Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au CNRS n° 217 : " Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués ") du Professeur Jean MONTREUIL, sous la direction de Monsieur Bernard FOURNET, Maître de Conférences.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

GENERALITES 4

I - LA SPECTROMETRIE DE MASSE 5

A - DESCRIPTION DES DIFFERENTS SPECTROMETRES DE MASSE 6

1 - Les spectromètres de masse conventionnels 6

a) le spectromètre de masse magnétique 6

b) le spectromètre de masse quadrupole 8

c) le spectromètre de masse monopole 10

d) le spectromètre de masse "time of flight" 10

2 - Les spectromètres de masse à double focalisation 11

a) le spectromètre de masse à géométrie MATTAUCH-HERZOG 11

b) le spectromètre de masse à géométrie NIER-JOHNSON 11

c) le spectromètre de masse à double faisceau 13

B - ANALYSE D'UN COMPOSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 14

1 - Introduction de l'échantillon 14

2 - Ionisation de l'échantillon 16

a) impact électronique 16

b) ionisation chimique 18

c) ionisation de champ 22

d) désorption de champ 26

3 - Discrimination des ions 27

4 - Détection des ions 28

a) la détection électrique 28

α) la cage de Faraday 28

β) l'amplificateur d'électrons 28

b) la détection photographique 29

5 - Traitement des résultats de l'analyse 30

C - TECHNIQUES PARTICULIERES UTILISEES EN SPECTROMETRIE DE MASSE 30

1 - Comparaison de fragments ("peak matching") 30

2 - Détection d'ions multiples 31

a) détecteur unique 31

b) détecteurs multiples 32

II - APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ETUDE DES SUCRES 33

A - LES MONOSACCHARIDES 34

1 - Les éthers méthyliques 34

2 - Les acétates 49

3 - Les éthers triméthylsilylés 56

4 - Les dérivés acycliques 68

a) les alditols acétates 68

b) les alditols perméthylés 70

c) les alditols acétates partiellement méthylés 70

d) les thioacétals 78

B - LES OLIGOSACCHARIDES 80

1 - Les éthers méthyliques 81

2 - Les éthers triméthylsilylés 103

C - RESULTATS DES AUTRES IONISATIONS 112

1 - Analyse par ionisation chimique 112

2 - Analyse par ionisation de champ 116

TRAVAUX EFFECTUES AU LABORATOIRE 118

I - MATERIEL ET METHODES 119

A - ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE D'OLIGOSACCHARIDES APPARTENANT AUX STRUCTURES GLYCANNIQUES 119

1 - Préparation du glycopeptide β de l'ovomucoïde 121

2 - Acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde 122

3 - Isolement des oligosaccharides de la fraction neutre de l'acétolysat 124

4 - Composition molaire en sucres des oligosaccharides 124

5 - Détermination de la structure des oligosaccharides par la méthode de la méthylation 125

6 - Préparation des oligosaccharides sous la forme de méthylglycosylalditols perméthylés 126

7 - Chromatographie en phase gazeuse des methylglycosyl-alditols perméthylés 127

8 - Spectrométrie de masse des méthylglycosylalditols perméthylés 127

B - APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLYCOPEPTIDE GP V-5 DE L'OROSOMUCOIDE 128

1 - Préparation du glycopeptide GP V-5 128

a) hydrolyse chymotrysique de l'orosomucoïde 128

b) séparation des glycopeptides "chymotrysiques" 128

c) hydrolyse pronasique des fractions I à V 129

d) séparation des glycopeptides "pronasiques" 129

2 - Composition molaire en sucres du glycopeptide GP V-5 130

3 - Structure du glycopeptide GP V-5 130

a) détermination par la méthode de la méthylation 132

b) acétolyse du glycopeptide GP V-5 et fragmentométrie métrie de masse des produits de son acétolyse 132

c) résonance magnétique nucléaire 132

II - RESULTATS 133

A - ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE D'OLIGOSACCHARIDES APPARTENANT AUX STRUCTURES GLYCANNIQUES 133

1 - Préparation du glycopeptide β de l'ovomucoïde 133

2 - Acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde 133

3 - Isolement des oligosaccharides de la fraction neutre de l'acétolysat 134

4 - Structure des oligosaccharides 134

5 - Chromatographie en phase gazeuse des oligosaccharides alditols perméthylés 134

6 - Détermination de la structure des oligosaccharides par spectrométrie de masse 135

a) analyse des spectres de masse des oligosaccharides après ionisation par impact électronique 135

b) analyse des spectres de masse des oligosaccharides après ionisation chimique 151

B - APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLYCOPEPTIDE GP V-5 DE L'OROSOMUCOIDE 165

1 - Préparation du glycopeptide GP V-5 165

2 - Composition molaire en sucres du glycopeptide GP V-5 165

3 - Structure du glycopeptide GP V-5 165

a) détermination par la méthode de la méthylation 165

b) acétolyse du glycopeptide GP V-5 et fragmentométrie de masse des produits de son acétolyse 166

c) étude du glycopeptide GP V-5 par résonance magnétique nucléaire 170

CONCLUSION 172

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Les glycoprotéines sont l'objet depuis une dizaine d'années d'un grand nombre de travaux qui concernent leur métabolisme et leur fonction dans les organismes. Au cours de ces études, il est apparu de plus en plus que la partie glycannique de la protéine joue un rôle très important ; dans le métabolisme où l'élimination de l'acide sialique terminal non réducteur entraîne la mort de la glycoprotéine (82) ; dans le rôle où la même désialylation de de certaines hormones rend ces dernières aveugles et incapables de reconnaître les cellules cibles où elles doivent agir (98), dans le rôle encore où la glycosylation de la protéine constitue pour elle un passeport de sortie de la cellule alors qu'elle reste intracellulaire lorsqu'elle n'est pas glycosylée (27).

L'importance grandissante de la chaîne glucidique dans la vie et l'action de la glycoprotéine a pu être démontrée grâce à des techniques de plus en plus précises et sensibles. Parmi elles, figurent les méthodes de coupure chimique (acétolyse, hydrolyse acide partielle, hydrazinolyse) et les réactions enzymatiques. Les techniques d'analyse ont progressé de manière parallèle : elles font appel maintenant aux colonnes capillaires en chromatographie en phase gazeuse, beaucoup plus efficaces que les colonnes de remplissage classiques. La résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse sont devenues des techniques couramment employées pour aborder la structure des molécules. L'évolution et la constante progression des analyses laissent entrevoir dans l'avenir la possibilité d'étudier

des substrats difficiles à obtenir en quantité appréciable comme par exemple les glycoprotéines membranaires.

Notre travail entre dans le cadre de l'utilisation de la spectrométrie de masse comme moyen d'étude de la structure de la glycoprotéine. Le mémoire comprend trois parties :

- la première partie présente la spectrométrie de masse : nous décrivons les différents spectromètres de masse utilisés, l'analyse classique d'un composé ainsi que quelques techniques particulières.
- la seconde partie relate les différents résultats de la spectrométrie de masse des sucres. Ils ont surtout été établis à partir de l'ionisation par impact électronique ; quelques premiers résultats intéressants ont également été obtenus après ionisation chimique.
- la troisième partie concerne les travaux effectués au laboratoire. Elle rassemble les résultats de l'impact électronique et de l'ionisation chimique par l'isobutane des oligosaccharides obtenus par acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde ; ces données ont servi à la détermination de la structure du glycopeptide GP V-5 isolé par K. SCHMID de la glycoprotéine acide du sérum humain et dont les produits d'acétolyse ont été analysés en mélange par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

Ce travail a été présenté sous forme d'affiches lors de réunions scientifiques :

- J.M. DHALLUIN, B. FOURNET, G. STRECKER, J. MONTREUIL, C. BOSSO et J.J. DEFAYE. Spectrométrie de masse des oligosaccharides obtenus par acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Société de Chimie Bio Biologique, Forum des Jeunes, Oullins, 6-8 Juillet 1977.

- J.M. DHALLUIN, B. FOURNET, G. STRECKER, J. MONTREUIL, C. BOSSO et J. DEFAYE. Spectrométrie de masse de la copule glycannique de l'ovomucoïde. VIIème Journées sur la Chimie et la Biologie des Glucides, Pont à Mousson, 24-26 Octobre 1977.
- B. FOURNET, J.M. DHALLUIN, G. STRECKER, J. MONTREUIL, C.BOSSO et J. DEFAYE. Gas liquid chromatography and mass spectrometry of oligosaccharides obtained by partial acetolysis of glycans of glycoproteins. IXth International Symposium on Carbohydrate Chemistry, London, 10-14 Avril 1978.
- J.M. DHALLUIN, B. FOURNET, G. STRECKER, J. MONTREUIL, C. BOSSO et J. DEFAYE. Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse des oligosaccharides obtenus par acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Société de Chimie Biologique, Forum des Jeunes, Villeneuve d'Ascq, 27-29 Juin 1978.

GENERALITES

I - LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse a surtout été utilisée dans ses débuts pour suivre les composés biologiques dans les organismes. L'étude était réalisée simplement à l'aide des isotopes car on supposait alors que les constituants principaux des organismes étaient métaboliquement inertes. Le deutérium a été l'un des premiers traceurs utilisés peu de temps avant l'azote ^{15}N, le carbone ^{13}C et l'oxygène ^{18}O lorsque leur préparation devint plus facile. La spectrométrie de masse était une technique qui, à cette époque, répondait le mieux aux problèmes de sensibilité que posait la faible quantité d'isotopes utilisable.

A cause de sa grande variation de concentration dans la nature, l'^{18}O fut davantage employé pour élucider les mécanismes des réactions biologiques impliqués par exemple dans la photosynthèse (84) ou la phosphorylation oxydative (43). Ces travaux ont orienté progressivement la spectrométrie de masse vers les études de structure des composés : ils ont concerné d'abord les lipides (91 , 92) puis les acides aminés (4). L'analyse des sucres fut entreprise peu après.

Avec les années, les spectromètres ont évolué et ont vu leur performance s'améliorer de manière très sensible qui a permis d'appréhendre avec précision les mécanismes de fragmentation des composés. L'arrivée de l'informatique, partie intégrante des spectromètres actuels, a optimisé davantage encore les possibités des appareils.

Les spectromètres de masse actuellement utilisés sont décrits brièvement dans un premier paragraphe qui permet d'aborder leurs intérêts et performances. Dans un second paragraphe, nous

décrivons les différentes étapes d'une analyse en spectrométrie de masse et présentons quelques techniques particulières utiles à la solution de problèmes qui ne nécessitent pas l'analyse classique.

A - DESCRIPTION DES DIFFERENTS SPECTROMETRES DE MASSE

On distingue deux séries de spectromètres de masse : les spectromètres conventionnels et les spectromètres à double focalisation.

1 - Les spectromètres de masse conventionnels

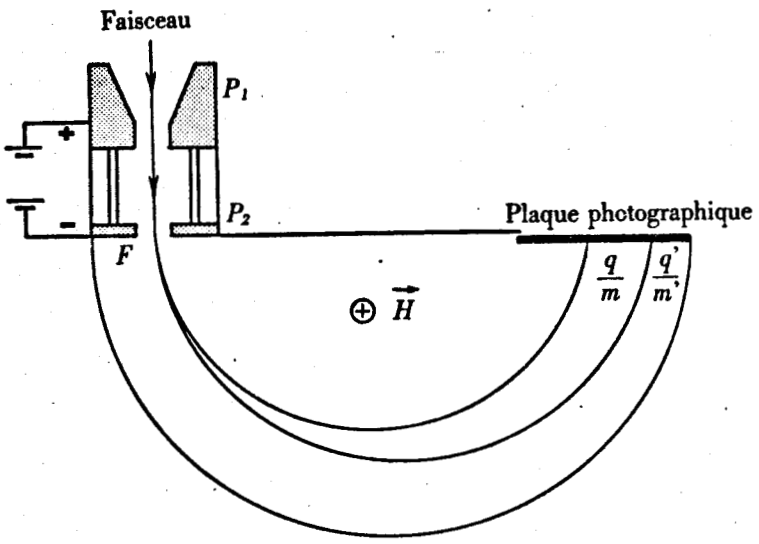
a) le spectromètre de masse magnétique

Cet appreil utilise un champ magnétique pour séparer les ions formés après impact électronique (voir principe figure 1 page 7).

Avant d'arriver dans le champ magnétique, les ions sont focalisés, puis sont accélérés à l'aide d'un champ électrique de l'ordre l'ordre de 3 à4 kV (kilovolts). Sous l'influence du champ magnétique, l'énergie cinétique acquise par les ions se traduit en un rayon de courbure qui est fonction de la masse m et de la charge q de l'ion. Un ion peut être ainsi caractérisé par le rapport de sa masse sur sa charge :

$$m/q = \frac{H^2R^2}{2V}$$

H représente la force du champ magnétique, V le potentiel électrique et R le rayon de courbure de la trajectoire de l'ion. Pour une valeur donnée des champs électrique et magnétique, quelques ions seulement sont détectés ; le spectre de masse est obtenu en faisant varier soit le potentiel électrique, soit la force magnétique. Le système de balayage peut enregistrer un spectre de masse dont les masses sont comprises entre 15 et 1000 en quelques secondes. Le pouvoir de résolution $\frac{m}{\Delta m}$ (m est la masse du fragment et Δm la différence de masse pouvant être discriminée) est voisin de 1000



Les ions positifs, de masse m et de charge q, accélérés entre P_1 et P_2 par le champ électrique V pénètrent dans le champ magnétique H avec une certaine énergie cinétique :

$$\frac{1}{2} mv^2 = qV, \qquad \text{d'où :} \quad v = \sqrt{\frac{2qV}{m}}$$

Chaque ion a donc une vitesse propre.

Dans le champ magnétique, les trajectoires sont des demi-cercles dont le rayon R résulte de l'égalité des forces centripètes (HqV) et centrifuges ($\frac{1}{2} mv^2$)

$$HqV = \frac{mv^2}{R}, \qquad \text{d'où :} \quad R = \frac{mv}{qH}$$

Chaque ion décrit un demi-cercle de rayon différent. $\frac{m}{q}$ peut alors être exprimé par la relation :

$$\frac{m}{q} = \frac{H^2R^2}{2V}$$

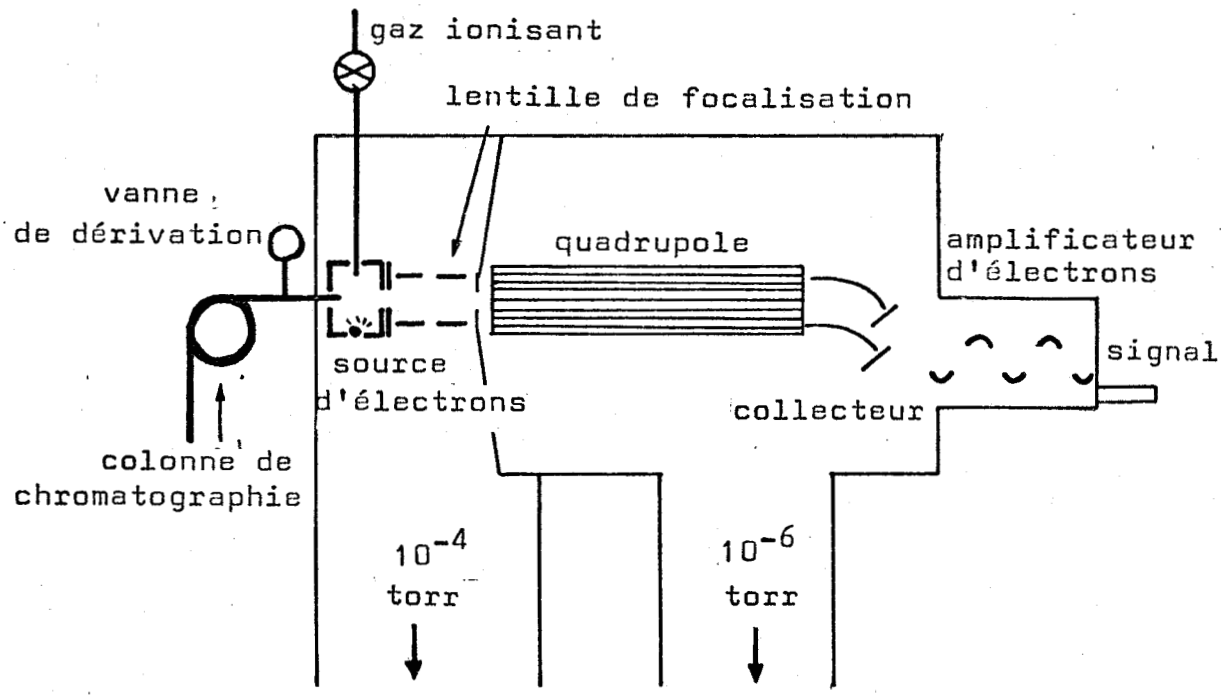
FIGURE 1

Principe de la séparation des ions dans un spectromètre de masse magnétique.

b) le spectromètre de masse quadrupole

C'est la combinaison d'un champ électrique continu et d'un champ électrique alternatif de haute fréquence qui effectue la séparation des ions. Ces champs sont appliqués à quatre barreaux métalliques dont l'arrangement spatial est illustré dans la figure 2 page 9 ; les barreaux sont connectés deux à deux, diagonalement par rapport à l'axe longitudinal du quadrupole, à des générateurs à potentiel variable et à haute fréquence (mégahertz). Cette disposition permet de focaliser les ions dans la région centrale du quadrupole en appliquant aux deux paires de barreaux des courants alternatifs en opposition de phase ; les ions n'atteignent le détecteur que pour un rapport tension alternative/tension continue donné. Le spectre de masse complet s'obtient par augmentation progressive du potentiel tout en gardant le rapport tension alternative/tension continue constant.

Le balayage du collecteur est assuré par un détecteur électrique ; la vitesse de lecture est très rapide, le spectre de masse pouvant être balayé en quelques millisecondes. Cette rapidité de lecture permet de suivre le spectre de masse sur un oscilloscope. Cet appareil convient à l'analyse des composés par couplage chromatotographie en phase gazeuse spectrométrie car il est peu sensible aux hautes pressions ; la limite de pression est fixée par le libre parcours moyen des molécules qui doit être au moins égal à la longueur du quadrupole afin que la mesure du spectre ne perde pas en sensibilité. L'inconvénient majeur de cet appareil est sa faible résolution ($\frac{m}{\Delta m}$: 1000 à 2500) ; celle-ci est fonction de



disposition spatiale des barreaux du quadrupole

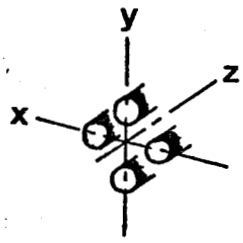


FIGURE 2

Schéma d'un spectromètre de masse quadrupole.

la valeur du rapport des tensions continues et alternatives. De très bonnes analyses peuvent être obtenues jusqu'aux masses de 800 à 1000.

c) le spectromètre de masse monopole

Il utilise les mêmes artifices que le spectromètre quadripolaire (courants continus et alternatifs) mais il ne possède que deux barreaux. Cet appareil relativement récent est très peu utilisé encore, notamment dans l'analyse des composés de haut poids moléculaire.

d) le spectromètre de masse "time-of-flight"

Ce spectromètre se sert de la différence de vitesse des ions pour les séparer. Après un bombardement électronique, les ions formés sont accélérés grâce à un champ électrique avant de traverser une enceinte libre de tout champ électrique ou magnétique ; à l'arrivée au détecteur, les ions se trouvent discriminés selon leur masse, les plus légers étant les premiers à atteindre le détecteur. Cette technique n'est valable que si le bombardement électronique est très court (environ 1,5 millisecondes), ce qui permet de génèrer un faisceau d'ions discret.

La lecture du collecteur d'ions est assurée par un amplificateur d'électrons. La vitesse rapide du balayage (100 millisecondes) le rend intéressant pour l'étude de réactions très rapides. Le spectre de masse, qui est un profil de plusieurs courants ioniques dans le temps, peut être visualisé également sur un oscilloscope. Cependant cet appareil est très peu performant, la discrimination de masse n'étant efficace jusqu'aux ions de masse m/e 300.

2 - les spectromètres de masse à double focalisation

La mesure de la masse exacte des ions exige une focalisation fine d'un faisceau d'ions de même énergie. En pratique, les ions ont au départ une énergie cinétique différente, une direction qui l'est aussi pour diverses raisons comme les forces de répulsion entre charges. Pour obtenir une bonne focalisation, il faut alors compenser ces différences d'énergie et de direction, ce qui est réalisé par une double focalisation : l'une corrige la trajectoire des ions par l'intermédiaire d'un champ électrique, radial avant leur arrivée au niveau du champ magnétique ; l'autre supprime la différence d'énergie cinétique à l'aide d'un champ magnétique qui regroupe les ions de même masse (voir principe page 12 figure 3).

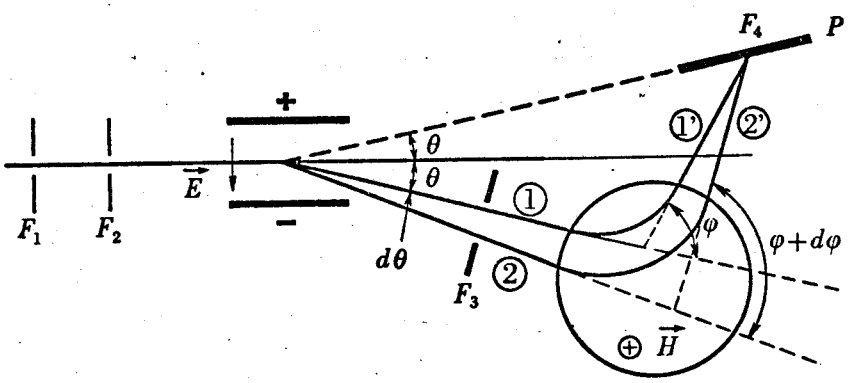
Cette technique de double focalisation améliore considérablement le pouvoir de résolution de l'appareil.

a) le spectromètre de masse à géométrie MATTAUCH-HERZOG

La double focalisation est réalisée simultanément avec ce spectromètre de masse à géométrie MATTAUCH-HERZOG. Le courant d'ions y est enregistré en continu sur une plaque photosensible située au niveau du plan de focalisation. Ce type de détection convient à l'analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse : il intègre en effet la totalité des courants ioniques produits durant toute la chromatographie. L'appareil peut également être équipé d'un système de détection électrique.

b) le spectromètre de masse à géométrie NIER-JONHSON

Cet appareil est conçu de façon à corriger d'abord la trajectoire des ions par un champ électrique radial puis à annuler



A l'issue de la phase d'accélération, les ions de même masse m et de même charge q n'ont pas tous la même énergie cinétique. Pour compenser cette différence, ils traversent d'abord un champ électri trique E à l'extrémité duquel ils ont subi une déviation de la forme :

$$\theta = C_1 \frac{q}{m} \times \frac{1}{v^2} \quad , \qquad C_1 = \text{constante de l'appareil}$$

Les molécules les plus lentes sont les plus déviées.

Les ions pénètrent ensuite dans un champ magnétique H ou ils subissent une nouvelle déviation :

$$\varphi = C_2 \frac{q}{m} \times \frac{1}{v} \quad , \qquad C_2 = \text{constante de l'appareil}$$

A nouveau, les ions sont d'autant plus déviés qu'ils sont lents.

Les déviations subies sont ainsi compensées ; les particules de même $\frac{q}{m}$ mais de vitesses légèrement différentes sont focalisées en une raie F_4, image de F_2, sur la plaque photo P.

FIGURE 3

Principe de la double focalisation.

Les trajectoires 1 et 2 sont celes de deux faisceaux d'ions de même masse m et de même charge q qui ont une énergie cinétique différente. La trajectoire 2 est clle du faisceau d'ions le plus lent.

ensuite la différence d'énergie des mêmes ions par un champ magnétique également radial. A la sortie de ce champ, se trouve le détecteur. Le spectre de masse complet est obtenu en faisant varier la force du champ magnétique. Cet appareil possède le plus haut pouvoir de résolution car il corrige l'image finale de l'ion mais à cause de problèmes techniques liés aux limites des systèmes d'amplification actuels, le pouvoir ne peut être supérieur à 10 000.

c) le spectromètre de masse à double faisceau

Ce sont deux spectromètres réunis en un. Si les sources ioniques, les amplifications et les détecteurs sont doubles, les "deux spectromètres" utilisent les mêmes champs électrique et magnétique qui réalisent la double focalisation simultanée des deux faisceaux d'ions. L'intérêt de cet appareil est l'analyse possible de deux produits différents dont l'un est généralement un produit connu qui permet la calibration de l'appareil et par là son utilisation optimale : le produit analysé est directement transmis en unités de masse, le spectre de masse du produit connu apparaissant simultanément sur un autre enregistreur à déflection opposée. Le spectromètre à double faisceau est ainsi le seul appareil de spectrométrie de masse à pouvoir utiliser un marqueur de masse chimique contrairement aux autres spectromètres où le marqueur de masse est obtenu grâce à une cellule de HALL qui produit un courant proportionnel à la force du champ magnétique.

Les performances des différents spectromètres de masse sont fort différentes. Les spectromètres à double focalisation encore appelés spectromètres de masse à haute résolution ($R > 2500$) sont

surtout utilisés pour obtenir des spectres de masse précis à partir desquels il sera possible de définir des fragmentations caractéristiques du produit analysé. Les spectromètres conventionnels, de faible résolution (R = 1000 à 2500) sont plutôt employés pour des analyses de routine menées à bien grâce aux voies de fragmentation qui auront été établies avec les spectromètres de haute résolution.

B - ANALYSE D'UN COMPOSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Cinq étapes sont nécessaires pour obtenir le spectre de masse d'un composé :

- son introduction
- son ionisation
- la discrimination des ions formés
- la détection de ces ions
- le traitement des résultats de l'analyse.

1 - Introduction de l'échantillon

Les échantillons introduits doivent être volatiles, c'est-à-dire avoir une pression de vapeur au moins égale à 10^{-2} mm de mercure à une température de 150 à 200° C, température à laquelle est portée la chambre de réception de l'échantillon. Cette condition oblige l'analyse de certains composés sous forme dérivée. C'est le cas notamment des sucres. La chambre de réception a un orifice tourné vers la source d'électrons ; comme sa pression est légèrement supérieure à celle de la chambre d'ionisation, l'échantillon "vaporisé" diffuse par l'orifice ; une très faible partie de l'échantillon, un centième, arrive à l'électrode d'ionisation, sous la forme d'un

faisceau.

L'introduction peut se faire directement ou indirectement. L'introduction directe se fait à l'aide d'une "sonde" : une faible quantité de produit (environ 1mg) est introduit dans un fin capillaire de verre que l'on insère à l'extrémité de la sonde ; cette dernière, placée dans le spectromètre fait face à la chambre d'ionisation et place l'échantillon près de l'électrode d'ionisation. L'introduction indirecte est réalisée par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse qui permet l'analyse d'un mélange dont les composés sont séparés après leur passage sur la colonne de chromatographie ; cette technique est en même temps une étape de purification. L'utilisation du couplage rencontre certaines difficultés, comme la différence de pression entre les deux appareils (1 atm. pour la chromatographie en phase gazeuse et 10^{-9} atm. pour la spectrométrie de masse), de même que le gaz vecteur qui balaye la colonne de chromatographie et dilue fortement l'échantillon. A cet effet, plusieurs types de séparateurs sont utilisés (tube-fritté, orifice "jet", membrane de silicone).

Un autre problème important se pose lors de ce couplage : la prise convenable du pic chromatographique du composé. L'abondance des fragments est en effet dépendante de la pression de l'échantillon. Or celle-ci varie pendant le temps d'élution du composé.Ce problème peut être résolu en utilisant un balayage rapide qui permet d'obtenir un spectre de masse qui corresponde au sommet du pic chromatographique.

2 - Ionisation de l'échantillon

Plusieurs types d'ionisations sont utilisés ; ils sont souvent complémentaires les uns des autres :

- ionisation par impact électronique
- ionisation chimique
- ionisation de champ
- désorption de champ.

a) ionisation par impact électronique

Les molécules qui diffusent par le petit orifice de la chambre de vaporisation se heurtent à un faisceau perpendiculaire d'électrons émis par une électrode chauffée (fil de rhénium très fin) et attirés par une cathode placée face à l'électrode émettrice. L'énergie des électrons peut être ajustée entre 10 et 100 V, zone d'énergie qui permet le contrôle des processus d'ionisation et de fragmentation. La plupart des molécules organiques ont un potentiel d'ionisation voisin de 10 eV (électron-volts) ; un accroissement d'énergie de 5 à 10 eV provoque la fragmentation de la molécule, fragmentation qui peut être amplifiée proportionnellement avec l'accroissement d'énergie des électrons jusqu'à atteindre un plateau à 70 eV.

La production d'ions par impact électronique peut se simplifier ainsi :

(a) $ABC + e \longrightarrow ABC^{+} + 2e$

(b) $ABC + e \longrightarrow AB^{+} + C + 2e$

(c) $ABC + e \longrightarrow AC^{+} + B + 2e$

La réaction d'ionisation (a) se produit quand l'énergie des électrons

atteint le potentiel d'ionisation de la molécule ; (b) et (c) sont deux possibilités de fragmentation qui sont provoquées quand l'énergie des électrons est élevée : (b) est une simple cassure de la molécule, (c) implique un réarrangement des fragments de la molécule après

Il a été démontré expérimentalement que le pourcentage d'ions positifs est environ 1000 fois supérieur à celui des ions négatifs, ce qui explique pourquoi ne sont considérés dans la plupart des spectres analysés jusqu'alors que les ions positifs.

L'ionisation d'une molécule se produit très rapidement : l'expulsion de l'électron a lieu dans un temps voisin de 10^{-15} secondes. Elle demande peu d'énergie (10 volts). Dans la pratique, un excès d'énergie est reçu de manière assez inégale l'énergie utilisée étant de 70 volts. L'énergie reçue peut être suffisante pour provoquer une fragmentation immédiate dans la chambre d'ionisation. Elle est parfois trop faible : elle se répartit alors sur la molécule sous forme d'énergie de vibration qui peut entraîner une décomposition retardée 10^{-5} à 10^{-7} seconde dans le tube analyseur. Les ions qui se décomposent ainsi sont communément appelés ions métastables ; ils donnent naissance à un pic diffus, de faible intensité sur le spectre de masse. La forme du pic s'explique par une libération faible mais variable d'énergie consécutive à la fragmentation.

Si l'ion métastable de masse m_1 donne l'ion de masse m_2, la masse de ce dernier se trouvera centrée sur une masse m^* de l'échelle de masse ; la valeur de m^* peut être calculée comme suit :

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1} \left[1 + \sqrt{\frac{\mu T}{eV}} \right]^2$$

où T est l'énergie moyenne libérée, V la tension d'accélération et le rapport $\frac{m_1 - m_2}{m_2}$. Les transitions se faisant avec une faible libération d'énergie, le terme de la parenthèse à une valeur proche de l'unité et conduit à l'approximation suivante

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$$

Pour confirmer une transition $m_1 \longrightarrow m_2$, la masse m^* calculée est comparée avec la masse m^* mesurée au sommet du pic métastable : si les deux masses ont des valeurs très voisines, la fragmentation $m_1 \longrightarrow m_2$ est confirmée.

b) ionisation chimique

Son principe est de provoquer une réaction entre les molécules de l'échantillon avec une série connue et contrôlée d'"ions réactants". Ces ions sont à l'ionisation chimique ce que sont les électrons à l'ionisation par impact électronique ; ils proviennent des molécules d'un gaz qui subissent également une ionisation.

Cette technique tire son origine d'études longues et poussées sur les réactions entre ions et molécules en phase gazeuse. Ces réactions sont extrêmement rapides, comparées à celles qui se produisent entre molécules non chargées. Une collision entre une molécule ABC et son ion moléculaire ABC^+ dans un spectromètre de masse peut s'inscrire ainsi :

$$ABC + ABC^+ \longrightarrow \left[ABC.ABC\right]^+ \longrightarrow ABCA^+ + BC$$

Le produit de la réaction a une masse plus élevée que celle de la molécule initiale, ce qui est facilement observé en spectrométrie de masse. La réaction ion-molécule est une réaction bimoléculaire, ce qui la rend très dépendante de la quantité d'échantillon introduite (appelée ici pression d'échantillon) et du potentiel de

l'électrode d'ionisation qui agit sur le temps de séjour de l'ion au niveau de la chambre d'ionisation.

Le méthane a été une des molécules les plus étudiées. Différents spectres de masse du méthane ont été établis dans des conditions de pression d'échantillon différentes. Un spectre de masse a été obtenu dans des conditions de pression voisines de celle de l'ionisation par impact électronique (10^{-4} torr)*. Il adonné le résultat suivant : 46% du courant ionique total est constitué par l'ion moléculaire CH_4^+, 39% par l'ion CH_3^+ et 7% par l'ion CH_2^+. Quand la pression augmente, les ions primaires cités réagissent avec les molécules neutres de méthane et conduisent à des ions secondaires dont les plus abondants sont les suivants :

$$CH_4^{\cdot+} + CH_4 \longrightarrow CH_5^+ + {}^{\cdot}CH_3$$

$$CH_3^+ + CH_4 \longrightarrow C_2H_5^+ + H_2$$

$$CH_3^+ + 2CH_4 \longrightarrow C_3H_7^+ + 2H_2$$

$$CH_2^{\cdot+} + 2CH_4 \longrightarrow C_3H_5^+ + 2H_2 + H^{\cdot}$$

$$CH_2^{\cdot+} + CH_4 \longrightarrow C_2H_4^{\cdot+} + H_2$$

$$CH_2^{\cdot+} + CH_4 \longrightarrow C_2H_3^+ + H_2 + H^{\cdot}$$

A une pression de méthane égale à 1 torr, 95% des ions sont constitués par les ions CH_5^+ (48%), $C_2H_5^+$ (41%) et $C_3H_5^+$ (6%).

Ces observations ont conduit naturellement à l'ionisation chimique d'une molécule par des ions issus d'une autre molécule, simple, et dont on peut contrôler l'abondance en utilisant des conditions

---

* 1 torr = pression égale à un millimètre de mercure à 0°C.

d'analyses précises. En pratique,l'ionisation chimique se réalise à des pressions d'échantillon élevées voisines de 1 torr. En outre, la concentration du composé analysé ne doit pas dépasser 0,1% de celle du gaz réactant afin d'éviter que des réactions se produisent entre ions et molécules neutres du composé.

Les évènements qui surviennent dans la chambre d'ionisation peuvent donc se décomposer comme suit :

- ionisation par impact électronique du gaz réactant
- réaction ion-molécule entre ions et molécules neutres du gaz qui fournit les "ions réactants"
- réaction ion-molécule entre "ions réactants" et molécules du composé.

Ces différentes étapes se produisent simultanément et en continu dans la chambre d'ionisation.

Les premiers spectres de masse par ionisation chimique sont obtenus avec le méthane utilisé comme gaz ionisant. En ionisation chimique les "ions réactants" issus du méthane sont surtout CH_5^+ et $C_2H_5^+$: ils ont des propriétés acides prononcées et vont donc réagir comme des acides, soit par transfert de protons, soit par captation d'ions hydrides. Les réactions sont formulées ci-dessous :

$$CH_5^+ + BH \longrightarrow BH_2^+ + CH_4$$
$$C_2H_5^+ + BH \longrightarrow BH_2^+ + C_2H_4$$
$$C_2H_5^+ + BH \longrightarrow B^+ + C_2H_6$$

BH étant la molécule de composé. Les nouveaux ions formés peuvent

ensuite se fragmenter (si leur énergie interne est suffisamment élevée) comme suit :

$$BH_2^+ \longrightarrow B^+ + H_2$$

$$BH_2^+ \longrightarrow A_i^+ + C_i$$

$$B^+ \longrightarrow A_i'^+ + C_i'$$

A_i^+ et $A_i'^+$ sont les nouveaux fragments possibles ; C_i et C_i' représentent les fragments neutres correspondants. Les ions cités jusqu'ici sont ceux qui figurent finalement sur le spectre de masse.

Le méthane n'est pas le seul gaz ionisant utilisé de nos jours. L'isobutane est également un gaz très utilisé : à une pression de l'ordre de 0,4 à 1,3 torr, les ions réactants sont surtout les ions $t\text{-}C_4H_9^+$ qui comptent pour 90% du courant ionique total. Ils réagissent comme des acides faibles, ce qui entraîne l'obtention d'un spectre de masse plus simple encore que ceux obtenus avec le méthane. En outre, il arrive que les ions réactants de l'isobutane forment un complexe stable avec des composés riches en électrons qui font apparaître des pics de masse plus élevée que celle de la molécule de départ. D'autres gaz sont également utilisés, comme l'hydrogène, le propane, l'ammoniac, l'eau, le méthanol, l'azote et les gaz rares. L'eau et le méthanol donnent exclusivement des ions protonés polymérisés, la polymérisation étant fonction de la pression du gaz réactant ; ces ions forment des complexes avec les composés. Les gaz rares, par contre, extraient un électron du

composé :

$$Xe^{+\cdot} + BH \longrightarrow BH^{+\cdot} + Xe$$

Comme on peut le voir, leur effet ionisant les fait distinguer nettement des autres gaz et les rapproche des électrons qui arrachent également un électron à la molécule. Cela annule par la même occasion l'avantage principal de l'ionisation chimique : en effet, celle-ci tire son intérêt du fait que le nombre d'ions primaires issus de la réaction avec les ions réactants du gaz est plus limité et donne par voie de conséquence des spectres de masse beaucoup plus simples que ceux obtenus par l'ionisation par impact électronique, laquelle génère au départ un nombre d'ions différents très élevé.

c) ionisation de champ

Ce type d'ionisation est souvent utilisé comme complément d'information à l'ionisation par impact électronique. A l'aide d'un champ électrique, de l'ordre de $5,10^7$ volts/cm, il est possible d'ioniser la molécule étudiée en lui conférant un supplément d'énergie interne plus faible que lors de l'impact électronique. C'est une ionisation douce. Elle se produit à la fois sur la surface et au voisinage de l'émetteur de champ électrique.

Cette technique est une extansion des études de détection des réactions chimiques qui ont lieu à la surface des solides, alors que l'ionisation par impact électronique se passe en milieu gazeux. L'ionisation de champ se différencie encore de l'impact électronique par le fait que la probabilité d'ionisation d'une molécule augmente avec l'intensité du champ électrique :

$$I \simeq cte \times F^{30}$$

I représente le courant ionique et F la force du champ électrique. Cette ionisation de nature électrodynamique peut s'expliquer par les lois de la mécanique quantique,lesquelles définissent une distance minimale par rapport à l'émetteur de champ où l'ionisation peut se produire. Cette distance est fonction à la fois du champ électrique et du potentiel d'ionisation de la molécule. Toutefois une molécule peut s'ioniser tout en étant adsorbée à l'émetteur de champ, à condition d'appliquer des champs plus élevés (5×10^8 volts/cm) : une telle ionisation est communément appelée "désorption de champ".

L'ionisation de champ se traduit également par l'apparition d'un courant ionique dont l'intensité dépend de l'apport des molécules neutres au niveau de l'émetteur, apport qui a deux origines :

- celle de la phase gaz
- celle de la diffusion de surface des molécules absorbées sur l'émetteur.

Le premier apport est défini par la relation :

$$n_o^{\cdot} = \frac{n\bar{c}}{4} \times O$$

$n_o^{\cdot}$ est le nombre de particules de la phase gaz arrivant à proximité de l'émetteur, n le nombre de particules par cm^3, $\bar{c}$ la vitesse moyenne de celles-ci et O la surface de l'émetteur. Il semble que l'apport est aussi fonction de la force du champ électrique, les molécules étant attirées dans les zones de champ élevées qui ont pour effet d'augmenter leur polarisation (polarisation induite ou permanente). Un facteur de multiplication σ peut être formulé :

$$\sigma = \frac{1 + \frac{2V}{}_{(F)}}{3kT} \qquad \text{avec} \quad V_{(F)} = \frac{\alpha}{2} F^2 + \mu F$$

k est la constante de BOLTZMANN, T la température absolue, $V_{(F)}$ l'énergie de polarisation, α la polarisabilité et μ le moment dipolaire moyen de la molécule. Ainsi, lorsque la force de champ électrique est suffisamment élevée, toute molécule dans le proche voisinage de l'émetteur de champ s'ionise pour donner un courant ionique dont l'intensité est donnée dans l'équation suivante :

$$I = en_0^{\cdot}\sigma$$

Le deuxième apport provient de la diffusion des molécules adsorbées sur l'émetteur vers le centre de celui-ci. Ce phénomène est difficile à définir mathématiquement ; il serait cependant fonction de l'énergie d'adsorption des molécules.

Plusieurs types d'émetteurs de champ sont utilisés : ce sont principalement des électrodes courbes, même sphériques, la force du champ étant inversement proportionnelle au rayon de courbure. Trois types d'émetteur sont généralement utilisés : sphères, fils et lames, petits ou fins et de nature métallique. Les plus hauts champs sont obtenus avec les sphères qui ont été employées aux débuts de l'ionisation de champ. En raison de leur faible surface et de leur forme, le courant ionique produit est faible et très variable, inconvénients que ne connaissent pas les fils et les lames au profit desquels elles ont été abandonnées pour aborder l'analyse qualitative et quantitative des composés organiques. Les fils métalliques compensent leur grand rayon de courbure -la tension électrique incurve le fil- par l'apparition de microaiguilles à leur surface, la multiplicité de ces dernières permettant d'obtenir un courant

ionique jusqu'à cent fois supérieur en intensité à celui obtenu avec les sphères (10^{-6}A). Ces microaiguilles sont autant de mini-champs locaux d'intensité élevée. Grâce à des observations au microscope électronique, il a été permis de contrôler la formation des microaiguilles qui est, non seulement fonction de la nature du métal, mais également de la nature de certains composés organiques. Actuellement, avant toute opération d'ionisation de champ, les fils sont prétraités avec un solvant qui permet d'obtenir le maximum de microaiguilles ainsi qu'un développement important de celles-ci : le benzonitrile et surtout l'acétone sont les meilleurs solvants de cette phase d'activation. Comme les sphères, des métaux de tension de rupture élevée composent les fils : les plus courants sont le platine (fil de 3 microns de diamètre) et le tungstène (fil de 10 microns de diamètre). Quant aux lames, également composées de platine ou de tungstène, leur avantage réside dans une cause de rupture beaucoup moins probable qu'avec les fils. Par contre, la force du champ créée est moins importante que celle obtenue avec les fils, de même que le courant ionique final qui est jusqu'à cent inférieur.

A titre de comparaison, l'intensité du courant ionique obtenu avec les fils métalliques (10^{-6}A) est beaucoup plus élevée que celle produite par bombardement électronique. Cependant, la collecte des ions est moins efficace que lors du bombardement électronique en ce sens que les ions issus de la première ionisation sont focalisés alors qu'ils ne le sont pas lors de l'ionisation de champ. Malgré cela, le courant ionique reste supérieur (10 fois) à celui de l'impact électronique. La résolution dépend ici du potentiel appliqué

entre les électrodes d'ionisation ; cette dépendance s'explique en partie par le fait qu'une chute de potentiel se produit tout au long des microaiguilles. Ce problème est partiellement résolu en utilisant la plus haute tension possible entre les électrodes. Il existe des spectromètres de masse équipés de deux sources d'ionisation (impact électronique et ionisation de champ) ; le changement s'effectue simplement par déplacement de deux sources face à la chambre de réception et interruption du faisceau d'électrons quand l'analyse se fait par ionisation de champ.

d) désorption de champ

C'est une technique dérivée de l'ionisation de champ. Comme il a été précédemment décrit, l'ionisation de champ est la composition de deux ionisations, dont l'une se produit au voisinage de l'émetteur, l'autre à la surface de ce dernier, la première étant largement prédominante. La désorption de champ met davantage l'accent sur l'ionisation de surface qui se traduit par la désorption des molécules. Pour ce faire, l'introduction de l'échantillon se fait de manière particulière : elle est effectuée par simple immersion de l'électrode dans la solution à analyser. Après élimination du solvant sous faible pression, l'électrode est chauffée progressivement par le passage d'un courant de quelques milliampères dont on augmente régulièrement l'intensité. Il est possible de cette façon, avant que l'échantillon ne soit totalement "consommé", d'obtenir plusieurs spectres de masse différents et d'optimiser finalement l'analyse. La désorption de champ intéresse surtout la détermination de l'ion moléculaire.

Chaque ionisation a un intérêt particulier. Le choc des molécules du composé analysé avec les électrons lors de l'impact électronique crée de nombreux ions différents, dont l'abondance et le nombre sont fonction de l'énergie des électrons. En donnant ainsi naissance à un nombre important de fragments, l'ionisation par impact électronique est très utile dans la détermination des voies de fragmentation qui conduisent à la structure des composés. L'ionisation chimique apporte les mêmes informations que l'ionisation précédente : elle fournit cependant des spectres de masse plus simples à cause d'une ionisation davantage contrôlée au départ ; ce contrôle est assuré par une série d'ions réactants dont le nombre et la variété dépendent des conditions de pression appliquées lors de l'analyse ; elle offre en outre la possibilité d'obtenir l'ion moléculaire. C'est la recherche de cet ion qui constitue le but essentiel de deux autres ionisations, l'ionisation de champ et la désorption de champ.

3 - Discrimination des ions

L'étape de la séparation des ions formés a été décrite lors de la revue des différents spectromètres de masse : elle peut être effectuée par un champ électrique (spectromètre quadrupole et monopole), par un champ magnétique (spectromètre magnétique conventionnel), à l'aide des deux champs (spectromètre à double focalisation) ou encore sans champ dans le cas du spectromètre "time of flight".

A l'exception des spectromètres qui utilise la discrimination électrique, les ions sont préalablement accélérés au moyen d'un champ électrique avant d'être séparés.

4 - Détection des ions

La détection des ions peut être électrique ou photographique. Les choix qui déterminent l'utilisation de l'une ou l'autre sont la précision, la sensibilité ou le temps de réponse de chacune en fonction de l'analyse entreprise.

a) la détection électrique

Dans les détecteurs électriques courants, les ions positifs qui arrivent au collecteur sont neutralisés par des électrons captés de la terre après passage dans une forte résistance. La différence de tension consécutive au niveau de la résistance représente l'intensité du courant ionique qui est par la suite amplifiée. Deux types de détecteurs électriques sont utilisés : la cage de Faraday et l'amplificateur d'électrons.

α) la cage de Faraday

La capture des ions peut se faire par une petite électrode située dans une cage de Faraday dont l'ouverture est orientée dans la trajectoire des ions ; l'électrode est en outre inclinée de manière à ce qu'aucun ion, même réfléchi, ne puisse ressortir de la cage. La réponse est en conséquence, indépendante de l'énergie, de la masse et de la nature chimique de l'ion et fait de la cage de Faraday un détecteur qui est peu sensible aux différences de masse.

β) l'amplificateur d'électrons

L'amplification se fait par émission secondaire d'électrons : les ions focalisés qui arrivent sur le collecteur atteignent une dynode de conversion laquelle transforme le courant ionique en courant électrique équivalent. Les électrons émis par cette première

dynode sont accélérés puis dirigés vers une autre dynode qui émet à son tour des électrons mais en nombre supérieur ; l'amplification est repétée plusieurs fois et il est relativement courant de voir des amplificateurs comprenant 10 à 20 dynodes : le gain final est important, de l'ordre de 10^5. La réponse étant très rapide, ce type de détecteur est très interessant. Toutefois, l'amplification est fonction de la masse, de la charge et de la nature de l'ion : un nombre donné d'ions de masse m/e 500 ne donnera pas un signal électrique de sortie égal en intensité à celui produit par un même nombre d'ions de masse m/e 50. En outre, ils sont sensibles aux variations de champ magnétique.

Ces deux détecteurs électriques sont associés à un système d'enregistrement sur papier photosensible. Le papier est impressionné au moyen de faisceaux lumineux réfléchis par de minuscules miroirs qui sont fixés sur des galvanomètres de sensibilités différentes, ces derniers enregistrant l'intensité des courants ioniques.

b) la détection photographique

Elle est utilisée surtout pour des analyses précises de la masse des fragments. C'est une plaque photographique, de format 5 x 25 cm le plus souvent qui peut contenir 15 à 30 spectres de masse obtenus par les spectromètres de masse à haute résolution. Les spectres apparaissent sur la plaque sous forme de traits verticaux bien définis, chaque trait correspondant à un ion. L'intensité des traits peut être convertie à l'aide d'un microdensitomètre : il peut mesurer des largeurs de plaque aussi fines qu'un micron permettant d'avoir alors une précision d'un millième de masse.

5 - Traitement des résultats de l'analyse

L'arrivée des ordinateurs constitue une étape fondamentale de modernisation de spectromètres de masse qui peuvent être utilisés au maximum de leurs possibilités..

L'informatique aide l'opérateur dans un premier temps à calibrer la spectromètre avec des composés de référence comme le perfluorokérosène ou la perfluorotributyfamine ; l'étape de la calibration consiste à faire coïncider le marquage de masse magnétique avec la masse connue des composés de référence.

L'appareil calibré, l'échantillon peut être introduit directement par la sonde du spectromètre ou injecté au chromatographe de phase gazeuse qui réalise la séparation des différents produits de l'échantillon. L'acquisition des résultats commence dès que le balayage du collecteur d'ions par le détecteur est déclenché ; les résultats sont stockés en continu sur disques ou bandes magnétiques. Lorsque l'analyse de l'échantillon est terminée, l'opérateur peut faire ressortir les données acquises selon le programme qu'il a établi au départ.

C - TECHNIQUES PARTICULIERES UTILISEES EN SPECTROMETRIE DE MASSE

L'obtention d'un spectre de masse simple et complet est ce qui est le plus demandé au spectromètre de masse, ce qui n'est pas toujours aisé. Certains problèmes peuvent être cependant résolus de manière plus spécifique par la recherche de fragments représentatifs d'une molécule, ou par le calcul de la masse de celui-ci.

1 - Comparaison de fragments ("peak matching")

Cette technique permet d'accéder à la masse exacte d'un

fragment caractéristique d'un composé : elle consiste à comparer deux fragments de masses différentes dont on peut faire coïncider les images sur un oscilloscope en faisant varier le potentiel électrique à l'aide d'un bouton de calibration et en maitenant la force du champ magnétique. La masse de l'un des fragments étant connue, celle de l'autre fragment peut être déchiffrée rapidement à la lecture du bouton de calibration. La superposition des images peut prendre plusieurs minutes et nécessite par conséquent une quantité suffisante de produit pour "alimenter" le spectromètre pendant ces quelques minutes. La technique ne peut donc être utilisée lors d'un couplage chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse. Elle est surtout réalisée avec des spectromètres à haute résolution (pouvoir de résolution : 10 000) ; elle est possible avec des spectromètres à faible résolution (pouvoir de résolution : 1500 - 1000) mais uniquement sur l'ion moléculaire.

2 - Détection d'ions multiples

La détection d'ions multiples permet de repérer plusieurs gaz différents ou plusieurs fragments issus d'un même composé. Elle se fait soit à l'aide de plusieurs détecteurs possédant chacun son propre système d'amplification ou à l'aide d'un détecteur unique associé au système d'accélération des ions (alternateur).

a) détecteur unique

La détection à détecteur unique a été effectuée à l'origine pour repérer les ions moléculaires d'un composé et de son analogue deutéré. L'alternateur d'accélération des ions est un système qui permet de faire varier la tension d'accélération de manière à ce

que les ions recherchés soient focalisés alternativement sur le collecteur. La tension ne peut varier au-delà de 10% de sa valeur. Techniquement, l'ion recherché de plus basse masse est focalisé en faisant varier le champ magnétique alors que la tension d'accélération est à son maximum ; les autres fragments sont ensuite centrés sur le collecteur en modifiant uniquement la tension d'accélération. A la fin de la manipulation, les différents fragments peuvent être visualisés sur un oscilloscope simultanément en reproduisant les différentes tensions utilisées pour les obtenir. Cette technique est très sensible et permet de voir les composés non détectables par un détecteur à ionisation de flamme ; elle n'est cependant que qualitative en raison de la trop faible concentration des produits analysés.

b) détecteurs multiples

C'est le système de détection le plus adapté pour la détection d'ions multiples. Les différents détecteurs peuvent être déplacés de manière à intercepter le courant ionique émis par chacun des fragments recherchés. Cependant comme les fenêtres du collecteur ont une taille finie, il est impossible de détecter des ions de masse voisines. Ce type de détection est utilisé pour l'analyse des gaz respiratoires comme l'oxygène, l'azote, le gaz carbonique. Sa limite d'utilisation se situe dans la zone des faibles masses de l'ordre de 70 unités.

II - APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ETUDE DES SUCRES

Les premières études des sucres en spectrométrie de masse, utilisant des spectromètres de masse à faible résolution ne sont guère encourageantes : les spectres de masse montrent un nombre d'ions importants qui laissent penser à des mécanismes de fragmentation complexes ; en outre, les ions de masse élevée sont rares ou très peu intenses. Cependant, la comparaison des sucres analysés avec leurs analogues deutérés va faire progresser l'analyse des spectres et avancer des mécanismes possibles de fragmentation qui se sont vus confirmés grâce à l'utilisation des spectromètres de masse à haute résolution, ceux-ci aidant à déterminer la masse exacte et la composition des fragments.

Le récent développement des autres ionisations (ionisation chimique, ionisation de champ) ont encore fait progresser les analyses des sucres en offrant surtout le moyen d'obtenir à la fois des spectres beaucoup plus simples et l'ion moléculaire souvent absent dans les spectres de masse obtenus après l'ionisation par impact électronique.

La faible volatilité et l'instabilité thermique des sucres non substitués nécessite l'examen de ceux-ci sous une forme dérivée. Les dérivés les plus utilisés sont les éthers méthyliques, les acétates et les éthers triméthylsilylés. Le choix de ces dérivés s'est surtout fait en fonction de leur préparation, plus ou moins aisée, de leur séparation en chromatographie en phase gazeuse, de la performance des spectromètres de masse. Les dérivés mixtes, comme les acétates ou les éthers triméthylsilylés des sucres partiellement méthylés, les alditols perméthylés et les alditols acétates

viennent compléter ces études en apportant des renseignements complémentaires sur la nature du sucre étudié, ou sa structure.

Les résultats de la spectrométrie de masse des sucres qui vont être décrits sont basés sur des analyses obtenues après ionisation par impact électronique. L'analyse des monosaccharides naturels courants sous diverses formes dérivées est présentée dans un premier temps ; les travaux réalisés sur les oligosaccharides sont décrits dans un deuxième temps.

A - LES MONOSACCHARIDES

Les différentes classes de monosaccharides, monosaccharides neutres, osamines, acides uroniques, acides sialiques et sucres phosphates, ont toutes fait l'objet de travaux en spectrométrie de masse. Pour chaque classe, plusieurs substitutions ont été utilisées ; chacune d'entre elles a apporté des renseignements précieux sur le monosaccharide (nature, forme du cycle) en donnant naissance à des fragments particuliers. Les monosaccharides sont revus selon la nature du substituant utilisé (groupement méthyl, acétyl ou triméthylsilyl).

1 - Les éthers méthyliques

Ces dérivés ont surtout été étudiés à cause de leur présence dans les hydrolysats ou les méthanolysats de polysaccharides libres ou conjugués perméthylés.

Les éthers méthyliques des monosaccharides neutres sont les dérivés qui ont été le plus analysés, ce qui explique pourquoi leur fragmentation est clairement définie depuis plusieurs années déjà. Le méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-β-D-arabinopyranoside a été choisi

comme modèle par KOCHETKOV et CHIZHOV (65) pour illustrer les différentes voies de fragmentation des monosaccharides perméthylés. Ce sucre sert souvent maintenant de référence pour identifier les autres monosaccharides. Les fragmentations ont été définies grâce à un marquage très précis par trideutérométhylation sur une ou plusieurs fonctions alcool des monosaccharides. Un tel marquage a permis en outre de remarquer que plusieurs ions pouvaient contribuer ensemble dans l'intensité d'un pic. Le tableau I page 36 permet de faire ressortir cette observation en rassemblant les intensités des différents fragments isomères obtenus à partir de la fragmentation du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-α-D-glucopyranoside et de ses analogues deutérés (63). Chaque voie de fragmentation est désignée par une lettre majuscule et les fragments dotés d'indices : ainsi, le fragment A_2^1 a suivi la fragmentation A, l'indice inférieur qu'il indique qu'il est formé après deux éliminations de radicaux ou de molécules et l'indice supérieur qu'il est le premier d'une série de fragments isomères de même masse.

La voie de fragmentation A se compose de fragments qui dérivent les uns des autres par perte d'une molécule de méthanol selon un mécanisme de β élimination (voir figure 4 page 38). Parmi les fragments de cette série A, il existe trois fragments A_2 isomères de masse m/e 187 dont le plus important est le fragment A_2^2 ; il dérive du fragment A_1 qui subit la perte du groupement méthyl du carbone C_3, comme le montre la lecture du tableau de la page 36 : lorsque l'on compare l'intensité du fragment de masse m/e 187 avec celle du fragment de masse m/e 190 consécutif à une monodeutération (remplacement d'un groupement méthyl CH_3 par

TABLEAU I

Intensités des fragments observés dans le spectre de masse du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- -D-glucoside et de ses analogues deutérés (KOCHETKOV et coll. (62))

(I)	Position of $-C^2H_3$ groups									
	6	4	3	2	2,3	2,4	2,6	3,4	3,6	4,6
219	221	221	221	221	224	224	224	224	224	224
205	205	208	208	208	211	211	208	211	208	208
187	190	190 (84)	190 (25)	190 (90)	193 (16)	193 (75)	193 (90)	193 (10)	193 (25)	193 (84)
		187 (16)	187 (75)	187 (10)	190 (84)	190 (25)	190 (10)	190 (90)	190 (75)	190 (16)
176	176	179	179	179	182	182	179	182	179	179
173	173	176	173	176	176	179	176	176	173	176
159	162	162	159 (50)	159 (50)	162	165 (50)	165 (50)	165 (50)	165 (50)	165
			162 (50)	162 (50)		162 (50)	162 (50)	162 (50)	162 (50)	
149	152	149	152	149	152	149	152	152	155	152
145	145	148	148	148	151	151	148	151	148	148
131	131	134 (60)	134	134	137	137 (60)	134	137 (60)	134	134 (60)
		131 (40)				134 (40)		134 (40)		131 (40)
111	111	114 (50)	114 (10)	114 (40)	114 (50)	114 (90)	114 (60)	114 (40)	114 (10)	114 (50)
		111 (50)	111 (90)	111 (60)	111 (50)	111 (10)	111 (40)	111 (60)	111 (90)	111 (50)
101	104 (10)	104 (70)	104 (30)	104 (90)	107 (30)	107 (60)	104	104 (95)	104 (35)	107 (10)
	101 (90)	101 (30)	101 (70)	101 (10)	104 (60)	104 (40)		101 (5)	101 (65)	104 (60)
					101 (10)					101 (30)
88	88	91 (16)	91 (95)	91 (84)	94 (79)	91	91 (84)	94 (16)	91 (95)	91 (16)
		88 (84)	88 (5)	88 (16)	91 (21)		88 (16)	91 (79)	88 (5)	88 (84)
								88 (5)		
45	48 (50)	48 (5)	48 (15)	48 (30)	48 (40)	48 (30)	48 (80)	48 (15)	48 (60)	48 (50)
	45 (50)	45 (95)	45 (85)	45 (70)	45 (60)	45 (70)	45 (20)	45 (85)	45 (40)	45 (50)

un groupement trideutérométhyl CD_3), on remarque que les fragments de masse m/e 190 sont les plus intenses (85 à 90% contre 15% environ pour le fragment de masse m/e 187) dans le spectre de masse des glucopyranosides perméthylés qui ont un groupement trideutérométhyl fixé sur le carbone C_2 ou C_4 ; le rapport est inversé dans le cas du dérivé monodeutéré sur le carbone C_3. Cette observation est confirmée par la forte intensité du pic de masse m/e 193 du méthyl-3,6-di-O-méthyl-2,4-di-O-trideutérométhyl-α-D-glucopyranoside et la prédominance du pic de masse m/e 190 des méthyl-4,6-di-O-méthyl-2,3-di-O-trideutérométhyl et méthyl-2,6-di-O-méthyl-3,4-di-O-trideutérométhyl-α-D-glucopyranosides.

Les fragments B_1, de la voie de fragmentation B, se forment par l'ouverture du cycle comme le montre la figure 4 page 38 ; ils peuvent ensuite perdre un radical méthoxyméthyl et donner le fragment B_2. Les fragments B_1 peuvent se décomposer d'une autre manière et donner d'autres ions (J_1^1 et F_1^1) qui contribuent cependant peu dans l'intensité des pics de masse correspondants (m/e 75 et m/e 101 respectivement).

La fragmentation C se caractérise surtout par le pic de masse m/e 115 composé en majeure partie de l'ion C_2^2 (voir figure 5 page 39) : la fragmentation de l'ion moléculaire commence par la cassure de la liaison carbone-carbone C_1-C_2 qui aboutit au fragment C_1 par perte d'une molécule de formiate de méthyle ; ce dernier fragment, très instable, conduit à une série de fragments C_2 dont le plus important est le fragment C_2^2.

Les séries D et J (figure 5 page 39) et F (figure 6 page 41) sont issues de l'ion moléculaire M_1^+ qui subit une fragmentation autre que celle de la série C. Le fragment D_1 provient d'un déplacement

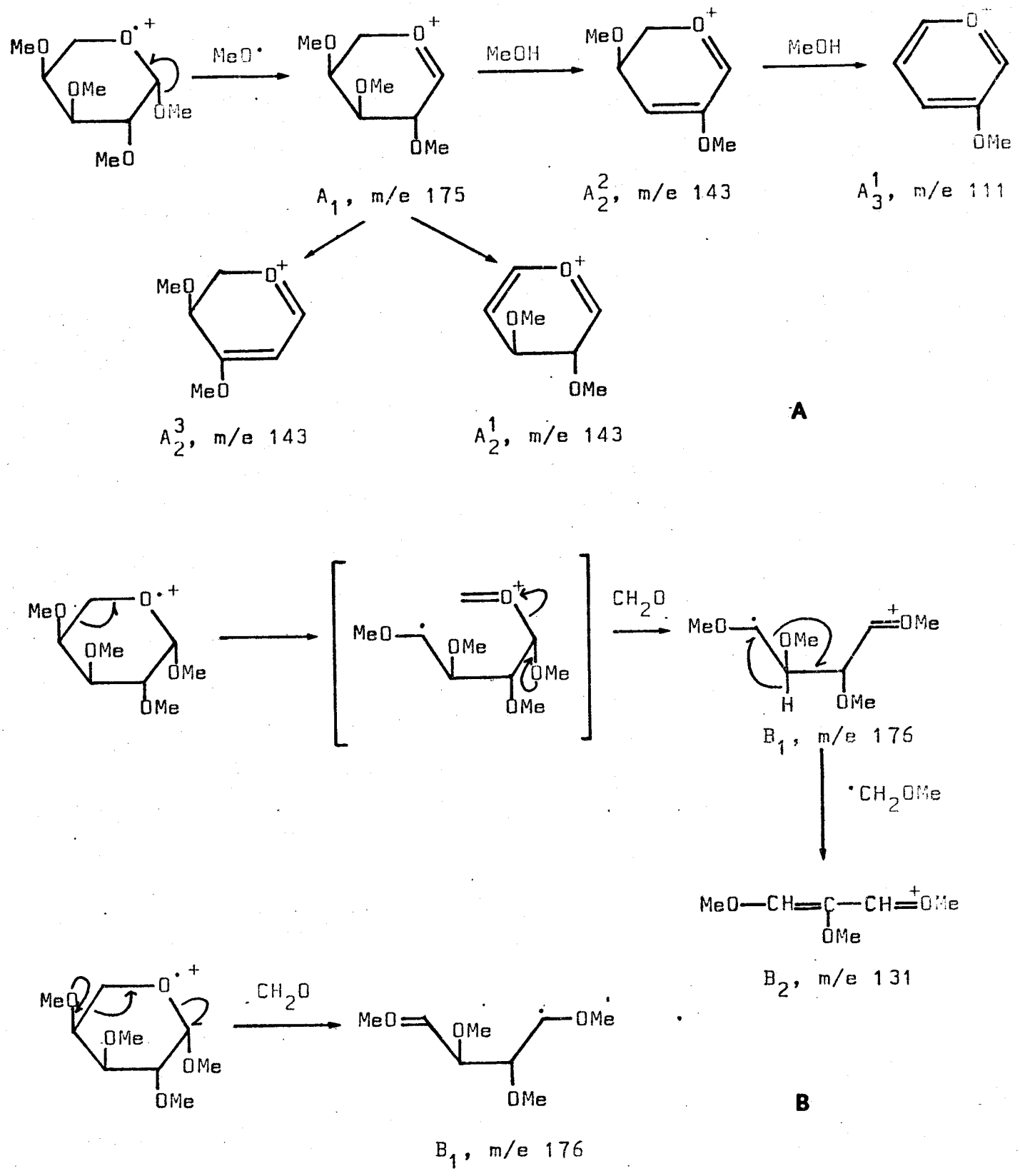


FIGURE 4

Fragmentation du méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-β-L-arabinoside.

A : fragments de la série A; B : fragments de la série B.

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

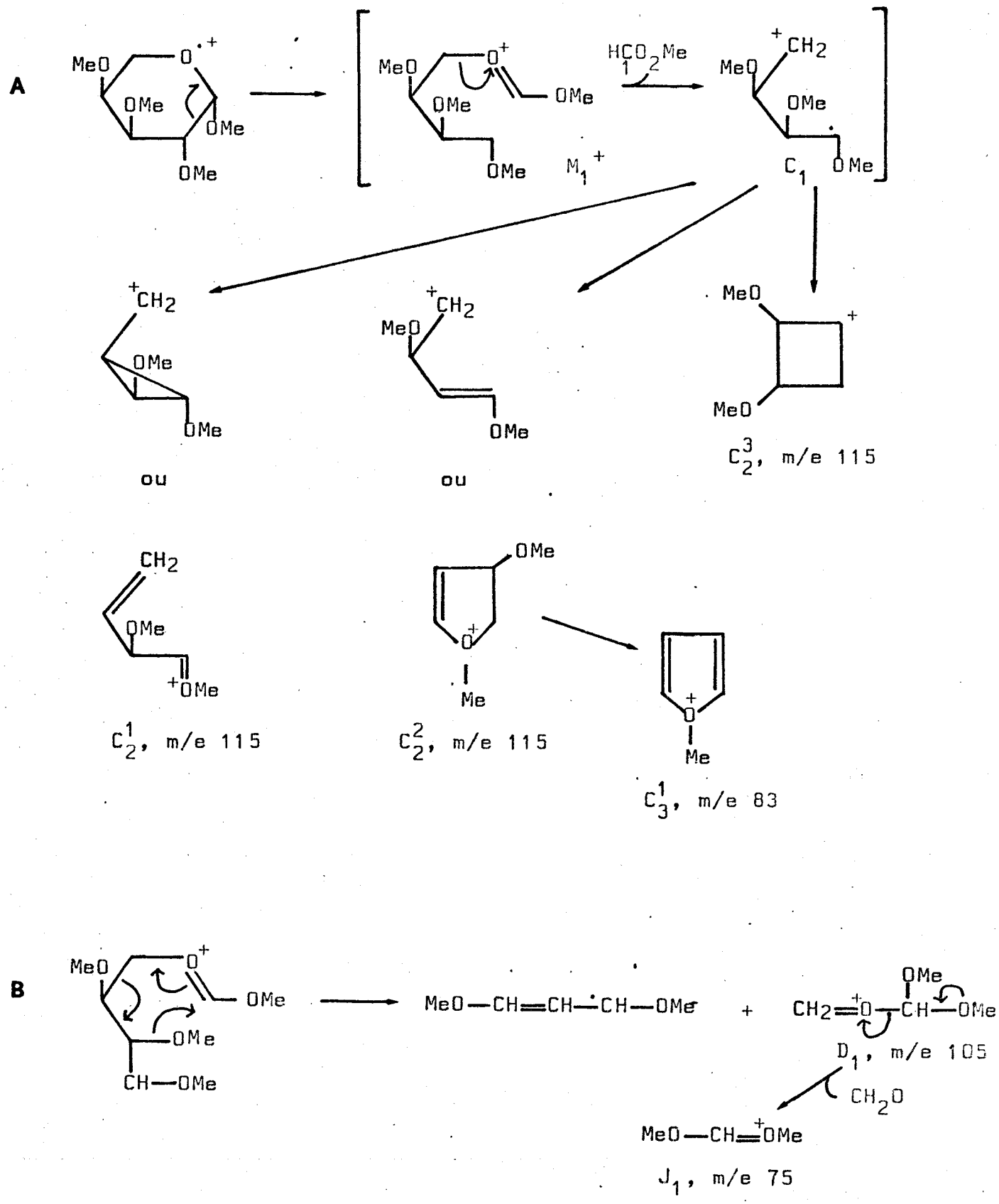


FIGURE 5

Fragmentation du méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-β-L-arabinoside.

A : fragments de la série C ; B : fragments de la série D.

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

électronique cyclique à l'intérieur de l'ion moléculaire ; c'est le précurseur de l'ion J_1. La série D représentée à la fois par les ions D_1 et J_1 est très importante comme nous le verrons plus loin car elle constitue la seule voie de fragmentation donnant lieu à un réarrangement : en effet, comme le prouvent les analogues deutérés, l'un des groupements méthyl lié au carbone C_1 du fragment J_1 provient du carbone C_3. La formation de l'ion F_1 est présentée dans la figure 6 page 41 : 80% du pic de masse m/e 101 est constitué de l'ion F_1^2 et 12% de l'ion G_1^4. Les fragments de la série G sont les fragments cycliques analogues de ceux de la série F.

Enfin, l'ion moléculaire M^+ est également dégradé en ions H et K, série de fragments de masse faible formés à la suite de permutations cycliques d'électrons (figure 6 page 41). Le plus abondant des ions de la série H de masse m/e 88 est l'ion H_1^2.

Les séries A à K représentent les voies de fragmentation fondamentales de tous les méthyl-glycosides perméthylés. La moindre modification de structure du monosaccharide comme l'apparition d'un substituant sur le carbone C_5 (hexoses, 6-déoxy-hexoses, acides uroniques, hexosamines) ou d'une nouvelle fonction (groupement acétamide des osamines) va se traduire par un changement sensible dans l'allure générale du spectre de masse au niveau de la masse des fragments notamment : les fragments de la série A, qui par exemple contiennent le carbone C_5 auront une masse supérieure de 44 unités de masse en ce qui concerne les méthyl-hexosides, de 14 unités pour les 6-déoxy-hexosides, de 58 unités pour les acides uroniques et de 85 unités dans le cas des N-méthyl acétamide-2-

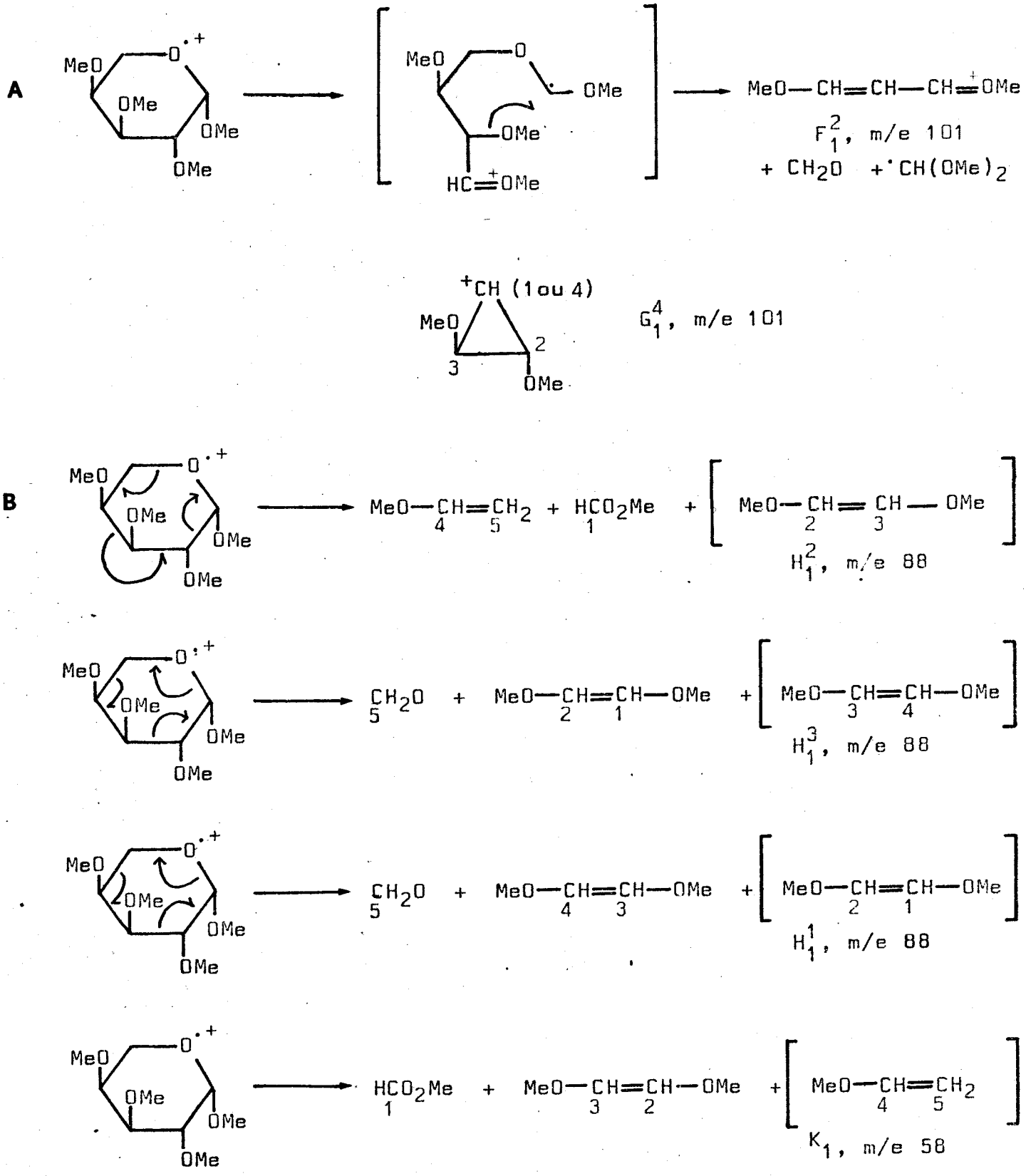


FIGURE 6

Fragmentation du méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl- -L-arabinoside.

A : formation du fragment F_1^2 et structure du fragment isomère cyclique G_1 ; B : fragments des séries H et K .

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

déoxy-hexosides.

Les méthyl-hexosides (64) dont le spectre de masse est senblable à celui des méthyl-pentosides, exception faite des masses de fragments des séries A, C et D, ont permis de définir une autre voie de fragmentation E dont les fragments ont cependant une intensité relativement faible ; elle se compose d'ions issus de l'élimination du substituant fixé sur le carbone C_5, l'ion E_1 donnant l'ion E_2 à la suite de la perte d'une molécule de méthanol (figure 7 page 43). La fragmentation générale du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-α-D-glucoside et son spectre de masse sont présentés figures 8 et 9 pages 44 et 45 afin de faire ressortir les fragments importants obtenus lors de l'analyse des méthyl-hexopyranosides.

KOVACIK et coll. (68) analysent les spectres de masse des acides uroniques qu'ils isolent après hydrolyse acide partielle de la résine du pêcher. Les spectres de masse des monosaccharides acides ressemblent fort à ceux des hexopyranosides neutres : les fragments des séries A, C et D ont une masse supérieure de 14 unités de masse ; les seuls fragments absents sont ceux de la série K qui sont composés des carbones C_4 et C_5 : la présence de la fonction acide du carbone C_6 les rend très instables. Les auteurs remarquent d'autre part des différences d'intensité très importantes selon la nature de l'acide uronique au niveau des fragments A_2, B_1, D_1, H_1 et F_1, différences susceptibles de permettre leur différenciation.

Des expériences détaillées ont également été réalisées

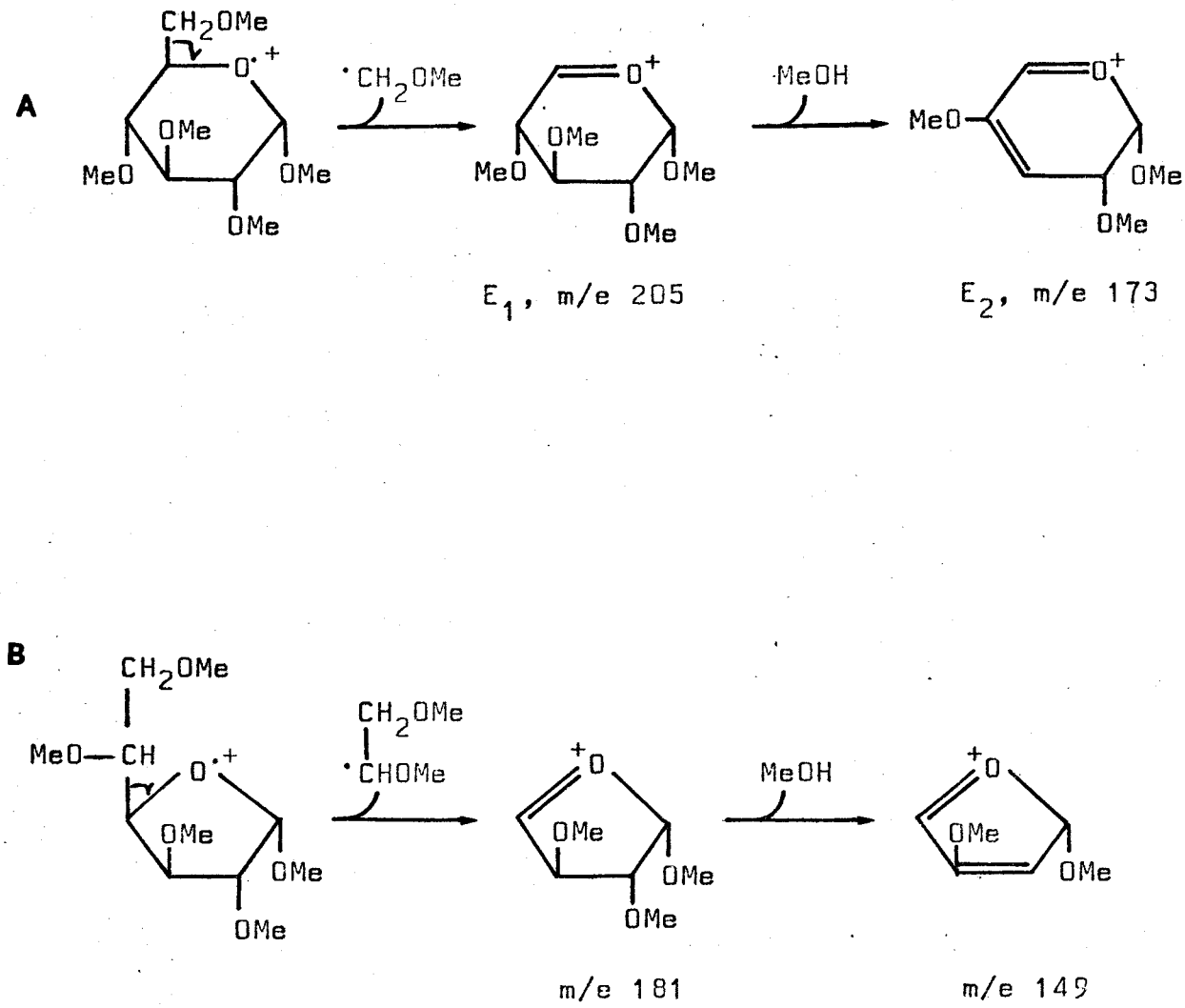


FIGURE 7

Voie de fragmentation E des méthyl-glycosides perméthylés.

A : du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- -D-glucopyranoside ;

B : du méthyl-2,3,5,6-tétra-O-méthyl- -D-glucofuranoside.

KOCHETKOV et CHIZHOV (64)

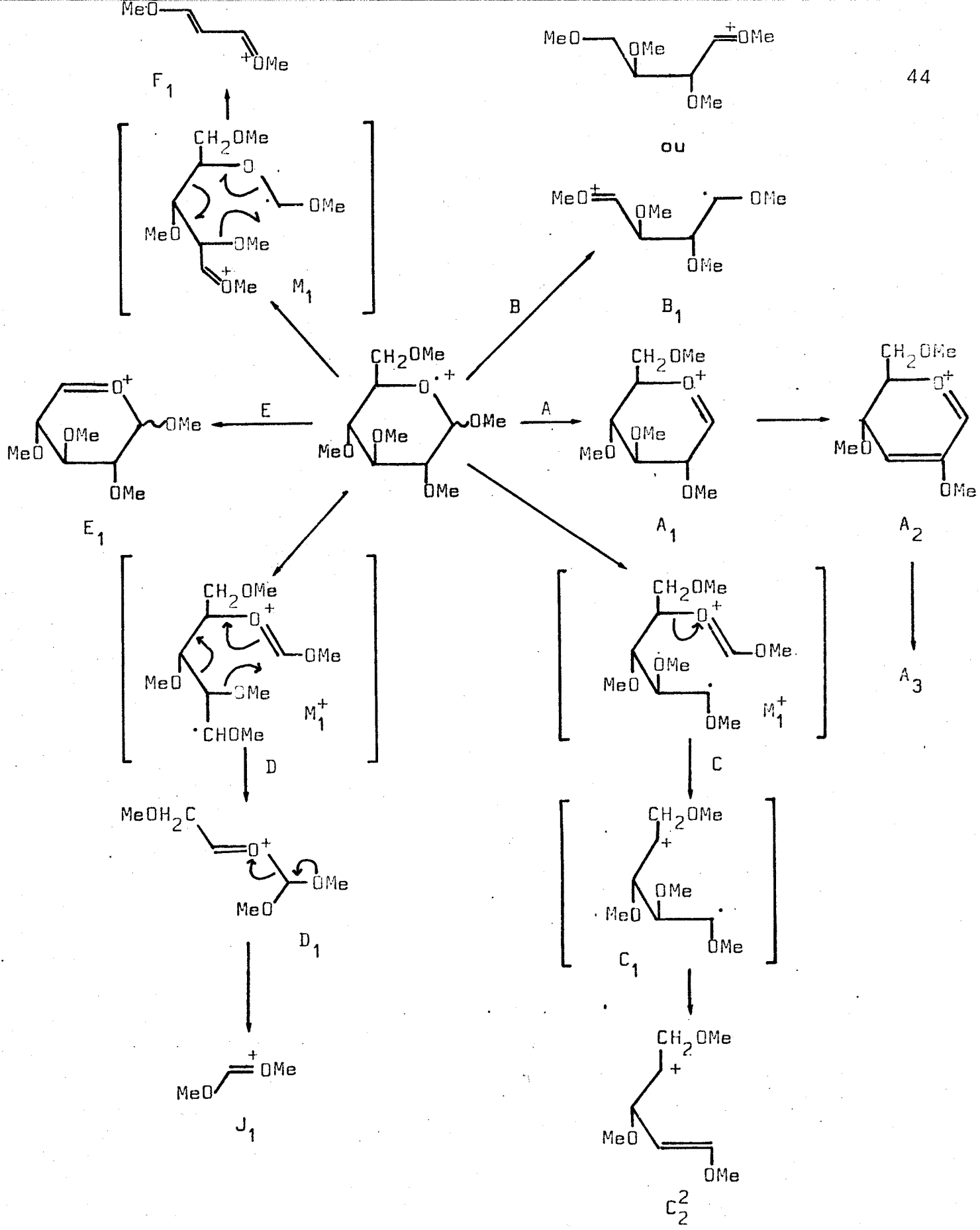


FIGURE 8

Fragmentation générale du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucopyranoside. KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

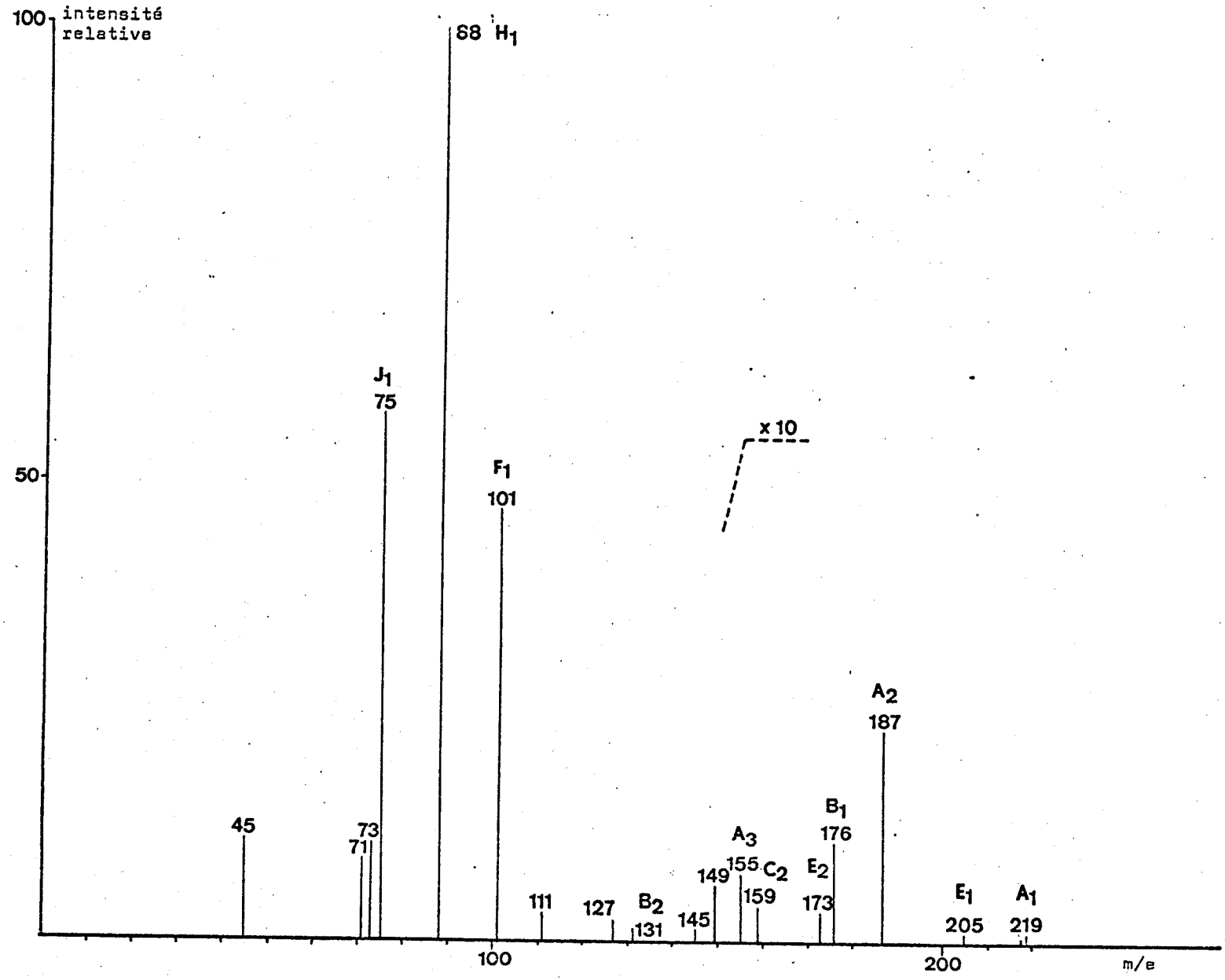


FIGURE 9

Spectre de masse du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-α-D-glucoside (KOCHETKOV et CHIZHOV (62)).

sur les monosaccharides aminés perméthylés, à l'aide de dérivés deutérés (47, 65). Des séries de fragments identiques à celles des méthyl-hexopyranosides sont évidentes à la lecture du spectre de masse, à l'exception de la série C qui conduit à un ion ammonium C'^{2}_{3} de masse m/e 98 par une fragmentation toute autre, C', que celle de la série C des monosaccharides neutres. De nouveaux fragments de masse m/e 128 et m/e 115 sont identifiés grâce aux analogues deutérés : ce sont les analogues des ions F_1 et H_1 des méthyl-hexopyranosides. Ces deux fragments peuvent se dégrader et donner naissance à la suite de l'élimination d'une molécule de cétène ($CH_2{=}C{=}O$) aux fragments de masse m/e 86 et m/e 73. D'autres travaux concernant des monosaccharides aminés dont la fonction acétamide est située différemment sur les carbones C_1, C_2, C_3 et C_4 ont été effectués (45). Il aété possible dans cette étude de localiser la position de la fonction acétamide à partir de la distribution des ions de masse m/e 88, 101 et 75 (H, F et J respectivement).

Les problèmes difficiles à résoudre en spectrométrie de masse sont l'anomérie et l'isomérie des sucres. KOCHETKOV et CHIZHOV (64) effectuent la comparaison des spectres de masse des anomères α et β du méthyl 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthyl-D-glucopyranoside et remarquent pour toute différence un rapport $\frac{m/e\ 187}{m/e\ 176}$ plus élevé dans le cas de l'anomère α : la formation du fragment m/e 187 se ferait plus facilement à cause de la position axiale énergétiquement défavorable du groupement méthyl sur le carbone C_1 qui faciliterait son élimination. De telles observations ont

également été reportées (61) mais l'exploitation de cette différence n'est plus utilisée sans précaution.

HEYNS et SCHARMAN (47) ont tenté de démontrer qu'il était possible de distinguer différents méthyl-pyranosides en comparant les intensités des pics ; ils attribuent les différences d'intensité aux positions cis ou trans des groupements méthyl.

Par contre, la spectrométrie de masse permet d'identifier la forme pyrane ou furane du cycle. KOCHETKOV et CHIŻHOV (64) remarquent plusieurs différences significatives : quand le cycle est sous forme furane, le fragment le plus important de la série A est le fragment A_2^1 qui représente 77% du pic de masse m/e 143 et les fragments de la série C ont une très faible intensité ; une série E, analogue à celle des hexopyranosides est présente (fragments E_1 et E_2) : la cassure primaire à l'origine du fragment E_1 se situe entre le carbone C_4 et C_5 (voir figure 7 page 43).

Ainsi on peut dire que de manière générale les spectres de masse de méthyl-glycosides perméthylés se caractérisent par les fragments F_1^2, H_1^2 et J_1, de masse faible et d'intensité importante : ils ont pour masse 101, 88 et 75 pour tous les méthyl-glycosides neutres et une masse de 128, 115 et 75 dans le cas des monosaccharides aminés. Les fragments appartenant aux séries A, C et D permettent quant à eux de préciser la nature du monosaccharide analysé. Un tableau général de plusieurs classes de monosaccharides rassemble les différents fragments caractéristiques de chaque classe. (tableau II page 48).

TABLEAU II

Fragments caractéristiques de chaque classe de monosaccharides analysés sous forme perméthylée.

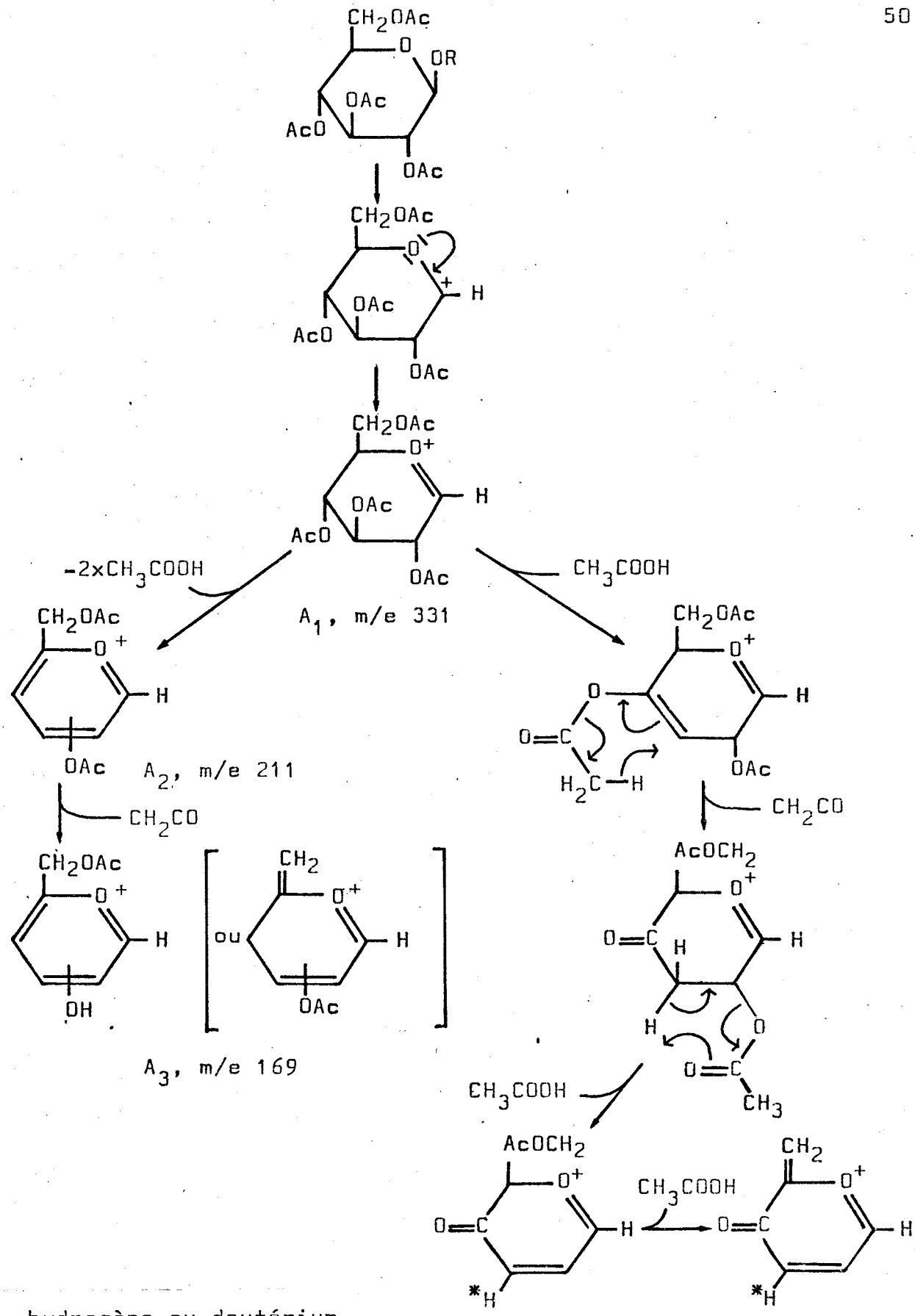
Monosaccharides	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	C_2^2	D_1	E_1	F_1^2	H_1^2	J_1
Pentoses	175	143	111	176	131	115	105	-	101	88	75
6-Déoxy-hexoses	189	157	125	176	131	129	119	-	101	88	75
Hexoses	219	187	155	176	131	159	149	205	101	88	75
Osamines	246	214	182	203	172	98 (C')	-	232	128	115	75
Acides uroniques	233	201	-	176	131	173	163	-	101	88	75

2 - Les acétates

La préparation des dérivés acétylés simple et rapide, de même que leur séparation aisée en chromatographie en phase gazeuse en ont fait des composés très intéressants à étudier en spectrométrie de masse.

Les hexoses sont les monosaccharides qui ont été le plus étudiés sous forme acétate ; leur spectre de masse sert d'ailleurs souvent de base à l'étude des autres monosaccharides. BIEMANN et coll. (5) publient en 1963 un article détaillé sur les hexoses et pentoses peracétylés et procèdent à la caractérisation de ces dérivés par comparaison avec leurs analogues deutérés qu'ils préparent par acétylation avec l'anhydride acétique deutéré $(CD_3CO)_2$. Ils peuvent ainsi émettre des schémas de fragmentation à partir du spectre de masse du 1,2,3,4,6-penta-O-acétyl-glucopyranose. Trois voies de fragmentation principales (A,B et C) sont à l'origine de la plus grande partie des fragments du spectre :

- la fragmentation A (figure 10 page 50) voit surtout le départ de plusieurs des groupements acétyl sous forme d'acide acétique et de cétène. Après le départ du groupement acétyl du carbone C_1 qui donne naissance au fragment de masse m/e 331, deux séries de fragments ont pu être distinguées grâces aux analogues deutérés : ainsi, dans le spectre de masse du 1,2,3,6-tétra-O-acétyl-α -D-glucopyranose dont le groupement acétyl du carbone C_4 est deutéré, un pic de masse m/e 170 est observé à côté du pic de masse m/e 169 plus intense ; le pic est formé si l'élimination du groupement acétyl en C_2 (départ d'acide acétique) se fait en empruntant l'hydrogène du carbone C_3, et non le deutérium de transfert



*H = hydrogène ou deutérium

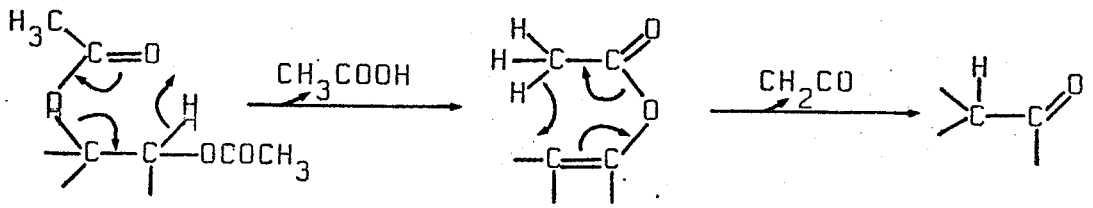
FIGURE 10

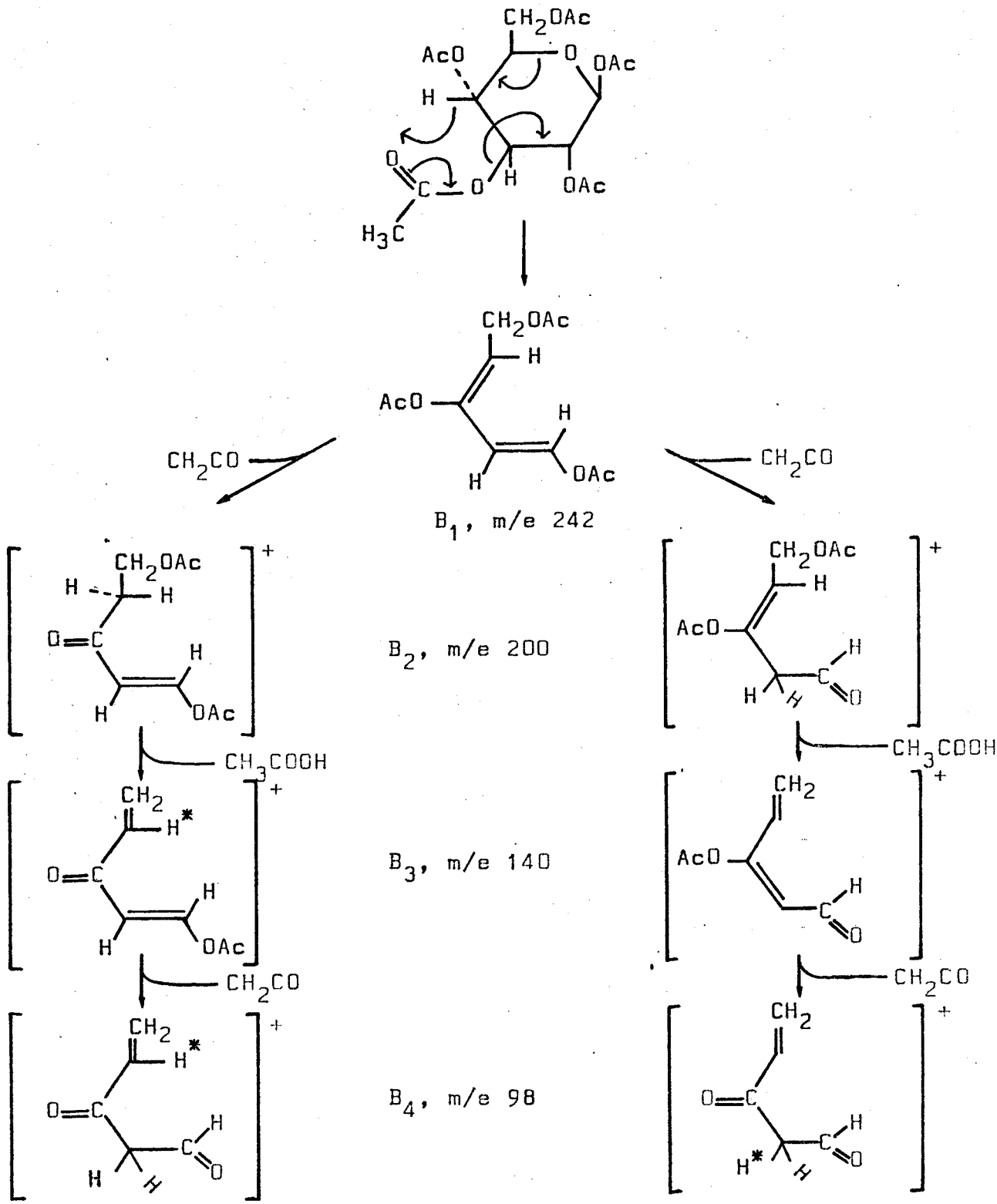
Voie de fragmentation A du glucopyranose peracétylé.

BIEMANN et coll. (5)

également fixé sur le carbone C_3, transfert qui s'était effectué lors du départ de cétène dans l'étape de fragmentation précédente ; le départ du deutérium, également probable, conduit au pic de masse m/e 169. Le même rapport d'intensité $\frac{m/e\ 169}{m/e\ 170}$ se retrouve plus loin au niveau des pics de masse m/e 110 et m/e 109, qui dérivent des ions m/e 170 et m/e 169 respectivement à la suite du départ d'une molécule d'acide acétique. Ce rapport d'intensité n'est pas observé dans le spectre de masse des autres deutérés.

- La série de fragments B se caractérise par l'ouverture du cycle pyrane qui s'accompagne du départ de deux groupements acétyl sous forme d'acide acétique. Le fragment B_1 de masse m/e 242 formé est à l'origine de deux séries de fragments expliqués par l'étude des dérivés deutérés ; ces fragments dérivent les uns des autres par l'élimination de cétène d'abord, d'acide acétique puis à nouveau de cétène, mais ces éliminations n'intéressent pas à l'intérieur de chacune des deux séries les mêmes groupements acétyl (voir figure 11 page 52). Un mode de fragmentation important appuyé par l'observation des pics métastables a d'ailleurs été remarqué lors de cette étude : le départ d'une ou deux molécules d'acide acétique est généralement suivie de l'élimination d'une molécule de cétène selon le mécanisme ci-dessous :





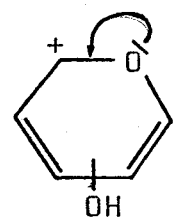
*H = hydrogène ou deutérium ; H = deutérium

FIGURE 11

Voie de fragmentation B du glucopyranose peracétylé.

BIEMANN et coll. (5)

Les auteurs remarquent en outre que tous les fragments de la série B contiennent le carbone C_5 car ces mêmes fragments ont une masse inférieure de 58 unités de masse dans le cas des 6-déoxy-hexopyranoses et inférieure de 72 unités dans le cas des pentoses. La série B est en outre absente du spectre de masse des 2-déoxy-hexopyranoses car il semble que la charge positive de l'ion B_1 soit stabilisée par le groupement acétyl du carbone C_2. En ce qui concerne les 2-déoxy sucres, l'ouverture du cycle se fait par coupure de la liaison carbone-carbone C_4 - C_5 qui donne les fragments de masse m/e 128 et m/e 86. Un autre pic caractéristique de ces sucres, de masse m/e 97 et d'intensité élevée, est observé : c'est un ion pyronium très stable qui se forme après élimination du carbone C_6, de deux molécules d'acide acétique et d'une molécule de cétène ; sa structure est proposée ci-dessous :



Sa masse est de 98 quand le monosaccharide de départ est 2-deutéro-dérivé.

La série C comprend trois fragments dont deux ont une très forte intensité ; leur structure a été déduite des spectres des dérivés deutérés (voir figure 12 page 55). C_1' est la structure la plus probable car la présence de la double liaison facilite le départ de cétène ; elle comprend les carbones C_2, C_3 et C_4.

Trois ions apparaissent généralement dans les spectres de

Trois ions apparaissent généralement dans les spectres de masse des polyacétates ; leur structure (figure 12 page 55) a été clairement définie grâce également aux dérivés deutérés. L'ion acétoxy de masse m/e 43 est très abondant ; il ne peut servir de pic de base car il est souvent jusqu'à 100 à 150 fois supérieur à l'ion qui suit en intensité. Les ions diacétyloxonium (m/e 103) et triacétyloxonium (m/e 145), qui sont des ions de réarrangement, possèdent le groupement acétyl qui se trouvait lié au carbone C_1 : dans le spectre de masse de l'analogue deutéré sur le carbone C_1, ces ions ont pour masse 106 et 148 respectivement.

La forme du cycle (pyrane ou furane) se manifeste par quelques fragments qui dérivent de la cassure carbone C_4 - C_5 quand le cycle est sous forme furane ; dans ce cas, les fragments caractéristiques ont une masse de 145 et 103, le deuxième fragment dérivant du premier par perte d'une molécule de méthanol. Cette cassure est également observée dans le cas des dérivés perméthylés. Ces deux fragments sont présentés figure 12 page 55 . Il convient toutefois de préciser qu'une partie de l'abondance des pics de masse m/e 103 et 145 est dûe à la participation des ions di-et-triacétyloxonium qui ont une masse identique.

Il ressort de toutes ces observations que la distinction peut être faite entre hexoses, déoxy-hexoses et pentoses par la masse différente des fragments de la série A et surtout ceux de la série B. Comme les fragments F, H et J des sucres perméthylés, les fragments de masse m/e 43, 103 et 145 caractérisent d'emblée la présence d'un sucre peracétylé. Ce type de substitution ne permet pas de dégager des éléments susceptibles de différencier

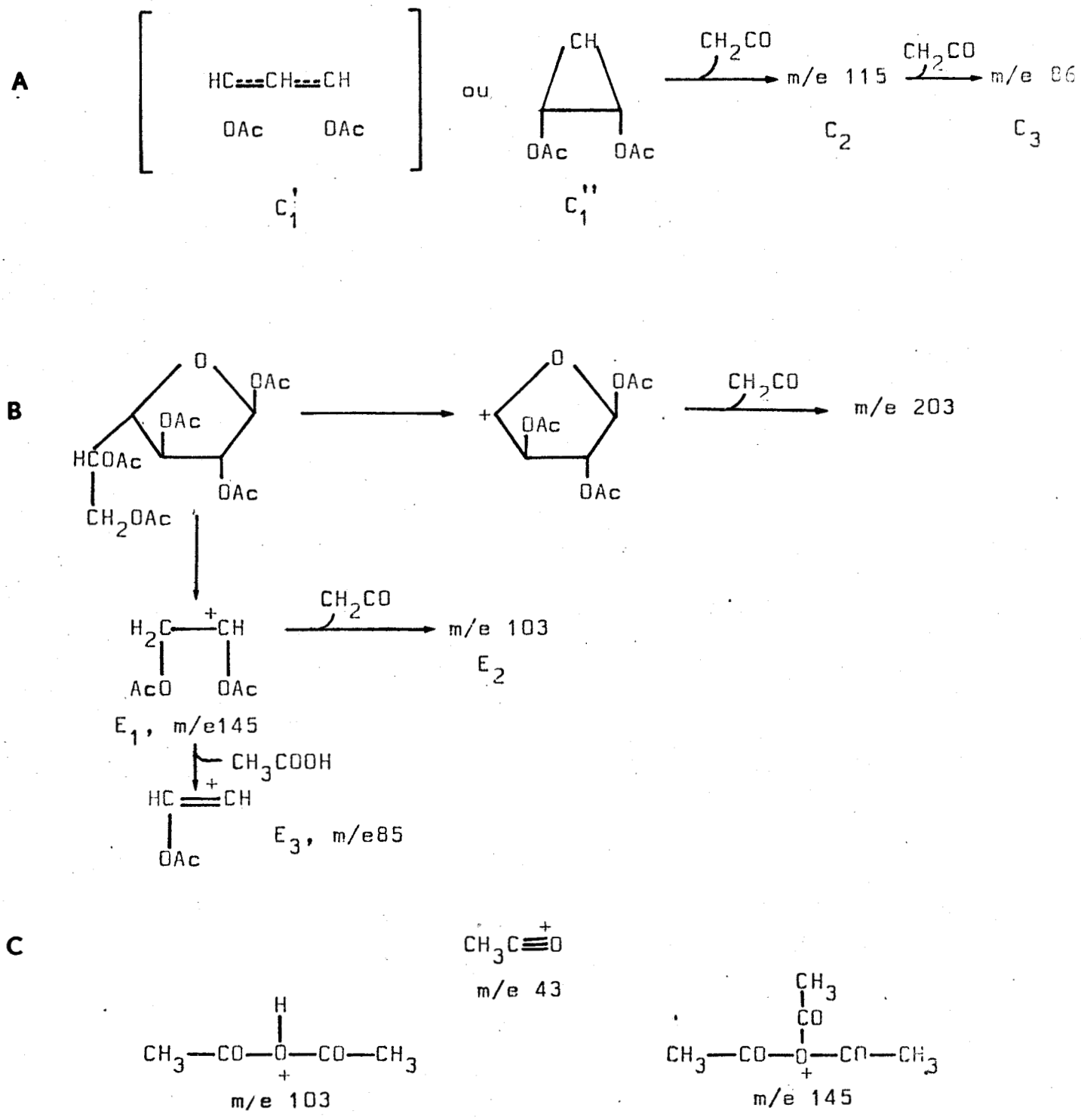


FIGURE 12

Fragmentation des monosaccharides peracétylés.

A : fragments de la série C du glucopyranose peracétylé ;

B : fragments de la série E du glucofuranose peracétylé ;

C : fragments caractéristiques de faible masse des monosaccharides peracétylés

BIEMANN et coll. (5)

la stéréochimie des sucres excepté au début de la fragmentation: l'ion de masse M-59 par exemple est plus intense dans le cas de l'α-D- glucopyranose pentaacétate que dans le cas de l'anomère β .

Le spectre de masse du β-manopyranose pentaacétate (figure 13 page 57) met en évidence les fragments les plus significatifs des monosaccharides neutres.

3 - Les éthers triméthylsilylés

Les dérivés triméthylsilylés des sucres sont des composés qui peuvent être préparés rapidement et séparés aisément en chromatographie en phase gazeuse sur silicone SE-52 ou polythylène glycol (95), ce qui explique les nombreux travaux qui en font part surtout par couplage chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse.

De JONGH et coll. (24) entreprennent très tôt la fragmentation de ces dérivés en se servant également des analogues deutérés. La lecture du spectre de masse du 1,2,3,4,6-pentakis-O-(triméthylsilyl)-α-D-glucopyranose fait observer l'absence du pic moléculaire m/e 540 ; l'ion de masse la plus élevée m/e 525 formé après élimination d'un radical méthyl $^{\cdot}CH_3$ à partir de l'ion moléculaire sert le plus souvent à déterminer indirectement la masse moléculaire ; cette élimination est généralement suivie du départ d'une ou deux molécules de triméthylsilanol. Deux autres voies de fragmentation principales sont décrites : la première voit le départ du carbone C_1 suivi de l'élimination d'un radical triméthylsilyloxy TMSIO$^{\cdot}$ ou d'une molécule de triméthylsilanol ; la seconde fragmentation débute par l'élimination des carbones C_5 et C_6 sous forme radical qui s'ensuit du départ soit d'un radical méthoxy $^{\cdot}CH_3$ ou d'un

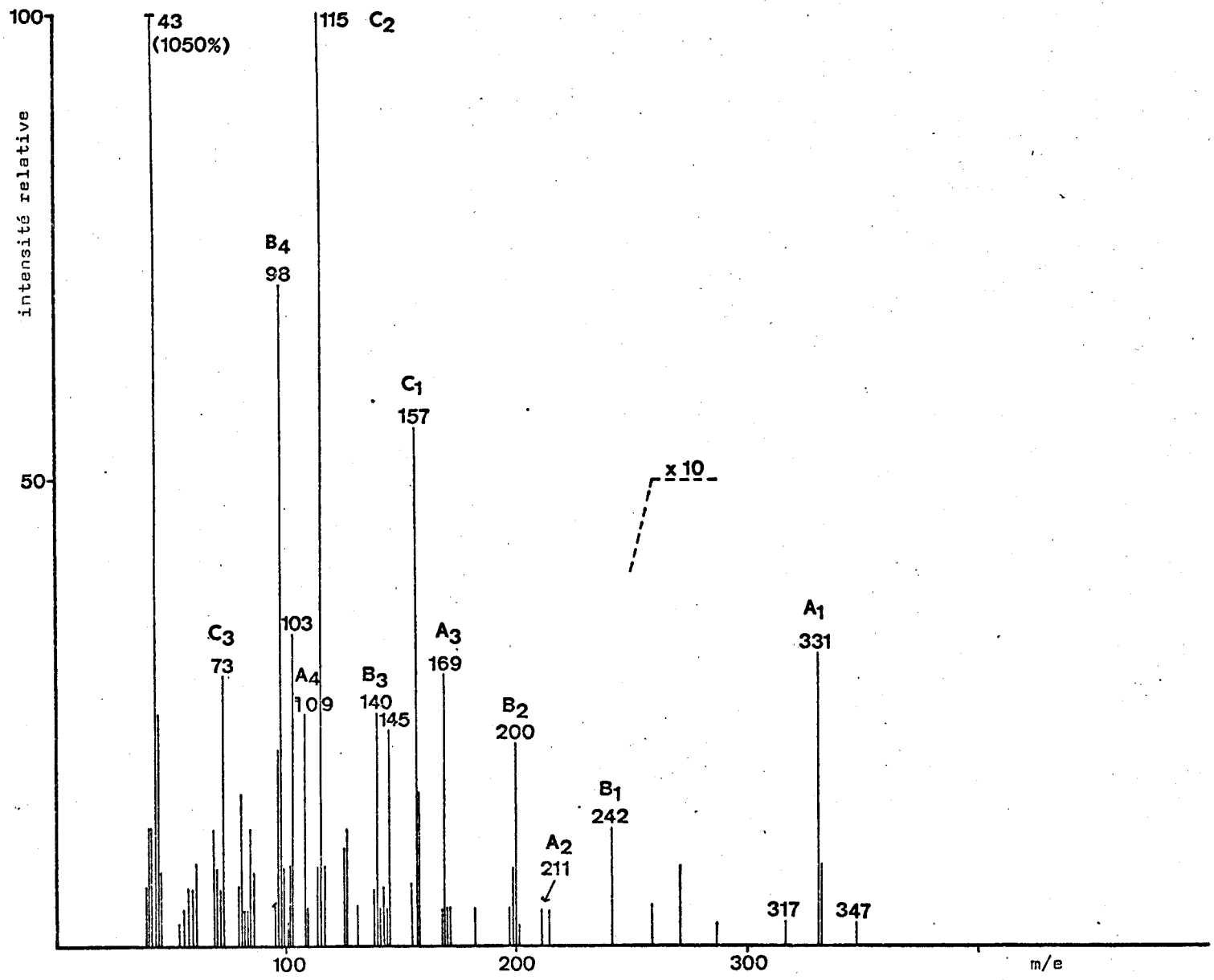
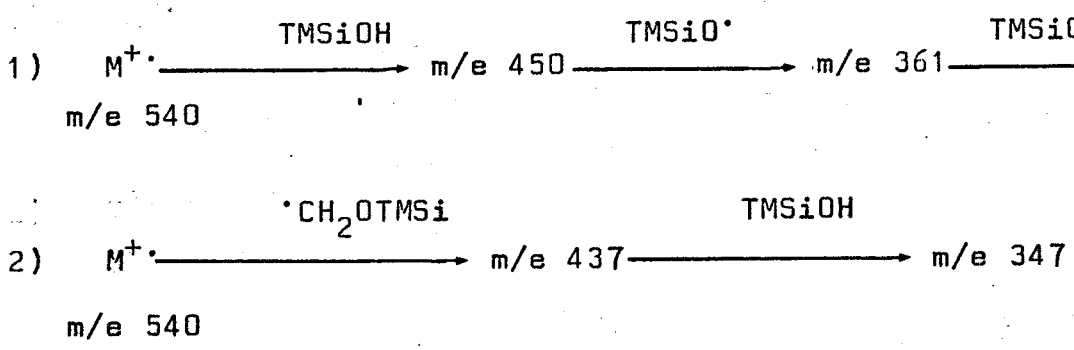


FIGURE 13

Spectre de masse du β-D-mannopyranose pentaacétate (BIEMANN et coll. (5)).

radical triméthylsilyloxy. La fragmentation générale du glucose pertriméthylsilylé est illustrée dans la figure page . D'autres voies de fragmentation existent: elles suppléent parfois à la détermination du composé mais l'intensité de leurs fragments reste souvent faible; elles sont brièvement décrites ci-dessous:



La fragmentation (2) est identique à la fragmentation E des dérivés des éthers méthyliques qui donne également naissance à des fragments de faible intensité. Parmi les fragments du spectre de masse, on retrouve les analogues des fragments H_1, F_1 et J_1 qui ont ici pour masse 204, 217 et 191 ; comme leurs analogues, ils sont abondants ; leur structure est décrite figure 14 page 59 . D'autres ions d'intensité relativement importante figurent aussi dans le spectre : ils sont issus de réarrangements, phénomènes particuliers à la triméthylsilylation. La structure de ces ions (voir figure 14 page 59) a été proposée après établissement de leur masse exacte. Le spectre de masse des méthyl-glycosides pertriméthylsilylés est très semblable, hormis l'élimination d'une molécule de méthanol, à partir du groupement méthyl du carbone C_1 ; quant au fragment J_1, sa masse est de 133 et confirme le transfert d'un groupement triméthylsilyl sur le carbone C_1.

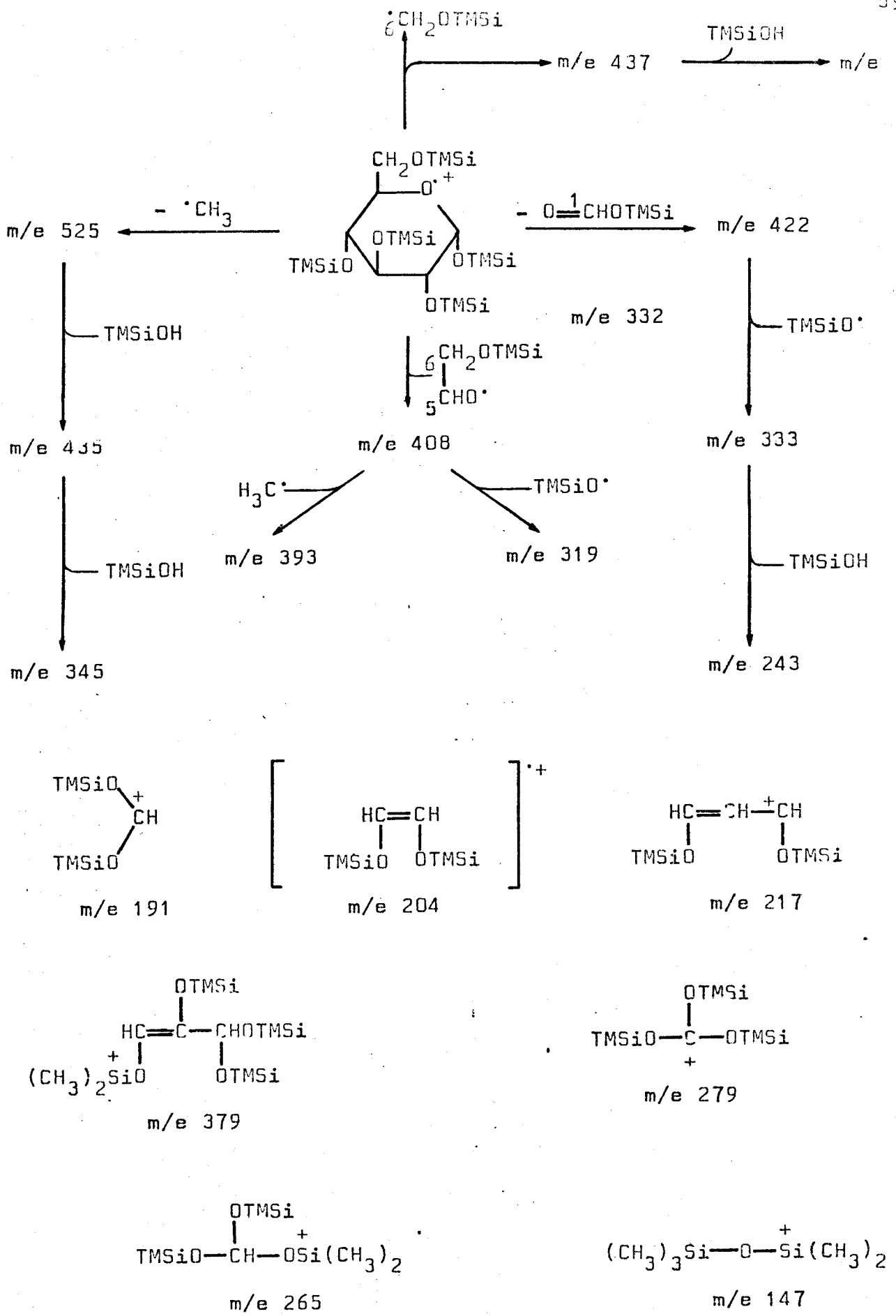


FIGURE 14

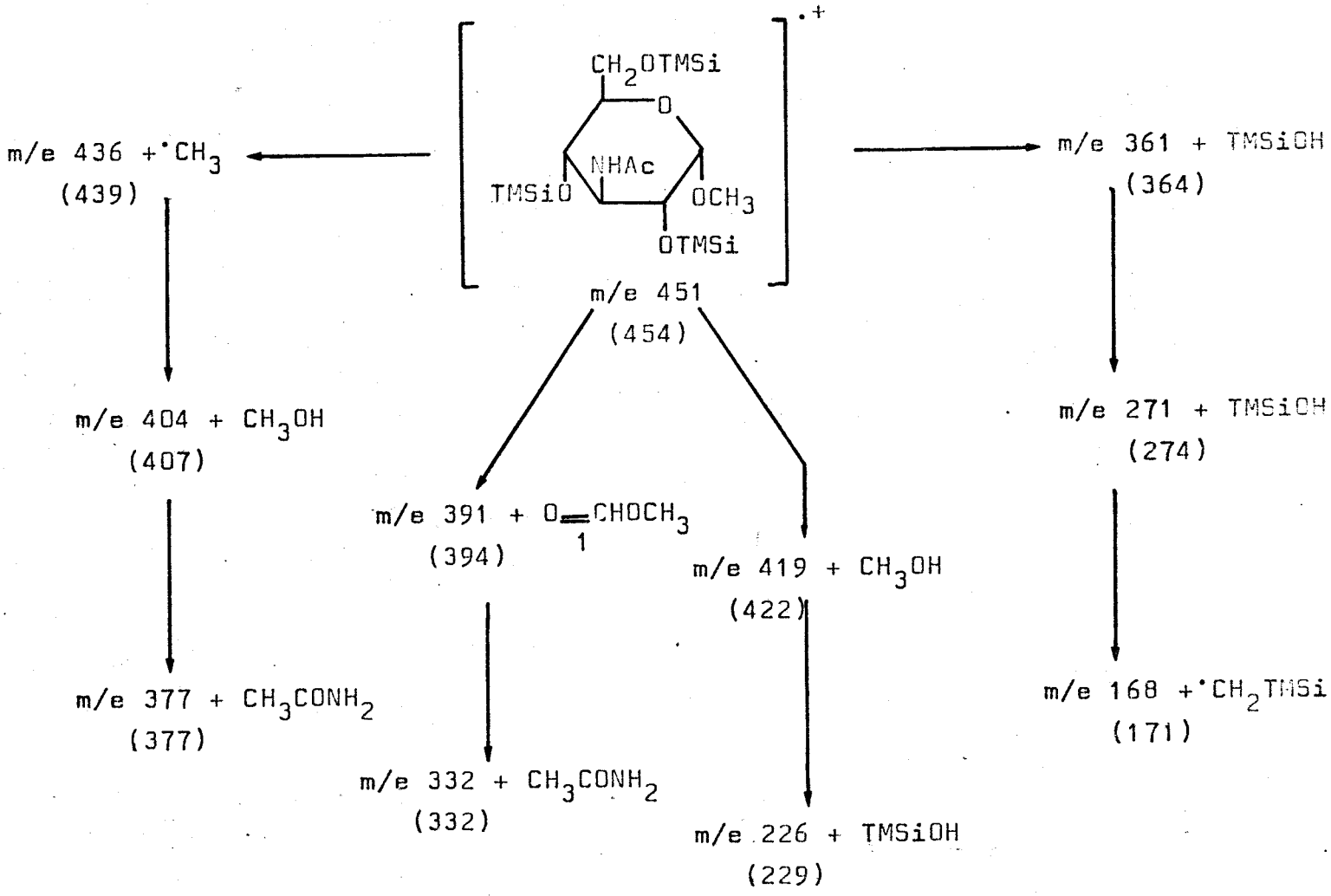
Fragmentation générale du 1,2,3,4,6-pentakis-O-(triméthylsilyl)-α-D-glucopyranose. De JONGH et coll. (24)

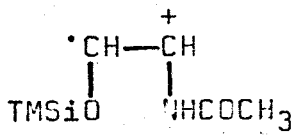
La forme du cycle peut être décelée avec ces dérivés par la présence de pics spécifiques : l'ion de masse m/e 205 caractérise les hexofuranosides, l'ion de masse m/e 103 les pentafuranosides ; leurs intensités sont importantes :

m/e 205 m/e 103

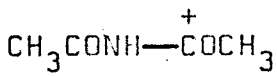
Les mêmes auteurs ont examiné la fragmentation des sucres aminés : celle du méthyl-3N-acétamido-3-déoxy-α-D-glucopyranose est montrée en exemple dans la figure 15 page 61 . Elle ressemble de près à celle des méthyl-hexosides ; le départ d'acétamide vient parfois s'ajouter en fin de fragmentation. La présence de la fonction acétamide sur le carbone C_3 explique l'absence de l'ion de masse m/e 204, mais aussi la présence de l'ion équivalent de masse m/e 173 L'ion de réarrangement de type J_1, a une intensité faible ; sa masse est 102. Dans le spectre de masse du méthyl-2-acétamido-2-déoxy-glucopyranoside, les ions de masse m/e 204 (analogue H_1^2) et 133 (analogue J_1) sont normalement présents.

Cette étude systématique des hexoses et méthyl-hexosides pertriméthylsilylés leur a d'ailleurs permis à cette époque d'identifier les produits de triméthylsilylation d'un monosaccharide en solution à l'équilibre. Le D-Galactose donne après silylation trois composés qui sont séparés par chromatographie en phase gazeuse : les deux composés majeurs sont les anomères α et β du galactopyranose





m/e 173 (analogue du fragment H_1^2)



m/e 102 (analogue du fragment J_1)

FIGURE 15

Fragmentation générale du méthyl-2-acétamido-2-déoxy-2,4,6-tri-O-(triméthylsilyl)-α-D-glucopyranoside.

De JONGH et coll. (24)

pertriméthylsilylés et le composé mineur le mélange des anomères α et β du galactofuranose pertriméthylsilylé. Il en est de même pour le D-Glucose ; quant à la galactosamine, elle ne donne qu'un composé sous forme pyrane, l'éther triméthylsilylé du 2-acétamido-2-déoxy-glucopyranose.

CURTIUS et coll. (19) dans leur étude sur la forme du cycle du fructose selon les conditions précédant la silylation, remarquent que la forme pyrane ou furane peut également être déduite à partir de l'intensité des ions de masse m/e 204 et m/e 217 : l'ion de masse m/e 204 est particulièrement intense quand le cycle est sous forme pyrane alors que l'ion de masse m/e 217 est relativement faible ; le rapport inverse est vrai quand le cycle est sous forme furane, l'ion m/e 204 étant même absent. Cette observation rejoint celle de KOCHETKOV et coll. (64) à propos des dérivés perméthylés, la forme du cycle semblant influencer de la même façon la formation de ces deux ions.

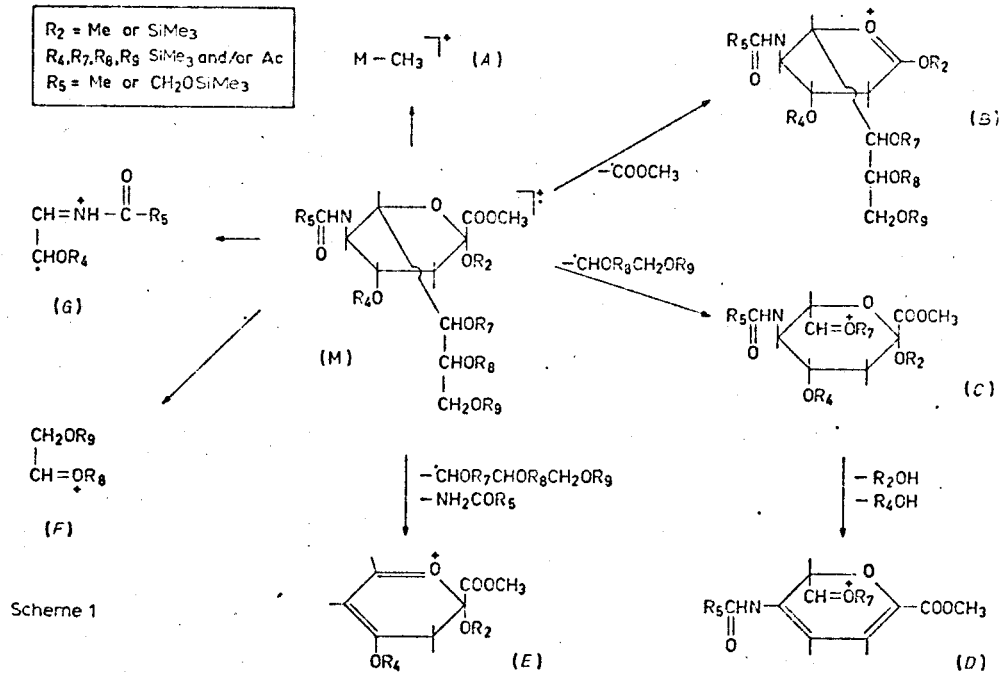
L'étude des acides sialiques a été abordée sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés. Ces monosaccharides acides sont également des sucres très répandus dans la nature, soit dans les polysaccharides libres du lait (96), soit liés sur la partie externe non réductrice des chaînes glycanniques des glycolipides ou des glycoprotéines (86) ; ils peuvent en outre s'y trouver liés entre eux (29, 94).

Il existe plusieurs acides sialiques différents : la fonction amine peut en effet être acétylée ou glycolylée (85) et ses fonctions alcools acétylées (56) glycolylée (13) ou encore méthylée (97).

Ces diverses formes ont nécessité une identification précise de l'acide sialique analysé : elles ont fait l'objet des travaux de KAMERLING et coll(55 , 56).

L'acide sialique connaît une fragmentation fort différente des autres sucres (figure 16 page 64) dûe essentiellement à sa structure particulière, la plupart des ions provenant de la coupure des liaisons carbone-carbone de la chaîne latérale. A chacun des fragments les plus abondants et les plus caractéristiques a été attribué une lettre majuscule (A à H). Le fragment A $(M-CH_3)^+$ dérive de l'élimination d'un radical méthyl de l'ion moléculaire, fragmentation caractéristique des éthers triméthylsilylés. Le fragment B (M-COOMe) est formé à la suite du départ de la fonction acide. Ces deux fragments de masse élevée, qui ne subissent pas de fragmentation ultérieure, caractérisent par leur masse la nature de l'acide sialique, à savoir si sa fonction alcool est substituée. Les fragments C, D, E, F et H sont issus des coupures de la chaîne latérale. La plus fréquente est la cassure entre les carbones C_7 et C_8 : elle donne naissance au fragment C qui peut se décomposer pour donner le fragment D après la perte des substituants des carbones C_2 et C_4. Le fragment E se forme à la suite du départ de la totalité de la chaîne latérale et du substituant du carbone C_5. Le fragment H provient de la cassure carbone-carbone C_8-C_9 et de l'élimination consécutive des substituants des carbones C_4 et C_7. Quant au fragment F, il se compose des carbones C_8 et C_9 et de leurs substituants. Le dernier fragment caractéristique, symbolisé par la lettre G, est composé de carbones C_4 et C_5 et de leurs substituants. Les fragments (C à H) renseignent sur la nature du sucre, et de ses substituants ;

A



Scheme 1

B

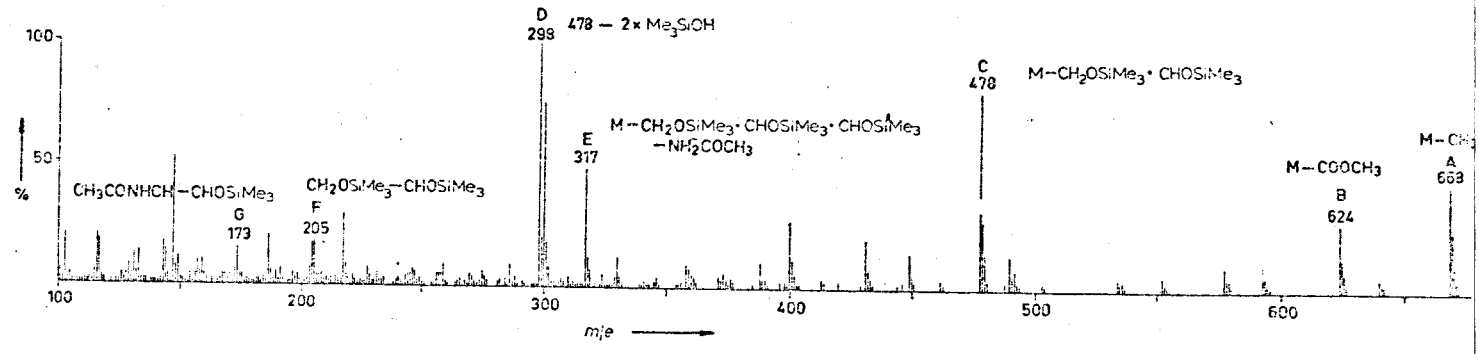


FIGURE 16

Fragmentation de l'acide sialique sous forme triméthylsilylée (A) et spectre de masse de l'acide N-acétylneuraminique triméthylsilylé(B) KAMERLING J.P. et coll. (56)

ils permettent également de localiser la position des substituants des fonctions alcools (O-substituants).

La fragmentation des acides N-acétyl et N-glycolyl neuraminiques est identique ; ces acides sialiques ne se différencient que par la masse différente de leurs fragments analogues et aussi par l'ion le plus intense qui est le fragment D dans le cas de l'acide N-acétyl neuraminique et le fragment m/e 388 dans le cas de l'acide N-glycolyl neuraminique.

La présence d'O-substituants se manifeste par l'absence d'un ou plusieurs des fragments issus de la chaîne latérale comme le démontrent les spectres de masse d'acides sialiques O-acétylés isolés des glandes sous-maxillaires de la vache et du cheval (56) : par exemple, l'acide N-acétyl-7,9-di-O-acétyl-neuraminique se caractérise par l'absence des fragments C et D ; il semble en effet que le fragment C, issu de la coupure carbone-carbone C_7-C_8 de la chaîne latérale, ne se forme que s'il est stabilisé par un substituant qui étherifie la fonction alcool du carbone C_7. L'estérification de la même fonction alcool par un groupement acétyl provoque par contre son absence. Cette observation rejoint les remarques de BJÖRNDAL et coll. (6) lors de leurs travaux sur les alditols acétates de monosaccharides partiellement méthylés : les fragments les plus intenses sont ceux dont la charge est stabilisée par un groupement méthyl, la méthylation étant aussi une étherification.

HAVERKAMP et coll. (45) peuvent ainsi caractériser les acides sialiques libérés après méthanolyse du ganglioside GT_{1b} perméthylé ; ils séparent et identifient après couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse l'acide N-acétyl

neuraminique perméthylé et l'acide N-acétyl-1,2,4,7,9-penta-O-méthyl-8-O-(triméthylsilyl)-neuraminique, l'acide partiellement méthylé se caractérisant par l'absence du fragment F ; l'absence de ce fragment s'explique par le groupement acétyl du carbone C_8 qui empêche sa formation. La présence du groupement acétyl démontre de manière indirecte que l'acide sialique est interne et lié au sein du polysaccharide par la fonction alcool du carbone C_8.

Cette fragmentation relativement simple de l'acide sialique, dont la moindre modification dans sa composition se traduit de manière très sensible par l'absence de quelques fragments, a justifié la préparation des éthers méthyliques du méthyl ester de l'acide sialique (12) en vue d'utiliser ces derniers comme composés de référence dans l'étude de la structure des polysaccharides perméthylés.

Peu de travaux ont été consacrés jusqu'à maintenant aux sucres phosphates. Ils n'ont été étudiés que sous forme triméthylsilylée (102). Ce type de substitution a été appliqué avec succès aux nucléosides et aux nucléotides (79).

La fragmentation du glucopyranose-6-phosphate pertriméthylsilylé est résumée dans la figure 17 page 67 ; la série d'ions de indiqués, existe une série de fragments de réarrangement, de masse m/e 387 à211. Par rapport aux autres sucres, la fragmentation des monosaccharides phosphates se distingue par l'élimination aisée du groupement bis(triméthylsilyl)phosphate, laquelle donne naissance à l'ion de masse m/e 271. Quant au ribose-5-phosphate (figure 17 page 67), il se caractérise par l'ion m/e 169, analogue de l'ion

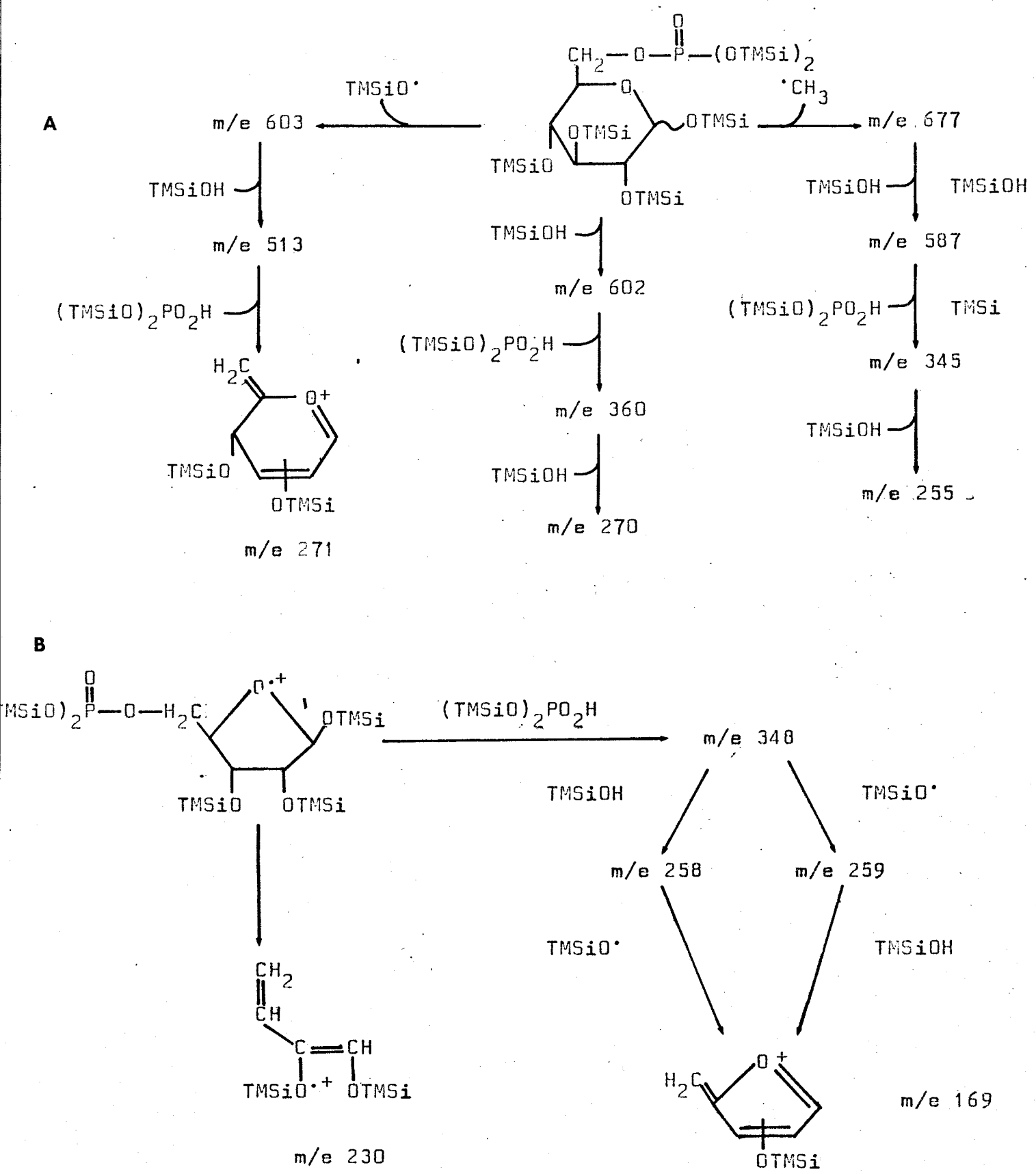


FIGURE 17

Sucres phosphates triméthylsilylés

Principaux fragments du glucopyranose 6-phosphate (A) et du ribofuranose 5-phosphate (B). ZINBO et SHERMAN (102)

m/e 271, et le fragment m/e 230 spécifique de la forme furane.

4 - Les dérivés acycliques

Cette classe de dérivés parmi lesquels se trouvent notamment les alditols acétates et les alditols perméthylés ainsi que les thioacétals ont beaucoup intéressé les chercheurs car ils éliminent les problèmes de stéréochimie et de forme du cycle avec pour conséquence des spectres de masse plus simples.

a) les alditols acétates

Des études systématiques des spectres de masse de ces composés ont permis de découvrir un mode de fragmentation simple (36). L'ion moléculaire est toujours absent, mais un ion $(M-CH_3CO_2^{\cdot})^+$ de faible intensité est observé. Le pic de base est dû à l'ion acétylium de masse m/e 43 ($CH_3C{\equiv}^+O$). Les autres fragments sont soit primaires, soit secondaires, les derniers dérivant des premiers. Les fragments primaires se forment à l'issue de la coupure de la chaîne carbonée comme l'indique le mécanisme de la figure 18 page 69 . Ainsi, le dérivé 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acétyl-D-glucitol donne naissance, en dehors de l'ion $(M-CH_3CO_2^{\cdot})^+$ cinq fragments primaires (figure 18 page 69). Les fragments peuvent ensuite se fragmenter par élimination d'acide acétique, de cétène ou d'anhydride acétique ; les éliminations peuvent se faire sous une forme acyclique ou cyclique (figure 18 page 69). Ces fragmentations relativement simples permettent cependant de différencier facilement chaque classe de monosaccharides : la présence d'une fonction déoxy empêche la coupure primaire au niveau de cette fonction à cause probablement de la faible stabilité du radical déoxy qui en résulterait ; de même, l'introduction d'une fonction acétamide augmente l'abondance des fragments issus de la

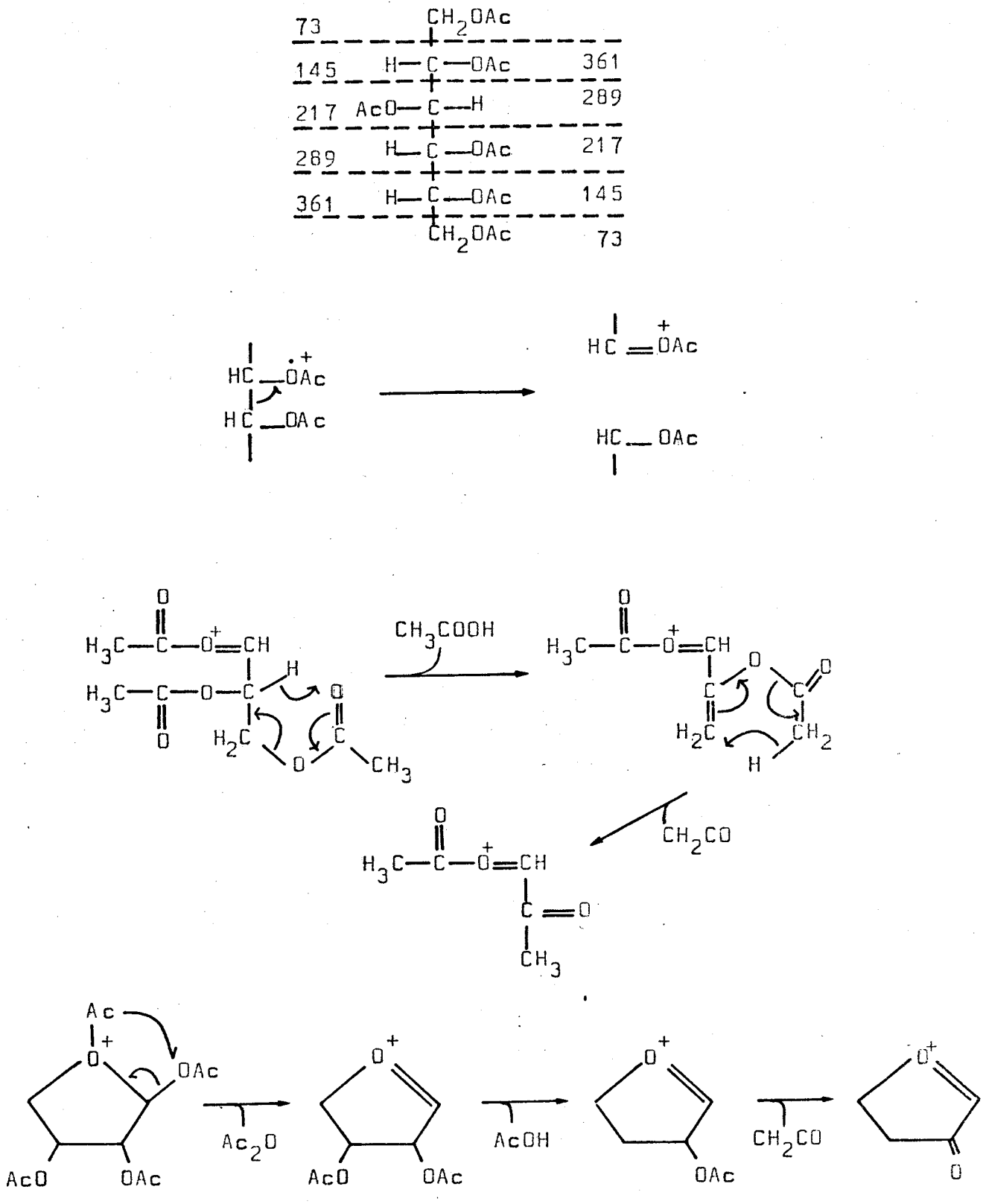


FIGURE 18

Fragmentation des alditols acétates. GOLOVNIKA et coll. (36)

A : fragments primaires du 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acétyl-D-glucitol

B : mécanismes d'élimination d'acide acétique, de cétène et d'anhydride acétique.

coupure de la chaîne de l'alditol au niveau de ladite fonction.

b) Les alditols perméthylés

La fragmentation des alditols perméthylés a été suivie sur les pentitols et hexitols perméthylés (37). Elle ressemble en beaucoup de points à celle des alditols acétates surtout en ce qui concerne la fragmentation primaire. L'étude précise de la fragmentation secondaire a pu être entreprise en remplaçant les groupements méthyl par les groupements trideutérométhyl. Les auteurs ont pu montrer de la sorte que le groupement méthyl situé sur le carbone en position β par rapport à celui qui "porte" la charge est éliminé d'abord. Le fragment primaire de masse m/e 221, peu abondant en raison de la faible stabilité du radical ($^{\cdot}CH_2OMe$) formé à la suite de la coupure, perd ainsi une molécule de méthanol comme précédemment décrit (figure 19 page 71) puis une deuxième pour donner les fragments secondaires m/e 189 et 157. Deux fragments primaires, suivants en masse, m/e 177 et m/e 133 éliminent une seule molécule de méthanol pour donner les fragments m/e 145 et 101 respectivement. Quant au fragment primaire m/e 89, il se fragmente également et conduit au fragment m/e 59, en éliminant une molécule de formaldéhyde ; il en est de même pour le fragment secondaire m/e 101 (voir figure 19 page 71).

c) Les alditols acétates partiellement méthylés

Les mélanges de monosaccharides partiellement méthylés obtenus après hydrolyse des polysaccharides entièrement méthylés sont couramment analysés par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse sous forme d'alditols acétates. Ces dérivés

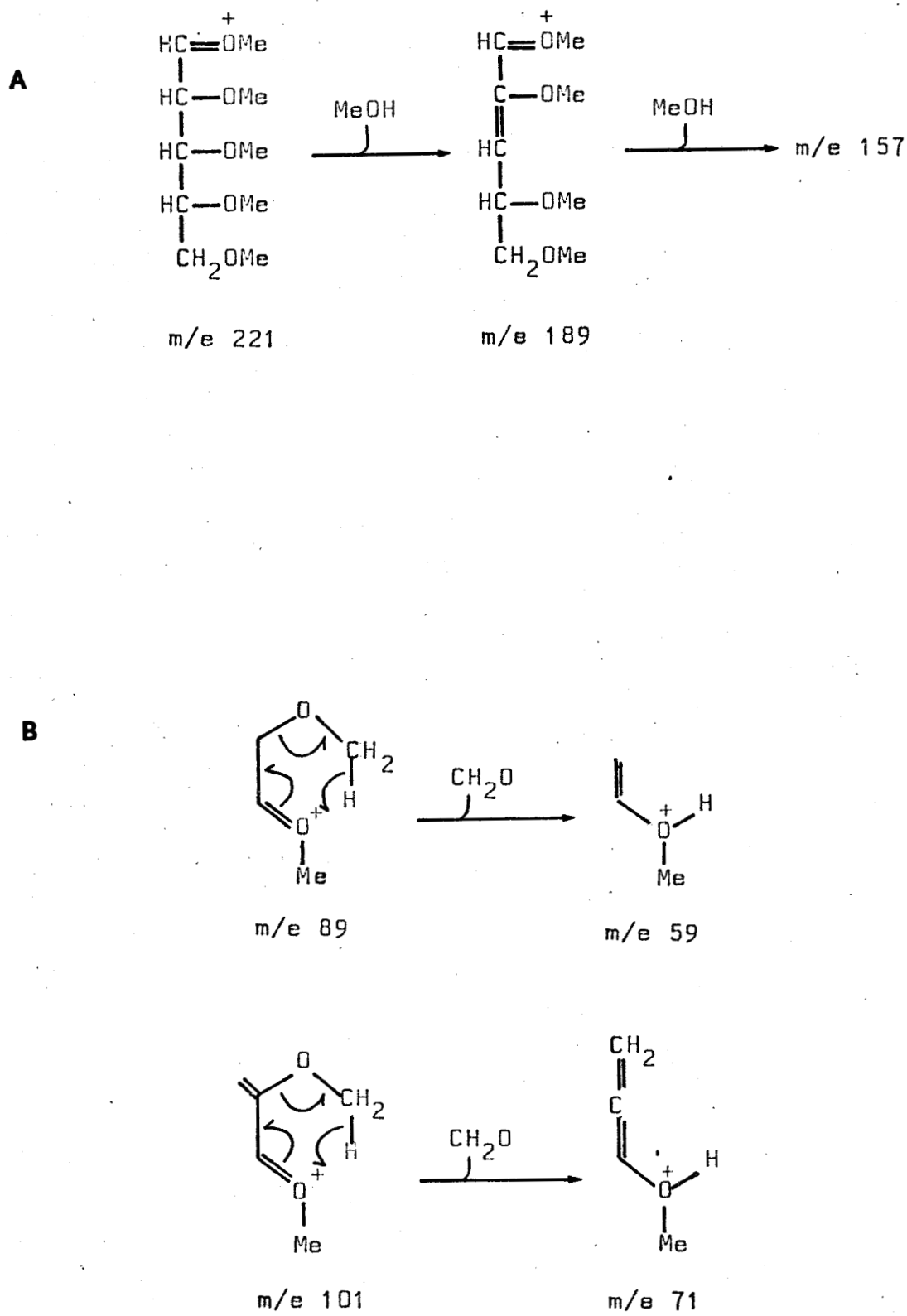


FIGURE 19

Fragmentation des alditols perméthylés

A : élimination de méthanol ;

B : élimination de formaldéhyde.

GOLOVNIKA et coll. (37)

mixtes ont été surtout étudiés par BJÖRNDAL et coll. (7), étude reprise plus tard à fin de précisions par les mêmes auteurs en utilisant le marquage au deutérium lors de la méthylation (9). Malgré la complexité de ces dérivés, il a été possible de dégager des mécanismes de fragmentation. Ils ne se distinguent pas des autres alditols en ce qui concerne l'ion moléculaire qui est absent et les fragments primaires dont l'intensité décroît avec la masse. Cependant la fragmentation primaire est ici influencée par la nature du substituant, comme l'indique la figure 20 page 73 : des quatre coupures possibles, les deux premières sont les plus fréquentes, étant donné que la charge est davantage stabilisée par le groupement méthyl que par le groupement acétyl. Ces coupures préférentielles sont parfaitement illustrées par l'abondance des fragments primaires du spectre de masse du 1,5,6-tri-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-D-glucitol (voir figure 20 page 73). Des fragments secondaires peuvent se former à partir des premiers par élimination de formaldéhyde, de méthanol, d'acide acétique généralement suivie de cétène, d'acétate de méthyle, de méthoxy - méthyl acétate ou d'acétoxyméthylacétate, avec un mécanisme particulier pour chaque élimination. Le départ de la formaldéhyde et celui de l'acide acétique suivi du cétène ont déjà été illustrées dans la frgure 19 page 71 et à la page 49 respectivement). La molécule de méthanol est éliminée uniquement quand un groupement méthyl se trouve sur le carbone situé en β de celui qui "porte" la charge ; c'est aussi le cas du groupement acétyl éliminé sous forme d'acide acétique. Les autres éliminations citées se font, soit par permutation cyclique d'électrons, soit par cyclisation des fragments(voir figure 21 page 74).

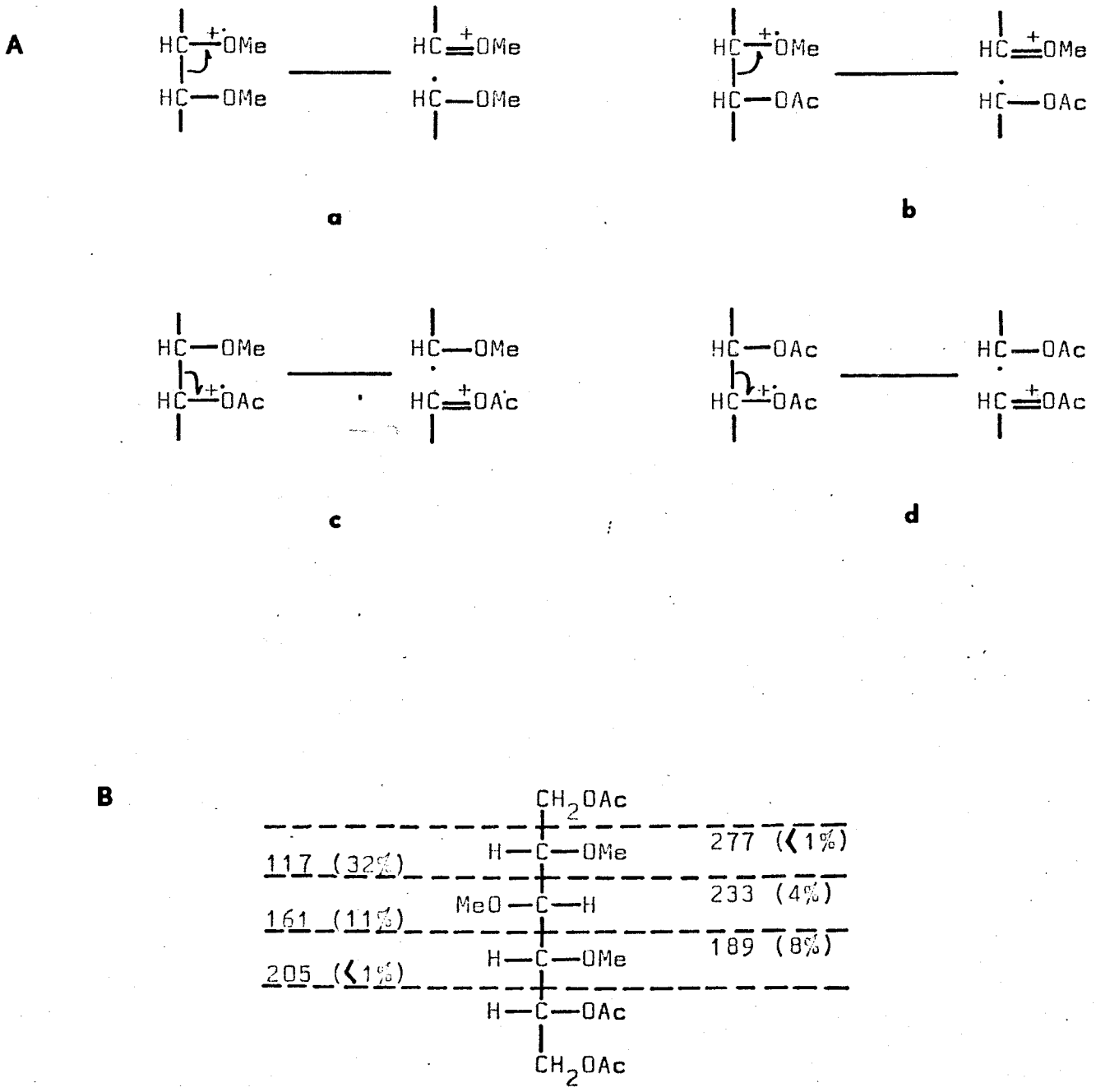


FIGURE 20

Fragmentation des alditols acétates partiellement méthylés.

A : coupures carbone-carbone possibles (a et b sont les plus fréquentes) ;

B : fragmentation primaire du 1,5,6-tri-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-D-glucitol.

BJORNDAL et coll. (7)

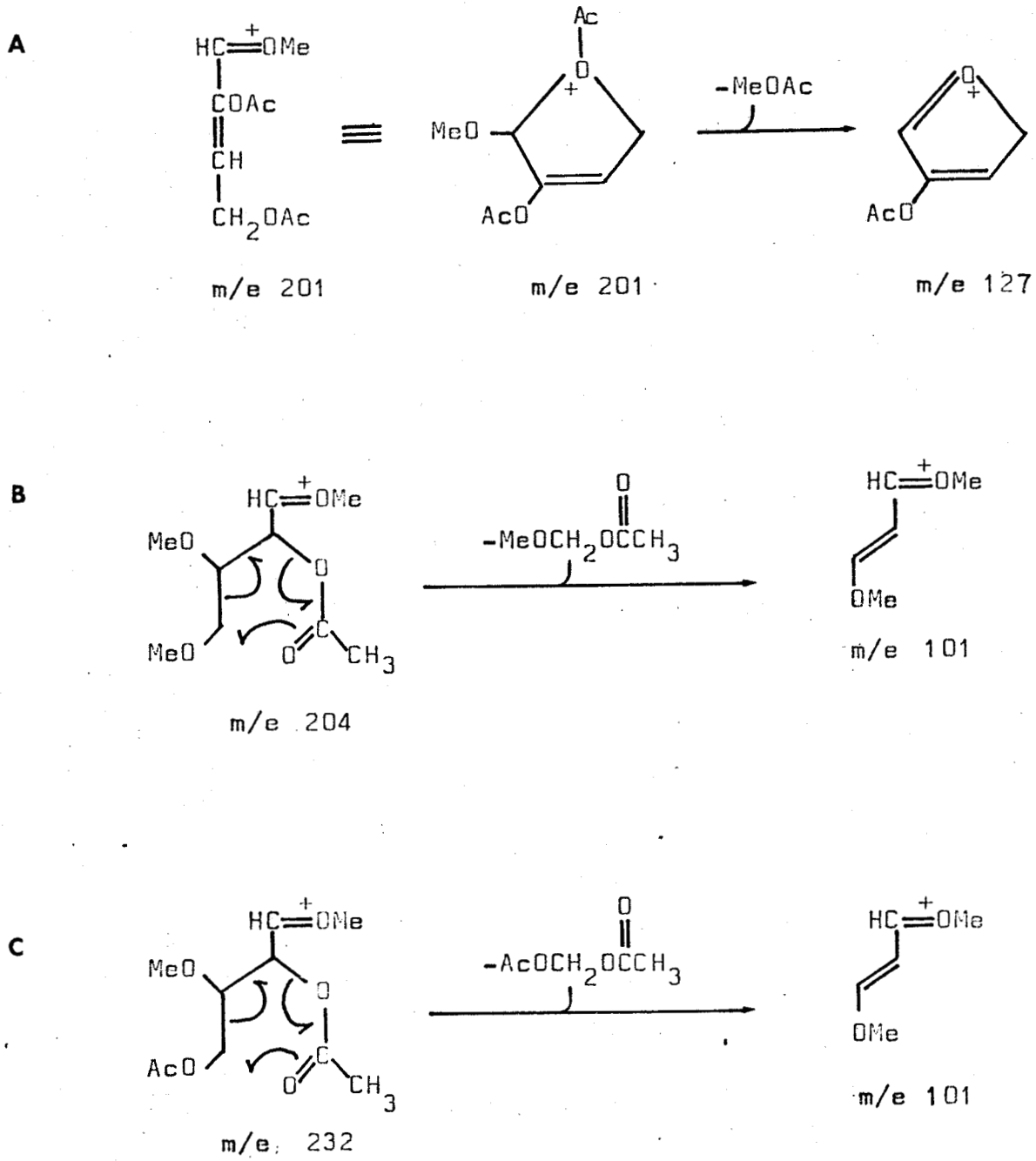


FIGURE 19

Alditols acétates partiellement méthylés

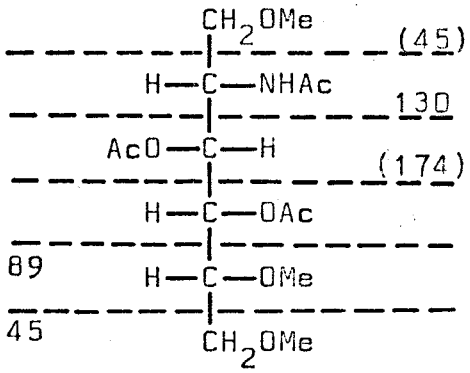
Eliminations secondaires d'acétate de méthyle (A), de méthoxyméthyl acétate (B) et d'acétoxyméthylacétate (C).

Ce travail a servi de base à l'identification des éthers méthyliques partiels du méthyl-α-D-mannoside (30, 32) et du méthyl-α-D-galactoside (33) préparés également dans le but d'élucider la structure des polysaccharides perméthylés. D'autres auteurs ont recouru à ce moyen d'analyse pour déterminer la structure de polysaccharides fongiques (8), bactériens (75, 76, 77), d'oligosaccharides d'origine variée (10, 78) et de glycolipides (39)

HASE et RIETSCHEL sont amenés à examiner le spectre de masse de la glucosamine lors de leur étude sur les produits de méthylation du chitobiose et du chitotriose (44). La présence de la fonction acétamide est rapidement décelée par la masse des fragments de masse m/e 130 et 174 ; ces derniers permettent également sa localisation sur le carbone C_2. La di-N-acétylation est tout aussi vite aperçue par la présence des nouveaux fragments de masse m/e 158 et 202, la di-N-acétylation pouvant se produire lorsqu'on hydrolyse, réduit et réacétyle le chitobiitol, ou le chitotriitol perméthylé. La détermination de la liaison 1⟶4 du chitobiose se caractérise par la présence d'un groupement acétyl sur le carbone C_4 qui contrarie beaucoup la coupure des liaisons carbone-carbone C_3-C_4 et C_4-C_5, comme le montre la faible intensité du fragment de masse m/e 174. La figure 22 page 76 présente la fragmentation primaire du méthyl-2-acétamido-2-déoxy-1,3,5,6-tétra-O-méthyl-4-O-acétyl-D-glucitol.

L'acide sialique a été examiné récemment (90) sous la forme alditol acétate. L'acide sialique ainsi modifié est une molécule très stable. Sa fragmentation est illustrée figure 23 page 77 .

A



B

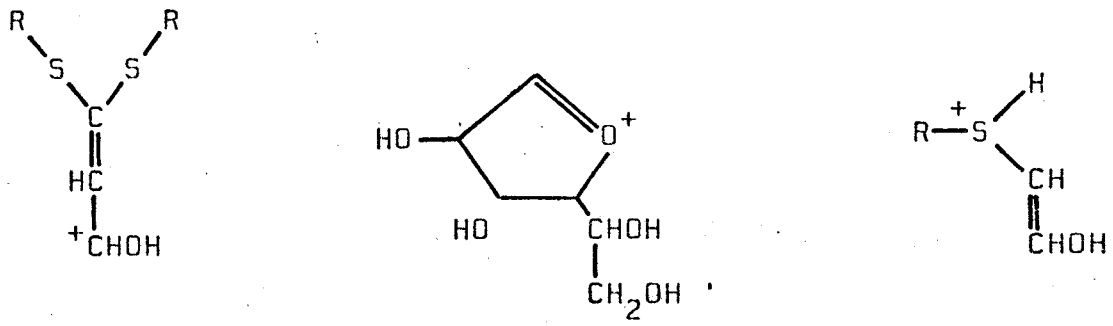
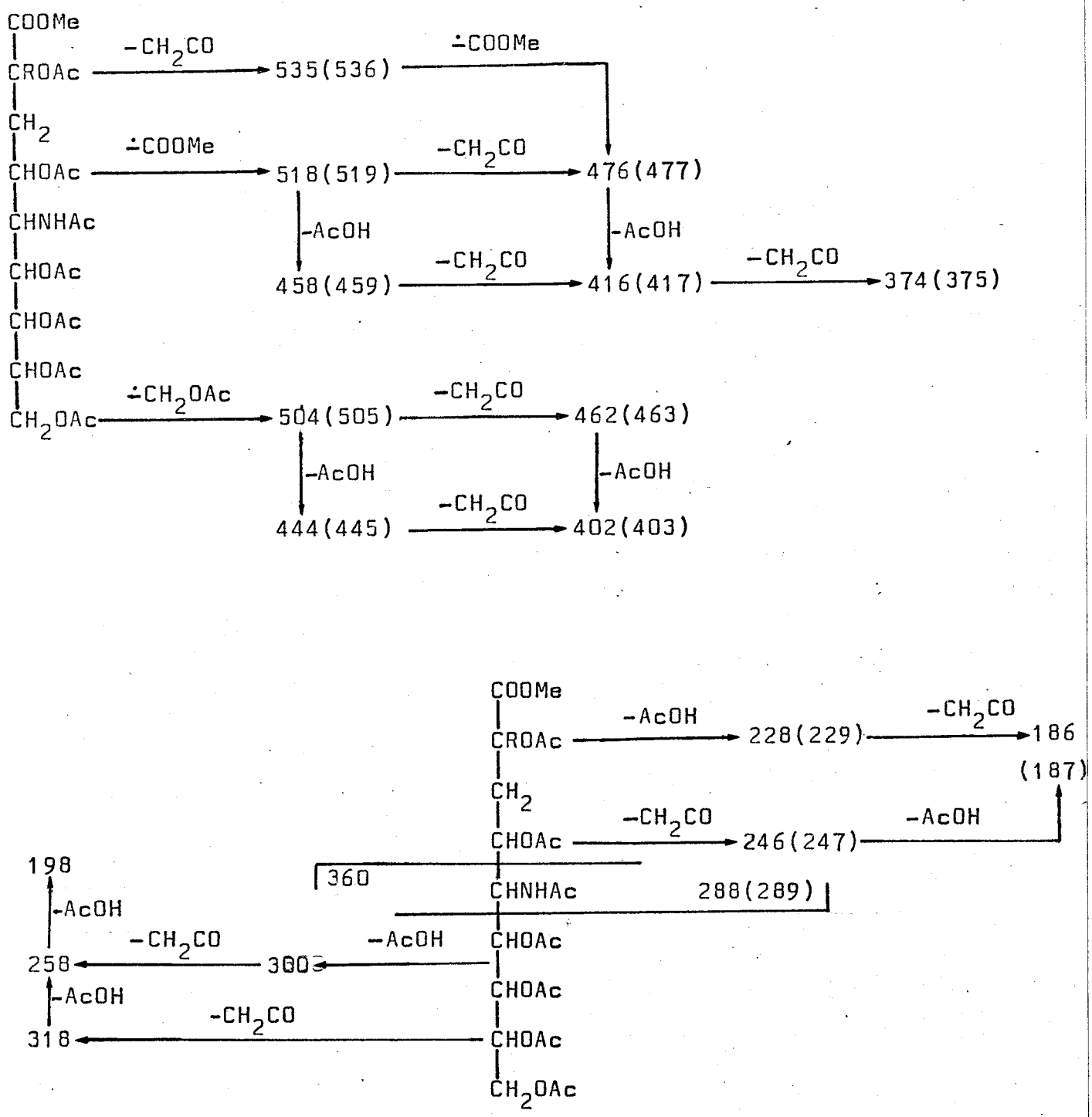


FIGURE 22

A : fragmentation primaire du méthyl-2-acétamido-2-déoxy-1,3,5,6-tétra-O-méthyl-D-glucitol ; HASE et RIETSCHEL (44)

B : fragments caractéristiques des dialkyldithioacétals. De JONGH (21)



1- R = H, $M^{\cdot +}$= 577

2- R = D, $M^{\cdot +}$= 578, masses entre parenthèses.

FIGURE 23

Fragmentation générale de l'ester méthylique de l'acide 5-acétamido-2,4,6,7,8,9-hexa-O-acétyl-3,5-didéoxy nononique. SMIRNOVA et coll. (90)

En dehors des classiques éliminations d'acide acétique et de cétène, elle se caractérise par la très forte intensité des fragments qui dérivent des coupures des liaisons carbone-carbone de part et d'autre du carbone qui porte la fonction amine.

d) Les thioacétals

De JONGH a particulièrement étudié ces dérivés (21) sous forme de diéthyldithioacétals. La principale caractéristique du spectre de masse des diéthyldithioacétals est la présence d'un ion moléculaire abondant qui classe de suite le monosaccharide étudié. Le fragment qui le précède en masse (M-RS$^{\cdot}$) résulte de la coupure de la liaison carbone C_1-soufre et le plus abondant de la coupure carbone-carbone C_1-C_2 avec retention de la charge positive sur le carbone C_1.

Trois autres ions sont importants dans la détermination du monosaccharide : le premier résulte de la coupure de la liaison carbone-carbone C_3-C_4 et de l'élimination consécutive d'une molécule d'eau ; le second provient de l'ion (M-RS$^{\cdot}$) qui perd une molécule de thioéthane ; le troisième a probablement la même origine que le second, l'ion (M-RS$^{\cdot}$) se fragmentant au niveau de la liaison carbone-carbone C_2-C_3. Ces ions sont présentés dans la figure 22 page 76 . La présence d'une fonction déoxy sur le carbone C_2 empêche la formation du second (23), celle d'une fonction acétamide entraîne la disparition des trois fragments (22). Le spectre de ces derniers composés est d'ailleurs beaucoup plus complexe, le groupement acétamide intervenant comme groupement stabilisateur de la charge ou étant rapidement éliminé. Ces dérivés ont également

Les thioacétals ont aussi été étudiés sous forme peracétylée

(20). Les spectres obtenus sont complexes, notamment à cause des fragments secondaires consécutifs aux éliminations des groupements acétyl sous forme d'acide acétique, de cétène ou d'anhydride acétique ; la combinaison des différentes éliminations peut en outre donner naissance à de nombreux fragments.

Des nombreux travaux se rapportant à l'étude en spectrométrie de masse des dérivés des sucres, plusieurs observations peuvent être faites :

- parmi les dérivés cycliques, les dérivés acétylés sont les composés les moins satisfaisants à cause de la complexité de leur fragmentation : en effet, l'addition d'un groupement acétyl se manifeste par plusieurs éliminations différentes, sous forme d'acide acétique, de cétène de radical acétyl ou acétoxy, éliminations qui peuvent se combiner entre elles. Ceci est davantage limité dans le cas des éthers méthyliques et triméthylsilylés ; les deux substitutions ont leurs propres avantages et inconvénients : la triméthylsilylation est aisée et rapide mais elle donne lieu à des mécanismes de réarrangement lors de la fragmentation qui ont rendu difficiles les premières analyses ; quant à la méthylation, elle est la plus aisée à comprendre car la fragmentation de ses dérivés est la plus simple. L'inconvénient majeur de cette substitution réside dans la préparation des dérivés qui est relativement longue.

- la fragmentation des dérivés acycliques se résume quant à elle aux coupures de la chaîne carbonée, ce qui limite le nombre de fragments ; ces fragments primaires se décomposent ensuite selon des mécanismes qui ont été bien définis pour chacune des substitutions.

Les dérivés acycliques sont pour cette raison des composés d'analyse intéressants ; bien des auteurs s'en servent surtout pour confirmer les résultats obtenus par spectrométrie de masse avec les oligosaccharides dont ils proviennent.

B - LES OLIGOSACCHARIDES

La connaissance de la fragmentation des monosaccharides par impact électronique acquise, les études en spectrométrie de masse des oligosaccharides suivirent rapidement. Après les di-et trisaccharides simples composés de monosaccharides neutres uniquement, le champ d'investigation de la spectrométrie de masse s'étendit à des matériaux d'origine très diverses (oligosaccharides du lait, de l'urine, polysaccharides bactériens, glycolipides sanguins) dont les unités monosaccharides appartiennent aux différentes classes.

Les éthers méthyliques et triméthylsilylés demeurent les seuls dérivés utilisés de manière courante dans l'étude des oligosaccharides où ils sont souvent comparés. De nombreuses publications relatent la détermination des structures à l'aide de dérivés perméthylés dont le monosaccharide terminal réducteur est sous forme alditol afin de s'implifier les spectres de masse ainsi que la détermination de la liaison glycosidique avec le sucre réduit. Quelques auteurs ont également utilisé les alditols triméthylsilylés comme moyen d'approche (57). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse trouve ici son optimum d'utilité en permettant d'analyser successivement les composés d'un mélange préalablement séparés par la colonne de chromatographie.

1 - Les éthers méthyliques

La complexité croissante des sucres étudiés a obligé les auteurs à préciser davantage la nomenclature de KOCHETKOV et coll. (64). KOVACIK et coll. (68) symbolisent les différentes unités monosaccharides par des lettres minuscules en commençant par le sucre non réducteur : ainsi, baA_1 est le fragment formé par fragmentation du cycle b selon la voie de fragmentation A et substitué par le cycle a.

KOCHETKOV et CHIZHOV (65) ont tenté dès 1966 de dégager des lois qui régissent la fragmentation des disaccharides perméthylés composés de résidus aldohexoses neutres. Ils observent tout d'abord que les unités monosaccharides suivent chacune leur propre voie de fragmentation après cassure de la liaison glycosidique. Les fragments qui en dérivent sont identiques à ceux des monoglycosides perméthylés. Ils remarquent ensuite que les fragments de la série A sont utiles dans la détermination des poids moléculaires du disaccharide et de ses unités monosaccharides (voir figure 24 page 82), que ceux de la série B formés par dégradation du cycle b peuvent être utilisés pour établir la nature de la liaison entre les deux monosaccharides. Ainsi, les disaccharides à liaison 1 ⟶ 4 et 1 — 2 qui possèdent des fragments communs baB_1 (m/e 380) et bF_1^2 (m/e 305) se différencient par le fragment bB_2 (m/e 161) uniquement présent dans le spectre de masse des disaccharides à liaison 1 ⟶ 4. Les disaccharides à liaison 1 ⟶ 6 ne donnent aucun de ces fragments, mais un fragment caractéristique de masse m/e 353 issu de la voie de fragmentation D (fragment baD_1). La formation de ces différents fragments est indiquée dans les figures 25 et 26 page 83 et 84 Un autre fragment de masse m/e 279 (figure 27 page 85) est observé.

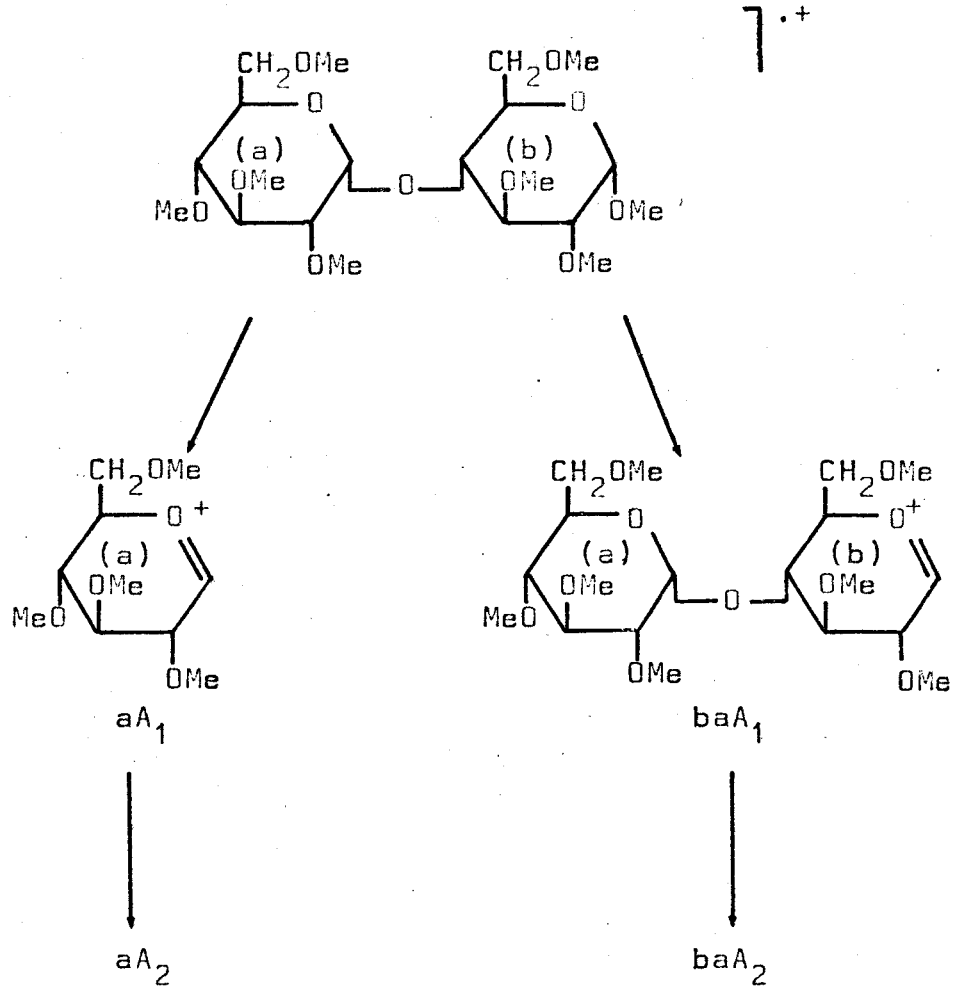


FIGURE 24

Oligosaccharides perméthylés.

Voie de fragmentation A

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

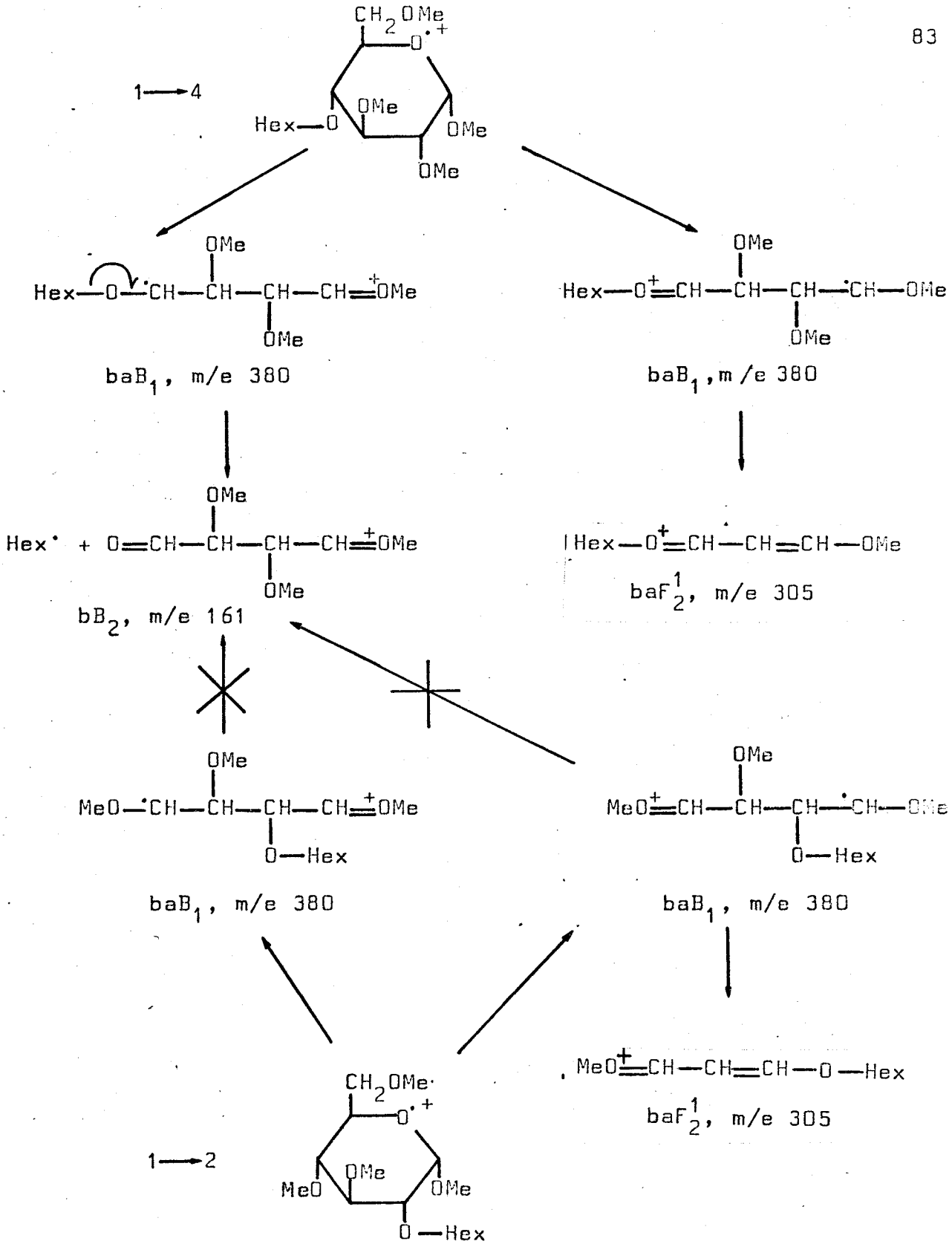


FIGURE 25

Fragments caractéristiques des disaccharides perméthylés à liaison 1⟶2 et 1⟶4 permettant leur distinction.

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

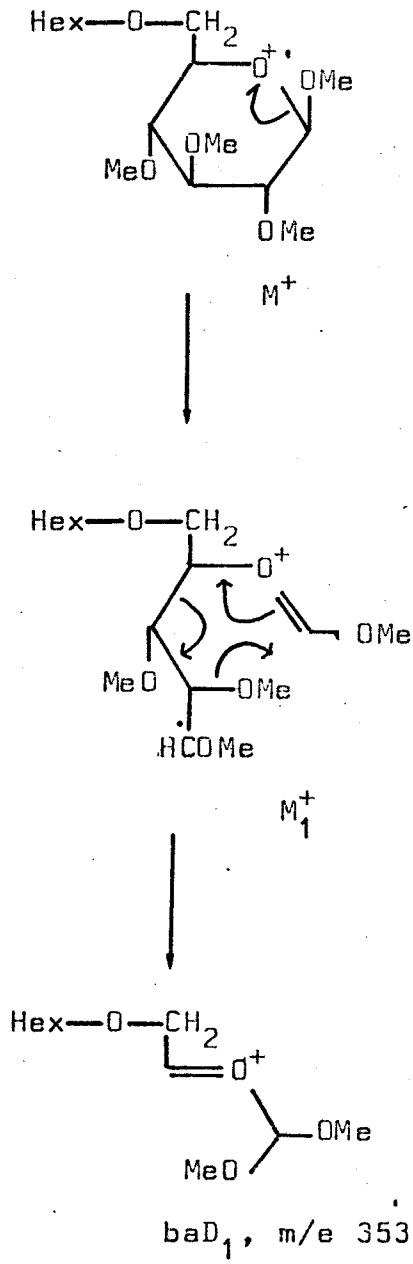
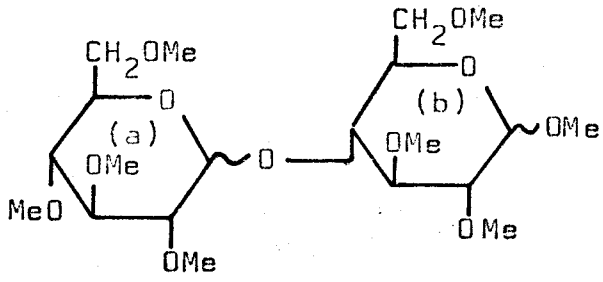
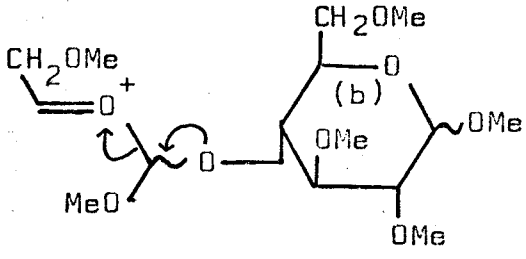


FIGURE 26

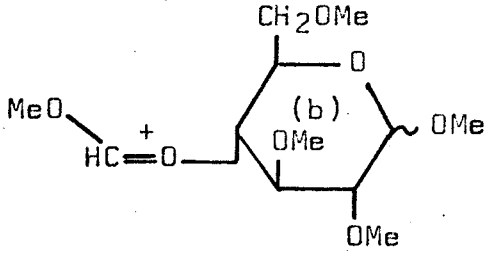
Voie de fragmentation caractéristique des disaccharides permethylés à liaison 1⟶6.

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)





abD_1



abJ_1

m/e 279

FIGURE 27

Formation de l'ion de masse m/e 279 (abJ_1) dans le cas du disaccharide Glc-1⟶4-Glc perméthylé.

KOCHETKOV et CHIZHOV (65)

Cet ion est l'homologue de l'ion J_1 observé dans le spectre de masse des monosaccharides perméthylés (m/e 75).

KÄRKKAINEN (58) étudie également de manière précise la fragmentation d'oligosaccharides de nature et de structure très variées sous forme perméthylée. Dans un but de simplification, il transforme le sucre réducteur en alditol : il profite de cette réduction pour introduire un atome de deutérium dans la molécule afin de provoquer une dissymétrie au niveau de l'alditol. Un exemple de fragmentation d'un disaccharide à unités monosaccharides neutres est présenté figure 30 page 96 . Dans son analyse, pas plus que KOCHETKOV et coll., il n'observe d'ion moléculaire. Les premiers ions de haute masse rencontrés sont les ions M-45, M-89, M-133 ; ils dérivent de la coupure des liaisons carbone-carbone de la chaîne carbonée de l'alditol. Les ions m/e 219, m/e 187 (219-32), m/e 155 (187-32) dont la masse reste inchangée dans le spectre de masse des analogues deutérés sont assimilés à l'unité non réductrice du disaccharide. Les fragments correspondant au résidu alditol (m/e 235, m/e 203, m/e 171) ont par contre une masse supérieure d'une unité. La détermination de la liaison glycosidique se fait par l'observation des fragments issus de la chaîne carbonée de l'alditol. Deux ions de masse m/e 177 et m/e 133 permettent de distinguer les disaccharides à liaison 1⟶2, 1⟶3, 1⟶4 et 1⟶6. Dans le cas des disaccharides à liaison 1⟶6 dont les fragments m/e 425 (M-45) et m/e 381 (M-89) ont une intensité faible, un ion relativement intense de masse m/e 177 est observé, ainsi que le fragment m/e 145, auquel il donne naissance. Dans le spectre de masse de l'analogue deutéré, ils ont pour masse m/e 178 et m/e 146. Les disaccharides à liaison

1⟶2 qui possèdent également ces deux ions dans leur spectre, ne voient pas la masse de ceux-ci changer après deutération. Les disaccharides à liaison 1⟶3 et 1⟶4 qui ne possèdent pas ces ions ne peuvent être distingués que par le moyen de la deutération. L'ion de masse m/e 133, formé par la coupure carbone-carbone C_3 - C_4 de la chaîne carbonée de l'alditol a une masse m/e 134 quand la liaison est de type 1⟶4 alors qu'elle est inchangée lorsque la liaison est de type 1⟶3. Aucune variation importante de la fragmentation n'est observée lorsque l'un des monosaccharides composant le disaccharide est aminé. Elle donne cependant naissance à des fragments de masse différente. Quand l'osamine, dont la fonction aminée est sous forme N-méthyl-acétamide suite à une méthylation totale selon le procédé de HAKOMORI (38), est en position non réductrice, les fragments qui en dérivent ont pour masse m/e 260 et m/e 228 (260-32), masses qui restent inchangées après deutération ; en position réductrice, celle-ci donne naissance aux fragments m/e 276 et m/e 245 (276-32) quand elle est non deutérée et m/e 277 et m/e 245 quand elle l'est. D'autres fragments, de faible masse, apparaissent. Tout d'abord, les fragments de masse m/e 129 et m/e 142 qui sont les analogues des ions H_2^2 (m/e 88) et F_1^2 (m/e 101) respectivement ; ces deux derniers sont également présents et démontrent indirectement ici la participation de plusieurs ions isomères dans l'intensité d'un pic de masse. Ensuite des fragments caractéristiques de la position terminale non réductrice de l'osamine : dans le cas de la lactosamine, ces fragments ont une masse m/e 130 et m/e 174 (m/e 131 et m/e 175 après deutération).

Lors de l'analyse des spectres de masse des 21 trisaccharides

qu'il a étudiés (60) sous forme d'alditols perméthylés, KÄRKKÄINEN remarque que la plupart des ions de masse inférieure à m/e 300 sont les mêmes que ceux rencontrés après fragmentation des monosaccharides analysés soit sous forme méthylglycoside perméthylée, soit sous forme alditol perméthylée. De nouveaux fragments de masse plus élevée sont apparus à la suite de l'addition d'un monosaccharide : les ions baA_{1-3} et bcA_{1-3} qui dérivent de la coupure des liaisons a⟶b et b⟶c respectivement ainsi que l'ion $abcJ_1$ occupent la région centrale du spectre (300 m/e 500) alors que les ions issus de l'ion moléculaire (M-45, M-89, M-133), peu nombreux et d'intensité faible sont les seuls à être observés dans la zone des masses m/e supérieures à 500. Ces ions peuvent aider à la détermination du poids moléculaire de l'oligosaccharide dont on constate toujours l'absence de l'ion moléculaire. La détermination de la liaison entre les deux derniers sucres b et c (liaison b⟶c) est abordée comme celle des disaccharides par l'examen des fragments issus de la chaîne carbonée de l'alditol. La liaison entre les deux premiers sucres a et b (liaison a⟶b) est plus difficile à déterminer. KARKKAINEN attache d'abord une importance particulière à l'ion de masse m/e 88. Cet ion est le pic de base des spectres de masse des trisaccharides à liaison a⟶b de type 1⟶4 et 1⟶6. Il explique cette forte intensité par la double provenance de celui-ci, de l'unité monosaccharide a d'une part de l'unité b d'autre part. Dans le cas des liaisons a⟶b de type 1⟶2 et 1⟶3, il ne peut provenir que de l'unité a et il a en conséquence une intensité nettement moindre. L'auteur observe ensuite la prédominance des ions des séries baA sur ceux des séries bcA quand la liaison a⟶b est de type 1⟶4 et

1⟶6, et le rapport inverse en ce qui concerne une liaison a⟶b de type 1⟶2 ou 1⟶3. L'ion de masse m/e 295 (bcJ_1) vient distinguer les disaccharides à liaison a⟶b de type 1⟶2 et 1⟶3. Il est absent quand la liaison est de type 1⟶3, absence qui s'explique aisément par la formation de l'ion J_1 : celui-ci nécessite le transfert du groupement méthyl du carbone C_3 sur le carbone C_1 pour être formé ; comme le carbone C_3 est engagé dans une liaison, l'ion de type J_1 ne peut être présent. Les liaisons a⟶b de type 1⟶4 et 1⟶6 ne peuvent être distinguées sans ambiguité.

Parmi les trisaccharides étudiés par KARKKAINEN se trouve un trisaccharide branché. Sa tructure se reflète surtout par l'absence des ions issus de l'alditol.

L'auteur conclue sur l'influence de la stéréochimie des sucres constituant l'oligosaccharide : il semble que celle-ci s'exerce par l'intermédiaire du sucre central sur l'intensité des ions de la série bcA qui peuvent être différenciés des ions baA par leur masse. contrairement aux mêmes trisaccharides perméthylés non réduits (59).

Dans une publication récente, MONONEN et coll. (80) reportent les résultats qu'ils ont obtenus avec les alditols perméthylés de disaccharides à osamine terminale réductrice. Ils observent les deux fragments correspondant aux parties non réductrice (m/e 219) et réductrice (m/e 276) ainsi que les fragments secondaires qui en dérivent, puis les ions de la chaîne carbonée dont l'absence ou la présence renseigne sur la nature de la liaison glycosidique. Un fragment intense de masse m/e 378 est observé dans le spectre de masse des disaccharides à liaison 1⟶3 ; il n'a pas d'analogue dans les spectres de masse des disaccharides à hexoses neutres : il dérive

probablement de la coupure de la chaîne carbonée de l'alditol entre les carbones C_3 et C_4 mais une autre origine a été également reportée (14 , 28). Le fragment m/e 130 est caractéristique de l'osamine en position réductrice : il provient de la coupure carbone-carbone C_2-C_3 de l'osamine ; il donne ensuite aisément le fragment de masse m/e 88 par perte d'une molécule de cétène. La masse de ces derniers fragments augmente d'une unité lorsque la réduction du disaccharide est réalisée avec le borodeutérure, ce qui entraîne la disparition du pic de masse m/e 130 et diminue l'intensité du pic de masse m/e 88 qui n'est représentative alors que de l'ion H_1^2 provenant de la partie non réductrice.

KOVACIK et coll. (68) entreprennent très tôt l'étude d'oligosaccharides à acide uronique sous forme de dérivés perméthylés. Ils observent les mêmes fragments que ceux des oligosaccharides à monosaccharides neutres, consécutifs à une fragmentation globale identique : après coupure de la liaison glycosidique, les unités monosaccharides se fragmentent indépendamment les unes des autres pour donner une série de fragments semblable à celle des monosaccharides seuls (série A). La valeur du rapport $\frac{aA_2}{aA_1}$ dans le cas des disaccharides à acide uronique en position non réductrice semble être liée à la nature de l'acide : il est très supérieur à 1 quand c'est l'acide glucuronique et inférieur à 1 quand il s'agit de l'acide galacturonique. Les auteurs font également remarquer que les ions communément appelés bA_1 proviennent des ions abJ_1 (figure 28 page 91). Les ions de la série B (baB_1, m/e 394 ; baF_1, m/e 319 ; baF_2, m/e 287) apparaissent dans le spectre de masse des disaccharides

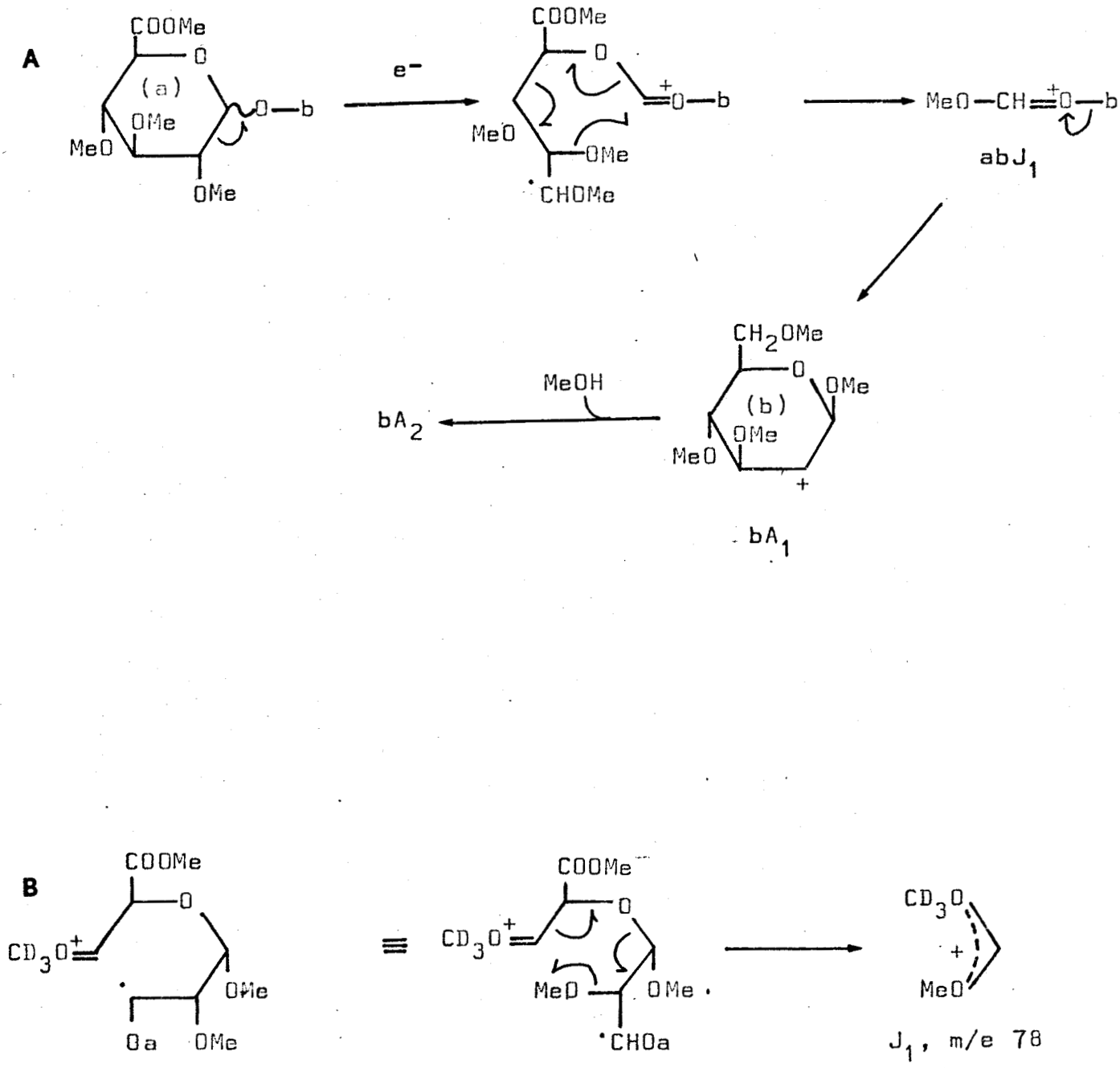


FIGURE 28

Seconde origine des ions de la série bA (A) et de l'ion J_1 (B).
KOVACIK et coll. (68)

à liaison de type 1⟶2 et 1⟶4 comme dans le cas des disaccharides neutres analysés par CHIZHOV et coll. ( ), le disaccharide à liaison 1⟶4 se distinguant dans cette série du disaccharide à liaison 1⟶2 par l'absence de l'ion bB_2 m/e 161. De même les disaccharides à liaison 1⟶6 se caractérisent par l'ion baD_1 (m/e 367). Les autres séries d'ions sont présentes (séries C, F, G, H, J, K).

Lors de leur étude des trisaccharides sous la même forme dérivée (69), les mêmes auteurs démontrent que la fragmentation générale est identique et ne doit sa complexité qu'au nombre croissant de fragments possibles au sein d'une même série. La figure 29 page 93 résume la fragmentation du trisaccharide GlcAU-β-1⟶6-Gal-β1⟶6-Gal. En outre, la présence ou l'absence d'un ou plusieurs fragments continuent à déterminer un type de liaison, de même que le rapport $\frac{aA_2}{aA_1}$ permet de découvrir la nature de l'acide uronique terminal non réducteur. Dans une étude plus récente (70), KOVACIK et d'autres collaborateurs établissent avec plus de précision les règles de fragmentation des disaccharides à acide uronique à partir de disaccharides de synthèse où l'acide est soit en position non réductrice (acides aldobiuroniques), soit en position réductrice (acides pseudoaldobiuroniques) et lié à un sucre neutre par toutes les liaisons glycosidiques possibles. Ces travaux confirment les anciens en ce qui concerne les acides aldobiuroniques à l'exception du critère de différenciation des liaisons 1⟶4 et 1⟶2. L'ion m/e 161 ne peut plus suffire car il est également présent, en faible quantité cependant, dans le spectre des acides aldobiuroniques à liaison de type 1⟶2 ; dans

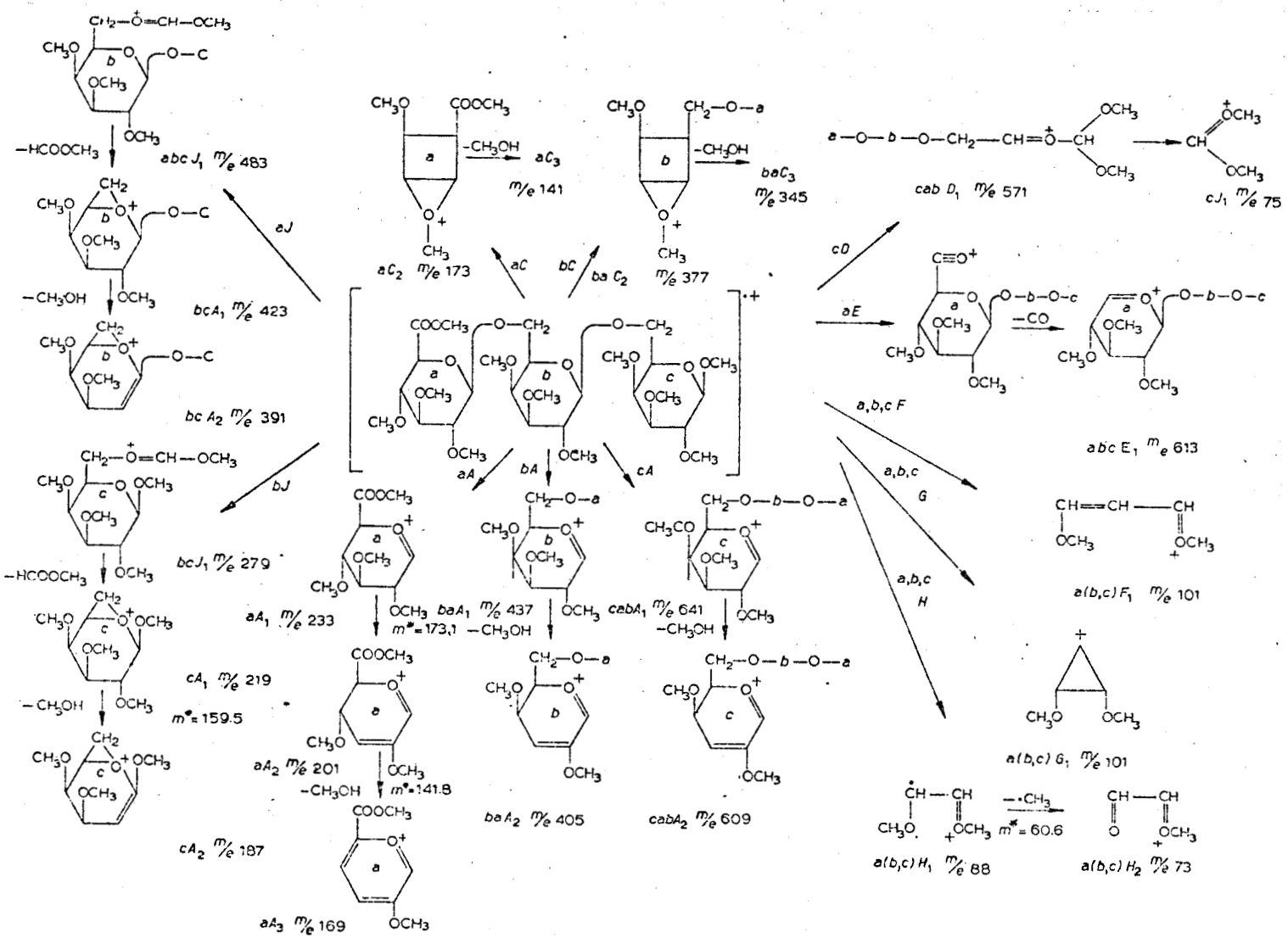


FIGURE 29

Fragmentation générale du trisaccharide GlcAU-β-(1⟶6)-Gal-β-(1⟶6)-Gal. KOVACIK et coll. (69)

ce cas, le rapport $\frac{m/e\ 161}{m/e\ 159}$ est un meilleur critère : il est supérieur à 1 dans le cas des liaisons 1⟶4 et inférieur à 1 pour les liaisons 1⟶2. La fragmentation des acides pseudoaldobiuroniques est globalement identique à celle des acides aldobiuroniques. Les principales différences résident dans la masse des ions abJ_1 (m/e 293 pour les acides pseudoaldobiuroniques et m/e 279 pour les acides aldobiuroniques) et dans la forte intensité de l'ion abD_1 de masse 367 présent dans le spectre de masse de tous les acides pseudoaldobiuroniques. Cet ion n'est pas à confondre avec l'ion baD_1 de même masse et caractéristique des acides aldobiuroniques à liaison de type 1⟶6. Si qualitativement, les acides pseudoaldobiuroniques produisent un spectre identique, ils peuvent être différenciés par quelques ions dont l'intensité varie sensiblement avec le type de liaison. L'acide pseudoaldobiuronique dont la liaison est de type 1⟶3 possède un ion bC_2 (m/e 173) très intense et un ion baJ_1 (m/e 279) faible contrairement aux autres acides pseudoaldobiuroniques. Le rapport $\frac{bC_2}{aA_2}$ peut également être pris en compte pour compléter cette distinction. Les produits de β- élimination des acides aldobiuroniques connaissent la même fragmentation que leurs "parents". Ils se différencient toutefois par l'absence de la série abJ_1 et la présence d'un ion abH_1 très intense de masse m/e 292. Quant aux acides pseudoaldobiuroniques 4,5 insaturés, ils subissent à l'exception de quelques fragments une fragmentation fort différente de celle déjà décrite, fragmentation qui passe notamment par un ion intermédiaire cyclique à 7 centres.

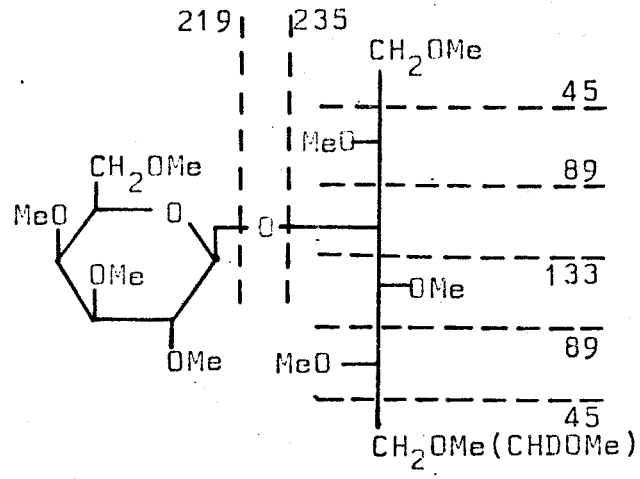
Ces travaux ont trouvé leur application dans l'étude de

structures de polysaccharides bactériens (11 , 76 , 77). La figure 30 page 96 montre la fragmentation primaire d'un trisaccharide acide obtenu après hydrolyse acide partielle du polysaccharide capsulaire de Klebsiella type 9 (76). Les fragments indiqués dans la figure permettent de déterminer rapidement la séquence du trisaccharide : le fragment de masse m/e 233 est caractéristique d'un acide uronique en position terminale non réductrice et le fragment de masse m/e 206 d'un déoxy-sucre réduit ; quant au fragment de masse m/e 407, il implique la séquence AU⟶déoxy-sucre. Parmi d'autres fragments, celui de masse m/e 59 caractérise un 6-déoxy-sucre terminal non réducteur, ceux de masse m/e 103 et 90 que la liaison b⟶c entre les deux derniers sucres est de type 1⟶3 et ceux de masse m/e 375 et 266 (ions baA_2 et bcJ_1) que la liaison a⟶b entre les deux premiers sucres est de type 1⟶4 : en effet, l'ion m/e 375 aurait été absent si la liaison a⟶b avait été de type 1⟶2 et l'ion m/e 266 également si la même liaison avait été de type 1⟶3. Le trisaccharide analysé est donc identifié en tenant compte des résultats complémentaires de la chromatographie en phase gazeuse des produits d'hydrolyse totale du trisaccharide ; il s'agit du trisaccharide GlcAU 1⟶4Rha 1⟶3Rhamnitol. Dans la figure 30 page 96, est également présenté un trisaccharide branché (76) caractérisé par la masse différente de ses fragments exception faite de la nature des unités monosaccharides ; la structure branchée est confirmée par l'absence simultanée des fragments de masse 133 et 103.

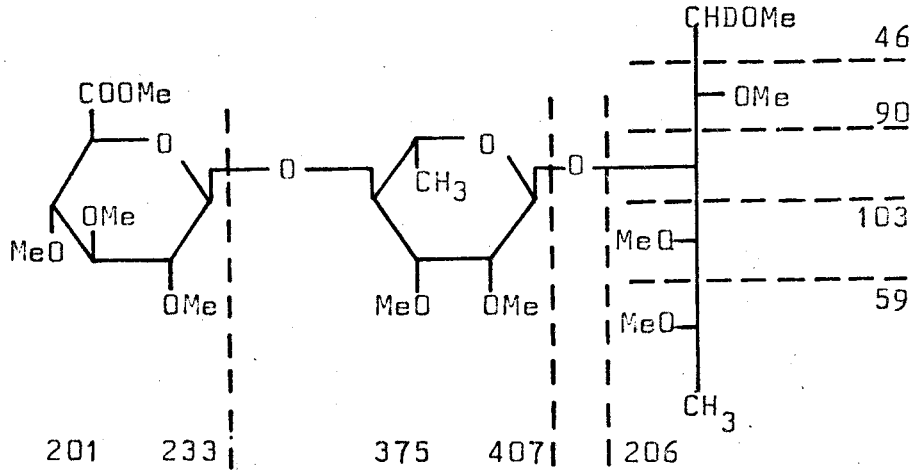
L'examen en spectrométrie de masse de la structure des glycolipides est abordé dans de nombreux articles où l'on tente surtout de déterminer la séquence glucidique malgré de nombreux

A

(KARKKAINEN (58))

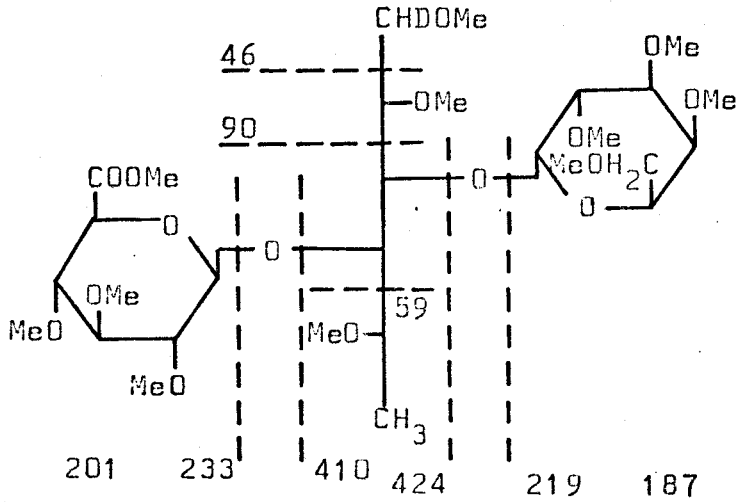


B



(LINDBERG et coll. (76))

C



(LINDBERG et coll. (76))

FIGURE 30

Fragmentation des oligosaccharides sous la forme d'alditols perméthylés.

A : lactitol perméthylé ; B : GlcAU-β-(1⟶4)-Rha-β-(1⟶3)-Rhamnitol perméthylé ; C : GlcAU-β-(1⟶4)-[Gal-α-(1⟶3)]-Rhamnitol perméthylé. (ou β)

ions dans la région centrale du spectre dus à l'hétérogénéité de la partie lipidique.

KARLSSON et coll. (61) observent cependant que la lecture du spectre de masse se trouve facilitée si l'on réduit le glycolipide par le borohydrure de lithium et d'aluminium avant de le perméthyler : cette étape supplémentaire permet de transformer les fonctions acétamide des osamines et du céramide en amines primaires (N-éthyl) et d'obtenir des produits dont la plus grande stabilité se reflète au niveau des fragments, plus nombreux et intenses même dans la région des masses élevées.

Lors de leur étude sur les glycolipides érythrocytaires (41, 42), HANFLAND et EGGE font ressortir quelques observations intéressant la localisation de l'osamine ainsi que le type de liaison contractée entre elle et le sucre situé du côté non réducteur. La localisation de l'osamine peut être déterminée par l'observation de la valeur du rapport $\frac{P^+}{P^+-32}$, où P^+ est l'ion qui se forme à la suite de la coupure d'une liaison glycosidique et 32 équivaut à la perte ultérieure d'une molécule de méthanol : quand un sucre neutre se situe du côté de la coupure, le rapport $\frac{P^+}{P^+-32}$ est supérieur à 3 et quand il s'agit d'une osamine, le même rapport est inférieur à 1. En outre, quand l'osamine est liée sur son carbone C_3, un fragment relativement intense de masse m/e 228 est observé, ce qui n'est pas le cas quand celle-ci est liée par son carbone C_4. La figure 31 page 98 explicite la différence entre les deux types de liaison.

L'étude des oligosaccharides du lait de femme (26) de même que celle de l'urine (40) viennent compléter les résultats de la spectrométrie de masse.

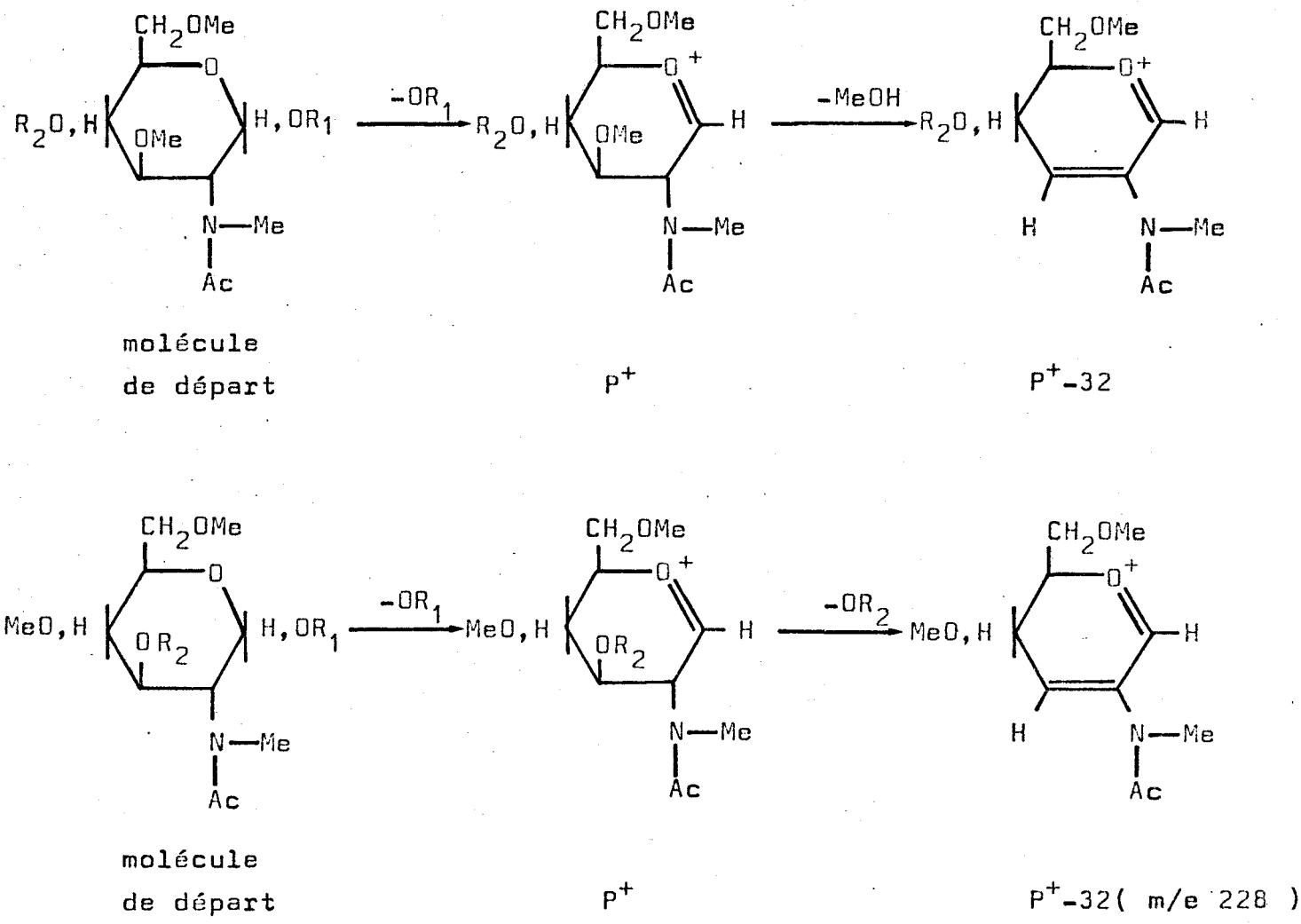


FIGURE 31

Mécanisme à l'origine de la formation des fragments P^+-32 et 228.
HANFLAND et EGGE (42)

Il ressort de plus en plus de ces différents travaux que la séquence glucidique se détermine à l'aide des fragments des séries A. Le schéma d'une structure glycannique est représenté figure 32 page 100 et montre l'importance de ces fragments. Les fragments de la série J aide à la détermination de la liaison glycosidique, leur présence éliminant la possibilité d'une liaison de type 1⟶3. On remarque de plus en plus l'utilisation de la réduction du sucre terminal réducteur qui permet de connaître sans problème la liaison avec l'alditol par l'observation des fragments issus de la fragmentation de la chaîne carbonée de celui-ci.

Dans un article récent traitant des glycogénoses, LENNARTSON et coll. (74) apportent de nouveaux renseignements sur la détermination du type de liaison entre les différents monosaccharides. La figure 33 page 101 résume leurs conclusions. Ils observent, lors de leur étude sur les trisaccharides, les intensités des fragments de la série bald pour distinguer la liaison a⟶b entre les deux premiers sucres : ils rapportent à ce propos que le fragment (bald-1x32) est le fragment majeur de la série quand la liaison a⟶b est 1⟶6 et que la série bald est décroissante en intensité, des fragments bald à (bald-2x32), quand la liaison est 1⟶4. Ceci se retrouve au niveau des tétrasaccharides comme le montre la figure 34 page 102 ; la liaison b⟶c entre les sucres centraux est ici déterminée par l'intensité des fragments bcald : une liaison b⟶c de type 1⟶4 voit le fragment bcald-32 dominer la série bcald comme le fragment bald-32 des trisaccharides. Les rapports d'intensité entre les fragments bald, bald-32, bald-2x32 et les fragments bcald, bcald-32 et bcald-2x32 sont environ 16 : 4 : 1 pour les liaisons

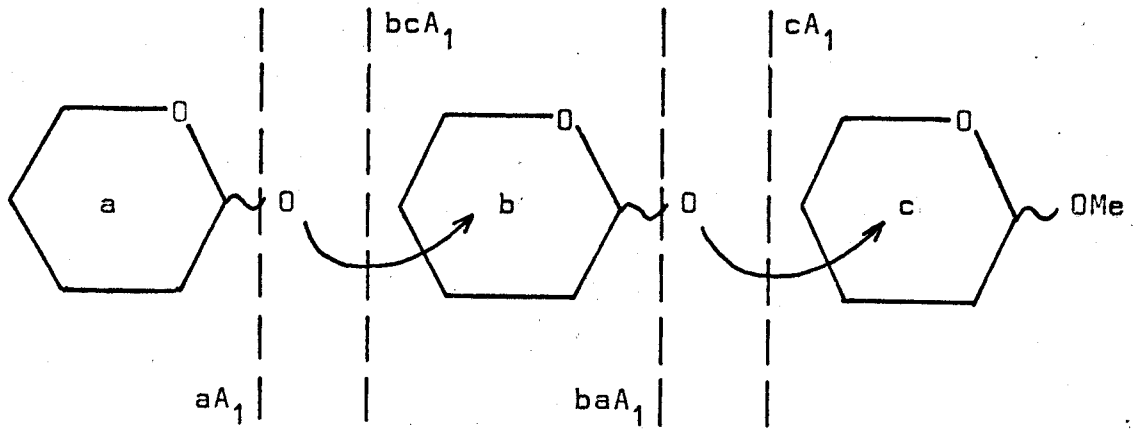


FIGURE 32

Fragments primaires caractéristiques de la séquence glucidique.

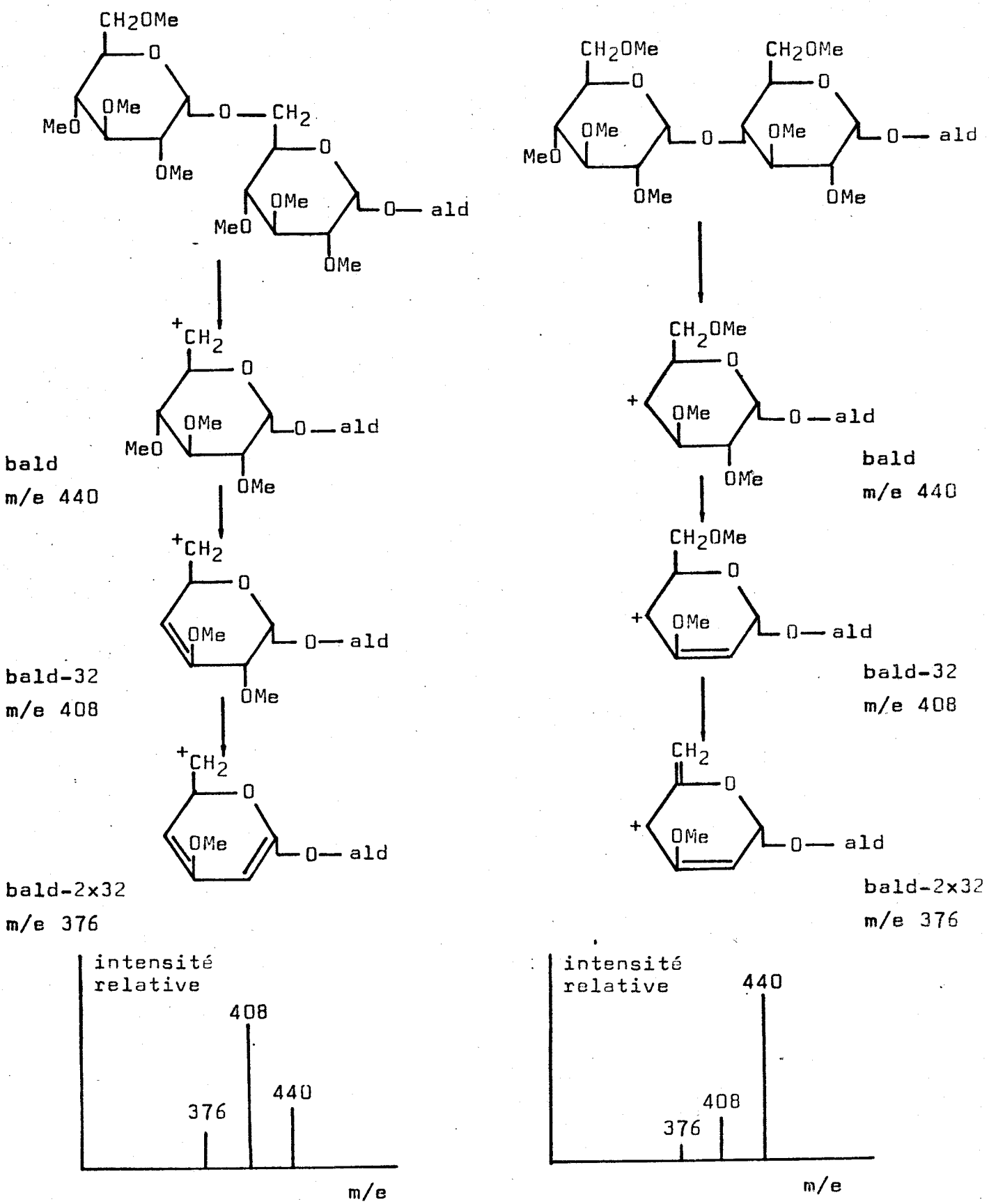


FIGURE 33

Fragments caractéristiques de la liaison a⟶b des trisaccharides analysés sous la forme d'alditols perméthylés.

LENNARTSON et coll. (74)

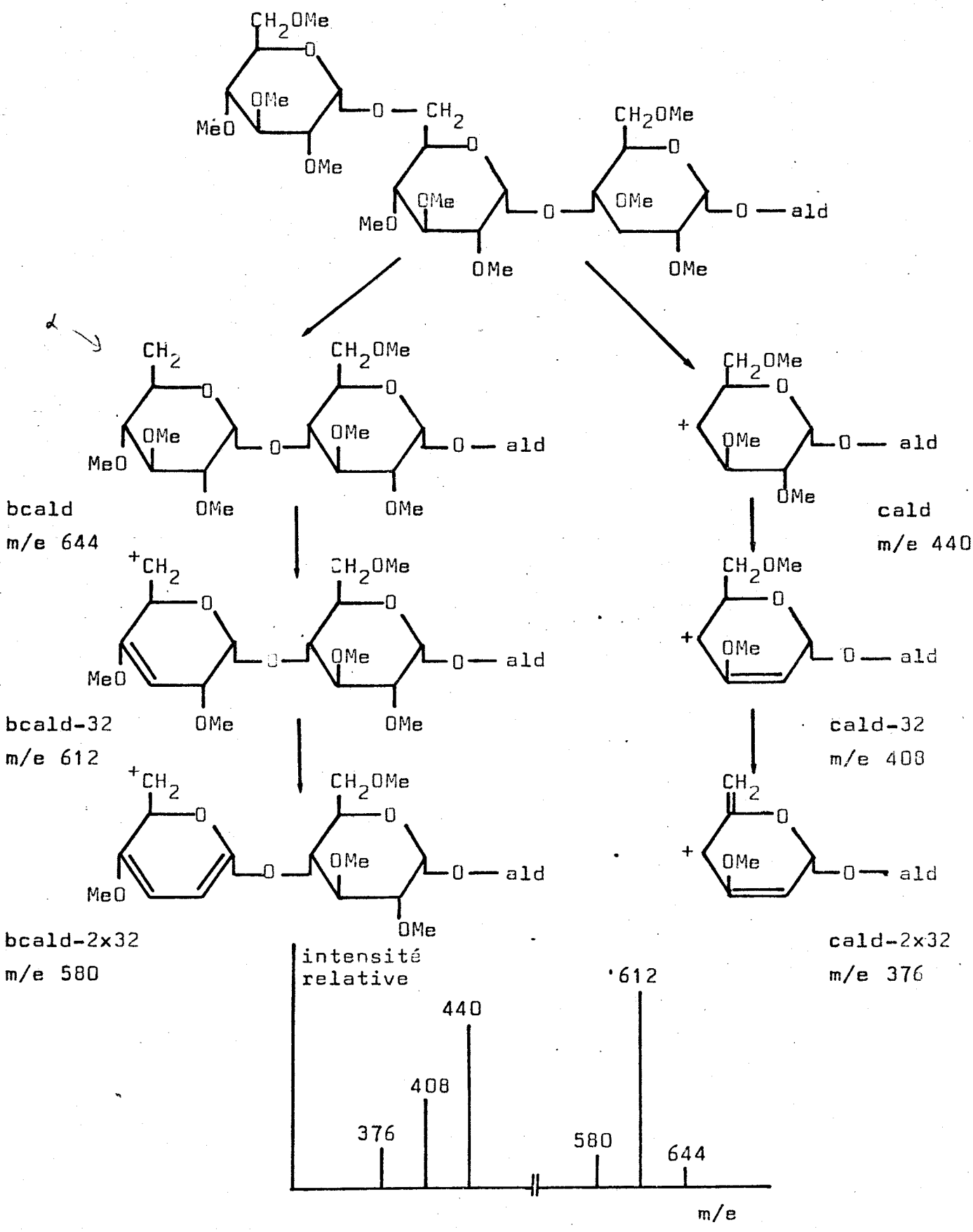


FIGURE 34

Fragments caractéristiques des liaisons a⟶b et b⟶c des tétrasaccharides analysés sous la forme d'alditols perméthylés. LENNARTSON et coll. (74)

a⟶b et b⟶c de type 1⟶4 respectivement et environ 1 : 5 : 2 pour les liaisons a⟶b et b⟶c de type 1⟶6. Ces différences d'intensité sont probablement dûes à des vitesses différentes d'élimination des molécules de méthanol ou encore à la stabilité du fragment.

2 - Les éthers triméthylsilylés

De nombreux travaux ont été consacrés à ces dérivés qui, à côté d'une volatilité voisine de celle des éthers méthylés, sont très faciles à préparer.

Les premiers travaux de KOCHETKOV et coll. (15, 67) sur les éthers pertriméthylsilylés des disaccharides font d'abord observer la présence dans certains spectres de l'ion moléculaire de très faible intensité à côté d'autres ions de masse élevée ($M-\dot{C}H_3$, M-TMSO$^{\cdot}$, $M-\dot{C}H_3$-TMSOH) qui peuvent aider à la détermination du poids moléculaire du produit. Ils dégagent également des fragments qui permettent de découvrir la structure du disaccharide : ces fragments, qui suivent la même fragmentation que les fragments des séries A et J des éthers méthyliques, restent utiles pour déterminer la séquence glucidique. Les principaux fragments sont présentés figure 35 page 104 ainsi que leur mode de fragmentation : l'ion m/e 569 constitué de l'unité réductrice de l'oligosaccharide caractérise ici l'unité hexose terminale réductrice. La double origine de l'ion m/e 451 illustré figure 35 page 104, qui peut comprendre soit l'unité non réductrice, soit l'unité réductrice, trouve tout son intérêt quand les deux monosaccharides ne sont pas isomères. D'autres fragments permettent de déterminer la nature de la liaison glycosidique. Les hexosyl-hexoses à liaison 1⟶6 se distinguent des autres hexosyl-

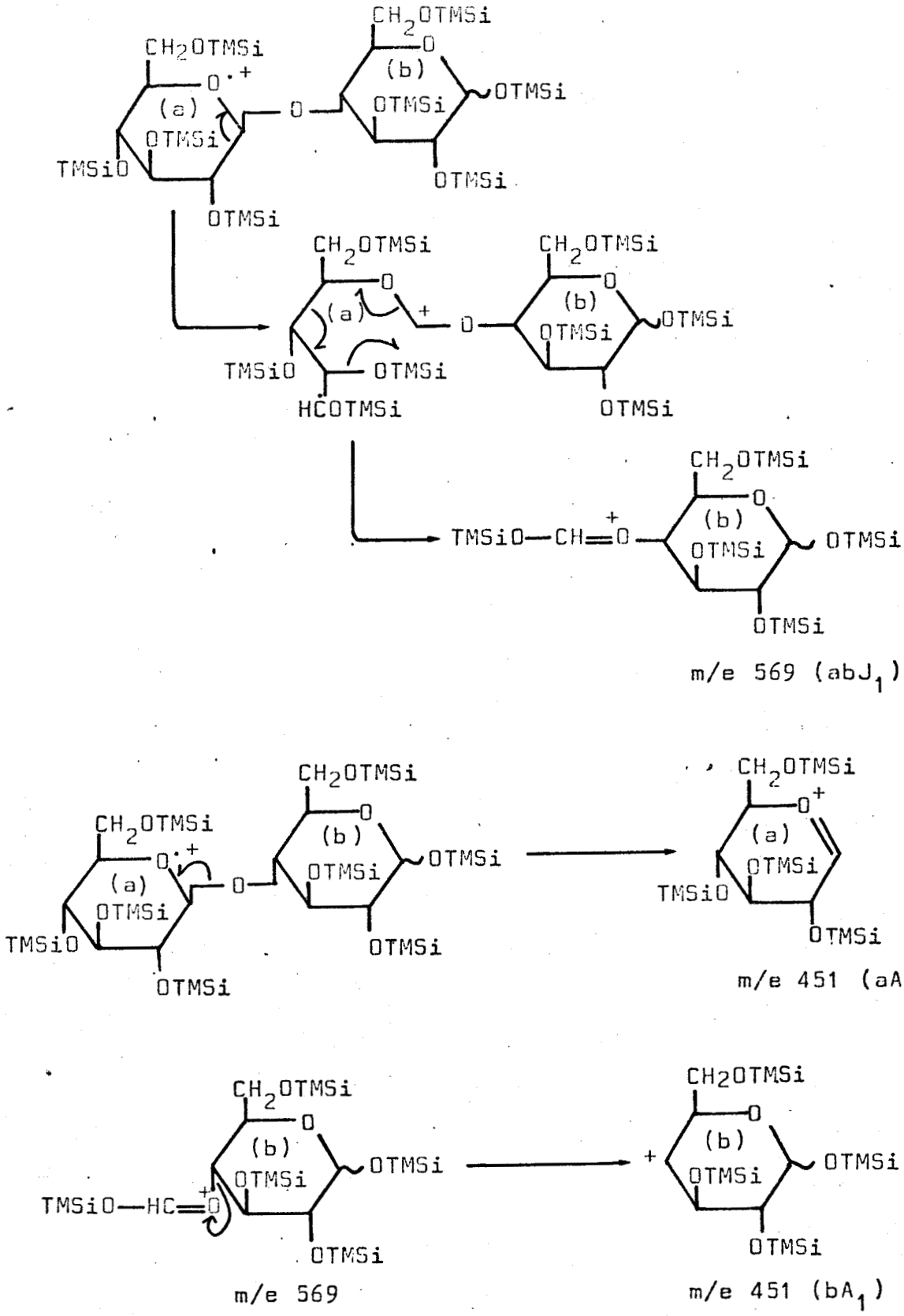


FIGURE 35

Fragmentation des oligosaccharides pertriméthysilylés.

A : formation de l'ion m/e 569 ;

B : double origine de l'ion m/e 451.

Ces ions sont les analogues des ions abJ_1 et A_1 des dérivés perméthylés.

KOCHETKOV et coll. (67)

hexoses par la présence d'un pic relativement intense de masse m/e 583 ; ce même ion a une masse m/e 481 dans le cas des pentosyl-(1⟶6)-hexoses. Son origine est schématisée figure 36 page 106 ; celle-ci peut être différente quand le sucre terminal réducteur est sous forme furane où la formation de l'ion est consécutive à la simple coupure de la liaison carbone-carbone C_4-C_5 du sucre réducteur. Les autres hexosyl-hexoses à liaison 1⟶2, 1⟶3 et 1⟶4 ont des spectres de masse très semblables : ils présentent tous un ion de masse m/e 683 dont la formation est identique à celle de l'ion B_2 des glycosides perméthylés (voir figure 36 page 106). Les disaccharides à liaison 1⟶2 et 1⟶4 peuvent toutefois être différenciés des disaccharides à liaison 1⟶3 par la présence des ions de masse m/e 668 et m/e 578, le second dérivant du premier par la perte d'une molécule de triméthylsilanol.

KAMERLINK et coll. (52) reprennent ces travaux de manière plus précise dans leur étude sur les aldosyl oligosaccharides pertriméthylsilylés. En dehors des hexosyl-(1⟶1)-hexoses, aisément caractérisés par les ions de masse m/e 565, 553 et 540, ils confirment la caractérisation des hexosyl-(1⟶6)-hexoses par l'ion de masse m/e 583 et différencient les autres hexosyl-hexoses à liaison 1⟶2, 1⟶3 et 1⟶4 par la valeur des rapports m/e $\frac{569}{539}$ et m/e $\frac{569}{668}$. Ils constatent que les hexosyl-(1⟶2)-hexoses ont un rapport m/e $\frac{569}{539}$ élevé par rapport aux deux autres hexosyl-hexoses, alors qu'une valeur élevée du rapport m/e $\frac{569}{668}$ caractérise les hexosyl-(1⟶3)-hexoses. Les mêmes observations sont faites sur les disaccharides contenant un pentose, en tenant compte des différences de masse. Les pentosyl-(1⟶6)-hexoses sont caractérisés par l'ion de masse

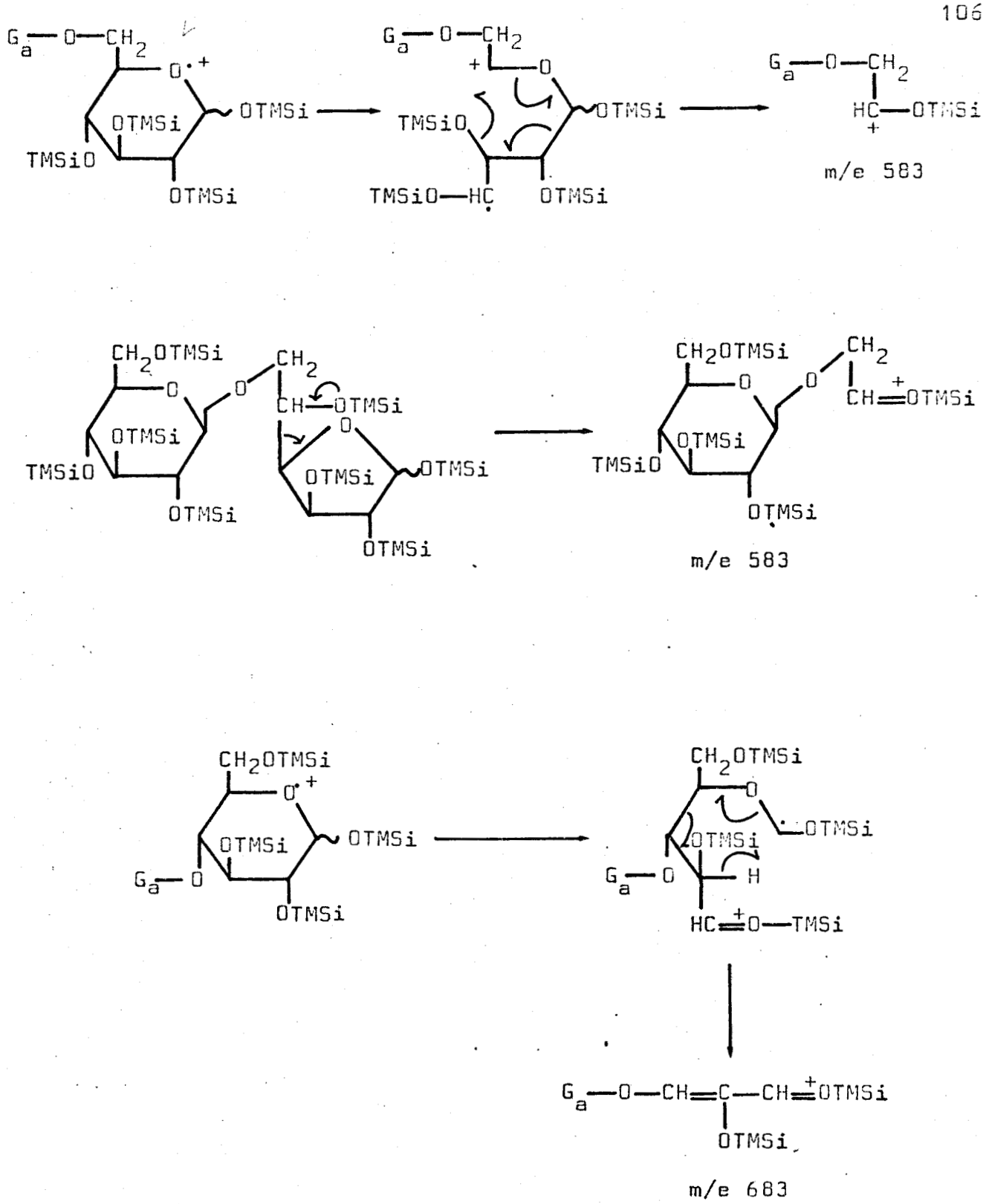


FIGURE 36

Formation de l'ion m/e 583 :

A : origine majeure ; B : origine possible (le sucre réducteur est sous forme furane) ;

Formation de l'ion m/e 683, analogue de l'ion B_2 des monosaccharides perméthylés.

KOCHETKOV et coll. (67)

m/e 481 ; celui-ci, analogue de l'ion m/e 583 des hexosyl-(1⟶6)-hexoses, confirme par ailleurs, la position non réductrice du sucre qui le compose. Les hexosyl-pentoses se caractérisent par contre par l'ion de masse m/e 467 analogue de l'ion de masse m/e 569 des hexosyl-hexoses. Le seul rapport m/e $\frac{467}{539}$ peut permettre de distinguer les hexosyl-pentoses à liaison 1⟶2 et 1⟶3 : il est élevé uniquement dans le cas des hexosyl-(1⟶2)-pentoses. Dans le même article, les auteurs essaient en outre de différencier quatre trisaccharides : en dehors des ions précédemment cités toujours utiles dans la détermination de la structure de l'oligosaccharide étudié, la présence de l'ion de masse m/e 961, à côté de l'ion m/e 583 dans les spectres de masse des aldosyl-(1⟶6)-aldosyl-(1⟶6)-aldoses permet de distinguer ces derniers des aldosyl-(1⟶6)-aldosyl-(1⟶4)-aldoses où ne figure dans le spectre que l'ion de masse m/e 583. Cette observation permet ainsi de déduire la liaison a⟶b de type 1⟶6 caractérisée par l'ion de masse m/e 583 et la liaison b⟶c de type 1⟶4 par l'ion de masse m/e 961.

A la suite de ces travaux, les mêmes auteurs abordent l'étude d'oligosaccharides contenant une ou plusieurs unités fructoses (54) puis celle des 2-acétamido-2- déoxy-aldohexosyl-hexoses (53). La présence d'une unité fructose se signale par l'intensité importante des ions de masse m/e 451 et m/e 961 (451-TMSOH) qui s'explique par la stabilité supérieure de l'ion cétofuranose par rapport à celle de l'ion hexopyranose. Un autre ion de masse m/e 437 caractérise la présence du cétose ; il est plus particulièrement intense dans le cas des glycosyl-(1⟶1)- et (1⟶2)-cétoses : dans le premier cas il résulte de la simple coupure de la liaison carbone-carbone

C_1 - C_2 et dans le second cas d'un mécanisme de réarrangement (figure 37 page 109). L'ion de masse m/e 815 est observé lorsque l'ion précédemment cité (m/e 437)a une unité hexose qui lui est liée sur les carbones 3, 4, 5 ou 6 et témoigne de la position interne dé cétose. Ces deux derniers ions suffisent ainsi pour déceler la présence et la position de l'unité cétose au sein de l'oligosaccharide. Une série complémentaire d'ions caractérise la séquence des unités cétoses dans la chaîne des oligosaccharides de masses plus élevées, chacun de ces ions différant d'une unité cétose (m/e 671, 1049 (641 + 378), 1427 (671 + 2x378) ; la formation de ces ions est illustrée figure 37 page 109 . Des travaux accomplis entre-temps par BINKLEY et coll. (6) sur des oligosaccharides de nature végétale à noyau sucrose avaient déjà souligné l'importance de la plupart de ces ions. Un des aspects intéressants de ces derniers travaux réside dans l'étude de ces mêmes oligosaccharides sous forme polyacétate. La présence notamment de deux ou plusieurs fructoses liés entre eux est à l'origine de la formation d'un ou deux ponts méthylène qui facilitent le départ du cétose terminal emmenant avec lui un groupement acétyl du cétose qui lui est lié (figure 38 page 110).

L'étude des 2-acétamido-2-déoxy-aldohexosyl-aldohexoses par KAMERLING et coll. (53) apporte également de précieux renseignements. Les auteurs remarquent tout d'abord que la somme des intensités des ions m/e 420 et m/e 330 est plus élevée que celle des intensités des ions m/e 451 et m/e 361 quand le sucre aminé est en position non réductrice. Le rapport entre ces totaux est inverse quand l'osamine est en position réductrice. Les deux premiers ions se composent du sucre aminé après coupure de la liaison glycosidique, le deuxième

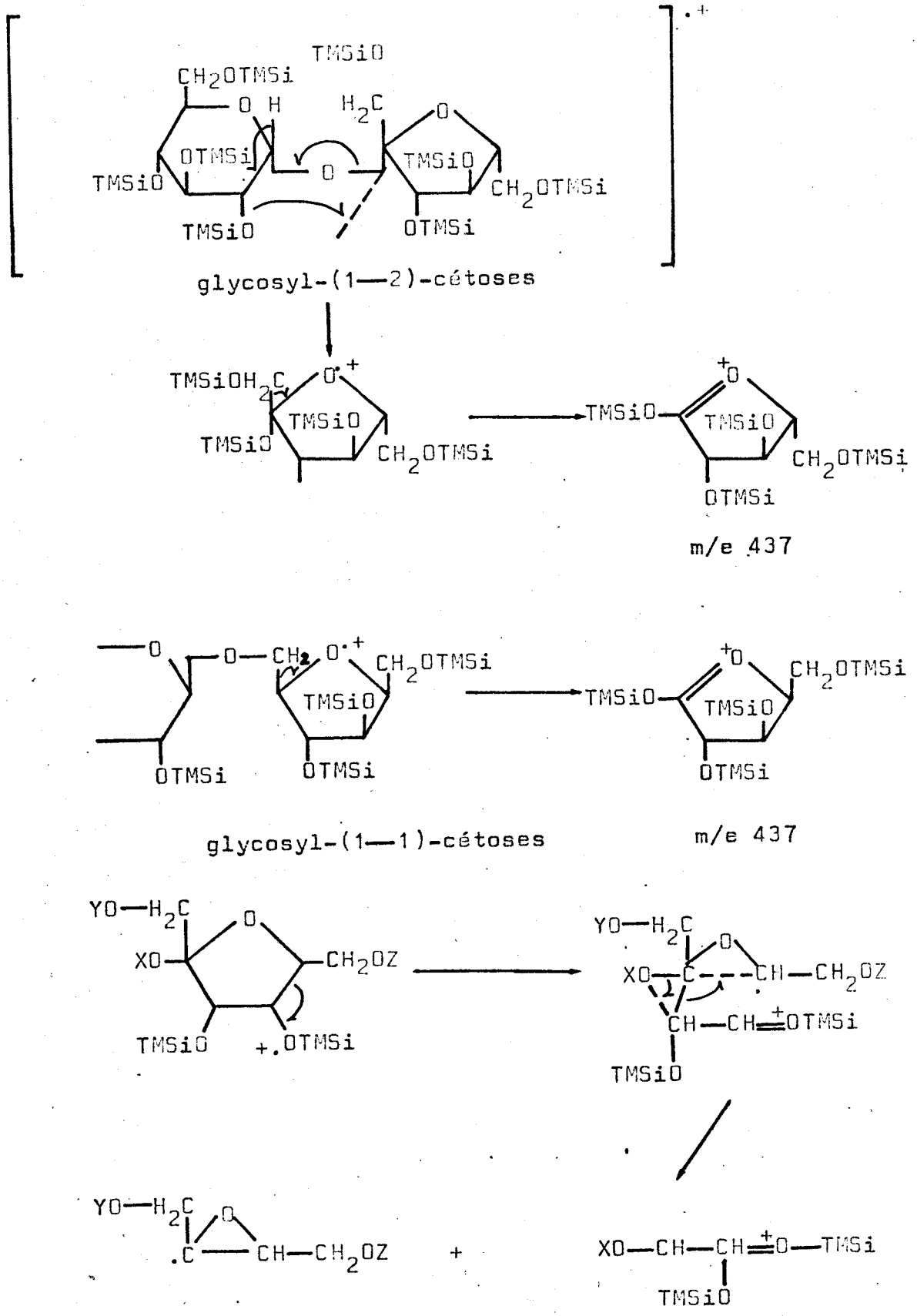


FIGURE 37

Fragmentation d'oligosaccharides à unités fructose analysés sous forme triméthylsilylée (KAMERLING et coll. (54)).

A : formation de l'ion m/e 437 ;

B : formation des ions m/e 671, 1049 et 1427 ; m/e 671 : X = G_p ; m/e 1049 : X = G_p Fru_f ; m/e 1427 : X = G_p Fru_f Fru_f .

(G_p : hexopyranose ; Fru_f : fructofuranose)

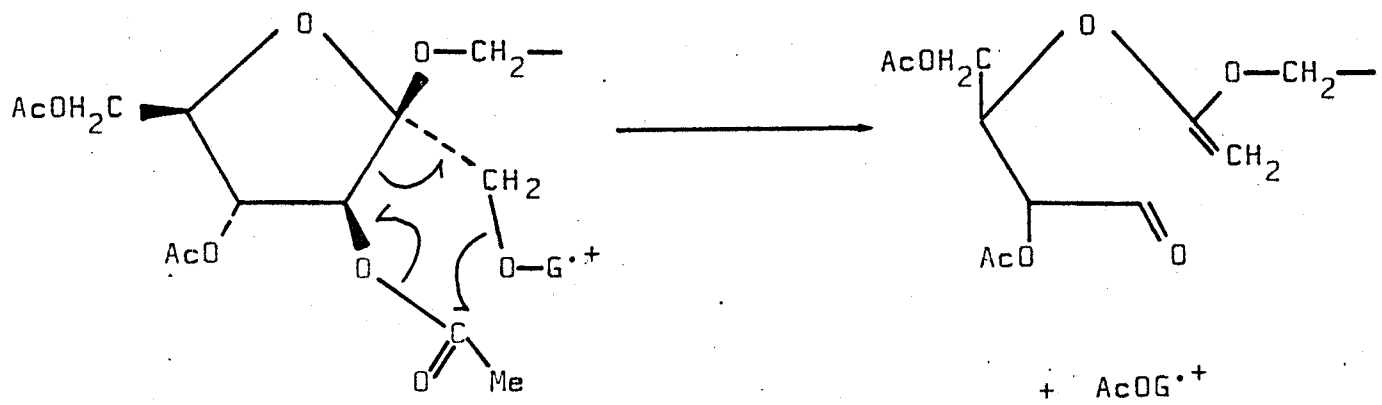


FIGURE 38

Fragmentation caractéristique d'oligosaccharides à noyau sucrose étudiés sous forme polyacétate.
BINKLEY et coll. (6)

étant issu du second par perte d'une molécule de triméthylsilanol ; les deux ions suivants comprennent l'unité monosaccharide neutre. Ensuite, seuls les hexosaminyl-(1⟶6)-hexoses se différencient des autres par la présence d'un pic de masse m/e 552 analogue de l'ion de masse m/e 583 des hexosyl-(1⟶6)-hexoses. Les autres hexosaminyl-hexoses sont en effet difficiles à distinguer notamment par des rapports analogues à ceux des disaccharides neutres. Un critère est cependant suggéré pour déterminer la liaison glycosidique : le rapport m/e $\frac{217}{204}$. Il est supérieur à l'unité dans le cas des hexosaminyl-(1⟶2)- et -(1⟶3)-hexoses et inférieur à celle-ci dans le cas des hexosaminyl-(1⟶4)- et -(1⟶6)-hexoses. L'arrivée d'une nouvelle fonction semble ainsi compliquer les tentatives de différenciation des sucres et nécessite d'autres apports d'information (chromatographie en phase gazeuse, résonance magnétique nucléaire). CODUTI et BUSH (17) dans leur étude du chitobiose (GlcNAc 1⟶4GlcNAc) et d'un disaccharide isomère (GlcNAc 1⟶6GlcNAc) ne peuvent apporter d'éléments supplémentaires pour différencier les sucres ; ici, la distinction est facile à cause de l'ion de masse m/e 552 caractéristique de la liaison du type 1⟶6.

Ces différents travaux sont maintenant l'outil de base pour les études de structure des glycoconjugués de lait comme le montrent les travaux de von NICOLAI et coll.(96) et KAMERLING et coll. (55) Le fucosidolactose et le difucosidolactose, présents dans le lait de femme (96), sont des oligosaccharides branchés, un puis deux résidus venant se brancher sur le lactose précurseur. Au niveau du spectre de masse, ces branchements se traduisent par l'apparition de nouveaux fragments dont la masse est supérieure d'une masse multiple de 290

lorsqu'on les compare à ceux du lactose. Les 2⟶3 et 2⟶6 neuraminyl-lactose sont également examinés. En dehors des fragments caractéristiques de la séquence, ils peuvent être différenciés par l'ion de masse m/e 784 spécifique uniquement de la liaison 1⟶6 entre deux sucres.

A la lecture des analyses obtenues par la spectrométrie de masse, il est visible que les éthers méthyliques et triméthylsilylés des oligosaccharides peuvent être déterminés sans grande difficulté. Le principal obstacle provient de la masse des produits car les fragments de masse élevée sont parfois difficiles à obtenir ou ont une très faible intensité. En ce sens, la méthylation des oligosaccharides est plus intéressante car elle alourdit beaucoup plus faiblement la masse des composés par rapport à la triméthylsilylation ; elle permet d'envisager l'analyse aisée de composés comprenant jusqu'à quatre à cinq monosaccharides. En outre, l'étude des oligosaccharides sous forme méthylglycosyl alditols facilite la détermination de la liaison qiu intéresse le monosaccharide en position réductrice, comparativement aux méthylglycosides. Ceux ont également des fragments caractéristiques mais leur fragmentation est beaucoup plus complexe.

C - RESULTATS DES AUTRES IONISATIONS

1 - Analyse par ionisation chimique

Le nombre de travaux faisant appel à l'ionisation chimique est encore relativement limité. La raison principale se trouve au niveau des résultats de l'ionisation par impact électronique qui apporte un maximum d'informations concernant la structure d'un composé.

La détermination de la masse moléculaire est le seul renseignement manquant. L'ionisation chimique a été abordée dans ce sens. Les quelques travaux qui ont été entrepris montrent aussi qu'elle renseigne sur la séquence des composés. Les gaz ionisants les plus utilisés sont l'isobutane, l'ammoniac et le mélange isobutane-ammoniac. Les résultats sont fort différents selon la nature du gaz : l'isobutane provoque, à côté de l'ionisation de la molécule, une fragmentation assez poussée (49), contrairement à l'ammoniac et au mélange isobutane-ammoniac dans lequel l'ion ammonium est dominant.

CHIZHOV et coll. (16) ont étudié récemment l'ionisation chimique de disaccharides et trisaccharides sous la forme d'alditols perméthylés. Ils comparent lors de ce travail les résultats de l'ionisation chimique par le mélange isobutane-ammoniac et l'isobutane seul. Le mélange ionisant apporte très peu de renseignements : le spectre se limite au complexe molécule-ion ammonium $(M + NH_4)^+$, très intense et à quelques ions peu abondants dont l'ion moléculaire protonisé par un atome d'hydrogène $(MH)^+$ et certains ions contenant la partie réductrice de l'oligosaccharide. D'autres ions d'intensité moyenne sont présents mais leur présence n'a pas trouvé d'explication. Par contre, les spectres de masse obtenus avec l'isobutane sont beaucoup plus intéressants. Deux séries d'ions sont présents : l'une correspond à la partie non réductrice (partie glycosyl G) : G^+, $(G-CH_3OH)^+$, $(G-2xCH_3OH)^+$, l'autre à la partie réductrice (partie alditol A) : $(AOH_2)^+$, A^+, $(A-CH_3OH)^+$. L'ion AOH_2 résulte de la protonation de la molécule sur l'oxygène de la liaison glycosidique puis de la coupure de celle-ci avec transfert d'un atome d'hydrogène sur l'alditol : la fragmentation $MH^+ \longrightarrow AOH_2$ est confirmée par un

ion métastable. Les auteurs dégagent en outre une relation entre le rapport $\frac{A^+}{(AOH_2)^+}$ et le type de liaison entre les deux derniers sucres : cette relation est vérifiée pour tous les oligosaccharides étudiés. Les ions MH^+ et (MH^+-CH_3OH) figurent également dans le spectre de masse des sucres analysés. Les principaux fragments et leur formation sont présentés dans la figure 39 page 115 .

ANDO et coll. (1) font les mêmes observations lors de leur étude sur des oligosaccharides qu'ils ont préféré isoler de leur substrat glycolipidique à fin de simplification. Ces sucres sont analysés sous forme méthylglycosyl alditol peracétylés, de préférence aux éthers méthyliques et triméthylsilylés car ils fournissent davantage d'informations. Le spectre d'ionisation par l'ammoniac présente peu de fragments : l'ion $(M+NH_4)^+$ est très abondant et les ions contenant la partie réductrice sont présents ; ces résultats sont très comparables avec ceux obtenus avec les oligosaccharides perméthylés. L'isobutane permet d'obtenir de plus amples renseignements : les principaux fragments sont issus de la coupure des liaisons glycosidiques qui donnent un fragment secondaire par perte d'une molécule d'acide acétique ; parmi les ions de masse élevée, ils observent les ions $(MH)^+$ et $(M-59)^+$.

L'ionisation par l'isobutane est également très utile à MURATA et coll. (83) qui peuvent caractériser les cérébrosides, lesquels sont analysés sous forme triméthylsilylée. La fragmentation est simple : le monosaccharide (glucose ou galactose) est caractérisé par les ions m/e 451, 361 (451-TMSOH) et 271 (451-2xTMSOH) et l'ion m/e 467 couramment observé lors de la fragmentation des glycolipides par impact électronique. Quant aux acides gras, ils sont assez aisément identifiés par plusieurs séries de fragments caractéristiques.

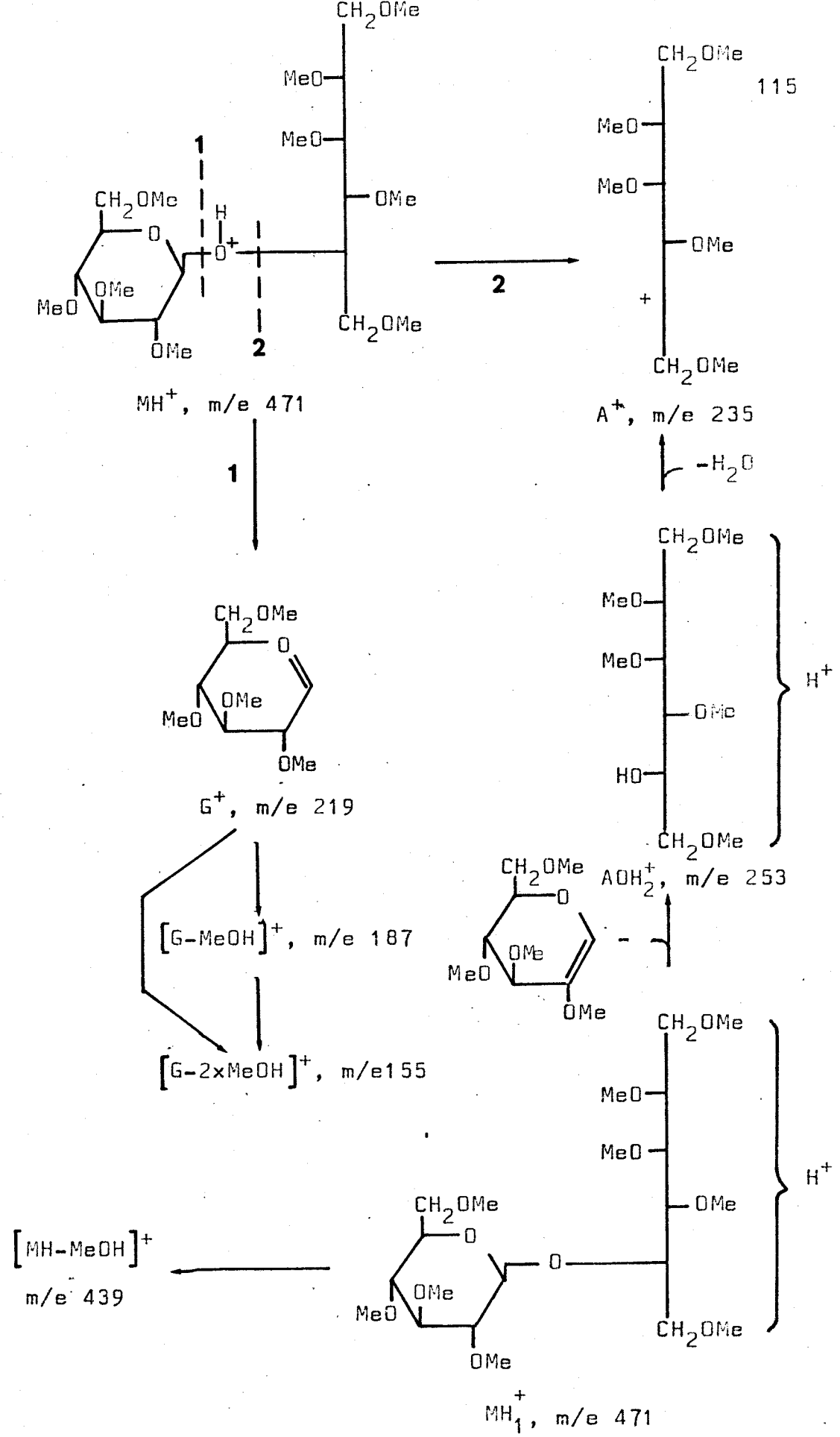


FIGURE 39

Principaux fragments obtenus par ionisation chimique (isobutane) du Glc-β-(1⟶2)-Glucitol perméthylé.
CHIZHOV et coll. (16)

D'après ces résultats encore très fragmentaires, il est logique de penser que l'ionisation chimique va prendre de l'importance dans l'avenir, notamment celle qui est réalisée avec l'isobutane ; elle fournit non seulement l'ion moléculaire mais aussi des ions très utiles à la détermination de la séquence et de la structure du composé analysé. Elle apparaît d'ailleurs de plus en plus souvent dans les analyses par impact électronique comme technique complémentaire.

2 - Analyse par ionisation de champ

Cette ionisation a été abordée pour l'étude des produits instables ; dans les conditions de l'analyse courante par ionisation chimique ou par impact électronique, les sucres non substitués le sont. Les premières expériences ont surtout porté sur les monosaccharides non dérivés.

Plus récemment, KRONE et BECKEY (71) ont analysé en parallèle les sucres non substitués et méthylés à titre de comparaison. En ce qui concerne les premiers, ils observent dans la zone de la masse moléculaire du composé quelques pics dont ceux correspondant aux fragments $\left[M+1\right]^+$ et M^+. Lorsqu'ils méthylent, ils remarquent que l'intensité du fragment M^+ augmente avec le degré de méthylation, comparativement au fragment $\left[M+1\right]^+$. L'ion $\left[M+1-H_2O\right]^+$ est le plus abondant des ions de masse élevée. D'autres fragments sont présents et sont attribués à une possible décomposition thermique. Les sucres (mono-, di- et trisaccharides) ont également été étudiés sous forme perméthylée (72) : l'ion moléculaire est toujours présent. Dans le cas des monosaccharides, on observe d'autres ions de masse m/e 235 $\left[M-CH_3\right]^+$, 219 $\left[M-OCH_3\right]^+$ et 205 $\left[M-CH_2OCH_3\right]^+$. Plusieurs ions caractéris-

tiques des liaisons glycosidiques dans les spectres de masse des oligosaccharides sont identifiés et leur intensité semble même être liée à la nature de la liaison.

La désorption de champ a été réalisée sur les sucres perméthylés. Un seul ion intense est observé : il s'agit de l'ion moléculaire. Ce type d'ionisation peut donc être en conséquence une analyse très utile si l'on veut connaître uniquement la masse moléculaire d'un composé.

TRAVAUX EFFECTUES AU LABORATOIRE

I - MATERIEL ET METHODES

A - ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE D'OLIGOSACCHARIDES APPARTENANT AUX STRUCTURES GLYCANNIQUES

1 - Préparation du glycopeptide β de l'ovomucoïde

L'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule a été préparé selon la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (35) dont le protocole est présenté dans la figure 40 page 120.

L'ovomucoïde ainsi isolé est soumis à une hydrolyse pronasique selon YAMASHINA et MAKINO (99) qu'ont mise au point MONSIGNY et coll. (81). L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans les conditions suivantes : rapport enzyme-substrat 1:50 dans acétate de calcium 0,01M, pH 8, 37°C, 48 heures ; le pH est maintenu constant par addition de soude 1N. A la fin de la réaction enzymatique, l'hydrolysat est amené à pH 4,5 par addition d'acide acétique glacial, concentré puis soumis à une précipitation par dix volumes d'éthanol absolu pendant 2 heures à 20°C puis 18 heures à 4°C avant d'être centrifugé (4000 tours/minute pendant 1 heure). Le précipité est repris par de l'acétate de calcium 0,01M de pH 8 et soumis à deux autres hydrolyses pronasiques dans les conditions qui viennent d'être décrites. Le dernier précipité, appelé fraction glycopeptidique I, est repris par de l'eau distillée et subit une série de purifications comme l'indique la figure 41 page 121 pour donner la fraction glycopeptidique II. L'élution de cette fraction par l'eau distillée sur Séphadex G-25 constitue la dernière étape de purification (élimination des derniers peptides). Enfin, les glycopeptides de la fraction Séphadex sont séparés sur Dowex 50x2 (200-400 mesh) : un premier passage d'eau distillée permet d'éluer le glycopeptide α et un

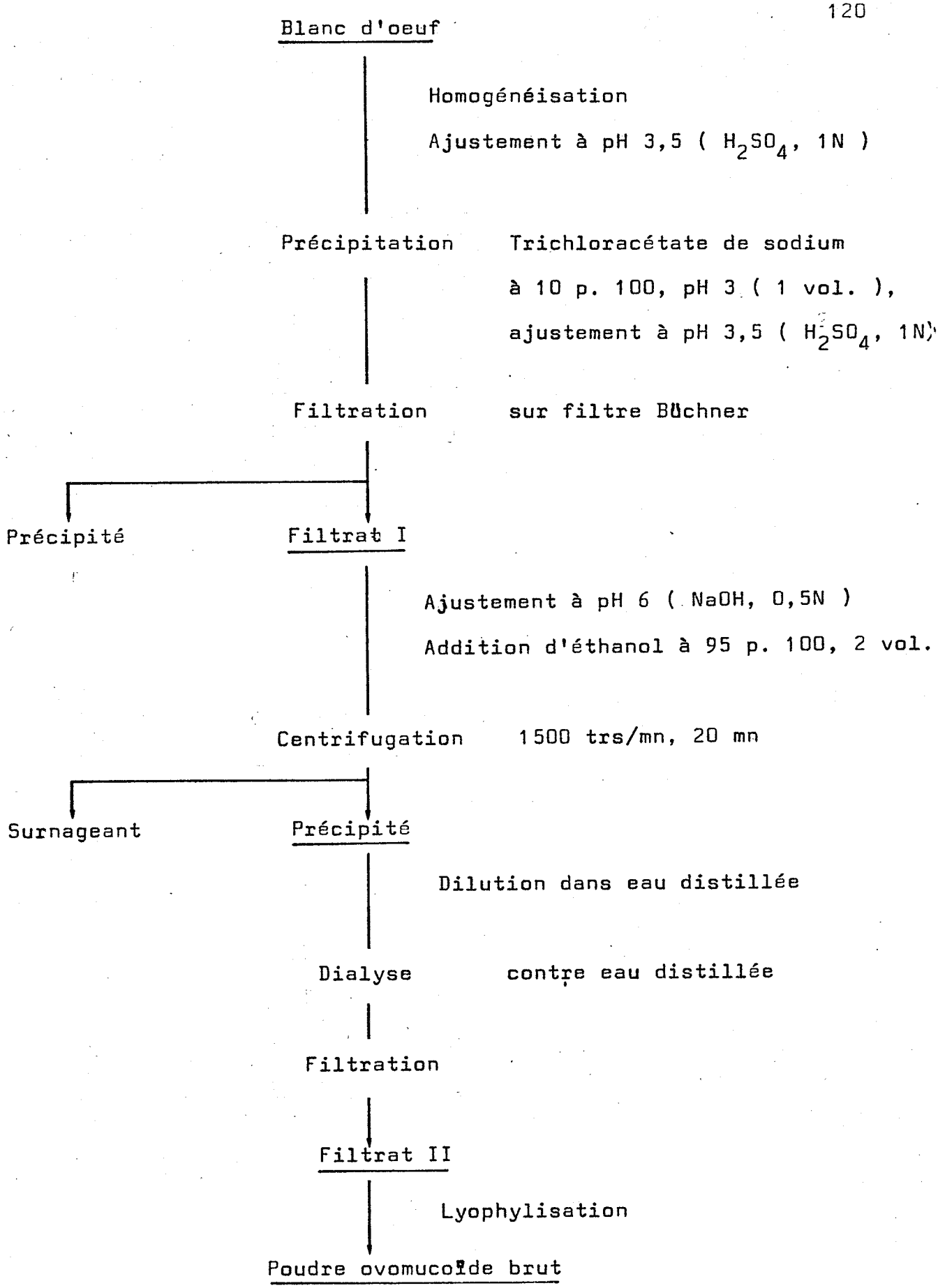


FIGURE 40

Préparation de l'ovomucoïde (selon FREDERICQ et DEUTSCH (35)).

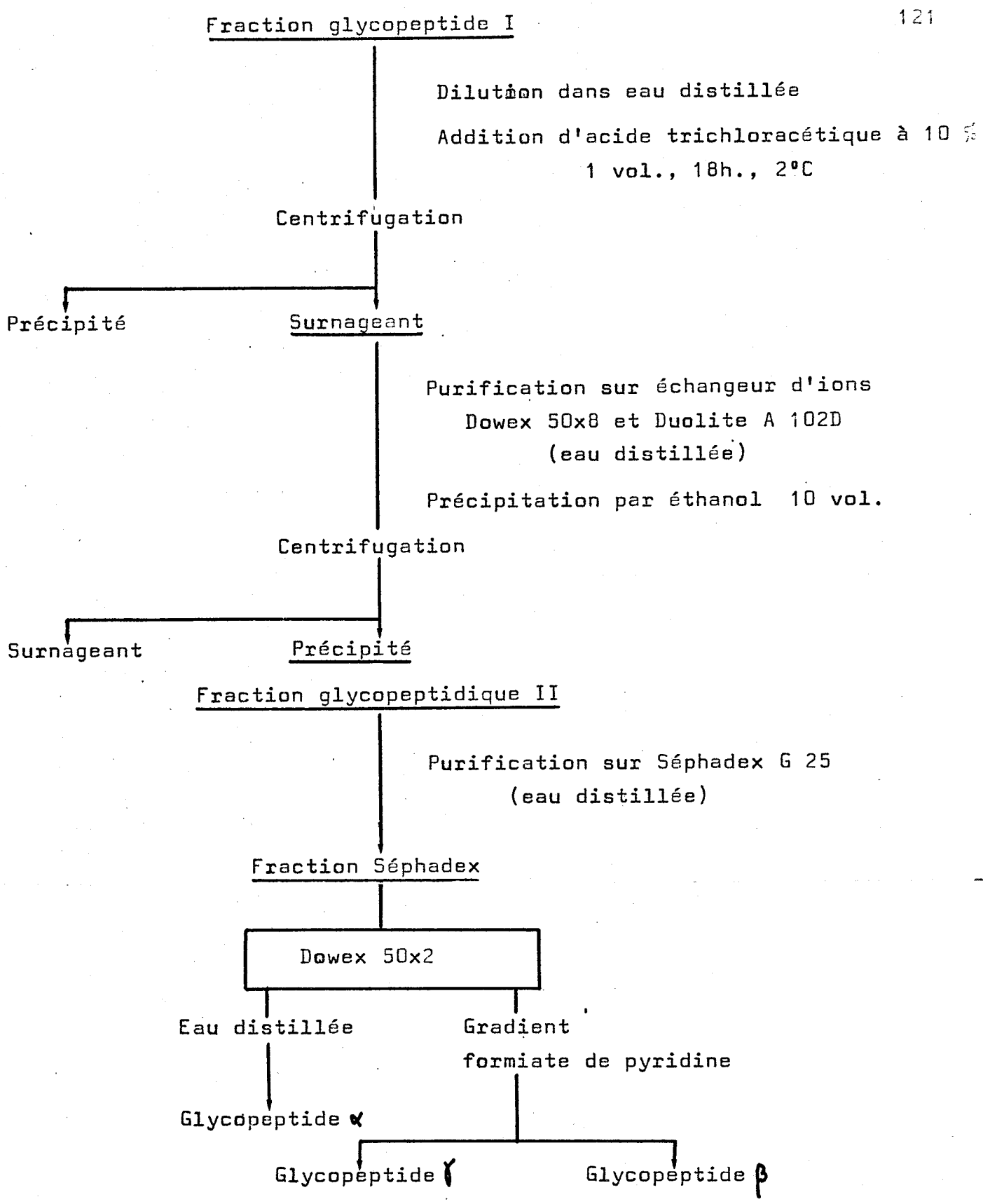


FIGURE 41

Préparation du glycopeptide β de l'ovomucoïde (selon MONSIGNY et coll. (81)).

gradient formiate de pyridine d'abord le glycopeptide β puis le glycopeptide γ .

2 - Acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde

L'acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde a été réalisée dans les conditions indiquées par BAYARD et coll. (2). Le glycopeptide (25g) est acétolysé par le mélange acide acétique/ anhydride acétique/acide sulfurique 10/10/1, à raison de 1g de glycopeptide pour 25 ml du mélange, pendant 4 jours à 20°C et sous agitation. L'acétolysat est versé goutte à goutte sur 75g de glace pilée ; après décongélation, le pH de la solution est amené à pH 4,5 par addition d'hydrogénocarbonate de sodium en poudre. La gelée obtenue est extraite 8 fois par 200 ml de chloroforme. Les extraits chloroformiques sont rassemblés, lavés par 150 ml du solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 1%, séchés sur chlorure de calcium anhydre puis concentrés à environ 20 ml. Enfin, les glucides per-acétylés sont précipités quantitativement par 2l. d'éther de pétrole. Deux phases sont ainsi isolées : une phase aqueuse et une phase chloroformique (figure 42 page 123).

Une fraction basique II est extraite de la phase aqueuse par passage de celle-ci sur une colonne d'échangeur de cations et élution de la colonne par une solution d'ammoniaque à 5%.

La phase chloroformique est saponifiée par une solution méthanolique de méthylate de sodium à 10^{-2} M à 4°C pendant une heure, puis débarassée du sodium par passage sur une colonne de Dowex 50x8 (25-50 mesh, forme H^+). La solution obtenue est alors fractionnée sur des colonnes (8x60 cm) de Dowex 50x2 (100 mesh,

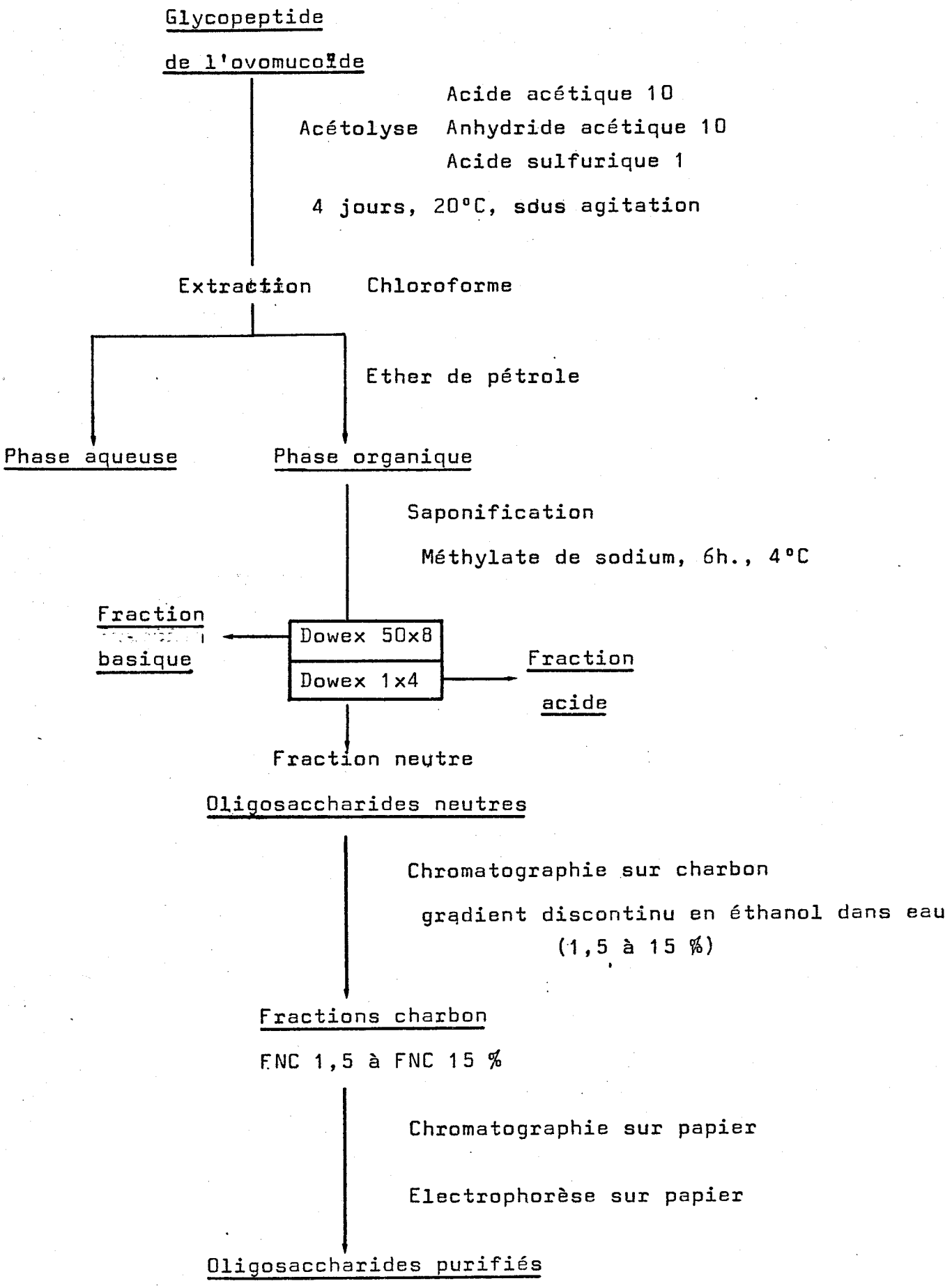


FIGURE 42

Isolement des oligosaccharides obtenus après acétolyse du glyco peptide β de l'ovomucoïde (selon BAYARD et coll. (2)).

forme H^+) et de Duolite A102D (25-50 mesh, forme HCO_2^-). Deux fractions sont isolées : une fraction neutre qui n'est pas retenue sur les échangeurs et une fraction basique I adsorbée sur l'échangeur de cations ultérieurement éluée par une solution aqueuse d'ammoniaque à 5%.

3 - Isolement des oligosaccharides de la fraction neutre de l'acétolysat

La fraction neutre de l'acétolysat est soumise à une chromatographie sur une colonne de charbon-célite : celle-ci est d'abord lavée par 5 l d'eau distillée qui permettent d'éliminer le galactose et le mannose puis éluée par des solutions aqueuses d'éthanol à 1,5, 3,5, 5, 7,5, 10 et 15% (v : v) (3). Les oligosaccharides de chaque fraction (FNC 1,5 à FNC 15) sont isolés puis purifiés par chromatographie sur papier Whatman 3 dans les systèmes solvants suivants : 1) alcool butylique/acide acétique/eau : 4/1/5 (v : v, pendant 1 à 4 jours) ; 2) acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau : 5/5/1/3 (v : v, pendant 1 à 2 jours). Une électrophorèse sur papier Whatman 3 (tampon borate de sodium à 1% de pH 9,2, 7 volts/cm, 4 heures) est parfois nécessaire pour obtenir certains oligosaccharides à l'état pur, lesquels sont purifiés par passage sur une petite colonne de charbon éluée ensuite par une solution aqueuse d'éthanol à 50%.

4 - Composition molaire en sucres des oligosaccharides

La composition molaire des oligosaccharides a été déterminée par la méthode de ZANETTA (101) : chaque oligosaccharide est

méthanolysé par l'acide chlorhydrique 0,5N pendant 24 heures à 100°C, séché sous azote et trifluoroacétylé dans le mélange anhydride trifluoroacétique/dichlorométhane (1 : 1) pendant deux fois 5 minutes à 150°C. Les dérivés trifluoroacétylés des sucres sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : colonne de verre (0,3x300 cm) garnie de Varaport 30 enrobé d'OV 210 à 5% ; programmation de température de 110 à 210°C à raison de 1°C par minute ; débit d'azote : 7,5 ml par minute.

5 - Détermination de la structure des oligosaccharides par la méthode de la méthylation

La structure des oligosaccharides a été déterminée par la méthode décrite par FOURNET (31). Les oligosaccharides sont d'abord perméthylés selon la méthode de HAKOMORI (38) : l'oligosaccharide anhydre (1 à 2 mg) est dissout dans le diméthylsulfoxide (1 ml) dans un bain ultrasonique pendant quelques minutes ; une solution de méthylsulfinylcarbanion (0,5 ml) est alors ajoutée et le mélange de nouveau soumis à sonication pendant 30 minutes avant l'introduction de l'iodure de méthyle (1 ml). La méthylation s'effectue alors pendant 1 heure sous azote et sous sonication. L'oligosaccharide méthylé est repris par 10 ml de chloroforme ; la solution chloroformique est purifiée par 3 fois 5 ml d'eau distillée puis séchée sur sulfate de sodium et concentrée. Pour terminer la purification, les oligosaccharides sont passés sur microcolonne de Silicagel (Kieselgel 70-325 mesh, Darmstadt) : la colonne de silice est d'abord lavée par 10 ml de chloroforme puis les oligosaccharides élués

sélectivement par 10 ml du mélange chloroforme/méthanol 95/5 (v : v) (100). Les oligosaccharides réduits sont ensuite hydrolysés par l'acide chlorhydrique 4N pendant 4 heures à 100°C puis soumis à une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9 qui permet d'effectuer la séparation des monosaccharides neutres (fraction neutre) et des osamines (fraction basique). Ces fractions sont analysées en chromatographie en phase gazeuse : colonne de verre (0,3x300 cm) remplie de Chromosorb W-AW HMDS enrobé de 3% de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 170°C ; débit d'azote : 30 ml par minute.

6 - Préparation des oligosaccharides sous la forme de méthylglycosylalditols perméthylés

Les différents oligosaccharides isolés ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse sous forme de méthylglycosylalditols perméthylés.

Avant d'être perméthylés selon le protocole de HAKOMORI décrit page 125 , les oligosaccharides sont réduits comme suit : 1 mg d'oligosaccharide est dissout dans 5 ml d'eau distillée à laquelle on ajoute ensuite 10 mg de borodeutérure de sodium ; la réduction se réalise ainsi pendant une nuit à la température du laboratoire. La réaction terminée, la solution est amenée à pH 4 à l'aide de Dowex 50x8 (25-50 mesh, forme H^+), filtrée puis concentrée. L'acide borique en excès est éliminée par codistillation sous vide avec le méthanol. L'alditol est repris par de l'eau puis lyophilisé.

7 - Chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosyl-alditols perméthylés

Les dérivés des oligosaccharides sont analysés en chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : appareil Varian Aérograph 2100 ; colonne de verre (0,3x100 cm) remplie de Supelcoport enrobé de Dexil 300 à 1% (p : p) ; température de l'injecteur : 200°C, du détecteur : 300°C ; débit de gaz vecteur (azote) : 40 ml/par minute ; programmation de température de 150 à 300°C à raison de 4°C/par minute pour les di- et trisaccharides, de 200°C à 300°C à raison de 4°C par minute pour les tétrasaccharides. Les temps de rétention ont été calculés par rapport au maltotriose réduit et perméthylé dans les conditions décrites ci-dessus. Les oligosaccharides ont également été analysés en mélange dans les conditions très similaires : les di- et trisaccharides sont séparés sur colonne (0,3x300 cm) remplie de Dexil 300 à 1% en programmation de température de 200° à 320°C à raison de 2°C par minute ; les conditions d'élution précédemment décrites pour l'analyse des tétrasaccharides ont été reprises pour obtenir la séparation des tri- et tétrasaccharides.

8 - Spectrométrie de masse des oligosaccharides

Chaque oligosaccharide a été analysé en spectrométrie de masse par introduction directe et par couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (appareil Girdell) dans les conditions décrites plus haut. Les tétrasaccharides et le pentasaccharide n'ont pu être étudiés que par introduction directe. L'analyse est réalisée sur un spectromètre de masse magnétique AEI-MS-30. Les

conditions de l'ionisation par impact électronique sont les suivantes : énergie d'ionisation : 30 eV ; courant d'ionisation : 100 µA (microampères) ; tension d'accélération : 4 kV ; température de la source : 150°C. Celles de l'ionisation chimique sont comme suit : gaz ionisant : isobutane ; pression du gaz ionisant : 1 torr ; température de la source : 150, 200°C ; courant d'ionisation : 500 µA.

B - APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLYCOPEPTIDE GP V-5 DE L'OROSOMUCOÏDE

1 - Préparation du glycopeptide GP V-5

Le glycopeptide GP V-5 a été isolé de l'orosomucoïde selon le procédé de SCHMID et coll. (89) ; il est l'un des 26 glycopeptides qui ont été obtenus à partir de l'orosomucoïde et dont la préparation comporte un grand nombre d'étapes ; les auteurs voulaient obtenir des glycopeptides très purs afin de mieux définir les sites de fixation et la composition des différents glycannes.

a) hydrolyse chymotrypsique de l'orosomucoïde

Avant d'être soumis à la digestion chymotrypsique, l'orosomucoïde isolé du plasma humain a été préalablement désialylé (87) puis réduit et carboxyméthylé (51). L'hydrolyse enzymatique de l'orosomucoïde ainsi modifié (4,5 g) a lieu dans des conditions conventionnelles (rapport enzyme-substrat 1 : 50, pH : 8,2, 37°C, 3 heures). L'hydrolysat obtenu est lyophilisé, puis dissout dans 50 ml d'une solution d'acide acétique à 10 % et purifié sur Sephadex G-25 (colonne de 7,5x97 cm).

b) séparation des glycopeptides "chymotrypsiques"

Les différents glycopeptides sont d'abord fractionnés sur

Nous remercions Messieurs le Pr J. DEFAYE et C. BOSSO, du CERMAV de GRENOBLE, qui ont effectué les analyses de spectrométrie de masse (ionisation par impact électronique et ionisation chimique).

colonne de DEAE-Cellulose : la chromatographie donne trois fractions qui sont à leur tour fractionnées sur colonne de CM-Cellulose : chacune d'entre elles est ainsi subdivisée en une fraction homogène et une fraction hétérogène, laquelle est sous-fractionnée sur colonne de CM-Cellulose ou de Dowex 50 (200-400 mesh). Le critère d'homogénéité est défini par rapport à une électrophorèse à haut voltage (40 V/cm, 90 mn). Dix fractions sont obtenues, chacune d'entre elles recevant un chiffre romain (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, IIc, IIIa, IIIb, IV et V). D'après l'analyse des séquences en amino-acides, le nombre des fractions est ramené à cinq : Ia, Ib et Ic forment une fraction I, IIa, IIb, IIc une fraction II et IIIa et IIIb une fraction III. Ce chiffre vient confirmer ici le nombre de sites de glycosylation qui avaient été démontré antérieurement (50,88)

c) hydrolyse pronasique des fractions I à V

L'hydrolyse enzymatique a lieu dans les conditions suivantes : 200 mg d'une fraction glycopeptidique dans 5 ml d'une solution d'acétate de calcium 0,01M ajustée à pH 8 subissent l'action de 4 mg de pronase à 37°C pendant 4 jours sous agitation. L'hydrolysat est concentré puis soumis à une chromatographie sur colonne de Séphadex G-25 (colonne de 1,6x110 cm). La colonne est éluée par de l'acide acétique 0,1N, ce qui permet d'éliminer les acides aminés et les peptides. L'éluat est lyophilisé puis soumis à une nouvelle digestion pronasique. La fraction V est digérée une troisième fois dans un rapport enzyme:substrat 1:10.

d) séparation des glycopeptides "pronasiques"

Leur séparation est effectuée essentiellement selon le procédé de CUNNINGHAM et coll. (18) : 200 mg de chaque fraction

Nous remercions M. le Dr K. SCHMID, de l'Université de Médecine de BOSTON de nous avoir fourni les glycopeptides de l'orosomucoïde.

digérée par la pronase sont dissouts dans 3 ml de tampon formiate de pyridine 10^{-3}M de pH 2,8 puis élués sur colonne (2,2x105 cm) de Dowex 50x2 (200-400 mesh) équilibrée dans le même tampon. Les glycopeptides des fractions I, IV et V sont élués par 1,5 litre du tampon précédemment cité puis par 200 ml de tampon formiate de pyridine 0,30M de pH 5, alors que les glycopeptides des fractions II et III le sont par 0,9 litre de tampon formiate de pyridine 10^{-3}M pH 2,8, 0,9 litre du même tampon à une concentration de 0,3M à pH 2,8 puis 200 ml du même tampon à une concentration de 0,3M à pH 5. 26 glycopeptides ont ainsi été isolés, chacun d'entre eux étant identifié par un nombre arabe selon son ordre d'élution sur la colonne de Dowex 50 (figure 43 page 131).

2 - Composition molaire en sucres du glycopeptide GP V-5

Les rapports molaires des sucres du glycopeptide GP V-5 ont été déterminés par la méthode de ZANETTA (101) dont les conditions ont déjà été décrites page 124 .

3 - Structure du glycopeptide GP V-5

La structure du glycopeptide GP V-5 a été étudiée de trois manières différentes : par méthylation selon le protocole de FOURNET, par la résonance magnétique nucléaire et par l'acétolyse dont les produits sont analysés en spectrométrie de masse.

a) détermination par la méthode de la méthylation

Les conditions de la méthylation ont déjà été décrites page 125 .

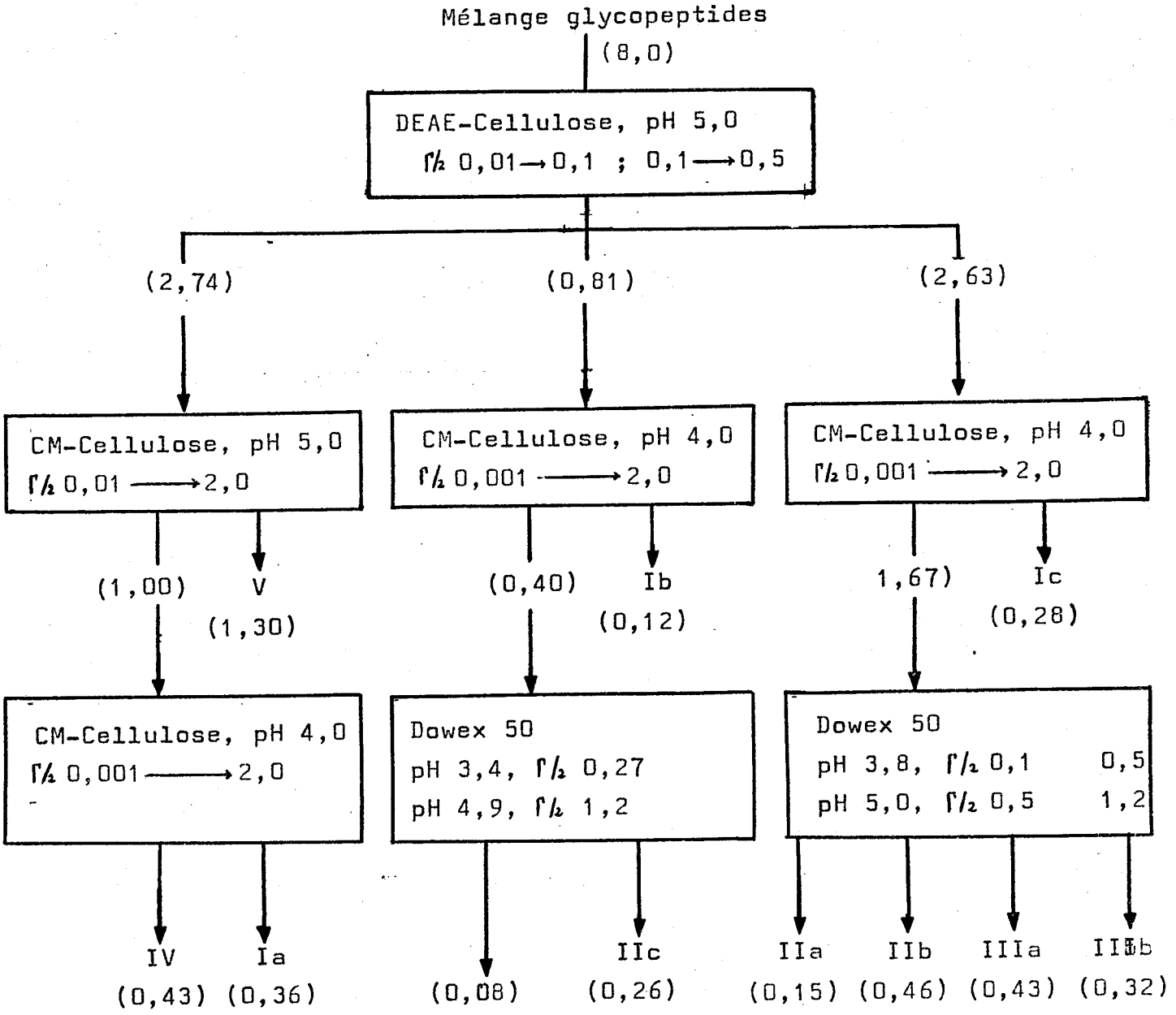


FIGURE 43

Isolement des glycopeptides "chymotrysiques" provenant de l'oroso-mucoïde désialylée, réduite et carboxyméthylée (selon SCHMID et coll. (89)). Les chiffres entre parenthèses indiquent les poids de chaque fraction (en grammes).

b) acétolyse du glycopeptide GP V-5 et fragmentométrie de masse des produits de son acétolyse

L'acétolyse de glycopeptide a été réalisée à petite échelle dans les conditions suivantes : 1 mg de glycopeptide rigoureusement anhydre est acétolysée par 1 ml du mélange acétolysant acide acétique/ anhydride acétique/eau : 10/10/1 pendant 3 jours sous agitation constante à la température du laboratoire. Le mélange réactionnel est alors déposé sur de la glace (5 ml) puis amené à pH 5 après décongélation par du carbonate acide de sodium en poudre. Les oligosaccharides peracétylés présents dans l'acétolysat sont extraits par le chloroforme puis désacétylés par une solution acétonique de soude 0,08M pendant 30 minutes à 4°C (73). La solution est ensuite désalée par addition de Dowex 50, forme H^+. L'acétolysat est alors réduit et perméthylé dans des conditions identiques à celles indiquées page

L'étude des produits d'acétolyse du glycopeptide GP V-5 a été effectuée par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse dans les conditions suivantes : chromatographie en phase gazeuse : sur colonne capillaire (0,4 mm x 25 m) enrobée d'une phase silicone SE-30 ; programmation de température : 230 à 280°C à raison de 3°C par minute ; débit du gaz vecteur (hélium) : 3 ml par minute ; spectrométrie de masse (spectromètre de masse Riber 1000) à une énergie d'ionisation de 70 eV. Les différents produits de l'acétolyse ont été détectés par la recherche des fragments de masse m/e 236, 260 et 277 qui correspondent aux résidus hexitol terminal neutre, hexosamine et hexosaminitol respectivement.

c) étude par résonance magnétique nucléaire

L'analyse en résonance magnétique nucléaire a été réalisée

Nous remercions Messieurs J.F.G. VLIEGENTHART, L. DORLAND et J. HAVERKAMP, de l'université d'UTRECHT, qui ont réalisé l'étude par résonance magnétique nucléaire.

sur un appareil BRUCKER HX-360, à 360 mégahertz, opérant en transformées de FOURIER. Les glissements chimiques des protons hydrogène des oligosaccharides ont été mesurés par rapport au sel de sodium du 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate, à l'aide d'un témoin interne constitué d'acétone : δ = 2,225 ppm.

Avant d'être analysés, les oligosaccharides ont été préalablement traités par l'eau lourde (D_2O) de manière à obtenir un échange des hydrogènes mobiles des fonctions hydroxyles.

II - RESULTATS

A - ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE D'OLIGOSACCHARIDES APPARTENANT AUX STRUCTURES GLYCANNIQUES

1 - Préparation du glycopeptide β de l'ovomucoïde

Deux glycopeptides principaux, α et β, sont isolés de l'hydrolysat pronasique de l'ovomucoïde. Ils ont été étudiés par MONSIGNY et coll. (81).

2 - Acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde

Deux fractions (basique et neutre) sont obtenues à partir de la fraction chloroformique de l'acétolysat. Il ressort des études de ces fractions (2) que la fraction basique est composée de glycopeptides qui appartiennent à la partie interne du glycanne ; la fraction neutre qui est la plus importante (75 % du glycopeptide) contient la partie centrale du glycanne.

La fraction basique II isolée de la phase aqueuse est moins riche en glucides que la fraction basique I de la phase chloroformique et comprend la partie externe du glycanne.

3 - Isolement des oligosaccharides de la fraction neutre de de l'acétolysat

La chromatographie sur charbon de la fraction neutre de l'acétolysat, ainsi que les chromatographies sur papier et électrophorèse des fractions consécutives obtenues sur charbon ont permis d'isoler treize oligosaccharides différents.

4 - Structure des oligosaccharides

D'après les résultats de la composition molaire en sucres, de la méthylation et d'une analyse complémentaire de la masse moléculaire sur Séphadex G-25 (3), la nature et la structure des oligosaccharides a été définie (figure 44 page 136).

Parmi les treize oligosaccharides, se trouvent quatre disaccharides (A, B, C et D), cinq trisaccharides (E, F, G, H et I), trois tétrasaccharides (J, K et L) et un pentasaccharide (M). Les tétrasaccharides et le pentasaccharide ont une structure branchée ainsi que deux des trisaccharides.

De ces treize oligosaccharides, douze ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse. Le trisaccharide E n'a pu être retrouvé lors d'une acétolyse ultérieure du glycopeptide β de l'ovomucoïde.

5 - Chromatographie en phase gazeuse des oligosaccharides

Les résultats de la séparation des oligosaccharides sont rassemblés dans le tableau III page 138 et la figure 45 page 137. Des chromatogrammes obtenus, on peut observer une très bonne séparation des disaccharides (A, B, C, et D) et des trisaccharides (F, G, H et I) ;

les tétrasaccharides se sont élués et n'apparaissent séparés que lorsque la température de départ est 200°C. L'impossibilité de les obtenir avec une température de départ plus basse (inférieure) peut s'expliquet par la dégradation probable de ces composés due à un séjour trop prolongé dans la colonne. Nous n'avons pu par contre obtenir de cette façon l'élution du pentasaccharide M.

6 - Détermination de la structure des oligosaccharides par spectrométrie de masse.

Les momenclatures utilisées lors de l'interpétration des spectres de masse sont celles qui sont employées dans la littérature (64 , 68 , 74).

a) analyse des spectres de masse des oligosaccharides après ionisation par impact électronique

Les oligosaccharides sont revus selon le nombre d'unités monosaccharidiques qui les composent. Les spectres de masse des di-, tri- et tétrasaccharides sont présentés dans les figures 46, 48 ,49 pages 142 ,147,152 respectivement.

DISACCHARIDES

L'analyse de cette classe se limite à l'observation des pics correspondant à la fragmentation du monosaccharide non réducteur et à celle du monosaccharide réducteur : ils déterminent rapidement la nature de chaque sucre, de même que la liaison entre les deux sucres. Le monosaccharide non réducteur est acractérisé par les fragments de la série aA alors que le monosaccharide réducteur l'est par ceux de la série "ald" dont l'origine peut être double : ils peuvent être formés par la cassure primaire de la liaison glycosidique

Oligosaccharide A : β-GlcNAc-(1⟶4)-Man

Oligosaccharide B : β-Gal-(1⟶4)-GlcNAc

Oligosaccharide C : β-GlcNAc-(1⟶2)-Man

Oligosaccharide D : α-Man-(1⟶3)-Man

Oligosaccharide F :
β-GlcNAc-(1⟶2)
β-GlcNAc-(1⟶4) → Man

Oligosaccharide G : β-GlcNAc-(1⟶4)- -Man-(1⟶3)-Man

Oligosaccharide H : β-GlcNAc-(1⟶2)- -Man-(1⟶3)-Man

Oligosaccharide I :
α-Man-(1⟶3)
β-GlcNAc-(1⟶4) → Man

Oligosaccharide J :
β-GlcNAc-(1⟶2)-α-Man-(1⟶3)
β-GlcNAc-(1⟶4) → Man

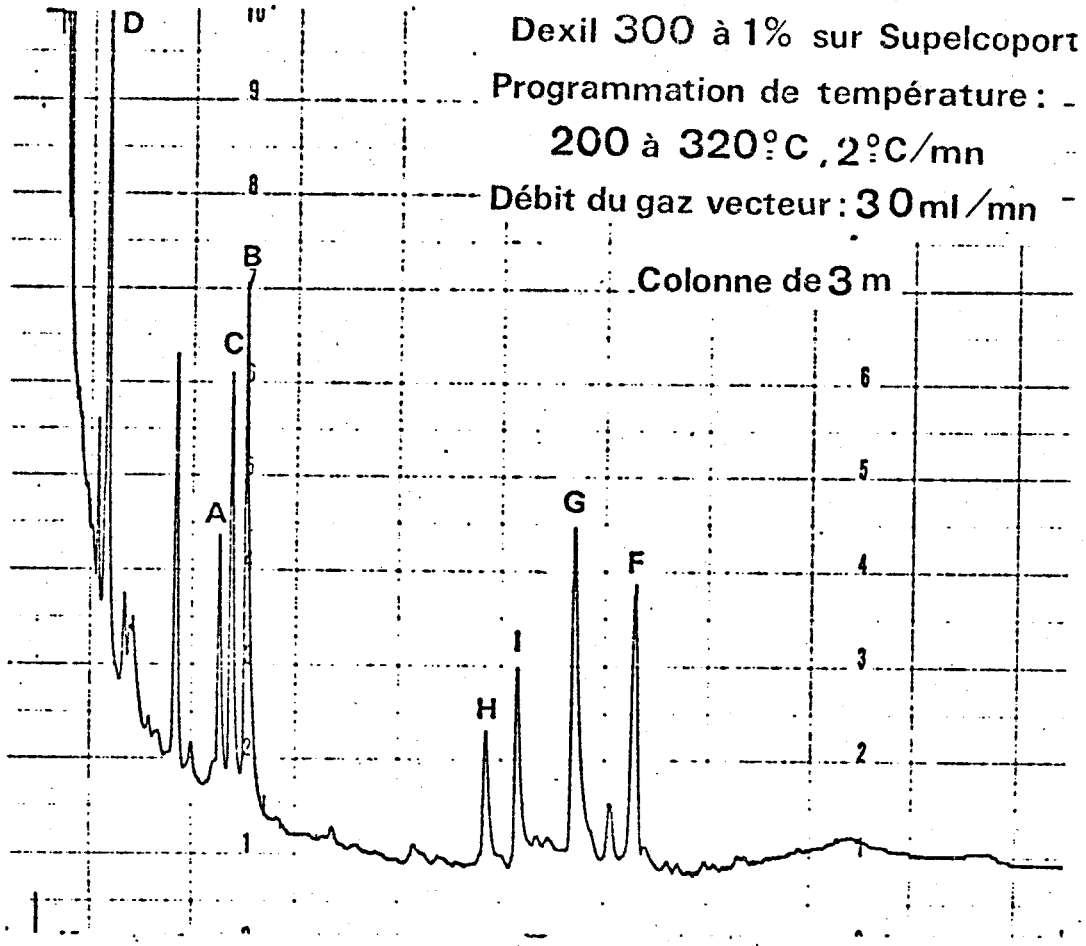
Oligosaccharide K :
β-GlcNAc-(1⟶2)
β-GlcNAc-(1⟶4)-α-Man-(1⟶3) → Man

Oligosaccharide L :
β-GlcNAc-(1⟶4)-α-Man-(1⟶3)
β-GlcNAc-(1⟶4) → Man

Oligosaccharide M :
β-GlcNAc-(1⟶2)
β-GlcNAc-(1⟶4)-α-Man-(1⟶3)
β-GlcNAc-(1⟶4) → Man

FIGURE 44

Structure des différents oligosaccharides obtenus après acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde (BAYARD et coll. (3)).



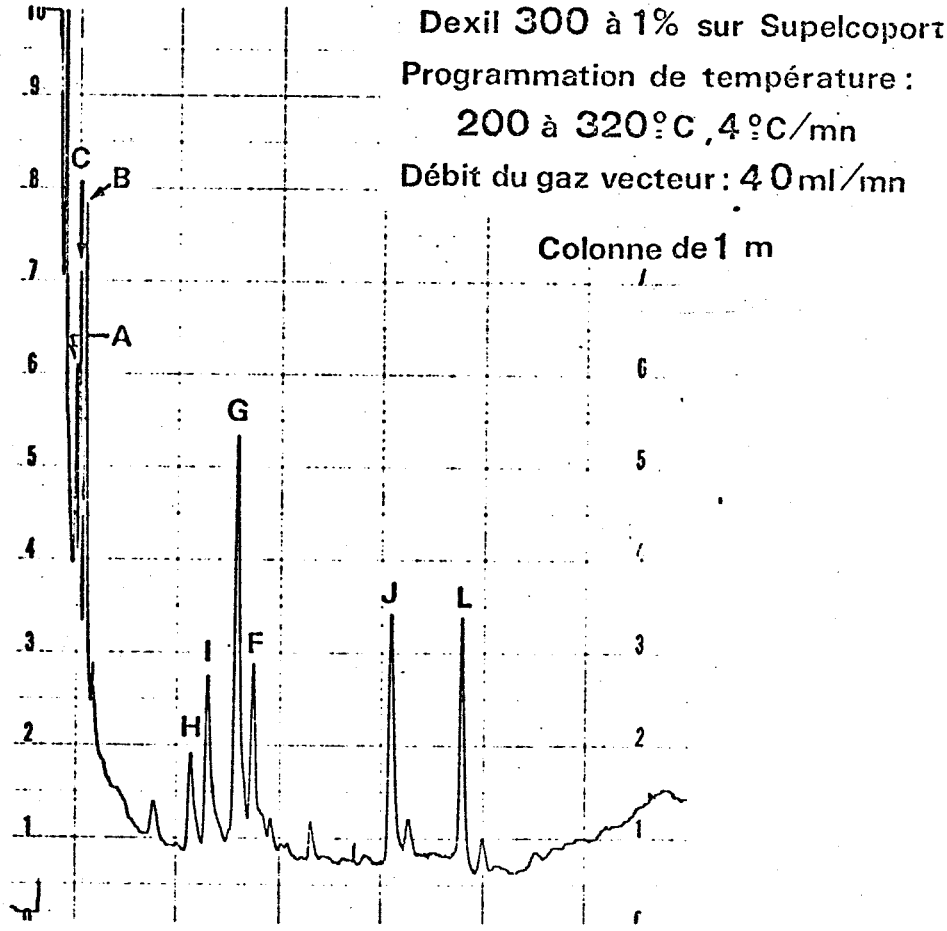


FIGURE 45

Chromatographie en phase gazeuse des oligosaccharides issus de l'acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde.

TABLEAU III

Temps de rétention des oligosaccharides obtenus après acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde (conditions de la chromatographie en phase gazeuse indiquées page 127).

Oligosaccharides	Temps de rétention*
A	0,64
B	0,71
C	0,68
D	0,31
F	1,56
G	1,33
H	1,18
I	1,22
J	3,03
K	-
L	3,76
M	-

* les temps de rétention ont été calculés par rapport à celui du maltotriose réduit et perméthylé.

ou provenir de la voie de fragmentation D comme l'ont indiqué KOVACIK et coll. (68).

Disaccharide A

La structure de ce disaccharide (O-β-D-GlcNAc-(1⟶4)-D-Mannitol) est déterminée par les fragments de la série aA (aA_1 : m/e 260 ; aA_2 : m/e 228 ; aA_3 : m/e 196) qui indiquent un résidu hexosamine en position non réductrice et les fragments "ald" ("ald" : m/e 236 ; "ald-32" : m/e 204) qui caractérisent un résidu hexitol. Les fragments de masse m/e 129 et m/e 142 confirment le résidu hexosamine en position non réductrice ; ils sont les analogues des fragments H_1^1 et F_1^2 de masse m/e 88 et 101 qui sont définis dans les spectres des monosaccharides neutres méthylglycosylés. La présence des fragments m/e 89 et m/e 134, liée à l'absence du fragment m/e 133, détermine une liaison glycosidique de type 1⟶4 entre les deux sucres, ainsi que le fragment de masse m/e 422 (M-30). Un fragment de masse m/e 186, relativement abondant, est observé. On le retrouve régulièrement dans les spectres de masse d'autres oligosaccharides où une osamine se situe en position terminale non réductrice. Il provient du fragment aA_2 de masse m/e 228 qui perd une molécule de cétène : cette fragmentation est appuyée par l'observation d'un pic métastable (m^*=152). Le mécanisme impliqué ici est identique à celui indiqué précédemment par BIEMANN et coll. (5) lors de leur étude sur les monosaccharides perméthylés ; il a déjà été présenté (voir page 51). Le fragment de masse m/e 186 peut conduire à son tour à la formation du fragment m/e 154 par perte de méthanol.

Disaccharide B

Le spectre de masse du disaccharide B (O-β-D-Gal-(1⟶4)-2-acétamido-2-déoxy-D-glucitol) est très différent de celui du disaccharide A : la séquence Gal⟶2-acétamido-2-déoxy-glucitol est confirmée par la masse des fragments aA (aA_1 : m/e 219 ; aA_2 : m/e 187 ; aA_3 : m/e 155) qui dérivent du résidu galactose non réducteur et celle des fragments "ald" ("ald" : m/e 277 ; "ald-32" : m/e 245) provenant du résidu hexosaminitol. On peut constater l'absence attendue des fragments de masse m/e 129 et m/e 142 normalement remplacés par les fragments analogues de masse m/e 88 et m/e 101 caractéristiques du résidu hexose neutre. Les fragments de masse m/e 131 (fragment secondaire m/e 89 par perte de cétène) et m/e 175 (fragment secondaire m/e 143 par élimination de méthanol) sont aussi en faveur de la position réductrice du résidu 2-acétamido-2-déoxy-glucitol. Le dernier fragment, ainsi que les ions de masse m/e 381 (M-131) et 423 (M-89), permettent de déterminer la liaison 1⟶4 entre les deux monosaccharides. Un ion de masse moléculaire, m/e 512, lequel fournit probablement l'ion de masse m/e 481 par perte de méthanol, est également observé.

Disaccharide C

Le spectre de masse du disaccharide C (O-β-D-GlcNAc-(1⟶2)-D-Mannitol) présente de nombreuses analogies avec celui du disaccharide A : les fragments de masse m/e 260, m/e 228 et m/e 196 (série aA) indiquent un résidu hexosamine non réducteur et les fragments de masse m/e 236, m/e 204 (série "ald") un résidu hexitol. Les disaccharides A et C, qui ne diffèrent que par la liaison glycosidique peuvent être distingués par les fragments de la chaîne carbonée de

peuvent être distingués par les fragments de la chaîne carbonée de l'alditol, de masse m/e 177 et 379 (M-133) ; ceux-ci se décomposent et donnent par perte de méthanol les fragments m/e 143 et 347 respectivement.

Disaccharide D

Le disaccharide D (O-α-D-Man-(1⟶3)-D-Mannitol) présente dans son spectre de masse les fragments m/e 219, m/e 187 et m/e 155 (série aA) et les fragments m/e 236, m/e 204 (série "ald") qui sont en faveur d'une séquence Man⟶Mannitol. La liaison glycosidique de type 1⟶3 est confirmée par la présence des fragments m/e 133 et m/e 382 (M-89).

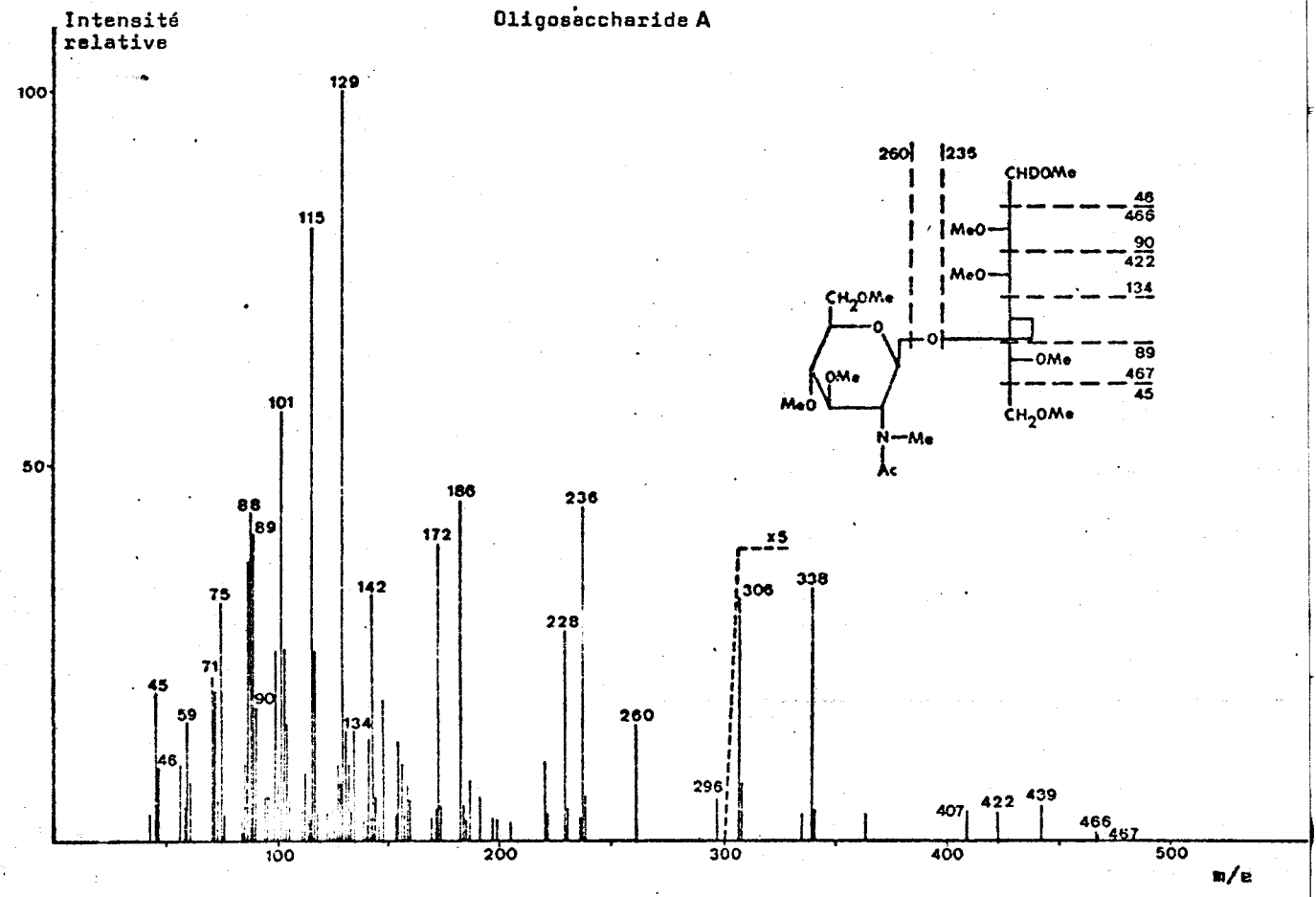
TRISACCHARIDES

L'unité monosaccharide supplémentaire ne modifie pas la fragmentation générale : les séries aA et ald renseignent toujours sur la nature des monosaccharides non réducteurs et réducteurs respectivement de même que les fragments issus de la chaîne de l'alditol sur la nature de la liaison entre l'alditol et le monosaccharide qui lui est lié. Cependant, parmi les nouveaux fragments de masse plus élevée qui apparaissent, certains vont être très utiles à la détermination de la séquence des sucres. Ils appartiennent aux séries A : les fragments baA indiquent la séquence des deux premiers sucres, les fragments baldA celle des deux derniers. Ces deux séries permettent également de connaître la liaison a⟶b lorsque l'on compare l'intensité de leurs différents fragments. Le fragment de la série J, $baldJ_1$, permet de caractériser aussi la

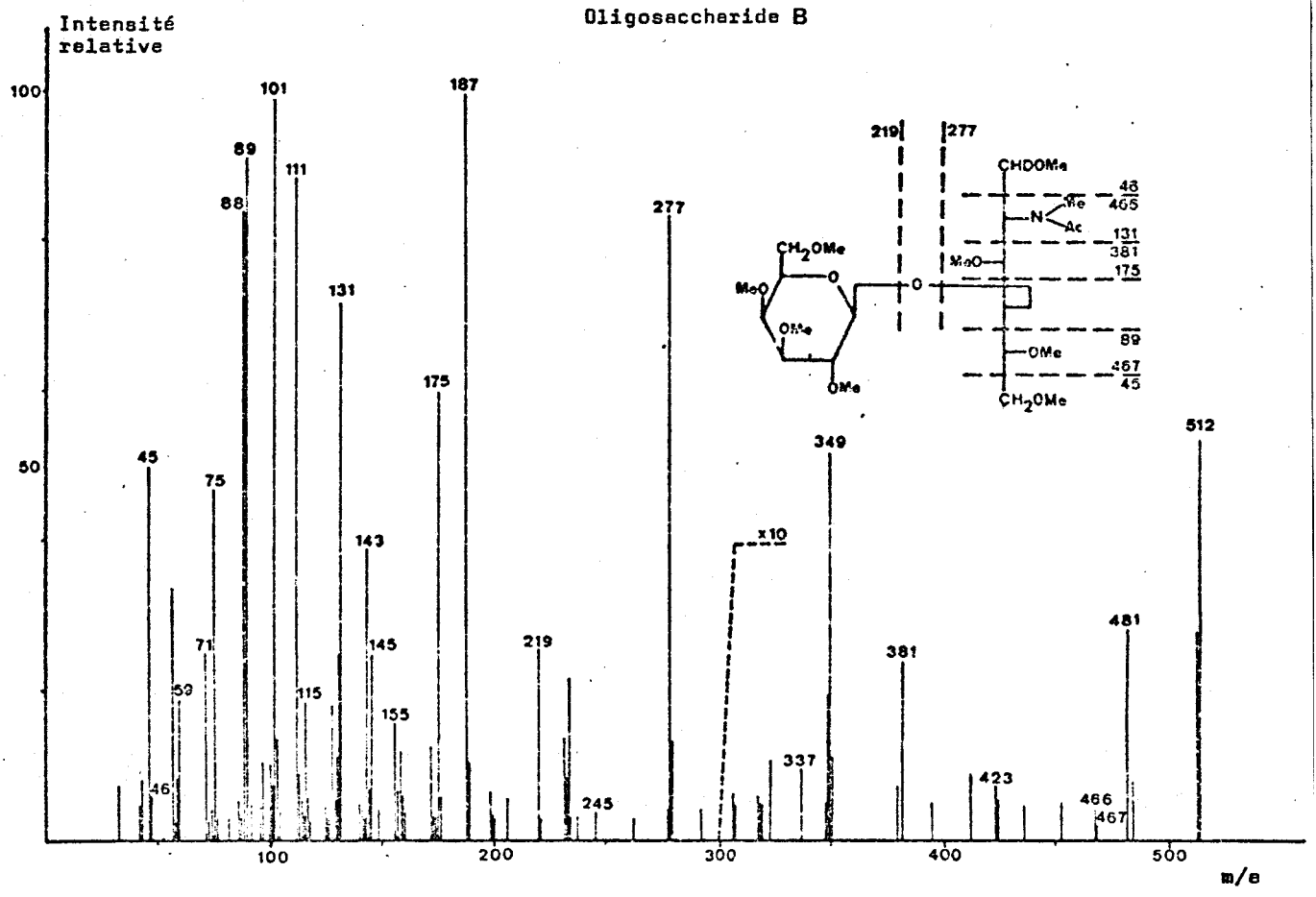
FIGURE 46

Spectres de masse obtenus après impact électronique des disaccharides A à D.

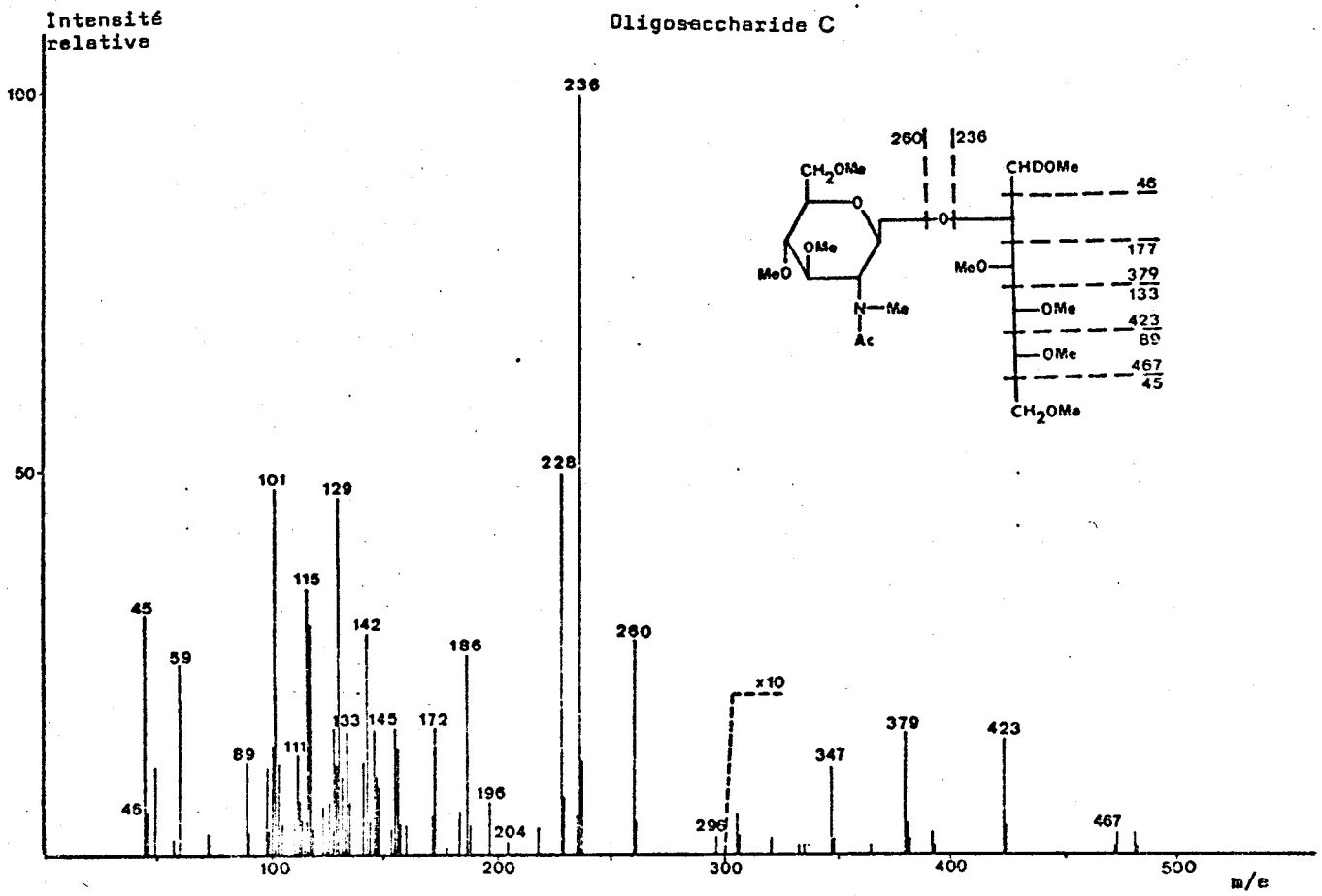
Oligosaccharide A



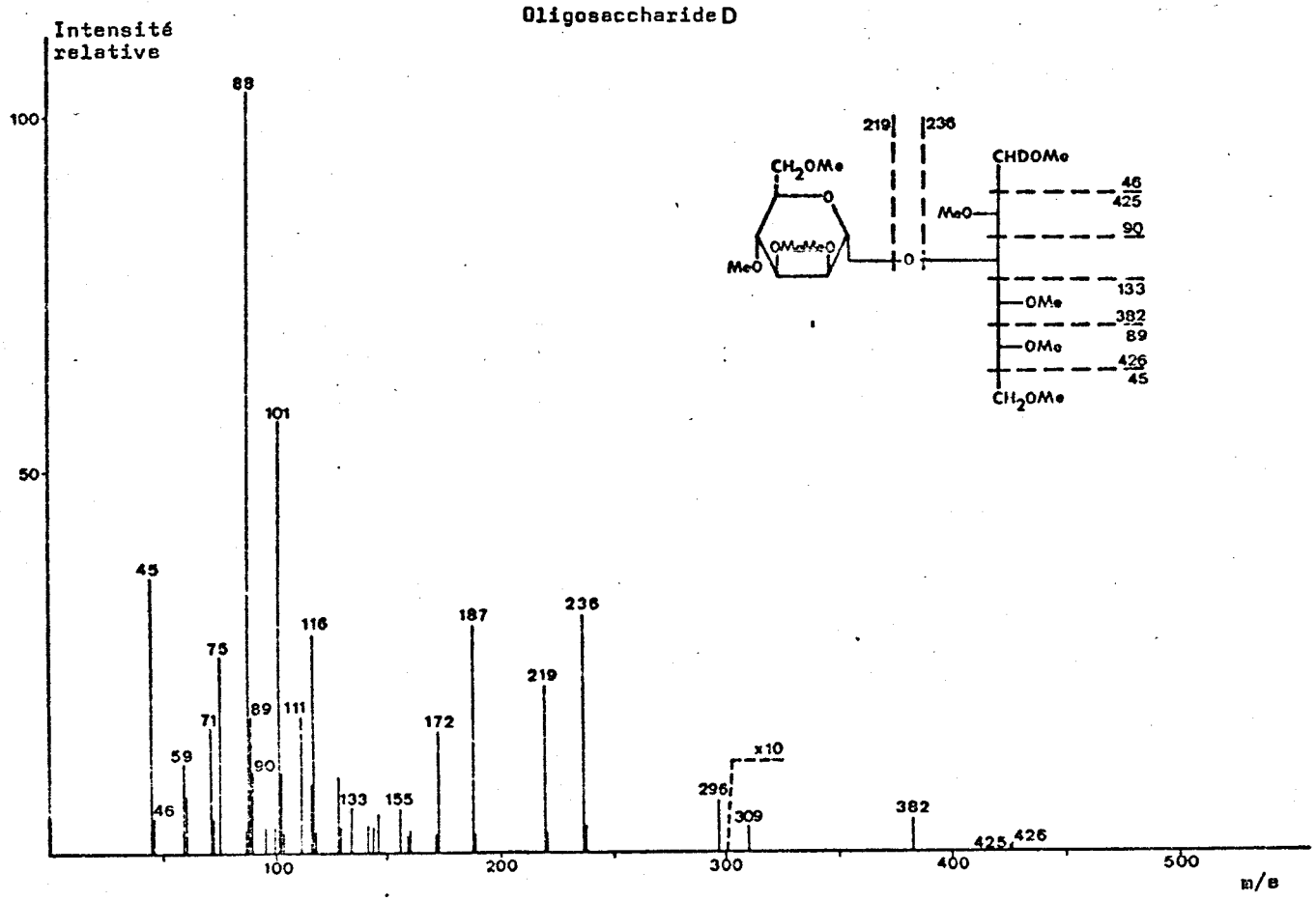
Oligosaccharide B



Oligosaccharide C



Oligosaccharide D



liaison a⟶b.

Trisaccharide F

Le spectre de masse de ce trisaccharide (O-β-D-GlcNAc-(1⟶4)-O-[β-D-GlcNAc-(1⟶2)]-D-Mannitol) est simple et dépouillé. Les ions de la série aA de masse m/e 260 (aA_1), m/e 228 (aA_2) et m/e 196 (aA_3) caractérisent un résidu hexosamine non réducteur. Aucun ion de la série ald n'est présent, ce qui laisse supposer une structure branchée (59). Celle-ci est confirmée par la présence de l'ion de masse m/e 481. Un autre fragment abondant est observé : il a pour masse 250. Sa présence semble être associée à la structure branchée car il apparaît dans le spectre de masse des autres oligosaccharides branchés (I, J, L) ; toutefois son intensité est très importante lorsque les liaisons glycosidiques sont contractées avec deux carbones adjacents de la chaîne du sucre réducteur. Le fragment de masse m/e 481 ne semblant suivre aucune autre dégradation, un mécanisme l'incluant dans la formation de l'ion m/e 250 est proposée (figure 47 page 144).

Trisaccharide G

Outre les ions de la série aA (aA_1 : m/e 260 ; aA_2 : m/e 228 ; aA_3 : m/e 196) et les ions de la série "ald" ("ald" : m/e 236 ; ald-32 : m/e 204) de forte intensité et caractéristiques respectivement d'un résidu hexosamine non réducteur et d'un résidu hexose réducteur, la structure du trisaccharide G (O-β-D-GlcNAc-(1⟶4)-O-α-D-Man-(1⟶3)-D-Mannitol) a pu être établie par la présence des ions de la série baA (baA_1 : m/e 464 ; baA_2 : m/e 432 ; baA_3 : m/e 400) en

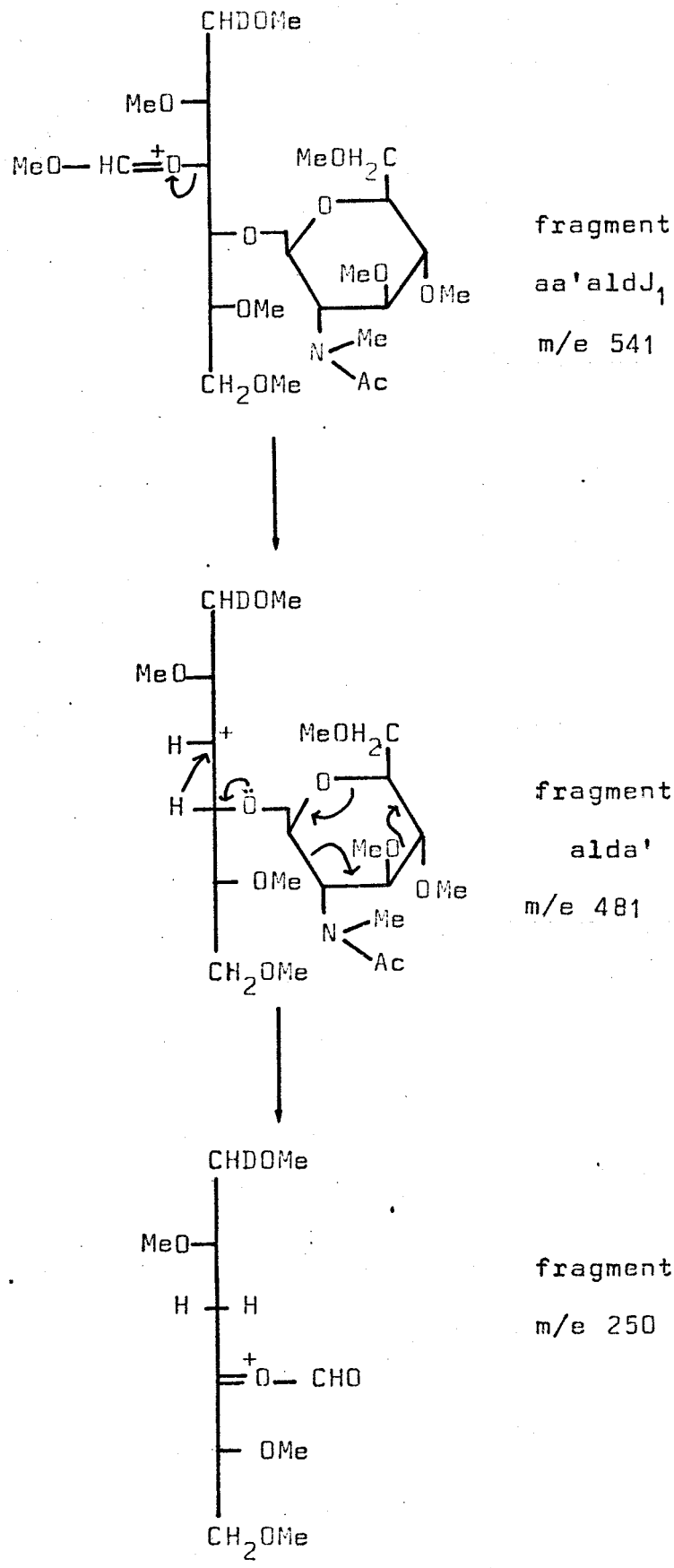


FIGURE 47

Hypothèse de formation de l'ion m/e 250.

faveur de la séquence GlcNAc⟶Man et celle des ions de la série baldA ($baldA_1$: m/e 440 ; $baldA_2$: m/e 408 ; $baldA_3$: m/e 376) en faveur d'une séquence Man⟶Mannitol. En ce qui concerne la liaison a⟶b, la possibilité d'une liaison de type 1⟶3 est exclue en raison de la présence du fragment de masse m/e 296 ($baldJ_1$) dont la formation fait intervenir le groupement méthyl du carbone C_3 du sucre central (64). D'autre part, la prédominance des ions de la série baldA sur ceux de la série baA oriente vers une liaison de type 1⟶4 ou 1⟶6 de préférence à une liaison de type 1⟶2 (60). Enfin, la liaison 1⟶4 est caractérisée par l'intensité décroissante des ions de la série baldA (de $baldA_1$ à $baldA_3$) (74). La liaison entre les deux derniers sucres de type 1⟶3 est déterminée par la présence des fragments de masse m/e 133 et m/e 627 (M-89).

Trisaccharide H

Le trisaccharide H (O-β-D-GlcNAc-(1⟶2)-O-α-D-Man-(1⟶3)-D-Mannitol) ne diffère du trisaccharide G que par la liaison a⟶b. Cette différence peut être appuyée par les observations suivantes : les fragments baA_2 et $baldA_2$ sont prédominants à l'intérieur de leurs séries sans doute à cause de l'élimination peu favorable d'une deuxième molécule de méthanol ; la même observation peut être faite à la lecture du spectre de masse du tétrasaccharide J. Le fragment de masse m/e 88 (H_1^1) est ici d'intensité relativement faible, alors qu'il est très important dans le spectre de masse du trisaccharide G ; ceci est en accord avec les observations de KÄRKKÄINEN (60). La liaison entre les deux derniers sucres de type 1⟶3 se caractérise exactement comme celle du trisaccharide précédent par les fragments

m/e 133 et m/e 627 et par l'absence du fragment m/e 134 caractéristique d'une liaison de type 1⟶4.

Trisaccharide I

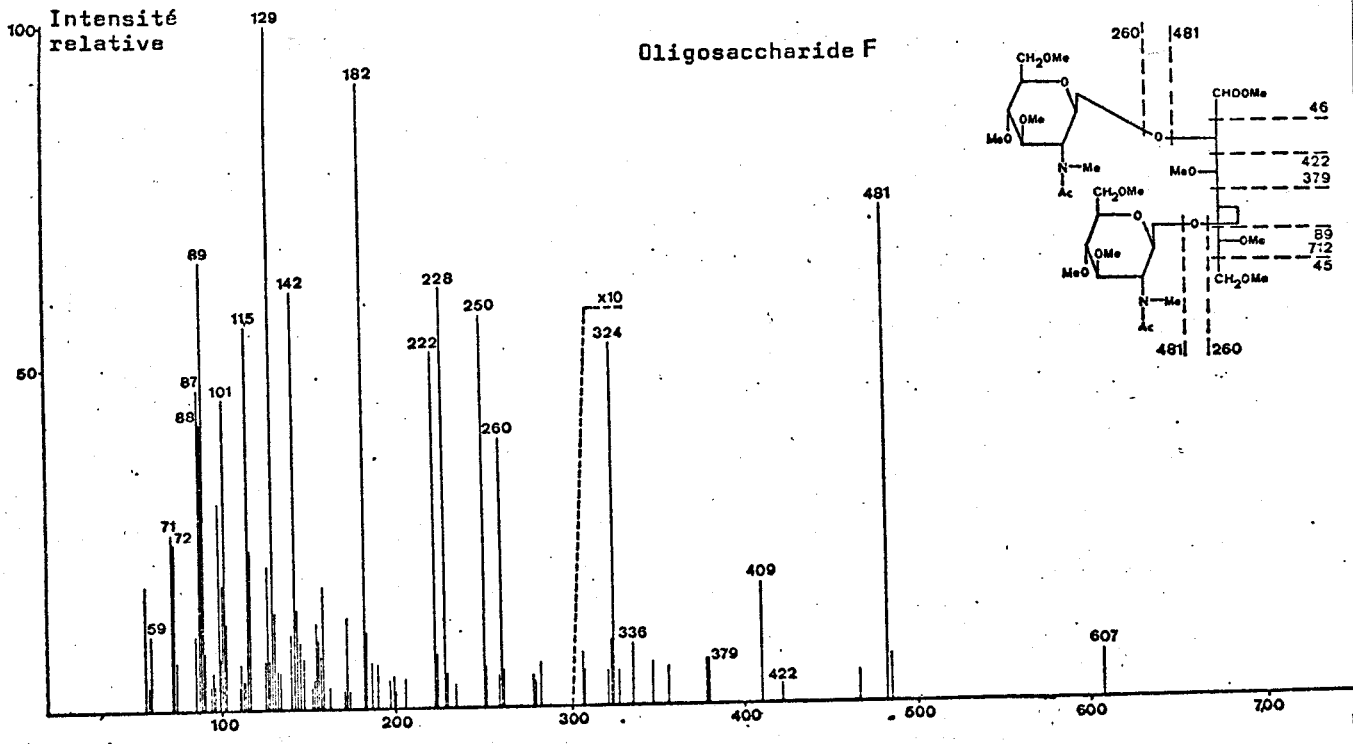
Les ions de la série aA (aA_1 : m/e 219 ; aA_2 : m/e 187 ; aA_3 : m/e 155) et les ions de la série a'A ($a'A_1$: m/e 260 ; $a'A_2$: m/e 228 ; $a'A_3$: m/e 196) indiquent respectivement un résidu hexose et un résidu hexosamine, tous deux en position non réductrice, ce qui constitue une preuve indirecte de la structure branchée du trisaccharide I (O-α-D-Man-(1⟶3)-O-[β-D-GlcNAc-(1⟶4)]-D-Mannitol). Ceci n'était pas visible dans le cas du trisaccharide F où les deux sucres non réducteurs étaient de même nature empêchant par conséquent de déduire la structure linéaire ou ramifiée du trisaccharide. Les ions aald de masse m/e 440 ("ald") et m/e 408 (aald-32) et le fragment alda' de masse m/e 481, caractéristiques des séquences Man⟶Mannitol et GlcNAc⟶Mannitol confirment la structure branchée de même que l'absence des ions de la série "ald" et des ions m/e 133 et m/e 134 spécifiques des liaisons 1⟶3 et 1⟶4 respectivement. L'ion de masse m/e 250 est présent ; son intensité est importante et suppose deux liaisons glycosidiques adjacentes sur les carbones C_3 et C_4 de l'alditol.

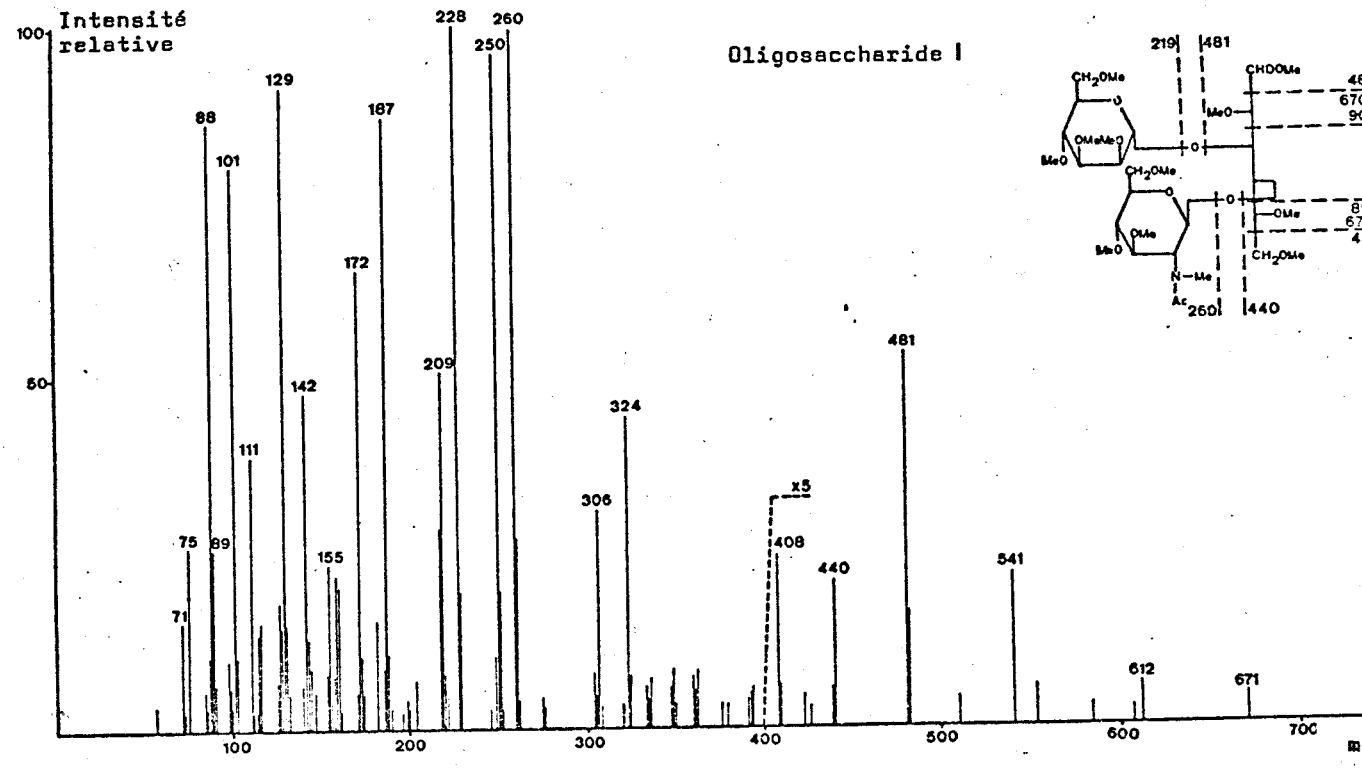
TETRASACCHARIDES

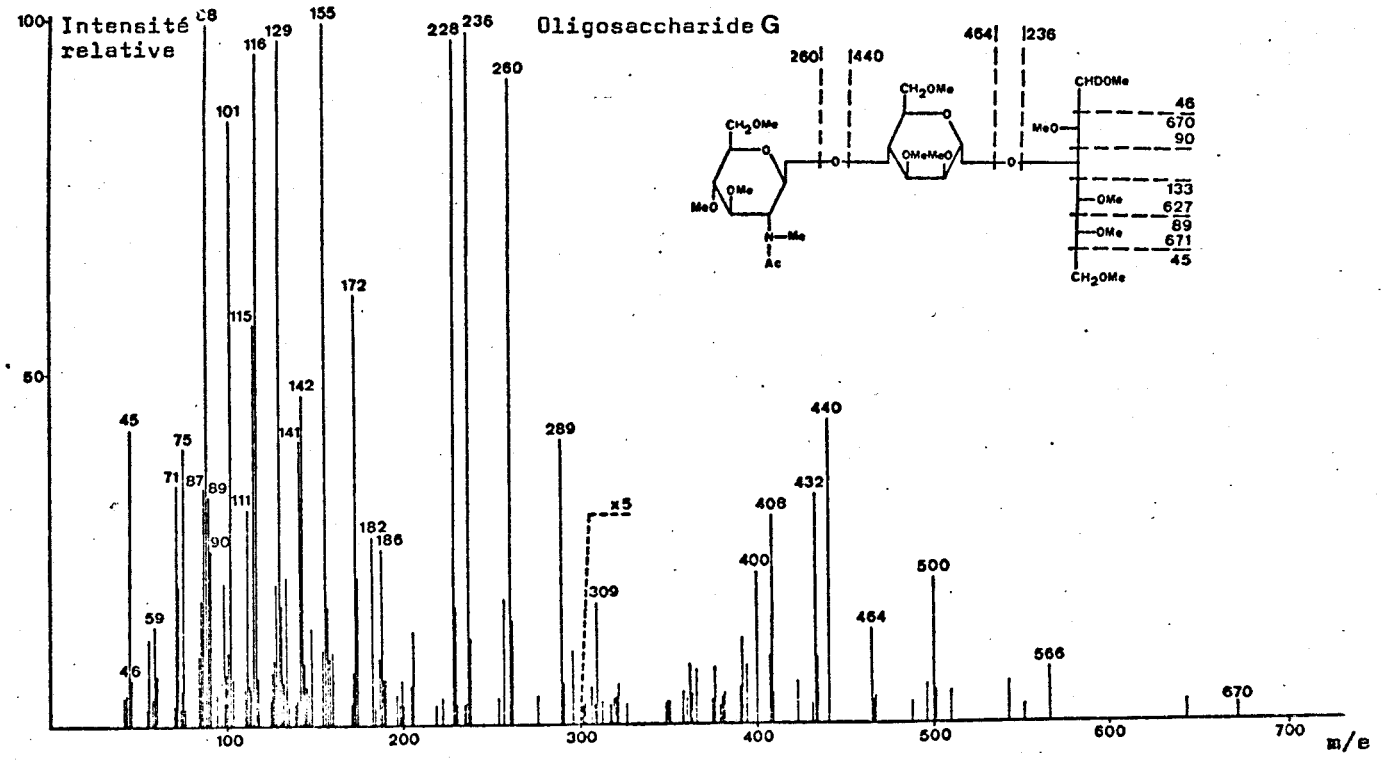
Ces oligosaccharides ont été analysés en spectrométrie de masse par introduction directe. Les ions des différentes séries A constituent encore la majeure partie des renseignements qui aident à déterminer la structure des oligosaccharides (nature de mono-

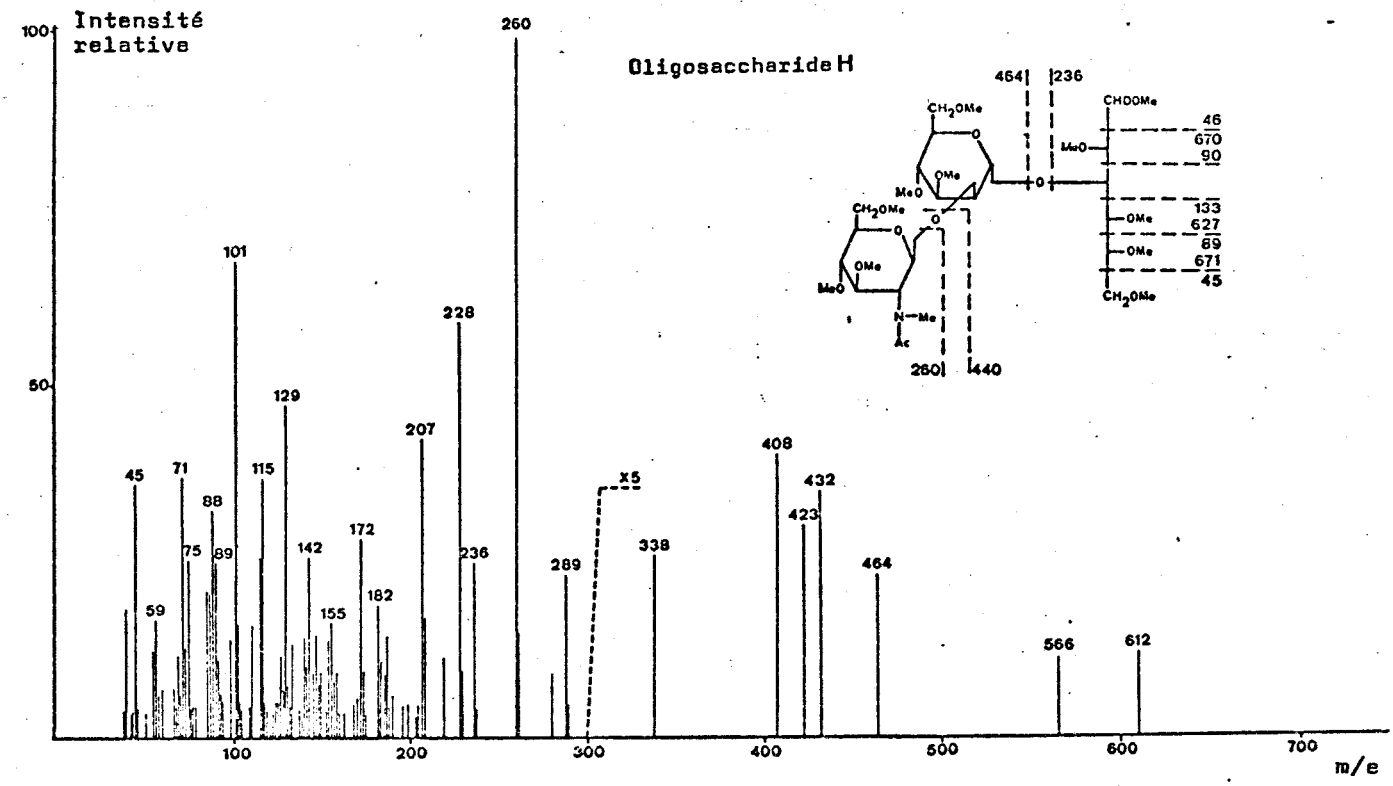
FIGURE 48

Spectres de masse obtenus après impact électronique des trisaccharides F à I.


Intensité relative
Oligosaccharide F
100
50
129
182
89
142
228
250
115
222
x10
324
87
101
88
260
71
72
409
59
336
379
422
607
481
100
200
300
400
500
600
700
m
260
481
CH2OMe
CHDOMe
46
422
379
89
712
45
MeO
OMe
N—Me
Ac


Intensité relative
Oligosaccharide I
100
50
228
260
250
129
187
88
101
172
209
142
324
111
306
x5
75
89
155
408
440
481
541
71
612
671
100
200
300
400
500
600
700
m/
219
481
CH2OMe
CHDOMe
46
670
90
89
671
45
MeO
OMe
N—Me
Ac
260
440


Intensité relative
Oligosaccharide G
100
50
45
46
59
71
75
87
88
89
90
101
111
115
116
129
141
142
155
172
182
186
228
236
260
289
309
x5
400
408
432
440
464
500
566
670
100
200
300
400
500
600
700
m/e
260
440
464
236
CH2OMe
OMe
MeO
N—Me
Ac
OMeMeO
CHDOMe
46
670
90
133
627
89
671
45


Intensité relative
Oligosaccharide H
100
50
45
59
71
75
88
89
101
115
129
142
155
172
182
207
228
236
260
289
x5
338
408
423
432
464
566
612
100
200
300
400
500
600
700
m/e
464
236
CH2OMe
OMe
MeO
N—Me
Ac
260
440
CHDOMe
46
670
90
133
627
89
671
45

saccharides terminaux, séquence des monosaccharides et nature de la liaison entre les monosaccharides). De nouvelles séries A correspondant à des séquences de trois monosaccharides apparaissent et permettent de reconstituer le tétrasaccharide non seulement du point de vue de la séquence mais également du point de vue liaison entre sucres centraux.

Tétrasaccharide J

Le spectre de masse du tétrasaccharide J (O-β-D-GlcNAc -(1⟶2)-O-α-D-Man-O-[β-D-GlcNAc-(1⟶4)]-D-Mannitol) ne permet que la détermination d'un seul sucre en position non réductrice : la masse des fragments aA (m/e 260, m/e 228 et m/e 196) indique qu'il s'agit d'une hexosamine. L'absence des ions de la série "ald" (m/e 236 et m/e 204), la présence des ions m/e 481 et m/e 250 font penser à une structure branchée, l'ion de masse m/e 481 étant caractéristique également de la séquence GlcNAc⟶Mannitol. Les fragments de la série baA (baA_1 : m/e 464 ; baA_2 : m/e 432) en faveur de la séquence GlcNAc⟶Man et ceux de la série abald (abald : m/e 685 ; abald-32 : m/e 653) en faveur de la séquence GlcNAc⟶Man⟶Mannitol permettent de définir l'autre branche du tétrasaccharide. L'ion $abaldJ_1$ de masse m/e 745 élimine la possibilité d'une liaison a⟶b de type 1⟶3 entre les deux premiers sucres. La liaison, qui est de type 1⟶2, est déterminée par la prédominance de l'ion baA_2 dans la série baA et la faible intensité de l'ion m/e 88. Comme dans le cas des trisaccharides branchés, l'absence des ions m/e 133 et m/e 134 implique une structure branchée dans laquelle les deux branches glycosidiques sont liées sur les carbones C_3 et C_4 de l'alditol.

Tétrasaccharide K

Dans le spectre de masse du tétrasaccharide K (O-β-D-GlcNAc-(1⟶4)-D-[-β-D-GlcNAc-(1⟶2)]-O-α-D-Man-(1⟶3)-D-Mannitol), les ions de la série aA (m/e 260, m/e 228 et m/e 196) et les ions de la série "ald" (m/e 236, m/e 204) indiquent un résidu hexosamine non réducteur et un résidu hexitol respectivement . La présence de la série "ald" laisse suggérer que l'alditol n'est lié qu'avec un sucre uniquement, ce que confirme la présence de l'ion m/e 133 et l'absence des ions m/e 481 et 250. Elle implique également le branchement du quatrième sucre sur le sucre central. Ce type de structure est confirmé par l'absence des séries baldA et bcA, la présence des ions baaldA (m/e 685, $baaldA_2$: m/e 683) dont la masse est égale à ceux de la série ba'aldA, caractéristiques d'une séquence linéaire GlcNAc⟶Man⟶Mannitol possible après rupture de la liaison glycosidique avec un monosaccharide non réducteur et la présence des ions de la série baa'A ($baa'A_1$: m/e 709 ; $baa'A_2$: m/e 677). Il n'est pas possible de déterminer la nature des liaisons a⟶b et a'⟶b dans le cas de ce tétrasaccharide pour la raison suivante : les intensités des fragments m/e 685 et m/e 663 (685-32) qui aideraient à leur détermination sont la somme des intensités d'ions de même masse provenant de deux séries différentes (séries baaldA et ba'aldA). L'ion de masse m/e 133 implique par sa présence une liaison de type 1⟶3 ; celui de masse m/e 872 (M-89) n'est pas observé.

Tétrasaccharide L

La structure du tétrasaccharide L (O-β-D-GlcNAc-(1⟶4)-O- α

D-Man-O-[β-D-GlcNAc-(1⟶4)]-D-Mannitol) est voisine de celle du tétrasaccharide J ne se différenciant que par la liaison a⟶b qui est de type 1⟶4. Cette distinction est difficilement décelable à la lecture des spectres ; la comparaison de deux séries de fragments cependant permet d'y accéder. Les fragments de la série baA (m/e 464, m/e 432 et m/e 400) ont des intensités relatives en faveur d'une liaison 1⟶4 ; ensuite l'ion abaldJ$_1$ de masse m/e 745 est faible alors que l'ion de masse m/e 685 (abald) auquel il donne naissance est important ; il n'y a pas de fragment de masse m/e 653 qui peut se former à partir du fragment de masse m/e 685 par perte de méthanol. Cet ion de masse m/e 685 semble être très stable. Le cas inverse est observé dans le cas du tétrasaccharide J où les fragments cités (m/e 745, 685 et 653) ont une intensité décroissante. Les autres fragments abondants du spectre de masse caractérisent un résidu hexosamine non réducteur (m/e 260, 228 et 196), une séquence GlcNAc⟶Mannitol (m/e 481), une séquence GlcNAc⟶Man Mannitol (m/e 685, m/e 653) qui compose la deuxième branche.

Le spectre de masse du pentasaccharide M est toujours resté incomplet et n'apu par conséquent permettre son idenfication. Les intensités des principaux fragments des différents oligosaccharides sont rassemblées dans le tableau V de la page 154.

D' autres fragments sont généralement observés dans les différents spectres de masse ; leur présence semble être associée à la classe d'oligosaccharides analysée (di-, tri- et tétra-saccharides). On remarque tout d'abord des ions de masse M-150 : leurs masses sont 362, 566 et 811respectivement. Ils sont relativement intenses sauf dans le cas des disaccharides A et C. Le tri-

saccharide F possède un fragment analogue de masse m/e 607. Un mécanisme de formation de ces ions est proposé figure 50 page 153 ; il demande cependant confirmation (étude d'analogues deutérés et mesure exacte des masses des fragments). Il semblerait ne concerner que la fragmentation de l'osamine terminale non réductrice. Un ion de masse m/e 824 est régulièrement présent dans le spectre des tétra-saccharides ; une hypothèse de sa fragmentation n'a pu être avancée.

b) analyse des spectres de masse des oligosaccharides après ionisation chimique

L'ionisation chimique a été téntée sur les oligosaccharides obtenus à partir du glycopeptide β de l'ovomucoïde pour obtenir des spectres de masse plus simples et des informations complémentaires à celles de l'impact électronique. Ceci pouvait être envisagé car l'ionisation est créée par un milieu ionisant contrôlé et non provoquée par un choc qui donne naissance au départ à un grand nombre de fragments différents.

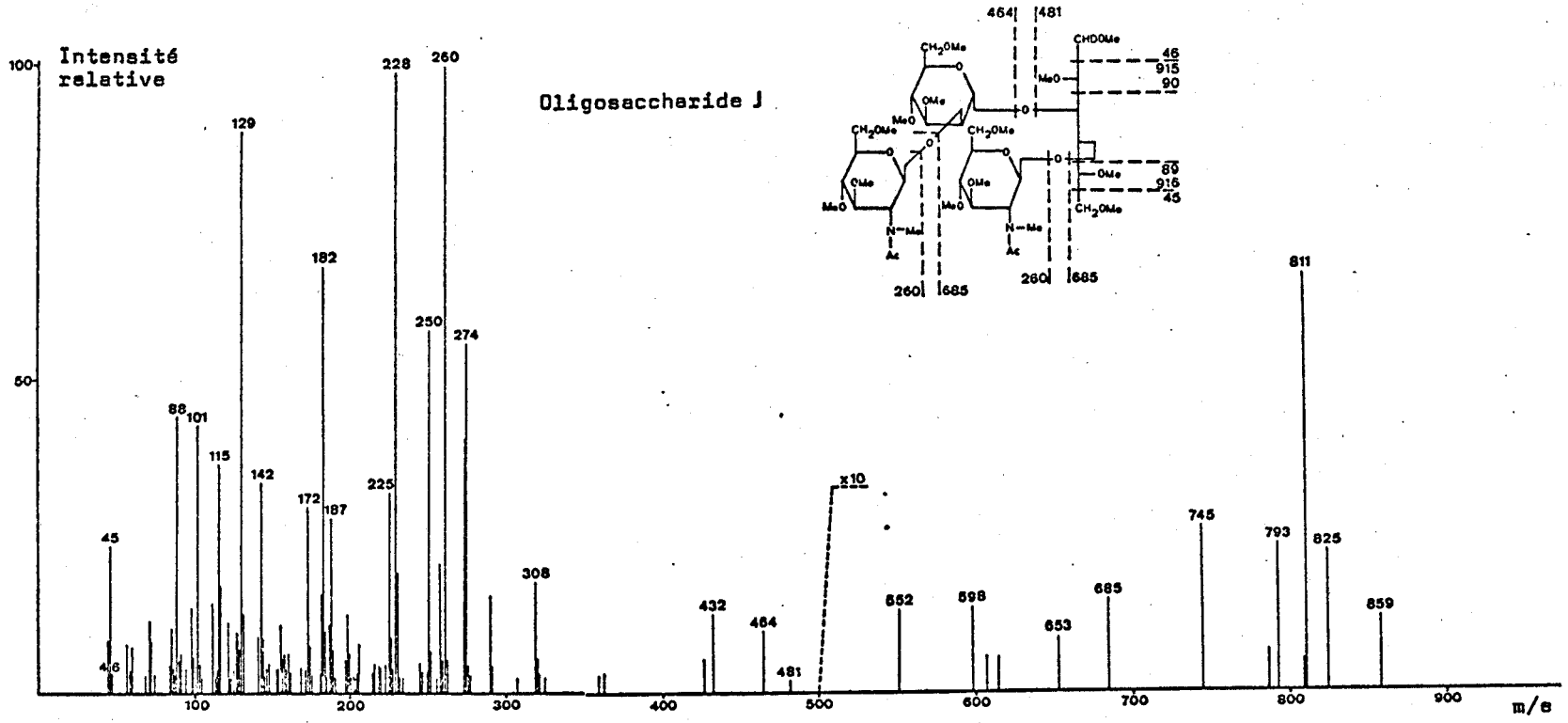
De la lecture des différents spectres de masse présentés dans la figure 51 page 157 , deux observations principales peuvent être faites :

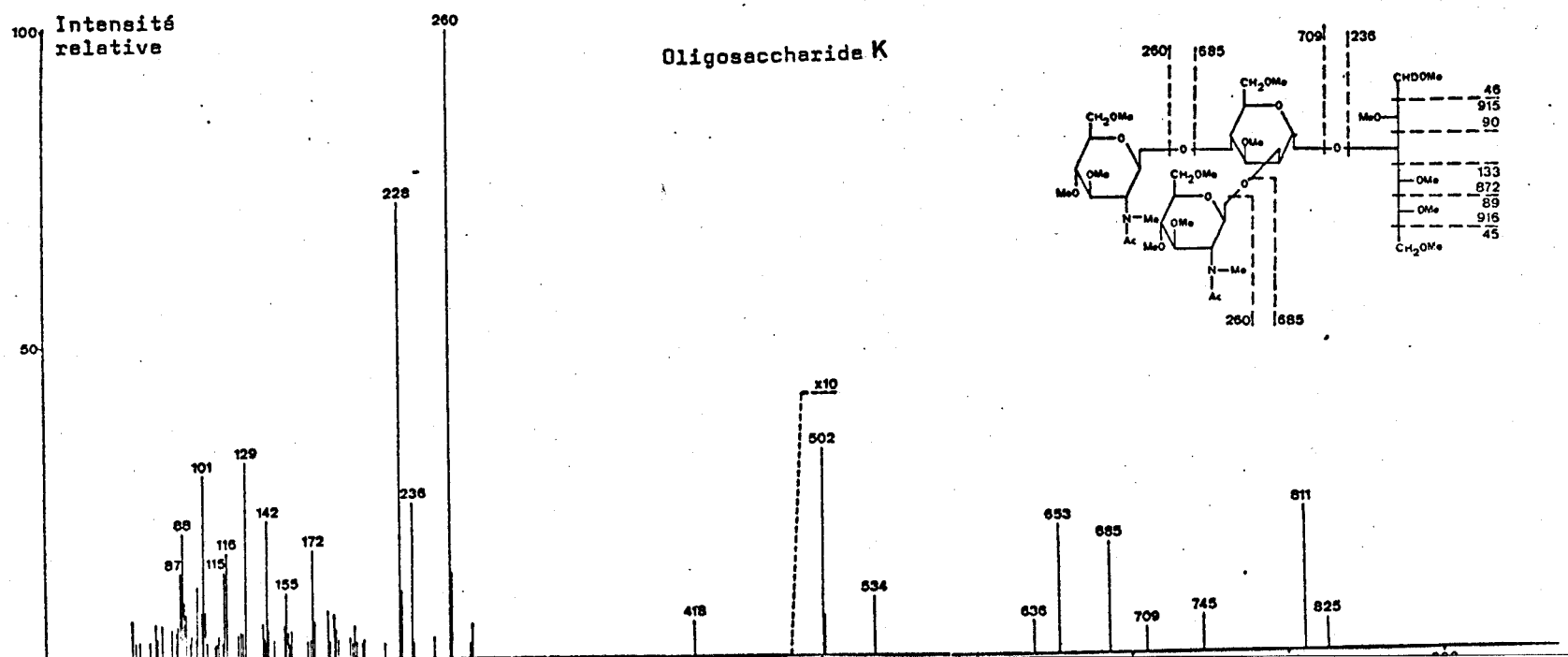
- l'ion moléculaire est présent ; il a une masse M+1 à la suite de son ionisation par un ion hydrogène (MH^+). Cet ion moléculaire se dégrade ensuite le plus souvent en éliminant une molécule de méthanol (MH^+-CH_3OH).

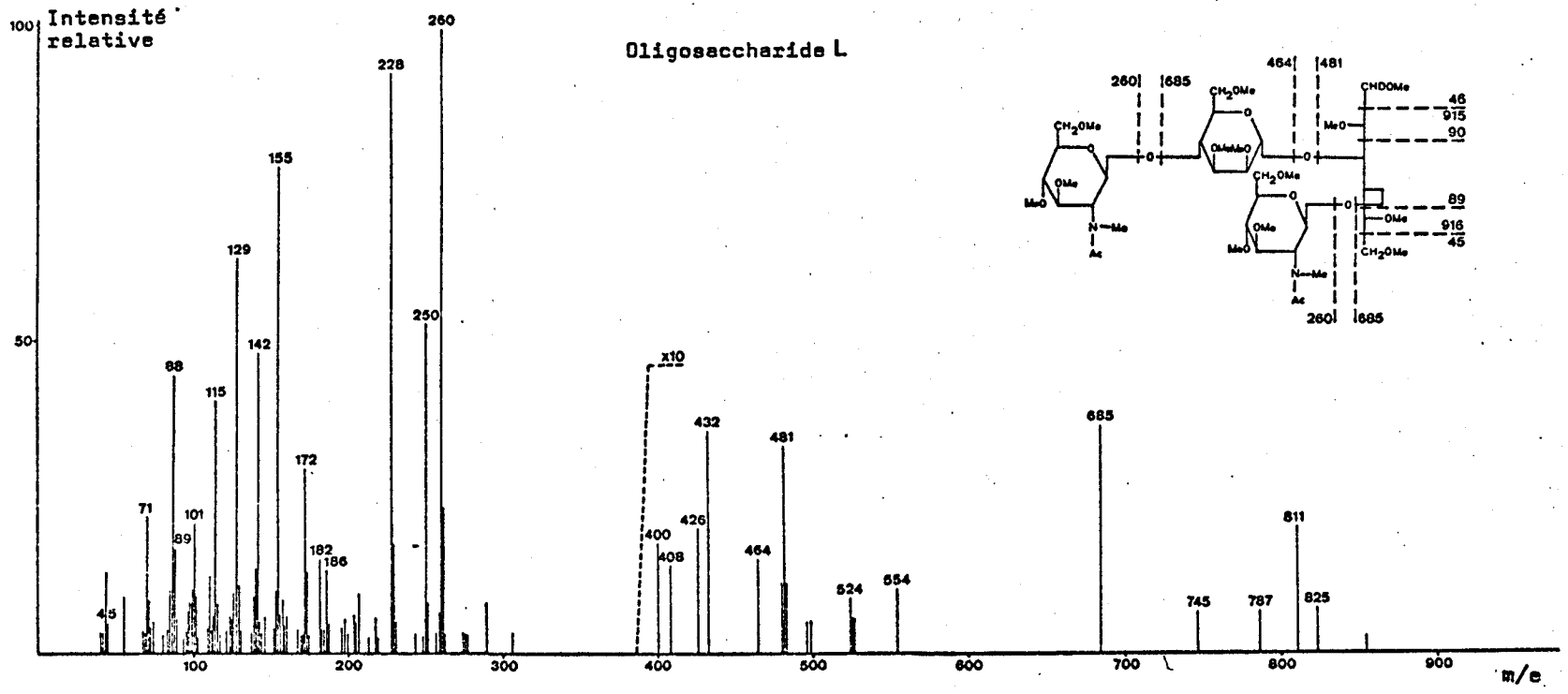
- les fragments primaires contenant l'alditol ont une masse supérieure de 18 unités de masse par rapport aux mêmes fragments observés en impact électronique. Cette différence de masse équivaut

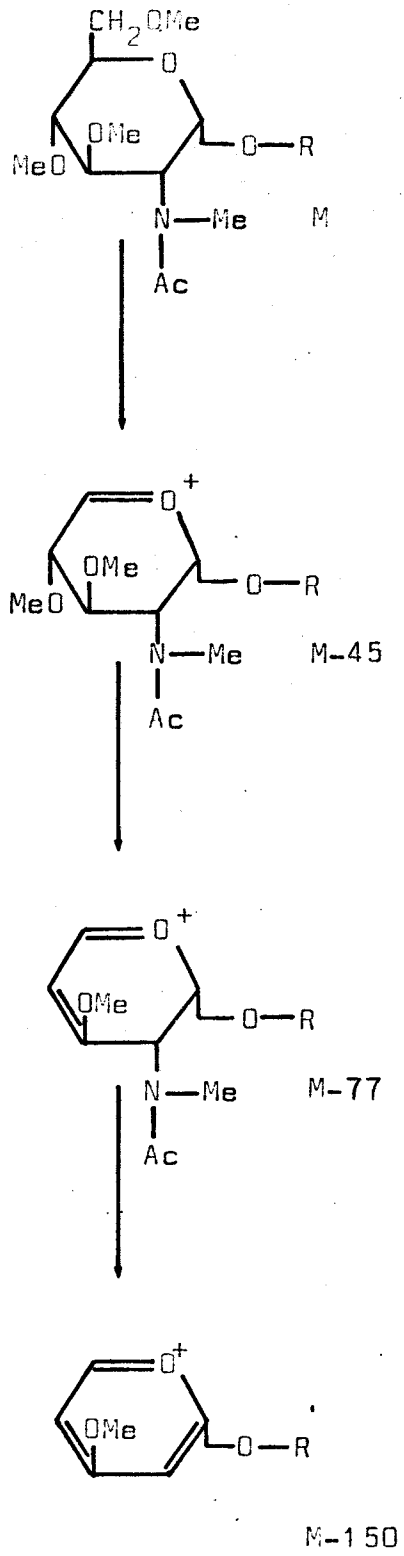
FIGURE 49

Spectres de masse obtenus après impact électronique des tétra-saccharides J à L.


Intensité relative
Oligosaccharide J
m/e


Intensité relative
Oligosaccharide K


Intensité relative
Oligosaccharide L
100
50
260
228
155
129
250
142
88
115
172
71
101
89
182
186
45
x10
432
481
426
400
408
464
524
554
685
745
787
811
825
100
200
300
400
500
600
700
800
900
m/e
260
685
464
481
CH2OMe
CHDOMe
MeO
OMe
N—Me
Ac
46
915
90
89
916
45



R = partie terminale réductrice

FIGURE 50

Hypothèse de formation des ions M-150.

TABLEAU IV

Intensités des principaux fragments obtenus après ionisation par impact électronique des loigosaccharides issus de l'acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde.

m/e	Oligosaccharides A	B	C	D	F	G	H	I	J	K	L
45	20,4	49,7	-	33,4	-	42,2	36,3	-	21,1	-	5,1
46	10,7	6,3	-	4,7	-	6,3	4,5	-	3	-	1,7
59	16,1	19,4	25	11,8	11,1	14,2	12,4	1,9	5,8	-	2,3
71	22,8	25,6	-	17,1	25,1	34	37	15,4	21,1	6	22,3
75	32,4	46,6	-	26,5	11,6	38,8	26,2	26,2	10	5,4	5,1
87	37,7	6,6	1	3,1	46,4	33,7	22	10,2	17	14	8,5
88	44	84,2	1,7	100	41,4	99,3	32,9	86,5	31,2	19,8	44,7
89	41,3	91,1	12	18,2	65,6	31,7	24,4	25,3	13	9,8	16,9
90	17,7	5,1	2,8	9,6	8,7	24,3	13,8	6,9	7,2	7,5	5,3
101	57,1	96,1	48,1	56,7	45,5	86	67,6	80,1	36,7	29	18,4
111	8,9	88,4	13,2	18,7	6,4	30,4	18,4	38,9	15,3	3,7	12,5
115	82,6	18,9	34,8	9,1	56	57,6	25	13,7	33,6	14,3	40,4
129	100	11,6	28,9	2,4	100	96,9	46	91,6	78,7	36,6	63
131	10,2	72,5	3,3	2,2	1,1	6	5	5	3,7	2,4	3,4
133	3,3	1	16,2	6,3	-	20,8	13,7	1,2	1,9	-	1,1
134	14,7	0,6	7,1	1,1	5,2	3	2,4	1	0,9	0,9	0,7
142	32,8	3,8	28,9	-	61	47,1	25,3	47,6	39	21,9	48,1
143	6	39,1	4,6	4,3	9,8	8,9	8,9	13	8,2	4,6	5,1
145	19,8	24,7	14,8	5,4	4,3	4,1	8	8,8	5	-	2,1
154	13	1,3	20,2	-	12,6	11	0,7	8	14,3	5,4	10,2
155	10	16	14,6	6,1	10,1	100	16,4	23,5	16,5	10,4	77,9
172	40	3,1	16,6	16,5	13,2	61,4	28,5	65,3	31	17,6	29,1
175	1	59,7	0,5	0,6	-	1,1	3,7	1,5	3,2	1,8	2,4
177	-		0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
182	45,7	1,2	5,8	-	90,7	26,9	11,2	15,4	50,2	8,1	14,9
186	8,1	0,8	26,8	-	6,6	9,7	9,3	8,7	11,1	7,5	13,5
187	1,7	100	4,1	30,2	-	25,3	4,7	87,5	25,1	4,5	10,8
204	2,4	0,7	2,4	-	-	5,4	4,5	7,2	-	2,4	5,9
219	10,7	26,2	-	22	1,7	-	11,3	51,1	4,3	2,5	2,5
228	20,1	1,1	50,1	-	61,3	97,9	58,9	100	97,5	72,9	97,6
236	44,4	3,4	100	31,2	-	98,3	25	-	-	19,6	0,6
245	-	4,5	0,5	-	-	1,3	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	56,9	2,2	2,6	95,9	46,3	3,7	52,6
260	15,3	0,8	28,6	-	39,1	91,9	100	99,6	100	100	100
277	-	83,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
296	5,5	-	2,9	7	-	10,4	-	-	-	-	-
379	-	0,7	1,6	-	0,6	-	-	-	-	-	-
381	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
382	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-	-	1,8
408	-	-	-	-	-	5,8	8	4,9	-	-	1,4
422	0,4	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	
428	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
432	-	-	-	-	-	6,6	7	-	10,5	-	-
440	0,5	-	-	-	-	7,6	2,1	-	-	-	-
464	-	-	-	-	-	2,7	4,6	-	6,8	-	1,5
467	0,4	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
481	-	2,9	-	-	7,5	-	-	10,5	1,7	-	3,3
500	-	-	-	-	-	4,2	1	-	-	-	-
541	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-
566	-	-	-	-	-	1,5	2,4	0,6	-	-	-
607	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-
670	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
671	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-
685	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,7	3,6
709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-
745	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	0,6	0,7
811	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	2,3	2
824	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	0,7

à l'ionisation des fragments par une molécule d'eau. Ces fragments sont d'autant plus intéressants que leur présence et leur masse semblent liées non seulement à la nature de l'alditol mais aussi à la structure linéaire ou branchée de l'oligosaccharide (voir figures 52 et 53 pages 158 et 159). Les disaccharides C et D et les trisaccharides G et H qui sont des oligosaccharides linéaires dont le sucre terminal réducteur est le mannose ont dans leur spectre un fragment de masse m/e 254 ; le disaccharide B, linéaire également, a un fragment analogue de masse m/e 295 qui caractérise par la même occasion la glucosamine terminale réductrice. Ces fragments peuvent se décomposer par perte d'une molécule d'eau et donner les fragments m/e 236 (254-18) et 277 (295-18). Dans le spectre de masse du disaccharide linéaire A, le fragment de masse m/e 254 est faible.

Les trisaccharides F et I et les tétrasaccharides J et L dont le sucre terminal réducteur est engagé dans deux liaisons glycosidiques possèdent le fragment de masse m/e 499 qui se dégrade parfois pour donner le fragment m/e 481 (499-18) après élimination d'une molécule d'eau ; cette différence de masse correspond à l'addition d'un résidu hexosamine par rapport au fragment m/e 254. Des fragments analogues de masse m/e 458 et m/e 440 sont observés dans le spectre de masse du trisaccharide I ; la différence de masse est dûe ici à un résidu hexose neutre supplémentaire. Les tétrasaccharides J et L présentent en outre des fragments homologues supérieurs par la présence d'un troisième sucre : ils ont pour masse 703 et 685 (703-18) ; ces deux derniers fragments caractérisent la deuxième branche des oligosaccharides, à savoir GlcNAc ⟶ Man ⟶ Mannitol.

Le tétrasaccharide K n'a donné aucun résutat intéressant par

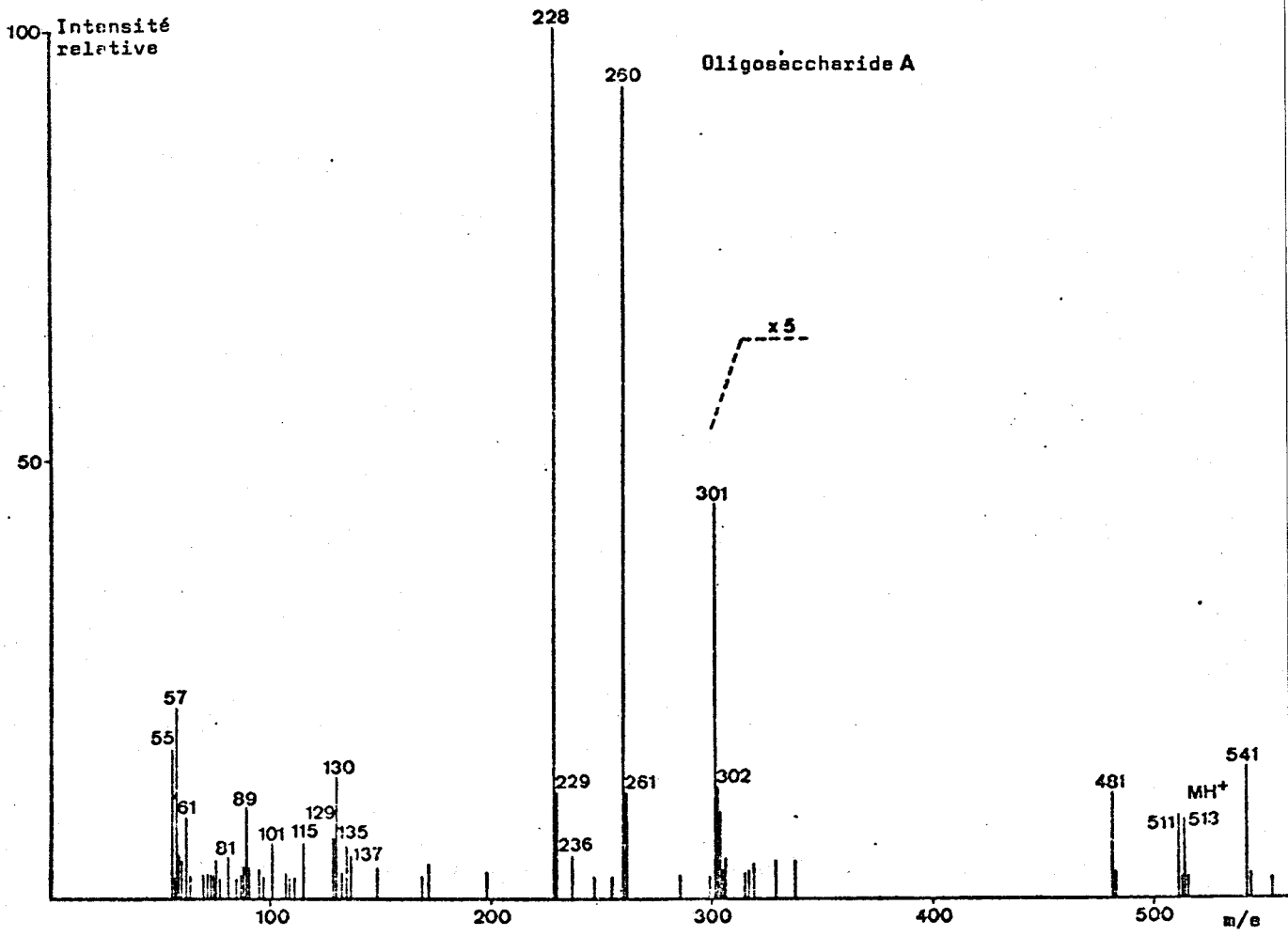
cette méthode d'ionisation. Par contre, le pentasaccharide M a pu être analysé : outre l'ion moléculaire (m/e 1207) et l'ion m/e 499 (481+18) caractéristique d'une branche de l'oligosaccharide, figurent les ions m/e 930 et 948 (930+18) représentatifs de la seconde branche.

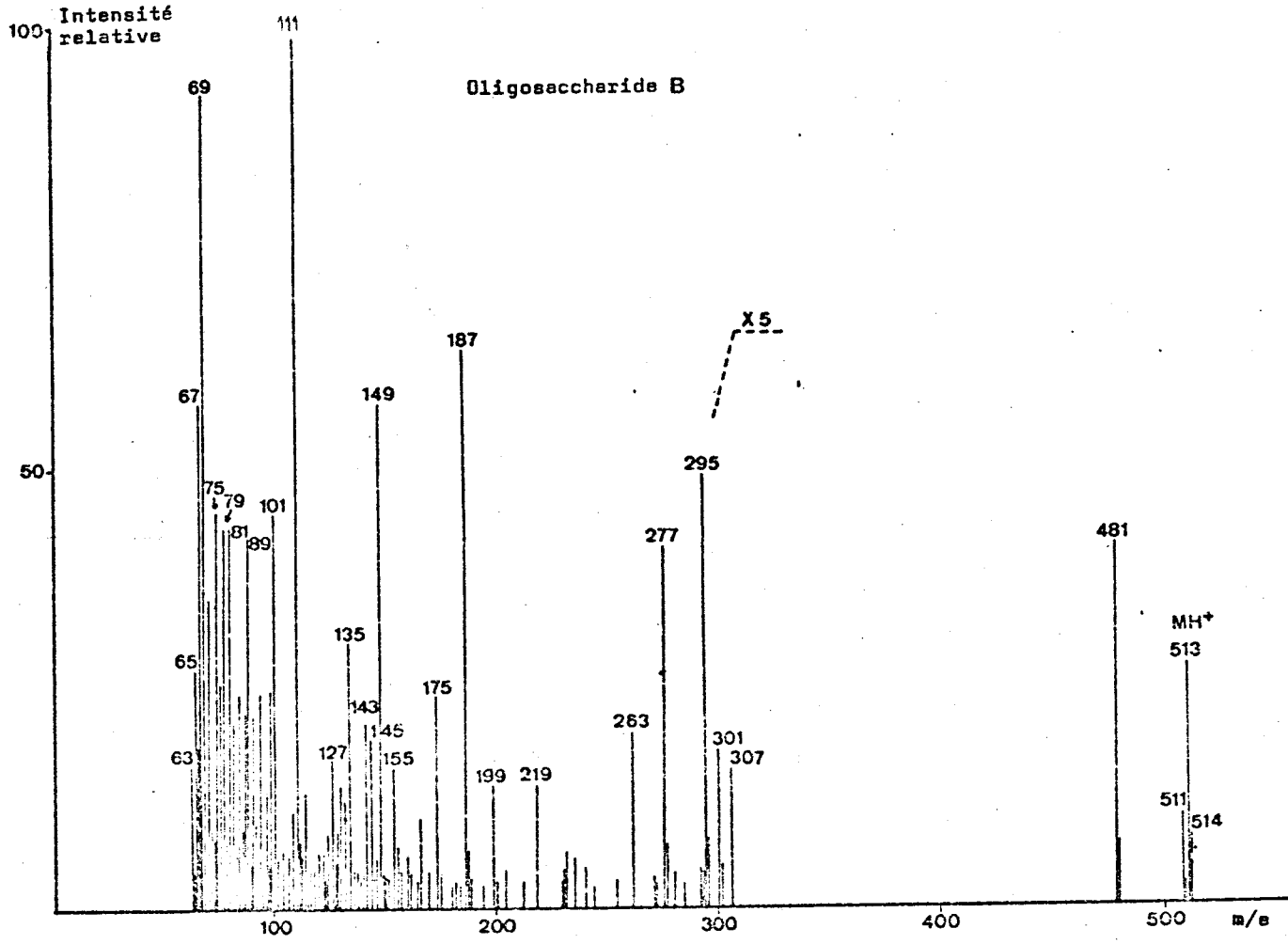
Un fragment de masse m/e 263 relativement intense est observé dans le spectre de masse du disaccharide B. Le fragment semble provenir du fragment m/e 295 qui éliminerait une molécule de méthanol. Une telle dégradation est absente dans le cas des autres oligosaccharides dont la seule différence à ce niveau est la nature du sucre terminal réducteur ; elle pourrait caractériser en dehors de la masse des fragments, la position terminale réductrice d'un résidu hexosamine.

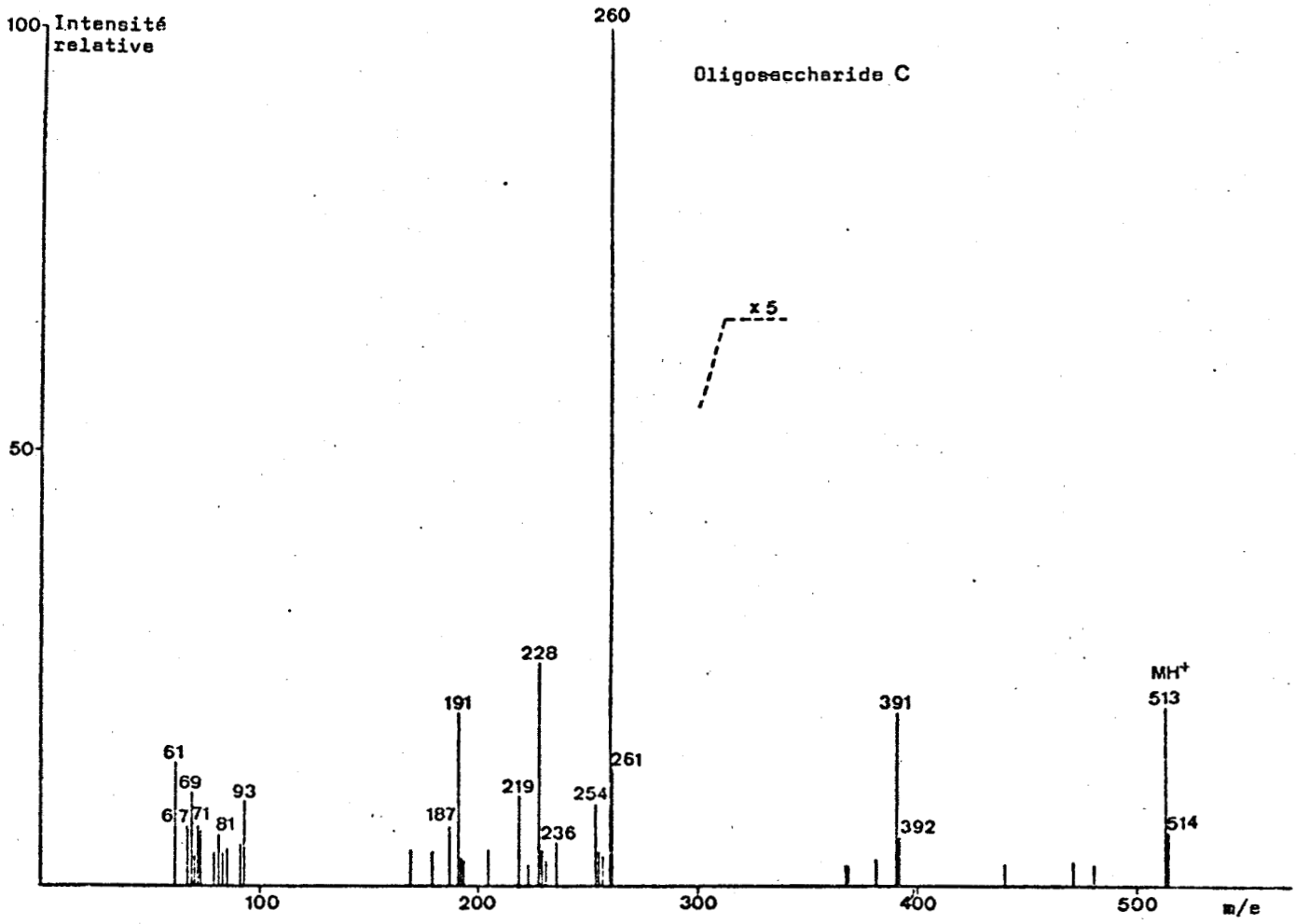
On peut remarquer en outre que la fragmentation générale de chaque oligosaccharide est moins poussée. Les fragments caractéristiques des sucres en position terminale réductrice et non réductrice sont néammoins présents. Au niveau des tri- et tétrasaccharides, les fragments pouvant aider à la détermination des séquences sont absents ou d'intensité très faible ; ils ne peuvent en conséquence déterminer le type de liaison existant entre les unités monosaccharides. Les fragments de masse faible (H et F notamment) ont des intensités très faibles contrairement aux résultats de l'impact électronique ; toutefois des fragments de masse plus faible encore sont souvent présents ; leur masse est comprise entre 50 et 70, avec notamment le fragment de masse m/e 69 souvent abondant qui serait à caractériser. On observe également un ion de masse m/e 279 dont l'intensité est parfois très importante. Il ne semble pas lié à la structure de la molécule (16).

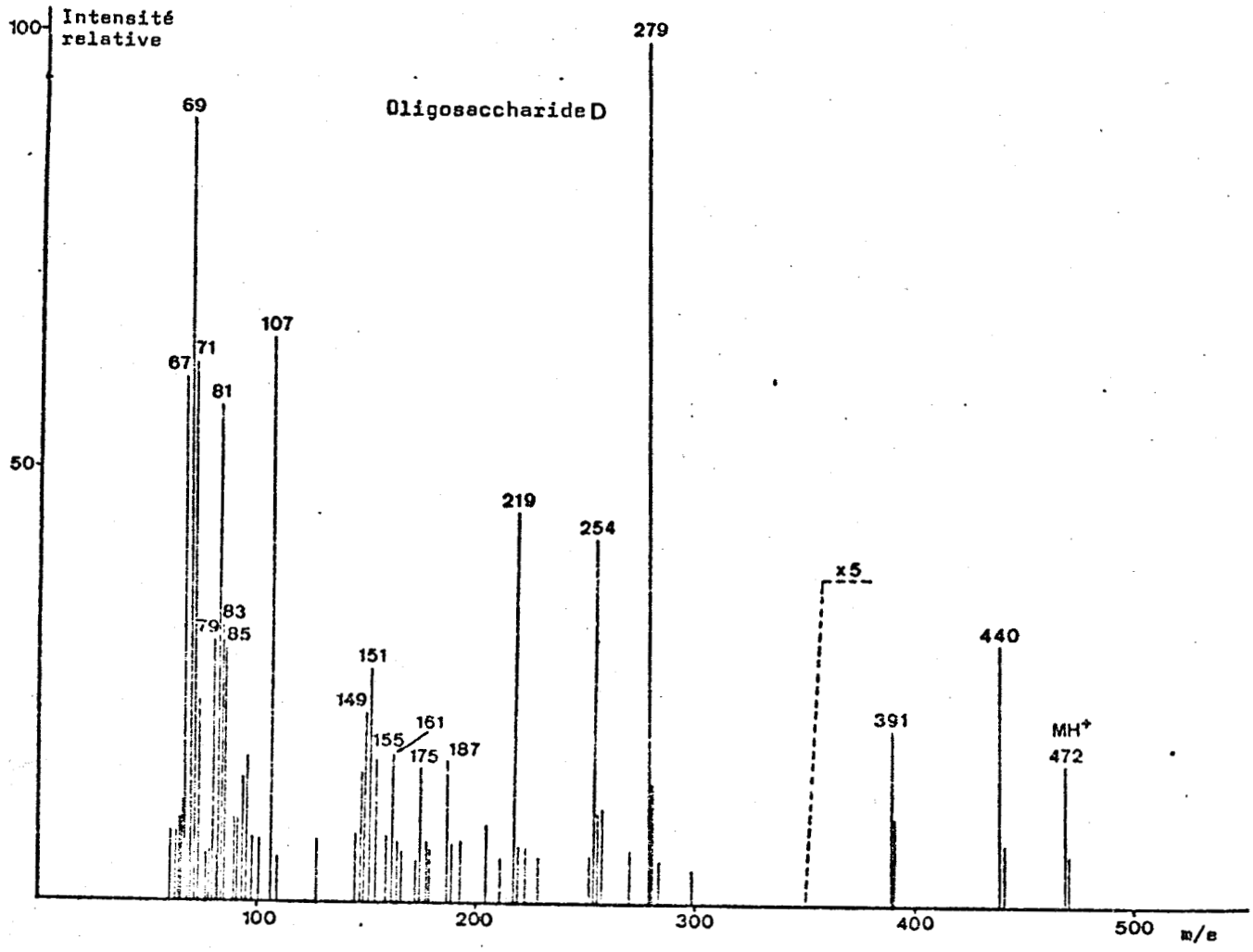
FIGURE 51

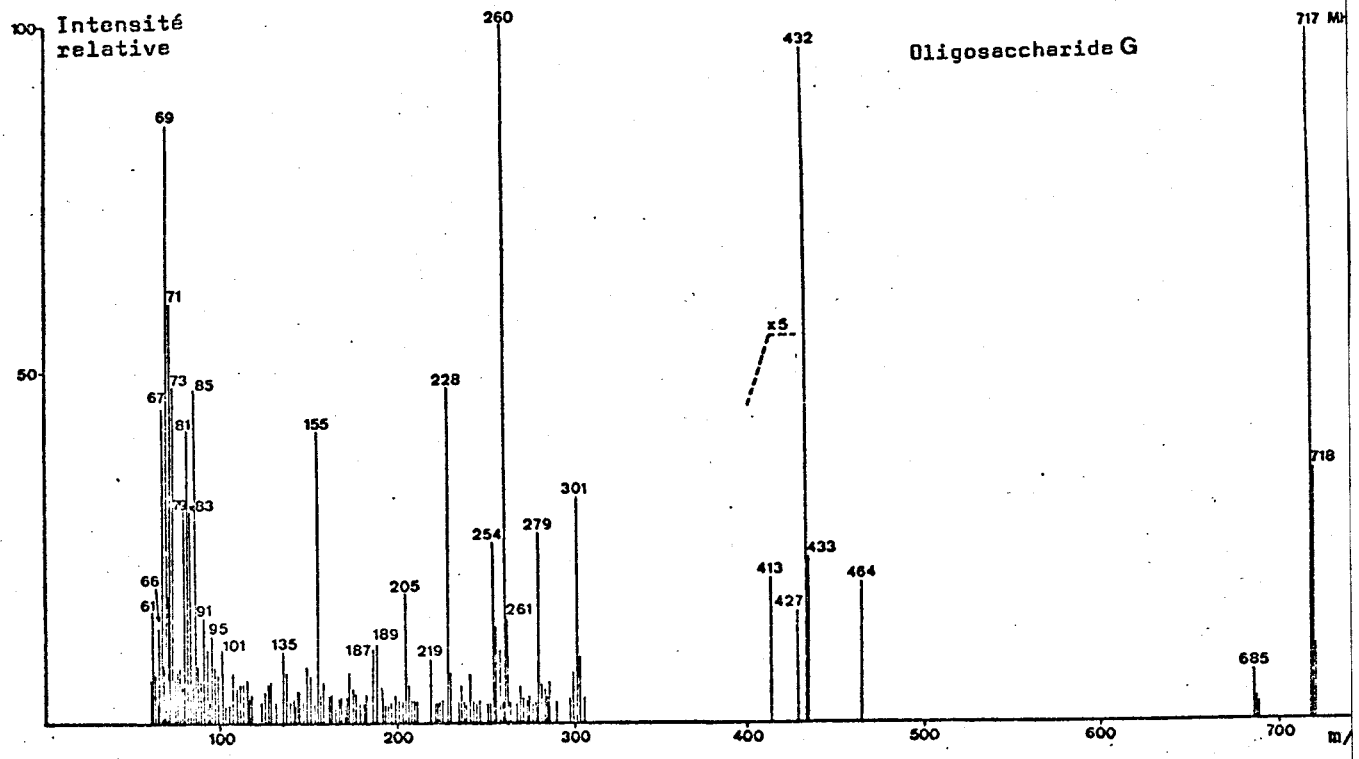
Spectres de masse obtenus par ionisation chimique (isobutane) des oligosaccharides A à J, L et M.

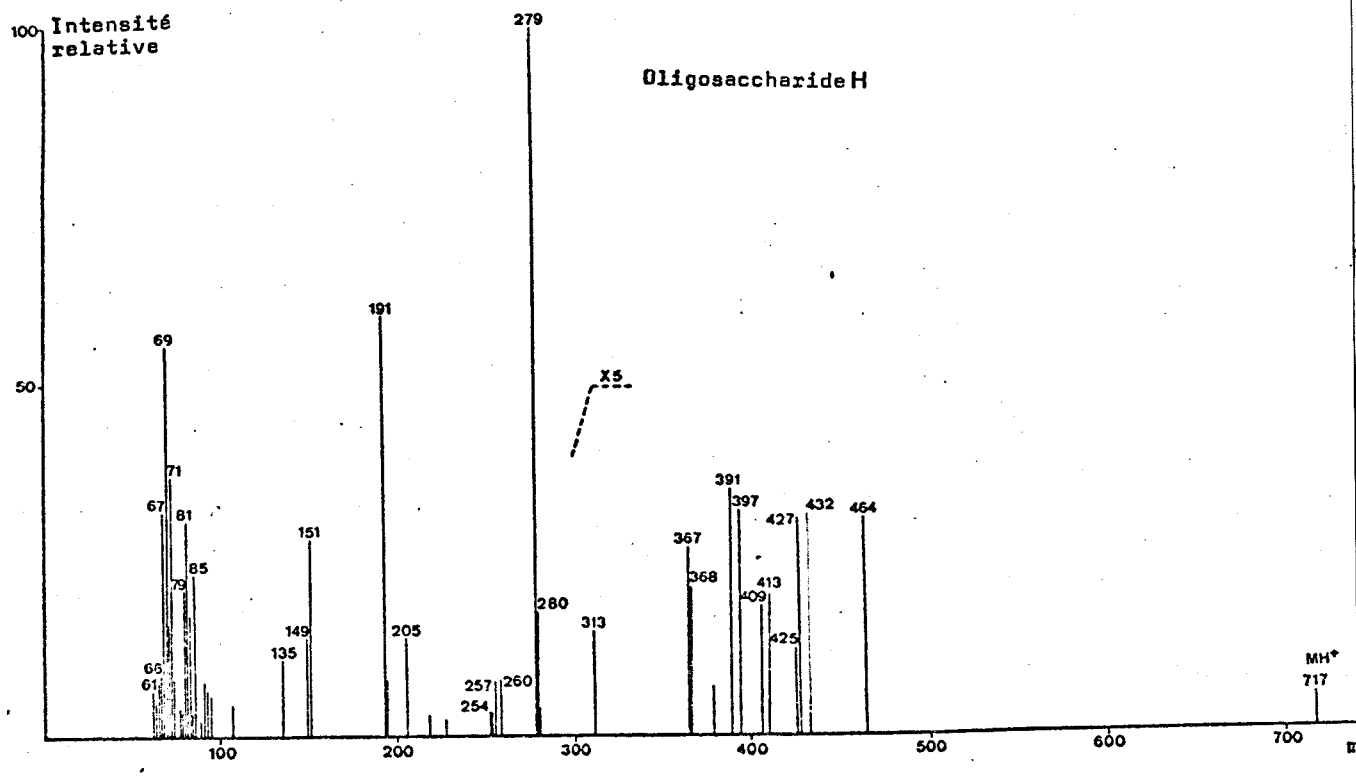

Intensité relative
100
50
Oligosaccharide A
228
260
x 5
301
57
55
61
89
81
101
115
129
130
135
137
229
236
261
302
481
511
513
MH+
541
100
200
300
400
500
m/e

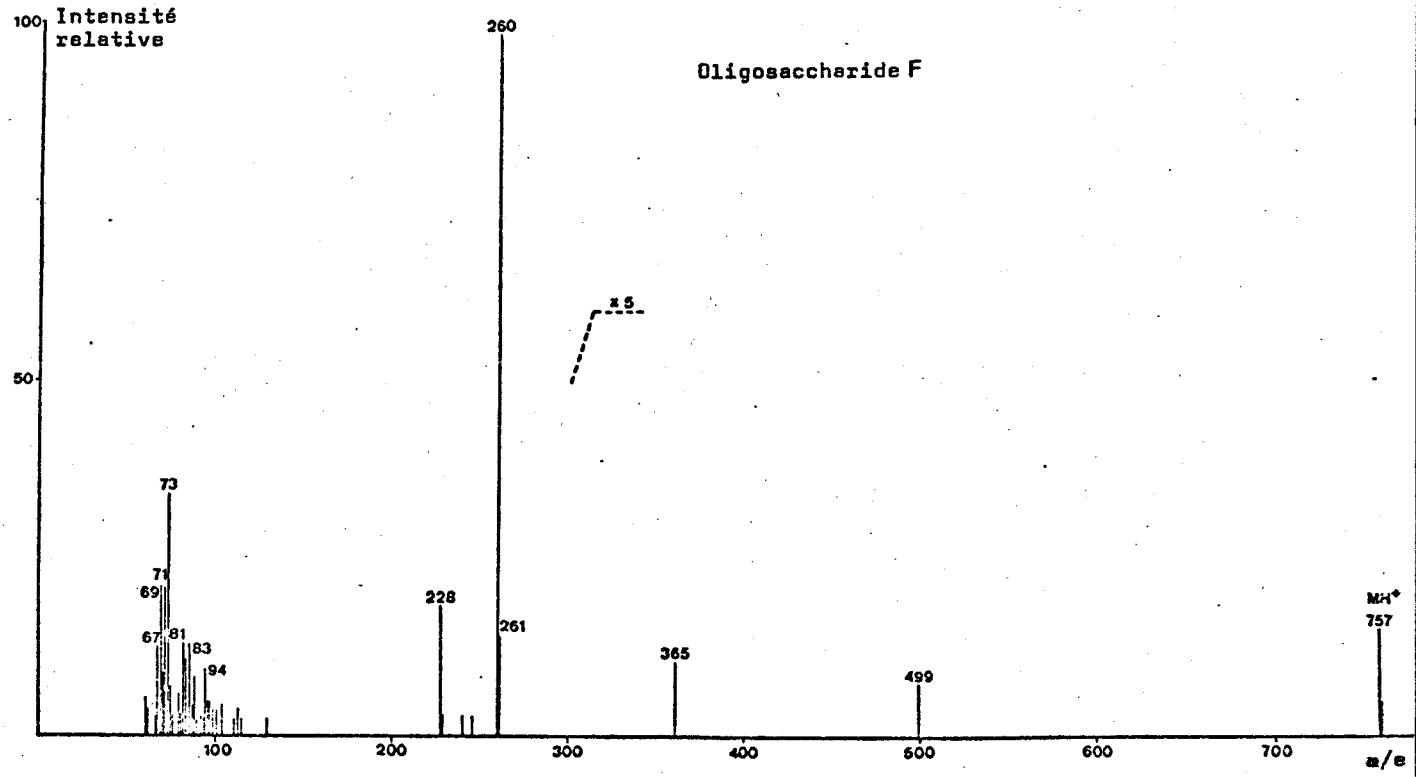

Intensité relative
100
50
Oligosaccharide B
111
69
X 5
187
67
149
295
75
79
101
81
89
277
481
MH+
513
135
65
175
143
146
263
63
127
155
301
307
199
219
511
514
100
200
300
400
500
m/e

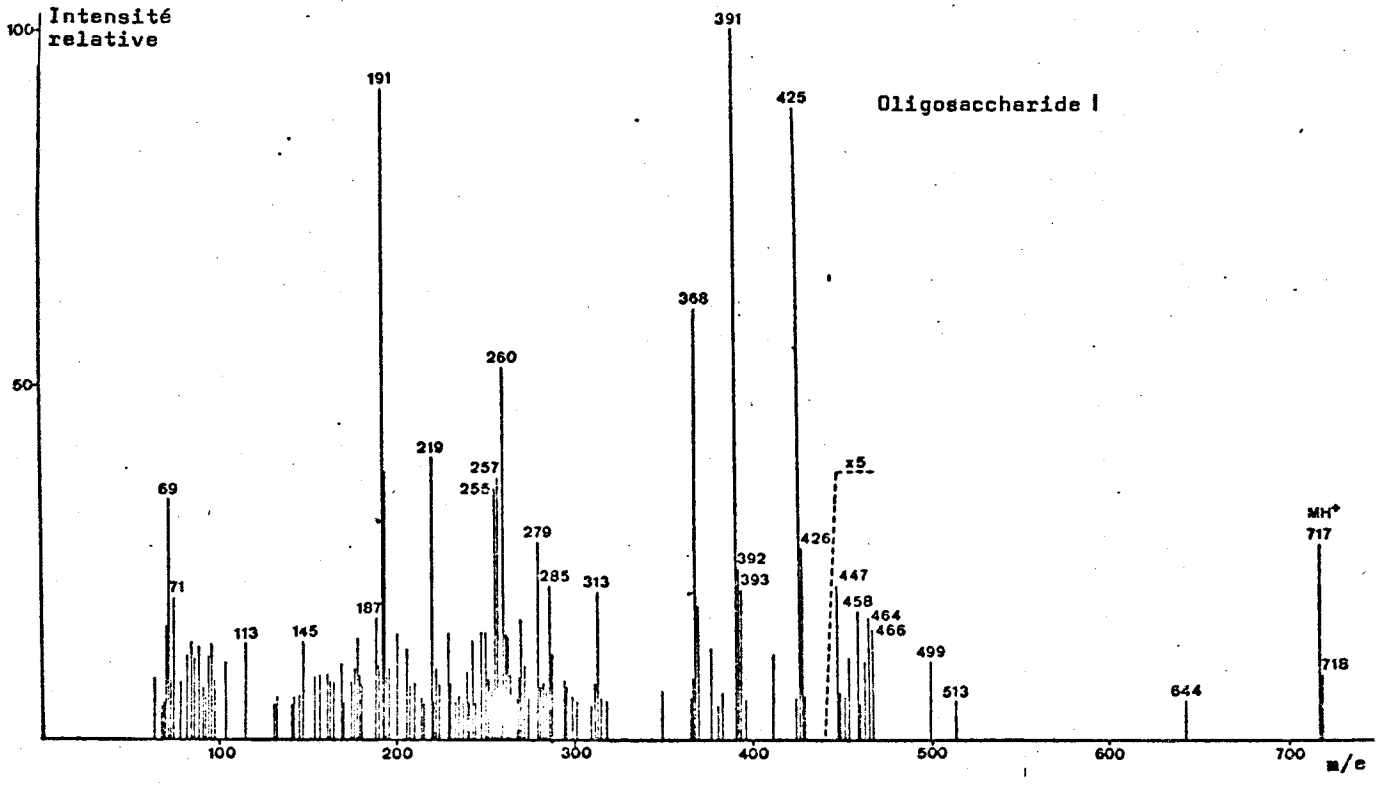

Intensité relative
100
50
Oligosaccharide C
x 5
260
228
191
391
MH+
513
61
69
93
67
71
81
187
219
254
261
236
392
514
100
200
300
400
500
m/e

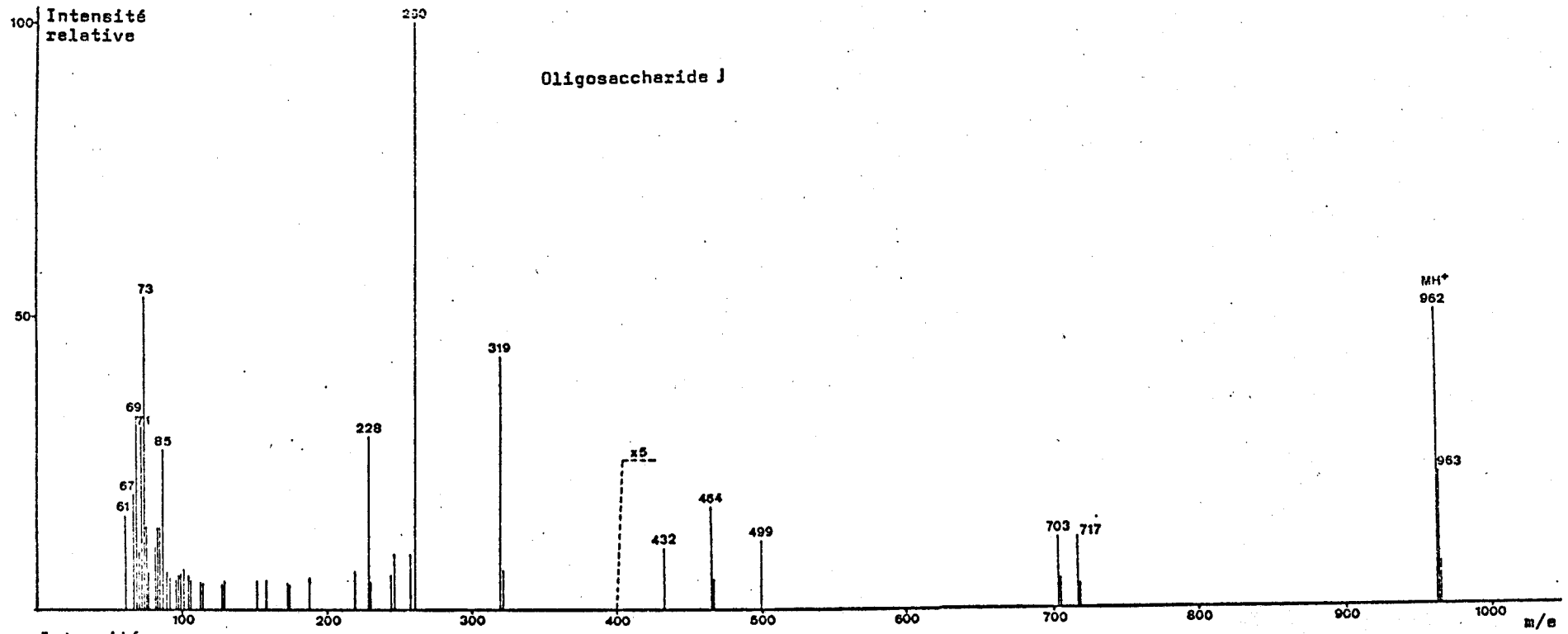

Intensité relative
100
50
Oligosaccharide D
279
69
107
67
71
81
83
79
85
151
149
155
161
175
187
219
254
x 5
440
391
MH+
472
100
200
300
400
500
m/e

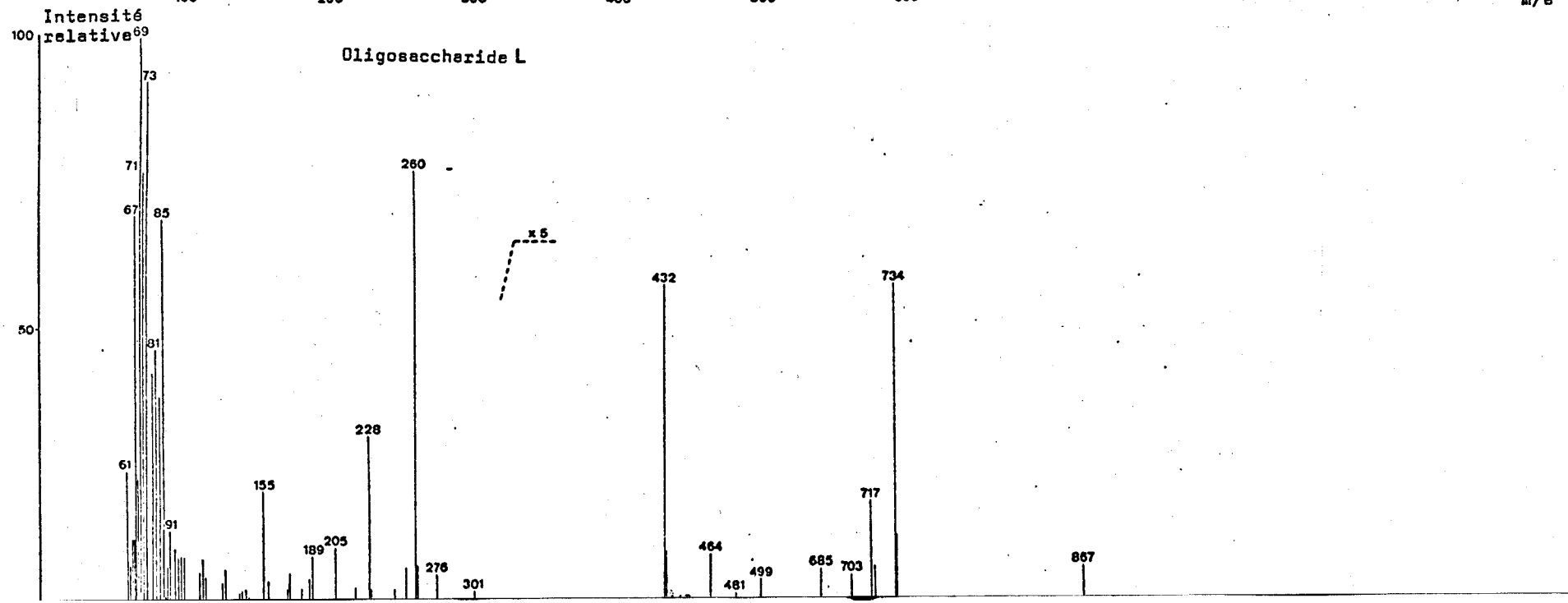

Intensité relative
Oligosaccharide G
100
50
69
71
67
73
85
81
83
66
61
91
95
101
135
155
187
189
205
219
228
254
260
261
279
301
413
427
432
433
464
685
717 MH
718
X5
100
200
300
400
500
600
700
m/

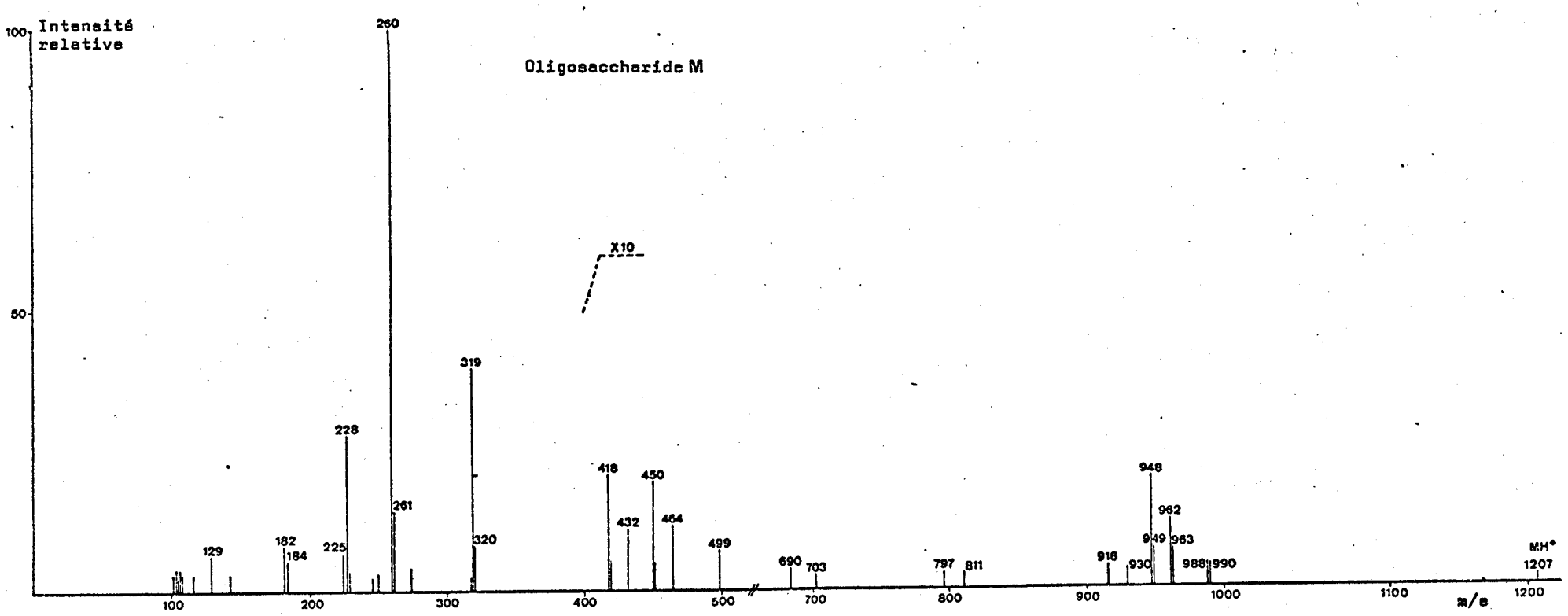

Intensité relative
Oligosaccharide H
100
50
69
71
67
81
85
79
66
61
135
149
151
191
205
254
257
260
279
280
313
367
368
391
397
409
413
425
427
432
464
MH+
717
X5
100
200
300
400
500
600
700


Intensité relative
Oligosaccharide F
100
50
260
x5
73
71
69
67
81
83
94
228
261
365
499
MH+
757
100
200
300
400
500
600
700
m/e


Intensité relative
Oligosaccharide I
100
50
391
191
425
368
260
219
257
255
x5
69
279
285
313
392
393
426
447
458
464
466
71
113
145
187
499
513
644
MH+
717
718
100
200
300
400
500
600
700
m/e


Intensité relative
Oligosaccharide J
100
50
73
69
71
85
67
61
228
260
319
x5
432
464
499
703
717
MH+
962
963
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
m/e


Intensité relative
Oligosaccharide L
100
50
69
73
71
67
85
81
61
91
155
189
205
228
260
276
301
x5
432
464
481
499
685
703
717
734
867


Intensité relative
Oligosaccharide M
100
50
X10
260
319
228
261
320
129
182
184
225
418
450
432
464
499
690
703
797
811
916
930
948
949
962
963
988
990
MH+
1207
100
200
300
400
500
700
800
900
1000
1100
1200
m/e

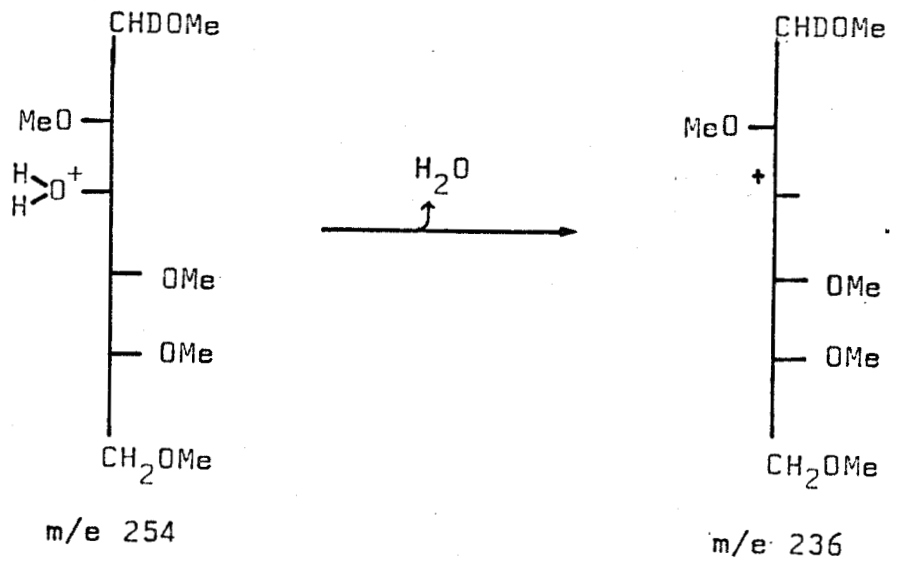


FIGURE 52

Fragments caractéristiques de la structure linéaire des disaccharides A, C et D et des trisaccharides G et H obtenus après ionisation chimique (isobutane).

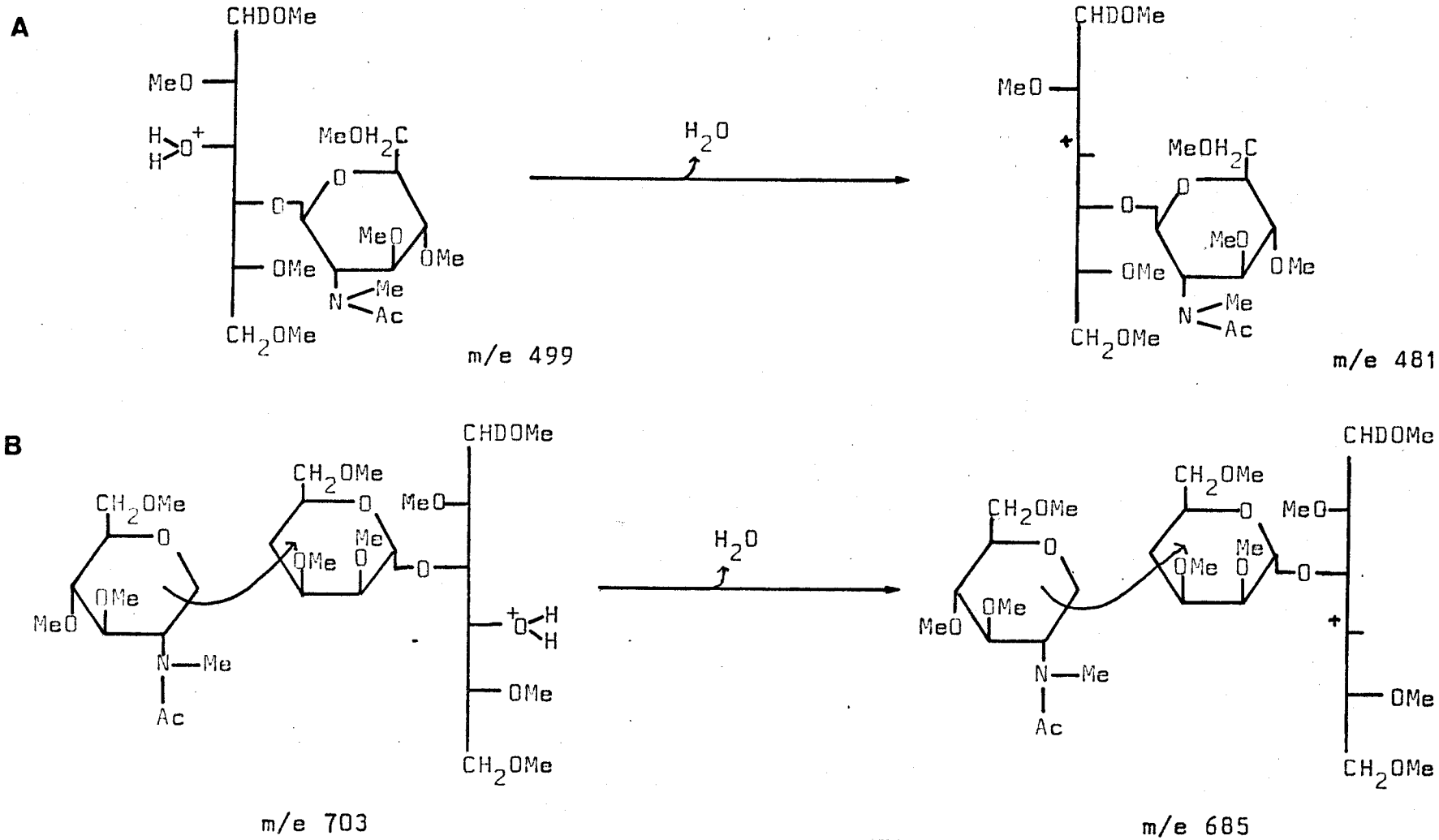
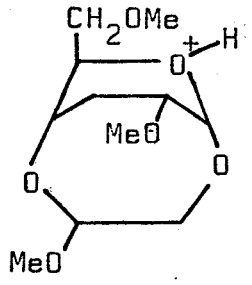


FIGURE 53

Fragments caractéristiques de la structure branchée des oligosaccharides.

A : trisaccharides F et I et tétrasaccharides J et L ; B : tétrasaccharides J et L.

C'est un ion bicyclique complexe, sa structure est illustrée ci-dessous :



m/e 279

Les intensités des fragments obtenus pour chacun des oligosaccharides sont présentées dans le tableau V page 161 .

Les informations de l'ionisation par l'impact électronique des oligosaccharides que nous avons étudiés sous la forme de méthyl-glycosylalditols perméthylés nous ont permis de déterminer leur structure sans ambiguité. Elles sont en accord avec les différentes observations des auteurs qui ont analysé des oligosaccharides de composition et de structure très voisines. Elles peuvent se résumer ainsi :

- la plupart des fragments utiles à la détermination de la nature des unités monosaccharides et de la séquence glucidique font partie des voies de fragmentation A et J : la masse 219 caractérise un hexose neutre en position terminale non réductrice, et la masse 260 une hexosamine terminale non réductrice, la masse 464 une séquence Hexose ⟶ Hexosamine et la masse 440 (baldA$_1$) une séquence Hexose ⟶ Hexitol. Les fragments les plus intéressants de la voie de fragmentation J concernent la partie terminale réductrice

TABLEAU V

Intensité des principaux fragments obtenus après ionisation chimique des oligosaccharides issus de l'acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde.

	Oligosaccharides										
m/e	A	B	C	D	F	G	H	I	J	L	M
67	1	57	7	60	13	4,5	32	16	19	69	-
69	3	92	11,2	85	21	85	56	34	33	100	-
71	3,1	35	7,2	62	21	60	37	20	31	77	-
73	2,8	7,5	2,2	24	34	46	8,2	4,5	53	92	-
79	1	43	4	30	6,1	30	21	12	11	42,3	-
81	5	43	6,3	55	13,5	42	31	14,5	14	46,2	-
83	2	21	4,1	32	11	30	17	11,5	14	38,5	-
85	2,3	24	4,5	29	13	48	23	13	27	69	-
89	11	42	1,9	9,5	2,4	6,2	2,5	6	5,4	8,5	-
101	6,5	44	2	6,8	3,5	10,5	1,5	11	6,9	11,5	2,9
111	2,3	100	1,5	3,9	2,5	5	1,7	3,1	3,3	9,3	1,5
131	2	14	1	2,7	2,2	3,3	1	3,7	2,1	3,1	-
135	6,1	30	6	4,1	1,4	10	11	2,1	1,4	3,8	-
143	1,4	21	1	3,5	1,7	4,5	1	.9	3,4	6,2	1
149	3,5	57	2	22	1,1	8,1	14	2,4	1,2	2,8	-
151	1,9	4	1	27	1,7	7,2	28	3,6	1,3	3,8	-
155	1,6	16	7	16,5	2,1	41	1,2	9,1	3,5	22,3	2,3
175	1,3	24	1,3	16	1,8	4,5	-	10,2	2,1	3,8	-
187	1,6	63	7	16,5	1,6	10,5	1,6	17	5,5	7,7	2,1
191	1	2,6	20	4,7	-	5	60	92	1,7	3,5	-
205	1,4	4,1	4,1	9	1,4	18	14	13	3,6	13,1	1
219	1,3	14	10,5	45	1,6	9	2,6	40	6,7	5,6	1,7
228	100	-	26	-	18,5	48	2,5	15,1	29	31,6	28
236	4,5	5,1	5	4,2	-	5,1	1,6	3,7	1	3,2	-
254	1	-	9,5	42	1,7	25	3,5	6	1	9,5	-
260	92	-	100	1	100	100	7,4	57	100	77	100
263	1	20	1,3	2,6	-	2,5	-	9	1	2	-
277	1	41	1	2,4	-	3,1	-	4,7	-	2,8	-
279	1	-	-	100	-	27	100	28	-	3	-
295	1,1	49	-	1,8	-	3,4	-	7	-	3,2	-
391	-	-	4	4,1	-	-	7	100	-	0,9	-
432	-	-	-	-	-	19	6,3	-	2,1	11,5	1,1
464	-	-	-	-	-	4	6,3	3,4	3,4	2,3	1,4
472	-	-	0,2	3,3	-	-	-	-	-	-	-
499	-	-	-	-	1,5	-	-	2,1	2,3	1,5	0,7
513	1,6	5,5	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-
685	-	-	-	-	-	15	-	0,5	-	-	-
703	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	0,4
717	-	-	-	-	-	22	1	5,5	2,4	-	-
758	-	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-
930	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
948	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
962	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	1,2
1207	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1

seule (partie alditol ald) : ils ont pour masse 236 et 277 quand le sucre réduit est un hexose neutre et une hexosamine respectivement ; ces ions peuvent provenir également d'une cassure primaire de la liaison glycosidique entre l'alditol et un autre monosaccharide ; ils appartiendraient alors à la série A. D'autres fragments de la série J, les ions J_1, viennent confirmer souvent la nature et la séquence des monosaccharides ; leur masse est supérieure de 60 unités à celle des fragments "ald" et des fragments de la série A contenant la partie réductrice "ald" : l'ion $aldJ_1$ peut avoir une masse de 296 (236+60) ou 337 (277+60) selon la nature du monosaccharide réducteur et l'ion $baldJ_1$ a une masse 500 (440+60).

- les mêmes fragments nous renseignent sur la nature de la liaison glycosidique ; l'information est déduite de la présence, de l'absence, ou encore de l'intensité des fragments : l'absence des ions J_1 est liée à une liaison de type 1⟶3 entre deux sucres ; l'intensité décroissante des fragments de la série bald (de $baldA_3$ à $baldA_1$) ou cald caractérise une liaison 1⟶4 (74) ; la somme des intensités des fragments bcA supérieure à celle des fragments baA est plutôt significative d'une liaison 1⟶2 qu'une liaison 1⟶4 (60).

- les fragments issus de la coupure de la chaîne carbonée de l'alditol aident à la détermination de la liaison glycosidique intéressant l'alditol : la présence de fragment de masse m/e 134 et l'absence du fragment de masse m/e 133 déterminent la liaison 1⟶4 ; l'inverse caractérise la liaison 1⟶3. La liaison 1⟶2 est déterminée par la présence de l'ion m/e 177.

- Les derniers fragments intéressants sont représentatifs des éthers méthyliques. Ils ont une masse faible et sont souvent très

intenses : ce sont les fragments F_1^2, H_1^2, et J_1 qui ont une masse m/e 101, 88 et 75 quand le monosaccharide est neutre et 142, 129 et 75 quand il s'agit d'une hexosamine.

De nouvelles observations ont pu être faites :

- il semble qu'une liaison a⟶b de type 1⟶2 (H et J) puisse se caractériser par la prédominance des ions baA_2 et $baldA_2$ très stables et par l'absence consécutive des ions baA_3 et $baldA_3$.

- la structure branchée d'un oligosaccharide peut être reconnue par la série de fragments suivante :

m/e 541 ⟶ m/e 481 ⟶ m/e 250

L'hypothèse de la formation des fragments est donnée dans la figure 47 page 144 . Si les deux premiers ont déjà été décrits aucune observation n'a été faite au sujet du troisième pourtant présent dans le spectre de masse d'oligosaccharides déjà analysés par ailleurs (40). L'intensité du fragment semble être liée à la nature des liaisons contractées avec l'alditol : en effet elle est très importante quand ces liaisons intéressent deux carbones voisins. A propos de cette série, il serait intéressant de savoir si elle est présente quand l'un des monosaccharides liés à l'alditol contracte une liaison avec un autre monosaccharide par sa fonction alcool du carbone C_3.

- un mécanisme a été proposé (voir figure 50 page 153) pour expliquer la présence de certains fragments : ils ne sont observés que dans une classe d'oligosaccharides, qu'ils soient

linéaires ou branchés. Ce qui laisse supposer que la fragmentation n'intéresse qu'un sucre ; ce dernier serait en outre en position terminale non réductrice. Le mécanisme proposé demande cependant à être vérifié (masse exacte de fragments, ions métastables, comparaison avec analogues diversement marqués).

L'ionisation chimique a apporté également de précieuses indications sur l'oligosaccharide . D'eux d'entre elles sont importantes :

- la première nous permet de connaître la masse moléculaire M de l'oligosaccharide : l'ion moléculaire est en effet présent dans tous les spectres de masse ; sa masse est souvent égale à M+1 car il est protoné par un atome d'hydrogène. Un fragment de masse M-1 est parfois observé ; sa formation n'est pas encore expliquée.

- la seconde concerne la structure de l'oligosaccharide. Elle se détermine aisément par les fragments contenant la partie réductrice que CHIZHOV et coll. (16) symbolisent par les lettres $(AOH_2)^+$: ces fragments se caractérisent par leur masse qui est supérieure de 18 unités ($+OH_2$) à celle des fragments A (encore appelés "ald"). Leur formation va permettre de distinguer:

- les oligosaccharides dont l'alditol n'est engagé que dans une seule liaison glycosidique ne possèdent qu'un fragment $(AOH_2)^+$: il a une masse m/e 254 dans le cas des oligosaccharides A, C, D, C, H et K et une masse m/e 295 dans le cas du disaccharide B. Ces deux masses caractérisent le sucre réducteur.

- les oligosaccharides dont l'alditol est engagé dans deux liaisons glycosidiques possèdent plusieurs fragments du type (AOH_2) : par exemple, dans le spectre de masse du trisaccharide I,

on observe les fragments de masse m/e 458 (440+18) et 499 (481+18) car le premier, outre l'alditol, contient un hexose neutre et le second une hexosamine. Le tétrasaccharide J présente également deux fragments de masse m/e 499 (481+18) et 703 (685+18) ; chacun est représentatif des deux branches glucidiques liées à l'alditol. Le trisaccharide F ne contient qu'un seul fragment (m/e 499) montrant que l'alditol est substitué par deux monosaccharides de même nature. La présence de ces fragments dans chacun des spectres est en toute logique avec le mécanisme de formation des fragments AOH_2.

B - APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLYCOPEPTIDE GP V-5 DE L'OROSOMUCOÏDE

1 - Préparation du glycopeptide GP V-5

Les différentes étapes de la préparation du glycopeptide GP V-5 sont indiquées figure 43 page 131 . Le glycopeptide est le 5ème glycopeptide élué de la colonne de Dowex 50 à partir de la fraction glycopeptidique V. Il représente 6% de cette fraction (89)

2 - Composition en sucres du glycopeptide GP V-5

La méthanolyse du glycopeptide GP V-5 a libéré des résidus mannose, galactose et N-acétyl-glucosamine dans les rapports 3 : 3 : 4,99 (34).

3 - Structure du glycopeptide GP V-5

a) détermination par la méthode de la méthylation

Le diagramme de la chromatographie en phase gazeuse des produits de l'hydrolyse du glycopeptide GP V-5 est présenté dans la

figure 54 page 167. On a pu identifier le méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside, le méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside, les méthyl-3,6- et 2,4-di-O-méthyl-mannosides et le méthyl-2-acétamido-2-déoxy-3,6-di-O-méthyl-glucoside dans les rapports 3,12 : 1,2 : 0,88 : 1 : 4,99 (34)

b) acétolyse du glycopeptide GP V-5 et fragmentométrie de masse de ses produits d'acétolyse

La fragmentométrie de masse, qui peut se réaliser par le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, nous permet d'utiliser les informations apportées par l'analyse en ionisation par impact électronique des oligosaccharides du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Pour accéder à la structure du glycopeptide GP V-5, nous avons procédé en deux temps :

- la première étape à étalonner l'appareil avec quelques uns des oligosaccharides du glycopeptide β de l'ovomucoïde choisis en fonction de la structure probable du glycopeptide GP V-5. Les oligosaccharides ont été suivis par quelques fragments caractéristiques : ils ont pour masse 236, 260 et 277 et correspondent aux fragments hexitol, hexosamine et hexosaminitol respectivement. Les oligosaccharides se trouvent ainsi traduits en courants ioniques dont les intensités sont représentées en fonction du temps de chromatographie sur un diagramme.

- l'analyse des oligosaccharides issus de l'acétolyse du glycopeptide GP V-5 constitue la deuxième étape. Les diagrammes de cette analyse sont présentés dans la figure 55 page 169. Une première augmentation significative et simultanée dans l'intensité des courants ioniques correspondants aux masses m/e 236 et 260 est

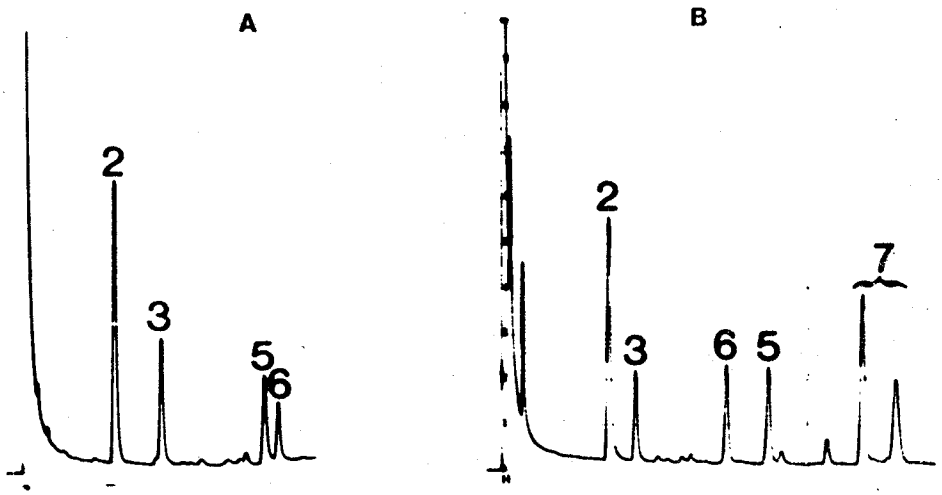


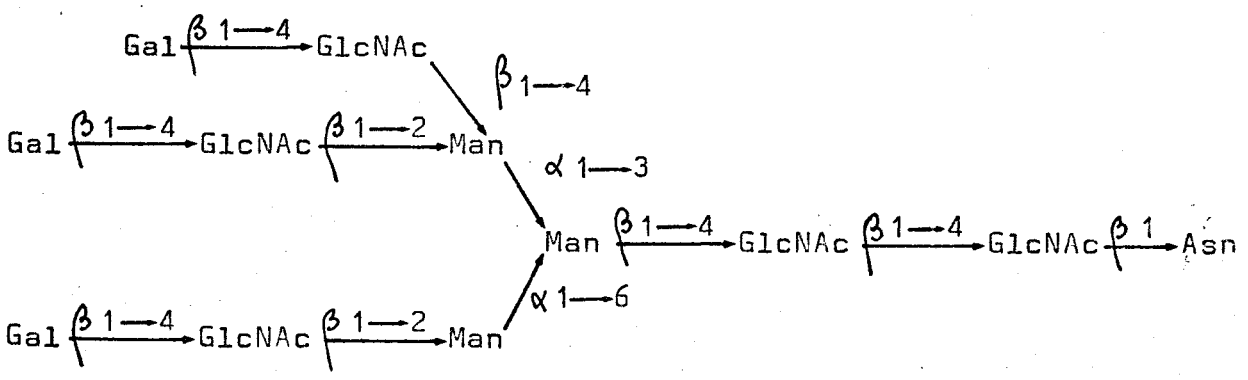
FIGURE 54

Chromatographie en phase gazeuse des produits d'hydrolyse du glycopeptide GP V-5 de l'orosomucoïde (sur colonne d'OV 210 à 5%, de 110 à 210°C à raison de 1°C par minute et à un débit d'azote de 7,5 ml par minute. FOURNET et coll. (34).

A : avant acétylation ; pic 2 : méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside ; pic 3 : méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside ; pic 5 : méthyl-2,4-di-O-méthyl-mannodide ; pic 6 : méthyl-3,6-di-O-méthyl-mannoside ;

B : après acétylation ; pic 7 : méthyl-2-acétamido-2-déoxy-4-O-acétyl-3,6-di-O-méthyl-glucoside .

observée : elle coïncide avec le profil d'intensité ionique du disaccharide A (composé 2), ce qui nous permet de dire que ce disaccharide est probablement présent dans l'acétolysat du glycopeptide GPV-5. Les disaccharides C (composé 3) et B (composé 4) se manifestent ensuite par un accroissement important des courants ioniques représentant les masses 236 et 260 pour le disaccharide C et 277 pour le disaccharide B. Le trisaccharide G (composé 5) est repéré de la même manière après un temps de chromatographie plus long. La caractérisation de ce trisaccharide nous permet de préciser le point d'attache de la troisième branche glucidique et de proposer la structure glycannique suivante :



glycopeptide GP V-5

Les résultats démontrent qu'il est ainsi possible d'utiliser efficacement les données acquises lors d'analyses précédentes. Associée au couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, la fragmentemétrie permet d'éviter des étapes de préparation et de purification supplémentaires et d'économiser le substrat disponible pour d'autres études.

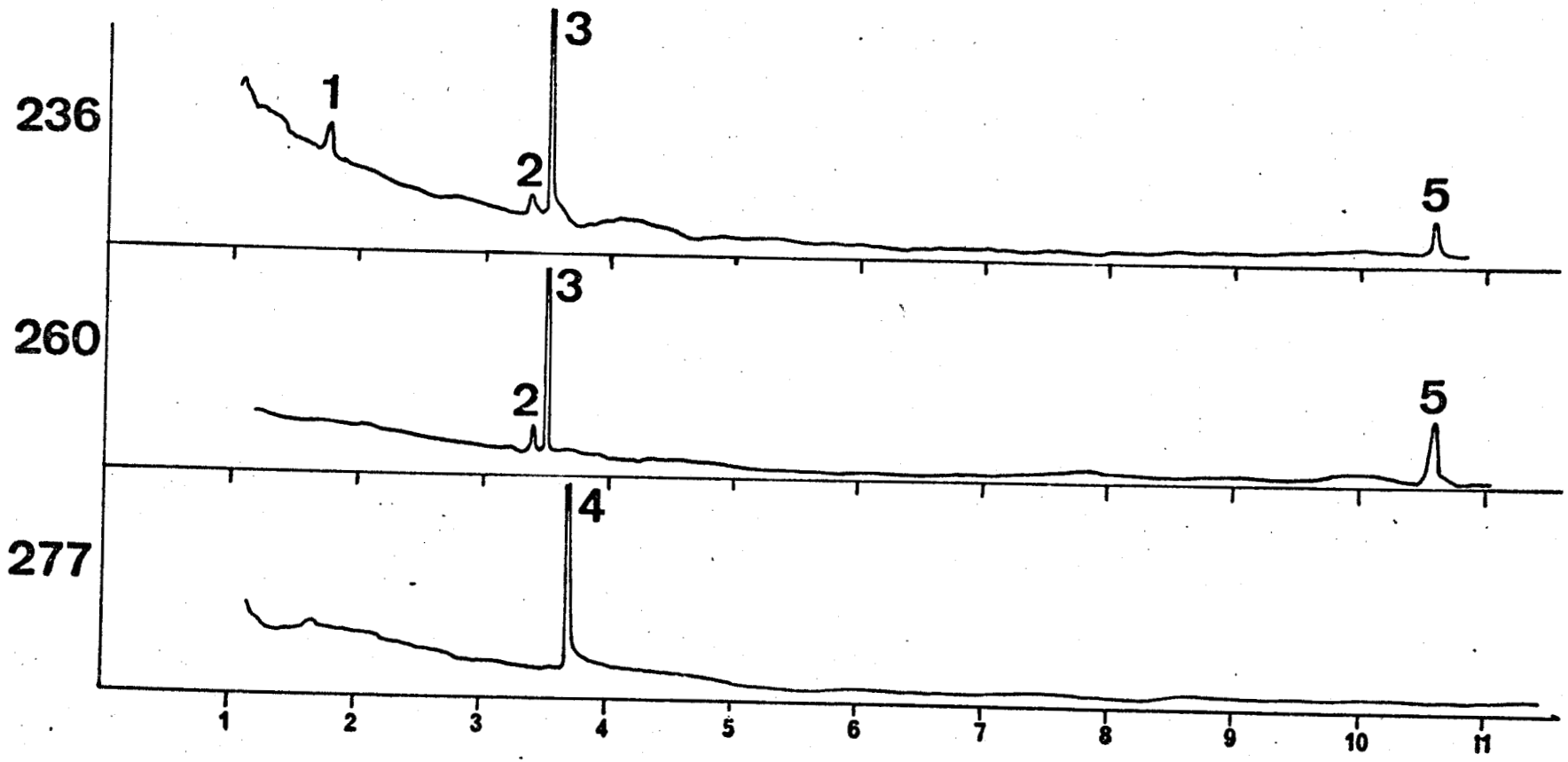


FIGURE 55

Fragmentométrie de masse du glycopeptide GP V-5.

Profils des courants ioniques des produits d'acétolyse du GP V-5 selon la masse des fragments recherchés pendant la chromatographie. FOURNET et coll. (34).

c) étude du glycopeptide GP V-5 par résonance magnétique nucléaire

L'étude du glycopeptide GP V-5 par résonance magnétique nucléaire a été réalisée également en deux temps avec un étalonnage préalable qui a pu être effectué grâce aux oligosaccharides isolés de l'urine de certains malades (25 , 93). Comme lors de l'étude de ces sucres urinaires, il a été possible de montrer que la valeur des résonances des protons des différents glycopeptides de l'orosomucoïde varait avec leur environnement (34). Le glycopeptide GP II-6 dont la valeur des des résonances des protons servent de référence possède la composition la plus simple et a une structure biantennée.

Par rapport aux valeurs de base, seules les résonances des protons H-2 des mannoses 3 et 4 du glycopeptide GP V-5 varient sensiblement alors que celle du mannose 4' reste inchangée (voir tableau VI page 171). Cette variation permet d'avancer que la troisième antenne glucidique vient se brancher sur le mannose 4 ; les résultats de la spectrométrie de masse se trouvent ainsi confirmés. A titre de comparaison, les résonances des mêmes protons du glycopeptide GP V-4 sont également indiquées : on peut remarquer que la substitution des mannoses 4 et 4' se fait bien ressentir au niveau des protons H-2 des trois mannoses qui voient leurs résonances modifiées.

TABLEAU VI

Valeurs des résonances magnétiques nucléaires des protons H-2 des mannoses 3, 4 et 4' des glycopeptides GP II-6, GP V-4 et GP V-5 de l'orosomucoïde (FOURNET et coll. (33)).

Glycopeptides	3	4	4'
GP II-6	4,250	4,191	4,112
GP V-5	4,221	4,221	4,105
GP V-4	4,218	4,218	4,093

CONCLUSION

Le travail que nous avons effectué au laboratoire a été réalisé dans le but d'étendre et d'améliorer les techniques d'analyses existantes permettant la détermination des chaînes glycaniques des glycoconjugués. Les nombreux travaux sur la spectrométrie de masse concernant l'étude des sucres nous ont encouragé à utiliser cette technique. Les résultats que nous avons obtenus sont prometteurs.

Dans un premier temps, nous avons analysé plusieurs oligosaccharides obtenus par acétolyse partielle du glycopeptide β de l'ovomucoïde à fin d'étalonnage. Les spectres de masse ont permis de déterminer avec précision la séquence des unités monosaccharides qui composent chaque oligosaccharide ainsi que leurs liaisons. L'accès à la structure peut se faire de manière simple et se limiter à l'observation d'un petit nombre de fragments caractéristiques comme ceux de la série A. Notre étude nous a fait remarquer lors de l'ionisation par impact électronique, un fragment très intéressant de masse m/e 250 : sa présence semble être associée à une structure ramifiée et son intensité fonction de la nature des liaisons contractées par le monosaccharide terminal réducteur. D'autre ions ont retenu notre attention par leur appartenance à une classe donnée d'oligosaccharides (tri- ou trétrasaccharides); leur importance dans l'élucidation de la structure est cependant moins évidente. D'autre part, l'ionisation chimique a permis de caractériser la structure linéaire ou branchée de l'oligosaccharide par un type particulier de fragments (fragments AOH_2).

Dans un second temps, nous avons utilisé les données acquises par l'analyse des premiers oligosaccharides pour ~~dé~~ détecter d'autres uniquement par quelques fragments caractéristiques. L'application a été réalisée sur les oligosaccharides obtenus aprés acétolyse du glycopeptide GP V-5. L'analyse s'est faite par couplage chromatogra graphie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. La fragmentométrie et le couplage offrent plusieurs aspects intéressants :

- ils évitent d'avoir à isoler à l'état pur les différents oligosaccharides qui pourraient être obtenus à partir de coupures chimiques des glycoconjugués. Ces derniers doivent toutefois être homogènes.

- ils permettent de détecter un oligosaccharide rapidement par un nombre réduit de fragments sans avoir à établir son spectre complet.

- enfin, la quantité nécessaire en composé est trés faible (0,1 à 1 µg).

BIBLIOGRAPHIE

1- ANDO S., KON K., NAGAI Y. et MURATA T., J. Biochem., 1977, 82, 1623 , page 114.

2- BAYARD B. et MONTREUIL J., Carbohyd. Rés., 1972, 24, 427, pages 122, 123.

3- BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J., Carbohyd. Res., 1972, 24, 445, pages 124, 134.

4- BIEMANN K., GAPP F. et SEIBL J., J. Amer. Chem. Soc., 1959, 81, 2274, page 5.

5- BIEMANN K., De JONGH D.C. et SCHNOES H.K., J. Amer Chem. Soc., 1963, 85, 1763, pages 49, 139.

6- BINKLEY W.W., DOUGHERTY R.C., HORTON D. et WANDER J.D., Carbohyd. Res., 1971, 17, 127, page 108.

7- BJORNDAL H., LINDBERG B. et SVENSSON S., Carbohyd. Res., 1967, 5, 433, page 72.

8- BJORNDAL H. et LINDBERG B., Carbohyd. Res., 1970, 12,29, page 75.

9- BJORNDAL H., LINDBERG B. , PILOTTI A. et SVENSSON S., Carbohyd. Res., 1970, 15, 339, page 72.

10- BJORNDAL H. et LUNDBLAD A., Biochem. Biophys. Acta, 1970, 201, 434, page 75.

11- BJORNDAL H., LINDBERG B., LONNGREN J., ROSELL K.G. et NIMMICH W., Carbohyd. Res., 1973, 27, 373, page 95.

12- BRUVIER C., DEA 3ème cycle, Nov. 1977, page 66.

13- BUSCHER H.P., CASALS-STENZEL J. et SCHAUER R., Eur. J. Biochem., 1974, 50, 71, page 62.

14- CARLSON D.M., J. Biol. Chem., 1968, 243, 616, page 90.

15- CHIZHOV O.S., MOLODTSOV N.K. et KOCHETKOV N.K., Carbohyd. Res., 1967, 4, 273, page 103.

16- CHIZHOV O.S., KADENTSEV V.I., SOLOV'YOV A.A., LEVONOWICH P.F. et DOUGHERTY R.C., J. Org. Chem., 1976, 41, 3425, pages 113, 164.

17- CODUTI P.L. et BUSCH C.A., Anal. Biochem., 1977, 78, 21, page 111.

18- CUNNINGHAM L., FORD J.D. et RAINEY J.M., Biochem. Biophys. Acta., 1965, 101, 233, page 129.

19- CURTIUS H.C., MULLER M. et VOLLMIN J.A., J. Chromatog., 1968, 37, 216, page 62.

20- De JONGH D.C., J.Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 3149, page 79.

21- De JONGH D.C., J. Org. Chem., 1965, 30, 1563, page 78.

22- De JONGH D.C.et HANNESSIAN S., J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 3744, page 78.

23- De JONGH D.C., J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, 3114, page 78.

24- De JONGH D.C., RADFORD T., HRIBAR J.H., HANNESSIAN S., BIEBER M., DAWSON G. et SWEELEY C.C., J. Amer.Chem. Soc., 1969, 91, 1728, page 56.

25- DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., STRECKER G., MICHALSKI J.C., FOURNET B., SPIK G. et MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., 1978, 87, 323, page 170.

26- EGGE H., von NICOLAI H. et ZILLIKEN F., FEBS Letters, 1974, 39, 341, page 97.

27- EYLAR H., J. Theoret. Biol., 1965, 10, 89, page 1.

28- FINNE J., Biochem. Biophys. Acta, 1975, 412, 317, page 90.

29- FINNE J., KRUSIUS T. et RAUVALA H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, 74, 405, page 62.

30- FOURNET B. et MONTREUIL J., J. Chromatog., 1973, 75, 29, page 75.

31- FOURNET B., LEROY Y. et MONTREUIL J., Actes du Colloque International de Villeneuve d'Ascq, Juin 1973, vol. 1, 111, page 125.

32- FOURNET B., LEROY Y. et MONTREUIL J., J. Chromatog., 1974, 92 185, page 75.

33- FOURNET B., DHALLUIN J.M., LEROY Y. et MONTREUIL J., J. Chromatog., 1978, 153, 91, page 75.

34- FOURNET B., STRECKER G., SPIK G., MONTREUIL J., SCHMID K., DORLAND L., HAVERKAMP J., SHUT B.L. et VLIEGENTHART J.F.G., Biochemistry, 1978, soumis à publication, pages 165, 166, 170.

35- FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F., J. Biol. Chem., 1949, 181, 499, page 119.

36- GOLOVNIKA L.S., WULFSON N.S. et CHIZHOV O.S., Isv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim., 1968, 73, 64, page 68.

37- GOLOVNIKA L.S., WULFSON N.S. et CHIZHOV O.S., Zh. Org. Khim., 1968, 4, 738, page 70.

38- HAKOMORI S., J. Biochem., 1964, 55, 205, pages 87, 125.

39- HAKOMORI S., SIDDIQUI B., LI Y., LI S. et HELLERQVIST C.G., J. Biol. Chem., 1971, 246, 2271, page 75.

40- HALLGREN P. et LUNDBLAD A., J. Biol. Chem., 1977, 252, 1014, pages 33, 163.

41- HANFLAND P. et EGGE H., Chem. Phys. Lipids, 1975, 15, 243, page 97.

42- HANFLAND P. et EGGE H., Chem. Phys. Lipids, 1976, 16, 201, page 97.

43- HARRISSON W.H., BOYER P.D. et FALCONE A.B., J. Biol. Chem.,1955, 215, 303, page 5.

44- HASE S. et RIETSCHEL E.T., Eur. J. Biochem., 1976, 63, 93, page 75.

45- HAVERKAMP J., KAMERLING J.P. et VLIEGENTHART J.F.G., FEBS Letters, 1977, 73, 215, page 65.

46- HEYNS K. et MULLER D., Tetrahedron, 1965, 21, 3151, page 46.

47- HEYNS K. et SCHARMANN H., Tetrahedron, 1965, 21, 507, page 47.

48- HEYNS K., KIESSLING G. et MULLER D., Carbohyd. Res., 1967, 4, 452, page 46.

49- HORTON D., WANDER J.D. et FOLTZ R., Carbohyd. Res., 1974, 36, 75, page 113.

50- IKENAKA J., ISHIGURO M., EMURA J., KAUFMANN H., ISEMURA J., BAUER W. et SCHMID K., Biochemistry, 1972, 11, 3817, page 129.

51- ISHIGURO M., YAMAMOTO A. et SCHMID K., Biochem. Biophys. Acta, 1969, 194, 91, page 128.

52- KAMERLING J.P.,VLIEGENTHART J.F.G., VINK J. et De RIDDER J.J., Tetrahedron, 1971, 27, 4275, page 105

53- KAMERLING J.P., VLIEGENTHART J.F.G., VINK J. et De RIDDER J.J., Tetrahedron, 1971, 27, 4749, pages 107, 108.

54- KAMERLING J.P., VLIEGENTHART J.F.G., VINK J. et De RIDDER J.J., Tetrahedron, 1972, 28, 4375, page 107.

55- KAMERLING J.P., VLIEGENTHART J.F.G. et VINK J., Carbohyd. Res., 1974, 33,297, pages 63, 111.

56- KAMERLING J.P., VLIEGENTHART J.F.G., VERSLUIS C. et SCHAUER R., Carbohyd. Res., 1975, 41, 7, pages 62, 63.

57- KARKKAINEN J., Carbohyd. Res., 1969, 11, 247, page 80.

58- KARKKAINEN J., Carbohyd. Res., 1970, 14, 27, page 86.

59- KARKKAINEN J., Carbohyd. Res., 1971, 17, 1, page 89.

60- KARKKAINEN J., Carbohyd. Res., 1971, 17, 11,pages 88, 143, 145, 162.

61- KARLSSON K.A., LEFFLER H. et SAMUELSSON Bo. E., J. Biol. Chem., 1974, 249, 4819, page 97.

62- KOCHETKOV N.K., WULFSON N.S., CHIZHOV O.S. et ZOLOTAREV B.M., Tetrahedron, 1963, 19, 2209, page 47.

63- KOCHETKOV N.K. et CHIZHOV O.S., Biochem. Biophys. Acta, 1964, 83, 134, page 35.

64- KOCHETKOV N.K. et CHIZHOV O.S., Tetrahedron, 1965, 21, 2029, pages 42, 46, 47, 62, 81, 135, 145.

65- KOCHETKOV N.K. et CHIZHOV O.S., Advan. Carbohyd. Chem., 1966, 21, 39, pages 35, 81.

66- KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S. et ZOLOTAREV B.M., Carbohyd. Res., 1966, 2, 89, page 46.

67- KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S. et MOLODTSOV N.V., Tetrahedron, 1968, 24, 5587, page 103.

68- KOVACIK V., BAUER S., ROSIK J. et KOVAC P., Carbohyd. Res., 1968, 8, 282, pages 42, 81, 90, 135, 149.

69- KOVACIK V., BAUER S. et ROSIK J., Carbohyd. Res., 1968, 8, 291 page 92.

70- KOVACIK V., MIHALOV V., HIRSCH J. et KOVAC P., Biomed. Mass Spectrom., 1978, 5, 736, page 92.

71- KRONE H. et BECKEY H.D., Org. Mass Spectrom., 1969, 2, 427, page 116

72- KRONE H. et BECKEY H.D., Org. Mass Spectrom., 1970, 5, 983, page 116

73- KUNZ A. et HUDSON C.S., J. Amer. Chem. Soc., 1926, 48, 1978, page 132.

74- LENNARTSON G., LUNDBLAD A., LUNDSTEN J., SVENSSON S. et HAGER A., Eur. J. Biochem., 1978, 83, 325, pages 99, 135,145, 162.

75- LINDBERG B., LONNGREN J. et NIMMICH W., Carbohyd. Res., 1972, 23, 47, page 75.

76- LINDBERG B., LONNGREN J., THOMPSON J. L. et NIMMICH W., Carbohyd. Res., 1972, 25, 49, pages 75, 95.

77- LINDBERG B. et SAMUELSSON K., Carbohyd. Res., 1973, 30, 63, pages 75, 95.

78- LUNDBLAD A. et SVENSSON S., Biochemistry, 1973, 12, 306, page 75.

79- Mc KLOSKEY J.A., LAWSON A.M., TSUBOYAMA K., KRUEGER P.M. et STILLWELL R.N., J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 4182, page 66

80- MONONEN I., FINNE J. et KARKKAINEN J., Carbohyd. Res., 1978, 60, 371, page 89.

81- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chem. Soc., 1968, 50, 857, page 119, 133.

82- MORELL A.G., IRVINE R.A., STERNLIEB I., SCHEINBERG I.H. et ASHWELL G., J. Biol. Chem., 1968, 243, 155, page 1.

83- MURATA T., ARIGA T., OSHIMA M. et MIYATAKE T., J. Lipids Res., 1978, 19, 370, page 114.

84- RUBIN S., RANDALL M., KAMEN M.D. et HYDE J.L., J. Amer. Chem. Soc., 1951, 63, 877, page 5.

85- SCHAUER R., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1973, 12, 127, page 62.

86- SCHAUER R., BUSCHER H.P. et CASALS-STENZEL J., Biochem. Soc. Symp., 1974, 40, 87, page 62.

87- SCHMID K., POLIS A., HUNZIKER K., FRICKE R. et YAGOSHI M., Biochem. J., 1967, 104, 361, page 128

88- SCHMID K., KAUFMANN H., ISEMURA S., BAUER F., EMURA J., MOTOYAMA T., ISHIGURO M. et NANNO S., Biochemistry, 1973, 12, 2711, page 129.

89- SCHMID K., NIMBERG R.B., KIMURA A., YAMAGUSHI H. et BINETTE J.P., Biochem. Biophys. Acta, 1977, 492, 291, pages128,165.

90- SMIRNOVA G.P., CHEKAREVA N.V., CHIZHOV O.S., ZOLOTAREV B.M. et KOCHETKOV N.K., Carbohyd. Res., 1977, 59, 235, page 75.

91- STALLBERG- STENHAGEN S. et STENHAGEN E., J. Biol. Chem., 1948, 173, 383, page 5.

92- STALLBERG-STENHAGEN S. et STENHAGEN E., J. Biol. Chem., 1950, 183,

93- STRECKER G., PEERS M.C., MICHALSKI J.C., HONDI-ASSAH T., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J., FARRIAUX J.P., MAROTEAUX P. et DURAND P., Eur. J. Biochem., 1977, 75, 391, page 170.

94- SVENNERHOLM L., Meth. Carbohyd. Chem., 1972, 6, 464, page 62.

95- SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. et WELLS W.W., J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 2495, page 56.

96- von NICOLAI H., EGGE H. et ZILLIKEN F., Z. Natürforsch, 1975, 30c, 451, pages 62, 111.

97- WARREN L., Biochem. Biophys. Acta, 1977, 486, 145, page 62.

98- WINTERBURN P.J. et PHELPS C.F., Nature, London, 1972, 236, 147, page 1.

99- YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem., 1962, 51, 359, page 119.

100- YAMASHITA K., TACHIBANA Y. et KOBATA A., Arch. Biochem. Biophys., 1976, 174, 582, page 126.

101- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G., J. Chromatog., 1972, 69, 291, pages 124, 130.

102- ZINBO M. et SHERMANN W.R., J. Amer. Chem. Soc., 1970, 92, 2105, page 66.