

## Caractérisation par LCMS et réseau moléculaire :

L'approche d'une analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LCMS) permet de caractériser un composé grâce à son ionisation (qui est portée au détecteur spectral par un liquide) et à son comportement spectral (c-à-d la façon unique dont ils se fractionnent à la suite d'une énergie collision). Dans le cadre de ce projet, l'approche LCMS<sup>2</sup> a été complétée par l'analyse du réseau moléculaire de chaque extrait dans le but de localiser les potentielles nouvelles molécules et de cibler les molécules susceptibles d'être responsables des activités évaluées (paludisme). Les données obtenues en HPLC-MS ont ainsi été converties en format de fichier «. mgf », puis exportées vers le serveur GNPS (Global Natural Product Social, Molecular Networking) pour la construction de réseaux moléculaire. L'analyse de composés chimiques par réseau moléculaire est un outil innovant, accessible librement par internet (GNPS). Celui-ci repose sur un postulat simple : les molécules structurellement proches partagent des voies de fragmentation similaires en spectrométrie de masse tandem, conduisant à des fragments ou des pertes de neutre en commun. Ainsi, cette approche utilise des algorithmes d'alignements spectraux, permettant la mise en évidence des familles de molécules analogues par l'intermédiaire de réseaux moléculaires, à l'aide de l'outil informatique de visualisation Cytoscape, également accessible librement en ligne. C'est donc une analyse de précision venant en appui aux analyses HPLC-MS.

## Méthode d'élution LC-MS spécifique aux extraits hydro-éthanoliques des *Dialium*

Les analyses ont été effectuées en couplant le système de chromatographie liquide (LC) à un spectromètre de masse équipé d'une source ESI, fonctionnant en mode ion positif. Le volume de la fiole d'injection était de 1,5 mg/mL dans MeOH (qualité HPLC) et le volume des injections était de 5 µL. La séparation a été réalisée par chromatographie en phase inverse à l'aide de colonnes analytiques octadécylsilyles (C18). Elles étaient protégées par les précolonnes

correspondantes (10 mm). Un gradient d'élution standard a été utilisé : MeOH/H<sub>2</sub>O+0,1% HCOOH (5/95→100/0 en 40 min), à un débit de 0,25 mL/min. La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur UV à barrettes de diodes connecté en série au spectromètre de masse Agilent 6530 Accurate (Agilent Technologies, Massy, France), équipé d'une source électrospray (ESI) et d'un analyseur quadripôle/temps de vol (Q/TOF). Les mesures ont été effectuées de m/z 100 à 1200. La source ESI était compatible avec des analytes de différentes gammes de polarité. Elle a été utilisée exclusivement en mode positif et a été observée principalement dans le [M]<sup>+</sup> ou le [M+H]<sup>+</sup>.

#### Méthode de prétraitement du GNPS et paramétrage du réseau moléculaire (spécifique pour les extraits de Dialium)

Tous les formats mzXML des fichiers de données MS<sup>2</sup> ont été extraits et traités à l'aide de MZmine v 2.53.20. Pour permettre une détection de masse plus ciblée, la fixation du bruit a été maintenue à 6,5E3 dans MS<sup>1</sup> et à 8,0E0 dans MS<sup>2</sup>, et a été effectuée en mode d'acquisition dépendant des données MS<sup>2</sup>. Le chromatogramme a été construit à l'aide du constructeur "ADAP", pour lequel une taille de groupe minimale de 5 scans, un seuil d'intensité de groupe de 3000, une intensité maximale de 4000 et une tolérance de 0,0 m/z (ou 10 ppm) ont été utilisés. Le chromatogramme a été déconvolué en utilisant l'algorithme des ondelettes avec les paramètres suivants : Seuil S/N = 23, hauteur caractéristique minimale = 1000, coefficient de zone/seuil = 10, durée du pic = 0,02 - 0,45 min, ondelette RT 0,00 - 0,10. Les scans MS<sup>2</sup> ont été appariés en utilisant les plages de tolérance respectives de m/z et de RT de 0,02 Da et 0,15 min. La fusion isotopique a été réalisée à l'aide de l'algorithme "isotopic grouper", en conservant un maximum de 2 charges isotopiques représentatives dans le mode le plus intense avec des tolérances m/z et RT fixées à 0,0 Da (ou 10 ppm) et 0,15 min respectivement. Le module d'alignement conjoint a aligné les pics avec une distribution égale à m/z=50 et RT=50 et une tolérance RT de 0,12 min. Toutes les

données spectrales au format. mgf et leurs fichiers de métadonnées .csv correspondants ont été exportés vers GNPS-FBMN.

### **Caractérisation par GC-MS :**

La chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a exactement le même fonctionnement qu'une LC-MS décrit précédemment au point (e.1) mais dans ce cas précis les composés sont portés par un gaz (l'hélium) pour permettre leur détection. La méthode est donc plus indiquée pour les composés volatiles (donc ayant une masse moléculaire moins élevée). Dans le cadre de notre étude, les bois africains étant réputés contenir des composés lourds, la dérivation (à l'aide d'un réactif spécifique : BSTFA-TMS) de nos échantillons s'est avérée nécessaire avant injection en GC-MS.

### **Méthode d'élution appliquée pour les Dialium**

L'analyse a été réalisée sur une phase stationnaire HP 5 (60m x 0,32mm ID x 0,25µm) à l'aide d'un chromatographe Var-ian 450-GC avec un détecteur FID, couplé à un spectromètre de masse. Pour faciliter la détection de tous les composés (même ceux ayant un poids moléculaire élevé), les échantillons ont été dérivés. Pour ce faire, 2mg d'extrait sec ont été solubilisés dans 53µl de 1% de BSTFA+TMCS dans des flacons de 2 mL. Le mélange a été incubé dans un bain à 70°C pendant 150 minutes au cours desquelles la réaction de silylation s'est produite. Le BSTFA a ensuite été évaporé et l'extrait dérivatisé a été dissous dans 1 mL de pyridine. 1µl de cette solution a été injecté en mode splitless. L'hélium (He) a été utilisé comme phase mobile, gaz porteur à un débit de 1,2mL/min. Le programme de température appliqué était de 40°C (maintenu pendant 2min) à 90°C à une vitesse de 5°C/min, puis à 120°C (maintenu pendant 2min) à une vitesse de 10°C/min, et enfin à 180°C (maintenu pendant 4min). Les températures du détecteur et de l'injecteur ont été réglées à 240°C et 270°C, respectivement. Les composants ont ensuite été identifiés sur la base de la comparaison de leurs

spectres de masse avec les bibliothèques Pal06, Wiley et NIST par le biais de la recherche NIST MS 2.0 (2011). L'identification a été considérée comme pertinente pour la concordance et la concordance inverse lorsque les valeurs de coefficient dépassaient 950 sur 1000.

### **Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).**

Les lyophilisats de bois et d'écorce des *Dialium* ont été analysés par FTIR afin de caractériser leurs constituants moléculaires sur la base de leurs groupes spécifiques. Les lyophilisats ont été séchés à 105°C pendant 12 heures avant l'analyse, et 5 mg de poudre ont ensuite été placés sous un dispositif cristallin incrusté de diamants. Le contact a été obtenu en appliquant une force de 150 N à l'échantillon. 32 balayages ont été utilisés, avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> dans la gamme 4000-400 cm<sup>-1</sup>. Tous les spectres FT-IR ont été traités à l'aide d'un Bruker VERTEX 70 couplé à un réflecteur total atténué (ATR) Bruker Platinum.