peu adaptée. Le début d'un gradient en chromatographie inverse est souvent constitué d'un pourcentage élevé de solvant aqueux. Toutefois, le développement des chaînes alkyles greffées sur la silice n'est pas optimal lorsque la phase mobile est entièrement aqueuse, ce qui revient souvent à observer la présence de métabolites polaires dans le temps mort. Enfin des problèmes de solubilité des métabolites polaires (reconstitués dans un solvant apolaire afin d'éviter un élargissement des pics en chromatographie inverse) peuvent apparaître.

Le but de l'étude des métabolites polaires est leur identification et quantification. C'est pourquoi d'autres systèmes possédant d'autres types de mécanismes de rétention, ont été envisagés. La HILIC est de plus en plus répandue en chromatographie liquide, et est souvent associée à la phase inverse, afin de donner une dimension de séparation supplémentaire. Elle souffre cependant d'un manque de reproductibilité en ce qui concerne le temps de rétention, ceci sur un grand nombre d'heures d'analyses. L'étape de rééquilibration est souvent bien plus longue qu'elle n'est dans la phase inverse. Cette technique utilise en outre de grandes quantités de solvants apolaires, ce qui est moins souhaitable pour l'environnement. Les pics chromatographiques sont en outre souvent traînants et larges à mi-hauteur (de l'ordre de la minute). La HILIC n'a pas été testée de façon extensive dans cette thèse, car une autre solution au manque de rétention a été envisagée : la paire d'ions a amené une solution rapide et simple d'utilisation sur des

colonnes C_{18} conventionnelles dédiées à cet usage. Des métabolites polaires sélectionnés pour leur rôle dans les cascades cellulaires ont été quantifiés dans plusieurs milieux (cellules hépatiques et cellules sanguines). Un nombre plus grand de métabolites polaires a ensuite été quantifié dans des globules rouges humains sains, et infectés, par le parasite responsable de la malaria (*P. falciparum*). La quantification absolue des métabolites polaires requiert, d'une part, des connaissances en termes de recouvrement d'extraction des métabolites et, d'autre part, l'utilisation de standards internes et chromatographiques pour garantir la fiabilité des résultats ainsi obtenus. Il reste cependant une variabilité difficilement maîtrisable lors d'analyse de métabolites, qui est la variabilité biologique. Il faut y ajouter la maîtrise des conditions de sélection du nombre de cellules.

1.3. L'utilisation du SWATH et des fenêtres variables pour l'augmentation de la sélectivité et l'amélioration de l'identification

La méthode d'acquisition SWATH est considérée comme une acquisition indépendante des données (DIA). En effet, cette méthode permet d'analyser et de fragmenter tous les ions présents, sans pour autant obtenir une complexité trop importante des spectres MS/MS, contrairement à la méthode MS^{ALL}. Les données SWATH possèdent l'avantage de partager l'information en sections ou fenêtres. Ceci réduit à la fois la complexité des spectres MS/MS obtenus, mais aussi améliore de ce fait la sélectivité. Ces sections peuvent en outre être utilisées de façon individuelle pour réaliser des tests statistiques et mettre en valeur des ions, dans une gamme de masse donnée. Ces ions ne seraient pas distingués en tenant compte de toutes les expériences.

En analyse par composante principale, dans le cas de la présence de protéines (multichargées) par exemple, il est possible de supprimer la ou les expériences concernées, et de ne garder que les données informatives présentes dans les autres fenêtres.

Le SWATH, de par sa capacité à fragmenter tous les ions présents, permet de garder l'information complète de l'échantillon. Les analyses peuvent être à nouveau exploitées après plusieurs années, si de nouvelles connaissances apparaissaient. C'est le cas, tout particulièrement, dans le cadre du dopage. En effet, si des analyses uniquement ciblées ont été réalisées, il n'est pas possible de trouver une information qui n'a pas été spécifiquement recherchée au moment de la réalisation des analyses. Cependant, la complexité des spectres MS/MS obtenus peut parfois entraîner des complications quant à l'identification des métabolites. La création de fenêtres SWATH variables comporte de ce fait un avantage pour améliorer l'identification. Il a été démontré que la création de ces

fenêtres pouvait se faire selon une problématique ciblée ou non ciblée. Pour une recherche non ciblée, et dont le critère principal est la mise en évidence d'un maximum d'ions, l'utilisation de fenêtres SWATH basées sur la complexité de l'échantillon, à l'aide du logiciel swathTUNER, est la meilleure solution. Il est nécessaire cependant de réaliser une analyse préliminaire TOF-MS pour obtenir l'information quant à la répartition des ions selon la gamme de masse. Lorsque des métabolites spécifiques appartenant à une base de données sont recherchés pour une identification spécifique, la création de fenêtres selon cette même base est préférable. De façon générale, l'utilisation du SWATH répond aux exigences actuelles en métabolomique exploratoire.

1.4. La place des bases de données en métabolomique

La métabolomique souffre encore actuellement d'un manque de disponibilité et d'accessibilité aux bases de données pour les études. Il existe de nombreuses bases de données, mais nombre d'entre elles sont toutefois payantes. Chaque laboratoire a tendance à créer ses propres bases de données selon ses propres critères. Ceci est principalement régi par le type et la marque des instruments utilisés au sein du laboratoire. En effet, chaque instrument possède ses propres logiciels liés au fournisseur.

Malheureusement cette approche s'avère coûteuse, redondante et chronophage. La figure suivante illustre cette problématique existant entre les librairies « open source » et les librairies payantes. Il faut noter que de nombreux lipides sont compris dans les bases de données dites « métabolomiques », et représentent une part importante des données répertoriées.

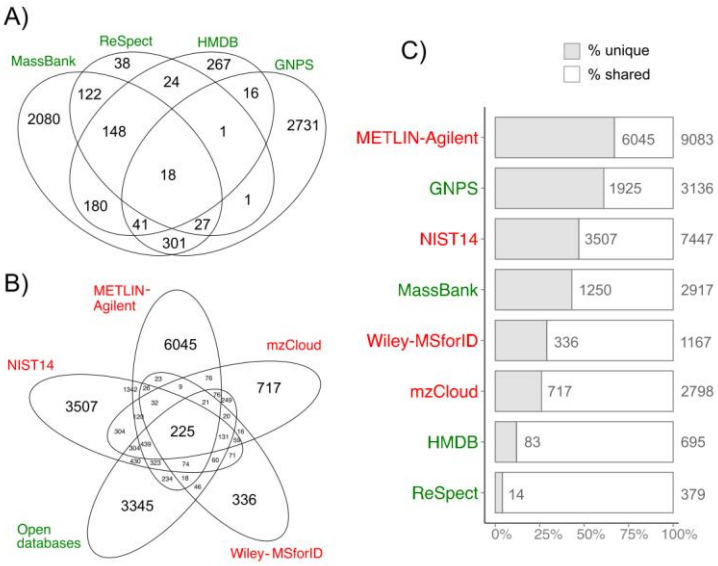


Figure 191: Diagramme de Venn (A) montrant le recouvrement entre les bases de données libres de spectres de masse (HMDB, MassBank, GNPS, et ReSpect) (B) diagramme de Venn montrant le recouvrement entre cinq bases de données payantes de spectres de masse et les bases de données libres décrites en A. (C) nombre et pourcentage de composés uniques et partagés. Tiré de [1] avec autorisation.

La standardisation et la normalisation des bases de données permettent une meilleure comparaison entre elles. Cependant le manque de diversité d'acquisition (processus de fragmentation, conditions analytiques) diminue les possibilités d'annotation [1]. Les acquisitions sont réalisées sur des instruments provenant de fournisseurs différents, dans des conditions différentes. Les données acquises (raw data) elles-mêmes sont différentes, c'est pourquoi une comparaison est très difficile. Un précédent doctorant a mis en place une base de données nommée AMML [2], contenant des métabolites provenant de la base de données HMDB. Cette base de données AMML a été réalisée selon de nombreuses contraintes, à l'aide de standards. Les spectres obtenus ont dû être vérifiés, annotés, normalisés et référencés de manière très rigoureuse. Il existe en outre des bases de données réalisant un spectre de référence par une fragmentation « in-silico ». Ces spectres, bien qu'étant utiles pour la découverte de nouveaux métabolites secondaires, végétaux par exemple, nuit à l'obtention de spectres de référence de molécules standards existantes. Malgré la pureté des produits standards fournis, aucune analyse n'est à l'abri du risque d'incorporer des fragments ou des molécules provenant d'interférents. C'est pourquoi il est très important d'annoter les fragments et, en outre, de tenir compte de possibles adduits, avant d'ajouter un spectre acquis directement au sein d'une base de données. Tous ce processus est nécessaire afin d'obtenir des identifications représentatives et robustes lors d'analyses métabolomiques.

1.5. Approche holistique de la mise en évidence d'un phénotype

La métabolomique fait partie d'un processus complet, partant de l'environnement jusqu'à l'expression d'un phénotype. En effet, la métabolomique est sujette aux variations provenant de l'environnement direct dans lequel le sujet se trouve (alimentation, stress, rythmes circadiens). Le métabolisme est le processus pouvant répondre le plus rapidement aux changements extérieurs. La variabilité d'expression est donc importante.

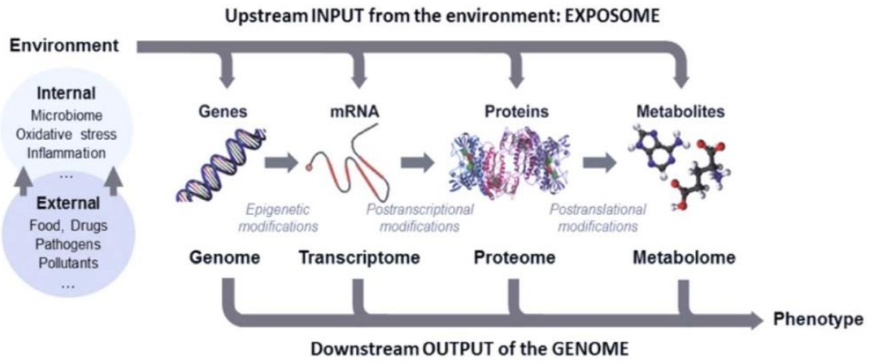


Figure 192: Schéma des processus impliqués dans l'expression d'un phénotype, tiré de [3]

La métabolomique ne peut fournir à elle seule une réponse complète à un phénomène biologique. C'est en combinant toutes les informations fournies par les sources disponibles, qu'une explication peut être obtenue. C'est la différence entre l'information et le savoir, illustrée à la figure suivante. Une information doit être mise en réseau et connectée, pour être validée et permettre de trouver un sens à un processus. Par exemple, l'augmentation de la concentration d'un métabolite fournit, à elle seule une information, mais n'est pas suffisante pour constituer une connaissance d'un processus biologique. L'urine était « goûtée » au moyen-âge afin de détecter un diabète (goût sucré). Cette information renseignait sur trouble, mais pas sur un fonctionnement complet d'un phénomène pathologique. Cette comparaison entre l'information et le savoir concerne tous les domaines « omics » qui sont en constante expansion.

Ce qui est donc souligné dans ce paragraphe est l'importance de la transversalité des connaissances et des compétences pour faire avancer la science, la connaissance et la recherche. Il n'est pas possible que chacun se cantonne à ses propres certitudes et « informations ».

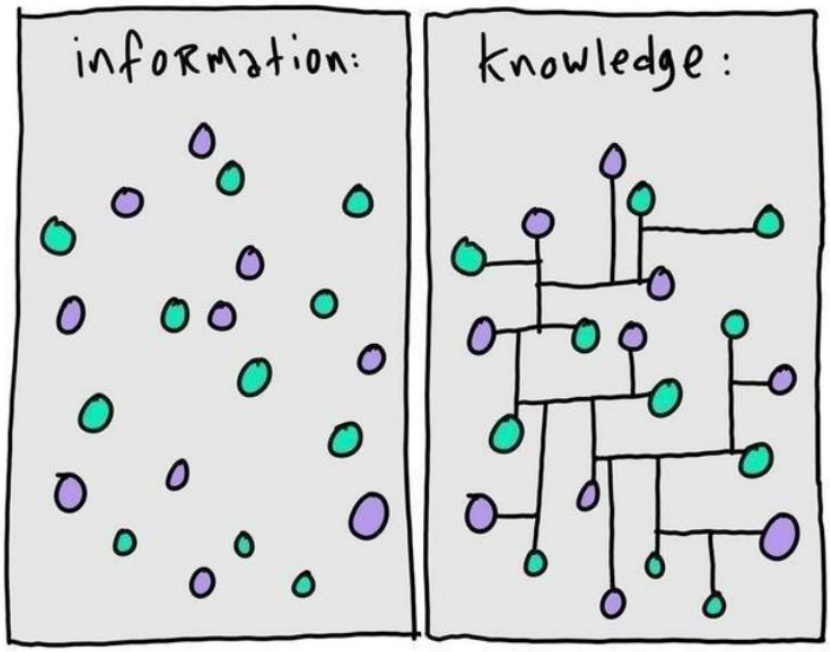


Figure 193: tiré de https://twitter.com/flowchainsensei Bob Marshall @flowchainsensei

1.6. Le mythe de la stratégie unique pour l'analyse métabolomique complète et exhaustive

La mise en place de plateformes analytiques, combinant plusieurs analyses complémentaires, est actuellement la forme la plus utilisée pour les analyses des petites molécules (GC, RMN, LC). Ceci permet de couvrir un maximum de métabolites, et donc d'obtenir l'information la plus exhaustive provenant du même échantillon. En chromatographie liquide, il est utile de combiner l'analyse d'un même échantillon à différentes techniques de séparation. Par exemple, le fait de réaliser une analyse en phase inverse et en HILIC va amener une dimension supplémentaire, permettant d'améliorer les critères pour l'identification des métabolites (deux temps de rétention). Les phénomènes de rétention sont différents entre la RPLC et la HILIC. Il est aussi possible de réaliser une séparation uniquement en RPLC, mais avec des phases mobiles comportant des pH différents (pH acide et pH basique). Certaines molécules sont détectées dans l'une et/ou l'autre gamme de pH. La complémentarité des modes d'ionisation (positif et négatif) en spectrométrie de masse présente un avantage certain pour l'identification. En effet, selon le mode d'acquisition (positif ou négatif), les fragments détectés seront différents et/ou plus nombreux.

La mobilité ionique amène aussi un phénomène séparatif supplémentaire, et se développe actuellement de plus en plus. Pour le moment cependant, les analyses de métabolites sont principalement dédiées à une ou à plusieurs classes de molécules, comme par exemple les aldéhydes, les sucres ou les lipides. De par la diversité des métabolites, il est très difficile d'obtenir un processus analytique unique et complet, produisant des informations détaillées.

1.7. Vers une approche quantitative et qualitative de l'analyse des métabolites

Le DIA supplante depuis quelques années le DDA. Cette approche, indépendante en ce qui concerne le mode d'acquisition, augmente la quantité d'informations obtenues dans une seule et même analyse. En outre, ce type d'analyse peut être traité à postériori selon l'évolution des connaissances analytiques. Le SWATH apporte des solutions pour une étude à la fois quantitative et qualitative d'un même échantillon, simplifiant la procédure qui était jadis, dans un premier temps exploratoire, puis dans un second temps, ciblée sur un nombre restreint de métabolites.

1.8. La métabolomique au service de la médecine personnalisée

La médecine personnalisée se trouve devant l'un des défis du siècle : en effet, comment est-il possible, d'un point de vue technique et financier, d'offrir à chaque habitant de la planète une analyse à la fois complète et individuelle, qui mène à un traitement, ou à un ensemble de traitements, qui soient à leur tour individualisés ?

Les analyses de laboratoire basculent ces dernières années de l'analyse ciblée vers la métabolomique non ciblée [4]. Cela signifie que ce n'est plus un ou plusieurs métabolites qui sont recherchés, mais une empreinte personnalisée d'un état déterminé, via une analyse métabolomique. Récemment, une étude en ce sens a été publiée par I. Kohler, qui illustre cette individualisation de traitement au travers de la recherche de biomarqueurs (figure 194).

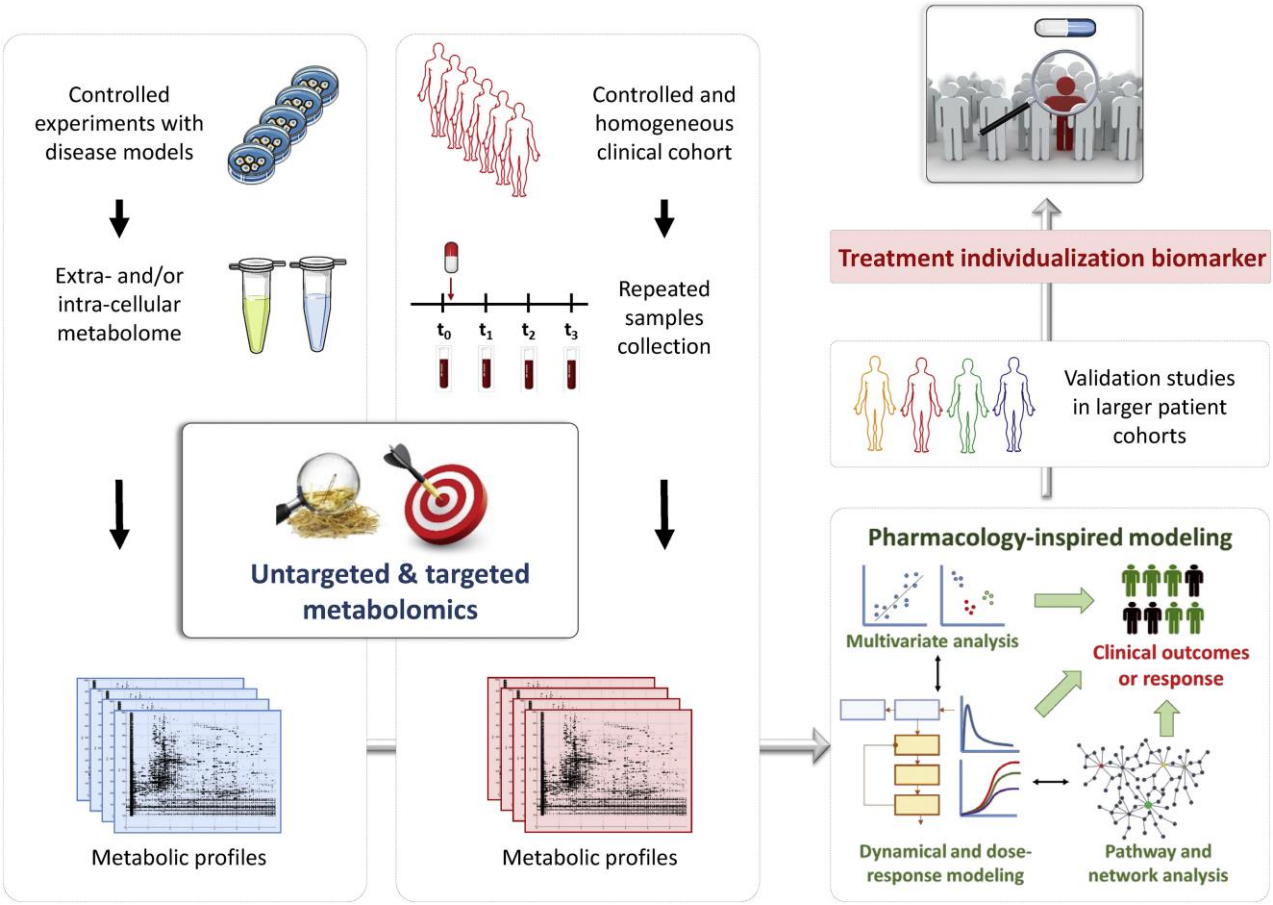


Figure 194: Illustration du processus de développement de traitement individualisé selon des biomarqueurs basés sur la métabolomique. Tiré de [5] avec autorisation

Cette approche pharmacologique tend à obtenir un système de quantification, de la douleur par exemple, basé sur l'identification de nouveaux biomarqueurs. Ceci permettrait d'évaluer le niveau de douleur de patients qui ne peuvent pas la communiquer. Dès lors,

cette approche offrirait la possibilité de mieux adapter des traitements en fonction des besoins individuels, mais aussi d'évaluer la réponse à un traitement donné, de façon beaucoup plus précise qu'on ne le fait actuellement.

2. Références du chapitre 5

1. Vinaixa, M., et al., *Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2016. **78**: p. 23-35.
2. Bruderer, T., *Accurate mass spectral libraries and predicted liquid chromatography retention times in bioanalysis and data independent metabolomics*. 2016.
3. Ivanisevic, J. 2014 [cited 2017 29 juin]; Available from: https://www.unil.ch/metabolomics/home/menuinst/backdrop.html.
4. Rochat, B., *From targeted quantification to untargeted metabolomics: Why LC-high-resolution-MS will become a key instrument in clinical labs.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2016: p. Ahead of Print.
5. Kohler, I., et al., *Integrating clinical metabolomics-based biomarker discovery and clinical pharmacology to enable precision medicine.* Eur. J. Pharm. Sci., 2017: p. Ahead of Print.

Remerciements

A mes pairs

Je remercie le Professeur Hopfgartner qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et m'a permis de réaliser mon doctorat dans des conditions instrumentales excellentes. Je suis reconnaissante pour son aide, sa disponibilité et sa patience pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie le Professeur Wolfender et le Docteur Junot pour avoir accepté d'être jurés à cette thèse et particulièrement pour leurs remarques constructives et pertinentes lors de la défense de la thèse.

Je remercie le Professeur Veuthey pour son écoute et son soutient dans les moments critiques de la fin de la thèse.

Je remercie enfin le Professeur Slaveykova pour m'avoir mis à disposition les ressources de son laboratoire et pour sa confiance dans cette collaboration.

Je remercie le Docteur Julie Schappler pour sa confiance et sa gestion très structurée des travaux pratiques IASP et ABM.

Je remercie le programme mentorat-relève de l'université de Genève. Un grand merci au Professeur Barazzone qui fut ma mentore et m'a permis de garder à l'esprit les priorités afin que cette thèse aboutisse. Elle a su trouver les mots (« le lard du chat s'il le faut ! ») ainsi que mobiliser les personnes autour d'elle pour que les conditions soient réunies pour que la fin de la thèse se déroule le mieux possible.

A mes collègues et amis

C'est un moment très émouvant (et éprouvant) pour moi d'écrire ces remerciements, je ne veux blesser ni oublier personne alors j'espère faire au mieux, ne m'en tenez pas rigueur le cas échéant !

Un grand merci à toi Tati qui a été la première à me soutenir et m'écouter pendant les premiers moments difficiles de la thèse. Tu es une amie en or !

Merci à toi Dominique pour ta compréhension, ton aide, ta chaleur humaine et ton écoute, ta disponibilité à toute épreuve dans mes moments de doutes. Te voir le matin dès mon arrivée et pouvoir partager avec toi des moments de vie était mon rayon de soleil !

Un très grand merci à Chantal pour son écoute, sa patience et son aide dans mes premiers pas avec ce cher chroméléon. J'ai adoré voir les magnifiques photos de vacances et tous ces moments au bureau.

Un grand merci à Eliane qui a su apporter un peu d'humanité au labo. Tu as été en quelque sorte notre maman à tous. Celle qui venait nous gronder quand la vaisselle s'amoncelait mais aussi celle avec qui la discussion était toujours possible et qui organisait les festivités du labo.

Une pensée à toi Youssef qui a été doctorant junior avec moi et qui est parti trop tôt de cette aventure.

Merci à Séverine pour son aide, sa patience et sa bonne humeur à Forel, j'ai adoré faire des manips dans ce cadre magnifique. Merci aussi à Giulia pour sa disponibilité et sa présence rassurante.

Jessica, je ne saurais écrire ici toute l'amitié dont tu as fait preuve au cours de toutes ces années. Tu as été un réel soutient autant dans les moments difficiles (que de boites de mouchoirs détruites) que dans des moments de délires lorsque nous étions au bord du point de rupture pendant (et hors) des travaux pratiques !

Tiffany, tu as été ma meilleure collègue et amie pendant des années de thèse. Nos pauses thés me manquent. Ton caractère bien trempé (oui oui !), ton franc parlé, ton aide et nos moments de complicité ont été très précieux. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle aventure !

Un immense merci à Sandra avec qui j'ai partagé beaucoup de moments importants dans ma vie et qui m'a toujours soutenue, écoutée et motivée dans la réalisation de la thèse. Tes conseils, ta bonne humeur ont toujours été très appréciés ! (non pas les carottes !)

A mes assistants qui sont devenus mes collègues puis qui sont partis, je ne vous oublie pas ! Michel avec tes shorts, tes pots de miels et tes délires, Antoine et ta manie des claviers propres, David et nos disputes, vous avez été les mentors et ouvert la voie (voix ?) du labo !

A mon ancien voisin de bureau, discret, fashion victim, toujours disponible et prêt à m'aider, merci Jonathan ! Merci aussi à Tobias pour son calme à toute épreuve et sa nonchalance.

Merci à mes anciens collègues anglophones, Ying, Aivett, Bandar qui m'ont aidé à améliorer mon anglais et m'ont permis de découvrir (un peu) le monde de la protéomique. Merci à Kyoko pour son aide au maniement des logiciels Shimadzu.

Merci à Emmanuel mon ancien co-directeur de thèse qui m'a enseigné le maniement des armes que sont la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. La coccinelle s'envole !

Je n'oublie pas mes anciens collègues qui sont encore sur le bateau et à qui je souhaite une belle aventure, périlleuse mais formatrice. Je remercie Sophie, Laura et Thomas pour leur bonne humeur et leur présence dans les derniers moments au labo. Je vous souhaite bon vent !

Bonne suite à Anita, Paul-Alain et Maria et salutations à Michel, Andras, David et Sandra.

Je remercie aussi Isabelle M. qui a été d'un professionnalisme à toute épreuve et sans laquelle la thèse n'aurait probablement pas abouti.

Un immense merci à Christine V qui a été présente dans les moments difficiles et m'a transformée en tank à toute épreuve. I can do it !

Je remercie toute l'équipe de la plateforme qui a toujours été présente et disponible. Un grand merci à Eliane S pour nos discussions toujours très appréciées. Merci à Sophie pour sa bonne humeur et ses aides ponctuelles précieuses. Je n'oublie pas non plus Harry et Julien pour leur aide ! Merci à Jean-François.

Merci à Véro et Pascal pour leur bonne humeur du matin et leur disponibilité !

A tous mes anciens collègues de TP, ces moments vont me manquer ! J'ai adoré enseigner auprès de vous et passer par toutes les couleurs de l'arc en ciel ! Merci aux anciens pour leur patience et leurs enseignements, je pense à Greg, Isa, Joséphine, Flavia. Un merci tout particulier à Isa qui a été la première à me considérer et m'enseigner de façon claire, précise et exhaustive les TP. Tu as toujours répondu à mes questions les plus farfelues avec professionnalisme et compréhension. Un grand merci à Dany avec qui j'ai passé de nombreuses (trop nombreuses ?) heures en TP autant l'IASP que l'analytique ! Monsieur Stas-Otto pour lequel l'extraction liquide-liquide n'a plus de secrets ! Merci à Monsieur CE Nicolas, pour les madeleines, les visites, les moments franches rigolades. Tu as un cœur d'or et ne laisse aucune stupide étudiante te le briser ! Merci à Yoric pour ton écoute, nos théories sur le métier de pharmacien et tous ces moments passés en TP. Merci à Vincent (monsieur LC) qui a su éclairer ma lanterne et garder toujours son âme d'enfant ! Yoric et Vincent, les moments passés au 206 avec vous à regarder des vidéo fort enrichissantes (oui j'ai level up ma culture) me manquent.

A tous mes collègues de divers TP, Olivier, Soura, Marie, Mohamed, Julie, Ioanna, Stella, Pierre, je ne vous oublie pas et vous remercie.

Merci à tous pour ces soirées de pharmaciens auxquels on a cartonné et passé des moments inoubliables ! Merci pour ce voyage à Amsterdam très sympa et toutes ces soirées mythiques Guitar hero qui se sont transformées en Just dance !

Merci tout particulier aux filles Isotopes qui ont été la meilleure team de copine pendant la thèse ! Merci à Aurélie, Jess, Stéphanie Emilie et Marta !!!!! Vive le chocolat, les petits déjeuners, les discussions et les délires ! Merci à Marta pour son optimisme à toute épreuve !

Merci à Hélène, ma meilleure amie et la sœur que je n'ai jamais eu. Tu es encore et toujours là pour me remonter le moral, participer à nos discussions sans fin à refaire le monde et parler de tout et de rien pendant des heures. Tu as toujours été à mes côtés et j'ai de la chance de t'avoir pour amie.

Merci à Aline, fidèle alliée et discrète amie qui a toujours été présente à mes coté et qui m'a aidée à sa manière à réaliser ma thèse.

A ma famille

Manar, ma chère tante bien-aimée, tu as toujours été à mes côtés. Tu as su quand et comment m'aider pour que je puisse finir cette thèse. Ta patience, ton empathie, ta disponibilité ont été le fer de lance de cette fin de thèse.

Je ne peux dire la reconnaissance que j'ai envers mes parents qui m'ont toujours soutenue, encouragée et sont présents à tous les moments de ma vie. Cette thèse est aussi en partie la vôtre. Vous avez eu le courage de supporter mes humeurs à chaque période d'examen et de faire le poing dans la poche pour que je puisse y arriver et terminer cette aventure.

Manar, Papa, Maman, Dina, Arlindo et André vous m'avez fait le plus beau des cadeaux pendant cette fin difficile de thèse : du temps. Du temps pour moi, du temps pour mes enfants, du temps pour mon mari, du temps pour l'écriture de la thèse. MERCI

Mes enfants, mon fils tant désiré et mon antithèse adorée, vous avez été à la fois les plus difficiles et les plus belles réalisations pendant cette thèse. Bien que vous n'ayez aucun chapitre ici vous faites partie intégrante de cette étape de vie et de ce que je suis devenue grâce à vous. Je vous aime

André, je taime

« Maman ?, Il est où ton ordinateur ? »

« Maman ? Tu es force comme Star Wars ! »