

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Nelly VISEUX

DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE INTEGREE
POUR L'ANALYSE STRUCTURALE DE GLYCANNES



Soutenue le 31 octobre 1996 devant la commission d'examen :

Président : Professeur André Verbert, Lille
Rapporteurs : Professeur Catherine E. Costello, Boston
Docteur Alain van Dorsselaer, Strasbourg
Examineurs : Professeur Edmond de Hoffmann, Louvain-la-Neuve
Professeur Bruno Domon, Lille

à Christophe,

à nos parents,

à mes grands-mères.

Professeur André Verbert, vous m'avez accueillie dans votre laboratoire pour un temps somme toute long, vous m'y avez permis d'entreprendre ce travail et de le mener à bien, c'est fort justement que vous êtes aujourd'hui le président de ce jury. Soyez-en remercié.

Professeur Catherine Costello et Docteur Alain van Dorsselaer, vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de siéger dans ce jury. Votre présence est un encouragement à plus d'un titre, recevez mes respectueux remerciements.

Professeur Edmond de Hoffmann, j'ai eu beaucoup de bonheur à travailler avec vous et votre équipe, et votre contribution est fondamentale dans la réalisation de cette thèse. Votre participation à ce jury est un témoignage précieux de cette collaboration. Soyez-en profondément remercié.

Professeur Bruno Domon, votre arrivée au sein du laboratoire a signifié un profond bouleversement dans mon travail. Mais, à aucun moment, vous n'avez trahi la confiance que je vous ai témoignée. Pour avoir su me prodiguer conseils et encouragements, pour avoir su donner vie à ce projet et espoir en mon avenir, recevez, en toute amitié, mes plus fervents remerciements.

Je tiens également à associer, au sein du laboratoire de Chimie Biologique, Michelle et Brigitte, ainsi que les personnes, qui, par leurs sourires, leurs gestes et leurs paroles, m'ont apporté sans compter, tout au long de ces années, un soutien et des encouragements complices. Merci, également, en toute amitié à Yves ainsi qu'à Annick, Raoul et Alex, à Louvain-la-Neuve, qui n'ont jamais lésiné sur leur disponibilité, leur compétence et leur gentillesse pour permettre la réalisation de ce travail.

Un merci tout particulier à Frédéric, pour avoir su m'épauler lors de la transition de sujet et envers lequel je conserve une dette, et à Danielle, alliée des bons et des mauvais jours, dont la présence longtemps indéfectible m'a été précieuse.

En dernier lieu, je souhaite remercier mes proches, en particulier mes parents, qui ont été mes plus fidèles et attentifs supporteurs au cours de cette longue et incertaine aventure, les parents de Christophe, pour leur enthousiasme et leur confiance, sans oublier Christophe, qui, des heures sombres aux jours plus gais, de près ou de loin, n'a jamais cessé de croire à l'aboutissement de cette thèse.

Qu'à tous, ce travail soit le témoignage de ma profonde et éternelle gratitude.

Le présent travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, au sein du Laboratoire de Chimie Biologique, UMR du CNRS n°111, dirigé par le Professeur André Verbert. Il a été entrepris en novembre 1994, à l'initiative du Professeur Bruno Domon, qui en a assuré la direction.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS :

Structural Analysis of Permethylated Oligosaccharides by Tandem Electrospray Mass Spectrometry

N. Viseux, E. de Hoffmann and B. Domon

Anal. Chem. (1996) *Soumis à publication*

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Post Source Decay Mass Spectrometry of Permethylated Oligosaccharides

N. Viseux, J. Lemoine and B. Domon

J. Mass Spectrom. (1996) *Manuscrit en préparation*

Characterization of Interglycosidic Linkages by Tandem Mass Spectrometry

N. Viseux, E. de Hoffmann and B. Domon

J. Mass Spectrom. *Manuscrit en préparation*

Methylation Analysis of Oligosaccharides Based on Tandem Mass Spectrometry of Alkylglycosides

N. Viseux, E. de Hoffmann and B. Domon

Anal. Biochem. *Manuscrit en préparation*

Interpretation of MS/MS Spectra of Oligosaccharides Assisted by Computer

B. Domon and N. Viseux

J. Mass Spectrom. *Manuscrit en préparation*

COMPTE-RENDUS DE CONFERENCES :

B. Domon & N. Viseux

Structural Characterization of Glycoproteins and Glycans by Mass Spectrometry

Atelier INSERM n°82, 3 et 4 juin 1996, Le Vésinet (France)

B. Domon, G. Dubreucq, E. de Hoffmann & N. Viseux

Methylation Analysis of Oligosaccharides Revisited: CIMS/MS of Permethylated Ethyl-Glycosides

Proceedings of the XXth ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, 12-16 mai 1996, Portland (Etats-Unis)

COMMUNICATIONS :

B. Domon, G. Dubreucq, E. de Hoffmann & N. Viseux (communication écrite)

Methylation Analysis of Oligosaccharides Revisited: CIMS/MS of Permethylated Ethyl-Glycosides

Proceedings of the XXth ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, 12–16 mai 1996, Portland (Etats–Unis)

N. Viseux, G. Dubreucq, E. de Hoffmann & B. Domon (communication orale)

An Integrated Methodology for Structural Analysis of Glycans Based on Tandem Mass Spectrometry

XVIIIème International Carbohydrate Symposium, 21–26 juillet 1996, Milan (Italie)

N. Viseux, E. de Hoffmann & B. Domon (communication écrite)

An Integrated Methodology for Structural Analysis of Glycans Based on Tandem Mass Spectrometry

Assemblée annuelle de la Société Belge de Spectrométrie de Masse, 13 septembre 1996, Louvain–la–Neuve (Belgique)

	pages
Abréviations	XI
Introduction	1
Généralités	2
1. NATURE ET VARIABILITE DES STRUCTURES GLYCANNIQUES	3
1.1. Rôles biologiques des glycoconjugués	3
1.2. Structures des glycannes de glycoconjugués	4
2. METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCANNES	10
2.1. Introduction générale	10
2.1.1. Isolement et purification des glycannes de glycoconjugués	10
2.1.2. Détermination de la composition	12
2.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire	14
2.2. Méthodes chimiques d'analyse structurale	15
2.2.1. Analyse de glycannes natifs	16
<i>Hydrolyse en milieu acide</i>	16
<i>Acétolyse</i>	22
<i>Solvolyse par l'acide fluorhydrique</i>	25
<i>Oxydation periodique et Dégradation de Smith</i>	27
2.2.2. Analyse de glycannes perméthylés	28
<i>Méthylation</i>	28
<i>Hydrolyse de glycannes perméthylés</i>	30
<i>Méthode de Lindberg</i>	31
<i>Clivage réductif</i>	33
2.3. Méthodes enzymatiques d'analyse structurale	35
2.3.1. Introduction	35
2.3.2. Spécificités des exoglycosidases	36
<i>Spécificités glyconique et aglyconique des exoglycosidases</i>	37
<i>Transglycosylation</i>	39
2.3.3. Analyse des produits de digestions enzymatiques	39
2.4. Amination réductive	40
2.5. Spectrométrie de masse	47
2.5.1. Introduction	47
2.5.2. Les techniques classiques d'ionisation	48
<i>Impact électronique</i>	48
<i>Ionisation chimique</i>	52
2.5.3. Les techniques de désorption/ionisation et de nébulisation	53

<i>Fast Atom Bombardment</i>	53
<i>Désorption laser assistée par matrice</i>	55
<i>Electrospray</i>	56
2.5.4. La spectrométrie de masse en tandem	57
<i>Principe général</i>	57
<i>Principe de la spectrométrie de masse en tandem sur un appareil triple-quadripôles</i>	59
<i>Principe de la PSD (post-source decay)</i>	60
<i>Application de la spectrométrie de masse en tandem aux glycanes et glycoconjugués</i>	61
2.6. Stratégies intégrées	64
Résultats et Discussion	71
1. INTRODUCTION	72
2. DETERMINATION DE LA SEQUENCE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM	73
2.1. Oligosaccharides dérivés par amination réductive	73
2.2. Oligosaccharides dérivés par acétylation	88
2.2.1. ESMS/MS d'oligosaccharides peracétylés	88
2.2.2. Caractérisation des sous-structures des fragments B peracétylés par MS/MS	95
<i>Etude des fragments B à m/z 618</i>	95
<i>Etude des fragments B à m/z 848</i>	97
2.3. Oligosaccharides dérivés par perméthylation	100
2.3.1. ESMS/MS d'oligosaccharides perméthylés	100
<i>Oligosaccharides de la série LNF monofucosylés</i>	102
<i>Oligosaccharides renfermant un résidu de N-acétylhexosamine</i>	106
<i>Oligosaccharides de la série LNF difucosylés</i>	110
<i>Oligosaccharides de la série LST</i>	112
2.3.2. Caractérisation des sous-structures des fragments B perméthylés par MS/MS	114
<i>Etude des fragments B à m/z 464</i>	114
<i>Etude des fragments B à m/z 638</i>	116
<i>Etude des fragments B à m/z 825</i>	120
2.3.3. ESMS/MS d'oligosaccharides dérivés par amination réductive et perméthylés	123
2.3.4. MALDPSD/MS d'oligosaccharides perméthylés	125
<i>Résultats préliminaires</i>	125
<i>Etude des oligosaccharides perméthylés en mode PSD</i>	128

2.4. Interprétation des spectres MS/MS assistée par ordinateur	134
2.5. Conclusion	140
3. DETERMINATION DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES PAR GC/MS/MS	144
3.1. Problématique	144
3.2. Analyse des éthylglycosides perméthylés sélectivement deutérométhylés par GC	145
3.3. Fragmentation des éthylglycosides perméthylés sélectivement deutérométhylés	146
3.4. Additivité	159
3.5. Application à la détermination des liaisons glycosidiques d'oligosaccharides	160
3.6. Les deutérométhylglycosides perméthylés sélectivement éthylés	167
3.7. Conclusion	171
4. DETERMINATION DE LA CONFIGURATION DES CARBONES ANOMERIQUES PAR LA COMBINAISON DE DIGESTIONS ENZYMATIQUES ET DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE	175
4.1. Introduction	175
4.2. Dérivation par amination réductive	176
4.2.1. Dérivation d'oligosaccharides neutres	176
4.2.2. Dérivation d'oligosaccharides sialylés	179
4.3. Digestions par les exoglycosidases	180
4.3.1. Mise au point des conditions de digestions spécifiques	180
<i>Digestion par les β -galactosidases de <i>Streptococcus pneumoniae</i> et bovine testis</i>	182
<i>Digestion par la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean</i>	186
<i>Digestion par l'α-galactosidase de green coffee bean</i>	190
<i>Digestion par l'α-mannosidase de Jack bean</i>	190
4.3.2. Application des digestions enzymatiques à la caractérisation de N-glycannes	191
<i>Analyse de la fraction sialylée de l'échantillon 2ANeuAc</i>	191
<i>Analyse de la fraction neutre de l'échantillon 2ANeuAc</i>	193
4.4. Conclusion	196
Conclusion et Perspectives	197
Appendice Technique	201

Annexes	214
<i>Annexe 1 – Formules des principaux monosaccharides</i>	215
<i>Annexe 2 – Principales exoglycosidases de spécificité connue et disponibles commercialement</i>	216
<i>Annexe 3 – Nomenclature et structures des oligosaccharides étudiés</i>	223
<i>Annexe 4 – Calcul de la masse d'une structure saccharidique, à partir du tableau des incréments de masse</i>	225
<i>Annexe 5 – Listing du programme OLIGO.BAS</i>	228
Références bibliographiques	238

2AB	2-aminobenzamide
CI	(<i>Chemical Ionization</i>) Ionisation chimique
CID	(<i>Collision Induced Dissociation</i>) Dissociation induite par collision
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
EI	(<i>Electron Impact</i>) Impact électronique
ES	Electrospray
FAB	Fast Atom Bombardment
GC	(<i>Gas Chromatography</i>) Chromatographie en phase gazeuse
HF	Hydrogène fluorhydrique
HPAEC	(<i>High pH Anion Exchange Chromatography</i>) Chromatographie d'échange d'anions à haut pH
MALD	(<i>Matrix Assisted Laser Desorption</i>) Désorption laser assistée par matrice
MS	(<i>Mass Spectrometry</i>) Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
PAD	Détection ampérométrique pulsée
PMAA	(<i>Partially Methylated Alditol Acetates</i>) Alditols acétates partiellement méthylés
PMDE	(<i>Partially Methylated Deuteriomethylated Ethylglycosides</i>) Ethylglycosides partiellement méthylés et deutérométhylés
PMED	(<i>Partially Methylated Ethylated Deuteriomethylglycosides</i>) Deutérométhylglycosides partiellement méthylés et éthylés
PSD	Post Source Decay
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

La Biochimie connaît actuellement une révolution majeure, marquée par l'importance croissante de la glycobiochimie. Les preuves ne cessent de se multiplier, démontrant les rôles cruciaux joués par les molécules glucidiques, dans un large éventail de phénomènes biologiques. Les glycanes, conjugués aux lipides et aux protéines, sont impliqués dans des fonctions de structure, de protection et de reconnaissance, ainsi que dans des processus pathologiques. Leur position en surface des cellules en fait des intervenants privilégiés de tous les phénomènes d'interaction. Le potentiel d'information porté par ces molécules est lié à leur grande variété structurale, élaborée à partir d'un nombre relativement limité de monosaccharides. La compréhension des bases moléculaires des phénomènes biologiques impliquant ces glycanes nécessite la caractérisation structurale de ces derniers.

A la différence des protéines ou des acides nucléiques, la détermination des structures glycaniques est une tâche complexe requérant plus que l'élucidation de la simple séquence. Toutefois, la méthodologie utilisée pour leur analyse structurale en est encore à un stade précoce de développement et aucune des techniques proposées à ce jour ne permet d'obtenir la structure complète des glycanes. Aujourd'hui, la glycochimie se trouve confrontée à la nécessité de mettre au point une méthodologie performante, qui plus est, applicable aux microquantités d'échantillons fournies par les biologistes.

Les récentes techniques développées en spectrométrie de masse ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'analyse des biomolécules. Nous avons utilisé leur formidable potentiel, en combinaison avec les techniques de dégradation chimique et enzymatique, dans le but de développer une stratégie relevant le défi de la caractérisation structurale des glycanes.

La première partie de ce travail présente une introduction sur la diversité structurale des glycanes et les différentes techniques pouvant être mises en oeuvre pour l'étude de cette dernière. Nous décrivons ensuite trois approches permettant la détermination des caractéristiques structurales essentielles que sont la séquence, le type de liaison et la configuration des carbones anomériques des monosaccharides constitutifs. Ces trois méthodes peuvent être intégrées dans une stratégie générale applicable à la caractérisation des glycanes issus de glycoconjugués.

Généralités

1. NATURE ET VARIABILITE DES STRUCTURES GLYCANNIQUES

Les molécules glucidiques, au sein des systèmes biologiques, sont fréquemment conjuguées, par liaison covalente, à des lipides et des protéines, donnant naissance respectivement aux glycolipides et aux glycoprotéines. Par le biais de ces glycoconjugués, les fractions glucidiques, dénommées glycannes, sont localisées dans tous les compartiments cellulaires et sont impliquées dans de nombreuses et importantes fonctions biologiques.

1.1. Rôles biologiques des glycoconjugués

L'évocation de l'importance des rôles biologiques des glycannes de glycoconjugués fait référence à des fonctions de structure, de protection et de reconnaissance. Les glycoconjugués, présents dans tous les compartiments cellulaires, jusque dans le noyau ou les mitochondries, où ils ont été récemment mis en évidence (Levrat *et al.*, 1990; Ishihara *et al.*, 1987), ont des implications fonctionnelles multiples (pour références, Kobata, 1992; Varki, 1993).

L'examen plus précis de ces différentes fonctions, dans le but de cerner l'impact de la glycosylation sur les propriétés des glycoconjugués, se heurte à la difficulté d'établir des règles définies. Les fonctions des oligosaccharides sont diverses. On leur attribue des rôles d'ordre physico-chimique, par la modification de la structure, des propriétés physiques et dynamiques des protéines auxquels ils sont liés, de protection contre les dégradations chimiques ou enzymatiques, ou de contrôle de l'activité biologique, en particulier enzymatique, lectinique, hormonale et immunologique. Les fonctions de reconnaissance apparaissent cruciales (Sharon et Lis, 1993), du fait de la localisation des glycoconjugués en surface des cellules, et les oligosaccharides sont des intermédiaires de choix dans l'interaction entre cellule et molécule et au niveau intercellulaire. Ceci est notamment illustré par le cas des sélectines (Varki, 1994). Cette implication se manifeste autant dans un organisme sain que dans des cas pathologiques (Rademacher *et al.*, 1988). Il apparaît cependant hasardeux de vouloir généraliser les rôles observés à partir de cas particuliers. Ce constat, souligné par Varki (1993), témoigne du fait que, si l'on peut attribuer aux oligosaccharides des fonctions aussi diverses que celles que nous venons d'évoquer, des exemples contraires existent.

La glycobiologie, discipline en plein essor et qui s'intéresse aux implications biologiques des glycoconjugués, peut ainsi tirer pleinement parti de la caractérisation détaillée de structures glycaniques, chaque jour plus nombreuses. L'accès à la connaissance de telles structures rejaillit à la fois sur l'aspect fondamental de la compréhension de l'incidence de la glycosylation, mais également sur ses applications thérapeutiques. Les nouvelles perspectives offertes, dans ce domaine, par les glycoprotéines recombinantes ont renouvelé l'intérêt porté aux oligosaccharides et amené les glycobiologistes à s'intéresser de façon plus approfondie à leurs structures.

1.2. Structure des glycannes de glycoconjugués

Au contraire des protéines et des acides nucléiques, il est possible à partir d'un nombre restreint de monosaccharides d'élaborer un éventail considérable de structures différentes. Les principaux monosaccharides entrant dans la composition des glycannes de glycoconjugués – galactose, mannose, glucose, fucose, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine, acide N-acétylneuraminique – sont rappelés, pour mémoire, dans l'annexe 1. La diversité structurale de ces molécules provient du nombre de paramètres variables, pour chaque monosaccharide, et qui provoque, lors de l'enchaînement des unités saccharidiques, une croissance fulgurante du nombre de combinaisons possibles (Laine *et al.*, 1988). Il apparaît cependant que, parmi l'ensemble des structures envisageables, un nombre assez limité de molécules existent et peuvent être répertoriées dans une classification des glycoconjugués basée sur ces structures.

Le terme glycoconjugué regroupe trois grandes familles de composés. Les protéoglycannes composent un ensemble à part des glycoprotéines (Esko, 1991). Composant fondamental de la matrice extracellulaire, ces biomolécules portent sur leur fraction protéique des polysaccharides dénommés glycosaminoglycannes, comprenant 100 à 200 unités osidiques et qui se caractérisent par des unités disaccharidiques de répétition. La nature de ces dernières permet de classer ces protéoglycannes en plusieurs groupes (fig. 1). Ces structures présentent une certaine microhétérogénéité traduite notamment par des variations dans la sulfatation.

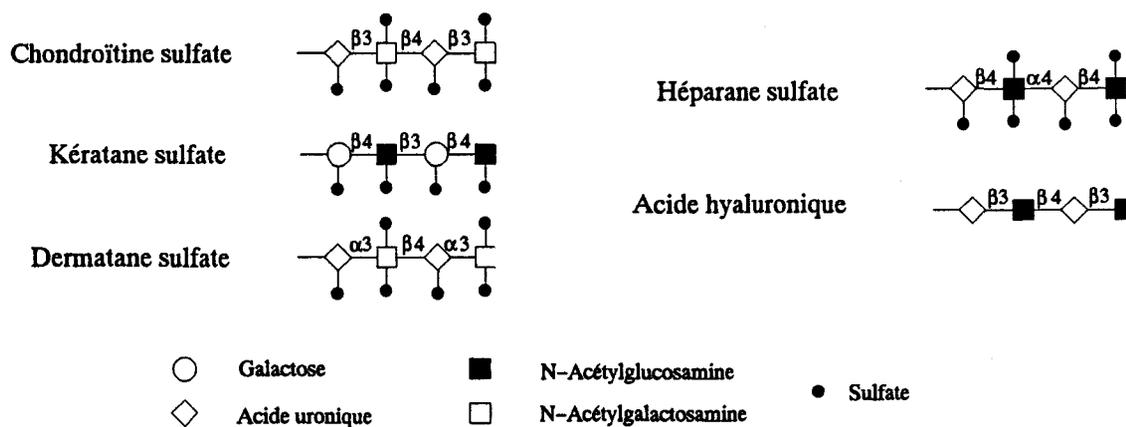


figure 1 – Classification des glycosaminoglycannes

Les glycolipides constituent la deuxième grande famille des glycoconjugués. Ils comprennent notamment les glycosphingolipides, les gangliosides, caractérisés par la présence de résidus d'acide sialique (Schnaar, 1994), et les glycosylphosphatidylinositols, impliqués dans l'ancrage membranaire de glycoprotéines (Menon, 1994). Les structures des glycanes de glycolipides peuvent être classées suivant la nature du noyau qu'elles renferment. La figure 2 reproduit les structures des cinq principaux noyaux décrits.

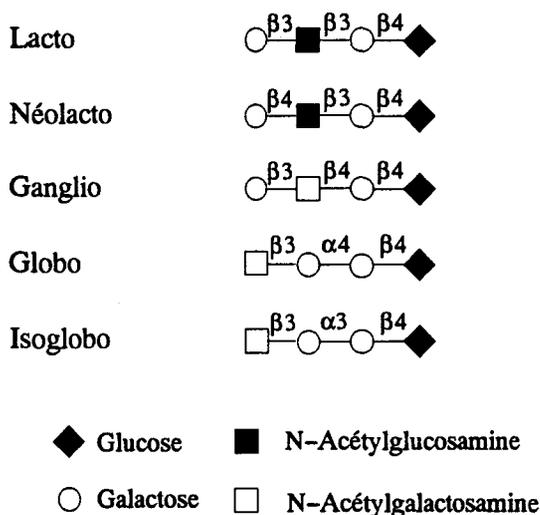


figure 2 – Principaux noyaux des structures glycaniques de glycolipides

Troisième et dernière grande famille des glycoconjugués, les glycoprotéines sont, de loin, les plus nombreuses et les plus étudiées (pour références, Montreuil, 1995). Elles présentent une grande variabilité structurale (Lis et Sharon, 1993), directement liée au large éventail de leurs fonctions biologiques.

Les glycannes de glycoprotéines sont classiquement répertoriés en deux grandes classes, les N- et les O-glycannes, suivant la nature de la liaison entre la fraction glycanique et la protéine (fig. 3) (Kornfeld et Kornfeld, 1976). Plus récemment, un nouveau type de liaison, faisant intervenir un atome de carbone et dénommé C-glycosylation, a été décrit (Hofsteenge *et al.*, 1994).

N-glycosylation	GlcNAc - Asn
O-glycosylation	GalNAc - Ser/Thr
C-glycosylation	Hex - Trp

figure 3 - Modes de liaison des glycannes de glycoprotéines

Les O-glycannes sont des structures de petite taille, comprenant généralement un nombre limité de monosaccharides, bien que des exemples de structures plus complexes aient été caractérisés (pour références, Gooley et Williams, 1994). Le mode de liaison des O-glycannes sur les acides aminés est variable, suivant la nature de l'organisme considéré, même si le motif GalNAc-Ser/Thr demeure le plus répandu (Kornfeld et Kornfeld, 1976). Ces glycannes présentent une importante variabilité structurale, à partir de motifs conservés (fig. 4). Ces cores sont l'objet d'un certain nombre de modifications comme l'addition de résidus de galactose en $\beta(1-3)$ ou $(1-4)$, de N-acétylglucosamine en $\beta(1-3)$ ou $(1-6)$, de fucose ou d'acide sialique, de substituants non osidiques tels des sulfates.

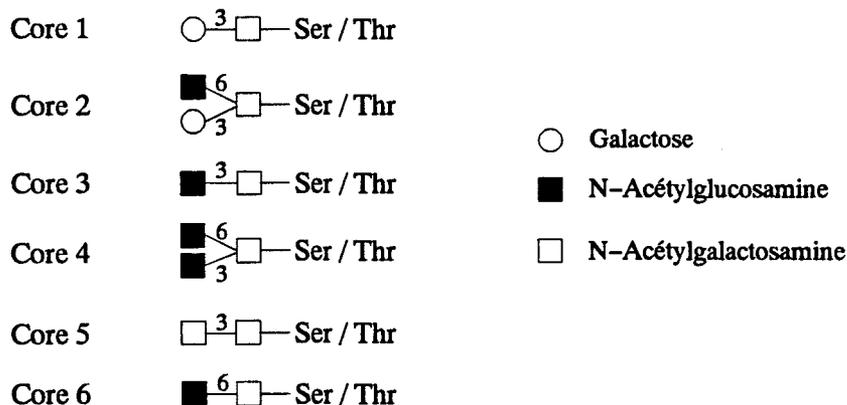


figure 4 - Principaux cores des O-glycannes

Les N-glycannes constituent comparativement des structures plus élaborées et sont subdivisés en trois groupes. A partir du core pentasaccharidique commun $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, l'addition de résidus de mannose en $\alpha(1-2)$ ou de séquences $\text{Gal}\beta(1-3/4)\text{GlcNAc}$ en nombre et localisation variables donnent naissance aux N-glycannes respectivement de type oligomannosidique et complexe (fig. 5). La coexistence, au sein d'un même glycanne, de ces deux types de motifs constitue le troisième sous-groupe, dénommé hybride (Tai *et al.*, 1977; Yamashita *et al.*, 1979).

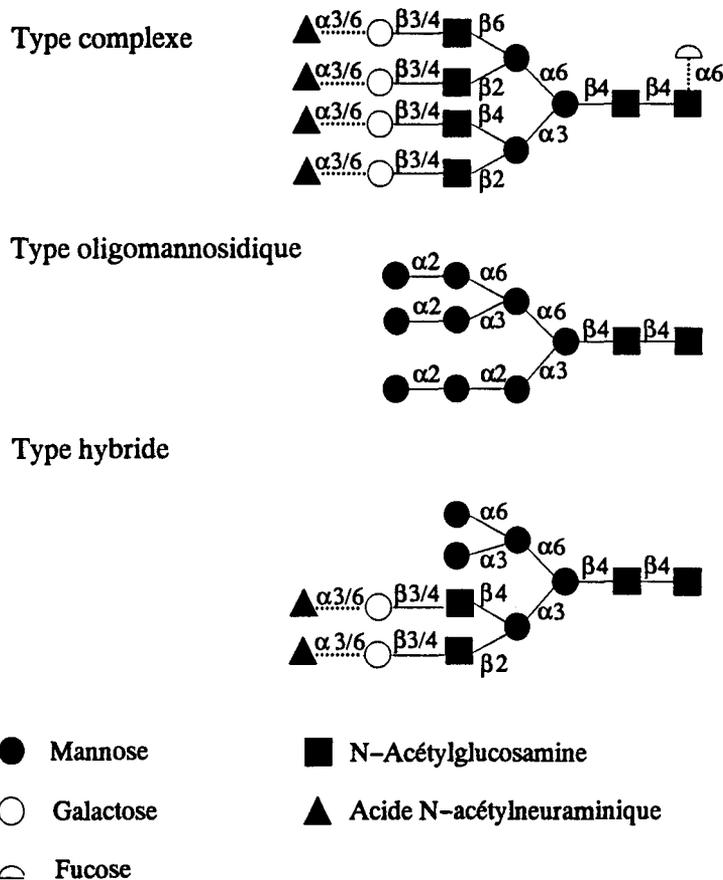
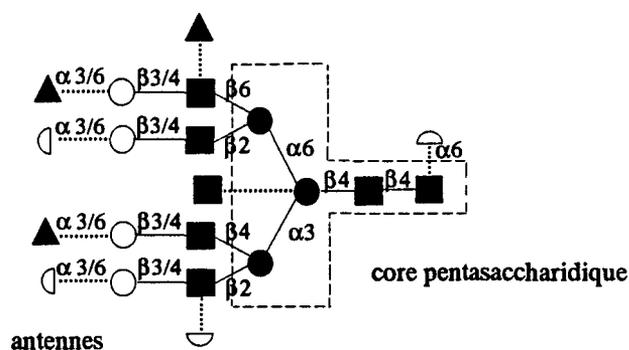


figure 5 – Exemples de structures des sous-groupes des N-glycannes

Si les N-glycannes sont en apparence plus complexes, leurs structures s'avèrent plus conservées que pour les O-glycannes. L'existence de motifs communs est le reflet de voies de biosynthèse partagées par les divers types cellulaires et les espèces. Les différences structurales observées sont la conséquence de l'action concertée de différentes glycosyltransférases et glycosidases (Waechter et Lennarz, 1976; Kornfeld et Kornfeld, 1985).

La variabilité glycanique des glycoprotéines donne naissance à deux notions, la microhétérogénéité et l'existence de glycoformes. La microhétérogénéité peut se concevoir comme l'ensemble des variations possibles autour d'une structure glycosidique donnée. La figure 6 illustre les différents aspects que peuvent prendre ces variations. Parmi celles-ci, notons le taux d'antennarisation, au maximum de cinq, la présence d'une N-acétylglucosamine en position bissectrice, la fucosylation en lieu et place de la sialylation (Varki, 1992) aux extrémités des antennes (Galili *et al.*, 1987), ou encore sur le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache et l'existence, au niveau des branches, de motifs poly-N-acétyllactosaminiques, rencontrés notamment lors des processus de cancérisation (Takasaki *et al.*, 1980).



- Antennarisation (structures bi, tri, tetra, pentaantennées)
- N-Acétylglucosamine bissectrice
- Position des antennes (cas des structures triantennées)
- Nature de la liaison Gal-GlcNAc (type I ou II)
- Fucosylation
- Sialylation
- Motifs poly-N-acétyllactosaminiques
- Substituants non glycosidiques

figure 6 – Nature des variations de structure des N-glycannes

Le concept de glycoformes (Rademacher *et al.*, 1988; Parekh, 1994) traduit, pour un peptide donné, l'ensemble des combinaisons possibles pour les structures glycaniques. Ainsi, si l'on considère un site de glycosylation particulier, l'on peut y mettre en évidence plusieurs glycannes de structures apparentées ou résolument distinctes. Pour une chaîne peptidique donnée, comportant plusieurs sites de glycosylation, les différentes combinaisons possibles prennent en compte les structures présentes aux sites glycosylés. En dernier lieu, parmi

l'ensemble des sites de glycosylation probables, les sites effectivement glycosylés caractérisent les glycoformes, les unes par rapport aux autres. Il apparaît donc que la glycosylation d'une protéine peut être variable, et ce, à plusieurs niveaux, dans le nombre et la nature de sites glycosylés et dans la combinaison et la nature des structures glycaniques rencontrées aux différents sites. La définition la plus précise de ces variations est l'enjeu de la caractérisation de la glycosylation des glycoprotéines, en particulier, recombinantes (Tsuda et al, 1990; Hokke *et al.*, 1995).

Afin de caractériser la structure des glycannes issus de glycoconjugués, des techniques chimiques, enzymatiques et spectroscopiques ont été élaborées que nous allons maintenant aborder.

2. METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCANNES

2.1. Introduction générale

L'analyse des glycanes est une tâche laborieuse et délicate, au regard de la complexité et de la variabilité des structures de ces oligomères, que nous avons pu appréhender dans le chapitre précédent. Une étude structurale d'un composé biologique, tel qu'un glycoconjugué, comprend plusieurs étapes. Une fois le composé identifié, généralement grâce à des propriétés biologiques particulières, l'isolement et la purification ont pour but de préparer ce composé sous une forme permettant sa caractérisation, biologique ou structurale.

La discussion concernant les procédés d'isolement et de purification de glycoconjugués ne faisant pas partie du cadre de ce travail, nous mentionnerons qu'en fait, il n'existe pas de méthodes standard, chaque cas étant particulier. L'expérimentateur a, à sa disposition, un certain nombre de techniques plus ou moins élaborées lui permettant de traiter spécifiquement le problème rencontré.

2.1.1. Isolement et purification des glycanes de glycoconjugués

La libération des glycanes de glycoconjugués peut faire intervenir, suivant les cas, des méthodes chimiques ou enzymatiques. Les N- et O-glycanes des glycoprotéines sont classiquement libérés par le biais, respectivement, de la dégradation alcaline (Lee et Scocca, 1972) et de la β -élimination (Carlsson, 1968). L'hydrazinolyse (Takasaki *et al.*, 1982), initialement décrite comme technique de N-déglycosylation, peut, dans certaines conditions, permettre le clivage des N- et des O-glycanes (Patel *et al.*, 1993). Une alternative chimique consiste en la trifluoroacétolyse (Svensson, 1980), qui, par le clivage des liaisons amides, permet également d'isoler ces deux types de glycanes. Cette technique est aussi applicable, au même titre que l'ozonolyse, à la libération de la fraction glycanique des glycolipides. Les méthodes enzymatiques concernent principalement les N-glycanes. Peu d'enzymes applicables aux O-glycanes ont été décrites à ce jour. L'on notera l'existence d'une endo- α -N-acétylgalactosaminidase isolée de *Streptococcus pneumoniae* (Umemoto *et al.*, 1977), qui clive la liaison entre le résidu de N-acétylgalactosamine et la sérine ou la thréonine, mais elle demeure d'un emploi limité en fonction de sa spécificité glyconique étroite. Deux types

d'enzymes peuvent être utilisés pour l'isolement des N-glycanes. Il s'agit, en premier lieu, des endoglycosidases, qui hydrolysent la liaison au sein de l'unité di-N-acétyl-chitobiosique. Ces enzymes telles que l'endo H ou l'endo D, apportent, par leur spécificité, des informations sur la structure des oligosaccharides libérés (Kobata, 1979). Elles sont à rapprocher des amidohydrolases, telles la PNGase F de *Flavobacterium meningosepticum* (Plummer *et al.*, 1984), qui sont également des outils de déglycosylation, grâce à la rupture des liaisons GlcNAc-Asn qu'elles provoquent.

A partir des glycanes isolés, plusieurs techniques de purification, essentiellement par chromatographie, sont envisageables. Y figurent la chromatographie basse pression (perméation de gel, échange d'ions; pour références, Kobata, 1994) et l'HPLC (phase normale, phase inverse, échange d'ions, perméation de gel; pour références, Honda, 1984; Hicks, 1988; Baenziger, 1994), largement décrites dans de nombreuses revues générales. Ces techniques, en fonction de leurs différentes modalités, s'appuient sur les propriétés des glycanes, pour réaliser un fractionnement, selon les différences de taille, ou plus exactement, de volume hydrodynamique, les propriétés de partition ou les états de charge des différents composants glucidiques d'un mélange. Plus récemment, la chromatographie d'échange d'anions à haut pH (Lee, 1990; Hardy et Townsend, 1994) a été introduite. L'un de ses avantages majeurs réside dans la possibilité d'analyser des oligosaccharides seuls ou en mélange, sans dérivation préalable, grâce à l'utilisation de la détection ampérométrique pulsée (Rocklin et Pohl, 1983). Cette technique permet la séparation des glycanes selon leur charge, leur taille mais également la position, l'anomérie et le type de liaison des monosaccharides constitutifs. A l'ensemble de ces techniques, s'ajoutent le fractionnement par chromatographie d'affinité, notamment sur lectines (Osawa et Tsuji, 1987).

L'électrophorèse capillaire (Linhardt, 1994) n'est pas à proprement parler une technique de purification car elle n'est pas applicable dans un but préparatif. Elle n'en demeure pas moins un moyen rapide et efficace d'analyse de mélanges complexes d'oligosaccharides naturellement chargés ou chimiquement dérivés.

L'étape suivante, après purification des glycanes de glycoconjugués, consiste à établir, de façon précise, les caractéristiques structurales de ces oligomères, relatives notamment à leur

structure primaire. La détermination de cette dernière est un des volets principaux de l'investigation structurale et se révèle beaucoup plus complexe que dans le cas des protéines ou des acides nucléiques. Par rapport à ces biomolécules, pour lesquelles l'élucidation de la structure primaire consiste à établir la séquence des éléments constitutifs, il s'agit, dans le cas des glycanes, de déterminer un certain nombre de caractéristiques structurales telles que la masse moléculaire du composé, la nature et la séquence des monosaccharides, les liaisons glycosidiques, le nombre et la position des points de branchement, la configuration des carbones anomériques et, enfin, la présence et la localisation de substituants non glycosidiques. Si la masse moléculaire d'un glycanne peut être aisément déterminée lors de la purification, par exemple, par perméation de gel ou, de façon plus actuelle, par spectrométrie de masse, les autres données structurales nécessitent, pour leur détermination, la mise en oeuvre de techniques particulières que nous allons maintenant détailler.

2.1.2. Détermination de la composition

La composition en monosaccharides d'un polymère glucidique nécessite la libération quantitative des oses polymérisés. L'un des principaux problèmes rencontrés lors de sa détermination concerne le choix des conditions de solvolysse permettant d'obtenir la coupure quantitative des liaisons glycosidiques. Un tel choix est très fréquemment assujéti à un compromis entre une coupure incomplète des liaisons, causée par des conditions trop douces, et la décomposition des monosaccharides, engendrée par des conditions trop sévères (Biermann, 1988). Les liaisons glycosidiques des osamines et des acides uroniques comptent parmi les plus résistantes et, à l'opposé, les acides sialiques sont libérés en conditions douces (Eylar et Jeanloz, 1962). La décomposition en milieu acide concerne principalement les pentoses et les désoxyhexoses, mais les acides uroniques et aldoniques, une fois libérés, peuvent être sujets à une décarboxylation, les osamines sont, pour leur part, relativement stables, exception faite de la N-desacétylation. L'existence de ce compromis entre libération quantitative et décomposition nécessite le plus souvent le calcul de facteurs correctifs pour chaque type de monosaccharide permettant l'estimation des pertes, par rapport à un standard interne, résistant à l'hydrolyse ou additionné après réaction, suivant les cas.

L'hydrolyse acide totale est une des techniques courantes de libération des monosaccharides de polymères. Plusieurs acides sont utilisables tels que l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique ou l'acide trifluoroacétique. Ce dernier présente l'avantage d'être facilement éliminable, comme l'acide chlorhydrique, mais de causer moins de dégradation que celui-ci. Deux études concernent plus particulièrement la décomposition des monosaccharides en présence d'acide trifluoroacétique (Albersheim *et al.*, 1967; Honda *et al.*, 1981) et quelques travaux portent sur les conditions utilisables pour la détermination de la composition des glycoconjugués par hydrolyse acide totale (Honda *et al.*, 1981, Biermann, 1988).

La méthanolyse, utilisant le méthanol chlorhydrique (MeOH/HCl), en milieu strictement anhydre et à température élevée (80°C), est une alternative provoquant une plus faible dégradation des oses, comparativement à l'hydrolyse, et l'on peut facilement remédier à la N-desacétylation partielle des monosaccharides qu'elle engendre (Clamp *et al.*, 1971, 1972). Chambers et Clamp (1971) ont étudié l'influence de la concentration en HCl sur le compromis libération-décomposition des oses. La méthanolyse génère cependant un mélange complexe de méthylglycosides, chaque monosaccharide étant détecté en théorie sous quatre formes isomériques possibles faisant intervenir la nature du cycle (isomérisation pyranne-furanne) et la configuration du carbone anomérique (anomérie α/β) (Laine *et al.*, 1972).

Nous mentionnerons également la solvolysse par l'acide fluorhydrique (Knirel *et al.*, 1989) détaillée plus avant dans ce chapitre. Alternative non destructrice à l'hydrolyse et à la méthanolyse, elle peut provoquer le clivage de toutes les liaisons glycosidiques (HF anhydre, 23°C), et permet, par réaction des α -glycosylfluorures formés en milieu aqueux, d'obtenir le mélange des monosaccharides constitutifs. Son emploi est néanmoins limité du fait des difficultés liées à son usage.

La chromatographie en phase gazeuse est la méthode classiquement utilisée pour l'analyse, en une seule étape, des monosaccharides libérés, après dérivation de ces derniers en composés volatils. Knapp (1979) a répertorié les différents types de dérivation décrits. Parmi les plus courants, citons la triméthylsilylation (Sweeley *et al.*, 1963), de loin la plus utilisée, l'acétylation appliquée aux monosaccharides réduits (Sawardeker *et al.*, 1965) et la trifluoroacétylation (Zanetta *et al.*, 1972). Les alditols acétates permettent l'analyse de

mélanges complexes mais se révèlent moins volatils que les dérivés triméthylsilylés, relativement instables et eux-mêmes moins volatils que les composés trifluoroacétylés, d'obédience, malgré tout, peu répandue. La confirmation de l'identification des différents dérivés par GLC est très souvent obtenue par le biais de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (Kochetkov et Chizhov, 1966; König *et al.*, 1973; Dutton, 1973, 1974; Kamerling *et al.*, 1975).

D'autres méthodes ont été développées ponctuellement comme l'HPAEC-PAD (Hardy *et al.*, 1988; Hardy, 1989; Lee, 1990), qui s'applique aux monosaccharides réducteurs non dérivés, ou l'HPLC (pour références, Chaplin, 1994).

2.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire

La Résonance Magnétique Nucléaire est une technique spectroscopique efficace et non destructive utilisée pour la caractérisation de structures glucidiques. De nombreuses informations structurales peuvent être déduites de telles analyses comme la séquence en monosaccharides, les types et anomérie de liaison ainsi que l'existence de points de branchements. Elle étudie la résonance de certains noyaux abondants dans les biomolécules tels que le proton ou, dans une moindre mesure, l'isotope 13 du carbone. La RMN permet en fonction des caractéristiques des signaux observés (déplacement chimique, constante de couplage, intensité) d'obtenir des informations structurales, mais également d'analyser l'homogénéité d'un échantillon et de confirmer la composition d'un polymère glucidique, en fonction de l'intensité de ces mêmes signaux. La structure primaire de glycanes peut être élucidée par l'analyse du comportement des seuls protons non échangeables d'une molécule glucidique (RMN ^1H) (pour références, Van Halbeek, 1994). Le spectre obtenu est alors utilisé comme une carte d'identité, permettant sa comparaison avec les spectres de témoins ou avec les données spectrales caractéristiques de glycanes répertoriées dans la littérature (pour références, Vliegthart *et al.*, 1983). L'élucidation complète du spectre n'est alors pas nécessaire. A contrario, dans le cas de structures relativement nouvelles, la caractérisation complète est requise et ne peut être réalisée par une telle analyse, en raison de l'importante complexité que peut revêtir un spectre de RMN du ^1H , en particulier en ce qui concerne les

signaux inclus dans le massif, partie du spectre qui comprend tous les signaux des protons non anomériques, à l'exclusion de ceux faisant partie de groupements marqueurs (structural reporter groups, Vliegthart *et al.*, 1983; Kamerling et Vliegthart, 1992). La RMN du ^{13}C permet d'obtenir comparativement plus d'informations structurales mais elle est très peu sensible, en raison de la faible abondance naturelle de ces noyaux. L'analyse met alors en jeu des techniques plus avancées telles que la RMN à deux dimensions, utilisant la corrélation homonucléaire, entre protons, ou hétéronucléaire, entre protons et atomes de carbone (Dabrowski, 1989).

Si l'élucidation structurale d'un glycanne est possible par RMN, il est à noter que l'utilisation de la seule RMN du ^1H nécessite, le plus souvent, des informations structurales complémentaires, obtenues par d'autres techniques. En dernier lieu, la RMN, bien que non destructive, est limitée à l'analyse des seuls glycanes purifiés et ne permet pas, à l'heure actuelle, l'analyse d'oligosaccharides disponibles en microquantités. Il apparaît dès lors nécessaire de mettre en oeuvre d'autres techniques d'élucidation structurale.

2.2. Méthodes chimiques d'analyse structurale

L'enjeu de l'analyse de la structure primaire des glycanes par les méthodes chimiques de dégradation consiste en l'obtention de composés plus faciles à caractériser, sous forme d'oligomères de taille réduite ou de monomères porteurs d'une information spécifique. Le recours aux méthodes chimiques est nécessaire car, à la différence des protéines ou des acides nucléiques, il n'existe pas d'enzymes de grande spécificité permettant une dégradation des glycanes en oligomères. Cependant, l'absence de méthodes chimiques standard oblige à un choix de l'une ou l'autre des techniques disponibles, souvent en fonction de la nature du glycanne étudié.

Parmi les méthodes chimiques de dégradation partielle, figurent les différentes réactions de solvolyses telles que l'hydrolyse, la méthanolyse, l'acétolyse et la formolyse. Nous avons décrit précédemment l'intérêt de l'hydrolyse et de la méthanolyse dans le cadre de la dégradation totale d'oligo- ou de polysaccharides, en vue de la détermination de leur composition en oses. Les techniques de solvolyses peuvent également être utilisées comme

méthodes de dégradation partielle, dans des conditions contrôlées, permettant une dépolymérisation relativement sélective.

Des techniques adaptées à des cas plus particuliers ont également été décrites. Il s'agit, entre autres, de l'oxydation périodique et de la méthode de dégradation apparentée, dite dégradation de Smith, utilisée de longue date dans l'analyse structurale des oligosaccharides et basée sur l'oxydation sélective de groupements hydroxyles vicinaux (Goldstein *et al.*, 1965).

Dans l'optique d'une analyse structurale détaillée comprenant la détermination des liaisons glycosidiques et des points de branchement, un certain nombre d'approches basées sur la dégradation des produits perméthylés ont été proposées. La perméthylation d'un composé glycosidique, suivie d'une dépolymérisation complète permet de mémoriser, par déduction, ceux parmi les groupements hydroxyles qui sont initialement impliqués dans les liaisons glycosidiques. La méthode la plus connue est celle des alditols acétates partiellement méthylés (PMAA, partially methylated alditol acetates) développée par Lindberg et coll. (Björndal *et al.*, 1970). Des variantes de cette méthode, dite de Lindberg, ont également été décrites, utilisant notamment la dépolymérisation par méthanolyse donnant naissance aux méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés (Fournet *et al.*, 1981). Plus récemment, Gray et coll. (Gray, 1990) ont proposé une méthode de dégradation réductive générant des anhydro-alditols partiellement méthylés et acétylés, ayant pour principal avantage de conserver la forme cyclique initiale des monosaccharides constitutifs.

Nous allons maintenant discuter, de façon plus détaillée, chacune des principales techniques précitées, tant pour la caractérisation d'oligosaccharides à l'état natif que perméthylés.

2.2.1. Analyse de glycannes natifs

Hydrolyse en milieu acide

L'hydrolyse en milieu acide est, de loin, la technique de solvolysse la plus couramment utilisée. Définie comme la coupure de la liaison glycosidique par addition d'une molécule d'eau (Biermann, 1988), elle est la réaction prédominante dans des solutions aqueuses diluées de glycosides et d'acides à des températures inférieures ou égales à 100°C (BeMiller, 1967).

Les acides les plus couramment utilisés pour la catalyse de cette réaction sont repris dans le tableau 1.

tableau 1 – Acides couramment utilisés pour l'hydrolyse acide (Biermann, 1988)

Acide	Molarité	pH
Chlorhydrique <i>aq</i> (HCl)	1 M	0,1
Sulfurique (H ₂ SO ₄)	0,5 M	0,3
Trifluoroacétique (CF ₃ COOH)	1 M	0,7
Acétique (CH ₃ COOH)	1 M	2,4

Effectuée en solution diluée ($\leq 1-2$ M), ne provoquant qu'une destruction minimale des monosaccharides libérés, l'hydrolyse permet la dépolymérisation d'oligo- ou de polysaccharides, grâce à une labilité plus ou moins prononcée des liaisons glycosidiques des différents types de monosaccharides. Un certain nombre de conditions standard ont été décrites dans la littérature (tableau 2). Le comportement en milieu acide des oligosaccharides n'a cependant donné lieu qu'à peu d'études systématiques, comparativement à l'importante littérature existant sur l'hydrolyse de monoglycosides (pour références, BeMiller, 1967; Capon, 1969). Ceci illustre la difficulté d'établir, de façon univoque, l'influence des différents facteurs structuraux dans le cas d'oligosaccharides. La compréhension des mécanismes régissant l'hydrolyse des polymères se base donc sur les études effectuées au niveau des monomères.

tableau 2 – Conditions utilisées pour la dégradation d'oligosaccharides natifs

Acide	Conditions	Applications
H ₂ SO ₄ <i>aq</i>	0,25M, 18h, 100°C	Hydrolyse des polysaccharides
HCl <i>aq</i>	4M, 4-6h, 100°C	Hydrolyse des glycoprotéines
TFA _{aq}	2-4M, 4-8h, 100°C	Hydrolyse des glycoprotéines

Les nombreuses données rassemblées sur les constantes de vitesses et les autres paramètres cinétiques de l'hydrolyse acide de glycosides ont permis l'émergence d'un mécanisme, bien que la comparaison des éléments bibliographiques disponibles soit compliquée par la variabilité des conditions expérimentales utilisées.

Le mécanisme admis pour l'hydrolyse acide, initialement proposé par Edward (1955) et Foster et Overend (1955), est repris dans la figure 7a (d'après BeMiller, 1967). Ce mécanisme met en jeu une décomposition par rupture de la liaison entre l'atome d'oxygène glycosidique protoné et le carbone C₁ (Bunton et al., 1955). Ces auteurs ont discuté de la possibilité d'une protonation sur l'atome d'oxygène cyclique, orientant différemment le mécanisme et impliquant une ouverture du cycle (fig. 7b), possibilité par ailleurs contestée (Bochkov et Zaikov, 1979). Après l'étape de protonation rapide et contrôlée à l'équilibre, survient l'étape déterminante de l'hydrolyse où se produit l'hétérolyse unimoléculaire qui conduit à la formation d'un intermédiaire oxonium cyclique. L'existence de ce dernier a été démontrée notamment par des expériences utilisant de l'eau marquée à l'oxygène 18.

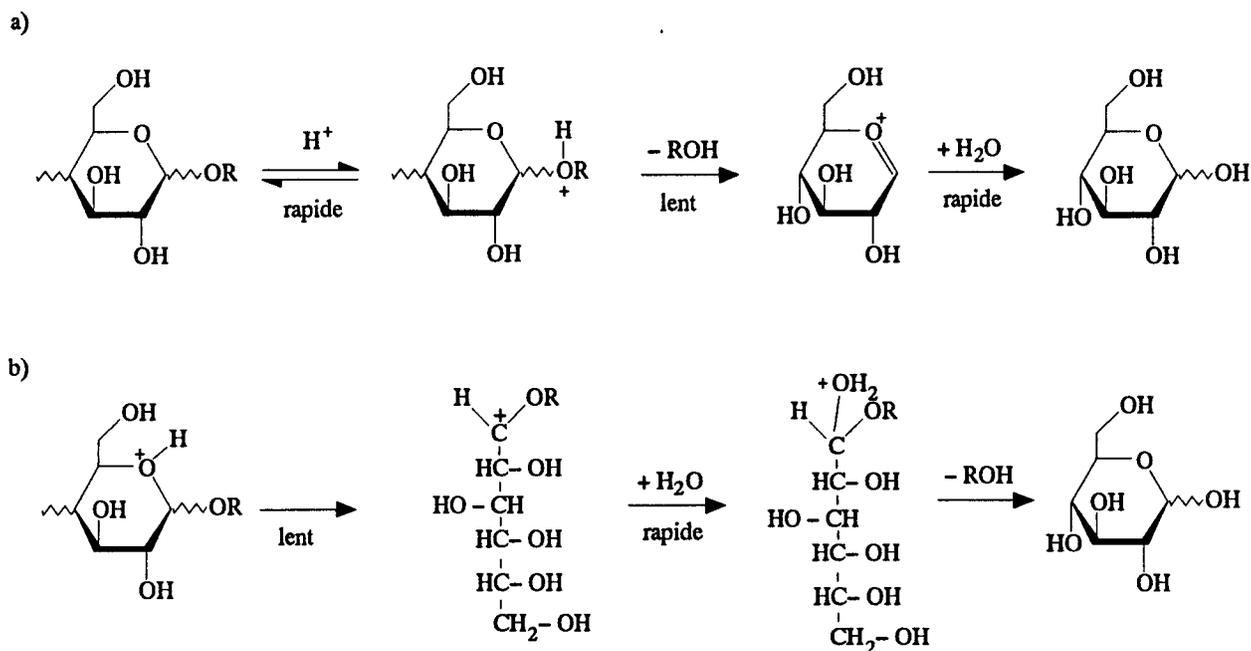


figure 7 – Mécanismes proposés pour l'hydrolyse acide des molécules glucidiques

Des vitesses d'hydrolyse très variables ont été observées en fonction des différents types de monosaccharides (oses neutres, acides uroniques ou osamines). L'hydrolyse apparaît influencée par de nombreux paramètres dont l'importance relative varie en fonction des glycosides considérés, compliquant l'explication des différences de réactivité de ces glycosides. Parmi ces facteurs, figurent la taille des cycles (de 5 ou 6 atomes), la configuration, la conformation et la polarité des oses ainsi que la taille et la polarité de l'aglycone (BeMiller,

1967). Leur incidence peut être traduite en termes d'effets stériques et électroniques. La compréhension du rôle de ces facteurs revêt une importance particulière, étant donné que les mécanismes proposés pour l'hydrolyse acide possèdent des analogies certaines avec ceux observés en phase gazeuse et régissant la fragmentation d'oligosaccharides protonés en spectrométrie de masse.

L'existence du cycle glycosidique ainsi que sa taille influencent la vitesse d'hydrolyse. Ceci est illustré par le fait que des composés acycliques, tels qu'ils peuvent être obtenus après oxydation périodique, sont hydrolysés beaucoup plus rapidement que leurs analogues cycliques. Une des explications avancées attribue cette différence à la possible existence d'effets inductifs stabilisateurs au niveau du cycle glycosidique. Il s'avère, d'autre part, qu'au sein des composés acycliques, la nature des fonctions générées par oxydation périodique possède une influence propre. Il a été prouvé que la vitesse d'hydrolyse de ces résidus, pour lesquels les fonctions aldéhydiques (CHO) sont réduites (CH₂OH), est plus importante que pour ces mêmes fonctions oxydées (COOH), elles-mêmes hydrolysées plus rapidement que dans le cas des fonctions aldéhydiques initiales.

En second lieu, la nature du cycle est également déterminante. Les monosaccharides furannosidiques sont connus pratiquement pour être hydrolysés plus rapidement que les résidus pyranosidiques, bien que le mécanisme de leur hydrolyse demeure encore incertain. Dans l'hypothèse d'un mécanisme identique pour ces deux types de composés, la formation d'un ion carbonium en C₁ au cours de l'hétérolyse apparaît favorisée pour un furanose, facilitant par conséquent l'hydrolyse de ce dernier. La vitesse d'hydrolyse obtenue expérimentalement est de fait supérieure de deux ordres de grandeur à celle d'un pyranose. Le tableau 3 illustre cette différence, de même qu'il met en évidence l'influence de la configuration anomérique sur la vitesse d'hydrolyse.

De façon générale, les glycosides de configuration β, possédant le groupement méthoxy anomérique en position équatoriale, pour les oses de la série D, sont hydrolysés deux fois plus vite que leurs homologues α.

tableau 3 – Influence de la configuration anomérique et de la nature des cycles sur les constantes de vitesse relatives (HCl 0,5 N, 75°C)
(d'après BeMiller, 1967)

Glycoside	Vitesse relative
Méthyl- α -D-Glcp	1,0
Méthyl- β -D-Glcp	1,9
Méthyl- α -D-Manp	2,4
Méthyl- β -D-Manp	5,7
Méthyl- α -D-Galp	5,2
Méthyl- β -D-Galp	9,2
Méthyl- α -D-Manf	150
Ethyl- β -D-Glcf	580

L'influence de la configuration des atomes de carbone peut être discutée sur la base du nombre de substituants en position axiale (Edward, 1955; Foster et Overend, 1955), ceci se traduisant sur la mise en conformation plus ou moins favorisée lors de la formation de l'intermédiaire oxonium cyclique (Feather et Harris, 1965).

Les substituants d'un résidu glycosidique influencent également la vitesse d'hydrolyse, bien qu'il soit difficile de distinguer entre l'influence de la polarité des substituants et celle liée à la stabilité conformationnelle acquise par le monosaccharide porteur de ces substituants. De façon simplifiée, les oses sont hydrolysés plus lentement que les désoxyoses correspondants, du fait de la protonation des groupements hydroxyles, qui dessert la protonation conduisant à la formation de l'intermédiaire oxonium cyclique. La présence d'un hydroxyle respectivement sur le C₂, le C₃ ou le C₅ diminue la vitesse d'hydrolyse d'un facteur 1100, 3 et 7, respectivement (Dyer *et al.*, 1962). A titre d'exemple, l'influence de la nature du substituant en position 6 est présentée dans le tableau 4.

Ces données indiquent clairement que les pentoses et les 6-désoxyhexoses sont hydrolysés plus rapidement que les hexopyranoses correspondants.

En dernier lieu, la nature de l'aglycone et celle de la liaison interglycosidique affectent aussi la vitesse d'hydrolyse comme l'illustrent les tableaux 5 et 6.

tableau 4 – Vitesse d'hydrolyse relative de méthyl- α -D-aldopyranoses en fonction de la substitution en position 6 (H_2SO_4 0,5M, 80°C)

R	Vitesse relative	Référence
H	4,9	a)
CH_3	5,1	a)
CH_2OH	1,0	a)
$\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$	0,67	a)
COOH	0,04	b)
COOEt	$5,0 \cdot 10^{-3}$	b)

(a) Bochkov et Zaikov, 1979; (b) BeMiller, 1967

tableau 5 – Influence de l'aglycone sur l'hydrolyse du β -D-glucopyranoside (H_2SO_4 0,5M, 80°C)
(d'après BeMiller, 1967)

Nature de l'aglycone	Vitesse relative
Méthyl	1,00
Ethyl	1,16
i-Propyl	1,85
Cyclohexyl	2,34
Benzyl	1,17
Allyl	1,36
Phényl	9,47

tableau 6 – Influence de la liaison glycosidique sur la vitesse d'hydrolyse (HCl 0,1M, 80°C)
(d'après BeMiller, 1967)

Type de liaison glycosidique	Vitesse relative
Glc (β 1-2)Glc Sophorose	1,18
Glc (β 1-3)Glc Laminaribiose	1,00
Glc (β 1-4)Glc Cellobiose	0,67
Glc (β 1-6)Glc Gentiobiose	0,59

Acétolyse

L'acétolyse, définie comme l'action de l'anhydride acétique en présence d'un catalyseur acide, provoque le clivage préférentiel des liaisons (1-6), ce qui en fait une réaction complémentaire de l'hydrolyse pour laquelle ce type de liaison est relativement stable (Guthrie et McCarthy, 1967; Bochkov et Zaikov, 1979; Geyer et Geyer, 1994).

Au cours de l'acétolyse, se produisent des réactions de rupture des liaisons glycosidiques concomitantes à des réactions d'estérification des fonctions hydroxyles libres. Le mélange le plus couramment utilisé se compose d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 10:10:1). D'autres combinaisons ont également été décrites telles que les associations anhydride acétique/acide perchlorique, anhydride acétique/chlorure de zinc, anhydride acétique/acide trifluoroacétique. L'acide sulfurique, qui catalyse la rupture des liaisons glycosidiques, joue également, avec l'anhydride acétique, le rôle d'agent déshydratant dans le mélange. La vitesse d'acétolyse est fonction de la concentration en acide sulfurique, concentration qui doit, toutefois, demeurer inférieure à 5% pour éviter la destruction des oses. De plus, une concentration trop importante en acide sulfurique ou une température de réaction supérieure à 40°C entraîne la formation d'acide sulfoacétique, diminuant de facto la proportion d'acide sulfurique et donc, l'efficacité de la réaction (Rosenfeld et Ballou, 1974). A la différence de ce qui est observé lors de l'hydrolyse, la N-acétylation résiste à l'acétolyse. Les liaisons des résidus sialosyles sont étonnamment stables (Kuhn et Wiegandt, 1963) alors que les liaisons fucosyles sont rapidement clivées (Naik *et al.*, 1985).

Le mécanisme réactionnel proposé par Rosenfeld et Ballou (1974) est repris dans la figure 8. Ces auteurs ont réalisé une étude des vitesses relatives de différents disaccharides (tableau 7).

Ces données mettent clairement en évidence la plus grande réactivité des liaisons de type (1-6) par rapport aux autres types de liaisons. L'on constate également une rupture préférentielle des liaisons β par rapport aux liaisons α , ce qui est justifié par un problème d'encombrement stérique dans ce dernier cas. La vitesse d'acétolyse apparaît liée, outre l'anomérisation et le type de liaison des oses, à leur configuration. Ainsi la nature du substituant en

C₂ et en C₄ de l'ose en position terminale non réductrice influence la réaction. Un résidu de glucose est ainsi plus stable qu'un résidu de N-acétylglucosamine, elle-même plus stable qu'un résidu de galactose. De plus, la présence d'un désoxyose concorde avec une diminution de la vitesse d'acétylyse.

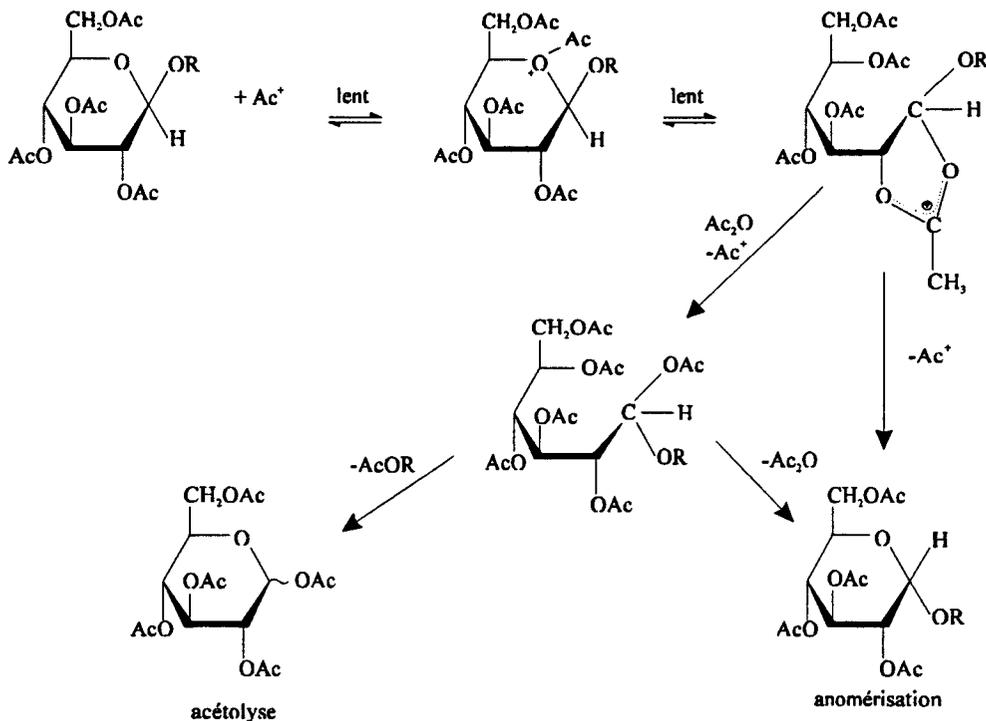


figure 8 – Mécanisme de l'acétylyse (Rosenfeld et Ballou, 1974)

Lors de l'acétylyse, une réaction d'anomérisation survient, avec formation préférentielle de l'anomère α , dans le cas des oses de la série D. Cette anomérisation entre en compétition avec la rupture de la liaison glycosidique, bien qu'elle ne soit que rarement plus rapide (Bochkov et Zaikov, 1979). L'explication apportée par Rosenfeld et Ballou (1974) est fondée sur l'influence des groupements électrophiles de l'ose en position terminale réductrice. Il est décrit qu'un nombre important de ces groupements, en l'occurrence les substituants O-acétyl ainsi que l'oxygène cyclique, si ils sont en position α de l'oxygène glycosidique, favorisent la réaction d'anomérisation par rapport à la rupture de la liaison glycosidique. Ceci est corroboré par le fait que, dans le cas d'une liaison en (1-2), l'on dénombre trois sites favorables à l'anomérisation contre deux dans le cas des liaisons (1-3) et (1-4), et un seul pour une liaison (1-6), ce qui est en accord avec les données expérimentales.

tableau 7 – Vitesses relatives d'acétolyse de disaccharides
(d'après Rosenfeld et Ballou, 1974)

Disaccharides	Vitesse relative
α -D-Glcp-(1→2)-D-Glc	0,2
α -D-Glcp-(1→3)-D-Glc	0,3
α -D-Glcp-(1→4)-D-Glc	1,0
α -D-Glcp-(1→6)-D-Glc	7,9
β -D-Glcp-(1→2)-D-Glc	1,4
β -D-Glcp-(1→3)-D-Glc	1,9
β -D-Glcp-(1→4)-D-Glc	1,2
β -D-Glcp-(1→6)-D-Glc	58,0
α -D-Manp-(1→2)-D-Man	0,2
β -D-Manp-(1→3)-D-Man	2,9
α -D-Manp-(1→4)-D-Man	1,4
α -D-Manp-(1→6)-D-Man	60,0
β -D-Galp-(1→4)-D-Gal	4,1
α -D-Galp-(1→6)-D-Gal	41,0

D'abord appliquée à des polymères d'oses neutres ou d'osamines (cellulose, mannane, chitine), l'acétolyse a été étendue à des glycoconjugués renfermant des proportions variables d'oses neutres, d'osamines et d'acides sialiques (mucines, gangliosides) (pour références, Bochkov et Zaikov, 1979). Un certain nombre d'applications ont été décrites concernant principalement la caractérisation structurale de mannanes de levures (Lee et Ballou, 1965; Stewart *et al.*, 1968; Kocourek et Ballou, 1969) et de N-glycanes de type oligomannosidique de glycopeptides (Tai *et al.*, 1975) ou de glycoprotéines (Diabaté *et al.*, 1984). Elle a permis également la caractérisation des oligosaccharides intermédiaires de la biosynthèse de N-glycosylprotéines (Li *et al.*, 1978; Li et Kornfeld, 1979; Vijay et Perdew, 1982). Li et Kornfeld (1979) ont mis en évidence une sensibilité différente des liaisons (1-6) suivant leur localisation au sein de la chaîne glycanique. La rupture des liaisons plus internes requiert une durée de réaction deux fois plus longue que les liaisons des mêmes résidus en position périphérique. Ces auteurs justifient cette différence sur la base d'une protection de la liaison interne par repliement de l'antenne supérieure d'un N-glycane sur l'unité di-N-

acétylchitobiosique. Naik *et al.* (1985) ont, par ailleurs, proposé l'utilisation de l'acétolyse suivant une cinétique de 30 min à 18 h pour la distinction des différents types de N-glycanes, les structures oligomannosidiques et poly-N-acétyllactosaminiques étant hydrolysées plus rapidement que les structures de type complexe.

Solvolyse par l'acide fluorhydrique

La solvolyse par l'acide fluorhydrique (HF), en conditions anhydres (Knirel *et al.*, 1989), offre plusieurs avantages, comme nous avons pu déjà le mentionner, par rapport à l'hydrolyse ou la méthanolyse. Toutes les liaisons glycosidiques sont clivables avec peu ou pas de décomposition des oses libérés, notamment des oses labiles comme les désoxyoses. Les liaisons amides s'avèrent résistantes, préservant ainsi les N-acylations et les protéines. La spécificité de la réaction concernant la nature des liaisons rompues est contrôlable par la température.

La principale restriction à l'utilisation en routine du HF concerne sa toxicité, notamment par brûlures, et sa manipulation requiert des précautions particulières, parmi lesquelles l'emploi d'un matériel en Téflon parfaitement étanche.

L'acide fluorhydrique réagit avec l'oxygène glycosidique selon un mécanisme réactionnel apparenté à celui de l'hydrolyse acide. Le glycosyl cation obtenu (fig. 9), suite au clivage de l'aglycone, réagit avec un ion fluorure pour donner naissance à un α -glycosylfluorure. En fonction des conditions de réaction, cet intermédiaire peut devenir un ose réducteur, un glycoside ou un oligosaccharide par combinaison avec un ose ou un autre oligosaccharide. La prévention de cette oligomérisation, survenant en fin de réaction lors de l'évaporation de l'acide fluorhydrique, est possible, en ne faisant intervenir qu'une faible concentration de polysaccharide ou en procédant à l'addition d'eau ou d'alcool avant évaporation (Knirel *et al.*, 1989).

L'application principale de cette technique concerne à ce jour les polysaccharides, plus particulièrement d'origine bactérienne et végétale. La réactivité du HF est fonction de la température de réaction, l'augmentation de cette dernière formellement entre -70°C et $+25^{\circ}\text{C}$ allant de paire avec un nombre croissant de liaisons glycosidiques clivées. Un choix approprié

de la température de réaction permet de cibler les monosaccharides dont les liaisons glycosidiques vont être rompues et de contrôler le devenir du polymère. Ainsi, et de façon simplifiée, à basse température, de -40°C à -20°C , il est possible de dissoudre les polymères glucidiques par coupure des liaisons hydrogène intermoléculaires (Defaye *et al.*, 1982), la coupure des liaisons des oses neutres et acides est obtenue graduellement de -20°C à 0°C et jusqu'à $+23^{\circ}\text{C}$ pour les osamines. La sensibilité distincte des différentes classes d'oses en fonction de la température de réaction (Knirel *et al.*, 1989) favorise l'obtention d'oligosaccharides à partir de polymères glucidiques.

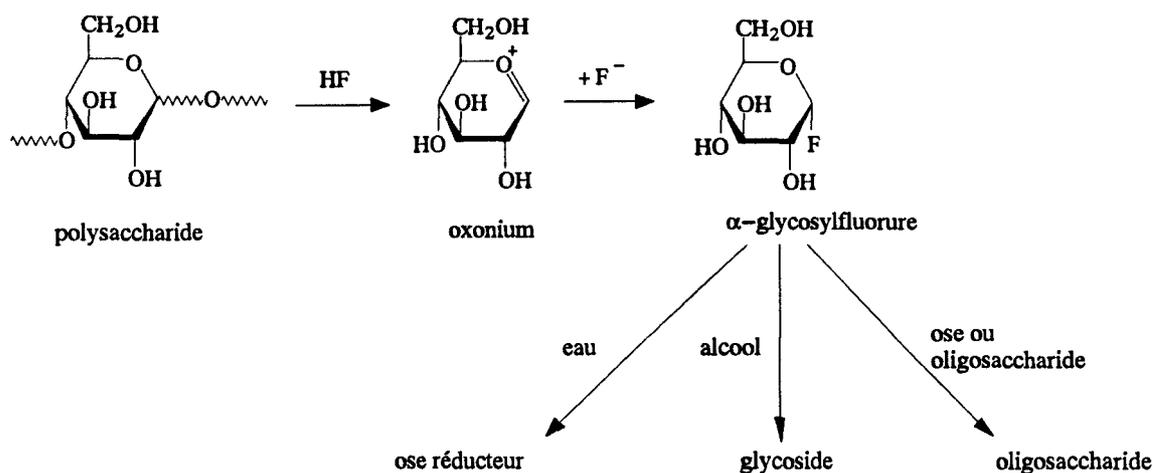


figure 9 – Principe de la solvolyse par l'acide fluorhydrique anhydre

Le traitement d'oligo- ou de polysaccharides dérivés n'a été que peu expérimenté. Il apparaît néanmoins qu'un polysaccharide peracétylé est résistant à la solvolyse par l'acide fluorhydrique alors qu'un polymère perméthylé donne naissance aux monosaccharides partiellement méthylés correspondants (Kenne *et al.*, 1986; Caroff *et al.*, 1984).

La présence dans le mélange réactionnel d'un certain pourcentage d'eau à concurrence de 30% n'affecte pas la réactivité du HF telle que nous l'avons décrite. Dans le cas d'un pourcentage supérieur, il s'agit d'une hydrolyse acide catalysée par l'acide hydrofluorique. Celle-ci permet le clivage, à 0°C , des liaisons phosphodiester sans coupure de liaisons glycosidiques (Unkefer et Gander, 1990).

Le HF anhydre peut également être utilisé comme agent de déglycosylation des protéines. Le clivage des liaisons O-glycosidiques est obtenu à température ambiante. Les

liaisons N-glycosidiques de type amide sont plus résistantes et le clivage obtenu laisse subsister un résidu de N-acétylhexosamine au point d'attache (Mort et Lamport, 1977).

Oxydation périodique et Dégradation de Smith

Le traitement de polymères glucidiques renfermant des hydroxyles vicinaux par l'acide périodique provoque la rupture des liaisons entre les atomes de carbone porteurs de ces groupements et la formation des fonctions aldéhydiques correspondantes (Goldstein *et al.*, 1965). L'application de l'oxydation périodique pour l'obtention d'oligosaccharides nécessite la présence d'oses résistants. Le principe de la réaction (fig. 10) permet la distinction entre les différents types de liaison, par la labilité distincte des monosaccharides diversement substitués et la nature des produits de la réaction. L'oxydation périodique est classiquement suivie d'une réduction et d'une dégradation en milieu acide dilué, connue sous l'appellation de dégradation de Smith. Afin de faciliter l'hydrolyse des monosaccharides oxydés, les fonctions aldéhydiques sont préalablement réduites pour donner les fonctions alcools correspondantes (Lindberg et Lönnngren, 1978).

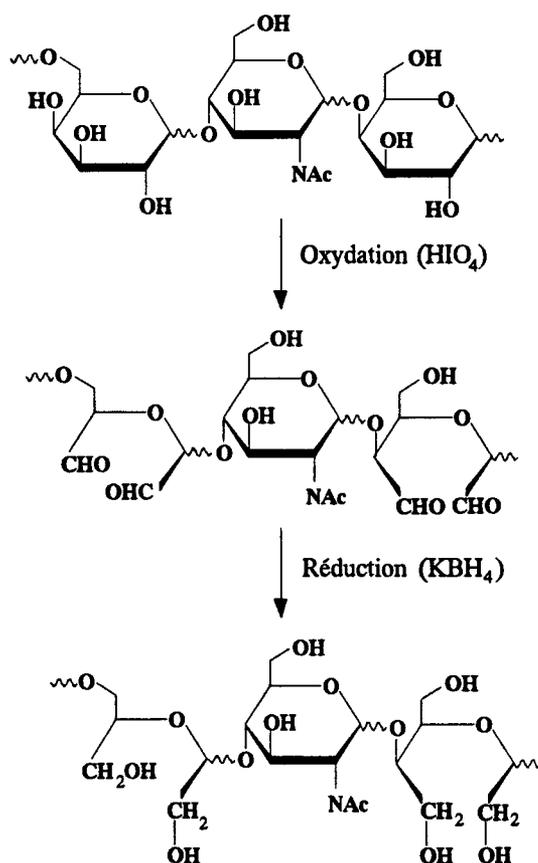


figure 10 - Principe de l'oxydation périodique

L'oxydation périodique a longtemps été caractérisée par la quantification de l'acide périodique consommé et par la nature et la proportion des produits de réaction (glycérol, glycéraldéhyde, acide formique) qui signent le type de liaison initialement présente. Plus récemment, elle a été combinée à la spectrométrie de masse même si les quantités requises pour l'étape chimique sont encore relativement importantes, de l'ordre de la micromole.

Angel et Nilsson (1990a, 1990b) ont ainsi étudié, en FABMS, la fragmentation d'oligosaccharides soumis à oxydation périodique puis perméthylés. L'oxydation périodique des composés permet d'obtenir des informations sur le type de liaison alors que l'analyse de ces produits sous forme perméthylée livre la séquence. A partir des fragments primaires et dans certains cas, secondaires, obtenus, il a été ainsi possible de caractériser des O-glycanes (Krotkiewski *et al.*, 1988), des N-glycanes sialylés (Lipniunas *et al.*, 1993), des gangliosides et des glycosphingolipides. Pour les oligosaccharides ne renfermant pas de résidus HexNAc, Angel et Nilsson proposent le recours à la peracétylation des oligosaccharides oxydés, avant l'analyse après perméthylation (Angel *et al.*, 1991). Une approche analogue utilisant l'ESMS a été mise en oeuvre par Reinhold *et al.* (1995).

2.2.2. Analyse de glycanes perméthylés

Méthylation

La méthylation est une des méthodes les plus importantes de la chimie structurale des molécules glucidiques. Conjugée à l'hydrolyse et l'analyse qualitative et quantitative du mélange d'oses partiellement méthylés obtenu, elle livre des informations sur le degré de substitution et la position des liaisons, mais ne permet pas de déterminer la séquence ou l'anomérisation des oses constitutifs (Lindberg, 1972; Lindberg et Lönngrén, 1978). Des données sur l'enchaînement des monosaccharides peuvent toutefois être obtenues par la comparaison des résultats de la méthylation de polysaccharides natifs et dégradés spécifiquement, par hydrolyse acide ménagée, hydrolyse enzymatique ou dégradation de Smith, pour ne citer que quelques techniques (Lindberg et Lönngrén, 1978).

Différents procédés de méthylation ont été décrits dans la littérature, visant à réaliser l'éthérisation quantitative de tous les hydroxyles libres (pour références, Lindberg, 1972). Le

protocole d'Hakomori décrit en 1964, utilise, pour ce faire, le carbanion méthylsulfinyle, aussi appelé base de Corey–Chaykovsky. Plusieurs variantes ont été décrites, concernant notamment la préparation de la base (Paz–Parente *et al.*, 1985) ou l'application de la technique aux polysaccharides peu solubles dans les solvants dipolaires (Prehm, 1980). Ciucanu et Kerek (1984) ont proposé une autre technique mettant en jeu comme base, l'hydroxyde de sodium dans le diméthylsulfoxyde, en présence d'iodure de méthyle. Cette méthode présente l'avantage d'être plus rapide, plus aisément réalisable et de générer des dérivés de meilleure qualité (Gunnarsson, 1987).

La stabilité des acides uroniques constitue l'une des difficultés rencontrées au cours de la méthylation. Une technique repose sur la β -élimination et permet, dans le cas d'un acide uronique glycosylé en position 4 d'obtenir un produit de dégradation spécifique de type 4-ène (Somme, 1986). Ces dérivés s'avèrent labiles durant la réaction et subissent une β -élimination après méthylestérification (Gunnarsson, 1987). Ciucanu et Luca (1990) ont proposé des conditions permettant de contrôler cette labilité.

A la différence des substituants de type sulfate, stables lors de la méthylation (Geyer et Geyer, 1994), ou des groupements méthyles intrinsèques caractérisables par deutérométhylation, les groupes esters présents dans la molécule native sont rapidement remplacés par des groupements méthyles, au cours de la réaction. La mise en évidence de tels groupements peut toutefois être réalisée en recourant à la méthode de de Belder et Norman (1968). Cette technique consiste à substituer, de façon réversible, les fonctions hydroxyles libres, par des groupements méthyl vinyl éther, de procéder au remplacement des substituants acétyles par méthylation et de libérer les fonctions hydroxyles protégées par hydrolyse acide, permettant ainsi une nouvelle dérivation. Selon un procédé analogue, Levery *et al.* (1989, 1990a, 1990b) ont décrit une technique permettant de caractériser les lactones présentes dans les gangliosides.

Après méthylation, les polymères dérivés peuvent être soumis à différents traitements tels que l'hydrolyse acide.

Hydrolyse de glycanes perméthylés

La seconde application majeure de l'hydrolyse concerne les molécules glucidiques perméthylées. Les groupements hydroxyles libres d'un polymère sont dérivés par perméthylation et l'hydrolyse permet de rompre les liaisons glycosidiques, libérant les oses sous forme de dérivés partiellement méthylés.

Du fait de la mauvaise solubilisation des oligo- ou polysaccharides perméthylés dans l'eau chaude, l'hydrolyse acide est le plus souvent précédée d'un traitement par l'acide formique ou acétique, dénommé parfois, à tort, formolyse ou acétolyse. Il ne s'agit en fait que d'une hydrolyse, car, en aucun cas, l'on ne procède à une formylation ou une acétylation des groupements hydroxyles libres. Dans les conditions standard de traitement par l'acide formique, le polymère perméthylé est mis en présence de l'acide à 90% durant 2h à 100°C. L'acide formique est employé sous une forme hydratée pour prévenir la O-déméthylation et la dégradation des oses libérés. Après élimination de l'acide, une hydrolyse par de l'acide sulfurique 0,025M (100°C, 12h) est envisageable. Cependant, du fait de la faible stabilité des acides sialiques dans ces conditions, d'autres auteurs ont préconisé l'utilisation de l'acide acétique 95%, traitement qui provoque, toutefois, la destruction des résidus furannosidiques ainsi qu'une hydrolyse partielle des liaisons glycosidiques des osamines et des acides uroniques. Pour ces derniers, il est malgré tout possible de remédier au problème en procédant à leur réduction préalable en hexoses. L'on retrouve de fait, pour le cas des oligosaccharides perméthylés, le même problème que lors de l'hydrolyse totale des polymères glucidiques natifs, avec le même dilemme entre destruction des monosaccharides et clivage incomplet de certaines liaisons glycosidiques. Toutefois, la labilité plus ou moins prononcée de certaines liaisons peut être exploitée pour cliver préférentiellement les liaisons de résidus furannosidiques ou de désoxyoses.

Une alternative est apportée, comme précédemment, par la méthanolyse grâce à l'action du méthanol chlorhydrique (MeOH/HCl) 0,5N à 80°C pendant 18h. Cette méthode permet la libération des oses et notamment des acides sialiques méthylés sans provoquer leur dégradation. L'utilisation du même réactif dans des conditions plus douces (MeOH/HCl 0,05N, 80°C, 16h) permet le clivage sélectif de ces résidus.

A partir de ces deux voies possibles, une stratégie globale a été proposée (Rauvala *et al.*, 1981) consistant à partager l'échantillon renfermant l'oligosaccharide perméthylé en deux pools, et d'effectuer sur l'un, un traitement par l'acide acétique suivi d'une hydrolyse acide, afin de procéder à l'analyse des dérivés des oses neutres et des N-acétylosamines, et sur l'autre partie de l'échantillon, de réaliser une méthanolyse pour l'identification plus spécifique des acides neuraminiques.

Méthode de Lindberg

La méthode de Lindberg consiste, à partir d'un oligosaccharide perméthylé, à réaliser l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, à réduire les monosaccharides libérés par du borodéutère de sodium et à acétyler les alditols ainsi générés. Ces dérivés sont classiquement dénommés alditols acétates partiellement méthylés (partially methylated alditol acetates, PMAA) (fig. 11).

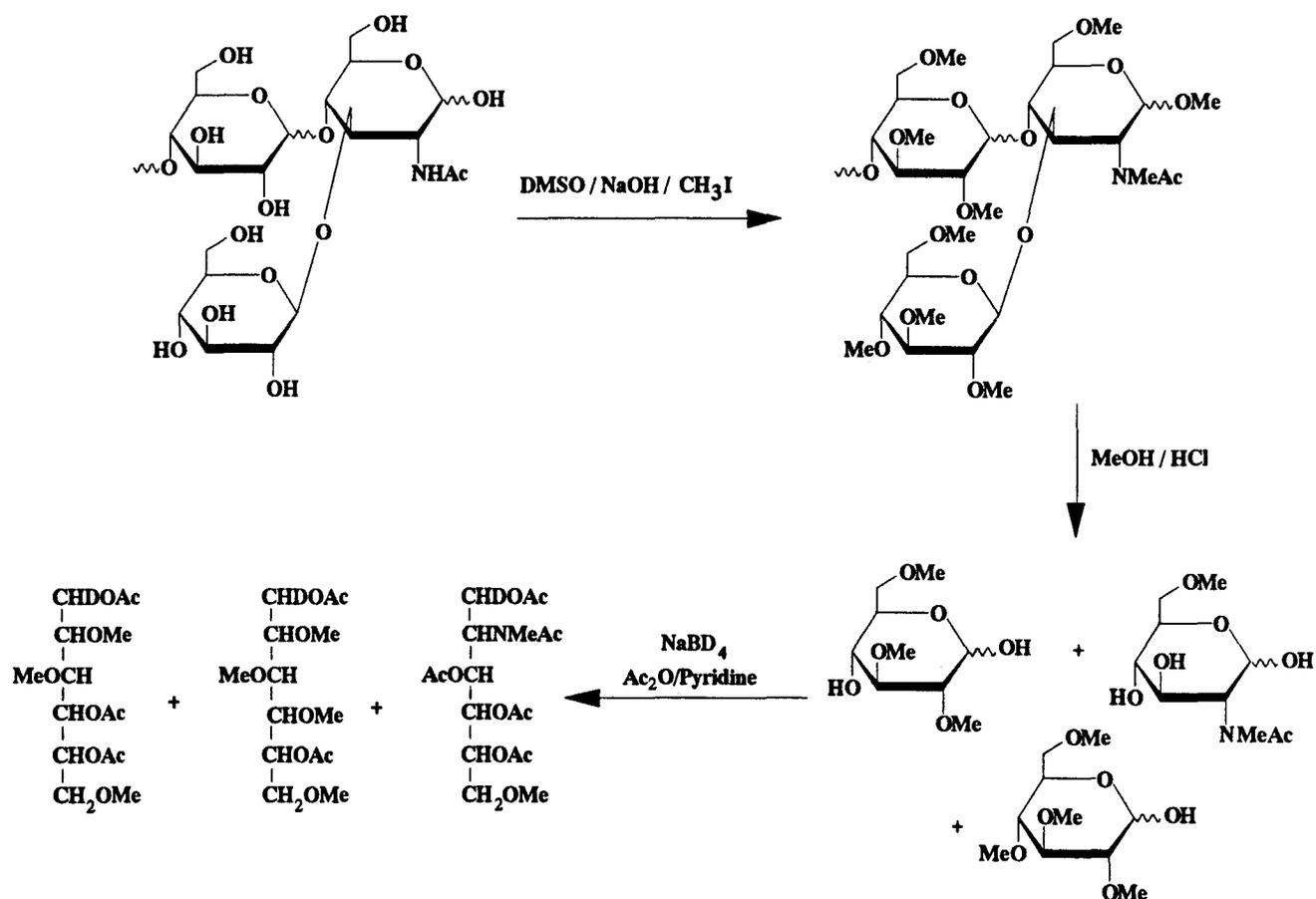


figure 11 - Principe de la méthode de Lindberg

Plusieurs facteurs, influençant l'obtention des PMAA, ont été répertoriés (pour références, Hellerqvist, 1990; Geyer et Geyer, 1994). Ils incluent la sous-méthylation, la dégradation et la O-déméthylation durant l'hydrolyse acide, la perte des dérivés volatils au cours des étapes d'évaporation et leur décomposition lors de l'analyse en GC-MS.

Les borates formés lors de la réduction en alditols des monosaccharides partiellement méthylés doivent être éliminés pour permettre l'acétylation des dérivés monosaccharidiques, ce qui représente du point de vue expérimental, une des principales difficultés de la méthode. Ceci est communément réalisé au moyen de codistillations longues et fastidieuses avec du méthanol. Blakeney *et al.* (1983) ont proposé l'utilisation du 1-méthylimidazole comme catalyseur d'acétylation tolérant la présence de borates.

La chromatographie en phase gazeuse est la meilleure méthode de séparation et de quantification des oses partiellement méthylés après hydrolyse de polysaccharides perméthylés et conversion en alditols acétates. Ces derniers donnent un pic unique mais nécessitent la réduction par le borodéutérure de sodium pour la distinction des C₁ et C₆. La quantification est obtenue par l'existence d'une relation linéaire entre surface des pics et concentration. Outre les difficultés rencontrées lors de l'hydrolyse et de l'élimination des borates, la principale limite à l'utilisation des PMAA consiste en la nécessité de posséder un certain nombre de témoins chromatographiques permettant de déterminer la nature des dérivés des monosaccharides ainsi séparés, ce qui peut se révéler problématique lors de l'analyse de polymères renfermant des oses rares ou nouveaux.

Les dérivés obtenus après méthanolyse de polysaccharides perméthylés et acétylation, dénommés méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés sont une alternative possible aux PMAA (fig. 12). De plus, cette technique permet la mise en évidence des acides neuraminiques, labiles par la méthode de Lindberg. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse de ces dérivés est toutefois beaucoup plus complexe en raison des pics multiples générés pour chaque monosaccharide lors de la méthanolyse.

L'identification des dérivés PMAA ou des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés sur la seule base des temps de rétention n'est pas rigoureuse. Si ceux-ci permettent de déterminer la nature de l'ose et, dans une certaine mesure, le degré de substitution, il est

nécessaire, pour confirmer la nature osidique des produits détectés en chromatographie et, surtout, pour déterminer le type de substitution, de recourir à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Deux modes d'ionisation ont été décrits pour l'obtention de fragments à partir de tels dérivés. L'ionisation par impact électronique est la méthode la plus couramment utilisée, permettant la caractérisation de la position des groupements méthyles, mais certains auteurs ont proposé l'emploi de l'ionisation chimique pour minimiser le nombre d'ions formés et augmenter le seuil de détection (Geyer *et al.*, 1983). Les méthylglycosides partiellement méthylés ont également fait l'objet d'une étude systématique en GC/EIMS, illustrant la possibilité d'identifier ces dérivés par les fragments observés (Fournet *et al.*, 1981).

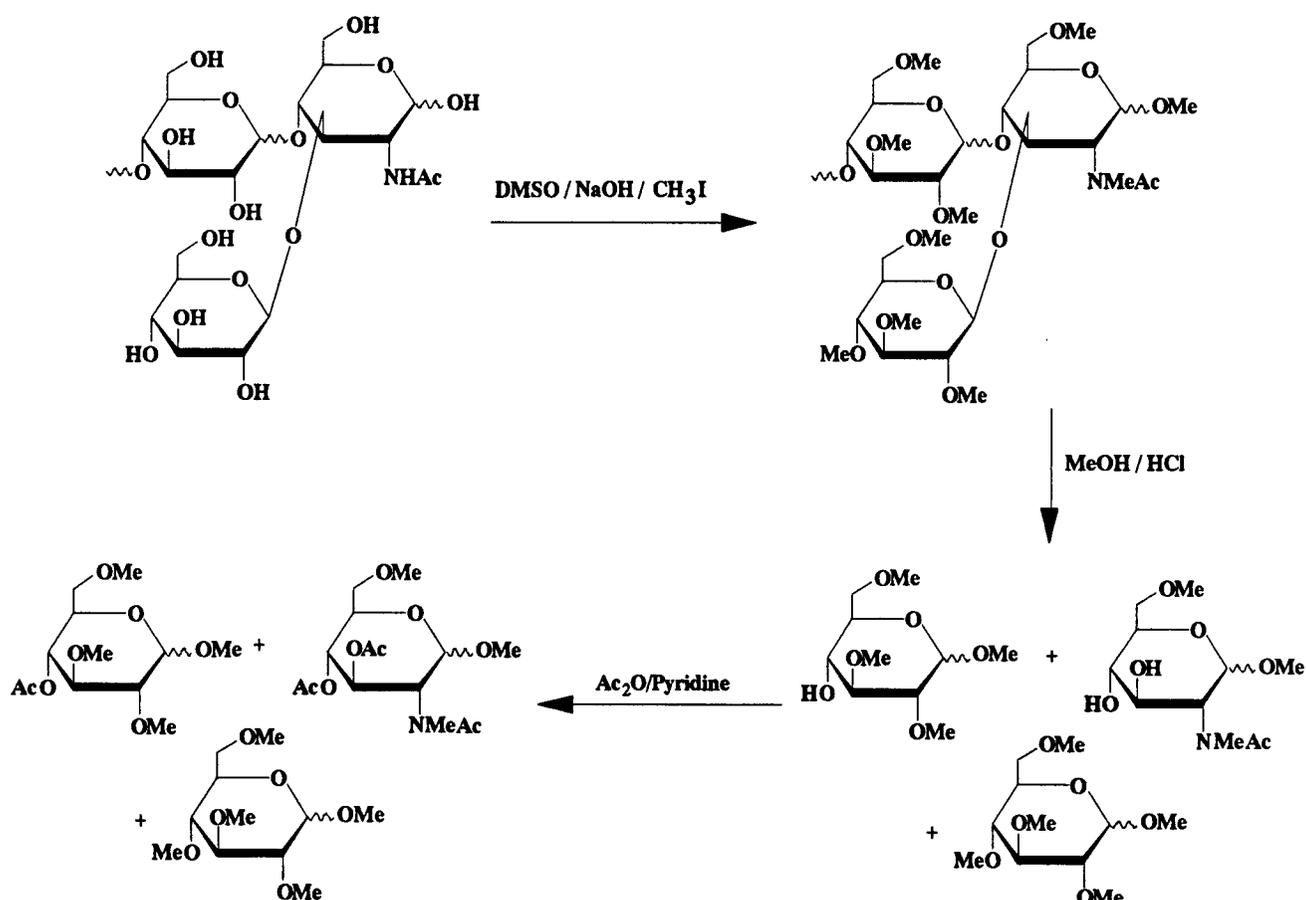


figure 12 – Principe de l'obtention des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés

Clivage réductif

La méthode de clivage réductif, d'introduction relativement récente (Rolf et Gray, 1982), permet la détermination simultanée de la position des liaisons et de la nature des cycles des

oses constitutifs d'oligo- ou de polysaccharides. Ce dernier aspect constitue l'originalité et l'avantage de cette technique, notamment par rapport à celle des PMAA décrite précédemment et qui ne permet pas la distinction entre un aldopyranoside substitué en 4 et un aldofuranoside substitué en 5. Une autre technique, décrite par Darvill *et al.* (1980), propose également de résoudre cette ambiguïté, mais elle s'avère complexe et laborieuse, et donc, difficilement utilisable en routine.

Le clivage réductif, comme les techniques précédemment évoquées, s'applique aux oligo- et aux polysaccharides perméthylés. Son principe est présenté figure 13.

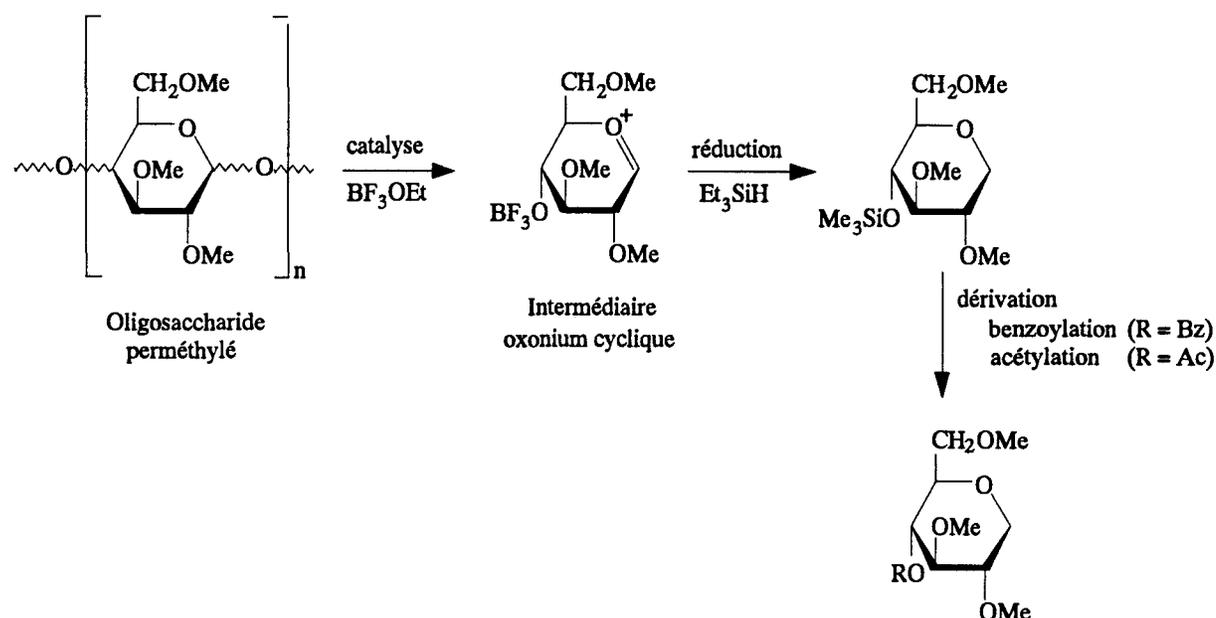


figure 13 – Principe du clivage réductif

A partir d'un polymère glucidique perméthylé, la réaction de catalyse par un acide de Lewis induit le clivage des liaisons glycosidiques avec formation d'intermédiaires oxoniums cycliques (Rolf et Gray, 1982; Rolf *et al.*, 1983). Ceux-ci sont ensuite réduits par le triéthylsilane (Et_3SiH), préservant ainsi le cycle osidique. Plusieurs catalyseurs ont été proposés parmi lesquels le trifluorure de bore-étherate (Rolf et Gray, 1982), le triméthylsilyl-trifluorométhane sulfonate (Rolf *et al.*, 1983; Gray, 1987), le mélange triméthylsilyl-méthanesulfonate - trifluorure de bore-étherate (Jun et Gray, 1987). Le mélange diméthyl-sulfide-borane - trifluorure de bore-étherate, récemment introduit (Oh et Gray, 1995),

apparaît comme le réactif de choix alliant simplicité de manipulation, facilité d'exécution des réactions et respect des caractéristiques de la technique.

Les dérivés obtenus par clivage réductif, des anhydro-alditols partiellement méthylés, peuvent être caractérisés selon deux méthodes (Lee et Gray, 1988). Après benzylation et séparation par HPLC, une analyse par RMN ^1H permet d'établir directement la position des substituants et la nature du cycle, déterminant ainsi l'ose d'origine. La seconde méthode, plus sensible et moins laborieuse, est réalisée par GC/MS après acétylation. L'identification de l'ose initial est alors obtenue par comparaison des temps de rétention sur des chromatogrammes simplifiés par absence de formes anomères et isomériques pyranne-furanne, et surtout à partir des spectres EIMS. Gray et coll. ont publié les spectres EIMS de différents isomères de substitution des oses les plus couramment rencontrés (Gray, 1990; Elvebak *et al.*, 1993) proposés comme références. La technique de clivage réductif a été appliquée à l'analyse de polysaccharides renfermant un large éventail d'oses et de substituants non osidiques (pour références, Gray, 1990; Oh et Gray, 1995) ainsi qu'à des cas particuliers comme les 3,6-anhydrohexoses (Kiwitt-Haschemie *et al.*, 1993) ou les acides sialiques (Srivastava et Gray, 1993).

2.3. Méthodes enzymatiques d'analyse structurale

2.3.1. Introduction

Les méthodes chimiques classiques décrites au chapitre précédent apportent des informations précieuses sur la structure détaillée des chaînes osidiques. Cependant, elles demeurent le plus souvent inadéquates pour la détermination de la séquence des monosaccharides composant ces chaînes ainsi que pour l'élucidation de la configuration des carbones anomériques.

Les exoglycosidases catalysent l'hydrolyse sélective de liaisons glycosidiques de monosaccharides en position terminale non réductrice de chaînes glucidiques et permettent de préciser la séquence et l'anomérisation des oses constitutifs. Elles peuvent également contribuer à l'étude des rôles biologiques des glycanes de glycoconjugués par modification contrôlée de la glycosylation (Flowers et Sharon, 1979) ou à la préparation d'accepteurs spécifiques pour

l'étude de l'activité de glycosyltransférases (Palcic, 1994).

Les sources d'exoglycosidases sont multiples et variées : animaux (Woollen *et al.*, 1961), plantes (Lee, 1972), champignons (Uchida *et al.*, 1974), bactéries (Glasgow *et al.*, 1977), virus (Paulson *et al.*, 1982). Dans certains cas, plusieurs enzymes ont été isolées et purifiées à partir d'une même source : *Aspergillus niger* (Bahl et Agrawal, 1969), émulsine d'amande (Lee, 1972), Jack bean (Li et Li, 1968), *Phaseolus vulgaris* (Agrawal et Bahl, 1968) et *Streptococcus pneumoniae* (Glasgow *et al.*, 1977). Cette large distribution illustre leur rôle catabolique vital notamment dans la préparation de nutriments pour la cellule (enzymes extracellulaires) ou dans la dégradation de chaînes glucidiques complexes (enzymes intracellulaires) (Flowers et Sharon, 1979; Kobata, 1979).

La principale limitation à l'utilisation systématique des exoglycosidases concerne leur disponibilité en tant qu'enzymes hautement purifiées et de spécificité clairement définie (Jacob et Scudder, 1994). De nombreuses enzymes, dont les protocoles d'isolement et de purification ont été décrits, présentent des activités contaminantes, le plus souvent glycosidasiques, compromettant leur utilisation. Une solution peut être apportée par les préparations commerciales. Cependant, même dans ce cas, des contaminations sont encore possibles et Jacob et Scudder (1994) décrivent des protocoles chromatographiques permettant l'élimination des activités glycosidasiques contaminantes courantes.

2.3.2. Spécificités des exoglycosidases

Depuis les premiers travaux de Payen et Persoz en 1833 sur l'amylase et la découverte par Fischer à la fin du XIX^{ème} siècle de certains des principes régissant l'action des enzymes tels que la spécificité, les effets du pH ou l'inhibition compétitive (pour références, Flowers et Sharon, 1979), de nombreuses exoglycosidases ont été isolées, voire purifiées et caractérisées, et ce, principalement au cours des années 1960–1970.

L'intérêt porté à la biologie et à la structure des glycoconjugués a rejailli sur les exoglycosidases. Ces dernières sont devenues un outil du séquençage des glycanes de glycoconjugués, en particulier des N-glycanes de composition en monosaccharides et de structure plus uniformes que les O-glycanes.

La détermination structurale d'un glycanne par les exoglycosidases comprend le séquençage complet par des digestions enzymatiques successives. Cela peut nécessiter, dans le cas d'un glycanne de structure inconnue, un éventail important d'enzymes. Dans la pratique, la plupart des analyses peuvent être effectuées grâce à une vingtaine d'exoglycosidases dont bon nombre sont disponibles commercialement. Dans le tableau 8 reproduit dans l'annexe 2, nous présentons les caractéristiques des principales exoglycosidases commercialisées et de spécificité connue.

Spécificités glyconique et aglyconique des exoglycosidases

On définit pour toute exoglycosidase, deux types de spécificités vis-à-vis de leurs substrats (Kobata, 1979), la spécificité glyconique et la spécificité aglyconique.

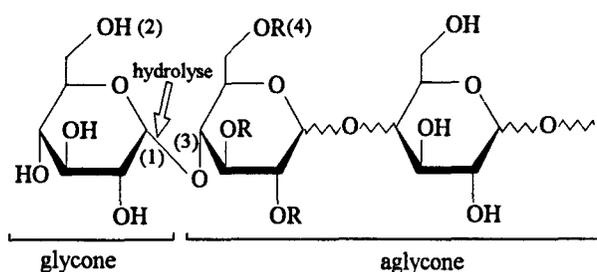


figure 14 – Eléments structuraux des spécificités glyconique et aglyconique

La spécificité glyconique concerne le monosaccharide en position terminale non réductrice, ou glycone (fig. 14). Elle englobe la configuration du carbone anomérique impliqué dans la liaison glycosidique (1), pour laquelle elle est exclusive : une α -exoglycosidase hydrolyse les liaisons glycosidiques des seuls monosaccharides d'anomérie α , une β -exoglycosidase que des oses d'anomérie β . La spécificité glyconique prend également en compte la configuration des hydroxyles du monosaccharide concerné (2). Cette caractéristique est étroite, bien que de rares exceptions existent telles la β -glucosidase d'émulsine d'amande, hydrolysant les résidus de glucose, galactose ou de fucose (Schwartz *et al.*, 1970) et les β -N-acétylhexosaminidases hydrolysant à la fois les résidus de β -N-acétylglucosamine et de β -N-acétylgalactosamine (Woollen *et al.*, 1961).

Du fait de la simplicité de la méthode, de nombreuses spécificités enzymatiques ont été

établies à partir de substrats de synthèse tels que les phényl-, p-nitrophényl- ou 4-méthylumbelliféryl-glycosides. L'hydrolyse de ces substrats ne permet de définir que la spécificité glyconique, l'aglycone porteur du monosaccharide libérable n'étant pas de nature osidique. Certaines enzymes ainsi caractérisées se sont révélées inefficaces pour l'hydrolyse de chaînes glycaniques alors que d'autres exoglycosidases, hydrolysant des substrats naturels, sont incapables de cliver des substrats de synthèse. Ceci illustre l'étendue de la spécificité aglyconique. Elle inclut la position de l'hydroxyle porté par l'aglycone et impliqué dans la liaison glycosidique hydrolysable (3). Elle peut à ce niveau être stricte comme pour la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (Paulson *et al.*, 1978), dépendante de la concentration enzyme/substrat comme pour la β -galactosidase de Jack bean (Arakawa *et al.*, 1974) ou large comme pour la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean (Li et Li, 1968, 1970) (annexe 2). La spécificité aglyconique fait également intervenir les possibles substitutions portées par l'aglycone (4) qui peuvent gêner stériquement et ainsi empêcher l'hydrolyse enzymatique (Harrap et Watkins, 1970; Arakawa *et al.*, 1974; Yamashita *et al.*, 1977).

Les enzymes d'une même source et d'une même famille d'exoglycosidases peuvent présenter des spécificités aglyconiques différentes comme dans le cas des α -L-fucosidases d'émulsine d'amande (Scudder *et al.*, 1990).

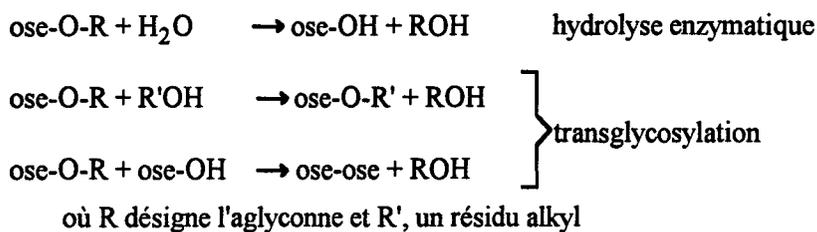
Pour mieux cerner les spécificités glyconiques et aglyconiques des exoglycosidases de façon générale, Wong-Madden et Landry (1995) ont proposé récemment un test de dépistage d'activités exoglycosidasiques, appliqué à des bactéries du genre *Xanthomonas*. Cette méthode, simple, rapide et sensible, permet, par chromatographie sur couche mince et à partir d'oligosaccharides fluorescents de structure choisie, de déterminer précisément les spécificités glyconiques et aglyconiques des activités détectées. Sa précision repose sur un choix arbitraire mais approprié d'oligosaccharides témoins.

L'examen des différentes spécificités enzymatiques met l'accent sur les précautions nécessaires et les réserves requises lors de l'interprétation des résultats de digestions enzymatiques. Un résultat, en apparence négatif, tel que l'absence de libération d'un monosaccharide par une glycosidase donnée, ne permet pas de conclure à l'absence du monosaccharide en position terminale non réductrice, ni de préciser la nature de la spécificité

glyconique de l'enzyme testée. Il peut s'agir d'une inadéquation de la spécificité aglyconique. Flowers et Sharon (1979) attirent l'attention sur l'existence possible d'inhibiteurs intrinsèques des exoglycosidases dans des préparations renfermant le substrat à étudier et plus ou moins purifiées. Kobata (1979) mentionne l'importance de la solubilisation du substrat, en particulier dans le cas de glycolipides pouvant requérir l'addition de détergents dans le milieu réactionnel. De même, la présence d'activités contaminantes peut être cruciale dans la production de résultats faussement positifs.

Transglycosylation

Les exoglycosidases catalysent l'hydrolyse de liaisons glycosidiques, mécanisme que Flowers et Sharon (1979) rapprochent de celui de l'hydrolyse acide et pour lequel ils décrivent des intermédiaires au sein des sites actifs et des moyens d'étude grâce à des inhibiteurs spécifiques, analogues structuraux des oses libérables. Cependant, outre l'hydrolyse, certaines exoglycosidases sont connues pour effectuer des réactions de transfert appelées transglycosylation. Ces réactions consistent en l'addition d'une molécule d'alcool ou d'ose sur l'ose libéré, donnant lieu à une synthèse plutôt qu'à une dégradation :



De telles réactions de transglycosylation ont été décrites pour la neuraminidase de *Clostridium perfringens* (Bouwstra *et al.*, 1987), l' α -galactosidase de green coffee bean (Courtois et Petek, 1966), l' α -galactosidase de *Mortierella vinacea* (Suzuki *et al.*, 1970), une β -galactosidase de *Trichomonas foetus* (Harrap et Watkins, 1970), la β -galactosidase de bovine testis (Distler et Jourdian, 1973, 1978), l' α -mannosidase de Jack bean (Li, 1967).

2.3.3. Analyse des produits de digestions enzymatiques

L'analyse des produits de l'hydrolyse enzymatique peut être effectuée par différentes

techniques comme la chromatographie de gel filtration (Kobata, 1979), l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Jackson, 1994), l'HPLC (Baenziger, 1994), ou la spectrométrie de masse (Harvey *et al.*, 1994). Ces méthodes mettent en évidence le plus souvent la disparition du résidu monosaccharidique sur le substrat de départ, plutôt que la quantification de l'ose libéré. Les exoglycosidases hautement purifiées peuvent être utilisées pour des digestions séquentielles (Yamashita *et al.*, 1982) ou pour une analyse automatisée (Edge *et al.*, 1992). Dans ce dernier cas, le substrat, réparti en aliquotes égales, est mis en présence de différents cocktails enzymatiques qui reconstituent en une étape la série de digestions séquentielles. L'omission de certaines enzymes ou le choix d'exoglycosidases de spécificités données, dans la constitution de ces cocktails, permet de mettre en évidence la présence des oses correspondants.

De façon générale, et de plus en plus fréquemment, les exoglycosidases sont utilisées au sein de stratégies faisant appel à des techniques chimiques et spectroscopiques, telle que la spectrométrie de masse, pour l'élucidation de structures telles que des oligosaccharides du lait de femme ou des N-glycanes. La discussion de l'utilisation des exoglycosidases, au sein de ces stratégies, est présentée dans le chapitre *Stratégies Intégrées*.

Jacob et Scudder (1994) considèrent que l'utilisation des exoglycosidases, pour les déterminations structurales, est amenée à diminuer, avec les progrès croissants des méthodes analytiques telles que la RMN ou la spectrométrie de masse. Cependant, à l'heure actuelle, pour tous les laboratoires ne pouvant avoir accès à ces techniques et, surtout, pour l'analyse d'un matériel en trop faible quantité, de l'ordre de la nanomole, le séquençage enzymatique, utilisant des exoglycosidases de haute qualité (pureté et spécificités) demeure une alternative de choix, certes délicate, mais alliant spécificité, rapidité et sensibilité.

2.4. Amination réductive

La majorité des molécules glucidiques ne possèdent qu'une faible activité spectrale d'absorption intrinsèque, posant le problème de leur détection spécifique et sensible au cours des processus chromatographiques de purification ou d'analyse.

Une possibilité est offerte par la détection ampérométrique pulsée (PAD) telle qu'elle a

pu être décrite par Rocklin et Pohl (1983) et qui est communément couplée à la chromatographie d'échange d'anions à haut pH (Hardy et Townsend, 1994). Toutefois, outre l'obligation de l'investissement dans un équipement coûteux, les conditions chromatographiques utilisées, fortement basiques, n'assurent pas la pérennité des structures glucidiques. Un marquage spécifique apparaît dès lors préférable. Celui-ci peut consister en l'insertion d'éléments radioactifs, par réduction de monosaccharides en position terminale réductrice, grâce à un agent réducteur tritié (Kobata, 1994) ou lors de la biosynthèse des glycanes, par l'insertion d'oses radioactifs (Varki, 1991) permettant de suivre spécifiquement les biomolécules marquées.

Une alternative utilise la conjugaison covalente de l'extrémité terminale réductrice d'un oligosaccharide donné avec un chromophore ou un fluorophore, par amination réductive. Les avantages d'une telle dérivation sont nombreux. Elle évite l'utilisation de radioisotopes et peut s'envisager indépendamment de toute biosynthèse. La détection par absorbance UV ou par fluorescence est spécifique et sensible, permettant l'utilisation de cette dérivation pour des glycanes disponibles en faible quantité. De plus, l'amination réductive est applicable à de nombreux types de molécules glucidiques, indépendamment de leur structure, avec des réserves toutefois concernant la sialylation, comme nous le verrons plus loin. Les caractéristiques chimiques des chromophores et fluorophores utilisables confèrent, en outre, une hydrophobicité non négligeable aux oligosaccharides au caractère intrinsèque nettement hydrophile. Il est ainsi possible d'employer l'HPLC en phase inverse pour la purification ou l'analyse des oligosaccharides ainsi dérivés. Enfin, l'utilisation de tels dérivés en spectrométrie de masse permet d'augmenter le seuil de détection.

La figure 15 illustre le principe de l'amination réductive. L'oligosaccharide considéré réagit avec l'agent de dérivation choisi, en l'occurrence, la 2-aminobenzamide dans l'exemple retenu. Il y a formation d'une base de Schiff entre la fonction carbonyle osidique et l'amine primaire du dérivé. Cette liaison réversible est ensuite stabilisée par réduction par le cyanoborohydrure de sodium, pour donner naissance à une amine secondaire.

De nombreux dérivés ont été utilisés, à ce jour, pour cette réaction dont les plus usités sont répertoriés dans le tableau 9. Ces composés ont en commun, outre la fonction amine

primaire indispensable, la présence de cycles aromatiques, responsables de leurs propriétés d'absorbance UV ou de fluorescence. Ces mêmes structures cycliques diversement substituées sont impliquées dans le comportement chromatographique hydrophobe de ces composés. Certains dérivés présentent la particularité de posséder une charge permanente, négative comme l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (Jackson, 1990) ou positive, comme le triméthyl-(p-aminophényl)-ammonium (Dell *et al.*, 1988), utilisables notamment en électrophorèse en gel de polyacrylamide et en électrophorèse capillaire.

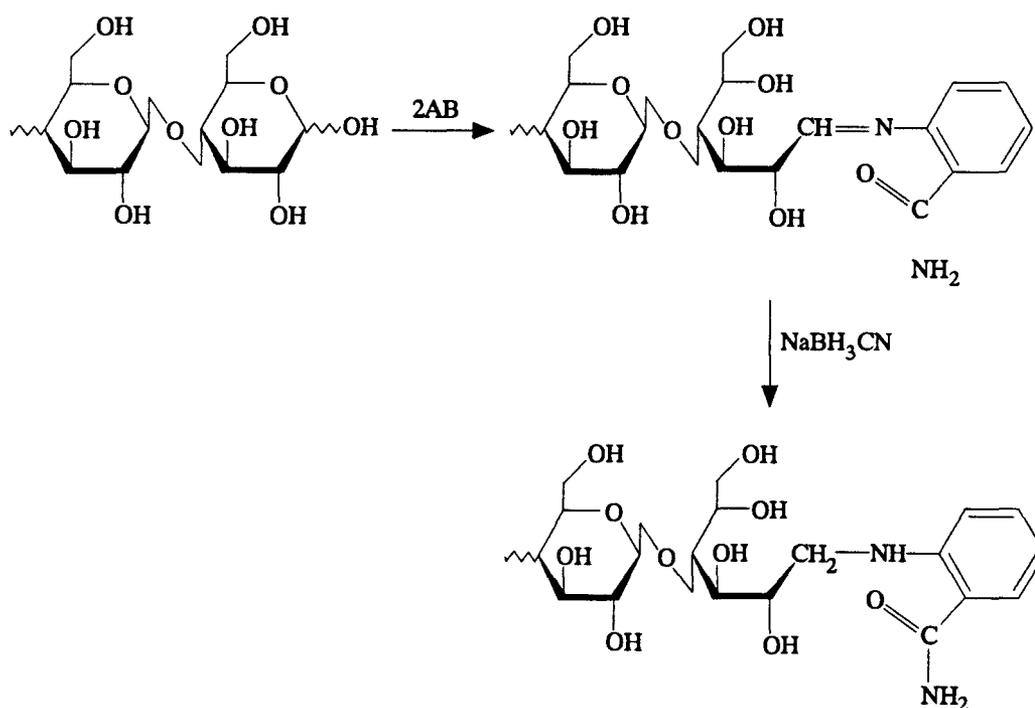


figure 15 – Principe de l'amination réductive par la 2-aminobenzamide

L'étude la plus approfondie des possibilités offertes par l'amination réductive utilisant un dérivé donné, a été menée par Hase et coll. sur la 2-aminopyridine (Hase, 1994). A travers les nombreuses publications de ce groupe, les auteurs ont appliqué les conditions d'amination réductive établies pour ce dérivé à un large éventail d'oligosaccharides (polymères de glucose, O-glycannes, N-glycannes oligomannosidiques et complexes neutres, glycannes de glycosphingolipides). Des conditions de miniaturisation ont par ailleurs été décrites afin de pallier à l'important excès de réactifs que génère l'emploi de ce dérivé (Hase *et al.*, 1985; Fan *et al.*, 1995). Les mêmes auteurs ont proposé un ensemble de conditions pouvant permettre de

tableau 9 – Dérivés utilisés pour l'amination réductive

Dérivé	Applications	Références
2-aminopyridine (2-AP)	Caractérisation structurale d'oligosaccharides dérivés Cartographie pour la détermination structurale des glycanes dérivés Amination réductive d'oligosaccharides sialylés Techniques de dégradation chimique des glycanes Composition en monosaccharides Synthèse de néoglycoconjugués Caractérisation de spécificités lectiniques Analyse par électrophorèse capillaire Analyse des oligosaccharides dérivés par chromatographie d'échange d'ions Analyse des oligosaccharides dérivés par RMN	pour références, voir texte et Hase (1994) Oefner et Chiesa (1994) Fan <i>et al.</i> (1995) Kimura <i>et al.</i> (1995)
2-amino-6-amidobiotinyl pyridine (BAP)	Analyse des oligosaccharides dérivés par HPLC Néoglycoconjugués par combinaison possible des oligosaccharides dérivés avec l'avidine et la streptavidine	Toomre et Varki (1994)
aminobenzoates d'alkyles		
p-aminobenzoate d'éthyle (ABEE)	Composition en monosaccharides Analyse de mono- et d'oligosaccharides dérivés par HPLC Digestions par exoglycosidases des oligosaccharides dérivés Caractérisation structurale des oligosaccharides dérivés par FABMS et FABMS/MS	Kwon et Kim (1993) Akiyama (1991) Wang <i>et al.</i> (1984) Poulter et Burlingame (1990), Gillece-Castro et Burlingame (1990), Poulter <i>et al.</i> (1991),
2-(N,N-diéthylamino) 4-aminobenzoate d'éthyle (ABDEAE)	Caractérisation structurale d'oligosaccharides dérivés par ESMS et ESMS/MS	Yoshino <i>et al.</i> (1995)
8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonate (ANTS)	Analyse par électrophorèse capillaire Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide d'oligosaccharides neutres et acides dérivés	Oefner et Chiesa (1994) Jackson (1990), (1994)
2-aminoacridone (AMAC)	Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide d'oligosaccharides acides dérivés	Jackson (1991), (1994)
triméthyl-(p-amino-phényl)-ammonium (TMAPA)	Caractérisation structurale par FABMS et FABMS/MS	Dell <i>et al.</i> (1988), Domon <i>et al.</i> (1994)

tableau 9 – Dérivés utilisés pour l'amination réductive (suite)

7-amino-4-méthylcoumarin (AMC)	Analyse d'oligosaccharides dérivés par TLC, caractérisation de digestats d'exoglycosidases	Prakash et Vijay (1983), Wong-Madden et Landry (1995)
Acide aminobenzoïque (2-ABA)	Composition en monosaccharides	Anumula (1994)
	Analyse d'oligosaccharides dérivés par électrophorèse en gel de polyacrylamide	Bigge <i>et al.</i> (1995)
2-aminobenzamide (2-AB)	Analyse d'oligosaccharides dérivés par HPLC, HPAEC, MALDMS, ESMS	Bigge <i>et al.</i> (1995)
1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMP)	Composition en monosaccharides	Honda <i>et al.</i> (1989)
	Analyse d'oligosaccharides dérivés par électrophorèse capillaire	Oefner et Chiesa (1994)
1-(p-méthoxy) phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMPMP)	Analyse d'oligosaccharides dérivés par HPLC	Honda <i>et al.</i> (1989) Takehi <i>et al.</i> (1991)

procéder à l'amination réductive d'oligosaccharides sialylés (Hase *et al.*, 1984; Kondo *et al.*, 1990), ces monosaccharides se révélant très labiles lors de l'application du protocole standard. Ce comportement particulier apparaît indépendant de la nature du dérivé choisi puisque Bigge *et al.* (1995) ont étudié et proposé des solutions pour le même problème rencontré avec la 2-aminobenzamide. L'amination réductive d'oligosaccharides sialylés n'a cependant donné lieu, à ce jour, qu'à peu d'applications. Le comportement d'oligosaccharides dérivés à la 2-aminopyridine a été testé vis-à-vis de réactions classiques de la dégradation chimique des glycanes. Hase et coll. ont ainsi démontré la compatibilité de cette dérivation avec l'hydrolyse acide ou alcaline, la méthylation et la méthode de Lindberg (Hase *et al.*, 1978), l'acétylyse partielle (Natsuka *et al.*, 1987) et l'oxydation périodique (Omichi et Hase, 1995). Dans tous les cas, l'extrémité terminale réductrice modifiée apparaît stable et ne modifie pas le déroulement des réactions. Takemoto *et al.* (1985) ont proposé, en outre, l'utilisation de l'amination réductive pour la quantification des monosaccharides en HPLC. Hara *et al.* (1989) ont appliqué la même démarche pour le dosage spécifique des acides sialiques et la caractérisation de leur degré de O-acétylation grâce à l'emploi du fluorophore 1,2-diamino-4,5-méthylène dioxybenzène.

Une étude systématique du comportement chromatographique des oligosaccharides

dérivés par la 2-aminopyridine en HPLC selon différentes modalités a été réalisé par Hase et coll.. Ces auteurs en ont déduit une méthode d'identification de structures N-glycanniques neutres et sialylées, basée sur la valeur des temps de rétention des produits, enregistrés au cours de différentes chromatographies (perméation de gel, phase inverse, échange d'ions). A partir des valeurs déterminées pour des témoins de structure connue, une cartographie a pu être établie (Tomiya *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1995). La caractérisation des structures s'appuie sur la constatation d'un phénomène d'additivité (Hase et Ikenaka, 1990). Chaque monosaccharide, composant d'une structure donnée, concourt à influencer, de façon constante et déterminée statistiquement, le comportement chromatographique de la molécule totale, en accélérant ou en retardant son élution. Cette influence, mesurée en unités de temps, dépend de la nature de l'ose mais également de sa situation relative dans la structure glucidique. Une telle technique a été utilisée pour la comparaison de pools de structures glucidiques de glycoprotéines natives et recombinantes (Yamamoto *et al.*, 1989) ainsi que de glycoprotéines normales et cancéreuses (Kondo *et al.*, 1994).

Le dernier aspect de l'amination réductive étudié par le groupe de Hase et coll. concerne une possible réversibilité de la dérivation, afin de restituer l'oligosaccharide sous une forme permettant l'étude fonctionnelle ou biologique. Un protocole a été proposé permettant de procéder à une nouvelle conjugaison avec des dérivés de la fluorescéine ou de la biotine (Hase, 1992). Toomre et Varki (1994) ont décrit une autre technique plus immédiate et utilisant la 2-amino-6-amidobiotinyl pyridine. La poursuite du même objectif a conduit à l'avènement d'une variante de l'amination réductive. Cette technique consiste en la synthèse de glycamines par greffe de fonctions amines primaires aux extrémités terminales réductrices des oligosaccharides. Ces fonctions amines sont ensuite liées de façon covalente à différents dérivés tels que la 9-fluorophénylméthoxycarbonylglycine (Fmoc glycine) (Arsequell *et al.*, 1994) ou le N-hydroxy-succinimidyl ester de la tert-butoxycarbonyl tyrosine (Boc tyrosine) (Da Silva *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 1994). Du fait de la possible réversibilité, une fonction amine primaire peut être restituée par action d'une base ou d'un acide, suivant les cas, donnant naissance à un dérivé 1-N-glycyl (pour la Fmoc tyrosine) ou un oligosaccharide porteur d'une tyrosinamide (pour la Boc tyrosine). Un oligosaccharide réducteur peut être obtenu par le

traitement du dérivé initialement formé par dégradation d'Edman (McBroom *et al.*, 1994). Ces composés sont utilisables à des fins biologiques telles que la préparation de néoglycoconjugués (Yoshida *et al.*, 1994).

Outre les applications déjà citées des oligosaccharides dérivés par amination réductive, nous mentionnerons encore la possibilité de faire réagir ces composés avec des lectines (Mega et Hase, 1991) ou avec des exoglycosidases (Wang *et al.*, 1984). Le gain de sensibilité généré par la dérivation peut être également utilisé en spectrométrie de masse par la protonation de la fonction amine apportée par l'agent de dérivation, supplantant les problèmes d'ionisation des oligosaccharides natifs. Nous discuterons plus particulièrement cet aspect dans le chapitre suivant.

L'électrophorèse capillaire tire également avantage de l'amination réductive des oligosaccharides (pour références, Oefner et Chiesa, 1994) notamment, par l'augmentation de sensibilité de la détection ainsi que par l'uniformisation de la réponse des oligosaccharides ainsi dérivés. Plusieurs types de chromophores et de fluorophores sont utilisés pour la dérivation des fonctions carbonyles ou amines des glycanes, parmi lesquels la 2-aminopyridine, le 1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone et ses dérivés ou l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique. Ce même dérivé est utilisé dans la mise en oeuvre d'un nouveau type d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Jackson, 1994) dénommée Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE). Son domaine d'application englobe l'analyse de monosaccharides, d'oligosaccharides ou de petits polysaccharides seuls ou en mélange, ainsi que l'obtention d'empreintes pour des pools de N-glycanes libérés enzymatiquement ou des digestats d'exoglycosidases. La variation des propriétés de réticulation du gel d'électrophorèse permet une séparation d'isomères et d'anomères, voire d'épimères, pour une sensibilité comparable à celle obtenue par HPLC ou par électrophorèse capillaire et supérieure à la détection ampérométrique pulsée, de l'ordre de 10 pmoles (Jackson, 1990, 1991). En dernier lieu, les molécules glucidiques ainsi séparées peuvent être transférées sur membrane poreuse, permettant l'utilisation de toutes les techniques liées à ce support.

2.5. Spectrométrie de masse

2.5.1. Introduction

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse ayant trouvé des applications variées en chimie analytique qualitative et quantitative. Si les premiers spectromètres de masse utilisés en chimie organique datent de la fin des années 50, les progrès réalisés au cours des quinze dernières années, tant dans la production, la séparation et la détection des ions que dans l'acquisition et le traitement des données, ont concouru à la naissance de nouveaux appareils dont la résolution et la sensibilité sont actuellement sans concurrence. Les potentialités offertes par la spectrométrie de masse en font un outil performant et efficace pour l'analyse de biomolécules.

De façon simplifiée, un spectromètre de masse se compose de différents éléments, chacun correspondant à une étape cruciale de l'analyse (fig. 16). L'ionisation de l'échantillon, ou production des ions en phase gazeuse, se déroule dans la source et constitue la première étape de l'analyse par spectrométrie de masse. Les ions ainsi formés, directement ou éventuellement par fragmentation ultérieure, sont séparés au sein de l'analyseur, suivant le rapport m/z de la masse au nombre de charges.

La spectrométrie de masse à deux dimensions ou spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) peut se concevoir comme l'utilisation de deux analyseurs montés en série. Les ions récupérés à la sortie du premier analyseur peuvent être soumis à une collision et les produits de fragmentation ainsi obtenus séparés dans l'analyseur suivant. Si, formellement, ce principe ne présente pas de limites, pratiquement, la diminution de l'intensité des signaux des ions à chaque étape rend difficile l'analyse par spectrométrie de masse au delà de la deuxième dimension. Le développement d'autres systèmes basés sur des principes physiques différents (résonance en cyclotron d'ions, ICR, ion trap, IT) permet d'envisager des expériences de type MS^n .

A la sortie du (ou des) analyseur(s), le détecteur permet la quantification de l'abondance relative des ions en fonction de leur rapport m/z . En dernier lieu, un système informatique réalise l'acquisition et le traitement des données sous forme de spectres et un système de

contrôle en retour assure la cohésion de l'ensemble de l'appareil et le réglage des paramètres. Le spectromètre de masse se présente souvent, non comme un appareil autonome (cas du MALDMS), mais comme un élément d'un couplage, un chromatographe, jouant le rôle d'un système d'introduction (GC, HPLC), est alors disposé avant la source d'ionisation. Par ailleurs, l'analyse s'effectue toujours sous vide poussé, pour minorer les collisions car celles-ci provoquent la déviation des ions, favorisant leur déchargement sur les parois de l'appareil, ou des réactions ions-molécules, entraînant des modifications de la structure des espèces en présence, qui compliquent les spectres.

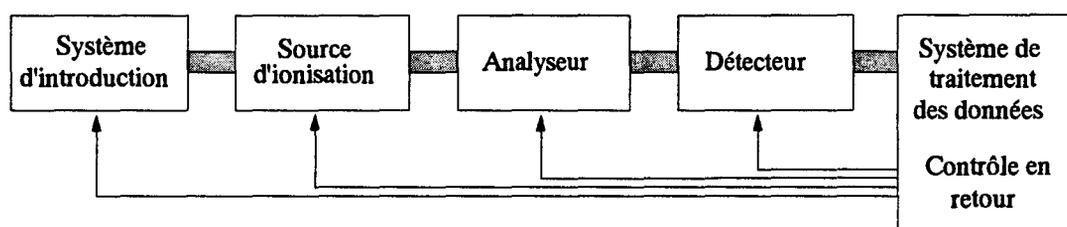


figure 16 – Schéma d'un spectromètre de masse

Chaque module composant un spectromètre de masse peut formellement être de plusieurs types. L'on distingue ainsi plusieurs sources d'ionisation, que nous présenterons plus loin, et différents types d'analyseurs, notamment, les secteurs magnétiques, les quadripôles et les analyseurs en temps-de-vol. Le choix et l'assemblage de l'un ou l'autre de ces modules donnent naissance aux différents appareils, chacun possédant ses caractéristiques propres (gamme de masse, pouvoir de résolution, sensibilité, précision des mesures), en fonction des modules choisis. Afin de simplifier, nous baserons notre présentation sur les différents modes d'ionisation en distinguant trois types d'analyse par spectrométrie de masse. Nous traiterons des techniques classiques applicables aux molécules volatiles, des techniques d'ionisation plus modernes pour l'analyse de substances polaires de masse moléculaire élevée et, en dernier lieu, de la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse structurale. Chacun de ces aspects est par ailleurs discuté du point de vue de l'application aux molécules glucidiques.

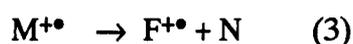
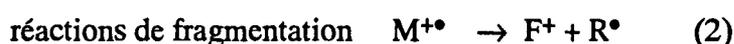
2.5.2. Les techniques classiques d'ionisation

Impact électronique

L'impact électronique (electron impact, EI) est historiquement le premier mode

d'ionisation développé appliqué à l'analyse de molécules organiques. Apparu à la fin des années 50, il est aujourd'hui une technique de routine pour l'analyse de petites molécules, tels les monosaccharides dérivés.

Son principe repose sur l'ionisation d'un échantillon vaporisé en phase gazeuse par un faisceau d'électrons (fig. 17), générant des ions moléculaires de type radical cation $M^{+\bullet}$ (1). Dans les conditions standard d'analyse, pour des électrons ayant une énergie de 70 eV, un excès d'énergie est, de plus, transféré vers les ions formés et provoque leur fragmentation spontanée. Celle-ci obéit à des règles que l'on peut résumer selon les équations (2) et (3) :



où M, F, R et N désignent respectivement la molécule d'échantillon, un fragment, un radical ou une molécule neutre.

Dès le début de la spectrométrie de masse organique, les monosaccharides dérivés ont fait l'objet de nombreux travaux (pour références, Radford et DeJongh, 1972). Parmi les études fondamentales, figurent celle des oses peracétylés par Biemann *et al.* (1963) et celle des oses perméthylés par Chizhov et coll. (Kochetkov *et al.*, 1963), qui ont établi les bases de l'analyse des glycosides. Parmi les abondants travaux ultérieurs qui en découlent, nous retiendrons plus particulièrement l'analyse d'oligosaccharides perméthylés et réduits de Karlsson (1974) et la méthode développée par Lindberg et coll., pour la détermination des liaisons glycosidiques (Hellerqvist *et al.*, 1968; Björndal *et al.*, 1970).

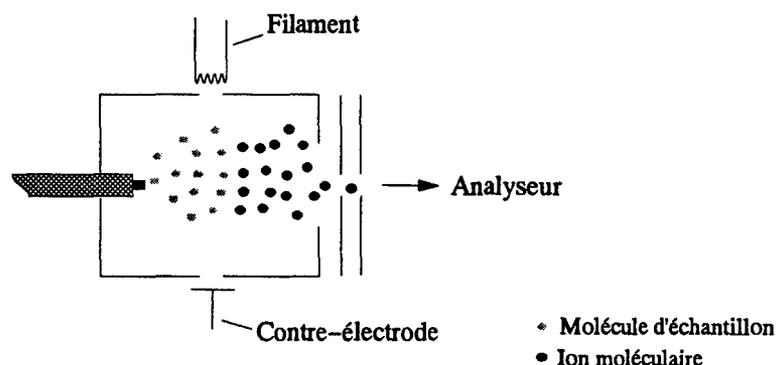
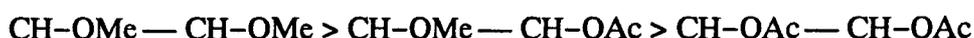


figure 17 – Principe de l'ionisation par impact électronique
(Domon, 1996)

Des études systématiques sur la fragmentation des dérivés alditols acétates partiellement méthylés (PMAA) ont été effectuées (Björndal *et al.*, 1967, 1970) mettant en évidence la possibilité de caractériser le type de substitution des monosaccharides considérés, par la présence de fragments marqueurs. Un certain nombre de règles, permettant d'expliquer la provenance des ions observés en fonction des structures des dérivés, en ont été déduites (Hellerqvist, 1990).

En premier lieu, des dérivés de même degré de substitution donnent des spectres de masse semblables. Il n'est donc pas possible de distinguer, à ce niveau, les stéréoisomères.

L'obtention de fragments primaires est réalisée par rupture de liaisons C-C (fig. 18). Un ordre préférentiel de clivage des liaisons existe, en fonction de la nature des substituants des atomes de carbone et l'on peut le traduire par les relations suivantes :



Une seule exception a été décrite pour le fragment à m/z 89 obtenu à partir du dérivé du galactofuranose, généré par le clivage préférentiel d'une liaison $\text{CH-OMe} - \text{CH-OAc}$, par rapport à une liaison $\text{CH-OMe} - \text{CH-OMe}$.

La charge positive est préférentiellement localisée sur le groupement méthoxy, ou sur l'atome d'azote dans le cas d'une fonction acétamide.

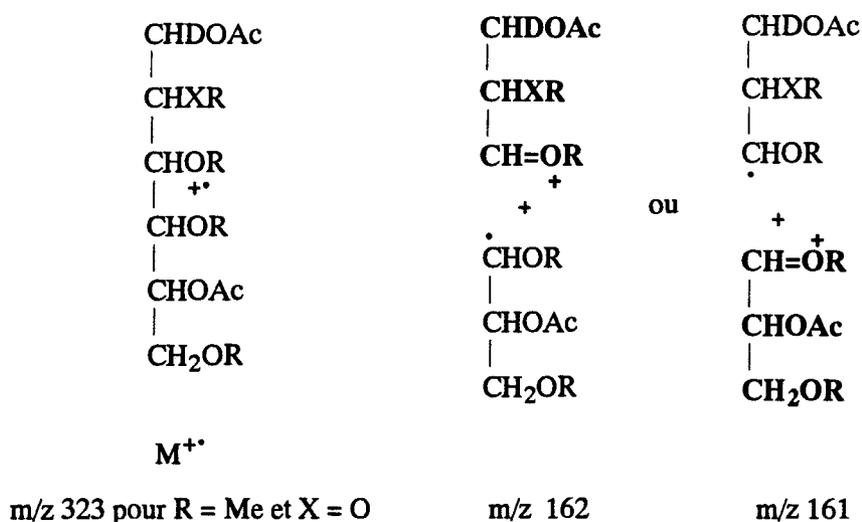


figure 18 – Fragmentation des PMAA ($\text{R} = \text{Me}$ ou Ac , $\text{X} = \text{O}$ ou NAc)

A partir de ces fragments primaires, un certain nombre d'ions secondaires sont formés, par perte de petites molécules telles que l'acide acétique (-60 uma), le méthanol (-32 uma), un cétène (-42 uma) ou le formaldéhyde (-30 uma).

Une étude systématique de la fragmentation des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés a été publiée par Fournet *et al.* (1981). Les principales voies de fragmentation en mode EI de ces dérivés, ou des méthylglycosides perméthylés qui s'en rapprochent, permettent leur caractérisation (fig. 19).

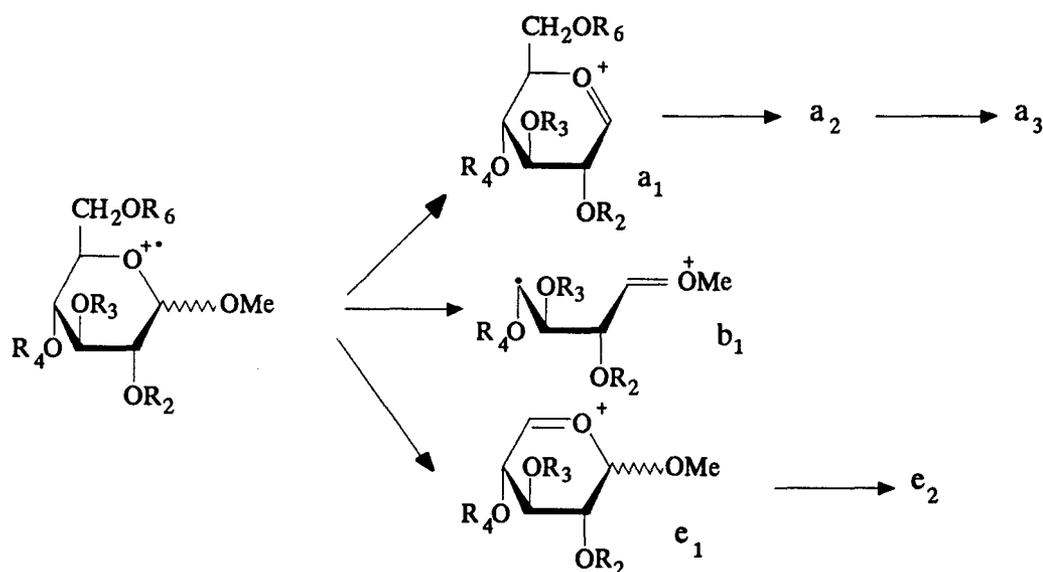


figure 19 – Fragmentation des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés

L'ion moléculaire élimine tout d'abord du méthanol à partir de la position 1, pour donner l'ion oxonium dénommé a_1 , selon la nomenclature de Chizhov et coll. (Kochetkov *et al.*, 1963) pour les monosaccharides. Cet ion est observé à m/z 219, 247, 275 ou 303 en fonction de la nature des substituants R (méthyle ou acétyle). Ce fragment peut donner naissance à une série de fragments par la perte successive des substituants en position 3 et 4, sous forme de méthanol (32 uma) ou d'acide acétique (60 uma). Un deuxième mécanisme conduit à la formation de l'ion b_1 , observable à m/z 176 ou 204, en fonction de la nature du substituant en position 2. L'ion e_1 résulte de la rupture de la liaison entre les atomes de carbone 5 et 6 et est observé à m/z 205, 233, 261 ou 289 selon les différentes combinaisons de substituants. Cette fragmentation permet la distinction des formes pyranosidiques et furannosidiques des dérivés. La combinaison des informations contenues dans les spectres EI des méthylglycosides

partiellement méthylés et acétylés permet ainsi de déterminer l'empreinte des substitutions. Toutefois, cette méthode présente des limites certaines par la relative complexité des spectres obtenus, la faible intensité des fragments de haute masse, ajoutées à la multiplicité des pics observés sur les chromatogrammes.

Ionisation chimique

L'ionisation par impact électronique présente, cependant, comme principal inconvénient, l'absence d'ion moléculaire détectable, puisque, généralement, ce dernier fragmente instantanément. Munson et Field (1966) sont parvenus à solutionner ce problème en développant une nouvelle technique, l'ionisation chimique (chemical ionization, CI) (fig. 20).

L'ionisation de l'échantillon en phase gazeuse est effectuée par l'intermédiaire d'un gaz réactant, lui-même préalablement ionisé par impact électronique. L'avantage de cette technique réside dans le contrôle possible, par un choix adéquat du gaz réactant, du transfert d'énergie entre ce dernier et l'échantillon. Le méthane, l'isobutane et l'ammoniac figurent parmi les gaz les plus couramment utilisés en mode positif. La CI permet aussi les analyses en mode négatif, notamment en utilisant le mélange méthane/hémioxyde d'azote ($\text{CH}_4/\text{N}_2\text{O}$). L'ionisation de l'échantillon, au sein du plasma d'ionisation formé par les ions du gaz réactant (R), résulte d'une réaction acide-base en phase gazeuse entre les ions CH_5^+ (cas du méthane), C_4H_9^+ (cas de l'isobutane) ou NH_4^+ (cas de l'ammoniac) et le substrat (M) :

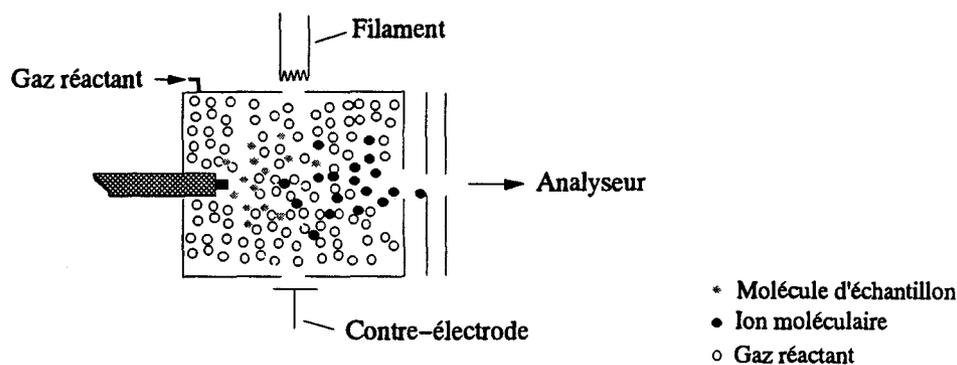


figure 20 – Principe de l'ionisation chimique (Domon, 1996)

L'énergie de la réaction peut être calculée, à partir des affinités protoniques (proton affinity, PA) des espèces en présence, par la relation :

$$\Delta H_r = PA(R) - PA(M)$$

Les gaz réactants utilisables diffèrent par la valeur de leur affinité protonique. Ainsi, pour un échantillon donné, un gaz présentant une affinité protonique plus faible qu'un autre gaz réactant induira une fragmentation plus importante de l'échantillon analysé. Le tableau 10 donne les affinités protoniques des gaz les plus couramment usités.

L'ionisation chimique a été appliquée à l'étude des glycanes (pour références, Radford et DeJongh, 1972, 1980). Les spectres CI des mono- et oligosaccharides dérivés analysés sont le plus souvent relativement simples et peuvent, comme dans le cas des alditols partiellement méthylés et acétylés, présenter des différences marquées en fonction de la stéréochimie (McNeil et Albersheim, 1977). En outre, la désorption/ionisation chimique (DCI) a permis l'étude de glycosides natifs, sans avoir recours à la dérivation.

tableau 10 – Affinités protoniques des principaux gaz réactants

Gaz réactant R	Ion réactant RH ⁺	Affinité protonique (kcal/mol)
H ₂	H ₃ ⁺	101
CH ₄	CH ₅ ⁺	132
H ₂ O	H ₃ O ⁺	167
CH ₃ OH	CH ₃ OH ₂ ⁺	182
i-C ₄ H ₁₀	C ₄ H ₉ ⁺	196
NH ₃	NH ₄ ⁺	205

2.5.3. Les techniques de désorption/ionisation et de nébulisation

Fast atom bombardment

La mise au point de l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (fast atom bombardment, FAB) par Barber *et al.* (1981) a constitué un progrès important en spectrométrie

de masse, en rendant possible l'analyse directe d'échantillons polaires, non volatils et de masse moléculaire élevée, telles les biomolécules.

L'échantillon traité par cette technique, préalablement mis en solution ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), est mélangé à une matrice liquide peu volatile (glycérine, 1-thioglycérine, alcool 3-nitrobenzylique, dithiothréitol/dithioérythritol 5:1) et cette préparation est soumise à un bombardement par un faisceau de particules rapides, des atomes (Ar ou Xe) pour la FABMS (fig. 21), ou des ions (Cs^+) dans le cas de la technique apparentée de la LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry). Dans la technique de FAB, les ions préexistants dans la phase condensée (mélange échantillon-matrice) sont transférés en phase gazeuse. Les espèces moléculaires ainsi générées résultent d'une protonation ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ou d'une cationisation par un métal alcalin ($[\text{M}+\text{cation}]^+$) en mode positif, ou d'une déprotonation ($[\text{M}-\text{H}]^-$) dans le cas d'une analyse en mode négatif. Comme pour les autres techniques de désorption, l'on observe principalement par FAB des espèces moléculaires et peu de fragments.

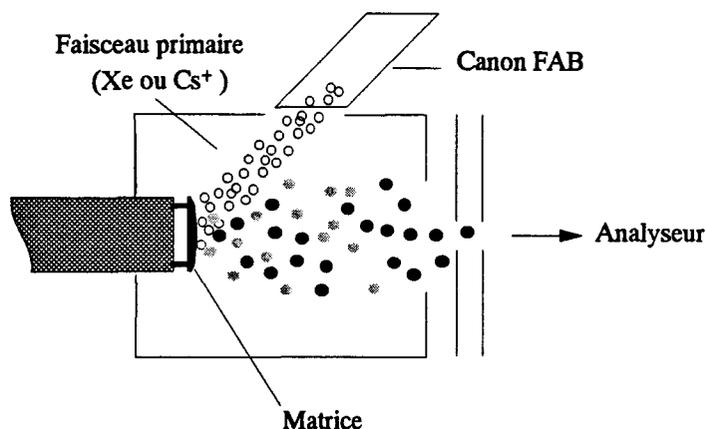


figure 21 – Principe de la désorption/ionisation par FAB (Domon, 1996)

La FABMS a été très rapidement appliquée à l'analyse de glycanes libres ou conjugués (pour références, Egge et Peter-Katalinic, 1987; Dell, 1987). Cependant, et par comparaison avec les peptides, les glycanes natifs étant difficilement ionisables, le recours à une dérivation demeure souvent un passage obligé. Parmi les principales modifications chimiques utilisées, figurent la peracétylation et la perméthylation (Egge et Peter-Katalinic, 1987) ainsi que l'amination réductive (Poulter et Burlingame, 1990). Les spectres FABMS obtenus après méthylation ou acétylation (analyse en mode positif) ou après amination réductive (analyse en

mode négatif) des oligosaccharides livrent des informations structurales importantes, en particulier sur la séquence des monosaccharides constitutifs.

Désorption laser assistée par matrice

Le principe de la désorption/ionisation par laser assistée par matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI), développée par Karas et Hillenkamp (1988), est donné dans la figure 22. Comme précédemment, cette technique utilise un mélange échantillon-matrice, où cette dernière est un solide, absorbant fortement dans l'UV, tels les dérivés de l'acide benzoïque (acide 2,5-dihydroxybenzoïque, DHB). Le mélange est irradié par un faisceau laser UV (337 nm pour un laser à azote), qui dépose une importante quantité d'énergie dans la phase condensée. La matrice est ainsi ponctuellement vaporisée et entraîne avec elle les ions formés par transfert de protons ou de cations entre l'échantillon et la matrice. Celle-ci, présente en large excès par rapport à l'analyte (1000 voire 10000 pour 1), et absorbant l'énergie, permet de préserver l'intégrité du substrat lors de la désorption, de prévenir l'agrégation de l'échantillon qui empêche la formation d'ions moléculaires et confère une grande souplesse à l'analyse, car cette technique, basée sur l'irradiation uniquement de la matrice, est indépendante des propriétés d'absorption et de la masse moléculaire du substrat. Le choix de la matrice peut être primordial pour l'analyse d'un échantillon. Si le DHB est souvent l'option retenue, donnant d'excellents résultats dans de nombreux cas, les acides sinapinique et α -cyano-4-hydroxycinnamique sont couramment utilisés pour l'analyse de peptides et de protéines. Dans le cas des glycanes, parmi d'autres possibilités, figurent la 3-aminoquinoléine (Stahl *et al.*, 1994) et le mélange DHB/1-hydroxyquinoléine (Mohr *et al.*, 1995).

La désorption laser assistée par matrice est très peu consommatrice d'échantillon, la surface irradiée étant très restreinte car le laser est un rayonnement fortement focalisé, le dépôt initial est ainsi de petite taille et la quantité de substrat expulsé n'est que de quelques picomoles. D'un point de vue technique, l'usage d'un rayonnement laser implique l'utilisation d'un analyseur adéquat, en l'occurrence, à temps-de-vol. Celui-ci permet la détection simultanée de tous les ions et est compatible avec les signaux pulsés du laser.

Les principales applications de cette technique récente consistent essentiellement en l'analyse de biomolécules de masse moléculaire élevée telles les acides nucléiques, les protéines et, plus particulièrement, les glycoprotéines natives (Hillenkamp et Karas, 1990). Elle a été appliquée aux glycolipides perméthylés (Juhász et Costello, 1992). Son utilisation pour l'étude d'oligosaccharides (Stahl *et al.*, 1991, 1994; Harvey *et al.*, 1993) est encore peu répandue et concerne principalement l'analyse de digestats enzymatiques d'oligosaccharides dérivés par amination réductive (Harvey *et al.*, 1994; Sutton *et al.*, 1994).

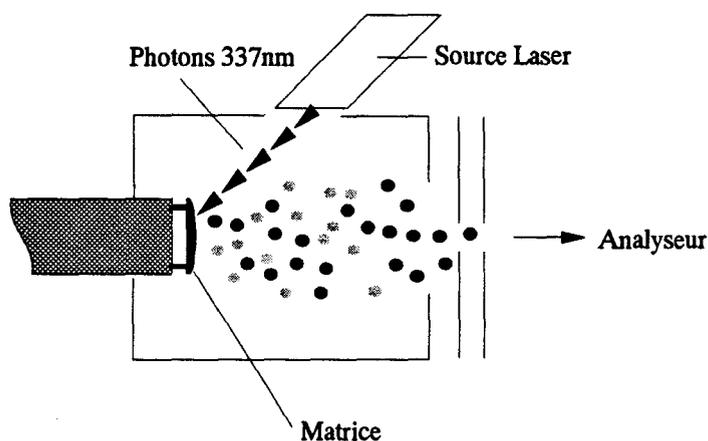


figure 22 – Principe de la désorption/ionisation par laser assistée par matrice (d'après Domon, 1996)

Electrospray

L'ionisation par électrospray (ES) (fig. 23), réactualisée à la fin des années 80 par Fenn *et al.* (1989, 1990), se produit, à pression atmosphérique, lors de la nébulisation d'une solution renfermant l'analyte, à la sortie d'un capillaire métallique, sur lequel est appliqué un fort champ électrique (de 3 à 6kV/cm). L'accumulation de charges, provoquée à la surface du liquide, conduit à la formation de fines gouttelettes chargées. Celles-ci vont subir une diminution de la taille par évaporation du solvant et une explosion, provoquée par la répulsion coulombienne des ions qu'elles renferment, libérant les espèces moléculaires, le plus souvent multichargées. La désolvatation s'effectue sur plusieurs étages de façon concomitante à une réduction progressive de la pression, pour permettre l'introduction des ions dans l'analyseur, aux pressions réduites classiquement utilisées. L'existence des ions multichargés permet d'augmenter la précision des mesures, et surtout, offre la possibilité d'analyser des

biomolécules de haute masse moléculaire avec des analyseurs opérant dans des gammes de masse habituelles (m/z 0–3000).

L'introduction de l'échantillon se faisant en solution, l'électrospray offre l'avantage du couplage entre la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide. Ainsi, outre l'application principale à l'analyse de protéines natives (Edmonds et Smith, 1990), cette technique est utilisée pour l'analyse par LC/ESMS de digestats enzymatiques de protéines (Covey *et al.*, 1991). Des protocoles ont été développés plus spécifiquement pour l'identification des glycopeptides dans ces digestats (Carr *et al.*, 1993; Guzzetta *et al.*, 1993; Huddleston *et al.*, 1993). L'application aux glycanes concerne jusqu'à présent l'analyse d'oligosaccharides natifs (Conboy et Henion, 1992) ou dérivés. L'amination réductive (Gu *et al.*, 1994; Takao *et al.*, 1996) et la perméthylation (Reinhold *et al.*, 1994) permettent, comme en FABMS, d'accroître la réponse.

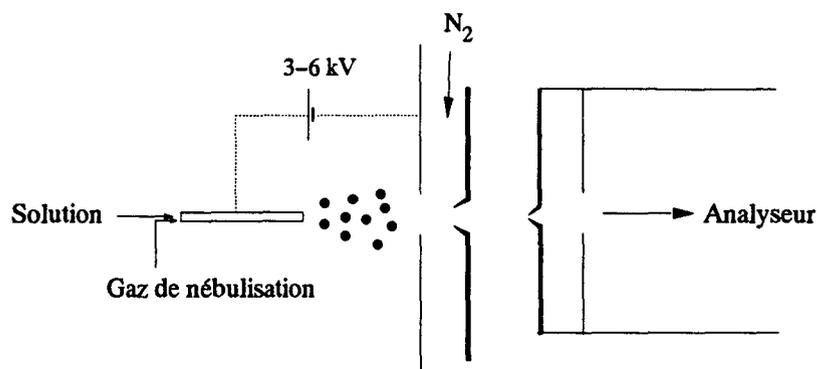


figure 23 – Principe de l'électrospray (d'après Domon, 1996)

2.5.4. La spectrométrie de masse en tandem

Principe général

Les techniques d'ionisation douces discutées précédemment conduisent à la formation principalement d'espèces moléculaires et ne provoquent que peu ou pas de fragmentation. L'acquisition d'informations structurales concernant des biomolécules implique le recours à la spectrométrie de masse en tandem.

Le principe de cette technique, communément désignée par l'acronyme MS/MS, est schématisé dans la figure 24. Ce type d'expérience consiste à utiliser un premier analyseur pour la sélection d'un ion précurseur (precursor ion) et de le soumettre à collision pour en analyser

les produits de fragmentation. L'on distingue à ce niveau la décomposition unimoléculaire (Unimolecular Decomposition) et la dissociation induite par collision (Collision Induced Dissociation), suivant la propension des molécules étudiées à se fragmenter spontanément. Si, théoriquement, rien n'empêche la multiplication des analyseurs successifs (MS^n), pratiquement, la diminution de l'intensité du signal rend difficile l'analyse au delà de la troisième dimension. Plusieurs types d'appareils peuvent être utilisés à des fins d'expériences de MS/MS, parmi lesquels les appareils multi-secteurs, les triples-quadrupôles et les appareils à temps-de-vol équipés d'un réflecteur. S'y ajoutent les spectromètres de masse à résonance en cyclotron d'ions (ICR) et les ion trap (IT). Ces appareils, qui connaissent actuellement un réel développement, sont basés sur la séparation temporelle des ions, à la différence des analyseurs classiques employant la séparation spatiale. Leur limitation pratique se situe à la troisième voire quatrième dimension.

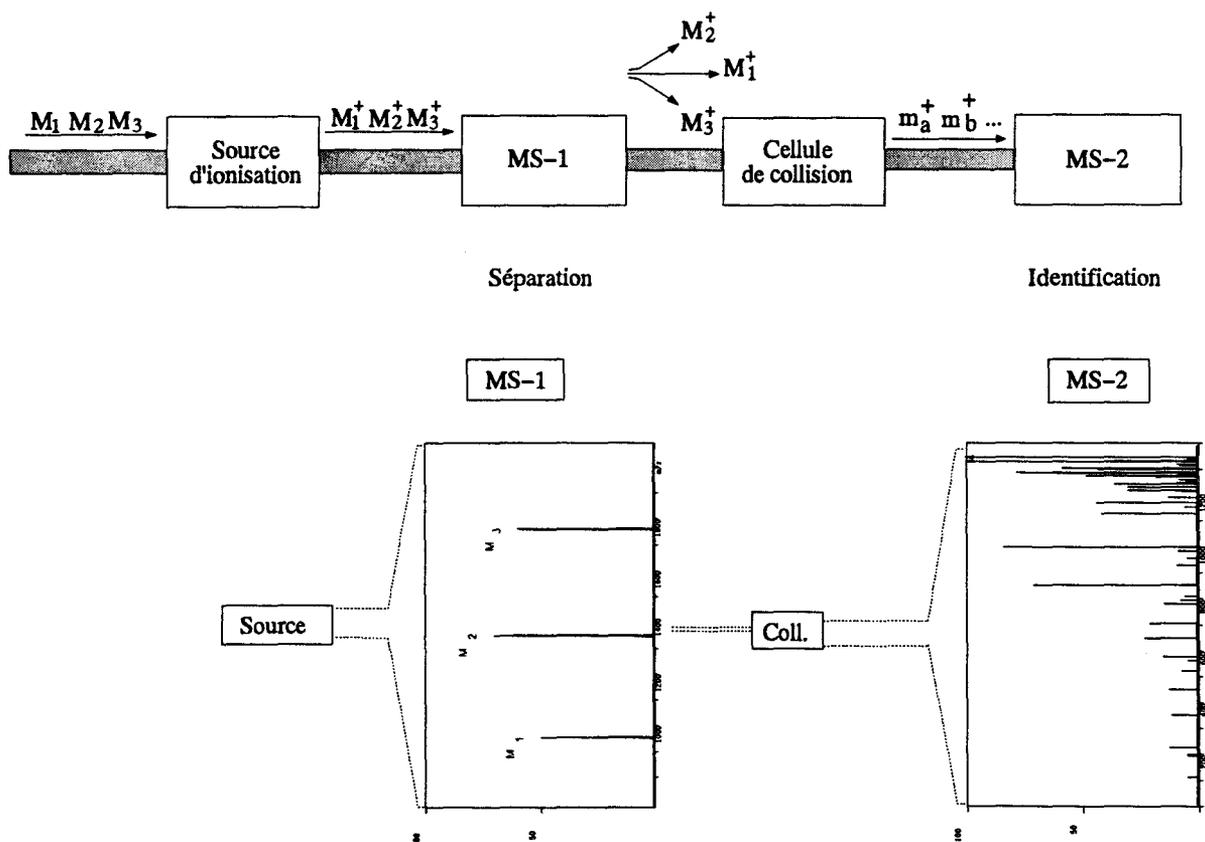


figure 24 – Principe de la spectrométrie de masse en tandem (Domon, 1996)

Les analyses de MS/MS conduisant aux ions de fragmentation peuvent être réalisées sur un instrument à double focalisation de type BE ou EB, pour lequel les deux secteurs sont balayés conjointement avec un rapport B/E constant, défini par la masse de l'ion précurseur choisi. Cette technique livre des fragments résultant de collisions à haute énergie (3–10kV). Il est à noter que ces instruments autorisent des expériences d'ion précurseur (precursor ion scan, parent ion scan), que nous expliciterons plus loin, par la réalisation d'un balayage de type B²/E. Toutefois, la sélection d'un ion s'effectuant à partir d'une fenêtre relativement large, les spectres sont alors compliqués par la prise en compte des différents isotopes. Pour pallier à cet inconvénient majeur, des appareils à quatre secteurs ont été développés, permettant des analyses à haute résolution dans les spectromètres MS-1 et MS-2. Grâce à la sélection du pic monoisotopique de l'espèce moléculaire (renfermant l'isotope ¹²C), les spectres obtenus, comparativement plus simples que précédemment, autorisent la détermination des masses des ions, très précisément, avec une incertitude inférieure à 0,3 Da. Bien que ces appareils livrent des spectres d'une qualité irréprochable, caractérisés par des fragmentations à haute énergie, l'infrastructure requise est lourde et son prix élevé, limitant la généralisation de l'utilisation de ces instruments. En outre, la sensibilité des nouvelles techniques d'ionisation, telles que l'électrospray ou la désorption laser à temps-de-vol, a également contribué à la supplantation des appareils de type FABMS/MS à quatre secteurs par des systèmes plus sensibles et moins onéreux.

Principe de la spectrométrie de masse en tandem sur un appareil triple-quadripôles

Le schéma d'un appareil triple-quadripôles est présenté dans la figure 25.

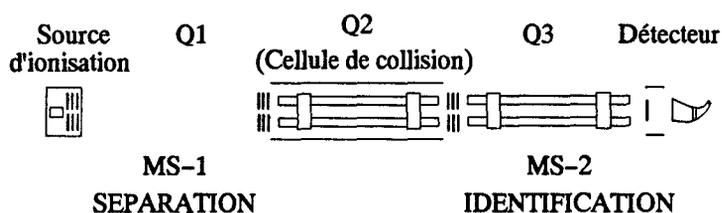
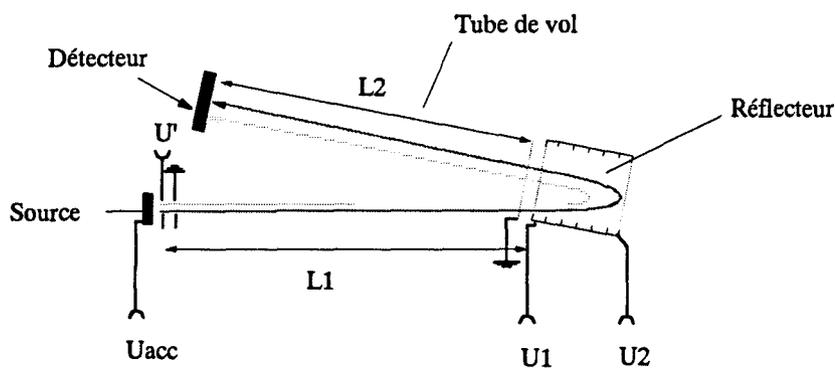


figure 25 – Principe de la spectrométrie de masse en tandem sur un appareil triple-quadripôles

Plusieurs types d'analyses, réalisables à basse énergie (1–100 eV), sont envisageables sur un tel instrument, en fonction de l'ion choisi comme objet de l'analyse. Nous retiendrons les spectres d'ions produits (product ion ou daughter ion) et les spectres d'ions précurseurs (precursor ion ou parent ion). Dans le premier cas, les ions précurseurs sont sélectionnés dans le premier quadripôle (Q_1). Ces ions sont soumis à des collisions multiples à basse énergie, donnant lieu à des transferts successifs d'énergie, dans la cellule de collision (Q_2 , rf-only), qui permet par ailleurs la refocalisation des ions. Finalement, les fragments formés sont analysés dans le troisième quadripôle (Q_3). Dans le second mode d'analyse, la sélection s'opère dans le troisième quadripôle, à partir de la valeur m/z de l'ion fragment choisi, l'on effectue alors un balayage dans Q_1 de façon à identifier tous les précurseurs de l'ion étudié.

Principe de la PSD (post-source decay)

Un appareil à temps-de-vol équipé d'un réflecteur (fig. 26) permet l'identification des fragments formés par décomposition spontanée dans la première zone libre du champ et appelés métastables.



Masse	m_1	m_2	$(m_1 - m_2)$
Vitesse	v	v	v
Energie	$\frac{1}{2} \cdot m_1 \cdot v^2$	$\frac{1}{2} \cdot (m_2/m_1) \cdot v^2$	

figure 26 – Principe de la spectrométrie de masse en mode PSD (Domon, 1996)

Les ions ainsi générés présentent la même vitesse que l'ion précurseur et ne peuvent ainsi pas être distingués de celui-ci en mode linéaire. Néanmoins, ils possèdent une énergie cinétique propre, fonction de la fraction de la masse conservée, et peuvent être refocalisés par le réflecteur en appliquant un potentiel adéquat. L'obtention d'un spectre complet nécessite la diminution du potentiel du réflecteur par paliers successifs (20% à chaque étape). Les différents segments sont ensuite recombinaés et calibrés par traitement informatique pour donner naissance au spectre PSD.

Application de la spectrométrie de masse en tandem aux glycanes et glycoconjugués

La plupart des études de glycanes et de glycoconjugués effectuées, à ce jour, par spectrométrie de masse en tandem, l'ont été en mode FABMS/MS. Quelques travaux ont été décrits en mode électrospray, et plus récemment, la désorption laser en mode PSD a été appliquée à l'analyse de glycanes dérivés.

La masse des échantillons analysables par des spectromètres de masse courants est limitée à environ 2000 sur les appareils quatre-secteurs et 1500 sur les appareils triple-quadrupôles. La spectrométrie de masse en tandem a, par conséquent, tout d'abord été appliquée aux glycanes natifs et dérivés, résultats que nous détaillerons plus avant, et dans une moindre mesure aux glycopeptides (Gillece-Castro et Burlingame, 1990; Henion *et al.*, 1992) et aux glycolipides (Costello et Vath, 1990).

Le développement de nouvelles techniques, notamment l'ESMS/MS et la MALD/PSDMS a permis d'étendre le champ d'analyse aux biomolécules de masse moléculaire plus élevée. L'ESMS/MS autorise l'analyse de telles molécules grâce à l'existence d'ions précurseurs multichargés, augmentant de fait la masse des composés analysables, de même qu'elle permet de travailler à des énergies de collision plus importantes. La MALD/PSDMS concerne une gamme de masses plus vaste et l'analyse de peptides et de glycopeptides de taille importante (4000-6000) dans ces conditions a été décrite (Carr *et al.*, 1993).

Les premières analyses de spectrométrie de masse en tandem d'oligosaccharides natifs sur un appareil de type quatre-secteurs ont été réalisées par Carr *et al.* (1985). Cette étude a démontré le potentiel de cette technique pour l'analyse structurale de glycanes,

particulièrement pour la détermination de la séquence des monosaccharides et la différenciation de structures linéaires et ramifiées. Par la suite, d'autres études ont été effectuées en FABMS/MS tant à partir de composés natifs que dérivés. Parmi les plus importantes, retenons les travaux de Leary et coll. (Zhou *et al.*, 1990; Hofmeister *et al.*, 1991) sur des oligosaccharides natifs de petite taille cationisés par des métaux alcalins (Li^+) ou divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Des analyses similaires en mode négatif ont également été décrites (Ballistreri *et al.*, 1989; Dallinga et Heerma, 1991; Garozzo *et al.*, 1990, 1992). Les travaux de Leary et coll. et de Garozzo et coll. sur des diglucosides ont montré qu'il était possible de différencier les isomères de liaison au vu des empreintes caractéristiques des spectres FABMS/MS. Il faut toutefois noter que la spectrométrie de masse en tandem (CID) d'oligosaccharides non dérivés révèlent l'existence de doubles clivages, par la rupture de deux liaisons glycosidiques, donnant lieu à la formation de fragments pouvant compliquer voire compromettre l'interprétation des spectres de structure inconnue. De plus, le récent travail de Kováčik *et al.* (1995) décrivant la migration de résidus glycosyles au sein des structures rend compte d'une possible complication supplémentaire.

Le fait que, d'une façon générale, les glycanes et glycoconjugués soient des substrats difficiles à ioniser, a incité plusieurs groupes à étudier les produits issus de différentes réactions de dérivation, en particulier, la peracétylation et la perméthylation (Egge et Peter-Katalinic, 1987). Les dérivés résultants montrent un accroissement de la réponse due au caractère nettement lipophile de ces produits.

L'amination réductive, initialement proposée par Wang *et al.* (1984), provoque une augmentation de la réponse en raison du caractère lipophile de l'aglycone et surtout par l'introduction d'un site de protonation (Poulter et Burlingame, 1990). Parmi les différentes amines greffées, citons le p-aminobenzoate d'éthyle (ABEE), la 2-aminopyridine (2-AP), l'hexylamine (Chen *et al.*, 1992) et le p-aminophényl-triméthylammonium (Dell *et al.*, 1988). Ce dernier a pour caractéristique d'introduire une charge permanente. Les dérivés obtenus par la dérivation par l'ABEE ont donné lieu à une étude systématique en FABMS/MS (Gillece-Castro et Burlingame, 1990). Il y est montré que les précurseurs de ces dérivés donnent essentiellement des fragments de type Y, permettant la détermination de la séquence des

monosaccharides et la localisation d'éventuels points de branchement. L'analyse en mode négatif de ces dérivés montre des signaux $[M-H]^-$ intenses, aux fragmentations caractéristiques livrant des informations similaires à celles obtenues en mode positif.

Par spectrométrie de masse en tandem d'oligosaccharides peracétylés, il a été montré que ces composés donnent des spectres simples, prévisibles et dominés par des ions de type B. Une détermination immédiate de la séquence des monosaccharides et de la position des points de branchement est ainsi possible (Domon *et al.*, 1989, 1990a; Blok-Tip *et al.*, 1993). De plus, ces dérivés permettent, dans une certaine mesure, d'obtenir des informations sur les liaisons glycosidiques, notamment par fragmentation secondaire des ions B, correspondant à la perte d'une molécule d'acide acétique indicative d'une liaison de type 1-4 (Domon *et al.*, 1990b). Toutefois, toutes les applications décrites, à ce jour, concernent des oligosaccharides dont la taille n'excède pas six unités osidiques, étant donnée la forte augmentation en masse que provoque la peracétylation.

La perméthylation permet de pallier, dans une certaine mesure, à cet inconvénient et sa combinaison à l'analyse par MS/MS a fait l'objet de plusieurs études. Initialement appliquée à des disaccharides, cette dérivation a montré, à partir des espèces moléculaires $[M+NH_4]^+$, en mode CI, la possible distinction des isomères de liaison (DeJong *et al.*, 1987). Ultérieurement, le groupe de Laine et coll. a démontré que la MS/MS des espèces moléculaires sodées de trisaccharides perméthylés, effectuée à basse énergie, permettait une même différenciation (Laine *et al.*, 1988, 1991; Yoon et Laine, 1992). D'autre part, la MS/MS à haute énergie a été utilisée pour l'analyse d'adduits sodiques d'oligosaccharides perméthylés (Domon et Costello, 1988; Gillece-Castro et Burlingame, 1990; Lemoine *et al.*, 1990, 1991; Burlingame *et al.*, 1994). Enfin, les glycolipides et les glycosphingolipides après perméthylation ont été étudiés en détail par spectrométrie de masse en tandem (Costello et Vath, 1990). Deux groupes (Baldwin *et al.*, 1990; Domon *et al.*, 1994) ont par ailleurs mis en évidence l'influence de l'introduction d'une charge piégée. Celle-ci peut prendre la forme d'un ammonium quaternaire généré par la méthylation d'une fonction amine ou résulter de la greffe d'un aglycone par amination réductive. Les spectres CID à haute énergie obtenus sont caractérisés par la présence

d'ions issus de processus de fragmentation à charge piégée (charge remote fragmentation, CRF) faisant intervenir des ruptures homolytiques.

Plus récemment, l'électrospray a été combiné à la spectrométrie de masse en tandem à basse énergie, offrant, par rapport à la FABMS/MS, une sensibilité accrue de deux ordres de grandeur. Les travaux de Henion *et al.* (1992) et de Carr *et al.* (1993) ont jeté les bases de l'identification des glycopeptides par des ions marqueurs spécifiques pour des mélanges complexes issus de digestions enzymatiques. Les résultats des groupes de Leary et coll. (Fura et Leary, 1993) et de Garozzo et coll. (Garozzo et Green, 1991), à partir respectivement d'espèces moléculaires cationisées ou déprotonées illustrent l'application possible de cette technique aux oligosaccharides. Reinhold *et al.* (1994, 1995) ont montré que, par analyse par MS/MS d'espèces sodées d'oligosaccharides perméthylés, l'on peut déduire des informations structurales pertinentes, en particulier en ce qui concerne les liaisons glycosidiques.

Enfin, l'utilisation de la MALD/PSDMS a donné des premiers résultats (Lemoine *et al.*, 1996). Cette technique offre de nouvelles perspectives pour l'analyse de glycanes, notamment à partir d'oligosaccharides dérivés par amination réductive grâce à l'obtention d'espèces moléculaires protonées.

2.6. Stratégies intégrées

L'analyse complète de la glycosylation d'une glycoprotéine implique, comme dans le cas des autres glycoconjugués, la caractérisation détaillée des structures glycaniques. L'étude d'une telle biomolécule s'avère toutefois beaucoup plus complexe, dans la mesure où cette détermination n'est qu'une étape de l'analyse des glycoformes de la glycoprotéine. A partir d'une même séquence peptidique, l'on peut définir trois niveaux dans l'hétérogénéité de la glycosylation. Différentes structures glycaniques peuvent être mises en évidence pour un même site de glycosylation. Pour une protéine donnée, présentant plusieurs sites de glycosylation, les structures présentes aux différents sites peuvent donner naissance à plusieurs combinaisons. Enfin, le nombre et la nature des sites effectivement glycosylés distinguent les glycoformes. Ainsi, outre la connaissance des structures glycaniques, s'ajoutent les nécessaires localisation et quantification des différents glycanes aux sites de O- et N-

glycosylation. Il apparaît par conséquent qu'un glycanne donné ne représente souvent qu'une petite partie de l'ensemble des glycanes de la glycoprotéine étudiée. Se pose donc le problème de l'analyse d'oligosaccharides disponibles en microquantités, qui appelle une méthodologie adaptée.

Ce problème revêt une importance cruciale pour le développement des glycoprotéines recombinantes. A la différence des protéines et des acides nucléiques, en l'absence de tout modèle moléculaire cellulaire, le contrôle de la glycosylation est réalisé indirectement par les conditions de la biosynthèse des glycanes, elles-mêmes influencées par les conditions de culture. Les liens entre conditions de culture et glycosylation n'étant pas encore établis à ce jour, il est difficile de prévoir les caractéristiques des glycoformes. L'analyse de la structure des oligosaccharides issus des glycoprotéines recombinantes demeure donc un passage obligé, notamment dans le but d'une utilisation thérapeutique. Le glycochimiste se trouve ainsi confronté au problème de la nécessaire caractérisation détaillée de glycanes disponibles en très faible quantité.

Au cours des chapitres précédents, nous avons pu apprécier la variabilité des structures glycaniques des glycoconjugués et discuter des différentes techniques existantes pour l'analyse de ces structures. Cependant, si des éléments structuraux peuvent être ainsi déterminés, il s'avère qu'aucune technique ne peut à elle seule solutionner le problème de l'hétérogénéité des glycanes, à plus forte raison dans le cas de microquantités. Il apparaît ainsi nécessaire de repenser l'analyse structurale des glycanes dans une vision plus globalisatrice et intégrée. L'utilisation combinée d'approches différentes tant chimiques qu'enzymatiques ou spectroscopiques a été mise en oeuvre dans un certain nombre de travaux que nous allons maintenant discuter.

Li *et al.* (1968) ont été parmi les premiers à proposer l'utilisation de la digestion séquentielle de glycanes par des exoglycosidases comme microméthode d'étude structurale. Testée sur des glycopeptides issus de glycoprotéines du foie, cette méthode permet de poser des hypothèses d'enchaînement et d'élucider la configuration des carbones anomériques.

Kawasaki et Ashwell (1976) ont combiné la digestion séquentielle par les exoglycosidases et l'oxydation périodique. L'action des enzymes tant sur les glycopeptides

natifs que sur les produits d'oxydation permet de confirmer certaines des hypothèses de séquence et de type de liaison.

Kobata et coll. (Kobata et Ginsburg, 1972; Yamashita *et al.*, 1977a, 1977b) ont développé une stratégie selon les mêmes bases, pour l'analyse structurale des oligosaccharides du lait de femme. Outre l'emploi des exoglycosidases permettant la mise en évidence de structures partielles communes aux différents oligosaccharides, ces auteurs ont exploité les informations obtenues par l'application de la méthode de Lindberg. Cette approche a été appliquée à la caractérisation de glycannes de glycoprotéines de différents milieux biologiques (salive, urines, sérum) (Mizuochi *et al.*, 1978, 1979; Yamashita *et al.*, 1979, 1980; Yoshima *et al.*, 1980; Takasaki et Kobata, 1986). Après libération des oligosaccharides, marqués au tritium par réduction, la caractérisation de la masse moléculaire est effectuée, tout au long de l'étude par le biais de la chromatographie basse pression de perméation de gel. L'estimation des masses moléculaires s'effectue par comparaison avec un mélange d'oligomères de glucose de degré de polymérisation croissant (Kobata, 1994). Il est ainsi possible de suivre la diminution de la masse moléculaire des composés lors de digestions enzymatiques effectives et d'en déduire des informations sur la séquence des oses, l'anométrie des atomes de carbone impliqués dans les liaisons et, dans le cas d'enzymes de spécificité étroite, d'établir, avec plus ou moins de certitude, le type de liaison.

Une telle combinaison de techniques a donné lieu à la mise au point d'un système automatisé (Reagent Array Analysis Method) (Edge *et al.*, 1992). La méthode consiste à soumettre des aliquotes d'échantillon à des cocktails enzymatiques prédéfinis et d'analyser l'efficacité de ces mélanges d'enzymes de spécificités différentes par l'estimation de la masse moléculaire des produits. Il est à noter que l'ensemble des digestats est analysé en une seule étape chromatographique, restreignant en cela l'analyse à un seul oligosaccharide pur. Une autre limite d'un tel système réside dans la définition du cocktail qui doit pouvoir utiliser des conditions standards pour toutes les enzymes, celles-ci présentant des spécificités parfois étroites, et donc, des exigences poussées.

L'analyse de problèmes ponctuels fait appel à des techniques chimiques et enzymatiques complémentaires. Ainsi, l'établissement de la concordance entre les structures neutres et

sialylées est réalisé par la comparaison des profils électrophorétiques ou chromatographiques (échange d'ions) des composés avant et après désialylation et par l'évolution de la masse moléculaire des oligosaccharides désialylés par digestions enzymatiques, la désialylation étant effectuée par hydrolyse en milieu acide (Yoshima *et al.*, 1980) ou par neuraminidase (Mizuochi *et al.*, 1978; Yamashita *et al.*, 1980, Takasaki *et al.*, 1980). L'étude de la fucosylation et, en particulier, la distinction du type de liaison en 3 ou en 6 utilise la sensibilité différente du monosaccharide porteur à l'action de l'oxydation périodique (Yamashita *et al.*, 1979). Après la mise en évidence de ces substitutions, la localisation respective des acides sialiques et des résidus de fucose est réalisée, dans le cas de N-glycannes biantennés monosubstitués, par la digestion, par les exoglycosidases, des branches non substituées. La détermination du résidu de mannose du core, porteur de la branche sialylée ou fucosylée, est obtenue après digestion par l'endo D (Mizuochi *et al.*, 1978, 1979) ou l' α -mannosidase de Jack bean (Yamashita *et al.*, 1980). Cette stratégie a été mise en oeuvre pour la caractérisation de N-glycannes complexes fucosylés de cellules normales et cancéreuses, mettant en évidence l'existence de motifs poly-N-acétyllactosaminiques (Takasaki *et al.*, 1980).

Le groupe de Geyer et coll. (Geyer *et al.*, 1984; Pfeiffer *et al.*, 1992) a appliqué un ensemble de techniques tout à fait comparable à la caractérisation de N-glycannes, notamment de type oligomannosidique, hybride et complexe renfermant des motifs poly-N-acétyllactosaminiques, la confirmation des hypothèses structurales, pour les échantillons majeurs, étant obtenue par RMN du ^1H . Tai *et al.* (1975) et Hase *et al.* (1985) ont ajouté l'acétolyse aux techniques utilisables, pour la caractérisation plus spécifique d'oligomannosides. Rana *et al.* (1987) ont appliqué cette stratégie à l'étude de O-glycannes de mucines.

Wang *et al.* (1984) ont introduit la dérivation par amination réductive des oligosaccharides, s'affranchissant des contraintes de détection des produits tritiés et permettant d'envisager la miniaturisation des stratégies. Le gain de sensibilité obtenu facilite l'analyse des échantillons par RP-HPLC et FABMS. Ces auteurs ont également montré la compatibilité d'une telle dérivation avec la digestion séquentielle par des exoglycosidases, tandis qu'Hase *et*

al. (1985) ont utilisé l'acétolyse et l'oxydation périodique suivie de la dégradation de Smith pour l'étude d'oligosaccharides dérivés.

L'analyse de la glycosylation de glycoprotéines, issus de types cellulaires différents provenant d'organes distincts ou de lignées normales et cancéreuses, réalisée par Parekh *et al.* (1987, 1989), selon des procédés analogues à ceux déjà décrits, a permis de préciser la nature des différents glycannes isolés, mais illustre surtout l'existence de l'hétérogénéité entre les structures au sein d'un même site de glycosylation, entre les différents sites et entre les mêmes glycoprotéines issues de différents types cellulaires. Ces travaux confirment l'importance de l'environnement cellulaire dans le contrôle de la glycosylation, puisqu'à partir d'une même chaîne peptidique, deux types de cellules peuvent donner naissance à des glycoprotéines différemment glycosylées.

Plus récemment, les nouvelles techniques d'ionisation, électrospray et désorption laser assistée par matrice, ont été intégrées dans les stratégies, permettant des gains accrus en sensibilité lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

L'utilisation de l'ESMS couplée à la chromatographie liquide, initialement utilisée pour la caractérisation de protéines ou de digestats protéiques a été étendue à l'analyse de produits de digestions de glycoprotéines (Carr *et al.*, 1993). Carr et coll. (Roberts *et al.*, 1995) ont ainsi développé une stratégie basée sur la LC/ESMS, pour l'identification des glycopeptides par analyse des fragments de petite masse, marqueurs de la présence de glycannes. A partir de la séquence peptidique connue, des hypothèses structurales peuvent être avancées et la confirmation peut être obtenue, dans une certaine mesure, par le suivi de la masse moléculaire des glycopeptides après digestion séquentielle par des exoglycosidases. Cette stratégie, utilisant des techniques de grande sensibilité, a été employée pour la caractérisation de glycoprotéines recombinantes (Settineri et Burlingame, 1994; Roberts *et al.*, 1995). Medzihradzky *et al.* (1994) ont, par ailleurs, cherché à améliorer la résolution du système chromatographique pour la séparation des glycopeptides, utilisant en cela un nouveau mélange de solvants (eau/éthanol/propanol/acide formique), qui accroît de plus la sensibilité de la détection en spectrométrie de masse.

Plusieurs groupes ont parallèlement développé l'utilisation de la spectrométrie de masse en mode MALD. L'analyse de glycoprotéines par MALDMS permet d'en obtenir une empreinte globale, mettant ainsi en évidence l'hétérogénéité des glycoformes. Réitérée pour chaque glycopeptide, une telle analyse précise la diversité structurale de la glycosylation pour chaque site de glycosylation. La déduction des structures oligosaccharidiques est, à ce stade, possible pour une séquence peptidique connue.

La sensibilité, la rapidité et la précision des analyses effectuées par MALDMS a été appliquée par Sutton *et al.* (1994) à la caractérisation de N-glycopeptides, puis aux mélanges de glycannes libérés par PNGase F. Stahl *et al.* (1994) ont utilisé une approche similaire pour l'étude d'oligosaccharides du lait de femme et de la glycosylation de protéines. Outre l'appréciation de l'hétérogénéité de la glycosylation par site, une quantification des différentes structures désialylées peut être effectuée à partir des intensités des signaux. Une série de digestions par exoglycosidases, réalisée à petite échelle et en faible concentration en sels, permet de confirmer les hypothèses structurales déduites des masses moléculaires. Le même souci de diminuer la proportion en sels lors des digestions enzymatiques, évitant en cela toute purification ultérieure, a conduit Yang et Orlando (1996) à développer un tampon standard pour la mise en oeuvre de toutes les digestions enzymatiques. Harvey *et al.* (1994) ont par ailleurs préconisé l'emploi du réflecteur en MALDMS, afin d'accroître la sensibilité et la précision de la détection.

La combinaison de l'ESMS et de la MALDMS pour la caractérisation des fractions peptidique et glycanique a été utilisée par Carr et coll. (Roberts *et al.*, 1995) pour une étude détaillée de la structure primaire de glycoprotéines recombinantes à des fins thérapeutiques. L'emploi de l'ESMS et de l'ESMS/MS permet la distinction des peptides et des glycopeptides, à partir de fragments marqueurs, notamment issus du clivage des liaisons glycosidiques de résidus de N-acétylglucosamine. La MALDMS est plus particulièrement mise en oeuvre pour la caractérisation de la masse moléculaire des digestats d'exoglycosidases à partir des glycopeptides et des oligosaccharides. Le choix des enzymes est effectué en fonction des informations structurales apportées par les analyses par spectrométrie de masse ainsi que par HPAEC-PAD des glycannes.

Le principal inconvénient des stratégies récentes développées à ce jour réside dans l'utilisation des seules exoglycosidases pour la détermination simultanée de la séquence, de la configuration des carbones anomériques et des types de liaison, dernier point souvent discutable. Dans le cas de l'utilisation d'enzymes à spécificité étroite, la méthode n'est pas applicable en routine et nécessite un choix approprié à chaque cas traité. Pour les études utilisant des enzymes à spécificité large, conférant une certaine souplesse dans l'utilisation et permettant une miniaturisation des méthodes, la détermination précise des types de liaison est difficilement réalisable sur la seule base de ces analyses. Dans tous les cas, les résultats restent tributaires d'éventuelles contaminations comme Carr et coll. (Roberts *et al.*, 1995) et Sutton *et al.* (1994) ont pu l'observer.

Au cours de ce chapitre, nous avons pu voir l'importance de la combinaison de techniques chimiques, enzymatiques et spectroscopiques, méthodologies qui apparaissent complémentaires dans la détermination structurale de glycannes. Malgré les avancées réalisées par un certain nombre de travaux, mettant en jeu, notamment, les nouvelles méthodes d'ionisation en spectrométrie de masse (ES et MALD), il existe toujours un grand besoin d'une méthodologie générale pour la caractérisation structurale détaillée d'oligosaccharides, et plus particulièrement, pour ceux disponibles en microquantités. Ce formidable besoin est le nouveau défi, posé par la glycobiologie et l'avènement des glycoprotéines recombinantes, aux glycochimistes.

Résultats et Discussion

1. INTRODUCTION

Aucune des méthodologies actuellement utilisables pour l'analyse des glycanes ne peut à elle seule permettre la détermination de l'ensemble des caractéristiques qui définissent la structure primaire de ces molécules. Ceci se justifie par la complexité de ces structures, liée au nombre d'éléments structuraux à préciser, mais également par un certain retard pris dans le développement des techniques chimiques, notamment en ce qui concerne leur miniaturisation. Il suffit, pour s'en persuader, de comparer les avancées réalisées par les techniques d'analyse des glycanes, avec le niveau atteint par les méthodologies utilisées dans l'étude des protéines et des acides nucléiques. Bien que les récents développements dans l'instrumentation, notamment en RMN et en spectrométrie de masse, aient considérablement fait progresser la caractérisation des structures de molécules glucidiques, aucune méthodologie ne permet, à ce jour, une détermination sensible et détaillée de telles structures, qui plus est, à partir de mélanges complexes.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de concourir au développement d'une méthodologie visant à la caractérisation structurale complète d'oligosaccharides, pour des échantillons disponibles en faible quantité. La stratégie que nous avons développée a été mise au point, pour partie, grâce à l'étude d'oligosaccharides témoins choisis comme modèles de structures partielles de glycanes issus de glycoconjugués. Elle utilise les possibilités offertes par la spectrométrie de masse, plus particulièrement en tandem, en faisant appel aux nouvelles techniques d'ionisation que sont l'électrospray et la désorption laser assistée par matrice. La détermination de certaines des caractéristiques structurales des glycanes nous a conduit à combiner le potentiel de méthodes chimiques et enzymatiques aux nouvelles techniques de spectrométrie de masse.

Ce travail comporte trois parties. Nous avons appliqué, dans un premier temps, la spectrométrie de masse en tandem (modes ES et MALD) à différents types de dérivés d'oligosaccharides dans le but de déterminer la séquence des constituants. La détermination du type de liaison fait l'objet du deuxième chapitre, qui présente la mise au point d'une variante de la méthode de Lindberg, axée sur l'analyse des dérivés par spectrométrie de masse en tandem

couplée à la chromatographie en phase gazeuse. En dernier lieu, la combinaison de la digestion des oligosaccharides par des exoglycosidases et la caractérisation des produits obtenus par MALDMS permet de déterminer la configuration des carbones anomériques.

2. DETERMINATION DE LA SEQUENCE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM

Pour cette étude, une série d'oligosaccharides modèles (annexe 3) a été dérivée par amination réductive, peracétylation ou perméthylation et la masse moléculaire des dérivés obtenus contrôlée par MALDMS. Ces produits ont ensuite fait l'objet d'une étude systématique par spectrométrie de masse en tandem, en ionisation par électrospray (ESMS/MS), et, le cas échéant, par désorption laser assistée par matrice en mode post-source decay (MALD/PSDMS), afin de mettre en évidence et de rationaliser les processus de fragmentation.

2.1. Oligosaccharides dérivés par amination réductive

Après dérivation par la 2-aminobenzamide (2AB) selon le mode opératoire d'amination réductive présenté page 203, les oligosaccharides obtenus, après extractions chloroformiques de l'excès de chromophore, sont purifiés par HPLC en phase inverse. Les chromatogrammes obtenus par détection UV ($\lambda = 254$ nm), lors de la purification sur colonne C18 (mode opératoire page 203), présentent des profils très similaires. Celui obtenu dans le cas du LNT est proposé à titre d'illustration dans la figure 27. La nature des composants détectés a été confirmée par TLC (protocole page 202, solvant nBuOH/AcOH/H₂O et révélation orcinol sulfurique) par comparaison avec des témoins. On distingue, sur le chromatogramme HPLC, trois pics principaux. Après l'élution au volume mort de la colonne des sels résiduels et, le cas échéant, d'une fraction de l'oligosaccharide non dérivée (1), le premier pic majoritaire détecté (2) correspond au complexe formé par la 2-aminobenzamide et le cyanoborohydrure de sodium. Le pic important détecté en fin de gradient (4) correspond à l'excès de 2AB, les extractions chloroformiques réalisées ne l'éliminant pas en totalité. Cependant, le gradient utilisé et l'hydrophobicité du 2AB concourent à retarder son élution de la colonne, ne gênant pas la purification des oligosaccharides dérivés. Ceux-ci, comme dans le cas du LNT (3), sont toujours détectés sous la forme d'un pic unique absorbant fortement en UV. Les autres pics,

minoritaires, présents dans tous les chromatogrammes, ne renferment que des produits secondaires de la réaction et qui ne sont pas de nature osidique.

Les oligosaccharides ainsi purifiés sont collectés, lyophilisés et analysés par MALDMS (conditions page 213). Cette technique présente l'avantage d'une détermination rapide, précise et sensible de la masse moléculaire de l'échantillon. Le spectre de masse du LNT-2AB (fig. 28) se caractérise par la présence, outre des pics de basse masse attribuables à la matrice utilisée, le DHB, de deux pics, respectivement à m/z 850 et 866. L'oligosaccharide dérivé, de masse moléculaire 827 (annexe 4), est ainsi détecté sous la forme d'espèces moléculaires dues à un adduit sodique ($[M+Na]^+ = 850$) ou potassique ($[M+K]^+ = 866$).

L'analyse par ESMS confirme ce résultat, le LNT-2AB donnant un signal dominant à m/z 828, correspondant à l'espèce moléculaire protonée $[M+H]^+$, accompagné du signal à m/z 850 de l'espèce moléculaire sodée $[M+Na]^+$. Nous avons donc entrepris l'étude des oligosaccharides dérivés par ESMS/MS. L'analyse des espèces moléculaires protonées (m/z 828) du LNT-2AB et de son isomère de liaison, le LNnT-2AB, préparé suivant le même procédé, sont reproduits dans la figure 29. Dans les deux cas, deux séries d'ions sont observées. Selon la nomenclature de Domon et Costello (1988), la première série est constituée par les ions B, avec B_2 , B_3 et $B_{2/1}$, respectivement à m/z 366, 528 et 204, ce dernier correspondant à une fragmentation secondaire de l'ion B_2 . Les ions B résultent de la rupture de la liaison glycosidique, après protonation de l'atome d'oxygène impliqué dans cette liaison (fig. 30). La seconde série comprend les ions Y, avec Y_1 , Y_2 et Y_3 , respectivement à m/z 301, 463 et 666. Ces ions sont générés par rupture de la liaison glycosidique et transfert de proton sur le fragment contenant l'extrémité terminale réductrice (fig. 30).

L'existence de ces ions donne des indications sur la séquence des oligosaccharides analysés. En effet, l'incrément de masse entre deux ions de la même série d'indices successifs permet de déduire la nature du monosaccharide correspondant. Par exemple, entre Y_2 et Y_1 , la différence de masse de 162 Da permet de caractériser la présence d'un hexose. De même, l'on peut déduire l'ensemble de la séquence du LNT-2AB et du LNnT-2AB, comprenant successivement un hexose marqué au 2AB, un hexose, une N-acétylhexosamine et un hexose.

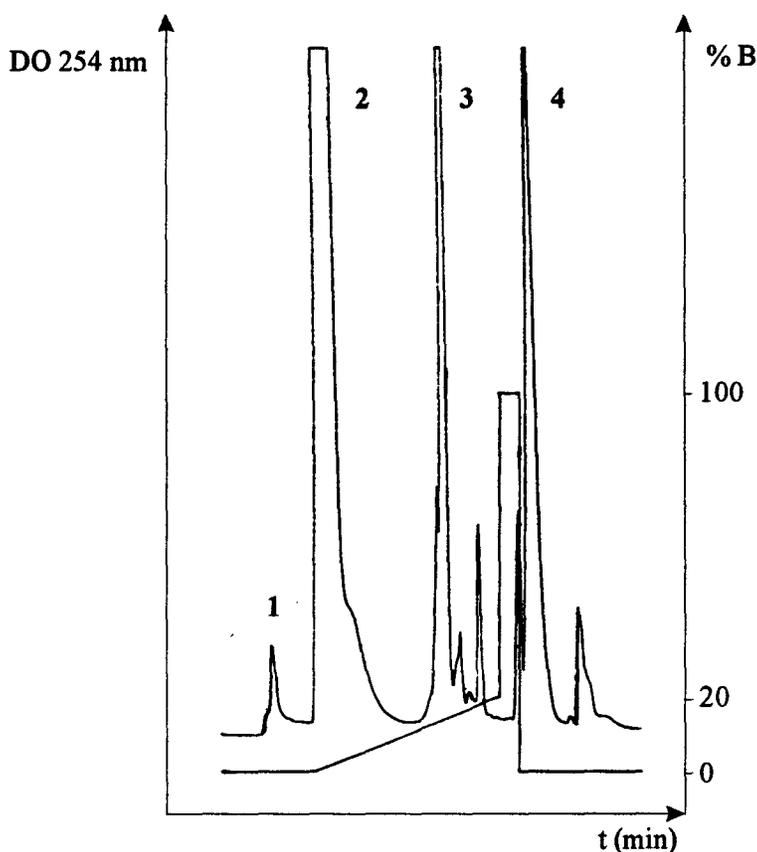


figure 27 - Chromatogramme HPLC en phase inverse du dérivé LNT-2AB

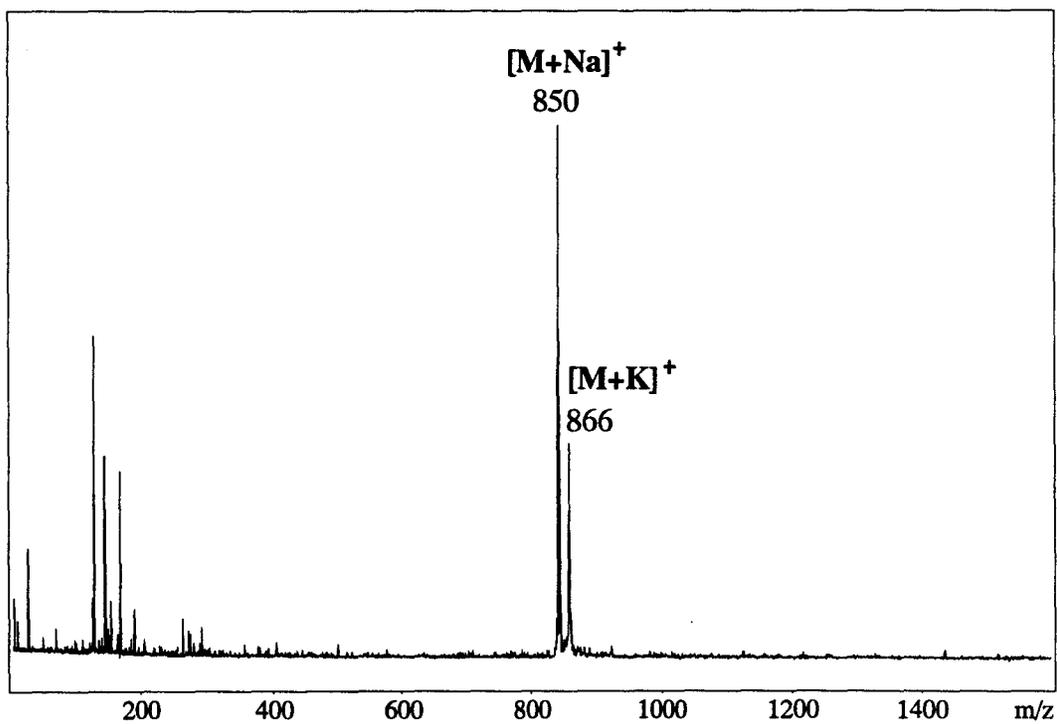


figure 28 - Spectre MALDMS du dérivé LNT-2AB

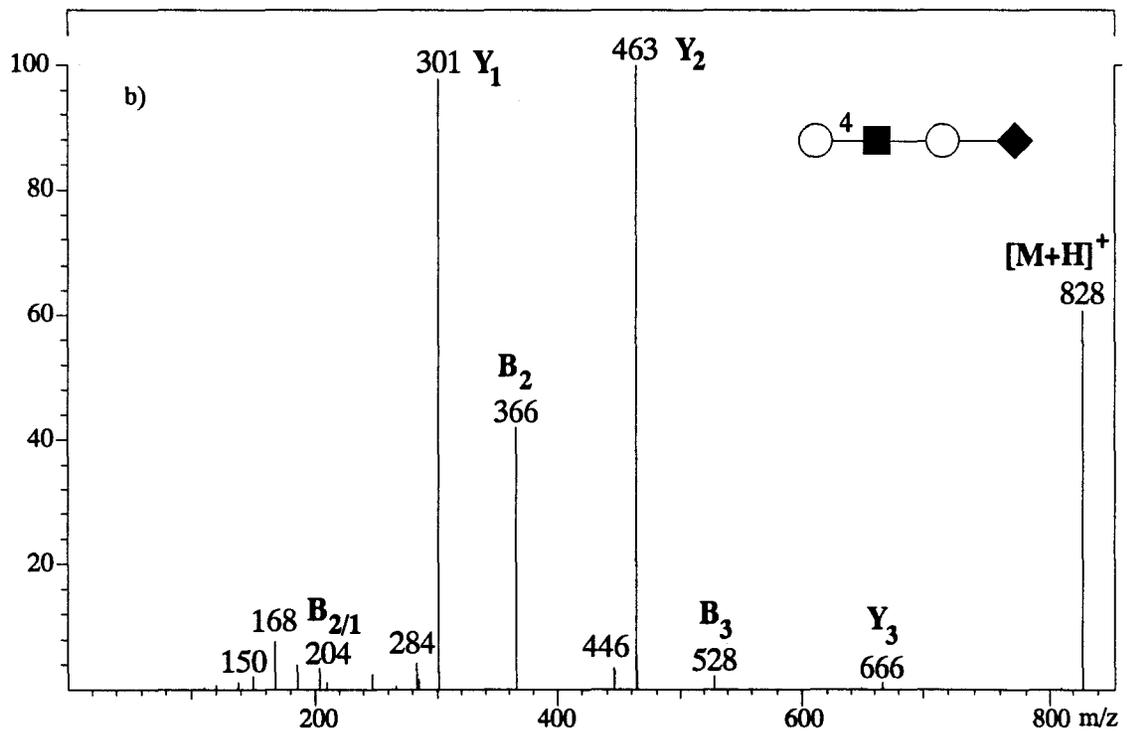
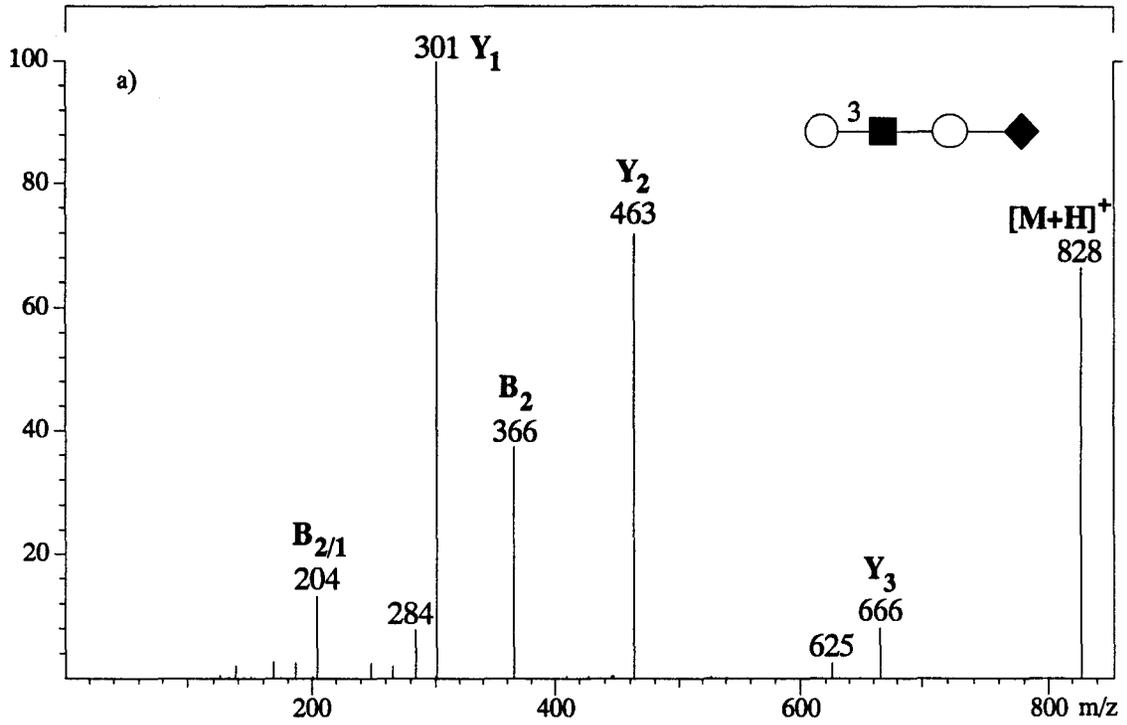


figure 29 – Spectres ESMS/MS des dérivés LNT-2AB (a) et LNnT-2AB (b)
 Ion précurseur [M+H]⁺ à m/z 828 (énergie de collision 15 eV)

En outre, l'intensité des ions B_2 et Y_2 s'explique par un clivage préférentiel de la liaison glycosidique du résidu de N-acétylhexosamine. Cette rupture est favorisée par la coopération du groupement acétamide (fig. 31).

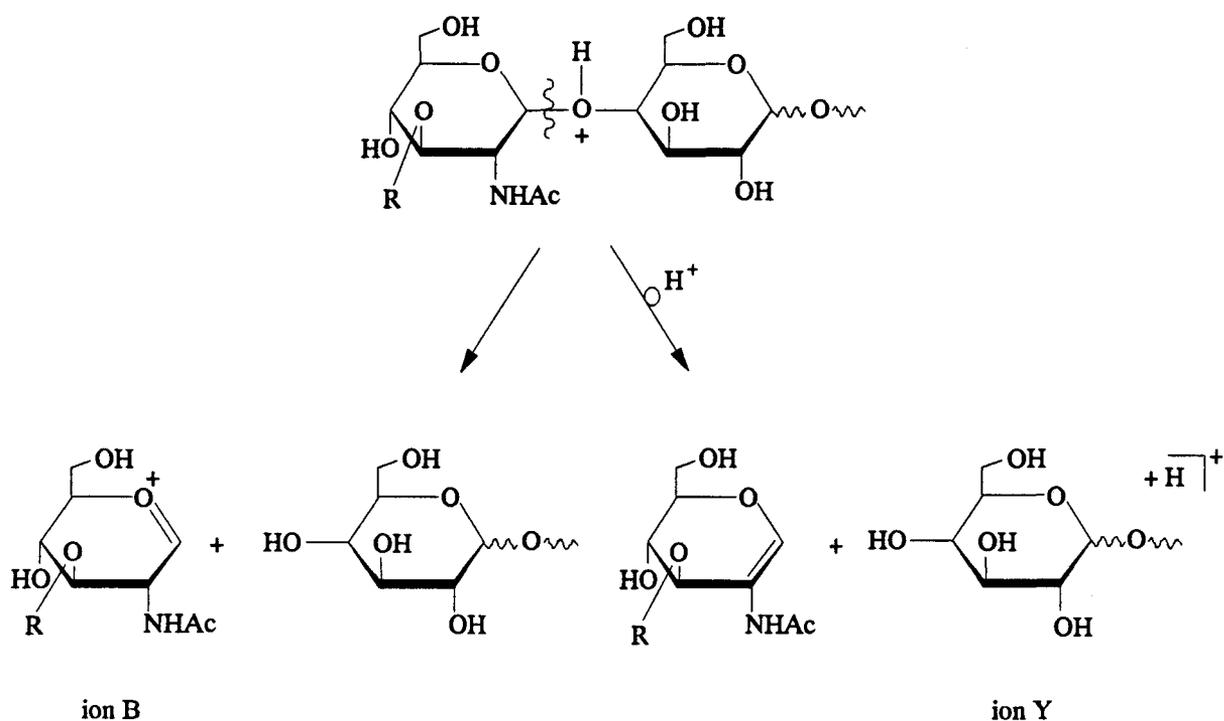


figure 30 – Formation des ions de fragmentation B et Y

Par convention et par souci de clarté, l'ensemble des schémas de fragmentation présentés au cours de ce travail sont basés sur la configuration du glucose.

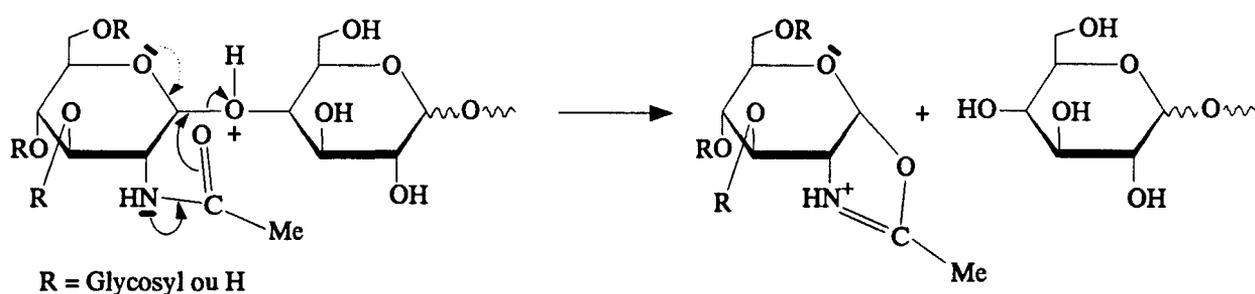


figure 31 – Clivage préférentiel de la liaison glycosidique des résidus de N-acétylhexosamine

La fucosylation du LNT et du LNT donne naissance aux oligosaccharides de la série LNF. La masse moléculaire de ces oligosaccharides dérivés par la 2-aminobenzamide et purifiés par HPLC (LNF-1, fig. 32) est de 973. Le spectre MALDMS du LNF-1-2AB présente, comme précédemment, deux adduits, sodique à m/z 996 et potassique à m/z 1012

(fig. 33). Les spectres ESMS/MS des oligosaccharides dérivés de type LNF sont regroupés dans la figure 34. Le spectre CID de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 974 du composé LNF-1-2AB (fig. 34a) présente, comme dans les cas décrits précédemment, des ions de la série Y. Cette série n'est cependant pas complète puisque le fragment Y_3 n'est pas observé. La séquence oligosaccharidique peut toutefois être élucidée grâce à l'existence de l'ion dominant B_3 , complémentaire de l'ion Y_3 , détecté à m/z 512 et résultant du clivage de la liaison glycosidique du résidu de N-acétylglucosamine. L'ion B_3 donne lieu, par ailleurs, à deux fragmentations secondaires observables sous la forme des ions $B_{3/2}$ et $B_{3/1}$. La fragmentation de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ de l'oligosaccharide LNF-2-2AB (fig. 34c) donne une série complète d'ions Y. Deux oses en position terminale non réductrice sont mis en évidence par l'existence des ions $Y_{3\alpha}$ et $Y_{3\beta}$, respectivement à m/z 812 et 828. L'ion B_2 , de nature trisaccharidique, à m/z 512, se décompose en $B_{2/1\beta}$ par perte du résidu fucosyle. Le spectre de l'oligosaccharide dérivé LNF-3-2AB (fig. 34d) présente des processus de fragmentation similaires à ceux décrits pour le LNF-2-2AB. L'on y retrouve les fragments de la série Y, à savoir Y_1 , Y_2 , $Y_{3\alpha}$ et $Y_{3\beta}$, auxquels s'ajoute un ion à m/z 666 correspondant à la perte du résidu galactosyle par l'ion $Y_{3\beta}$. L'ion B_2 (m/z 512) est également détecté et se décompose en ion $B_{2/1\beta}$ (m/z 366) par perte du résidu fucosyle.

L'ion à m/z 609, observé avec une intensité plus ou moins importante dans les spectres ESMS/MS des oligosaccharides LNF-1-2AB, -2-2AB et -3-2AB, ne peut être inclus dans les séries de fragments B et Y. Il peut s'agir d'une impureté des échantillons, mais l'absence de cette même impureté, lors de l'analyse en ESMS/MS des mêmes oligosaccharides sous forme perméthylée (§ 2.3.1.), contredit une telle hypothèse. Une autre explication a été proposée par Kovacic *et al.* (1995) et implique une modification de la séquence oligosaccharidique par migration interne du résidu fucosyle en phase gazeuse. Cependant, si il est possible de concevoir une migration similaire à celle décrite par ces auteurs sur une distance équivalente à un résidu, dans les cas des isomères branchés LNF-2-2AB et LNF-3-2AB, cela paraît plus difficile dans le cas du LNF-1-2AB où un "saut" de deux oses est nécessaire. Si une telle hypothèse tend à se généraliser, l'analyse par spectrométrie de masse en

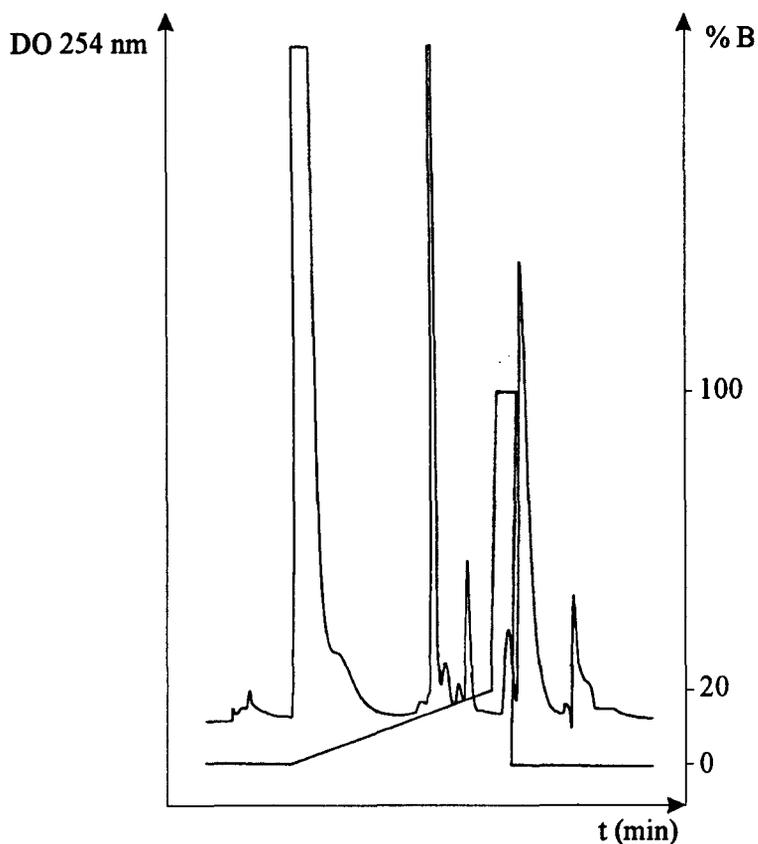


figure 32 – Chromatogramme HPLC en phase inverse du dérivé LNF1-2AB

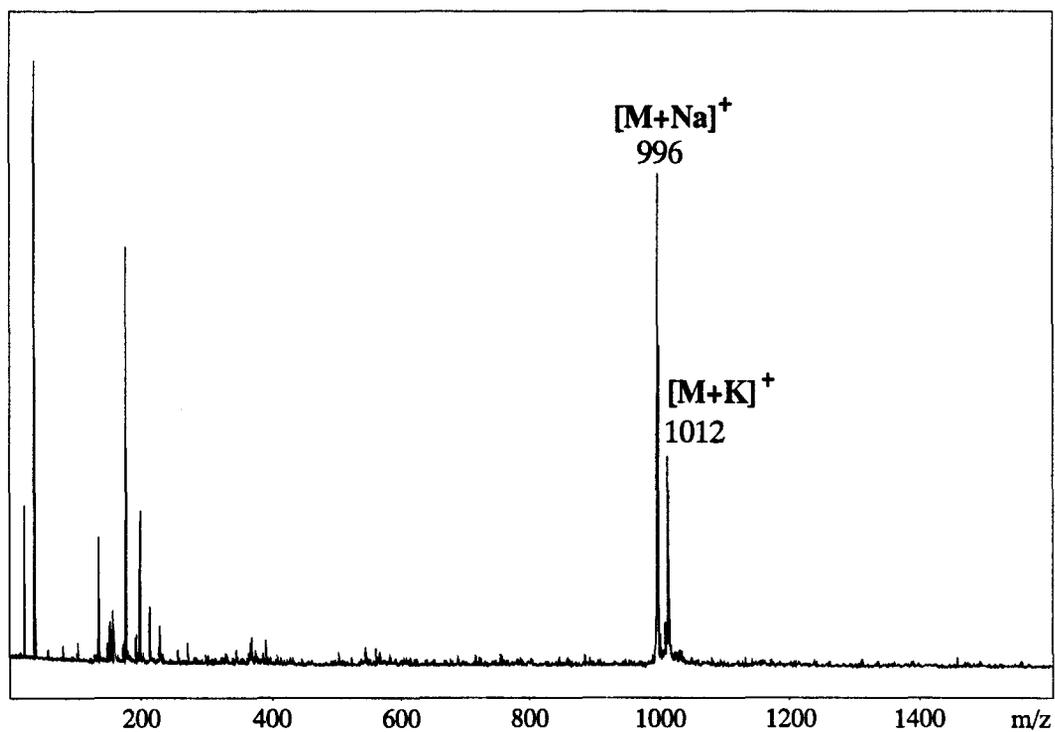


figure 33 – Spectre MALDMS du dérivé LNF1-2AB

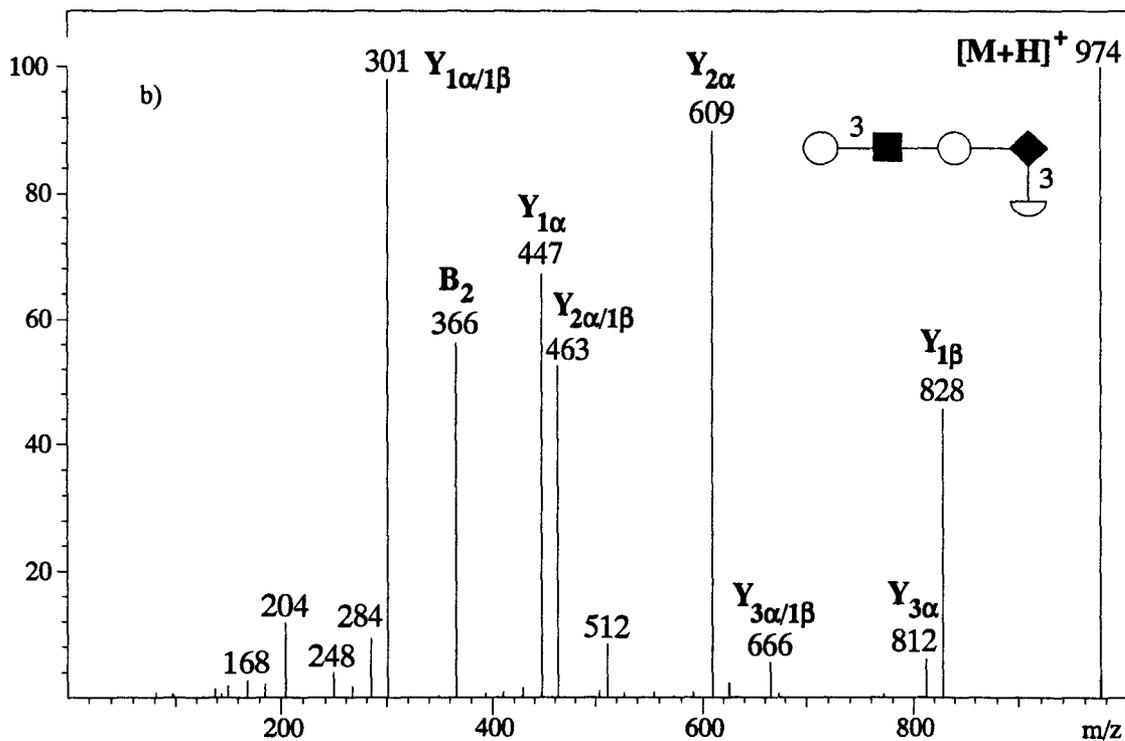
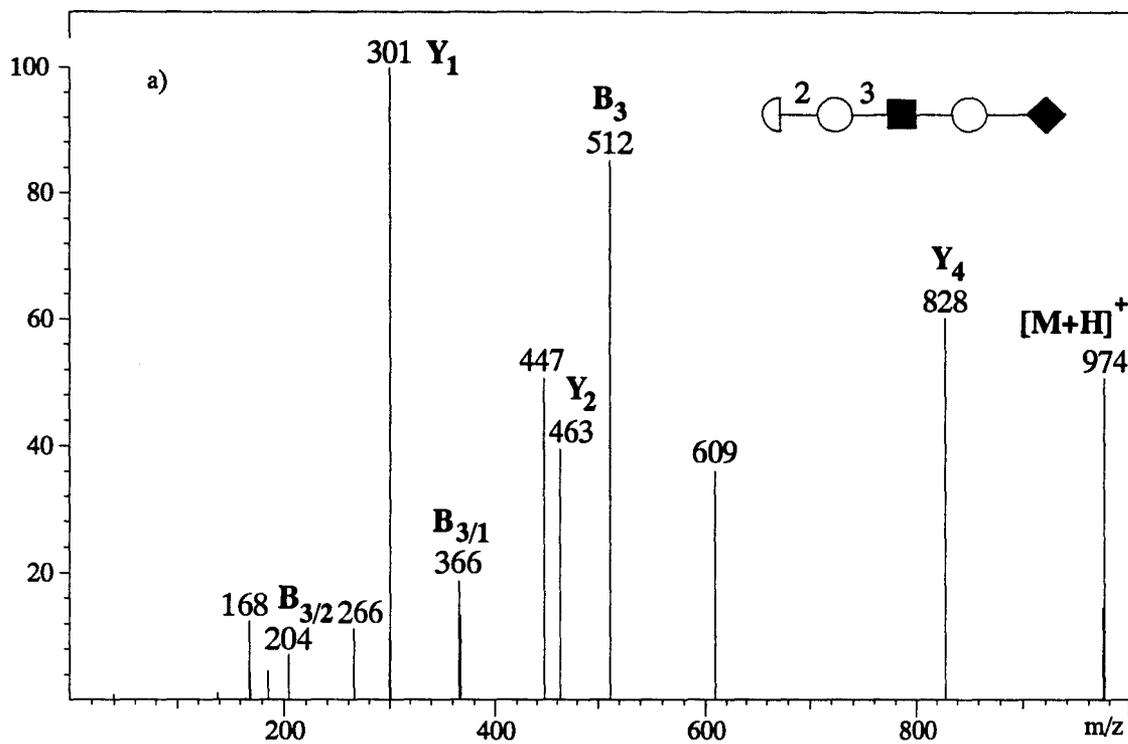


figure 34 – Spectres ESMS/MS des dérivés de la série LNF monofucosylés :
LNF1-2AB (a) LNF5-2AB (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 974
(énergie de collision 15 eV)

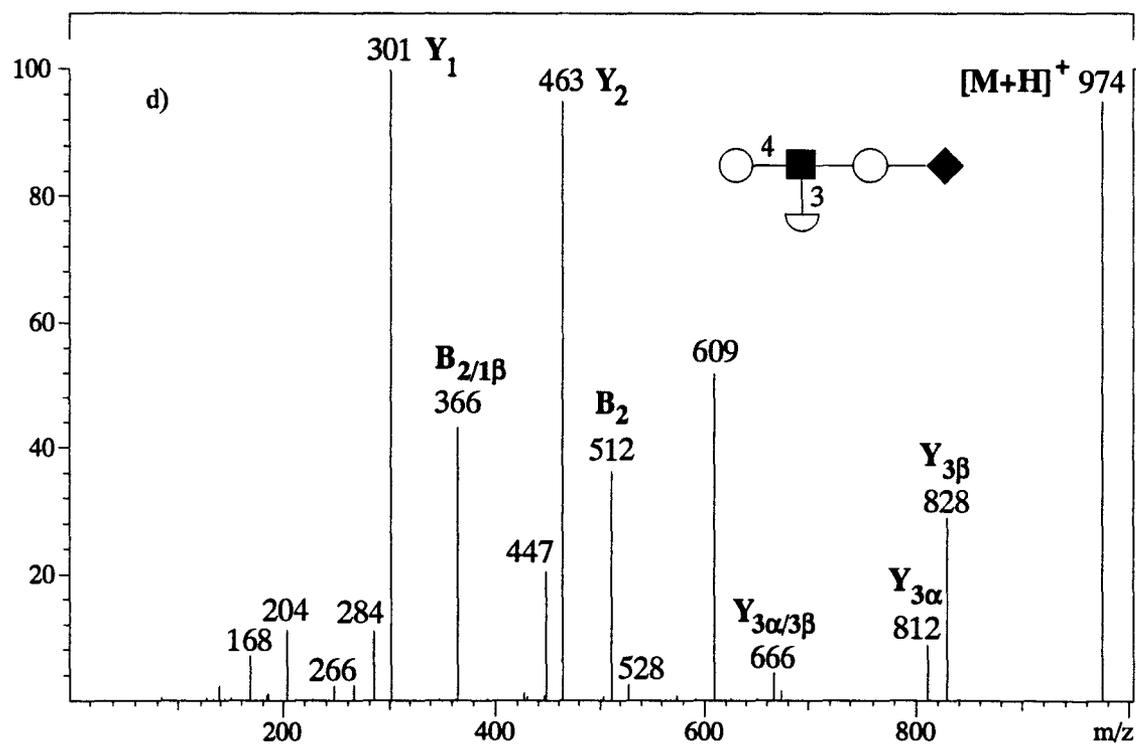
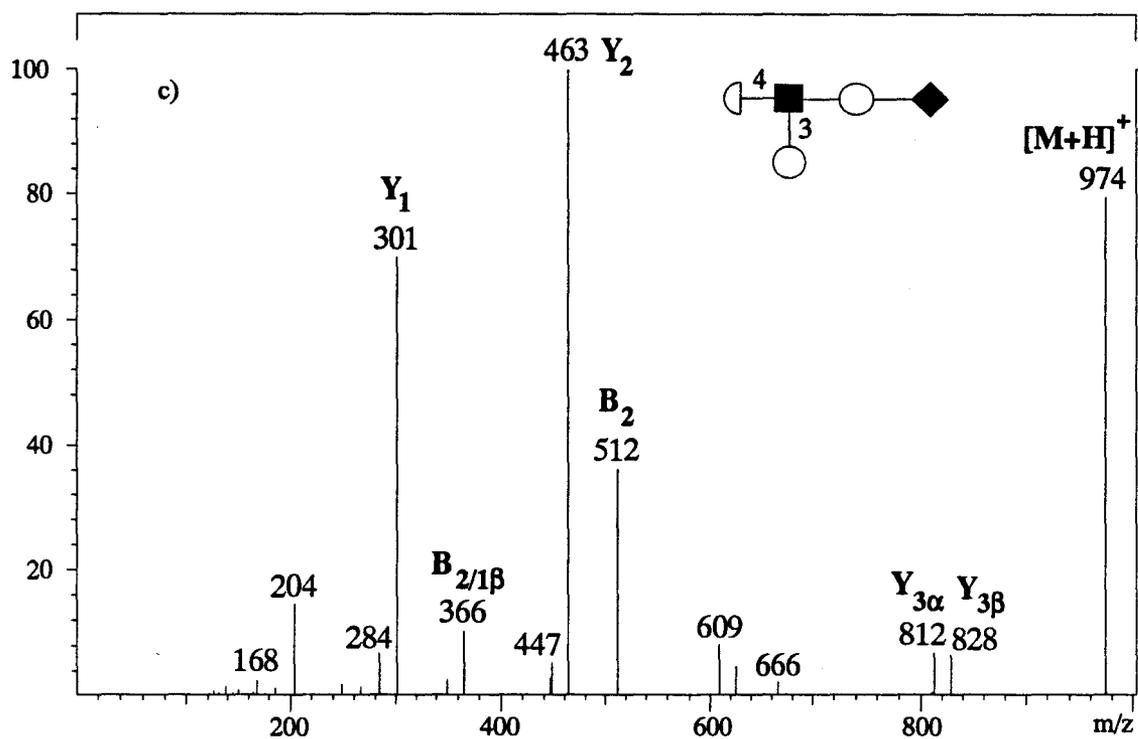


figure 34 (suite) – Spectres ESMS/MS des dérivés de la série LNF monofucosylés :
 LNF2-2AB (c) LNF3-2AB (d) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 974
 (énergie de collision 15 eV)

tandem de dérivés 2AB ne constitue pas une technique adéquate pour la détermination de séquences oligosaccharidiques.

En dernier lieu, le spectre ESMS/MS du composé LNF-5-2AB (fig. 34b) met en évidence principalement les ions de la série Y, $Y_{1\alpha}$, $Y_{2\alpha}$, $Y_{3\alpha}$ issus de la rupture des liaisons glycosidiques au sein de la branche la plus longue de l'oligosaccharide, ainsi que l'ion $Y_{1\beta}$ (m/z 828), généré par perte du résidu fucosyle. Les fragments $Y_{1\alpha}$, $Y_{2\alpha}$ et $Y_{3\alpha}$ subissent une décomposition par perte de ce même résidu pour donner les ions $Y_{1\alpha/1\beta}$, $Y_{2\alpha/1\beta}$ et $Y_{3\alpha/1\beta}$. Comme décrit précédemment, la fragmentation préférentielle au niveau de la liaison du résidu GlcNAc donne naissance à l'ion B_2 (m/z 366). On note, enfin, la présence d'un ion à m/z 512, non concordant avec la structure de l'oligosaccharide considéré.

Les oligosaccharides sialylés LST-a, LST-b et LST-c ont également été dérivés par amination réductive (protocole page 204) après estérification de la fonction carboxyle (MeOH/HCl 0,5N, 7h, 25°C), purifiés par HPLC dans les conditions précédemment mentionnées (LST-a, fig. 35) et leur masse moléculaire de 1132 vérifiée par MALDMS.

Les spectres ESMS/MS de l'espèce moléculaire protonée à m/z 1133 de ces composés (fig. 36a-c) mettent en évidence les séries d'ions B et Y, ainsi que certaines fragmentations secondaires, principalement à partir des ions B obtenus par clivage de la liaison glycosidique des résidus de N-acétylglucosamine (B_3 pour les LST-a-2AB et LST-c-2AB et B_2 pour le LST-b-2AB). Les séquences et points de branchement de ces oligosaccharides peuvent ainsi être élucidés. Par ailleurs, l'on note la présence d'un ion à m/z 971, dans le spectre du LST-c-2AB. Une justification possible envisage une migration de l'acide sialique, par référence à Kovacic *et al.* (1995) (comparer les figures 36b et 36c).

L'analyse en ESMS de ces oligosaccharides marqués au 2AB se caractérise par la présence des espèces moléculaires $[M+H]^+$ et, dans une moindre mesure, $[M+Na]^+$, mais surtout par l'existence de signaux d'intensité importante à m/z 567 correspondant à des ions doublement chargés (LST-c-2AB, fig. 37). Ces ions, peu courants dans l'analyse des glycannes, ont également été soumis à collision et les spectres MS/MS obtenus sont reproduits dans la figure 38. Ils sont dominés principalement par des ions de la série Y. Ceci peut

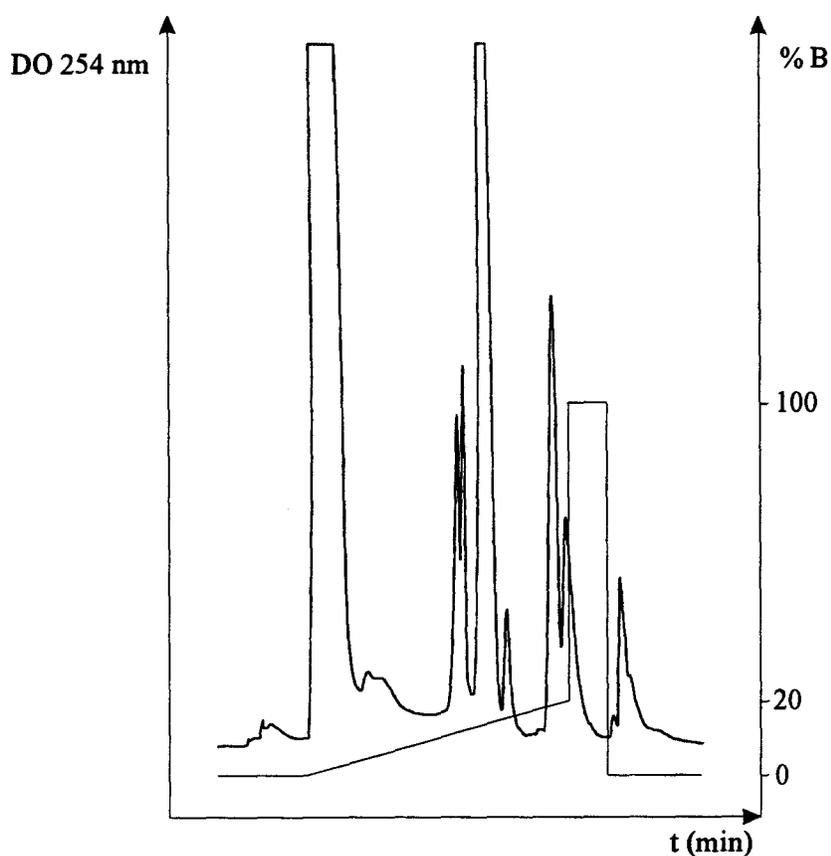


figure 35 - Chromatogramme HPLC en phase inverse du dérivé LST-a-2AB

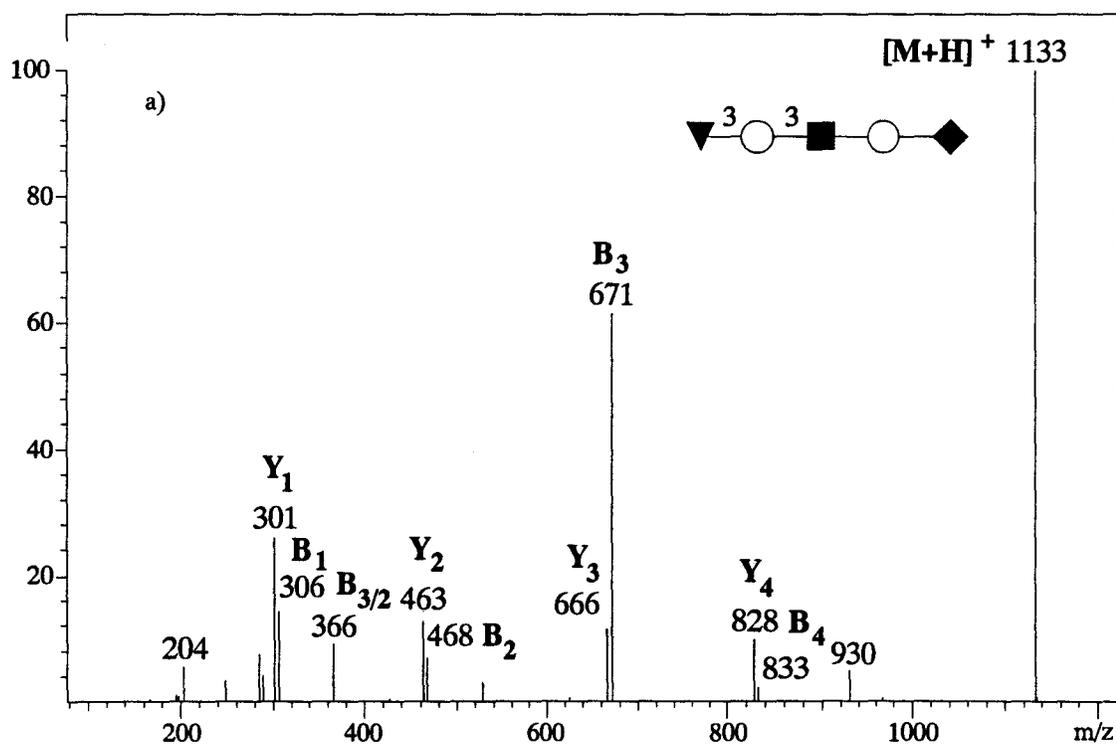


figure 36 - Spectres ESMS/MS des dérivés sialylés : LST-a-2AB (a)
Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1133 (énergie de collision 15 eV)

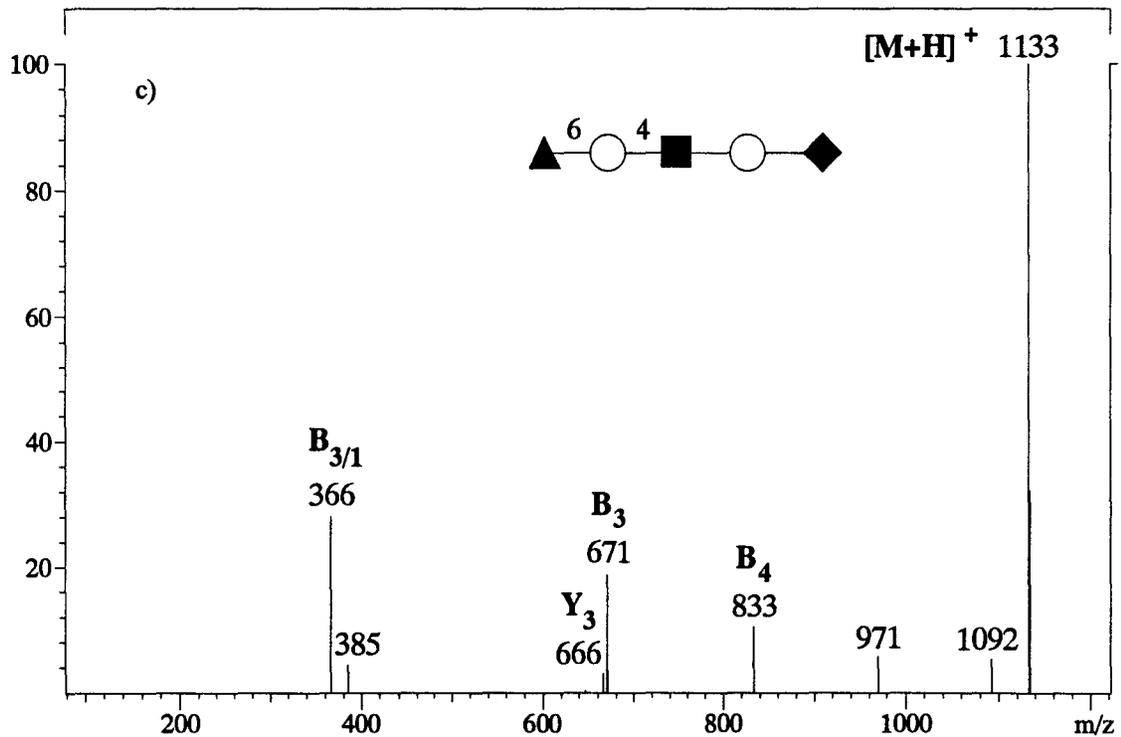
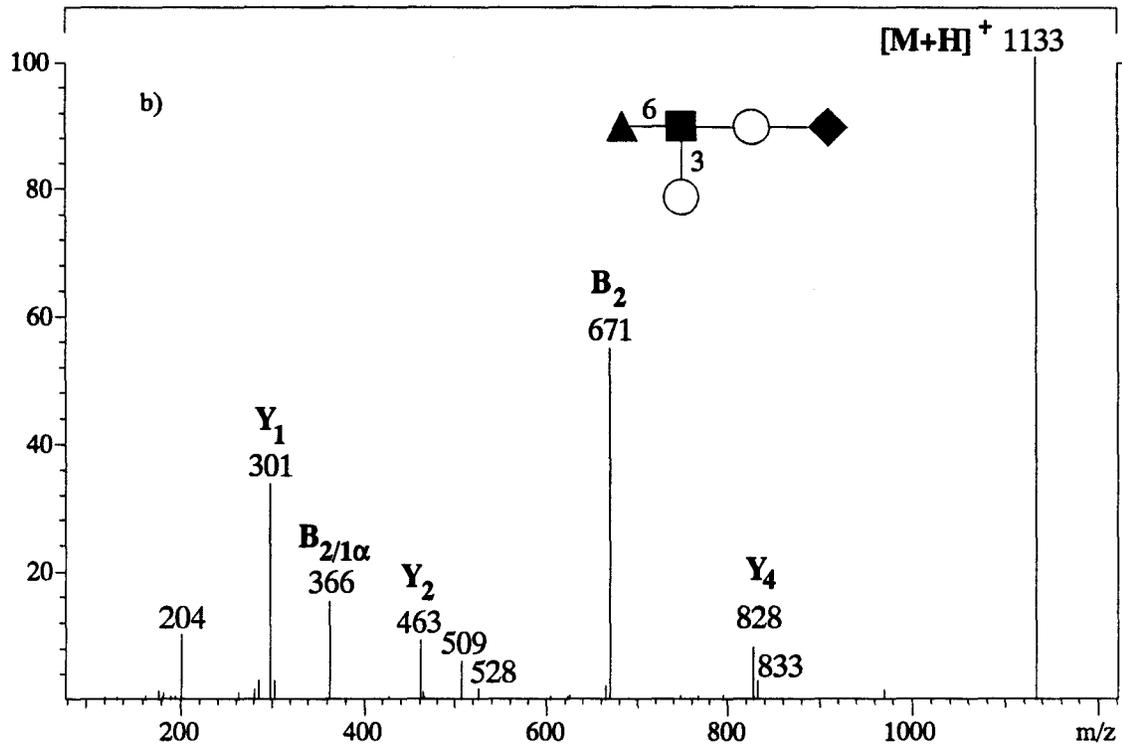


figure 36 (suite) – Spectres ESMS/MS des dérivés sialylés : LST-b-2AB (b)
 LST-c-2AB (c) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1133
 (énergie de collision 15 eV)

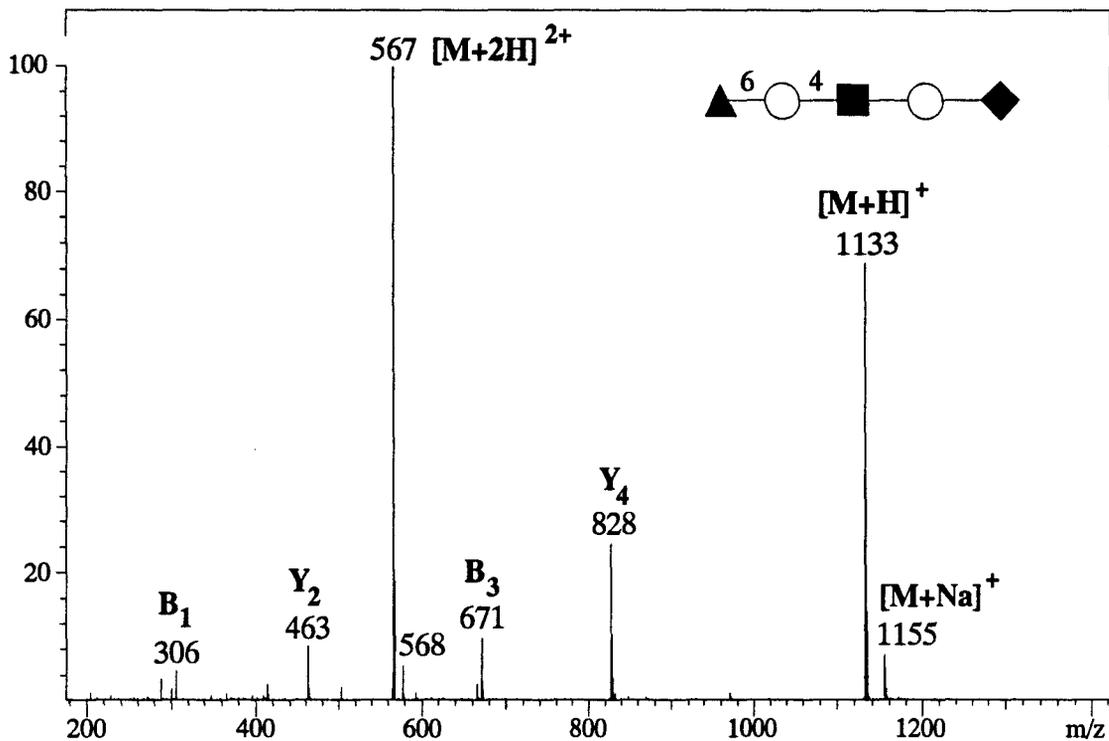


figure 37 – Spectre ESMS du dérivé LST-c-2AB

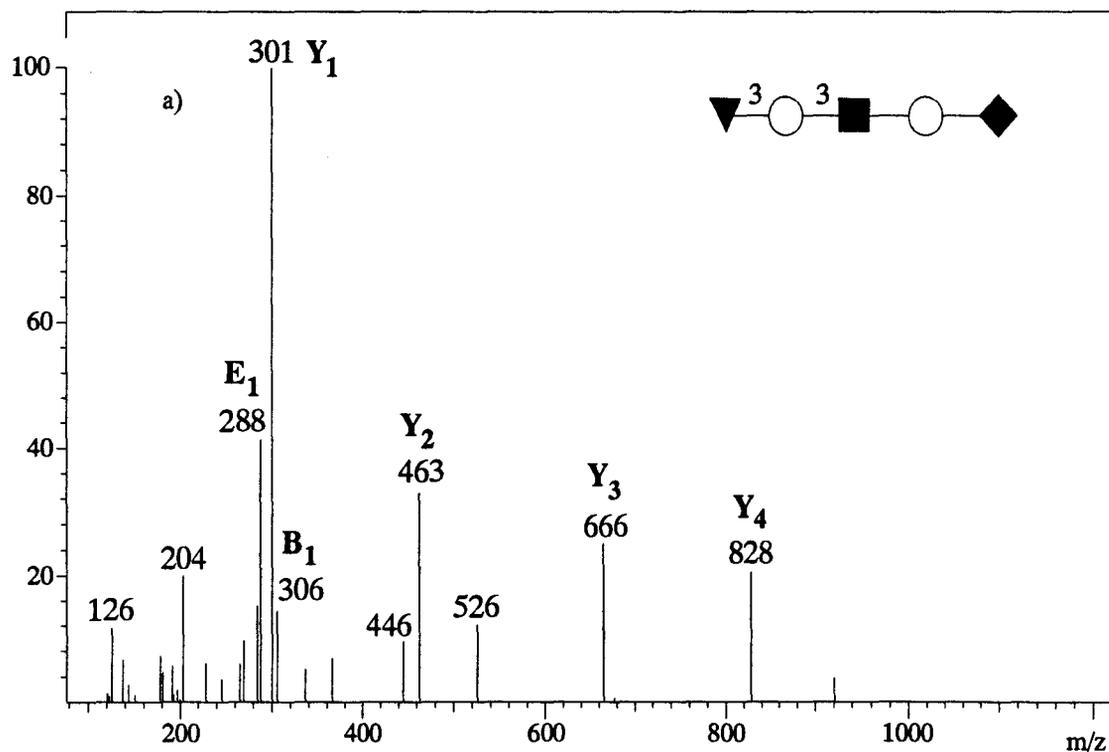


figure 38 – Spectres ESMS/MS des dérivés sialylés : LST-a-2AB (a)
 Ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 567 (énergie de collision 15 eV)

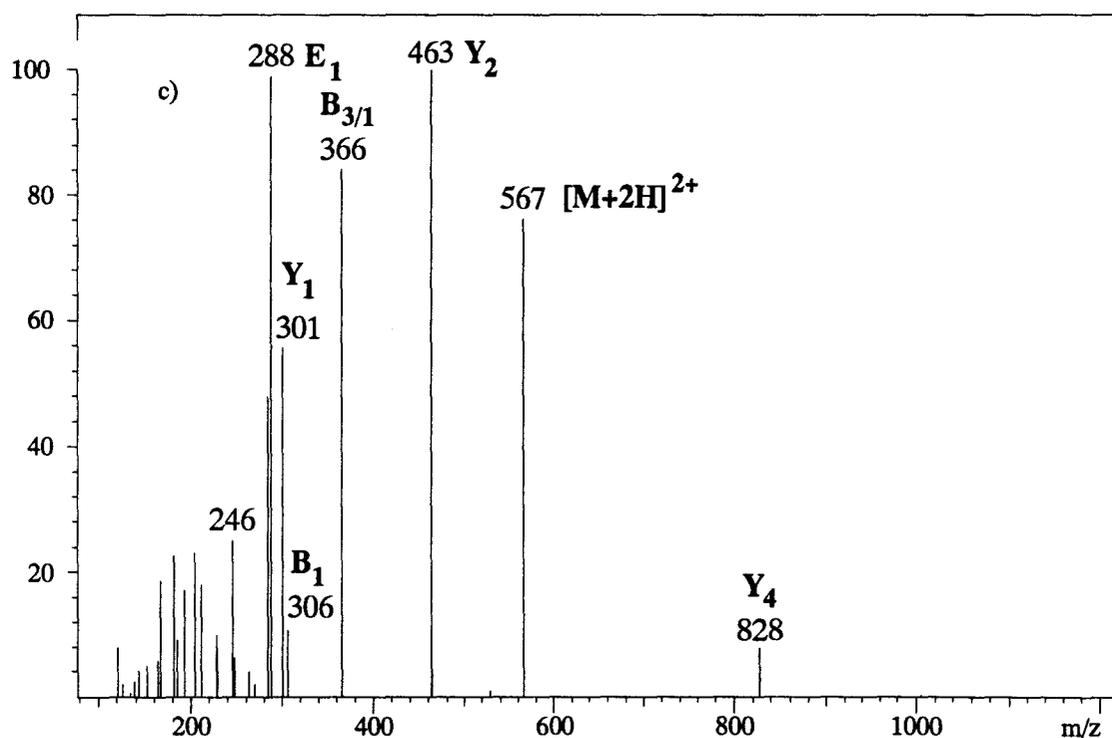
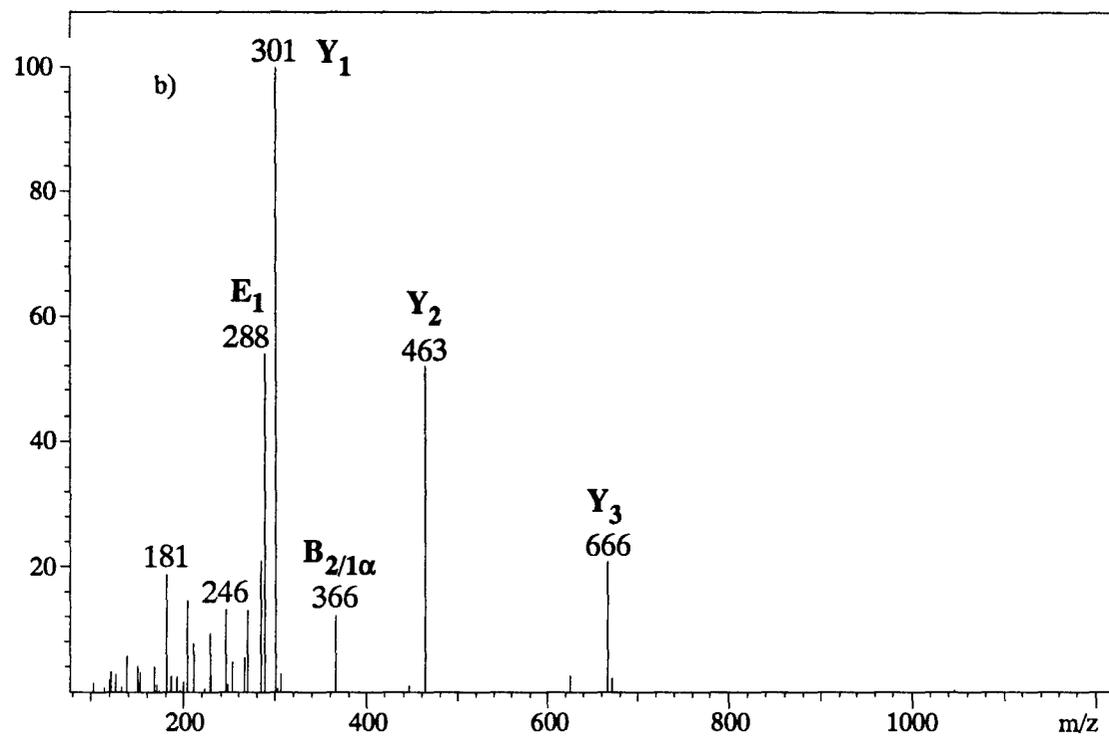


figure 38 (suite) – Spectres ESMS/MS des dérivés sialylés : LST-b-2AB (b)
LST-c-2AB (c) Ion précurseur [M+2H]²⁺ à m/z 567
(énergie de collision 15 eV)

s'expliquer par l'existence de deux charges au sein de ces ions. En effet, dans le cas d'un ion monochargé, la fragmentation, induite par la charge, encore dénommée charge driven process, implique que la protonation s'effectue sur l'une des liaisons glycosidiques, donnant naissance aux ions B, par rétention de cette charge sur l'extrémité terminale non réductrice. Les ions Y peuvent être générés, dans un second temps, après transfert d'un proton sur le fragment contenant l'extrémité terminale réductrice. Cette formation est schématisée dans la figure 30 page 77. Les ions Y étant obtenus à partir des ions B, ils s'avèrent moins intenses que ces derniers. Dans le cas d'ions doublement chargés, une des charges est résidente sur la fonction amine apportée par le dérivé aromatique (fig. 39) tandis que la seconde va, à son tour, résulter de la protonation de l'une ou l'autre des liaisons glycosidiques. La genèse des ions Y est, dans ce cas, indépendante du processus de fragmentation conduisant à la formation des ions B. Ceci est suggéré par le fait qu'expérimentalement, nous n'observons que peu d'ions B dans les spectres des ions à m/z 567, alors que les ions Y y sont largement présents.

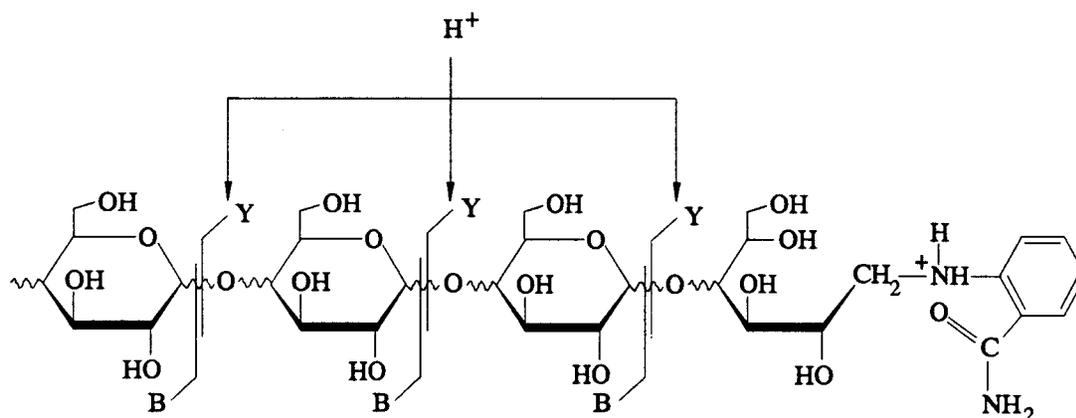


figure 39 – Fragmentation des oligosaccharides doublement chargés

Parmi les ions B observés, outre la présence des ions dus à la rupture des liaisons glycosidiques de résidus de N-acétylglucosamine, on met en évidence un ion intense à m/z 288, dénommé E_1 , issu de la fragmentation de l'ion B_1 . Cet ion E_1 est un diène conjugué généré par l'élimination préférentielle du substituant en position 3 de l'ion B_1 (fig. 40) qui est, par ailleurs, détecté avec une faible intensité à m/z 306. Ces ions s'avèrent être des fragments marqueurs de la sialylation, car ils témoignent de la présence d'un résidu d'acide N-acétyl

neuraminique méthylestérifié, aussi bien dans des structures oligosaccharidiques linéaires que ramifiées.

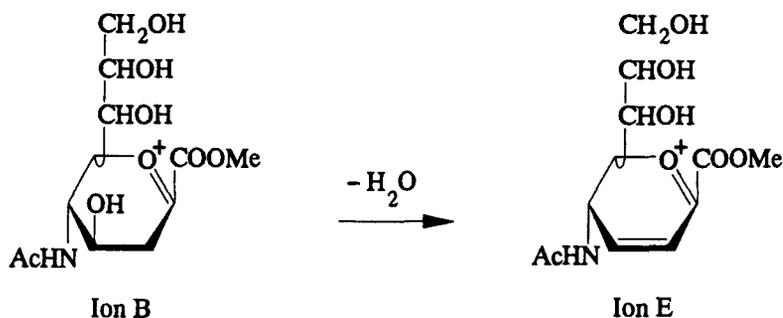


figure 40 – Fragmentation de l'ion B de l'acide N-acétylneuraminique

Les analyses réalisées sur les oligosaccharides dérivés par amination réductive illustrent l'adéquation de la méthode proposée pour la préparation et la purification d'oligosaccharides dérivés par la 2-aminobenzamide.

Les résultats obtenus lors de l'étude par ESMS/MS de ce type de composés montre l'existence de fragmentations primaires à partir des espèces moléculaires protonées, concordantes avec les séquences oligosaccharidiques. Cependant, et à l'exception du cas particulier des oligosaccharides sialylés marqués au 2-AB, certaines des fragmentations secondaires constatées ne sont pas en accord avec les structures étudiées, pouvant donner lieu à des ambiguïtés dans le cas de l'analyse de composés de structure inconnue. Une autre série d'analyses a été entreprise à partir des mêmes oligosaccharides sous forme peracétylée.

2.2. Oligosaccharides dérivés par peracétylation

2.2.1. ESMS/MS d'oligosaccharides peracétylés

Les oligosaccharides peracétylés sont préparés selon le protocole présenté page 212. Leur masse moléculaire est contrôlée par MALDMS (LNT, fig. 41a). Le spectre ESMS du dérivé peracétylé du LNT est reproduit dans la figure 41b. L'on y distingue deux ions intenses, respectivement à m/z 1254 et 1276, correspondant aux espèces moléculaires protonée ($[M+H]^+$) et cationisée ($[M+Na]^+$). Des fragments sont également présents. Il s'agit des ions B_2 (m/z 618), B_3 (m/z 906) et Y_3 (m/z 924). L'intensité de l'ion B_2 s'explique, comme précédemment dans le cas des oligosaccharides dérivés par amination réductive, par la rupture favorisée de la liaison glycosidique du résidu de N-acétylglucosamine. Ces ions sont

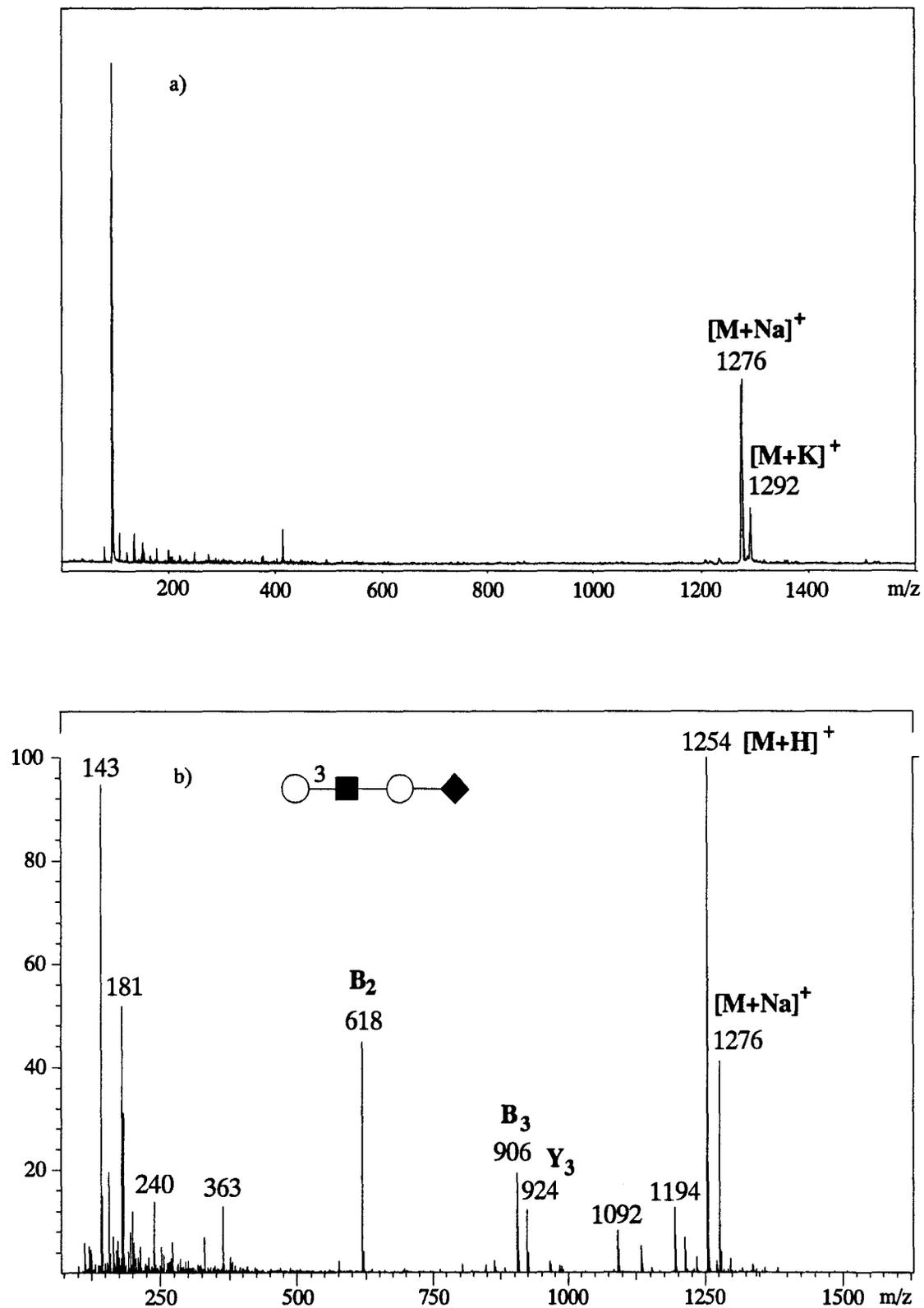


figure 41 – Spectres MALDMS (a) et ESMS (b) du dérivé LNT-Ac

également détectés lors de l'analyse ESMS/MS des dérivés peracétylés du LNT et du LNnT effectuée à partir des espèces moléculaires protonées à m/z 1254 (fig. 42). L'on y distingue les ions de la série B, B_1 , B_2 , B_3 , respectivement à m/z 331, 618 et 906, et les ions de la série Y, Y_1 , Y_2 et Y_3 , respectivement à m/z 349, 636 et 924. Des fragmentations secondaires sont également mises en évidence et consistent en l'élimination par certains fragments B d'une ou deux molécules d'acide acétique ($B_1 - 60$, $B_1 - 120$, $B_2 - 60$, $B_2 - 120$) ou la perte de 102 uma, qui peut correspondre à une molécule d'anhydride acétique ($- 102$ uma) ou à une perte successive d'acide acétique ($- 60$ uma) et d'une molécule de cétène ($- 42$ uma). La comparaison des deux spectres ne permet pas de distinguer nettement les substitutions en 3 et en 4 du résidu de N-acétylglucosamine. Ce monosaccharide, dans le cas du LNnT, est substitué par le résidu de galactose en position 4. L'élimination préférentielle du substituant en position 3 de la N-acétylglucosamine consiste donc, dans le cas présent, en une élimination d'acide acétique. Cependant, si l'on observe un ion d'intensité moyenne à m/z 558 ($B_2 - \text{AcOH}$) dans le spectre du LNnT-Ac, le même fragment, bien que d'intensité plus faible, est présent dans le spectre du LNT peracétylé. Il apparaît ainsi difficile de discriminer, de façon générale, le type de substitution, 3 ou 4, d'un résidu de N-acétylhexosamine, par spectrométrie de masse en tandem des espèces moléculaires de dérivés peracétylés. Ceci contraste avec des résultats antérieurs obtenus par FABMS/MS (Domon *et al.*, 1990). Une autre explication possible concerne la qualité de l'échantillon utilisé pour cette étude, et nous reconsidérerons cette éventualité plus loin dans cette discussion (pages 95 - 97).

L'analyse par ESMS/MS est appliquée au cas des oligosaccharides peracétylés de la série LNF (fig. 43). A partir des espèces moléculaires protonées à m/z 1484, les ions détectés sont principalement de type B, à l'exception toutefois de l'ion $Y_{1\beta}$ du spectre du dérivé du LNF-5 (fig. 43b). Hormis l'espèce moléculaire protonée, tous les spectres présentent, comme autre ion dominant, l'ion B généré par rupture de la liaison glycosidique du résidu de N-acétylglucosamine. L'on observe ainsi, dans le spectre du dérivé du LNF-1, l'ion B_3 à m/z 848, en plus des ions B_1 (m/z 273), B_2 (m/z 561) et B_4 (m/z 1136) de plus faible intensité. Les oligosaccharides peracétylés isomères de liaison, LNF-2 et LNF-3, possèdent une fragmentation similaire avec l'ion B_2 à m/z 848, les ions $B_{1\alpha}$ et $B_{1\beta}$, respectivement à m/z 331

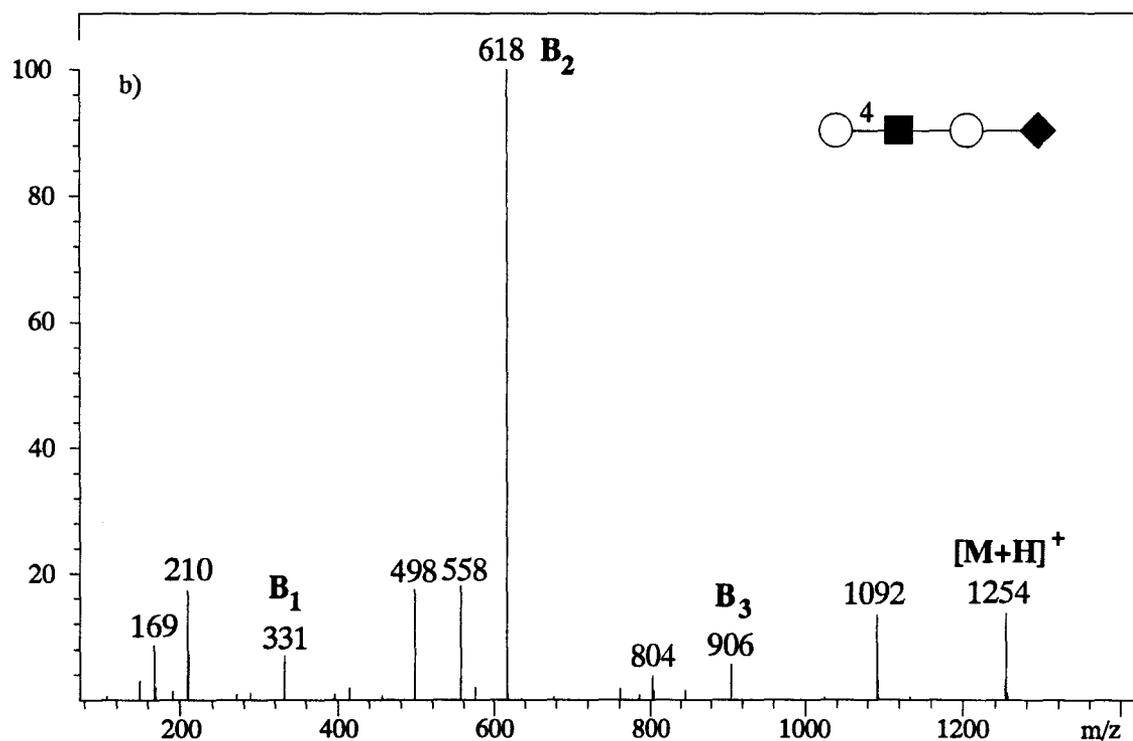
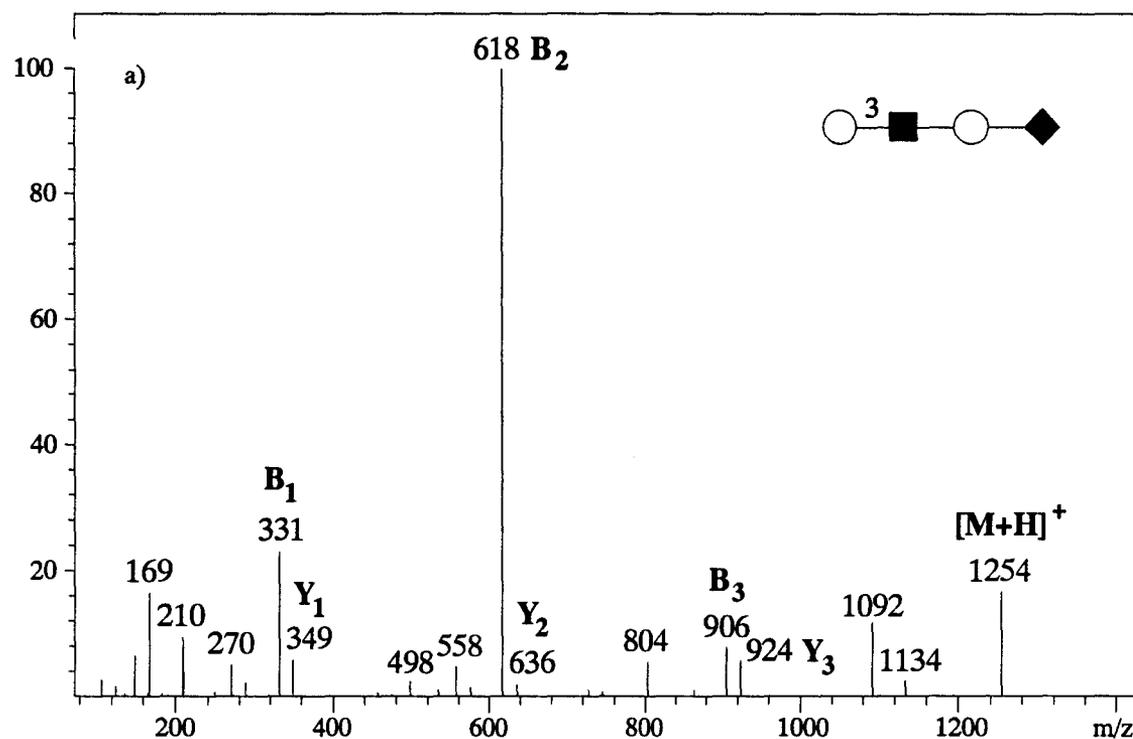


figure 42 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides peracétylés : LNT-Ac (a) et LNnT-Ac (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1254 (énergie de collision 15 eV)

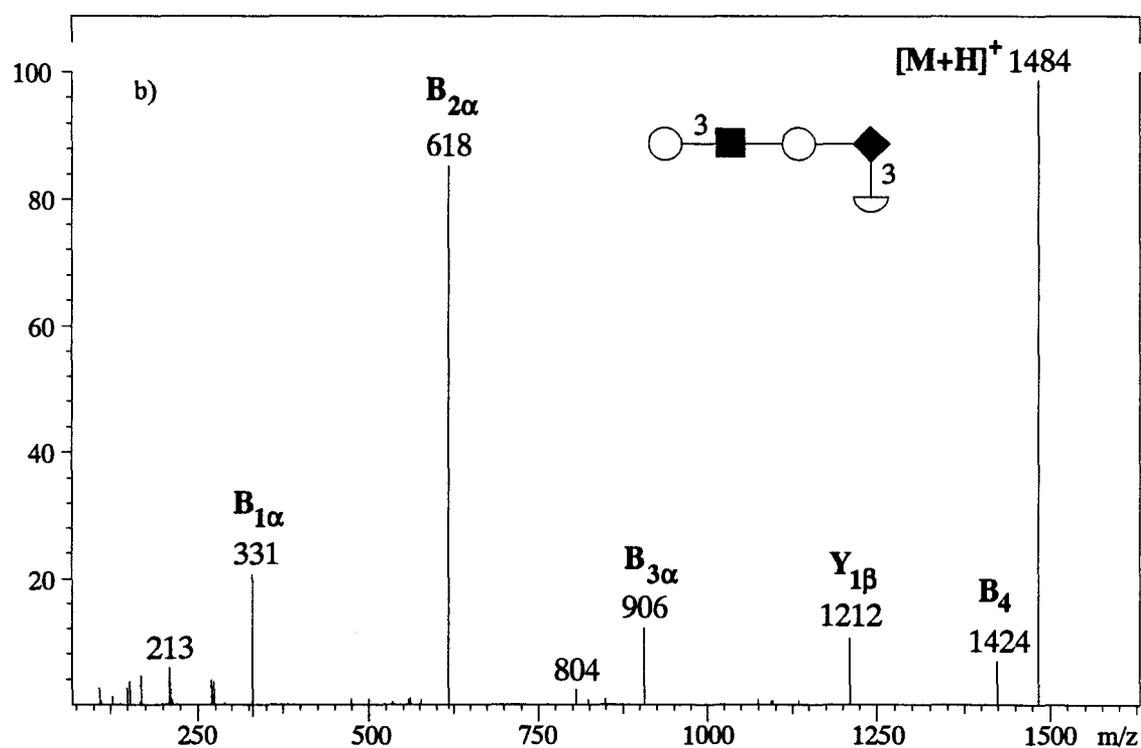
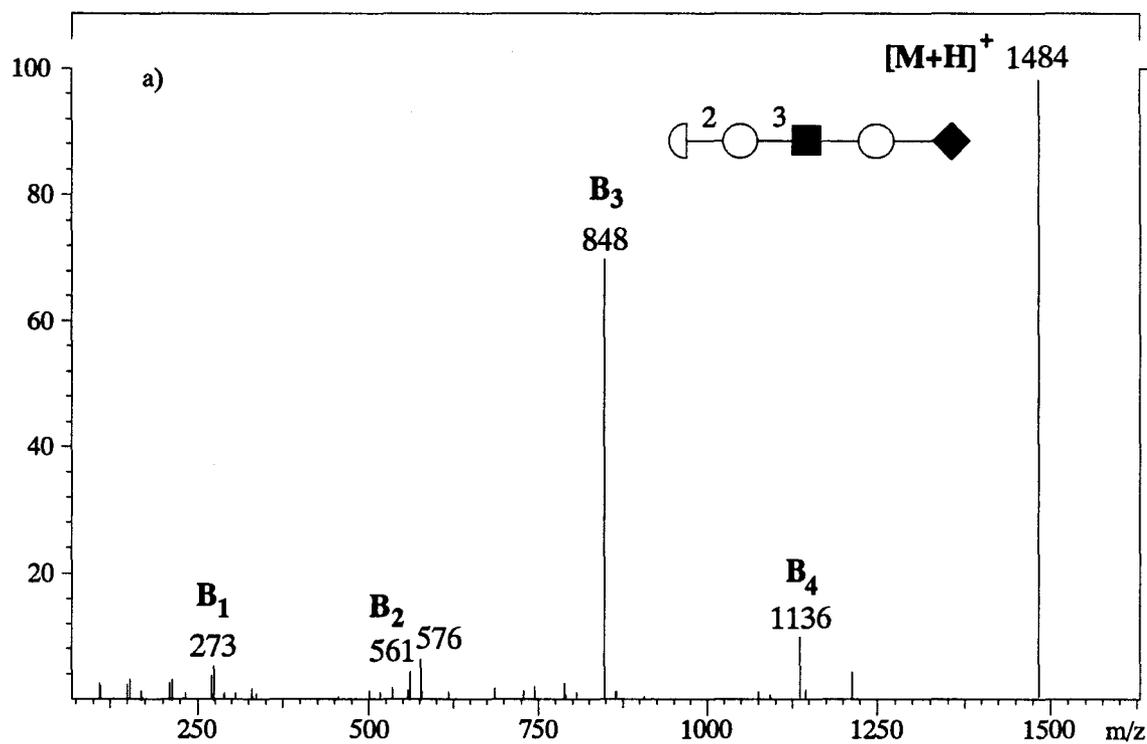


figure 43 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides peracétylés de la série LNF monofucosylés : LNF1-Ac (a) LNF5-Ac (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1484 (énergie de collision 10 eV)

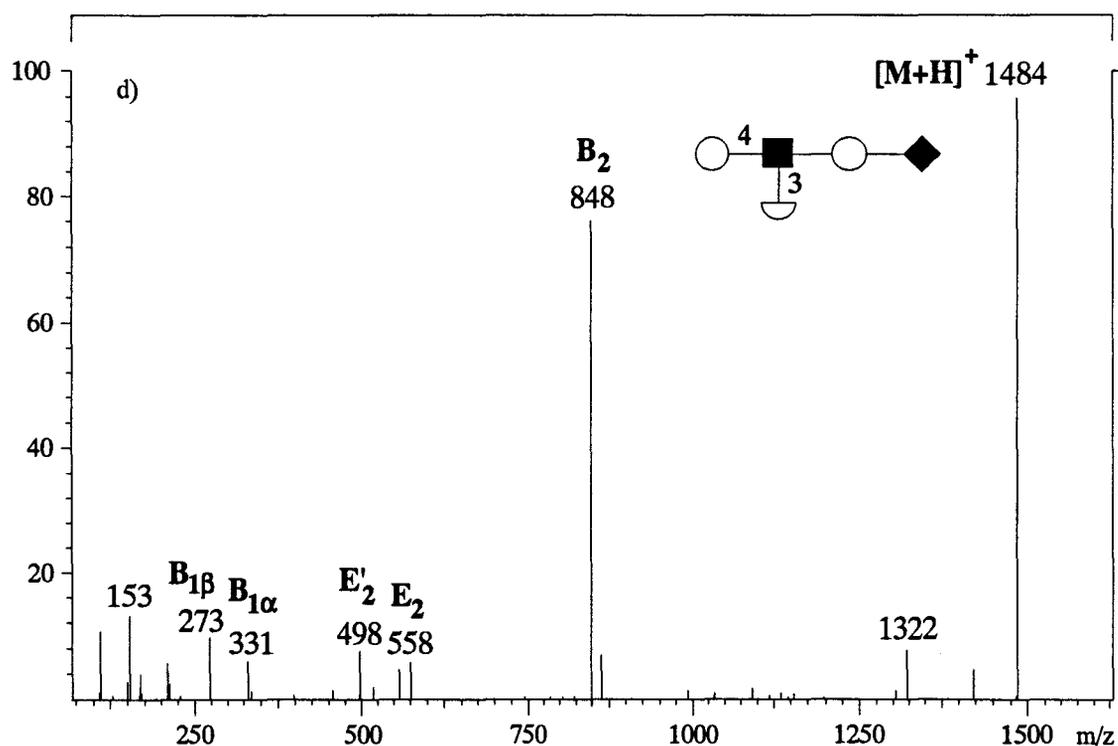
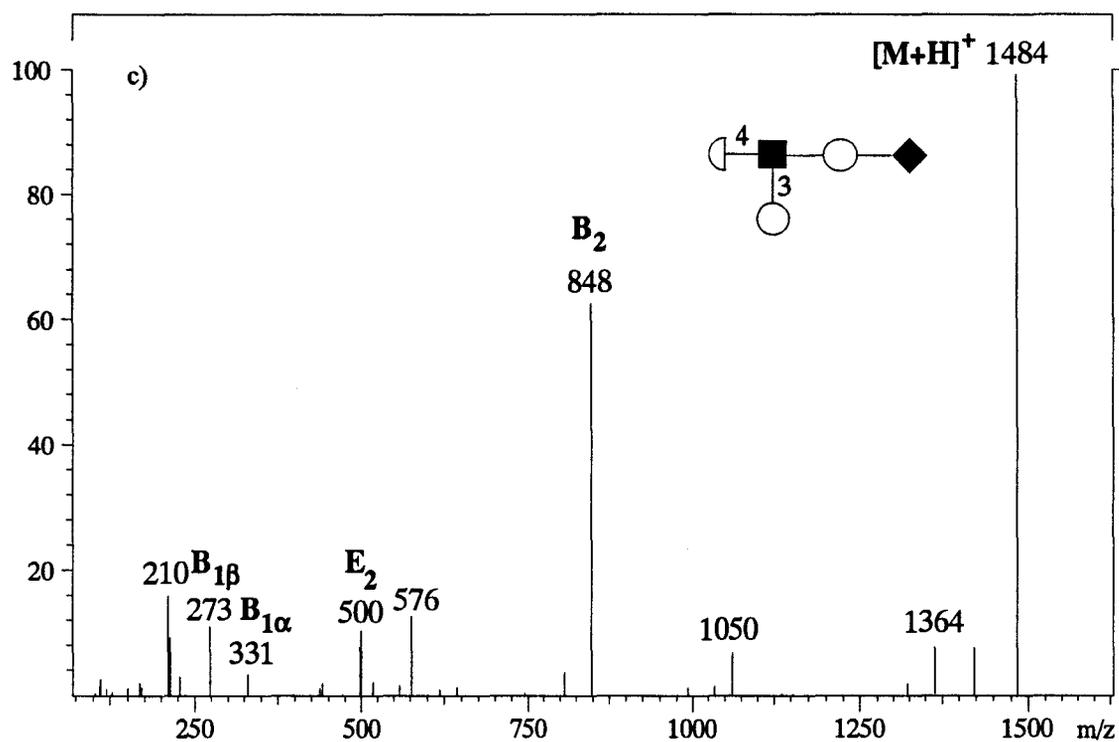


figure 43 (suite) – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides peracétylés de la série LNF monofucosylés : LNF2-Ac (a) LNF3-Ac (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1484 (énergie de collision 10 eV)

et 273. La nature des oses substituant le résidu de N-acétylglucosamine, en position 3 et 4, dans ces deux structures, est élucidée par l'étude des fragments secondaires des ions B_2 . Dans le cas de l'oligosaccharide LNF-2-Ac, l'élimination préférentielle du substituant en position 3 de la N-acétylglucosamine génère un ion E_2 à m/z 500, la différence entre les masses de ces ions permet la caractérisation d'un hexose en position 3 du résidu GlcNAc, en l'occurrence un résidu de galactose. Dans le cas du LNF-3-Ac, ce même processus de fragmentation donne lieu à un ion E_2 à m/z 558, correspondant, dans ce cas, à un désoxyhexose, identifié comme étant un résidu de fucose, d'après la structure de l'oligosaccharide. Cet ion E_2 subit l'élimination de son substituant en position 4, sous forme d'une molécule d'acide acétique pour produire un ion E'_2 dont la structure est présentée dans la figure 44. En dernier lieu, l'oligosaccharide peracétylé LNF-5-Ac donne naissance aux fragments B_4 , $B_{3\alpha}$, $B_{2\alpha}$, $B_{1\alpha}$ et $B_{1\beta}$, respectivement à m/z 1424, 906, 618, 331 et 273. L'ion $B_{3\alpha}$ génère, par perte de 102 uma, l'ion à m/z 804. Il est possible par la présence des ions $B_{1\alpha}$ et $B_{1\beta}$, de mettre en évidence immédiatement l'existence d'une ramification dans les structures étudiées, la masse de l'ion B_2 permettant d'assigner ces substitutions.

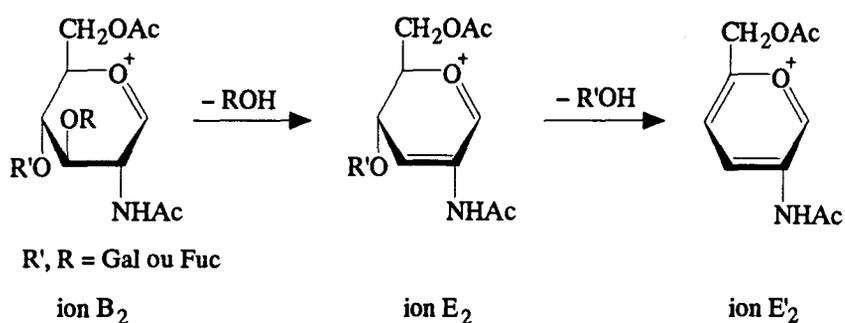


figure 44 – Fragmentation de l'ion B_2 du LNF-2-Ac et du LNF-3-Ac

Il est donc possible par analyse par ESMS/MS d'oligosaccharides peracétylés d'élucider des structures branchées. Cependant, nous avons pu constater qu'une ambiguïté dans la substitution d'un résidu de N-acétylglucosamine, dans le cas d'une structure linéaire, ne peut être levée sans équivoque. Pour résoudre cette ambiguïté, nous avons donc eu recours à une analyse des mêmes échantillons par sélection de fragments générés en source.

2.2.2. Caractérisation des sous-structures des fragments B peracétylés par MS/MS

La spectrométrie de masse en tandem permet de déduire des informations structurales à partir des spectres de collision des espèces moléculaires, mais également d'établir la structure de fragments issus de celles-ci. Cette approche est particulièrement intéressante, car elle permet de lever des ambiguïtés ponctuelles sur des structures partielles, par comparaison des spectres de collision des fragments indéterminés avec ceux obtenus pour des éléments structuraux de référence.

L'électrospray se prête aisément à de telles analyses car, dans ce mode d'ionisation, il est possible de générer une fragmentation en source de l'espèce moléculaire en augmentant le potentiel d'extraction, appelé "cone voltage". Les ions ainsi accélérés, étant donnée la pression relativement élevée régnant dans la source, vont subir des collisions et générer des fragments qu'il est ensuite possible d'analyser en MS/MS. Ce principe, apparenté à la MS³, a été appliqué aux oligosaccharides peracétylés précédemment étudiés.

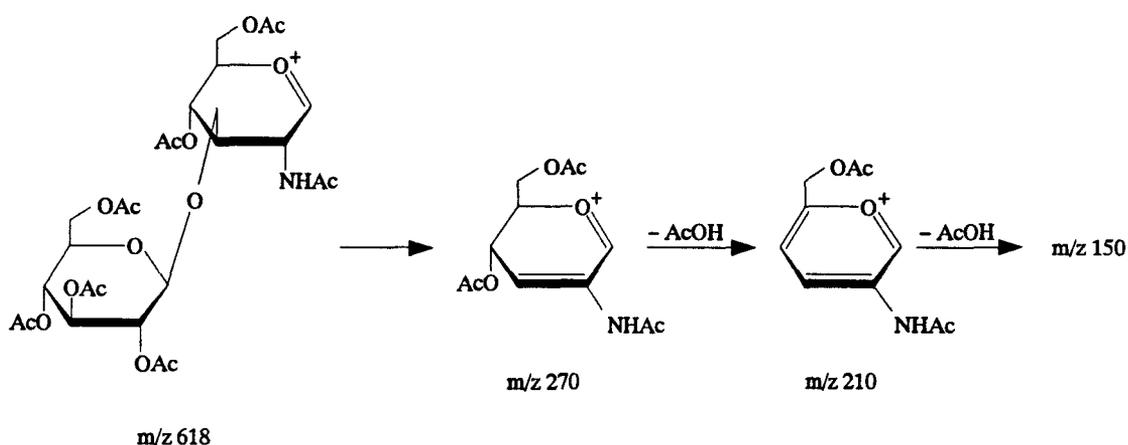
Etude des fragments B à m/z 618

Les ions intenses B₂ à m/z 618 sont des fragments facilement générés en source, dans le cas des composés LNT, LNnT et LNF-5 peracétylés. Les spectres MS/MS de ces ions sont présentés dans la figure 45. En raison des incertitudes planant quant à la pureté des échantillons utilisés pour l'analyse des espèces moléculaires, nous avons préparé, pour cette étude, des dérivés peracétylés à partir de substrats d'autre provenance. Les dérivés des oligosaccharides LNT et LNnT se différencient par l'intensité des ions à m/z 558 et 498, de faible intensité dans le premier cas et beaucoup plus importants pour une glycosylation en 4. Nous avons précédemment discuté de la genèse de ces ions par perte d'une ou deux molécules d'acide acétique. La caractérisation de la structure du LNT est effectuée grâce aux ions caractéristiques à m/z 270 et 150, dont une hypothèse de mécanisme de formation est proposée dans la figure 46.

L'établissement d'une telle discrimination est en accord avec des résultats décrits antérieurement en FABMS/MS d'oligosaccharides peracétylés (Domon *et al.*, 1990). Une application de cette capacité à distinguer une glycosylation en 3 ou en 4 est offerte par le cas

du LNF-5 peracétylé (fig. 45c). Le spectre MS/MS de l'ion B_2 à m/z 618 présente une grande similitude avec celui obtenu dans le cas du LNT-Ac, notamment par la présence des ions à m/z 270 et m/z 150. Ceci nous permet de conclure que la substitution glycosidique du résidu de N-acétylglucosamine de l'oligosaccharide LNF-5 est de type 3. Cet exemple illustre ainsi le potentiel de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de structures glycosidiques partielles, sur la base d'une seule expérience ne nécessitant que quelques dizaines de picomoles d'échantillon.

Glycosylation en position 3



Glycosylation en position 4

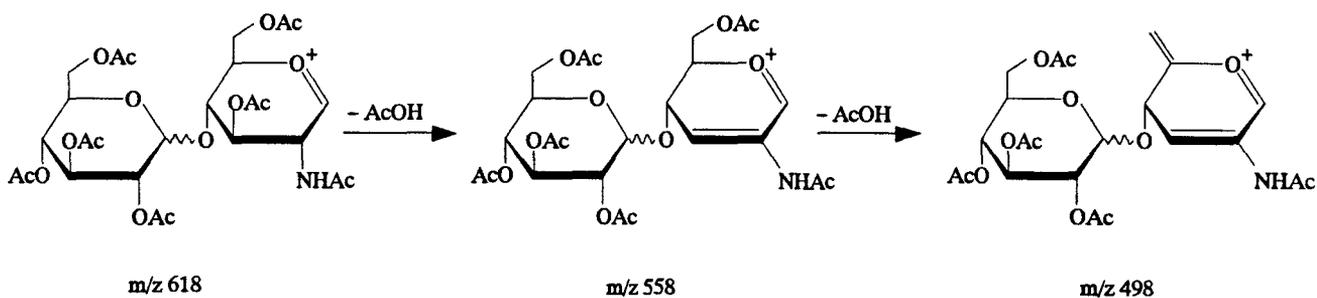


figure 46 – Fragmentation des ions B_2 permettant la discrimination entre la glycosylation en position 3 et en position 4

Etude des fragments B à m/z 848

Une étude similaire a été réalisée sur les ions oxoniums à m/z 848, obtenus par clivage de la liaison glycosidique du résidu GlcNAc des trois pentasaccharides, LNF-1, LNF-2 et

LNF-3 peracétylés. Les spectres de collision (fig. 47) présentent de grandes différences. Le spectre de l'ion dérivé du composé LNF-1-Ac est caractérisé par des signaux intenses à m/z 273, 213 et 153, correspondant aux ions B_1 , E_1 ($B_1 - \text{AcOH}$) et E'_1 ($E_1 - \text{AcOH}$) du résidu fucosyle en position terminale non réductrice. L'existence de ces ions ainsi que la masse des ions B_2 (m/z 561) et B_3 (m/z 848), respectivement de nature di- et trisaccharidique, nous permettent de conclure à une structure linéaire du trisaccharide étudié. L'ion B_3 donne lieu, par ailleurs, à une perte de 578 uma par élimination du substituant en position 3 pour générer le fragment E_3 à m/z 270. Une telle différence de masse permet de positionner le disaccharide Fuc-Gal en position 3 du résidu de N-acétylglucosamine. L'ion E_3 subit deux éliminations successives d'acide acétique pour donner naissance aux ions E'_3 et E''_3 , respectivement à m/z 210 et 150 (fig. 46 page 97).

Les spectres des ions B_2 dérivant des deux isomères de liaison LNF-2 et LNF-3 peracétylés sont tous deux caractérisés par les deux fragments $B_{1\alpha}$ et $B_{1\beta}$, respectivement à m/z 331 et 273, marqueurs de deux résidus peracétylés en position terminale non réductrice, en l'occurrence, un désoxyhexose et un hexose, suggérant l'existence d'une ramification dans ces structures oligosaccharidiques. Celle-ci est confirmée par l'absence d'ion B de nature disaccharidique. Les masses des ions E_2 et E'_2 à m/z 500 et 440, dans le cas du LNF-2-Ac et, 558 et 498, pour le LNF-3-Ac, témoignent de la substitution en position 3 du résidu GlcNAc, respectivement par l'unité galactosyle et fucosyle.

L'ensemble de ces données met en évidence l'intérêt de l'analyse par MS/MS des espèces moléculaires et des fragments issus de ces dernières, pour l'élucidation structurale d'oligosaccharides peracétylés. Les informations déduites des spectres obtenus permettent une caractérisation comparable à celle réalisée par FABMS/MS à partir des espèces moléculaires. Cependant, la dérivation par acétylation augmentant considérablement la masse moléculaire des oligosaccharides, l'analyse par MS/MS devient difficile au-delà de la masse 2000, soit pour un oligomère de 6 à 7 résidus. La méthylation constitue, dès lors, une alternative séduisante. Nous avons donc entrepris l'analyse d'oligosaccharides perméthylés par spectrométrie de masse en tandem.

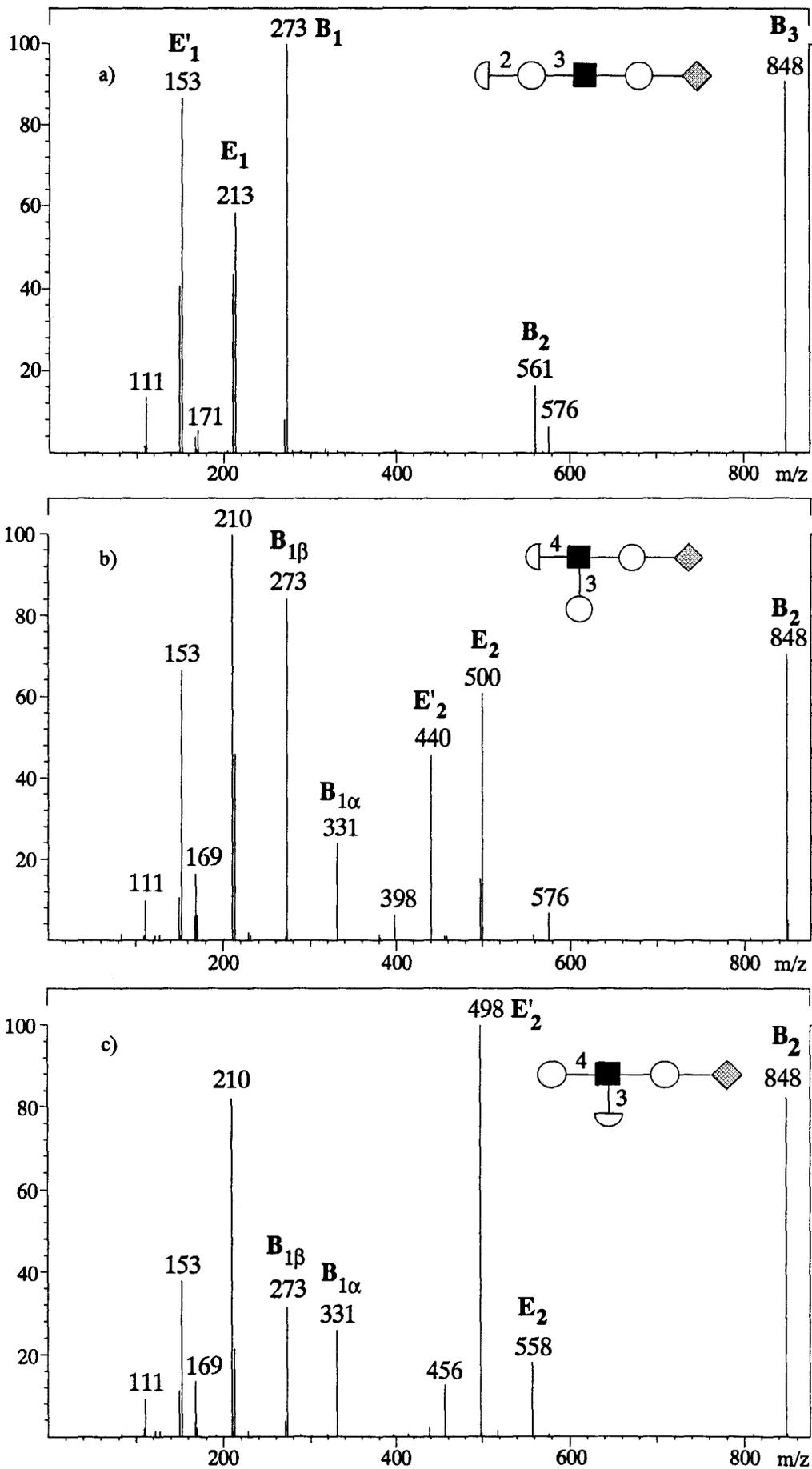
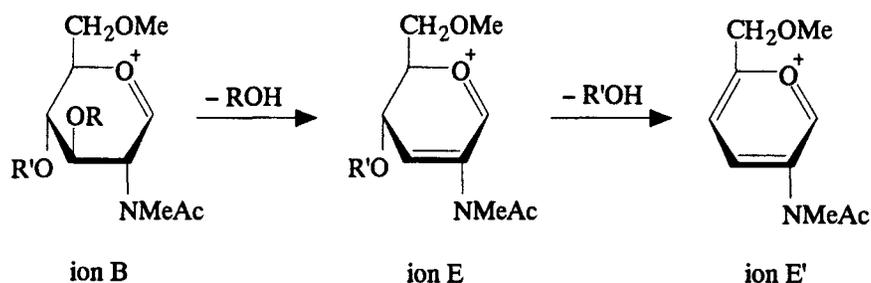


figure 47 – Spectres ESMS/MS du fragment à m/z 618 généré en source des oligosaccharides peracétylés : LNF1-Ac (a) LNF2-Ac (b) LNF3-Ac (c) (énergie de collision 15 eV)

2.3. Oligosaccharides dérivés par perméthylation

2.3.1. ESMS/MS d'oligosaccharides perméthylés

Les oligosaccharides étudiés dans ce chapitre sont perméthylés selon les protocoles pages 210 et 211 et analysés par ESMS/MS, après que leur masse moléculaire ait été vérifiée par MALDMS. Les analyses effectuées à des énergies de collision faibles, de l'ordre de 10 à 15 eV, mettent en évidence des fragmentations importantes. Les tétrasaccharides LNT et LNnT perméthylés, dont l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ est observée à m/z 904, donnent les spectres MS/MS de la figure 48. Contrairement à ce que nous avons précédemment décrit pour les oligosaccharides peracétylés (fig. 42 page 91), les empreintes des dérivés perméthylés sont nettement distinctes. Outre les ions de la série B, tels que B_2 (m/z 464), B_3 (m/z 668) et B_4 (m/z 872), l'on observe l'ion E_2 . Nous avons déjà relaté la présence d'un ion de ce type comme marqueur de sialylation d'oligosaccharides dérivés par amination réductive et comme fragment permettant le positionnement relatif des monosaccharides substituant un résidu de N-acétylhexosamine dans le cas des oligosaccharides peracétylés. La genèse de cet ion, pour les oligosaccharides perméthylés, emprunte une voie similaire et nous nous contenterons d'en rappeler le mécanisme dans la figure 49.



R, R' = Glycosyl perméthylé ou Me

figure 49 – Genèse des fragments E et E' d'oligosaccharides perméthylés

A la différence des dérivés peracétylés, où la substitution du résidu de N-acétylglucosamine des LNT et LNnT était caractérisée par MS/MS d'un fragment de source à m/z 618, l'existence de l'ion E_2 , intense dans le spectre de collision de l'espèce moléculaire protonée des oligosaccharides perméthylés, permet une caractérisation plus immédiate. L'intensité des ions E_2 est à nouveau justifiée, d'une part, par l'abondance relative de leurs ions

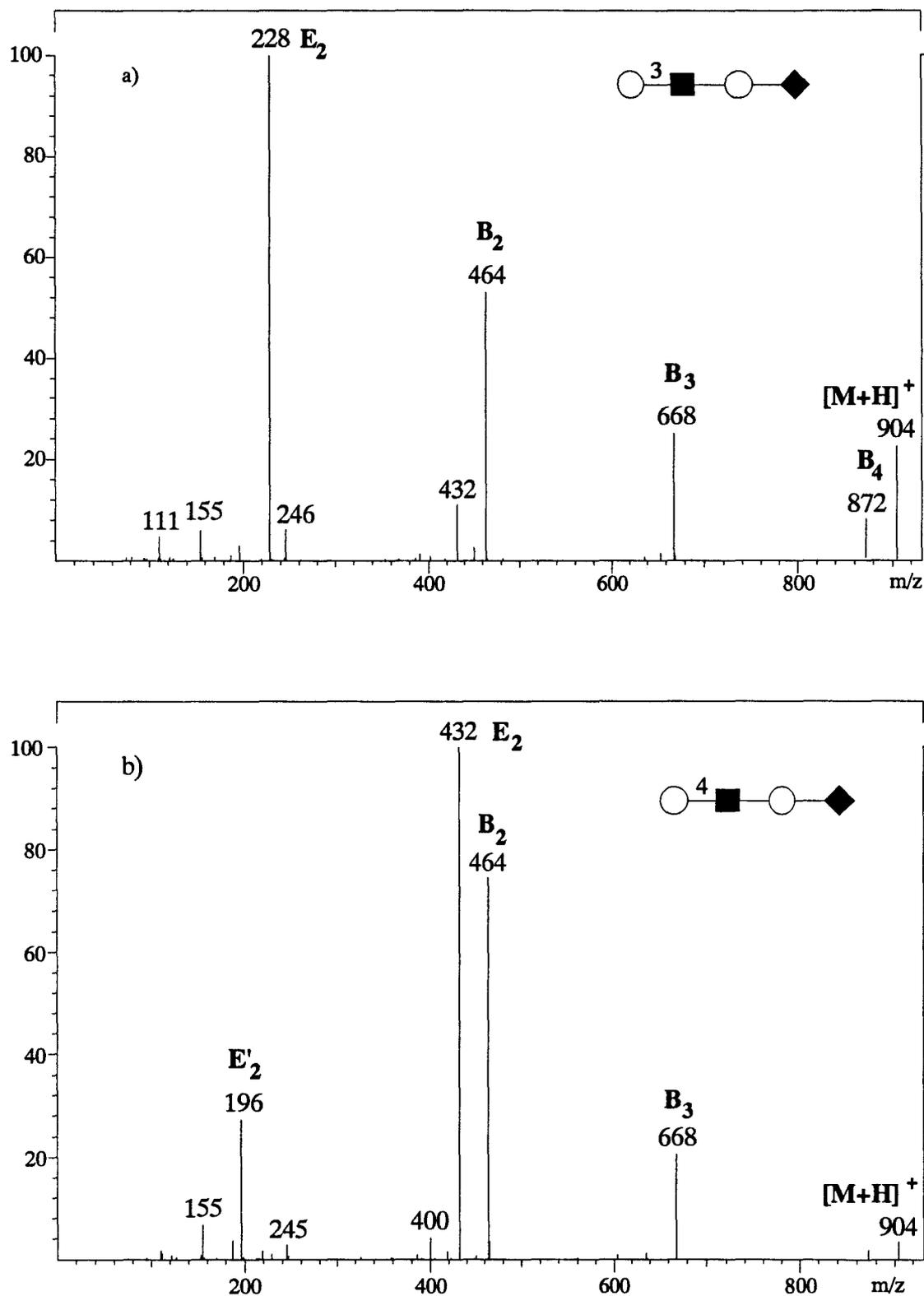


figure 48 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides perméthylés : LNT-Me (a)
LNnT-Me (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 904
(énergie de collision 15 eV)

précurseurs B_2 , eux-mêmes obtenus par clivage préférentiel de la liaison glycosidique des résidus de N-acétylglucosamine et, d'autre part, par l'élimination favorisée à partir de l'ion B_2 du substituant en position 3. Dans les exemples décrits, la masse de l'ion E_2 est respectivement de 228 dans le cas du LNT-Me et de 432 dans le cas du LNnT-Me. Par différence à partir de la masse de l'ion B_2 , ces valeurs permettent de conclure que, dans le cas du LNT, le substituant en 3 est un résidu hexosyle alors que, dans le cas du LNnT, il s'agit d'un groupement méthyle. Pour ce dernier oligosaccharide, la caractérisation peut être plus complète par l'existence de l'ion E'_2 , de masse 196 et qui rend compte du type de substituant en position 4 de l'ion B_2 (fig. 49), en l'occurrence un hexose.

Oligosaccharides de la série LNF monofucosylés

Les spectres ESMS/MS des oligosaccharides fucosylés de la série LNF perméthylés de façon similaire, sont reproduits dans la figure 50. A partir de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 1078 du dérivé LNF-1-Me, l'on distingue la série des ions B, B_1 (m/z 189), B_2 (m/z 393), B_3 (m/z 638) et B_4 (m/z 842), des ions Y, avec Y_3 (m/z 686) et Y_4 (m/z 890), ainsi qu'un certain nombre de fragmentations secondaires, E'_2 (m/z 361) assez peu intense, et E_3 (m/z 228) caractéristique de la substitution en 3 du résidu GlcNAc, comme nous avons pu le discuter dans le cas du LNT-Me. Afin d'établir, de façon univoque, l'origine des fragments secondaires à m/z 246, 450 et 654, l'oligosaccharide natif subit l'échange de l'hydroxyle hémiacétalique en présence d'eau renfermant de l'oxygène 18 (page 209). Ce produit est perméthylé et analysé comme précédemment (fig. 51a) par ESMS/MS. L'espèce moléculaire protonée est détectée à m/z 1080, rendant compte de l'échange d'oxygène effectué. Un shift de 2 uma est également constaté pour les ions Y_3 et Y_4 respectivement à m/z 688 et 892, et, a contrario, la masse des ions B demeure inchangée. Ces résultats apportent une confirmation de l'identification des ions B et Y. En ce qui concerne les ions 246, 450 et 654, aucun shift n'est enregistré. Ceci lève l'ambiguïté pouvant exister quant au processus de fragmentation leur donnant naissance. Ainsi, dans le cas de l'ion 654, la voie privilégiée est celle d'un ion de type B issu d'une fragmentation supplémentaire de l'ion Y_4 défucosylé (m/z 890) par rapport à l'hypothèse infirmée d'une élimination de méthanol à partir de l'ion Y_3 (m/z 686). Une autre preuve concordante est

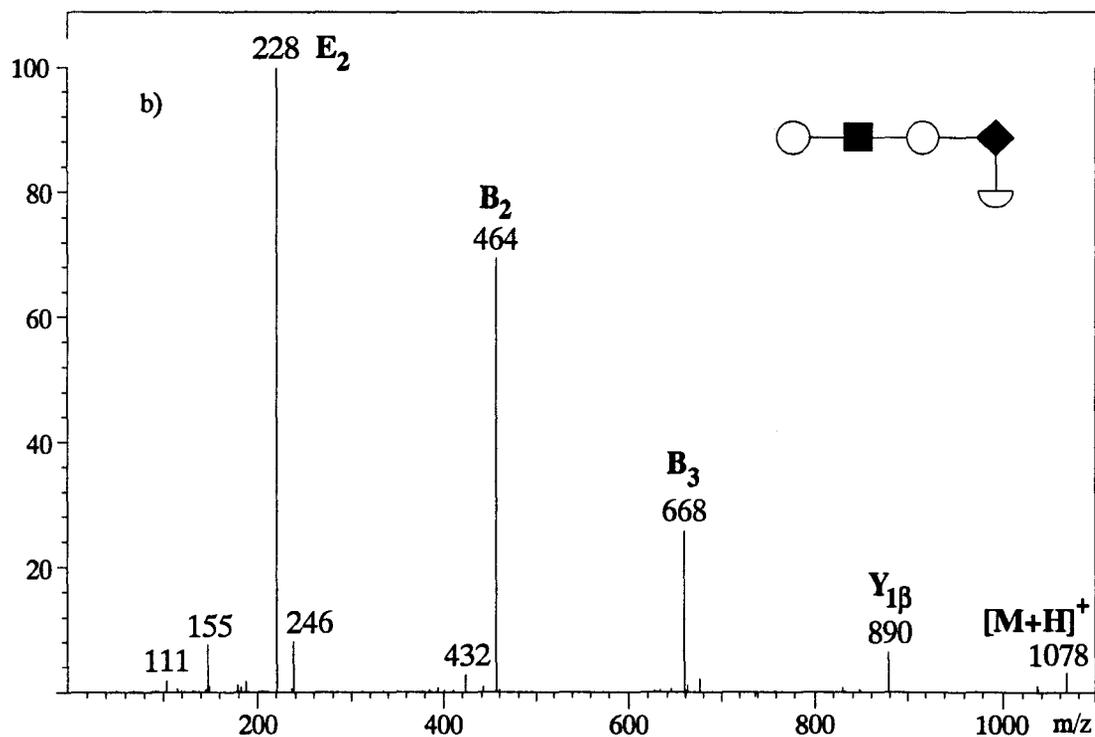
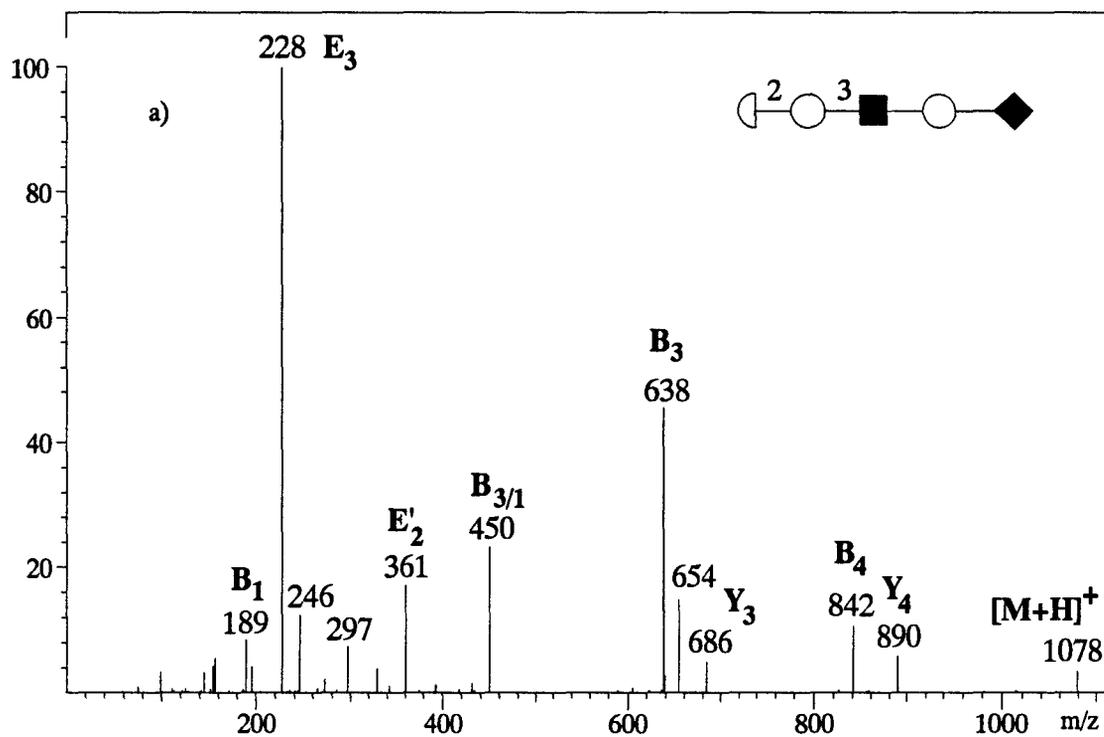


figure 50 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides perméthylés de la série LNF monofucosylés : LNF1-Me (a) LNF5-Me (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1078 (énergie de collision 15 eV)

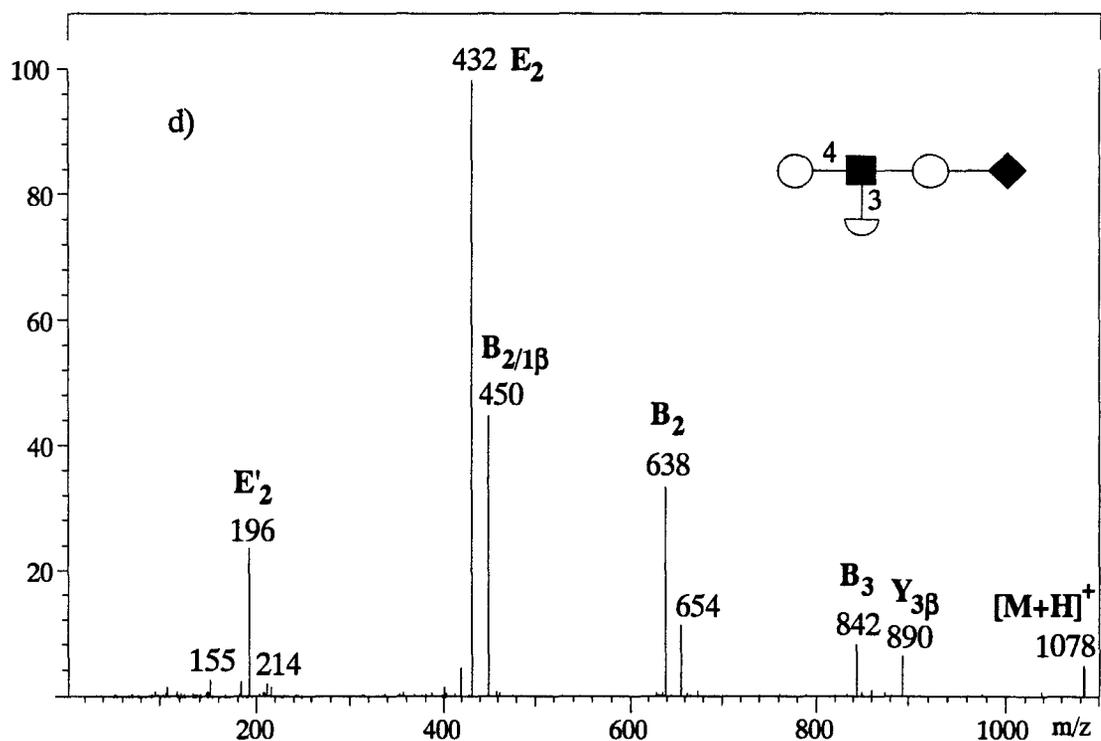
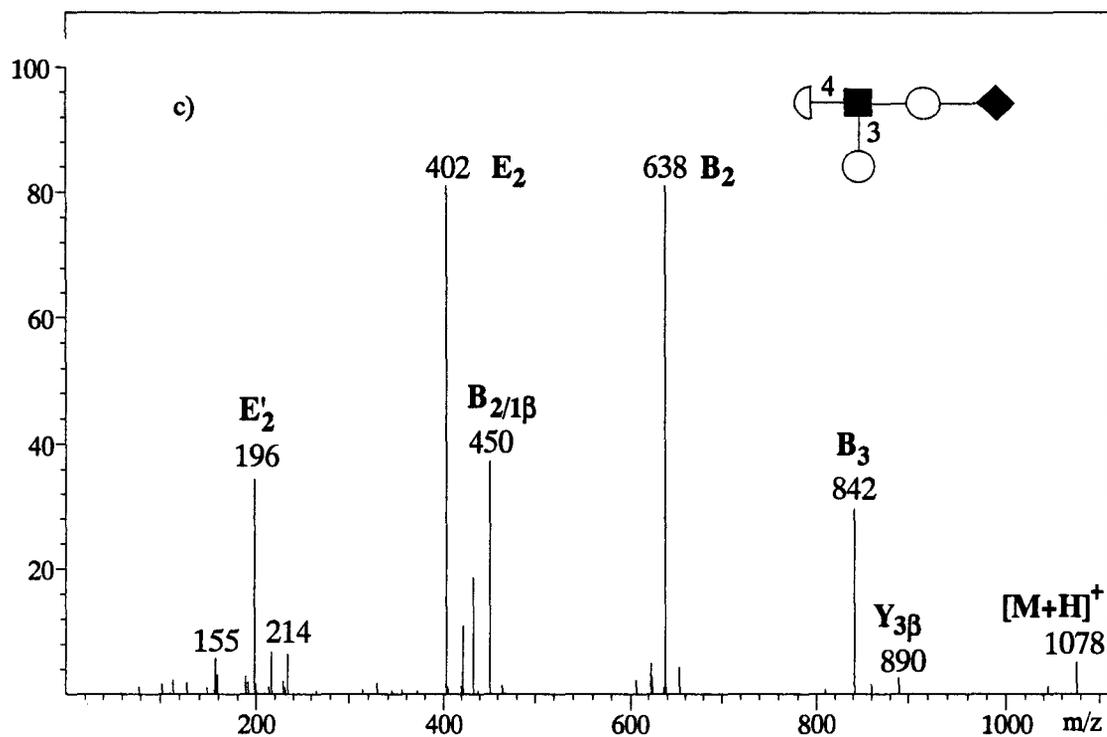


figure 50 (suite) – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides perméthylés de la série LNF monofucosylés : LNF2-Me (c) LNF3-Me (d) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1078 (énergie de collision 15 eV)

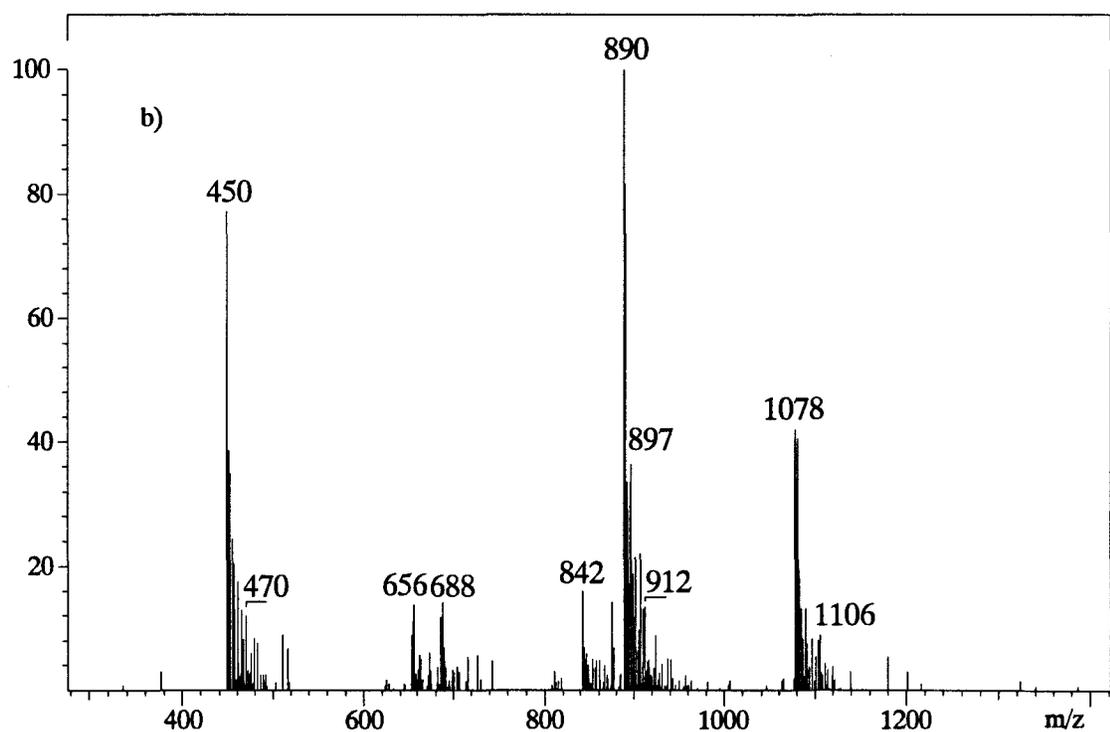
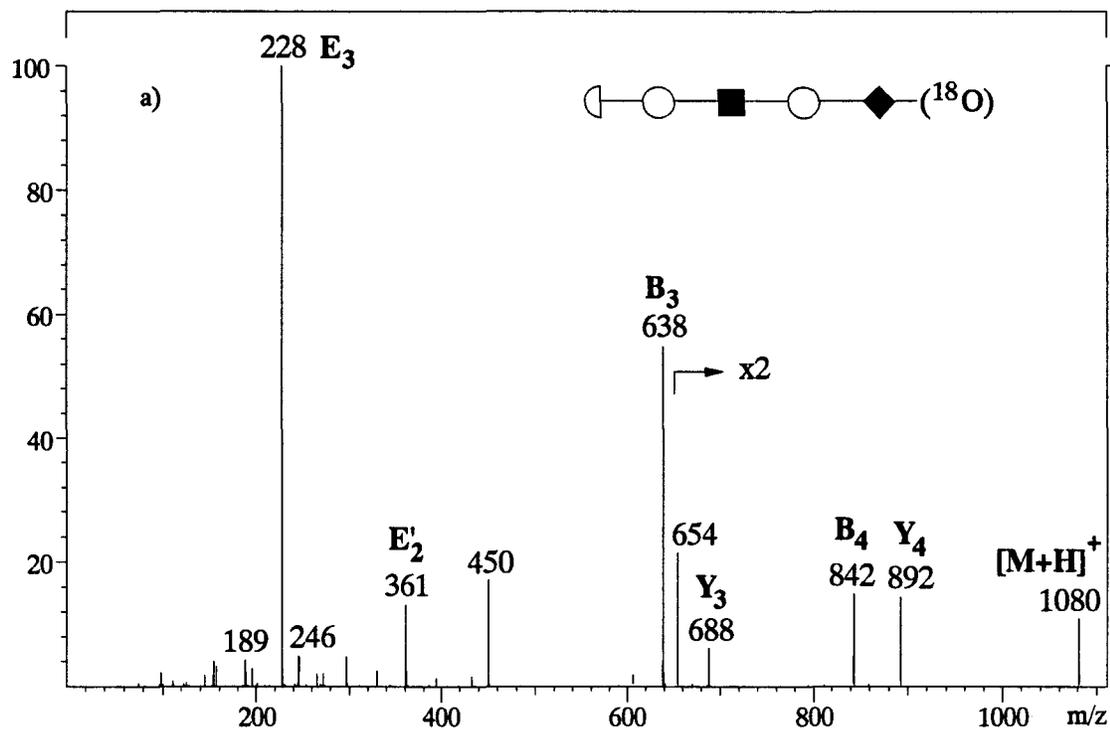


figure 51 – Spectre ESMS/MS de l'oligosaccharide perméthylé LNF1- ^{18}O (a) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1080 (énergie de collision 15 eV) et analyse des ions précurseurs du fragment à m/z 450 du LNF-1-Me (b)

apportée par une expérience de balayage des ions précurseurs (parent scan) pour l'ion à m/z 450, qui met clairement en évidence l'ion à m/z 890 comme précurseur de ce fragment (fig. 51b).

Les spectres des isomères ramifiés LNF-2-Me et LNF-3-Me sont caractérisés par les ions B_2 (m/z 638), B_3 (m/z 842) et E_2 . La masse des ions B_2 indique leur nature trisaccharidique et permet d'identifier des structures branchées. Ces ions subissent l'élimination du substituant en position 3, en l'occurrence un hexose tétraméthylé pour LNF-2-Me et un désoxyhexose triméthylé pour LNF-3-Me générant les fragments E_2 , respectivement à m/z 402 et 432. A partir de ces derniers, la perte du substituant en position 4 donne naissance au fragment E'_2 à m/z 196. En dernier lieu, la fragmentation secondaire de l'ion $Y_{3\beta}$, par la rupture de la liaison glycosidique du résidu GlcNAc, donne un signal $B_{2/1\beta}$ à m/z 450.

Le composé LNF-5-Me donne un spectre relativement simple où les fragments B_2 (m/z 464) et E_2 (m/z 228) témoignent de la présence d'un résidu de N-acétylglucosamine substitué en 3 par un hexose. La nature trisaccharidique de l'ion B_3 , à m/z 668, ainsi que la masse de l'ion $Y_{1\beta}$, généré par perte de fucose suggèrent que le désoxyhexose est lié sur le monosaccharide en position terminale réductrice.

Oligosaccharides renfermant un résidu de N-acétylhexosamine

Une étude plus ponctuelle a été réalisée sur des disaccharides perméthylés, composés d'un résidu de galactose, et d'une hexosamine, une galactosamine ou une glucosamine selon les cas. Cette analyse a pour but de discriminer aisément les différents types de substitution des hexosamines, en position 3, 4 ou 6, par la nature des fragments observés (fig. 52a-d). Certains fragments sont retrouvés dans tous les spectres. Il s'agit de l'ion B_2 , obtenu par perte d'une molécule de MeOH par les espèces moléculaires protonées $[M+H]^+$ à m/z 496, des ions à m/z 278 et 246, signant la présence d'un résidu de N-acétylhexosamine monosubstitué, sous forme de l'ion Y_1 et du fragment interne $B_{2/1}$, et des ions caractéristiques de l'hexose en position terminale non réductrice, à m/z 187 (B_1 -MeOH), 155 (B_1 -2MeOH) et 111 (B_1 -MeOH-MeOCH₂OMe). La discussion des processus de fragmentation générant ces ions est présentée dans la deuxième partie des résultats. Dans le cas d'une substitution en position 3 du

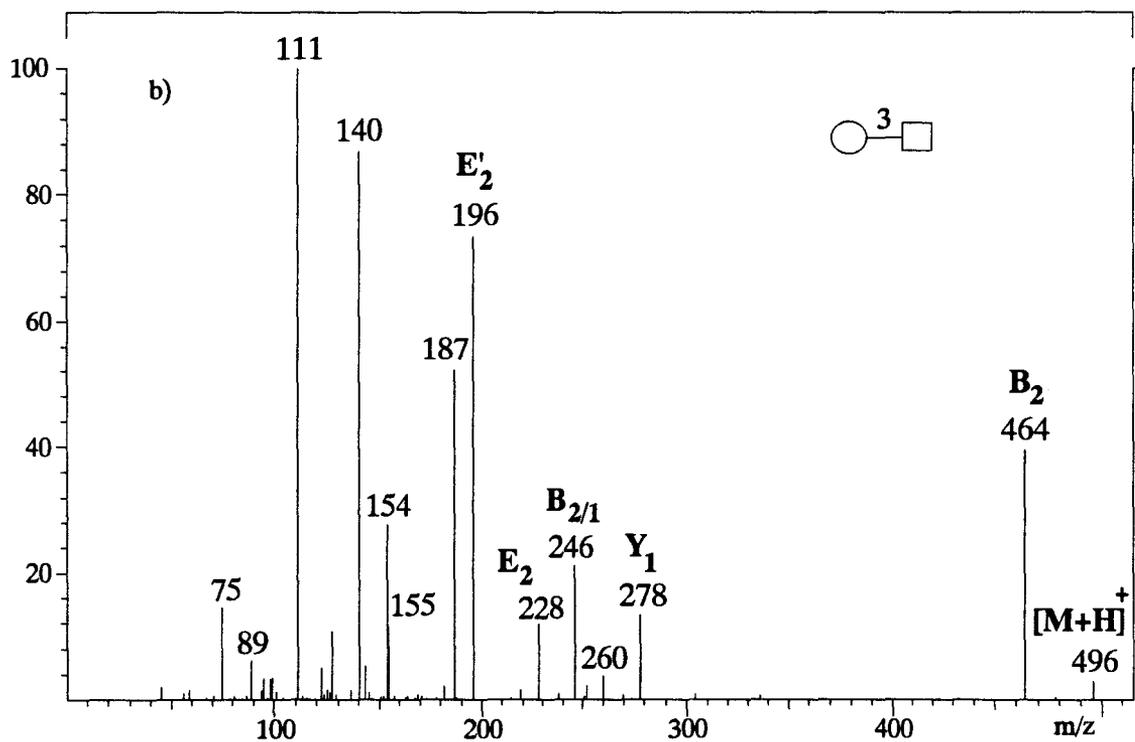
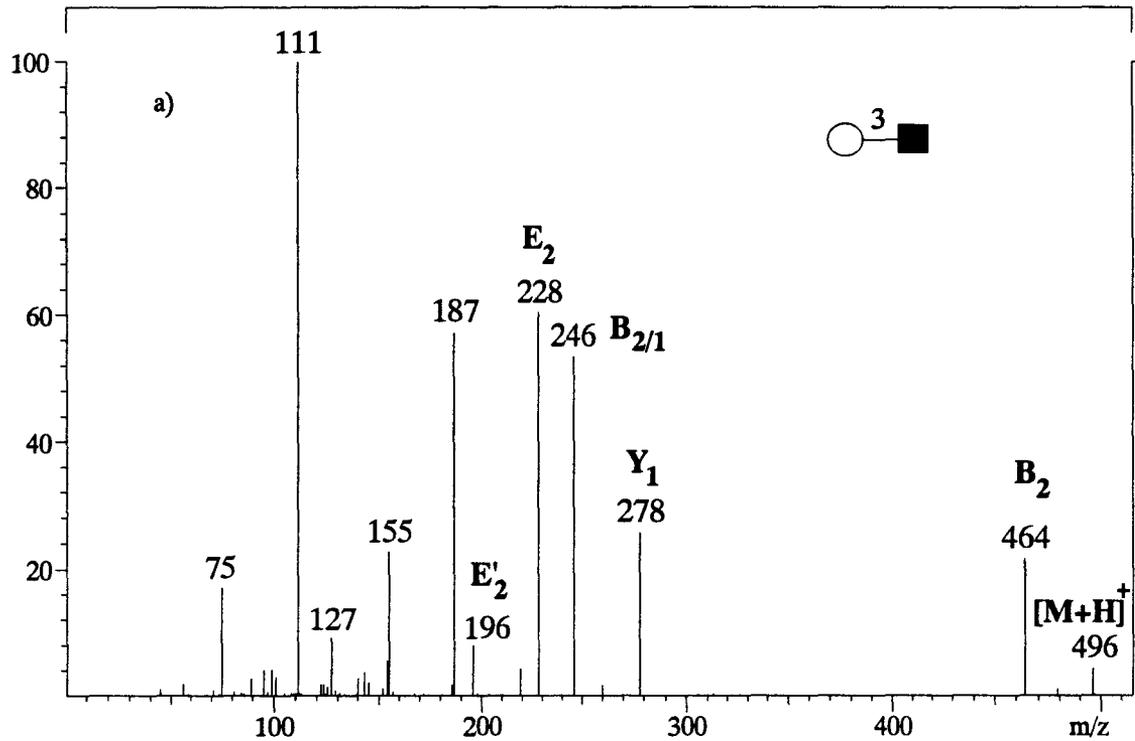


figure 52 – Spectres ESMS/MS des disaccharides perméthylés : Gal(1-3)GlcNAc-Me (a)
Gal(1-3)GalNAc-Me (b) Ion précurseur [M+H]⁺ à m/z 496
(énergie de collision 20 eV)

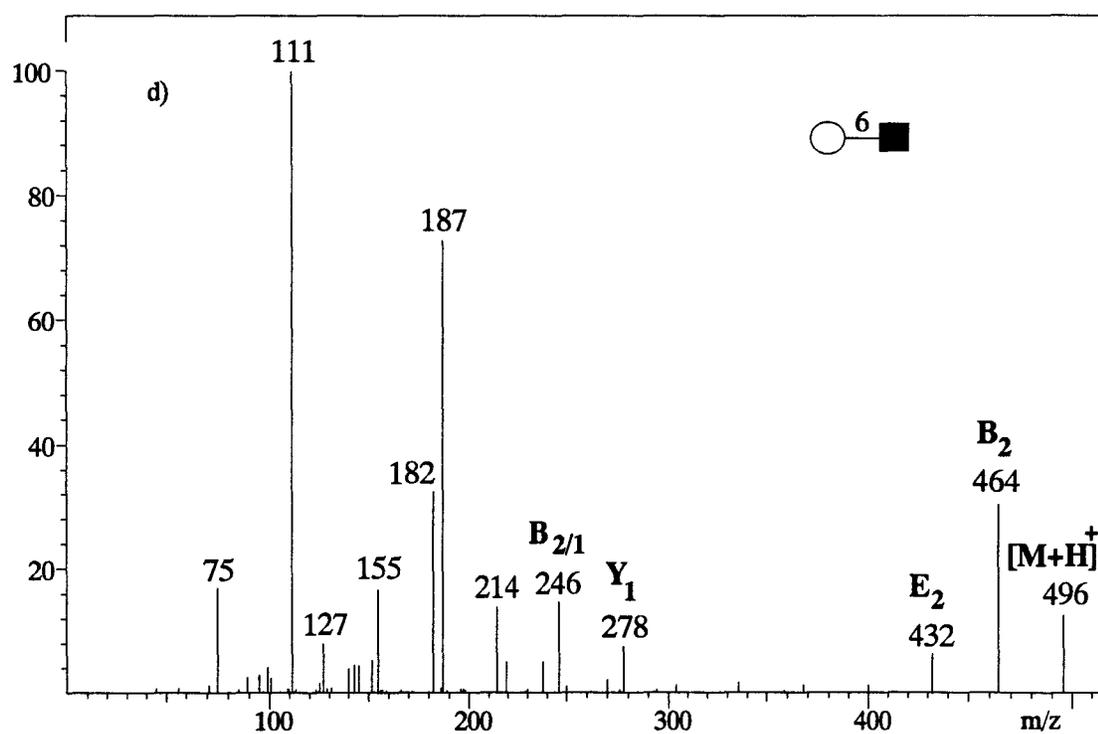
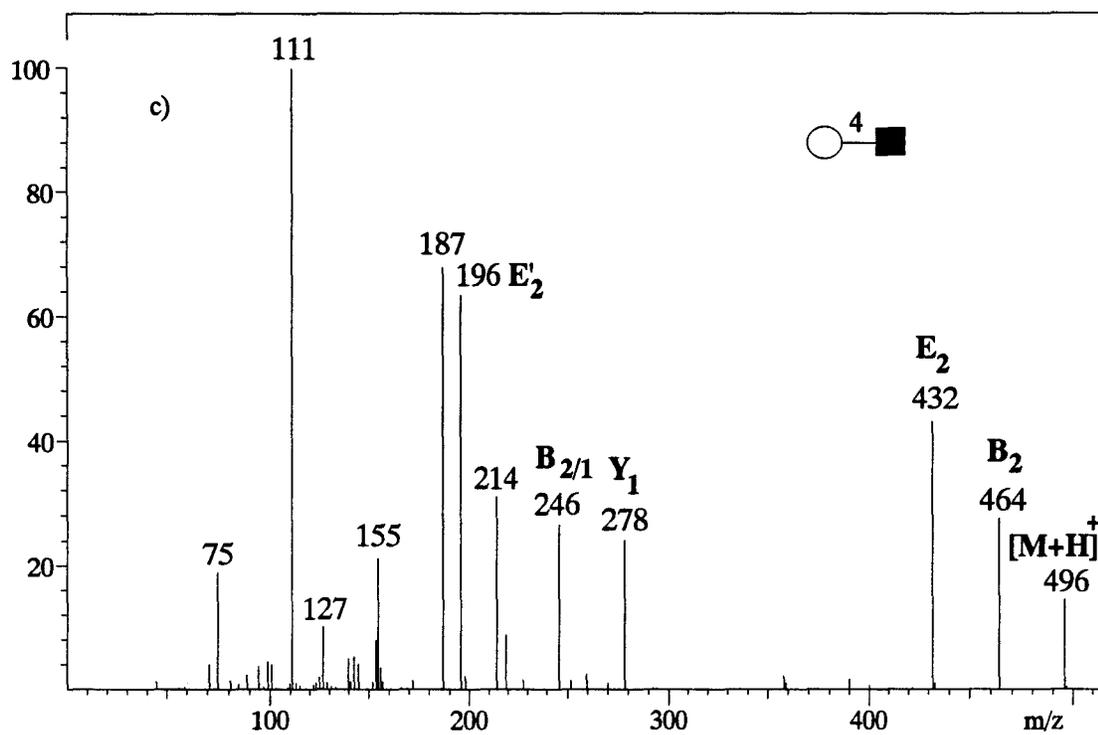


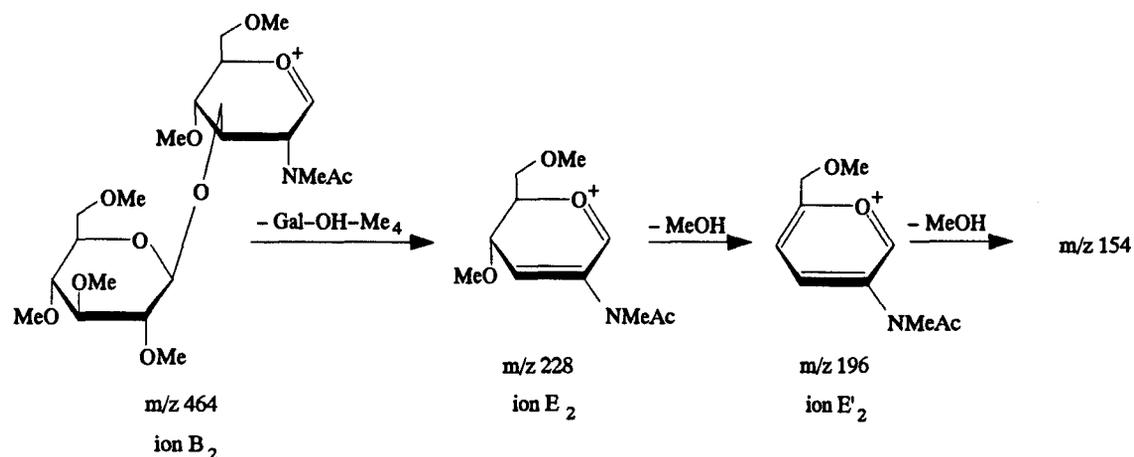
figure 52 (suite) – Spectres ESMS/MS des disaccharides perméthylés Gal(1-4)GlcNAc-Me (a)
Gal(1-6)GlcNAc-Me (b) Ion précurseur [M+H]⁺ à m/z 496
(énergie de collision 20 eV)

résidu de N-acétylhexosamine (fig. 52a et 52b), ce substituant est éliminé préférentiellement pour générer l'ion E_2 correspondant à m/z 228, ion qui peut encore perdre une molécule de méthanol, initialement en position 4, pour donner l'ion E'_2 (m/z 196) (fig. 53), voire une molécule de cétène (m/z 154). Il est à noter que la nature de l'hexosamine n'affecte pas de façon significative l'empreinte du spectre. Dans le cas des autres substitutions en position 4 et 6, les spectres MS/MS (fig. 52c et 52d) montrent l'absence prévisible de l'ion à m/z 228 et la présence d'un signal à m/z 432. Celui-ci correspond à l'ion E_2 , obtenu par perte de méthanol en position 3. La substitution en 4 est caractérisée par l'ion E'_2 à m/z 196 qui provient de l'ion E_2 par l'élimination du résidu Gal. L'ion à m/z 214 peut être formellement expliqué selon deux voies, qui sont au bout du compte équivalentes. La première prend en compte l'élimination de l'hexose perméthylé (218 uma) à partir de l'ion E_2 , l'autre possibilité est liée à l'élimination d'une molécule de méthanol à partir de l'ion du fragment interne $B_{2/1}$ à m/z 246, pour donner l'ion E correspondant. Cette dernière voie est celle envisagée pour expliquer la présence de cet ion dans le cas de la substitution en position 6. Seule possibilité restante de substitution pour un résidu de N-acétylhexosamine, son empreinte est marquée par l'absence des fragments marqueurs des substitutions en 3 et en 4. Nous avons résumé dans la figure 53, la genèse des fragments marqueurs de ces liaisons. Un parallèle peut être effectué avec les résultats précédemment obtenus dans le cas d'oligosaccharides peracétylés (page 97). Une différence majeure entre ces deux types de dérivés réside dans le fait que les ions E des oligosaccharides perméthylés, à la différence de ceux des oligosaccharides peracétylés, éliminent, dans une seconde phase, le substituant lié en position 4. Ceci est un avantage dans la distinction des disubstitutions de type 3,4 et 3,6.

Des processus de fragmentation spécifiques du type de liaison des unités de N-acétylhexosamine sont ainsi mis en évidence par la mesure des spectres de collision des fragments B_2 . Habituellement, ces fragments sont produits spontanément dans la source, ou dans le cas contraire, un léger accroissement du voltage d'extraction dans la source d'ionisation est suffisant pour les obtenir dans des proportions importantes. Ceci démontre le potentiel de l'ESMS/MS pour la caractérisation de sous-unités oligosaccharidiques. Nous discuterons de l'intérêt de l'obtention de tels spectres marqueurs de sous-structures oligosaccharidiques dans

les pages suivantes (§ 2.3.2.).

Glycosylation en position 3



Glycosylation en position 4

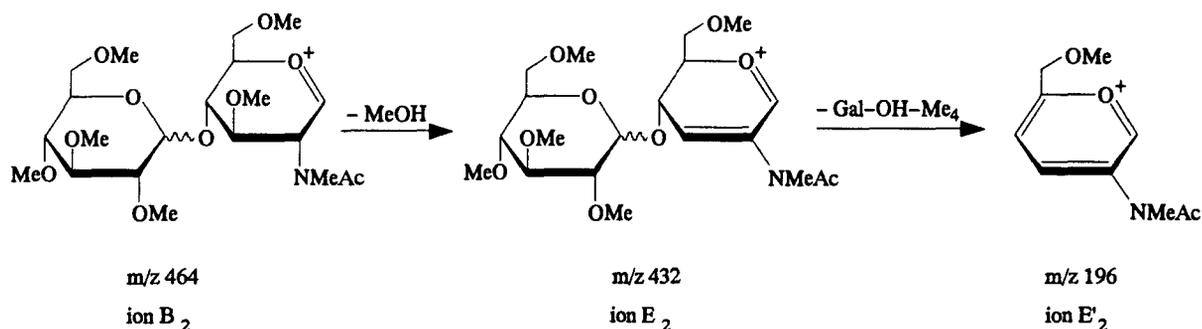


figure 53 – Fragmentation des ions B_2 permettant la distinction entre les glycosylations en position 3 et 4.

Oligosaccharides de la série LNF difucosylés

L'étude des oligosaccharides perméthylés a été étendue aux oligosaccharides difucosylés, LNDFH-1 et LNDFH-2. Les spectres de collision des espèces moléculaires $[M+H]^+$ à m/z 1252 de ces dérivés sont reproduits dans la figure 54. L'élucidation structurale du LNDFH-1-Me est basée sur la fragmentation de l'ion B_3 , de nature tétrasaccharidique, qui, subissant une élimination de 410 uma (dHex-HexOH-Me₆), donne l'ion E_3 à m/z 402. Nous pouvons, par la masse de ce dernier fragment, directement assigner le motif dHex-Hex en position 3 du résidu HexNAc. La masse de l'ion E'_3 , à m/z 196, résultant de la perte d'un désoxyhexose à partir de

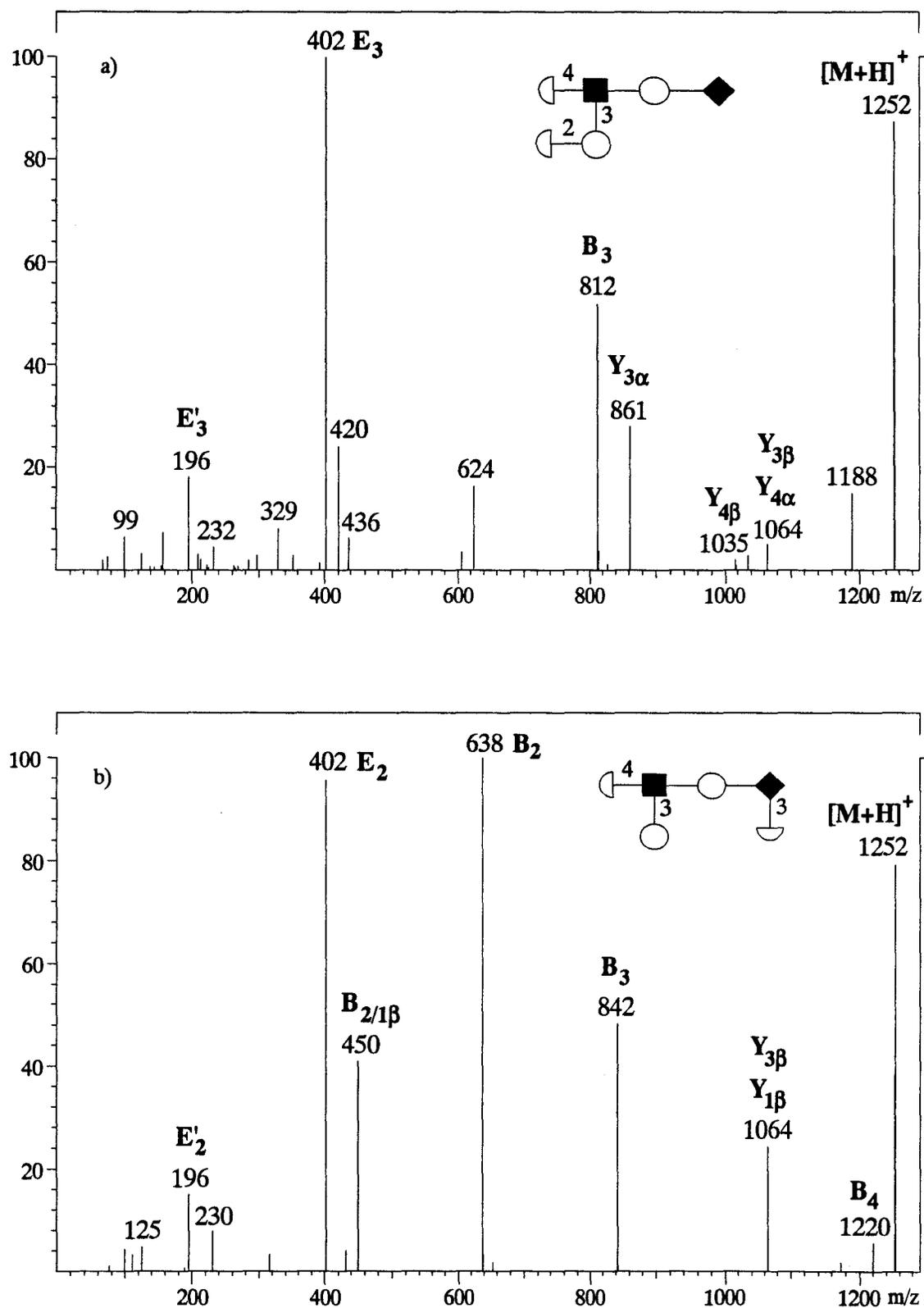


figure 54 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides perméthylés de la série LNF difucosylés : LNDFH-1-Me (a) LNDFH-2-Me (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1252 (énergie de collision 10 eV)

E₃, témoigne de la position en 4 de cet ose sur le résidu de N-acétylhexosamine. Les ions B₄, Y_{4α} et Y_{3β}, bien que de faible intensité, ainsi que l'ion Y_{3α}, permettent de confirmer la séquence et les points de branchement de la structure oligosaccharidique.

Dans le cas du LNDFH-2-Me, les ions B₂ (m/z 638), B₃ (m/z 842), B₄ (m/z 1220), Y_{1α} et Y_{3β} (m/z 1064) permettent de déterminer la séquence oligosaccharidique. Plus spécifiquement, l'ion à m/z 1064 et qui correspond aux deux ions Y_{3β} et Y_{1α} permet de localiser les deux résidus fucosyles respectivement sur le résidu GlcNAc et l'hexose en position terminale réductrice. La fragmentation secondaire de l'ion B₂, produisant les signaux à m/z 402 et 196, rend compte de la position des résidus hexosyle et désoxyhexosyle en position respectivement 3 et 4 de la N-acétylglucosamine.

Oligosaccharides de la série LST

En dernier lieu, nous avons examiné l'adéquation de la spectrométrie de masse en tandem par électrospray pour la caractérisation structurale d'oligosaccharides perméthylés sialylés (fig. 55). Les trois spectres MS/MS des espèces moléculaires protonées à m/z 1265 ont en commun la présence de signaux intenses à m/z 1029, 825, 376 et 344. Les deux premiers ions correspondent aux fragments B₄ et B₃ des dérivés LST-a-Me et LST-c-Me, ou B₃ et B₂ dans le cas du composé LST-b-Me, alors que les deux derniers sont les ions B₁ et E₁, marqueurs de la présence de l'acide sialique (fig. 56). La différenciation des trois isomères est basée sur la fragmentation secondaire de l'ion B à m/z 825. Cet ion donne naissance à un fragment E dont la masse est respectivement égale à 228, 793 et 589 pour les composés LST-a-Me, LST-c-Me et LST-b-Me. Dans le premier cas, nous pouvons conclure à une structure linéaire où le résidu de N-acétylglucosamine est substitué en 3 par le motif NeuAc-Hex-Me₉. L'ion à m/z 793 du composé LST-c-Me permet de démontrer que cet oligosaccharide est obtenu par sialylation du composé LNnT, puisque l'élimination du substituant en position 3, présidant à la formation de l'ion E, consiste en une molécule de méthanol. Par déduction, le motif NeuAc-Hex est porté en position 4 du résidu de N-acétylglucosamine. Enfin, dans le cas du LST-b-Me, l'ion B₂ trisaccharidique perd un résidu HexOH-Me₄, pour donner l'ion E₂ à m/z 589. Ceci indique que seul le résidu de galactose est branché en position 3 et que, par

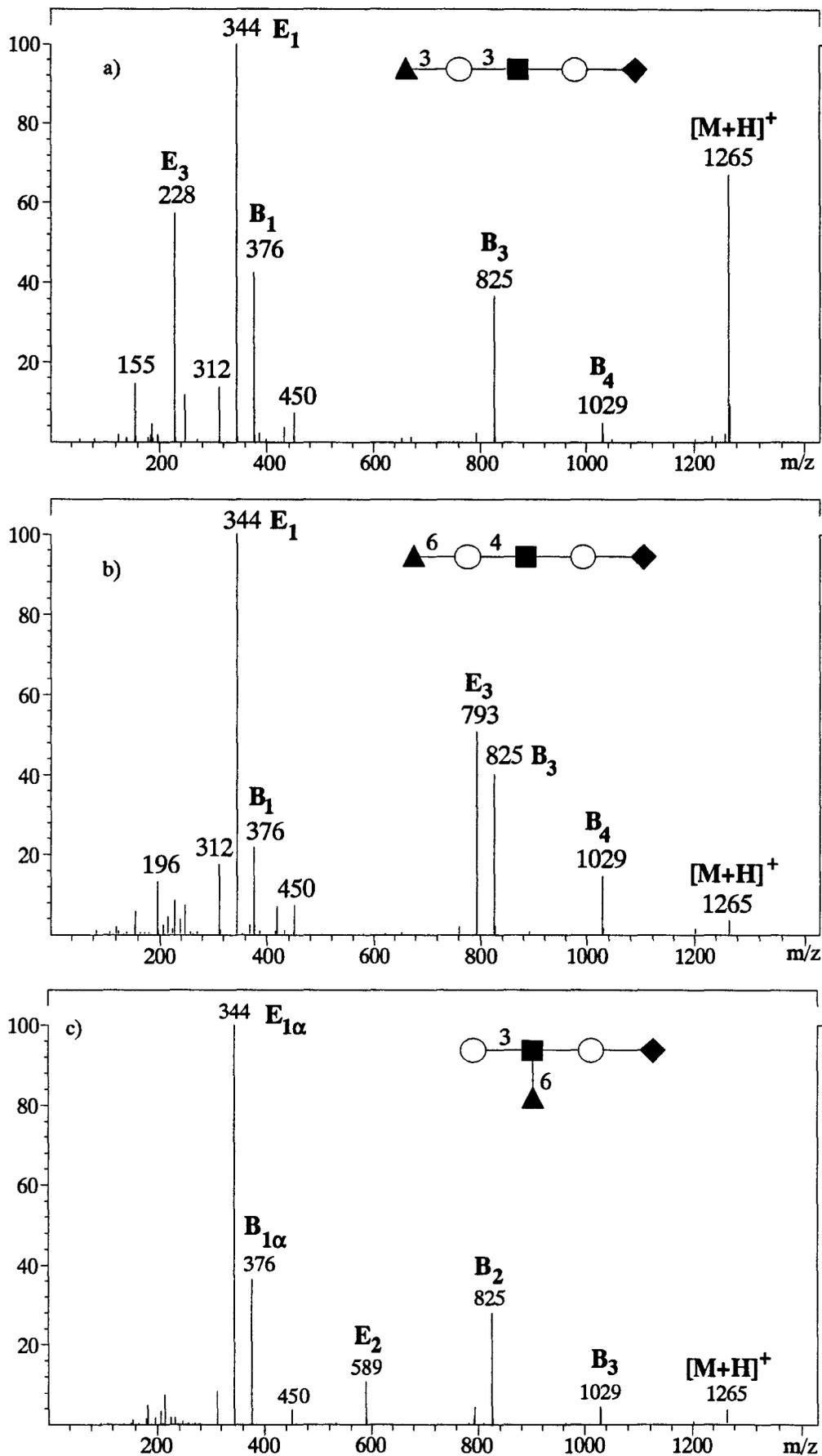


figure 55 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides perméthylés de la série LST : LST-a-Me (a) LST-c-Me (b) LST-b-Me (c) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1265 (énergie de collision 20 eV)

conséquent, l'acide sialique présent sur la N-acétylglucosamine est lié en 6. En effet, l'on n'observe pas d'ion à m/z 196, marqueur d'une substitution en position 4 et de plus, la sialylation met en jeu, de par la biosynthèse, des liaisons de type 3 ou 6. Il est à noter, qu'à ce stade, l'analyse par MS/MS permet de distinguer les modes de substitution de résidus de N-acétylhexosamine mais ne donne pas d'indication quant au type de liaison des résidus de galactose substitués par l'acide sialique, comme nous venons de le voir, ou par le fucose, comme nous avons pu le discuter précédemment.

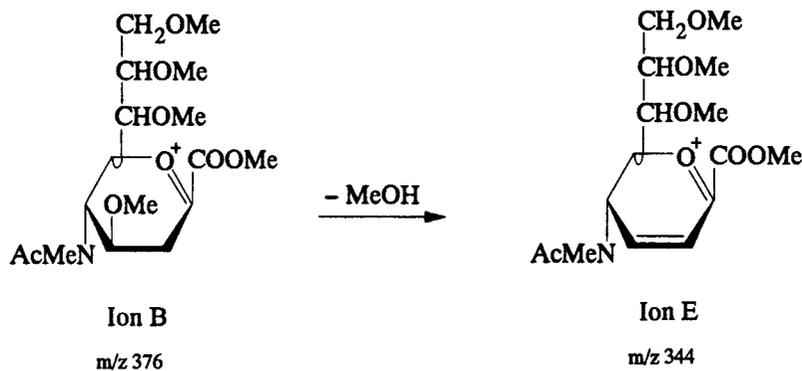


figure 56 – Fragmentation de l'ion B₁ de l'acide N-acétylneuraminique

2.3.2. Caractérisation des sous-structures des fragments B perméthylés par MS/MS

Nous avons appliqué aux fragments B générés en source à partir des oligosaccharides perméthylés, le principe d'analyse apparenté à la MS³, déjà utilisé et discuté dans le cas des oligosaccharides peracétylés.

Etude des fragments B à m/z 464

Seule une très légère augmentation du potentiel d'extraction est nécessaire pour produire l'ion B₂ à m/z 464, résultant du clivage de la liaison glycosidique du résidu GlcNAc des LNT et LNnT perméthylés. Les spectres de collision mesurés à une énergie de 15 eV sont reproduits dans la figure 57. L'on y reconnaît aisément les ions E₂ et E'₂. Les fragments à m/z 111, 155 et 187 résultent de la fragmentation de l'ion B₁ à m/z 219, dérivé de l'hexose en position terminale non réductrice, fragment qui n'est pas observé dans le cas du LNT-Me. Les mécanismes qui président à la formation de ces ions sont largement discutés dans le chapitre suivant. Comme nous avons pu l'observer dans le cas des espèces moléculaires, la distinction

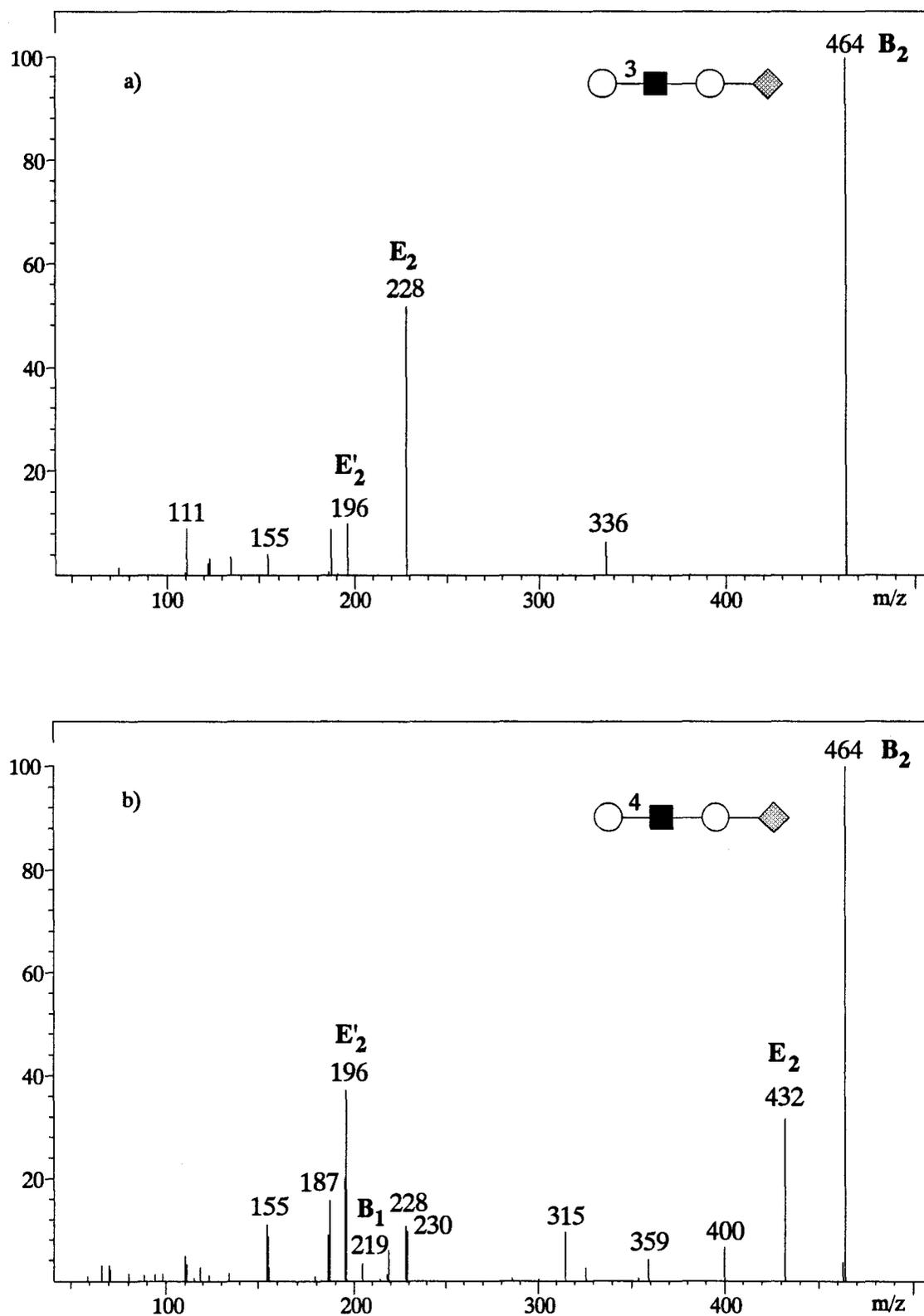


figure 57 – Spectres ESMS/MS du fragment généré en source à m/z 464 des oligosaccharides perméthylés LNT-Me (a) et LNnT-Me (b) (énergie de collision 15 eV)

entre les glycosylations en position 3 et 4 du résidu de N-acétylglucosamine est immédiate, sur la base de la masse de l'ion E_2 . Afin de généraliser nos observations, les ions à m/z 464 générés à partir des disaccharides Hex-HexNAc perméthylés, composés discutés précédemment, ont été soumis à collision dans des conditions semblables (fig. 58). Les empreintes des isomères de glycosylation en 3 et 4 sont largement concordantes avec les résultats observés pour les LNT-Me et LNnT-Me. Le cas particulier de la glycosylation en position 6 offre une empreinte caractéristique et différente de celles des autres isomères. Alors que l'ose en position non réductrice donne naissance aux fragments prévus à m/z 187, 155 et 111, ce spectre est marqué par l'absence d'ions issus du résidu glycosidique réducteur. Il est ainsi possible de déterminer de façon univoque la structure de sous-unités glycosidiques perméthylées comprenant une hexosamine N-acétylée, grâce à la MS/MS de fragments générés en source. L'ensemble de ces spectres constituent, dès lors, des références permettant la comparaison avec les spectres issus des fragments à m/z 464 d'autres oligosaccharides.

Les exemples choisis à titre d'illustration sont les ions obtenus à partir du LNF-5-Me et de deux hexasaccharides, le LNH et le LNnH perméthylés. Le spectre de l'ion B_2 issu du pentasaccharide LNF-5-Me est représenté à la figure 59a. Son empreinte est similaire à celle du spectre de la figure 57a et permet la caractérisation de la liaison glycosidique de type 1-3. De façon semblable, le spectre de l'ion à m/z 464 dérivé du composé LNnH-Me (fig. 59b) indique une liaison glycosidique de type 1-4. En ce qui concerne le composé LNH-Me, le spectre obtenu, à partir de l'ion B_2 (fig. 59c), ne correspond à aucun des spectres de référence. Il présente cependant les ions marqueurs des liaisons en 1-4 (m/z 432) et 1-3 (m/z 228). Etant donné que cet oligosaccharide est un hexasaccharide renfermant deux résidus de N-acétylglucosamine, nous pouvons conclure qu'il s'agit en fait d'un mélange des deux sous-structures.

Etude des fragments B à m/z 638

L'étude a été étendue aux fragments à m/z 638, formés en source, pour l'analyse des oligosaccharides perméthylés LNF-1, LNF-2 et LNF-3 (fig. 60). Les informations apportées sont en tout point concordantes avec l'affectation des signaux réalisée à partir des spectres des

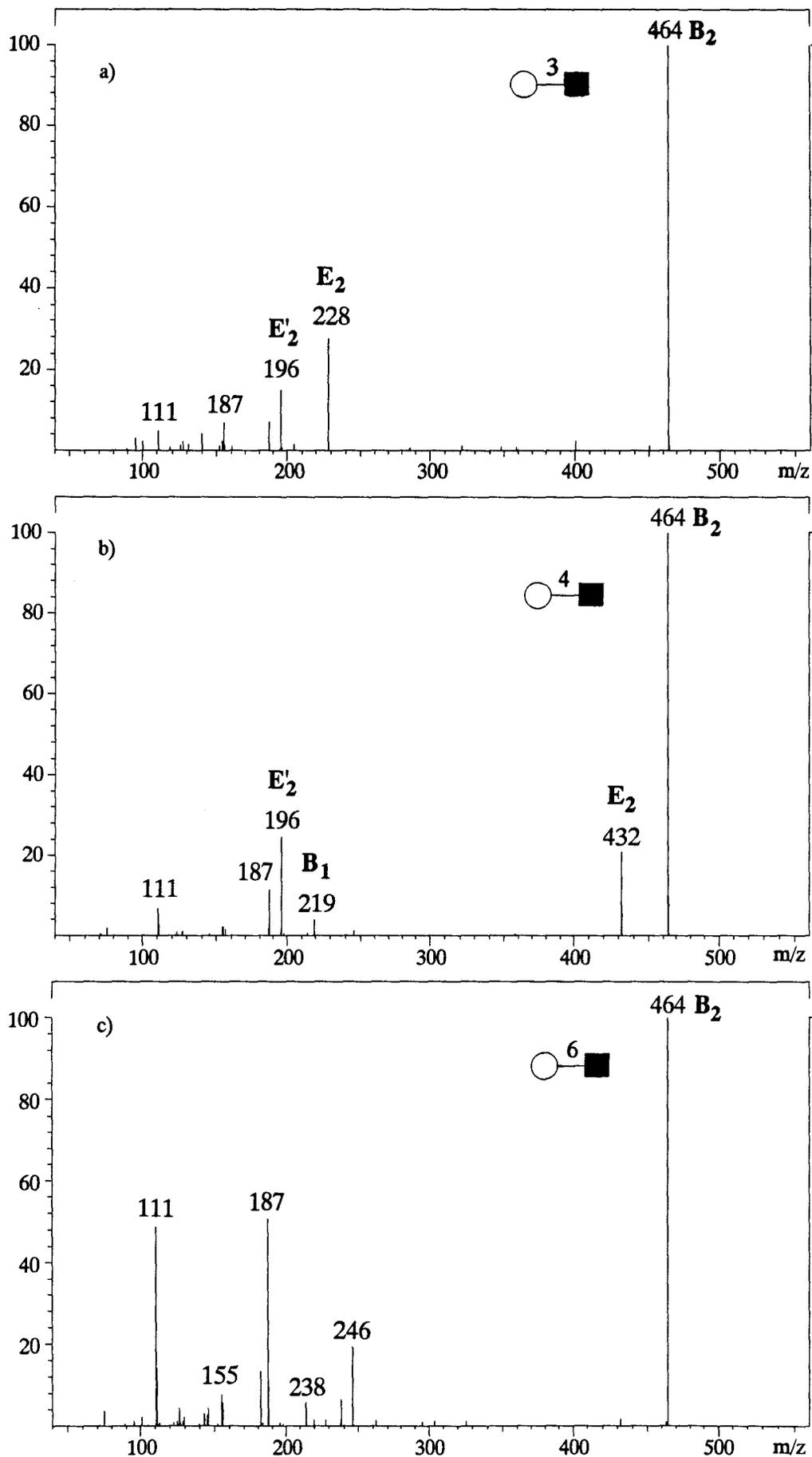


figure 58 – Spectres ESMS/MS du fragment généré en source à m/z 464 des disaccharides perméthylés Gal(1-3)GalNAc (a) Gal(1-4)GlcNAc (b) et Gal(1-6)GlcNAc (c) (énergie de collision 15 eV)

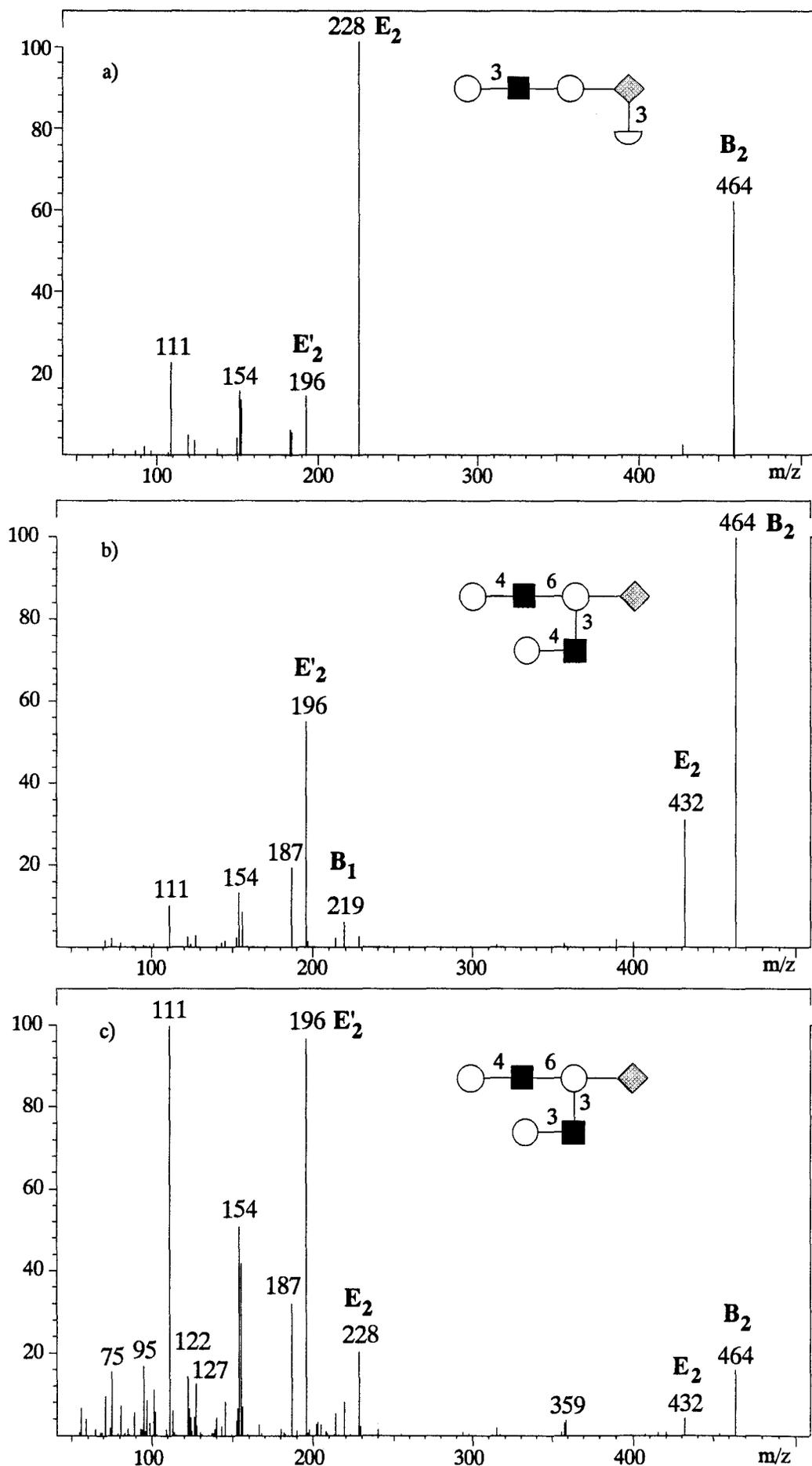


figure 59 – Spectres ESMS/MS du fragment généré en source à m/z 464 des oligosaccharides perméthylés L N_n H-Me (a) L N_n H-Me (b) et LNH-Me (c) (énergie de collision 15 eV)

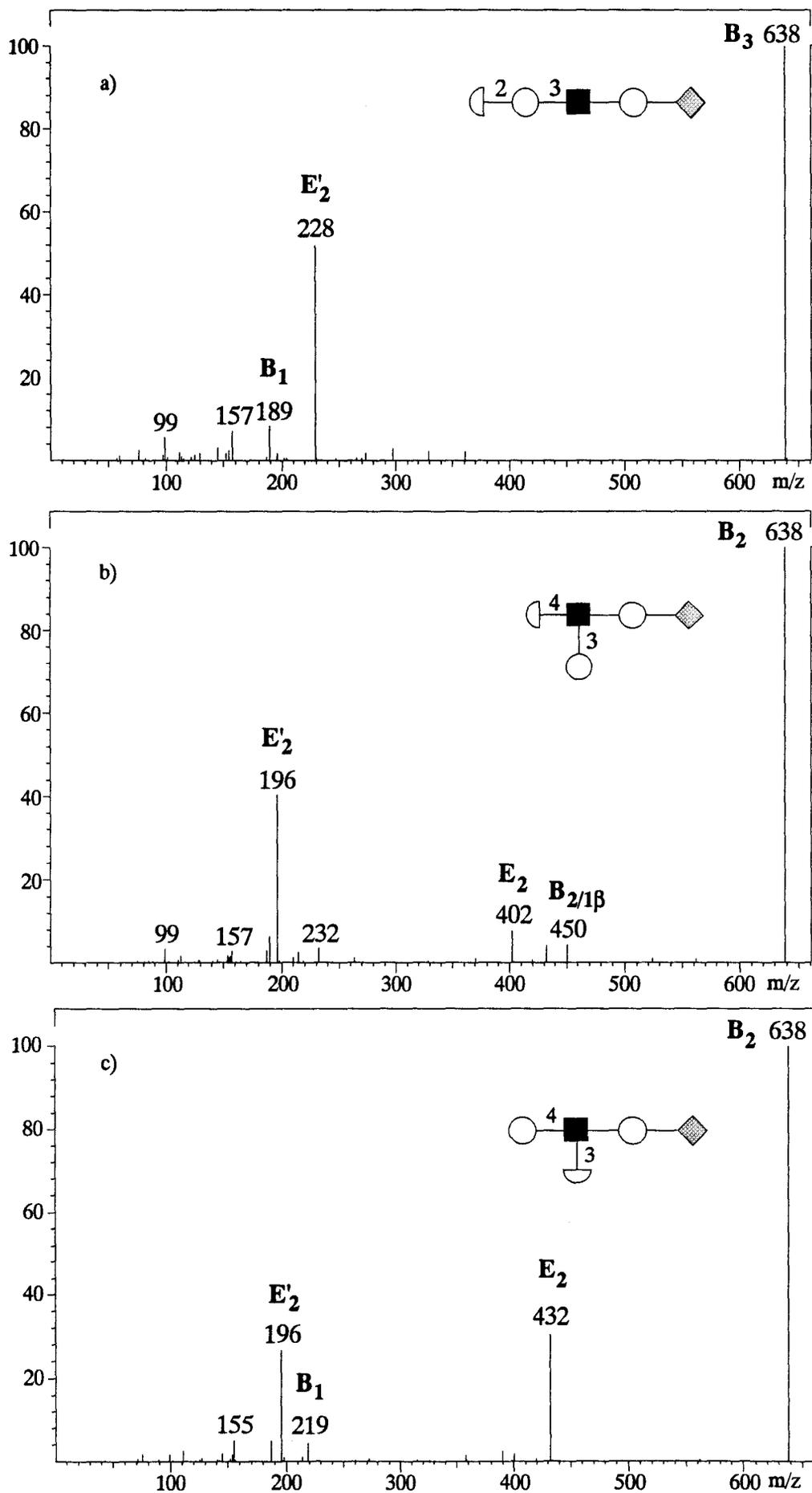


figure 60 – Spectres ESMS/MS du fragment généré en source à m/z 638 des oligosaccharides perméthylés LNF1-Me (a) LNF2-Me (b) et LNF3-Me (c) (énergie de collision 15 eV)

espèces moléculaires. Ce type d'analyse permet de caractériser de façon indubitable la provenance des fragments secondaires observés. Nous nous contenterons de reprendre les conclusions au vu des ions détectés sans rediscuter leur genèse. Le spectre du LNF-1-Me comporte un signal majeur à m/z 228 permettant de localiser le motif dHex-Hex en position 3 du résidu HexNAc et de conclure à une structure linéaire de l'oligosaccharide. L'identification d'un résidu de N-acétylhexosamine glycosylée en position 3 et 4 est basée sur l'existence de l'ion à m/z 196 de type E'_2 , dans les cas du LNF-2-Me et LNF-3-Me, (fig. 60b et c), la nature de l'ose en position 3 étant déterminée grâce à la masse de l'ion E_2 , 402 pour un hexose dans le cas du LNF-2-Me et 432 soit un désoxyhexose pour le LNF-3-Me. Dans le spectre du LNF-2-Me, deux signaux à m/z 450 et 432 sont générés par l'élimination non spécifique du résidu fucosyle.

Ces empreintes permettent de caractériser nettement la sous-structure issue du LNDFH-2-Me. A la différence du LNDFH-1-Me dont l'ion B issu du clivage de la liaison de la N-acétylglucosamine a pour masse 812 (fig. 61a), l'oligosaccharide dérivé du LNDFH-2 possède un signal équivalent à m/z 638 (fig. 61b). La comparaison du spectre de collision de cet ion avec les spectres de références des oligosaccharides monofucosylés nous amènent à conclure à une identité de structure des ions à m/z 638 du LNDFH-2-Me et du LNF-2-Me, permettant de caractériser cette sous-structure, de type Lewis-a, dans l'oligomère difucosylé.

Etude des fragments B à m/z 825

De même que précédemment, cette série d'expériences a pour but d'établir indiscutablement la fragmentation secondaire des ions B à m/z 825 générés en source, lors de l'analyse de pentasaccharides sialylés de la série LST, et d'illustrer l'intérêt de l'analyse de cette fragmentation dans l'élucidation structurale de sous-unités oligosaccharidiques. De façon synthétique, les trois spectres mettent en évidence la présence d'un acide sialique par les deux ions apparentés B_1 et E_1 respectivement à m/z 376 et 344, et issus du monosaccharide en position terminale non réductrice. La substitution du résidu de N-acétylglucosamine est explicitée comme précédemment par les ions de type E. La glycosylation en position 3 par le motif NeuAc-Hex est élucidée par la masse du fragment E_3 à m/z 228 (LST-a-Me, fig. 62a)

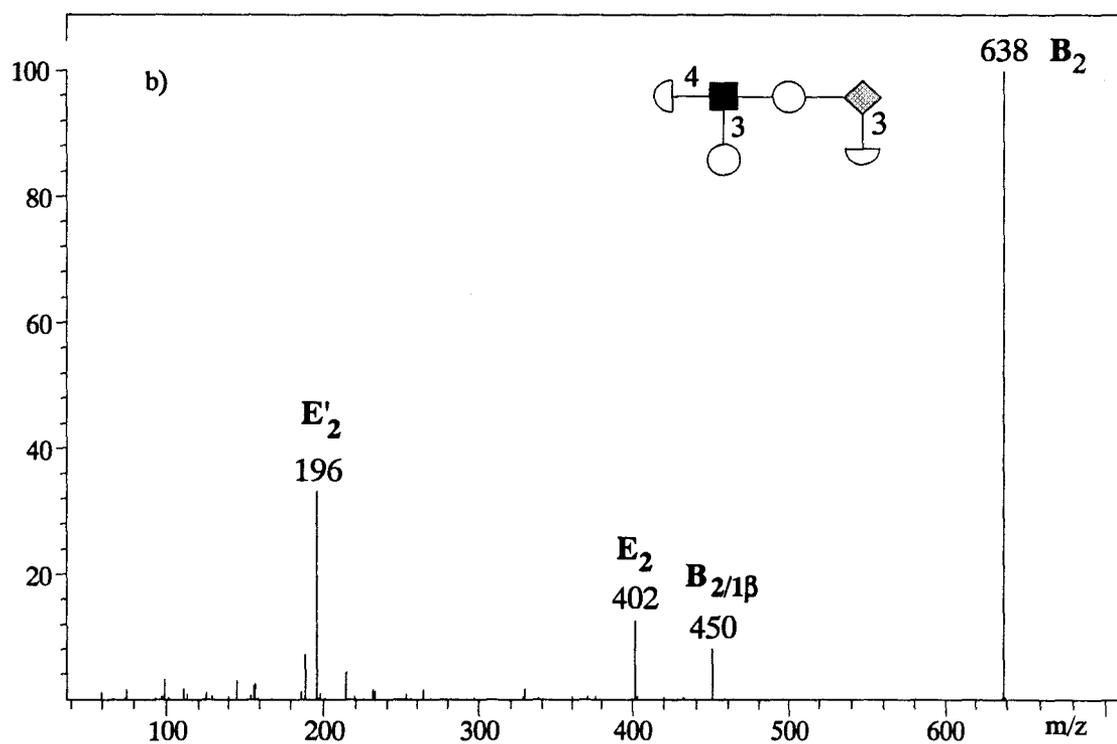
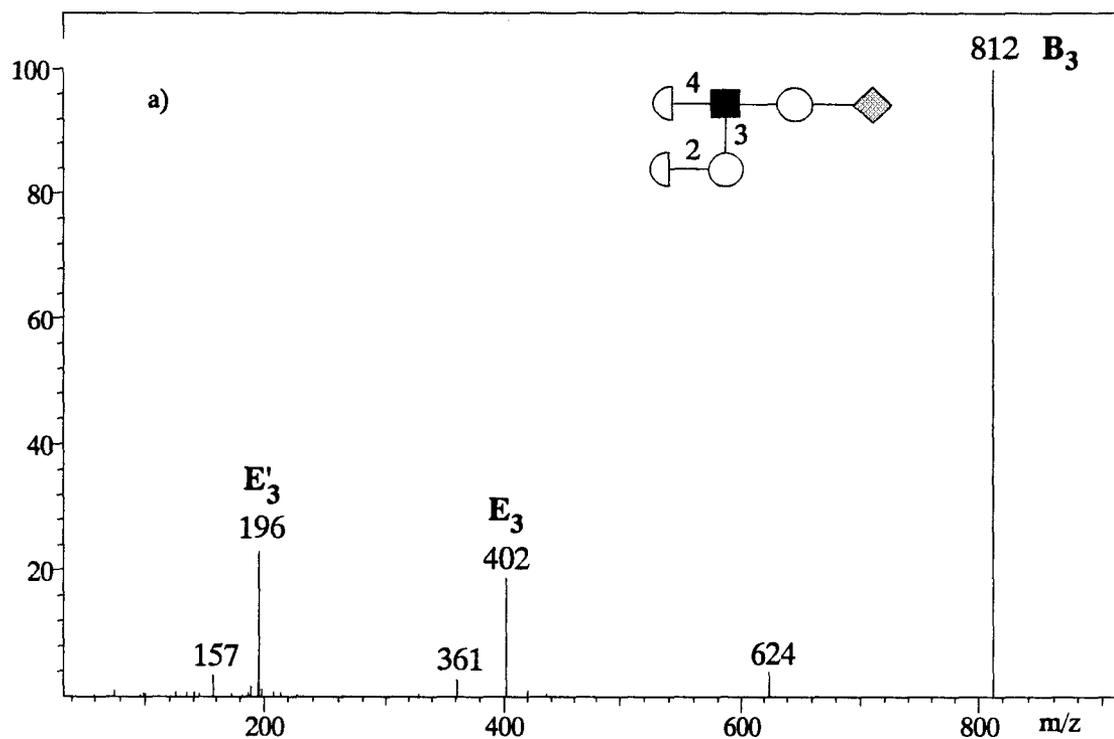


figure 61 – Spectres ESMS/MS du fragment généré en source respectivement à m/z 812 et 638 des oligosaccharides perméthylés LNDHFH-1-Me (a) et LNDHFH-2-Me (b) (énergie de collision 15 eV)

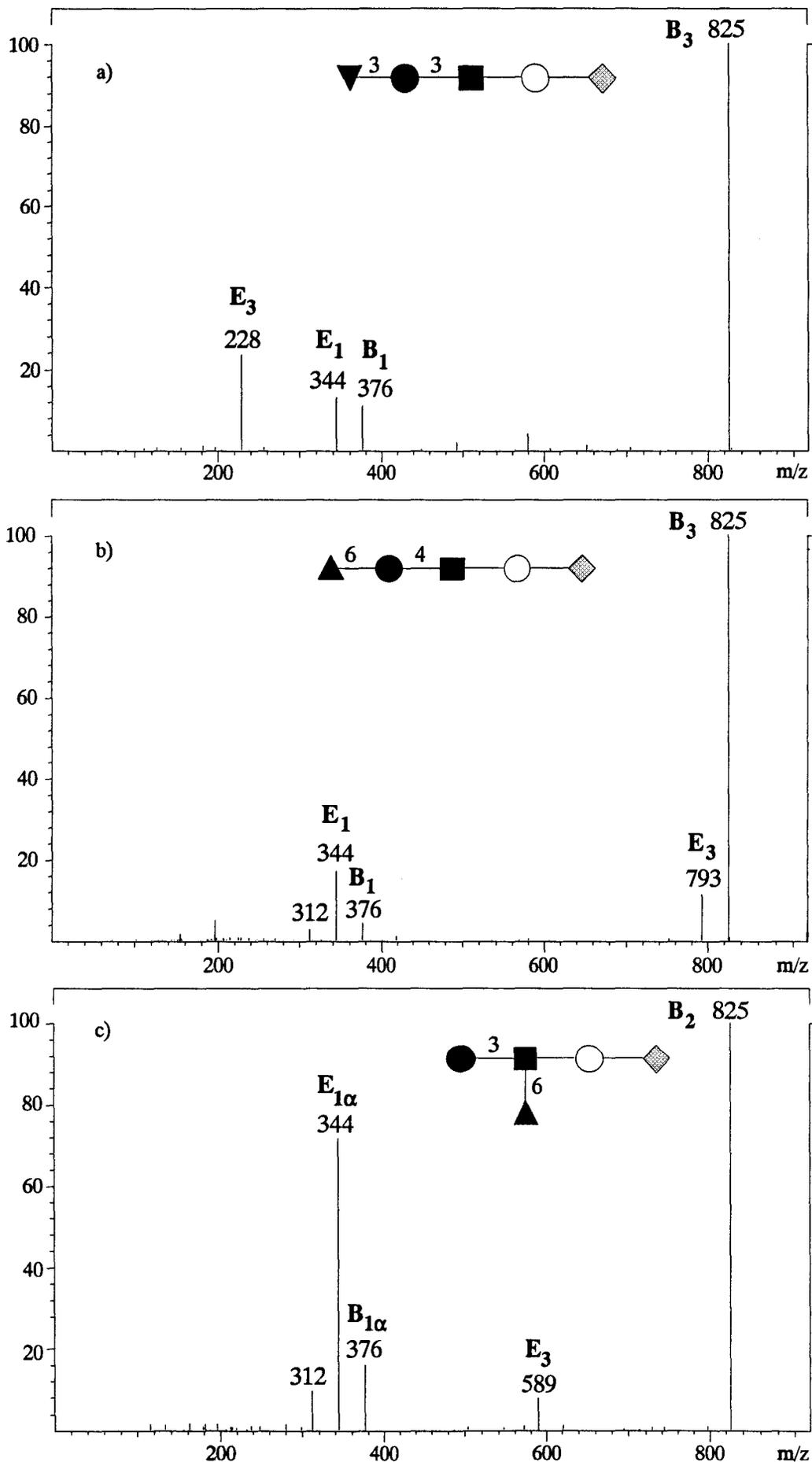


figure 62 – Spectres ESMS/MS du fragment généré en source à m/z 825 des oligosaccharides perméthylés LST-a-Me (a) LST-c-Me (b) et LST-b-Me (c) (énergie de collision 15 eV)

alors que celle en 4 est déduite du signal à m/z 793 (B_3 -MeOH, LST-c-Me, fig. 62b). Une double glycosylation est caractérisée par l'ion E_3 à m/z 589 (fig. 62c). De nouveau, la fragmentation des ions B permet la différenciation univoque des types de glycosylation des résidus de N-acétylhexosamine. Cependant, dans la configuration utilisée, la MS/MS ne permet pas de préciser les positions des acides sialiques sur les résidus de galactose et donc, de distinguer les liaisons de type $\alpha(2-3)$ et $\alpha(2-6)$.

2.3.3. ESMS/MS d'oligosaccharides dérivés par amination réductive et perméthylés

L'analyse par ESMS/MS d'oligosaccharides sous forme perméthylée constitue le meilleur choix pour l'élucidation structurale de ce type de molécules, en particulier leur séquence et leurs éventuels points de branchement. Dans le but d'intégrer le volet ainsi développé dans une stratégie globale s'intéressant aux glycanes issus de glycoconjugués après purification, nous avons appliqué la perméthylation aux oligosaccharides préparés après dérivation par amination réductive. Un certain nombre d'oligosaccharides dérivés par la 2-aminobenzamide et purifiés par HPLC ont été perméthylés et analysés par ESMS/MS selon les conditions préétablies. Nous détaillerons plus spécifiquement la discussion concernant l'obtention de ces dérivés et leur purification dans le troisième volet de ce travail. Ces produits font l'objet d'une N-acétylation, afin de modifier la fonction amine secondaire et d'éviter ainsi la formation d'un dérivé ammonium quaternaire lors de la méthylation. De plus, il est à noter que la perméthylation induit, au niveau de l'aglycone, la formation du dérivé 2-amino-N,N-diméthyl benzamide. Le spectre ESMS du dérivé ainsi formé à partir de l'oligosaccharide LNF-1 et dénommé LNF-1-2AB-NAc-Me, présente comme attendu deux signaux correspondant aux espèces moléculaires protonée, à m/z 1269, et sodée, à m/z 1291. Leurs spectres de collision sont présentés à la figure 63. La dérivation par amination réductive avant perméthylation ne modifie pas fondamentalement l'empreinte des spectres de l'ensemble des oligosaccharides ainsi étudiés par rapport aux résultats précédemment obtenus par perméthylation (§ 2.3.1.). Le spectre de l'espèce sodée met en évidence des fragments tels que des ions Y, Z et C. Ces deux derniers types d'ions apparaissent plus spécifiques de la fragmentation des espèces moléculaires sodées. Le spectre de l'espèce $[M+H]^+$ montre la série des ions Y et les ions B_4 ,

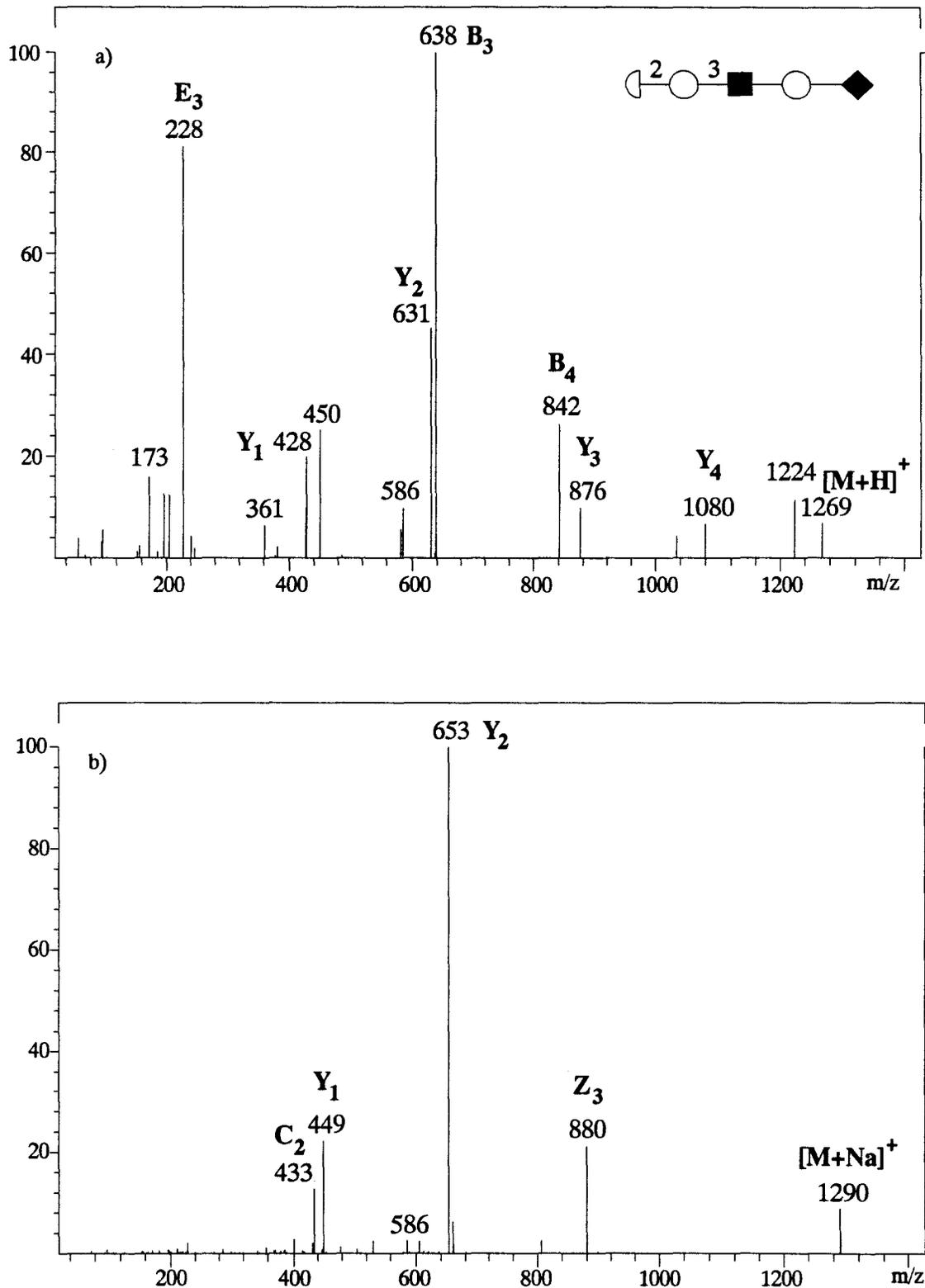


figure 63 – Spectres ESMS/MS du dérivé par amination réductive perméthylé de l'oligosaccharide LNF-1 Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1269 (énergie de collision 15 eV) (a) Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 1290 (énergie de collision 50 eV) (b)

B₃ et E₃. Deux signaux de faible intensité sont détectés à m/z 1036 et 1224 et correspondent à la perte de 45 uma par l'espèce moléculaire et l'ion Y₄. L'on peut postuler que cette élimination provient de la fonction 2-amino-N,N-diméthyl benzamide.

Les isomères ramifiés LNF-2-2AB-NAc-Me, LNF-3-2AB-NAc-Me et LNF-5-2AB-NAc-Me et l'oligosaccharide difucosylé LNDFH-2-2AB-NAc-Me présentent également ce type d'élimination à partir des espèces moléculaires, et des ions Y₂ et, Y₁ et Y₂ dans le cas respectivement des LNF-2-2AB-NAc-Me et LNF-3-2AB-NAc-Me. Les autres ions présents dans ces spectres (fig. 64) sont, comme attendu, de type B, Y et E et sont ainsi tout à fait comparables à ceux observés pour les oligosaccharides perméthylés. L'on retrouve ainsi le type d'information structurale précédemment décrite. Ces résultats prouvent l'adéquation de l'analyse par ESMS/MS de dérivés perméthylés après dérivation par amination réductive.

2.3.4. MALD/PSDMS d'oligosaccharides perméthylés

Résultats préliminaires

La qualité des résultats obtenus lors de l'élucidation structurale d'oligosaccharides perméthylés par spectrométrie de masse en tandem en mode électrospray nous a incités à examiner les processus de fragmentation par une autre technique d'ionisation, la désorption laser selon le mode post-source decay (PSD).

Des analyses préliminaires ont été réalisées sur des oligosaccharides modèles dérivés par perméthylation, peracétylation ou amination réductive (Lemoine *et al.*, 1996). Ces types de composés forment principalement en MALDMS des espèces moléculaires cationisées, sous forme de [M+Na]⁺, et dans une moindre mesure, [M+K]⁺. Les spectres PSD de ces espèces moléculaires livrent des informations structurales sous forme d'ions B et Y, permettant la détermination de la séquence et des points de branchement au sein des structures étudiées. Les dérivés peracétylés présentent, par ailleurs, de nombreuses fragmentations secondaires, par perte de molécules d'acide acétique, compliquant notablement les spectres. Ces auteurs ont également démontré que la fixation, sur l'extrémité terminale réductrice de l'oligosaccharide,

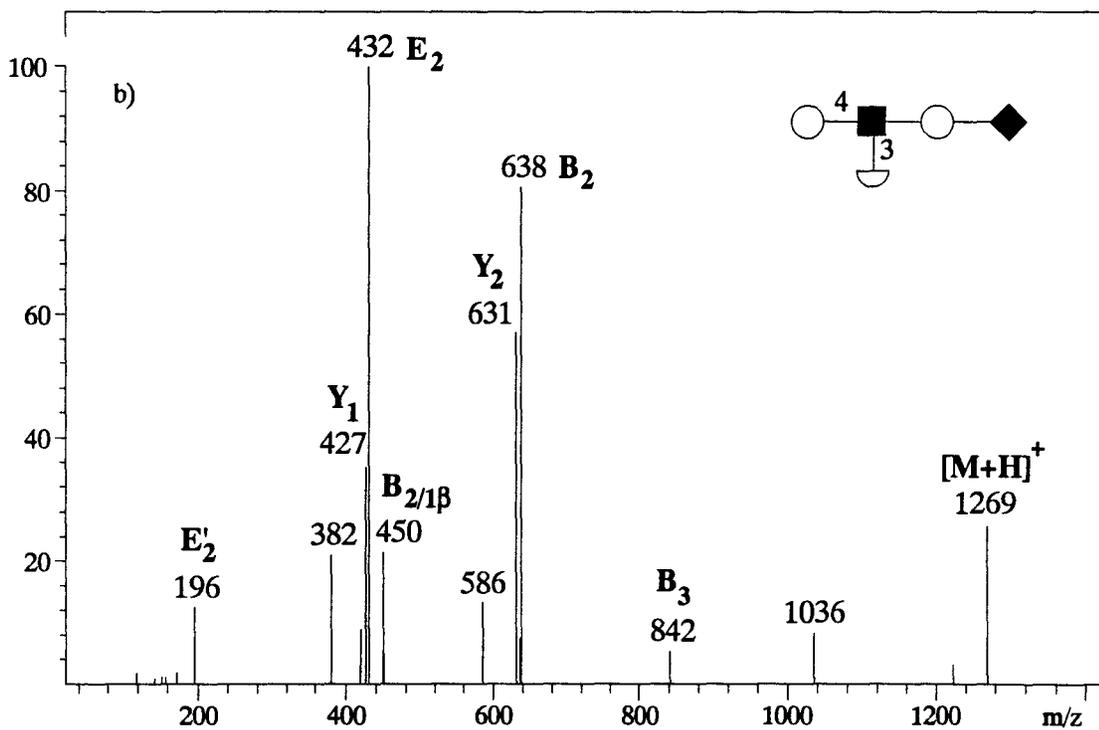
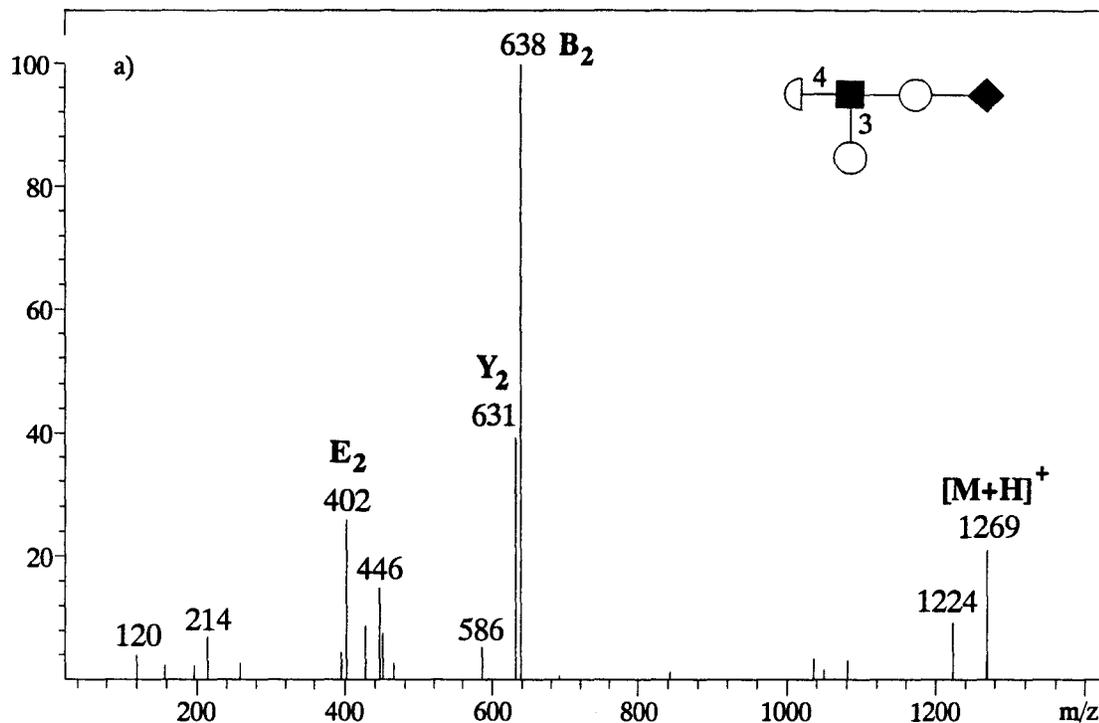


figure 64 – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides dérivés par amination réductive et perméthylation de la série LNF : LNF2-2AB-NAc-Me (a) LNF3-2AB-NAc-Me (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1269 (énergie de collision 15 eV)

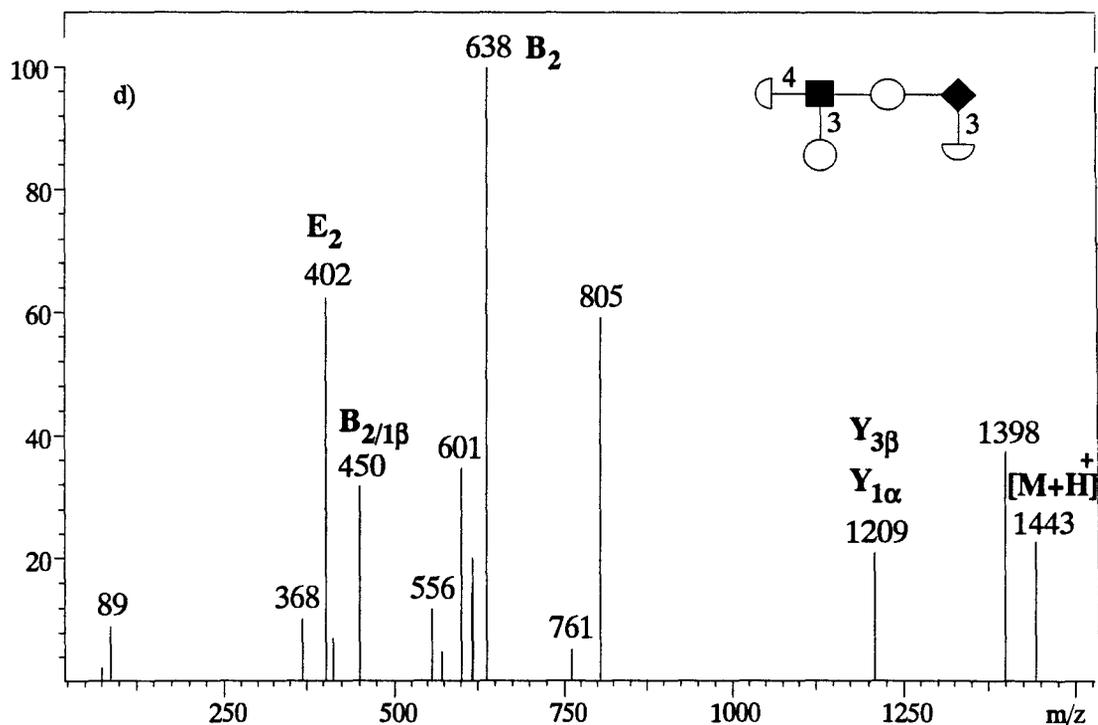
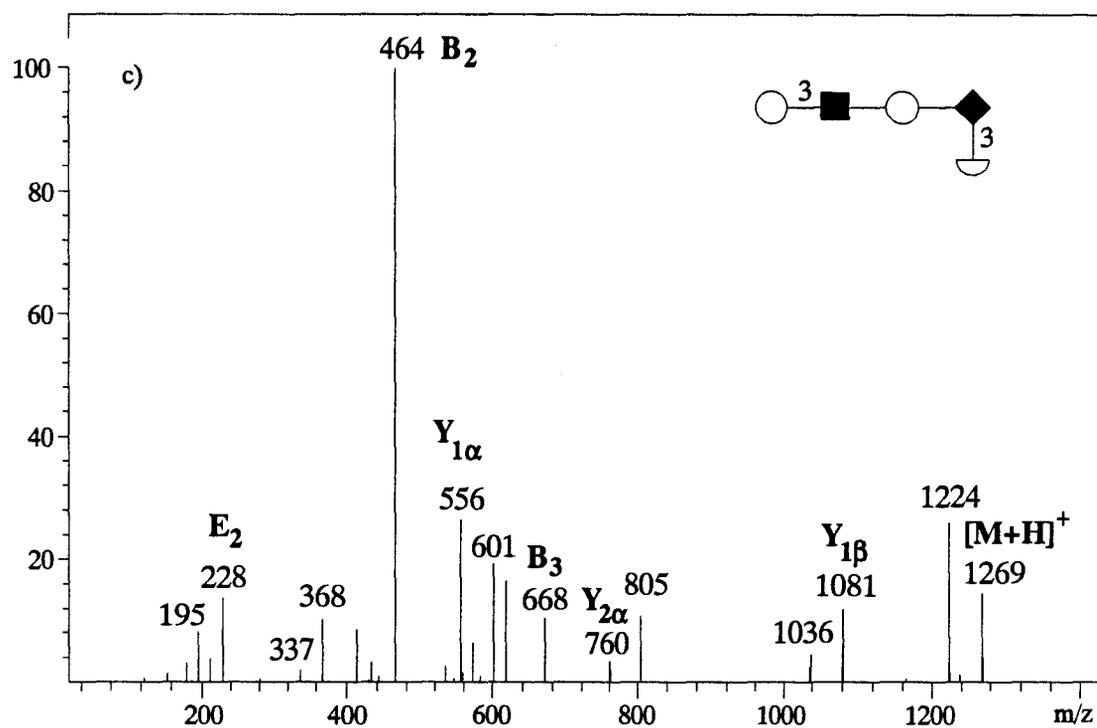


figure 64 (suite) – Spectres ESMS/MS des oligosaccharides dérivés par amination réductive et perméthylation de la série LNF : LNF5-2AB-Nac-Me (a) et LNDFH-2-2AB-Nac-Me (b) Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1269 et 1443 (énergie de collision 15 eV)

lors de la dérivation par amination réductive, d'une amine fortement basique de type aliphatique ou benzylique, à la différence d'une amine aromatique, permettait de générer préférentiellement des espèces moléculaires protonées. Ces dernières donnent, en mode PSD, des spectres prévisibles, caractérisés par la présence de séries complètes de fragments Y et livrant des informations structurales déterminantes (séquence et points de branchement). Une telle approche est tout à fait applicable à l'analyse de composés de structure inconnue.

La fragmentation des dérivés perméthylés n'ayant pas été étudiée par ces auteurs, nous avons donc entrepris une étude systématique de ces dérivés en mode MALD/PSDMS.

Etude des oligosaccharides perméthylés en mode PSD

Les oligosaccharides perméthylés, analysés par désorption laser, forment des espèces moléculaires cationisées de type $[M+Na]^+$. Les contributions naturelles sous forme de $[M+K]^+$, régulièrement associées, peuvent être minimisées par dopage de la matrice avec des ions sodium. L'acquisition d'informations structurales en rapport avec la fragmentation des oligosaccharides analysés par cette technique implique le recours au mode PSD, dont le principe est présenté page 60.

Les spectres des deux isomères linéaires LNT et LNnT sont représentés à la figure 65. Ils montrent deux signaux intenses à m/z 463 et 487, correspondant respectivement aux ions Y_2+Na et B_2+Na . Ces ions sont générés par la rupture de la liaison glycosidique de l'unité N-acétylhexosaminique, comme nous avons pu le décrire antérieurement. La distinction des deux spectres est basée sur la présence de l'ion à m/z 709, Y_3 , dans le cas du LNnT-Me et de l'ion à m/z 690, identifié comme un fragment Z_3 , dont l'on peut supposer qu'il est caractéristique de la liaison glycosidique en 1-3. Ce type d'ion est habituellement observé dans les spectres CID à haute énergie et semble constituer une particularité de la fragmentation en MALDPSD/MS des oligosaccharides perméthylés. Le processus de fragmentation lui donnant naissance est illustré dans la figure 66. La confirmation d'une telle observation est obtenue par l'analyse des oligosaccharides de la série LNF.

Le composé LNF-1-Me donne naissance aux signaux à m/z 432, 463, 659 et 690, correspondant aux ions C_2+Na , Y_2+Na , B_3+Na et Z_3+Na (fig. 67a). La présence de l'ion Z_3 est

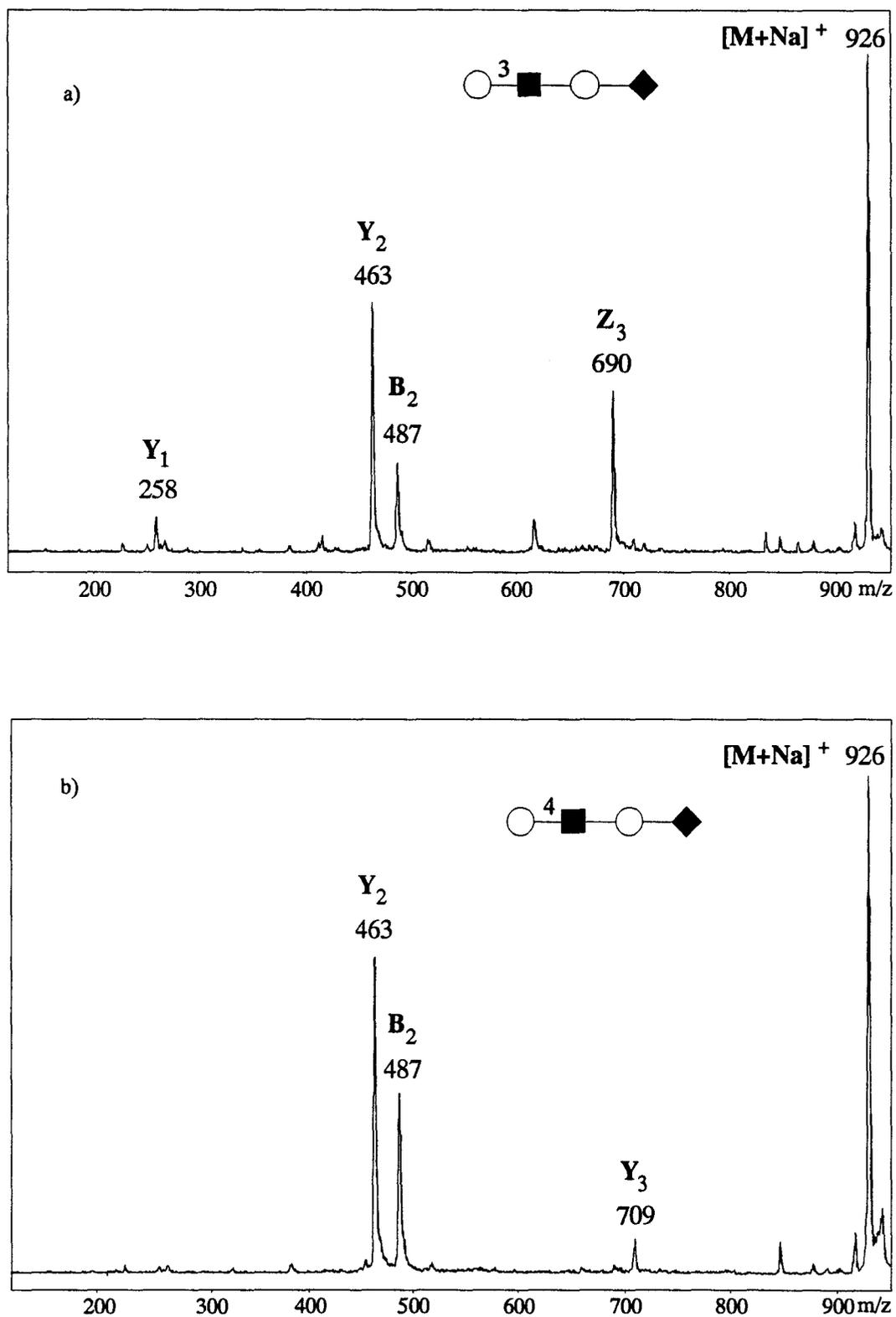


figure 65 – Spectres MALD/PSDMS des oligosaccharides perméthylés : LNT-Me (a)
LNnT-Me (b) Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 926

en accord avec l'élimination spécifique du motif dHex–Hex lié en position 3 du résidu de N-acétylhexosamine.

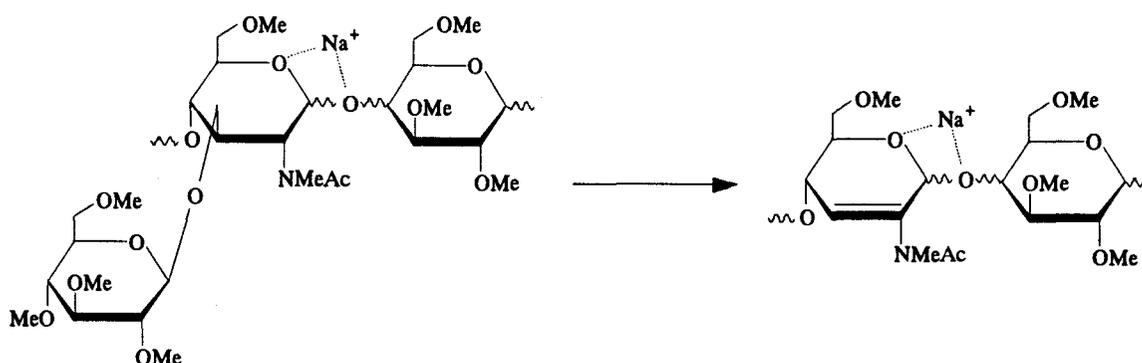


figure 66 – Formation des ions $Z+Na^+$

L'attribution de ces fragments est confirmée par l'analyse du même composé après marquage en position réductrice à l'oxygène 18 (fig. 67b). Les ions Y_2+Na et Z_3+Na montrent un déplacement de 2 uma, respectivement à m/z 465 et 692, démontrant ainsi qu'ils renferment l'extrémité terminale réductrice.

Les isomères ramifiés LNF-2-Me et LNF-3-Me donnent les spectres de la figure 68. Leurs empreintes sont très simples et comportent trois signaux principaux. Il s'agit des ions Y_2+Na et B_2+Na à m/z 463 et 660, ainsi que l'ion Z_3+Na . La masse de ce dernier est de 866 dans le cas du LNF-2-Me et de 896 dans le cas du LNF-3-Me, résultant respectivement de la perte des motifs Hex–OH–Me₄ et dHex–OH–Me₃. Il est ainsi possible d'identifier le substituant en position 3 du résidu de N-acétylhexosamine par analyse en mode PSD des espèces moléculaires sodées d'oligosaccharides perméthylés. La structure ramifiée de l'oligosaccharide perméthylé LNF-5-Me est, par ailleurs, caractérisée par deux signaux majeurs à m/z 637 ($Y_{2\alpha}$) et 864 ($Z_{3\alpha}$).

Les composés de type LNDFH perméthylés, dont l'espèce moléculaire $[M+Na]^+$ est observée à m/z 1274, sont analysés selon le même principe et donnent également des spectres relativement simples (fig. 69). Dans le cas du LNDFH-1-Me, les ions de basse masse à m/z 433 et 462, correspondant aux fragments C_2 et Y_2 , sont accompagnés de deux signaux à m/z 836 et 865 dus au fragment B_3 et à la perte du motif dHex–Hex–OH–Me₆ lié en position 3 de l'unité N-acétylhexosaminique. Le second isomère est caractérisé par les ions $Y_{2\alpha}$ à m/z 637

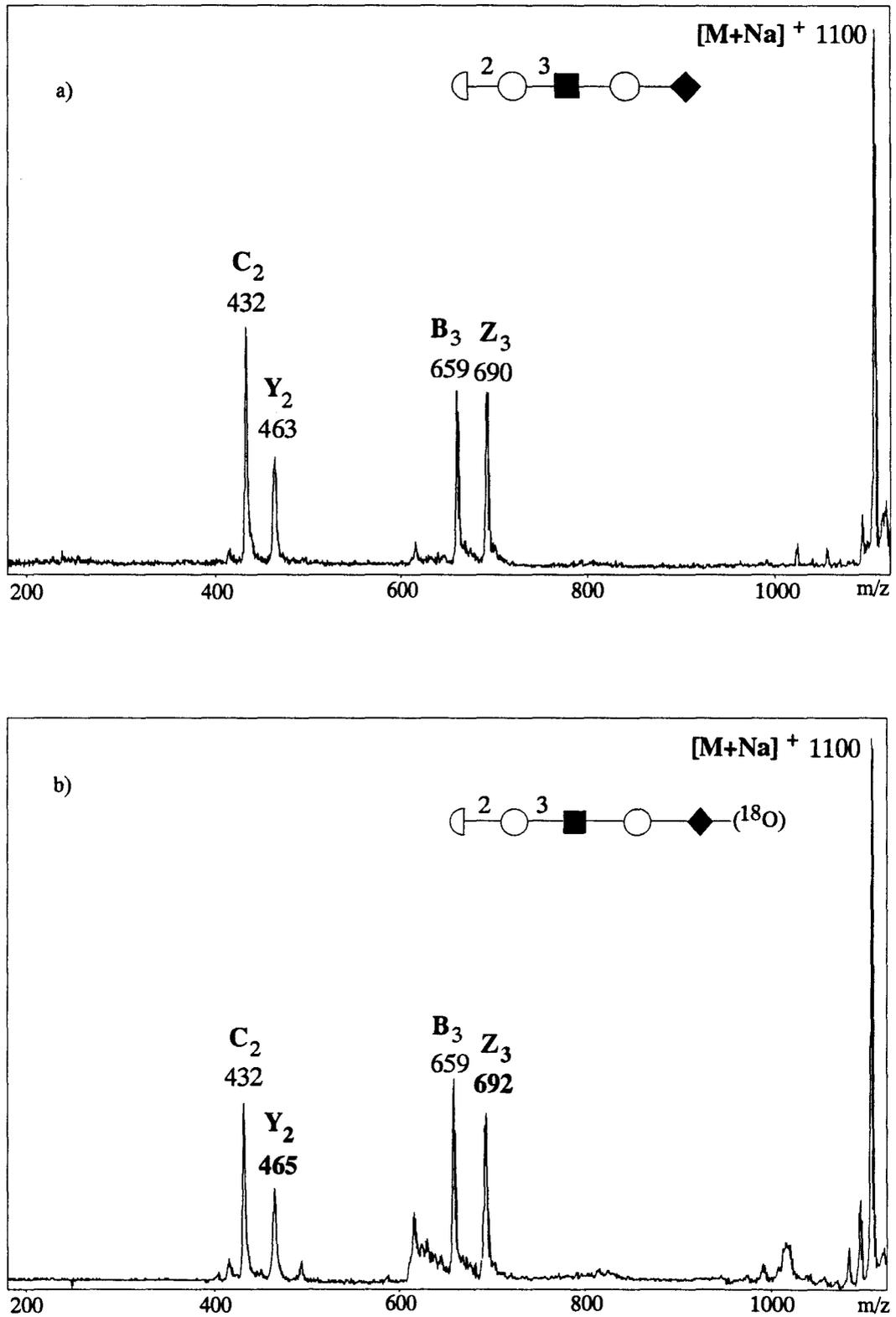


figure 67 – Spectres MALD/PSDMS des oligosaccharides perméthylés : LNF1-Me (a) Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 1100, LNF1- ^{18}O -Me (b) Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 1102

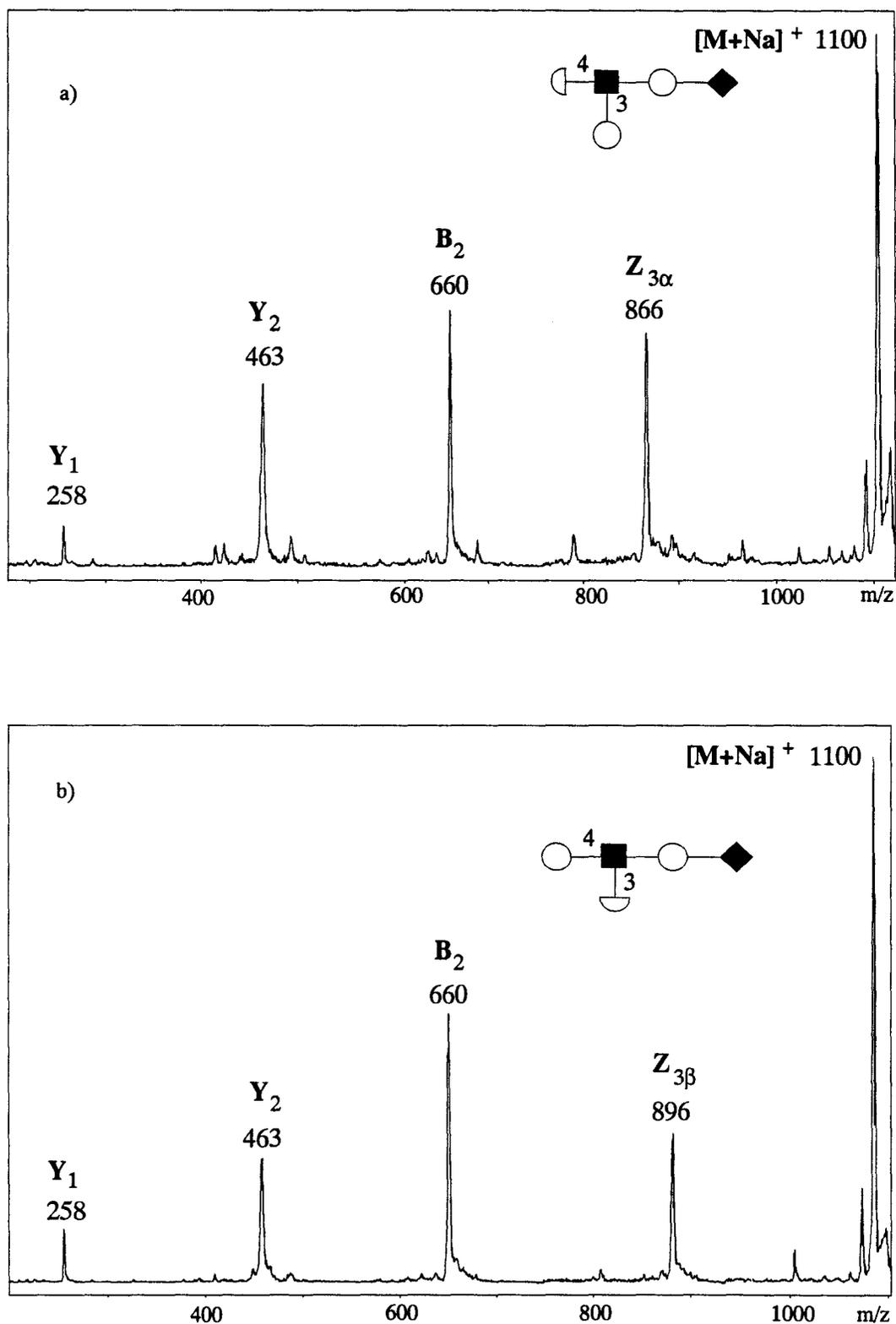


figure 68 – Spectres MALD/PSDMS des oligosaccharides perméthylés : LNF2-Me (a)
LNF3-Me (b) Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 1100

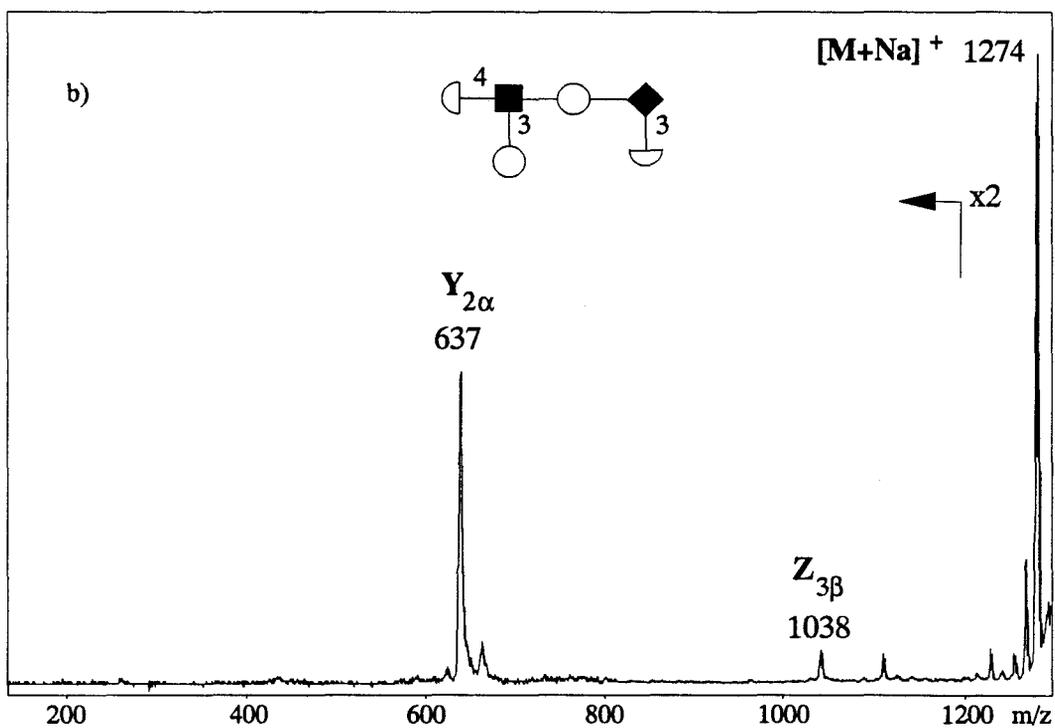
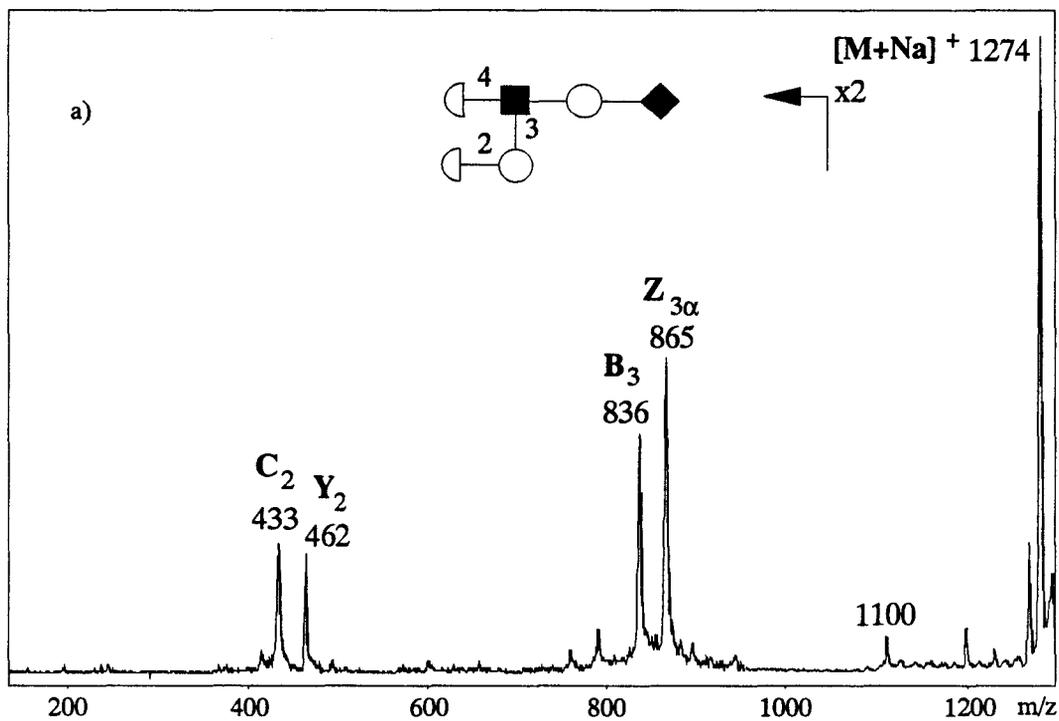


figure 69 – Spectres MALD/PSDMS des oligosaccharides perméthylés :
LNDHF1-Me (a) LNDHF2-Me (b) Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 1274

et $Z_{3\beta}$ à m/z 1038, obtenu par perte du résidu galactosyle tétraméthylé lié en position 3 (fig. 69b).

Comme nous pouvons l'observer dans tous les spectres présentés, le premier segment contient généralement des ions dont l'élucidation n'est pas possible. Ces fragments résultent vraisemblablement d'une décomposition de l'ion précurseur dans le réflecteur et ne peuvent dès lors être assignés correctement en fonction de la masse observée.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette série d'analyses met en évidence deux types de fragmentation pour les oligosaccharides perméthylés. La rupture préférentielle de la liaison glycosidique des résidus de N-acétylhexosamine donne lieu à la formation d'ions B ou Y ainsi qu'à la genèse de fragments de type Z, à basse énergie, par l'élimination du substituant glycosidique en position 3 de ces mêmes résidus. Ces informations sont concordantes avec celles obtenues par ESMS/MS. L'analyse dans les mêmes conditions des oligosaccharides dérivés LNF-1-2AB-NAC-Me et LNF-3-2AB-NAC-Me (fig. 70) amène à une conclusion analogue. Cependant, même si les fragments observés, complémentaires à ceux détectés pour les oligosaccharides dérivés par amination réductive ou par peracétylation, constituent une innovation quant à l'obtention d'informations structurales à partir d'espèces moléculaires cationisées, la somme de données collectées en PSD, pour les oligosaccharides perméthylés, demeure malgré tout assez fragmentaire ne permettant pas une élucidation structurale complète, en particulier dans le cas de composés inconnus.

2.4. Interprétation des spectres MS/MS assistée par ordinateur

Comme nous avons pu le démontrer au cours de ce chapitre, les spectres MS/MS obtenus pour des oligosaccharides dérivés par perméthylation, peracétylation, et dans une certaine mesure, par amination réductive, présentent des fragmentations prévisibles.

Afin de simplifier l'interprétation de ces spectres, et en particulier le calcul des fragments de type B et Y, pouvant se révéler relativement laborieux dans le cas de structures ramifiées, nous avons développé un programme informatique permettant le calcul des masses des fragments primaires de structures oligosaccharidiques, ainsi que la détermination des fragmentations secondaires caractéristiques des unités N-acétylhexosaminiques.

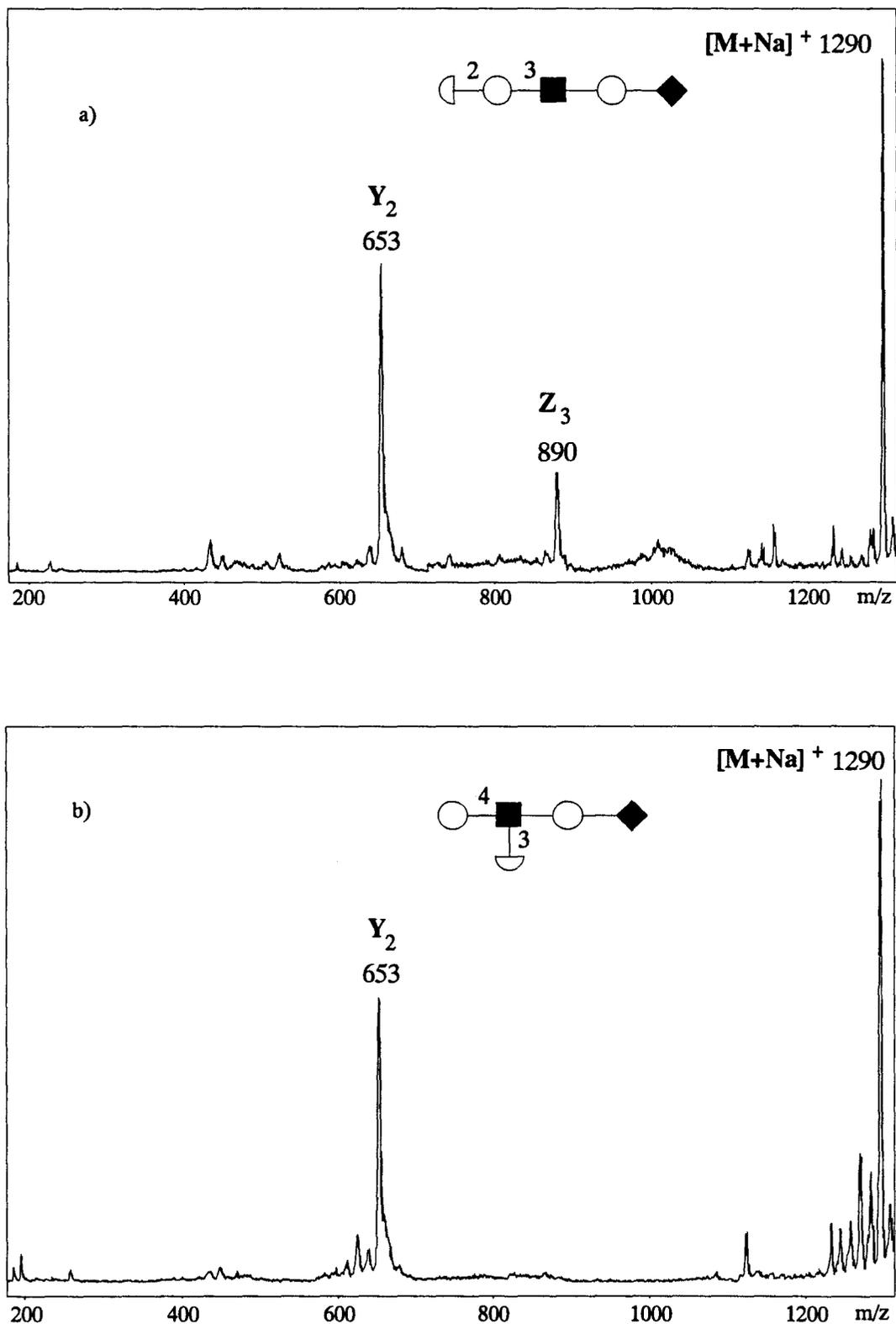


figure 70 – Spectres MALD/PSDMS des oligosaccharides dérivés et perméthylés :
LNF1-2AB-Nac-Me (a), LNF3-2AB-Nac-Me (b)
Ion précurseur $[M+Na]^+$ à m/z 1290

La figure 71 reproduit l'organigramme du programme intitulé OLIGO.BAS développé sous langage BASIC. Ce programme exploite une banque de données renfermant un certain nombre d'oligosaccharides, banque qui peut être complétée par l'utilisateur en fonction de ses besoins. Les résultats livrés par le programme sont exploitables selon différents supports, par affichage écran, par impression sur papier et sous forme de fichier ASCII réutilisable indépendamment du programme OLIGO.BAS.

Le programme principal se compose de 6 modules :

- MODULE 1 - Définition de la séquence de l'oligosaccharide étudié

Selon le choix de l'oligosaccharide étudié, proposé ou non par le programme, la séquence est stockée en mémoire et il y a donc relecture des données ou la nouvelle séquence est saisie manuellement et sauvée, le cas échéant, sur disque.

La séquence est définie par la nature des monosaccharides (désoxyhexose, hexose, N-acétylhexosamine, acide N-acétylneuraminique) et par leur degré de substitution (0 pour un ose en position terminale non réductrice, 1, 2 ou 3 pour un ose respectivement mono-, di- ou trisubstitué).

- MODULE 2 - Définition de l'extrémité terminale réductrice, calcul de la masse moléculaire de l'oligosaccharide natif

Ce module permet de choisir la nature de l'extrémité terminale réductrice parmi celles déjà enregistrées ou d'en définir une nouvelle grâce à sa formule brute (C, H, O, N). Les possibilités offertes par le programme concernent une extrémité terminale réductrice native (-OH), alkylée (-OMe, -ODMe, -OEt), acétylée (-OAc) ou dérivée par amination réductive (2-aminobenzamide ou aniline).

A partir de la séquence complète ainsi définie, le programme calcule la masse moléculaire de l'oligosaccharide natif.

- MODULE 3 - Dérivation et ionisation

Le choix est offert d'une dérivation de l'oligosaccharide défini par perméthylation, perdeutérométhylation, peréthylation ou peracétylation. Le programme propose, en

outre, deux modes d'ionisation, négative ou positive et pour cette dernière, le choix entre différents types d'ions ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$).

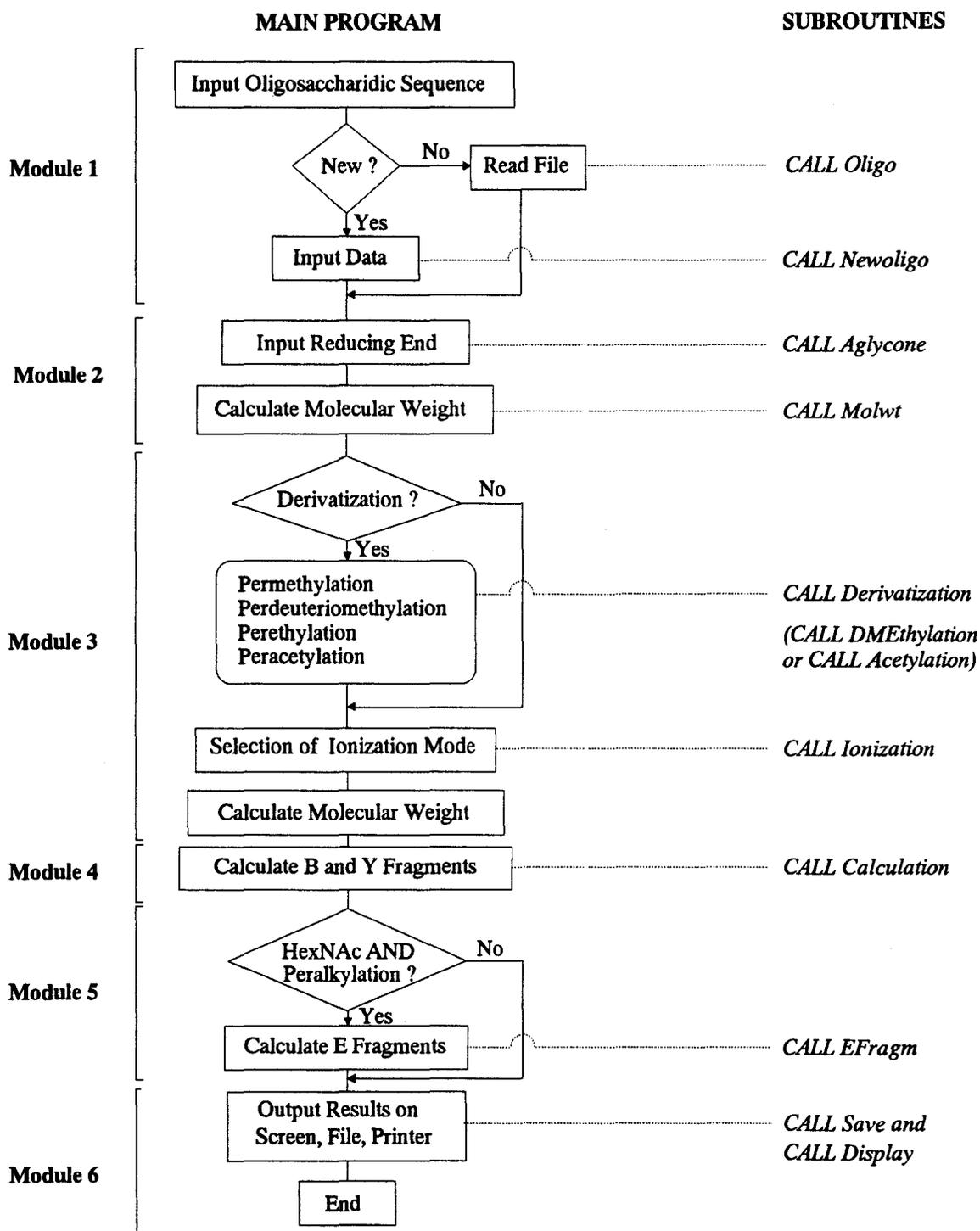


figure 71 – Organigramme du programme OLIGO.BAS

– MODULE 4 – Calcul de la masse des fragments B et Y

L'algorithme créé permet de calculer la masse des ions B et Y pour des oligosaccharides

tant linéaires que ramifiés. La nomenclature des chaînes et des ions reprend celle définie par Domon et Costello (1988).

– **MODULE 5** – *Calcul de la masse des fragments E*

Ce module réalise, dans le cas d'oligosaccharides dérivés par peralkylation et renfermant des résidus N-acétylhexosaminiques, le calcul des fragments de type E, spécifiques de ces monosaccharides. Ces fragments, comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, sont générés, à partir des ions B par élimination de leurs substituants en position 3.

– **MODULE 6** – *Présentation des résultats*

Les résultats obtenus à l'issue du module 4, et éventuellement du module 5, sont affichés sur l'écran et sauvegardés dans un fichier ASCII, fichier qui peut être importé dans un autre logiciel, tel un traitement de texte et réexploité à volonté. Ce module offre également la possibilité d'une impression papier des résultats.

Le bon fonctionnement des modules définis s'articule sur un certain nombre de sous-routines :

Sous-routines	Fonctions
Acetylation	<i>Peracétylation de l'oligosaccharide</i>
Aglycone	<i>Définition de la nature de l'aglycone</i>
Calculation	<i>Calcul des fragments B et Y</i>
Derivatization	<i>Dérivation</i>
Display	<i>Présentation des résultats à l'écran</i>
DMethylation	<i>Perméthylation, perdeutérométhylation ou peréthylation de l'oligosaccharide</i>
Efragm	<i>Calcul des fragments E des résidus HexNAc</i>
Ionization	<i>Choix du mode d'ionisation et du type d'ion</i>
Molwt	<i>Calcul de la masse moléculaire de l'oligosaccharide</i>

Newoligo	<i>Définition d'une nouvelle séquence oligosaccharidique</i>
Oligosac	<i>Chargement d'une séquence oligosaccharidique à partir du disque</i>
RecRef	<i>Sauvegarde d'une nouvelle séquence oligosaccharidique sur disque</i>
Save	<i>Sauvegarde des résultats sous fichier ASCII</i>

Le listing complet du programme est inclus en annexe 5.

A titre d'exemple, les résultats obtenus par impression papier sont présentés pour les deux oligosaccharides LNDFH-1 et LNDFH-2 perméthylés (fig. 72).

-- LNDFH_1 --

Sugar Sequence : dHex(0) Hex(1) dHex(0) HexNAc(2) Hex(1) Hex(1)

Aglycone: 18.01

Molecular mass: 999.36

Derivatization: PME

Ionization mode: POS

Molecular species: [M+H]⁺ m/z 1252.7

Frag B 1 Branch B 189.1 Frag Y 1 Branch B 1064.5

Frag B 2 Branch B 393.2 Frag Y 2 Branch B 860.4

Frag B 1 Branch A 189.1 Frag Y 1 Branch A 1064.5

Frag B 2 Branch A 812.4 Frag Y 2 Branch A 441.2

Frag B 3 Branch A 1016.5 Frag Y 3 Branch A 237.1

Frag B 4 Branch A 1220.6 Frag Y 4 Branch A 33.0

Frag B 2 Branch A 812.4 Frag E 2 780.4 or 606.3 or 402.2

Values refer to monoisotopic masses.

-- LNDFH_2 --			
Sugar Sequence : dHex(0) Hex(0) HexNAc(2) Hex(1) dHex(0) Hex(2)			
Aglycone: 18.01			
Molecular mass: 999.36			
Derivatization: PMe			
Ionization mode: POS			
Molecular species: [M+H] ⁺ m/z 1252.7			
Frag B 1 Branch C	219.1	Frag Y 1 Branch C	1034.5
Frag B 1 Branch B	189.1	Frag Y 1 Branch B	1064.5
Frag B 2 Branch A	638.3	Frag Y 2 Branch A	615.3
Frag B 3 Branch A	842.4	Frag Y 3 Branch A	411.2
Frag B 1 Branch A	189.1	Frag Y 1 Branch A	1064.5
Frag B 2 Branch A	1220.6	Frag Y 2 Branch A	33.0
Frag B 2 Branch A	638.3	Frag E 2	606.3 or 432.2 or 402.2
Values refer to monoisotopic masses.			

figure 72 – Résultats obtenus par le programme OLIGO.BAS pour la fragmentation des oligosaccharides perméthylés LNDFH-1 et LNDFH-2

2.5. Conclusion

Tout au long de l'étude que nous venons de présenter, nous avons pu démontrer le potentiel de la spectrométrie de masse en tandem utilisant les nouvelles techniques d'ionisation que sont l'électrospray et la désorption laser assistée par matrice, pour l'analyse structurale de glycanes dérivés. La limite de détection de ces techniques, de l'ordre de la picomole, en font des instruments particulièrement adaptés pour la caractérisation de glycanes disponibles en faible quantité, cas de plus en plus fréquent pour les échantillons d'origine biologique. Dans la stratégie choisie, le facteur limitant n'est pas la spectrométrie de masse en tant que telle, mais l'étape de dérivation. Les différentes méthodes considérées, au cours de ce travail, telles que l'amination réductive par la 2-aminobenzamide, la peracétylation et la perméthylation ont été appliquées à des quantités d'échantillon de l'ordre d'une nanomole. Bien que cet aspect n'ait pas fait l'objet d'un développement systématique, des analyses ponctuelles, effectuées en préliminaire, montrent que ces dérivations peuvent être réalisées sur des quantités de l'ordre de

la dizaine de picomoles.

Les analyses par spectrométrie de masse permettent, de façon générale, d'obtenir des informations à partir des espèces moléculaires, constituant une première caractérisation des glycanes. Toutefois, une étude structurale détaillée requiert la détermination d'un certain nombre de caractéristiques, comme nous l'avons précisé page 12, qui ne sont accessibles que par le recours à la spectrométrie de masse en tandem. Les analyses effectuées en mode électrospray, sur un appareil de type triple-quadrupôle, mettent en évidence le grand nombre d'informations obtenues, par collision (CID) des espèces moléculaires protonées.

Dans le cas des dérivés marqués à la 2-aminobenzamide, les fragments de type Y, renfermant l'extrémité terminale réductrice, permettent de caractériser la séquence des monosaccharides et la localisation des éventuels points de branchement. Pourtant, l'observation de fragments internes, non prévisibles, peut, dans le cas d'échantillons inconnus, compliquer, voire compromettre, la détermination de la séquence et conduire à des conclusions erronées. Afin de pallier à ce problème, nous avons eu recours à d'autres types de dérivation. Les dérivés peracétylés permettent de générer en électrospray des espèces moléculaires $[M+H]^+$, pour des oligosaccharides renfermant une ou plusieurs unités N-acétyl-hexosaminiques. Les spectres MS/MS qui en découlent, relativement simples, présentent principalement des fragments de type B, incluant l'extrémité terminale non réductrice. Il est possible, à partir de ces fragments, de déterminer de façon univoque la séquence osidique et la localisation de points de branchement. L'obtention de fragments secondaires, à partir des mêmes ions B issus de la rupture des liaisons glycosidiques des résidus HexNAc, permet le positionnement des substituants glycosidiques en 3 et 4 sur ces monosaccharides. Cette étude a également démontré que les dérivés peracétylés génèrent, en source, certains des fragments observés en MS/MS, fragments pouvant faire l'objet d'analyses en tandem. Cette approche novatrice est particulièrement intéressante, car elle permet, comme nous l'avons démontré à partir de quelques exemples significatifs, de caractériser indiscutablement la séquence de sous-unités issues d'oligosaccharides de structure plus complexe. Malgré tout, la peracétylation d'un glycanne provoque un important accroissement de la masse moléculaire, limitant ainsi son application aux hexasaccharides, en raison de la gamme de masse pouvant

être étudiée par MS/MS et qui est inférieure à 2000 Da.

Nous avons donc entrepris l'étude de dérivés perméthylés, de masse moléculaire comparativement inférieure, permettant d'étendre l'analyse, pour des espèces monochargées, à des oligosaccharides renfermant jusqu'à dix oses. Comme dans le cas des oligosaccharides peracétylés, les spectres de collision livrent la séquence des monosaccharides constitutifs, permettant ainsi l'identification des oses et la localisation des points de branchements. Les ions B formés préférentiellement par rupture de la liaison glycosidique des N-acétylhexosamines, subissent des fragmentations secondaires par l'élimination des substituants en position 3. L'existence de tels ions autorise la différenciation entre les glycanes de type I [Hex (1-3) HexNAc] et de type II [Hex (1-4) HexNAc]. Un certain nombre de ces ions sont, comme précédemment générés en source, et peuvent être sélectionnés pour des analyses de MS/MS. La détermination de structures partielles de glycanes complexes, à partir des spectres de références obtenus pour des témoins choisis, est ainsi possible.

Au cours de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'espèces dichargées dans le cas d'oligosaccharides sialylés perméthylés. Les informations déduites des fragmentations constatées sont en tout point concordantes avec celles obtenues à partir des espèces monochargées. Il est ainsi possible, pour ce type de composés, d'étendre la gamme de masse des oligosaccharides étudiés.

L'étude de composés successivement dérivés à la 2-aminobenzamide et perméthylés démontre que les spectres de fragmentation présentent de très grandes similitudes avec ceux des oligosaccharides perméthylés. Cet aspect de l'étude est crucial dans l'optique du développement d'une stratégie intégrée, comme nous le verrons ultérieurement.

L'analyse de la fragmentation des espèces moléculaires sodées générées par désorption laser assistée par matrice est possible en mode post-source decay (PSD). Une étude systématique des dérivés perméthylés montre ainsi que ces composés livrent des informations structurales pertinentes, notamment par la formation des ions B et Y, issus du clivage des liaisons glycosidiques des résidus de HexNAc. De surcroît, pour ces mêmes résidus, substitués en position 3, les espèces moléculaires $[M+Na]^+$ donnent lieu à l'élimination spécifique de ce substituant pour générer des fragments de type Z.

En dernier lieu, afin de permettre une interprétation plus rapide et moins laborieuse des spectres obtenus, nous avons développé un logiciel permettant de calculer les différents ions, mettant ainsi à profit l'existence des fragmentations prévisibles. Cet outil performant nous permet ainsi de réaliser une interprétation assistée par ordinateur.

L'ensemble des résultats décrits démontre les possibilités de la spectrométrie de masse en tandem dans l'analyse de glycanes dérivés, notamment par perméthylation, et illustre le potentiel de l'approche par MS/MS d'espèces moléculaires et de fragments générés en source pour l'analyse de glycanes complexes de structure inconnue.

3. DETERMINATION DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES PAR GC/MS/MS

3.1. Problématique

Nous avons démontré, dans le chapitre précédent, l'intérêt de l'analyse d'oligosaccharides perméthylés par spectrométrie de masse en tandem par ESMS/MS et par MALD/PSDMS. Ces techniques permettent l'élucidation de la séquence en monosaccharides des oligomères étudiés, ainsi que la localisation d'éventuels points de branchement. Toutefois, l'information concernant les liaisons glycosidiques entre ces monosaccharides reste partielle et limitée au cas particulier des N-acétylhexosamines. Nous avons donc développé le deuxième volet de notre stratégie afin d'acquérir cette information.

La détermination des liaisons interglycosidiques par la méthode des alditols acétates partiellement méthylés (PMAA) développée par Lindberg et coll. (Hellerqvist *et al.*, 1968; Björndal *et al.*, 1969) constitue un moyen privilégié d'établir le type de substitution des monosaccharides constitutifs d'oligo- ou de polysaccharides. Cependant, cette méthode a pour inconvénient majeur de nécessiter une importante collection de témoins chromatographiques. De tels échantillons n'étant pas disponibles commercialement, leur préparation peut s'avérer longue et laborieuse, et constituer, dès lors, un obstacle à l'utilisation de cette méthode en routine.

Pour pallier à ce problème, nous proposons une autre approche, simplifiée, car ne nécessitant qu'un nombre restreint de témoins chromatographiques, en tirant avantage du potentiel de la spectrométrie de masse en tandem. L'utilisation des appareils permettant de telles analyses (triple quadripôles, ion trap) s'étant généralisée au cours de la dernière décennie, cette technique est devenue accessible à un grand nombre d'utilisateurs.

Nous nous sommes ainsi intéressés à un nouveau type de dérivés monosaccharidiques, les éthylglycosides perméthylés et sélectivement deutérométhylés, que, pour des commodités d'écriture, nous appellerons PMDE (partially methylated deuteriomethylated ethylglycosides). Ces dérivés sont obtenus en remplaçant, dans la procédure de Lindberg, l'étape d'acétylation par une deutérométhylation. Ceci permet de diminuer le nombre de produits formés puisque,

formellement, tous les monosaccharides sont perméthylés, tout en conservant l'empreinte des liaisons glycosidiques par le marquage au deutérium.

3.2. Analyse des éthylglycosides perméthylés sélectivement deutérométhylés par GC

Les éthylglycosides perméthylés sélectivement deutérométhylés d'un oligosaccharide donné sont obtenus en réalisant tout d'abord une perméthylation de la chaîne glucidique (protocole page 210), suivie d'une éthanolyse (page 208), libérant les monosaccharides, et d'un marquage spécifique des hydroxyles libres par deutérométhylation. Le marquage spécifique de l'hydroxyle en position 1 par un résidu éthyl permet de distinguer l'élimination d'alcool à partir de cette position des éliminations compétitives issues des autres substitutions, et par delà, de discerner les différentes voies de fragmentation.

Le principe de l'approche ainsi développée est repris dans la figure 73.

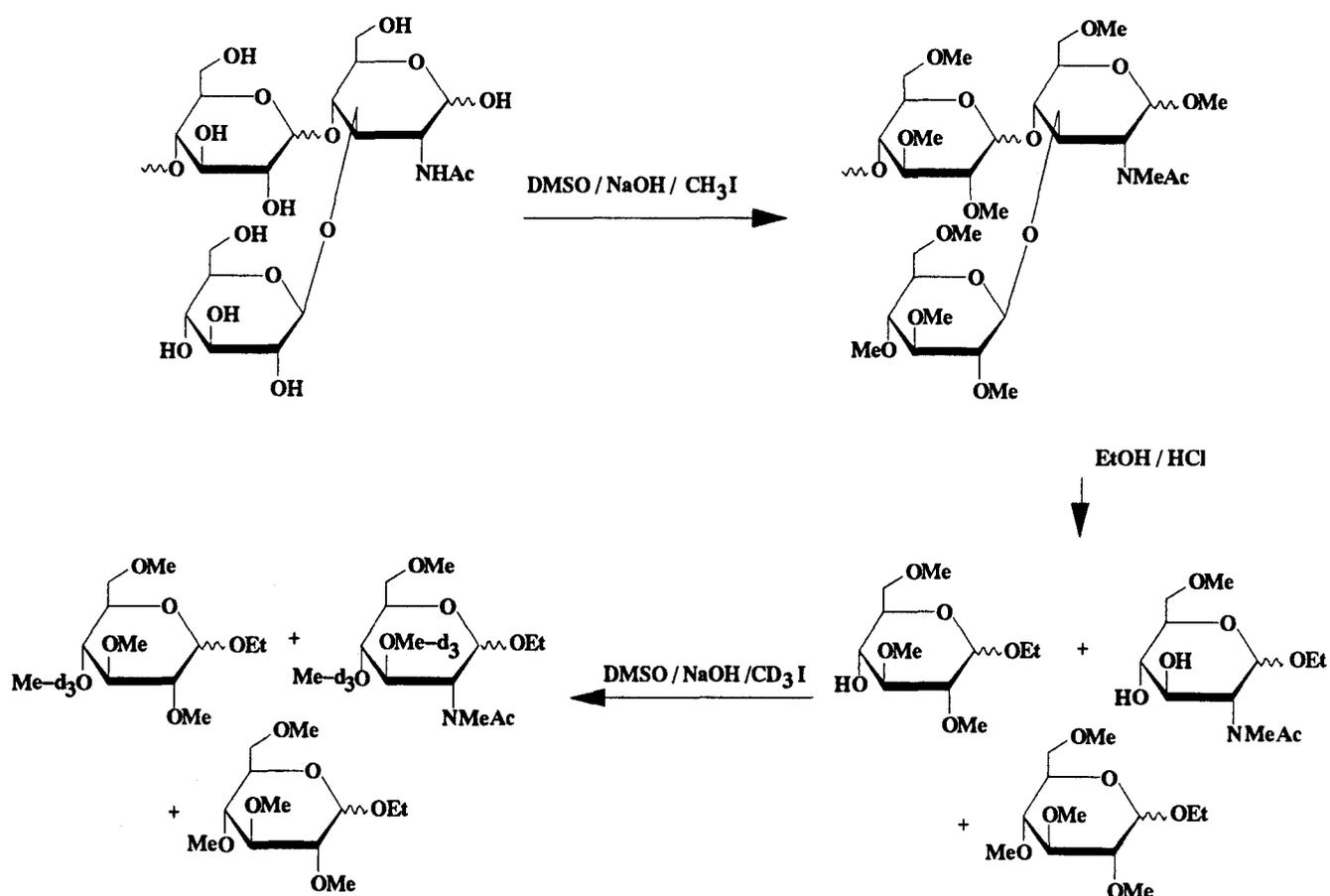


figure 73 – Préparation des éthylglycosides perméthylés sélectivement deutérométhylés

Les PMDE obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (conditions page 212). Le profil chromatographique apparaît simple, dans le sens où l'on ne détecte que des oses perméthylés, que les dérivés soient ou non porteurs de marqueurs CD₃. Il subsiste, cependant, du moins en théorie, pour chaque monosaccharide donné, quatre pics, comme dans le cas de n'importe quel glycoside, du fait de l'anomérisation α/β et de l'isomérisation pyranne/furanne.

3.3. Fragmentation des éthylglycosides perméthylés sélectivement deutérométhylés

Après séparation par chromatographie en phase gazeuse, les PMDE ont été étudiés par spectrométrie de masse en ionisation par impact électronique.

Le spectre de l'éthylmannoside perméthylé en EI, mesuré à une énergie d'ionisation standard de 70 eV, montre l'absence de l'ion moléculaire M^{+•} et une fragmentation importante, ce qui est en concordance avec les données de Radford et DeJongh (1972). L'objectif de notre étude est la détermination du degré de substitution des oses sur la base de la masse moléculaire de leurs dérivés PMDE ainsi que la différenciation du type de substitution dans le cas des espèces isomériques, par spectrométrie de masse en tandem. Il est donc impératif de préserver l'intégrité des espèces moléculaires. Pour ce faire, l'analyse a été répétée à une énergie d'ionisation plus faible, 20 eV, réduisant ainsi l'énergie interne des ions formés, et donc, leurs potentialités de fragmentation. Même dans ces conditions, il n'est cependant pas possible d'obtenir un ion moléculaire, ou un fragment issu de celui-ci, conservant l'intégrité de la stéréochimie, avec une intensité satisfaisante.

Afin de solutionner ce problème, l'éthylmannoside perméthylé a été analysé par ionisation chimique, technique d'ionisation préservant mieux l'intégrité des espèces moléculaires. Différents gaz réactants ont été utilisés : l'isobutane, le méthane, ainsi que le mélange méthane/hémioxyde d'azote 3:1. Un éthylglycoside, lorsqu'il est introduit dans un plasma, va réagir avec les ions C₄H₉⁺ (cas de l'isobutane) ou CH₅⁺ (cas du méthane), pour former une espèce moléculaire protonée de type [M+H]⁺ (fig. 74). L'excès d'énergie contrôlé, apporté lors de l'ionisation, et qui correspond à la différence d'affinité protonique entre le substrat et le gaz réactant, induit une fragmentation spontanée de l'espèce moléculaire. Dans le

cas présent, celle-ci élimine une molécule d'éthanol pour donner naissance à l'ion oxonium, dénommé B_1 . La formation de cet ion apparaît favorisée, de par sa forte intensité, en raison de la stabilisation par résonance de la paire libre de l'atome d'oxygène du cycle glycosidique. Il constitue dès lors un fragment idéal pour une analyse par spectrométrie de masse en tandem.

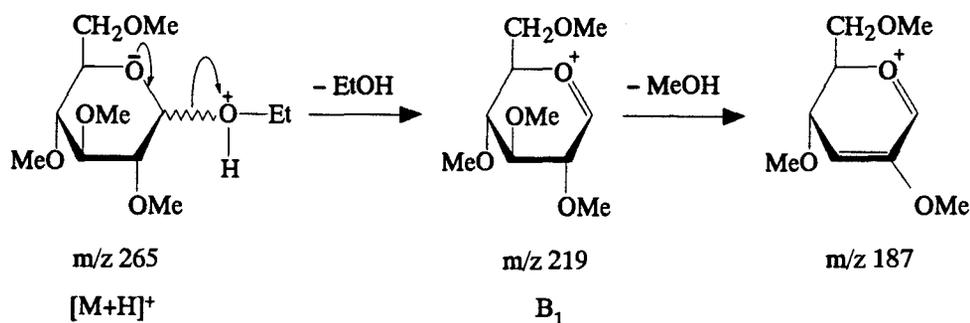


figure 74 – Ionisation et fragmentation en source des éthylhexopyranosides perméthylés

Le spectre obtenu dans l'isobutane (fig. 75a) donne un signal principal à m/z 219, correspondant à l'ion B_1 . Ce dernier peut donner lieu à une élimination secondaire de méthanol et former l'ion à m/z 187. Un spectre de masse similaire est obtenu dans le cas du méthane (fig. 75b). Le mélange méthane/hémioxyde d'azote, utilisé également en routine dans le laboratoire, a été testé (fig. 75c). La fragmentation est, dans ce cas, un peu plus importante, notamment en ce qui concerne l'intensité de l'ion à m/z 187.

L'ionisation chimique paraît, par conséquent, être un mode d'ionisation particulièrement adapté pour des analyses en MS/MS, dans la mesure où l'intégrité stéréochimique des ions oxoniums, issus des espèces moléculaires, est préservée, à l'exception, toutefois, de la configuration anomérique.

Une série d'expériences préliminaires a été effectuée sur le dérivé PMDE du glucopyranose, sélectivement deutérométhylé en position 2, 3, 4 ou 6, en utilisant l'isobutane ou le mélange méthane/hémioxyde d'azote comme gaz réactant. Les spectres MS/MS des ions à m/z 222, masse correspondant à l'ion oxonium d'un hexose perméthylé (m/z 219) porteur d'un motif CD_3 , ne sont pas affectés par la nature du gaz réactant choisi. En conséquence et pour la suite de ce travail, le mélange méthane/hémioxyde d'azote est utilisé comme gaz réactant.

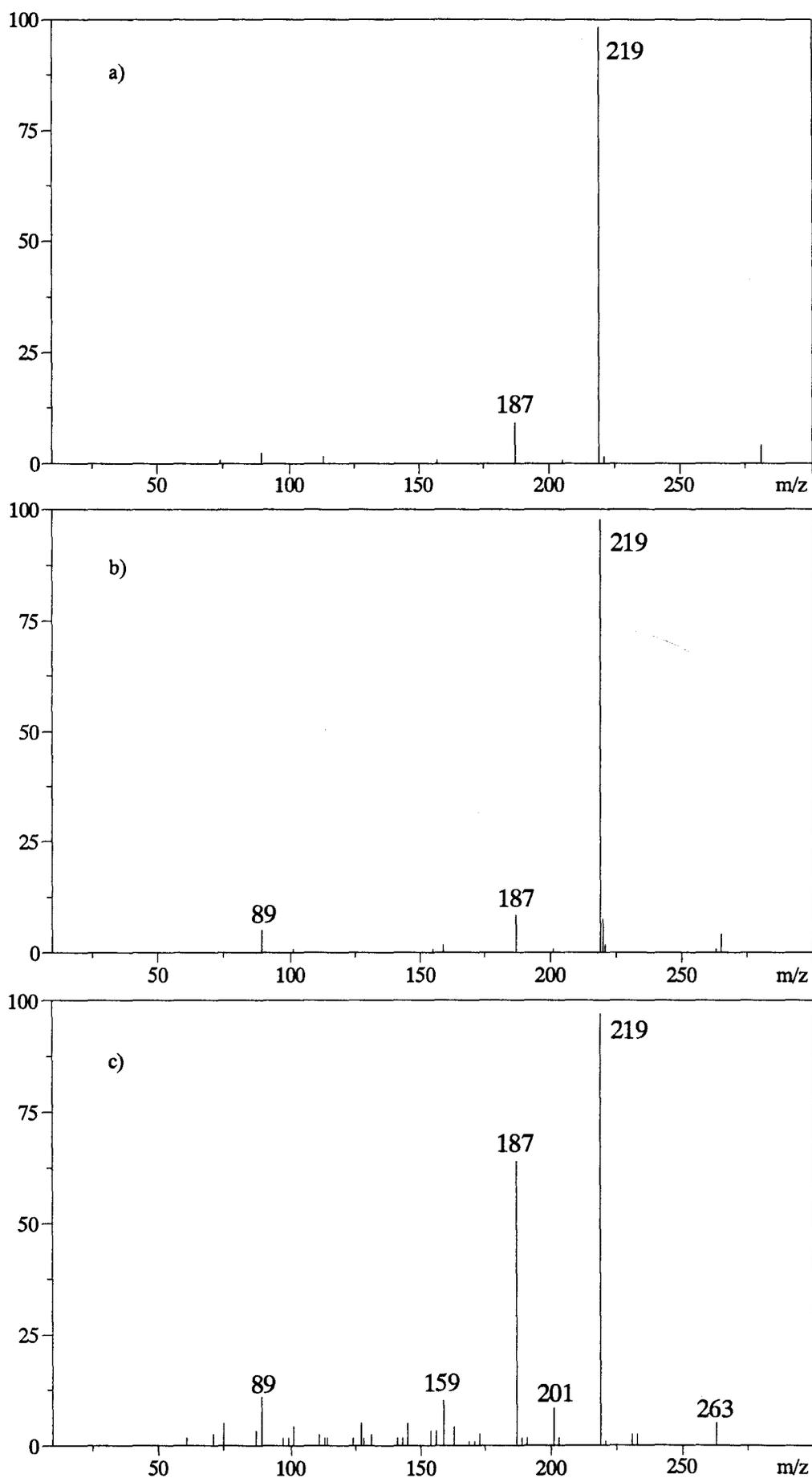


figure 75 – Spectres de masse en ionisation chimique de l'éthylmannoside perméthylé utilisant différents gaz réactants : isobutane (a), méthane (b), méthane / hémioxyde d'azote (c)

Dans une étude antérieure (Domon *et al.*, 1996), les auteurs ont démontré que la spectrométrie de masse en tandem des ions oxoniums B_1 permettait la distinction des différents isomères de position de résidus hexosyles. Les spectres MS/MS de l'ion à m/z 222 des PMDE du mannose, sélectivement deutérométhylés en position 2, 3, 4 ou 6, sont représentés dans la figure 76. Il est possible de différencier la position en 3 ou en 4 du substituant CD_3 des positions en 2 et en 6. Cette différenciation est principalement axée sur les rapports des intensités d'ions marqueurs significatifs, en l'occurrence, les couples d'ions à m/z 187 et 190, d'une part, et m/z 111 et 114, d'autre part. La différence de +3, constatée entre les rapports m/z au sein de chaque couple d'ions, est fonction de la présence d'un motif CD_3 en lieu et place d'un substituant CH_3 . L'examen de ces seuls spectres ne permet toutefois pas de distinguer les PMDE marqués en 2 et en 6. Dans ce but, une expérience complémentaire est réalisée, dans laquelle les ions à m/z 190 des différents isomères, générés en source, sont activés par collision pour donner les spectres MS/MS de la figure 77. Comme précédemment, les spectres des PMDE deutérométhylés en 3 ou en 4 présentent des empreintes différentes, mais surtout, il est possible de distinguer sans équivoque les PMDE marqués en 2 ou en 6 en fonction de l'intensité des ions à m/z 111 et 114.

La spectrométrie de masse en tandem utilisant l'ionisation chimique (CIMS/MS) permet ainsi d'élucider le type de liaison de résidus hexosyles monosubstitués par le biais de leurs dérivés PMDE, grâce à la fragmentation de leurs ions oxoniums B_1 et des ions B_1 -MeOH.

L'analyse des dérivés PMDE sélectivement deutérés dans les différentes positions permet en outre de localiser la provenance de la molécule de méthanol éliminée lors de la formation de l'ion B_1 -MeOH et de quantifier la proportion des différentes voies d'élimination (fig. 78). Il est à noter que celles-ci diffèrent notablement des résultats observés antérieurement en impact électronique (Kochetkov *et al.*, 1963).

Le processus de fragmentation conduisant aux ions m/z 111 et 114 apparaît plus complexe, un fragment de masse 76 est éliminé et les différents marquages ont montré qu'il renfermait les groupements méthoxy des positions 2 et 6. Une hypothèse de mécanisme, tenant compte de ces observations, est proposée dans la figure 79.

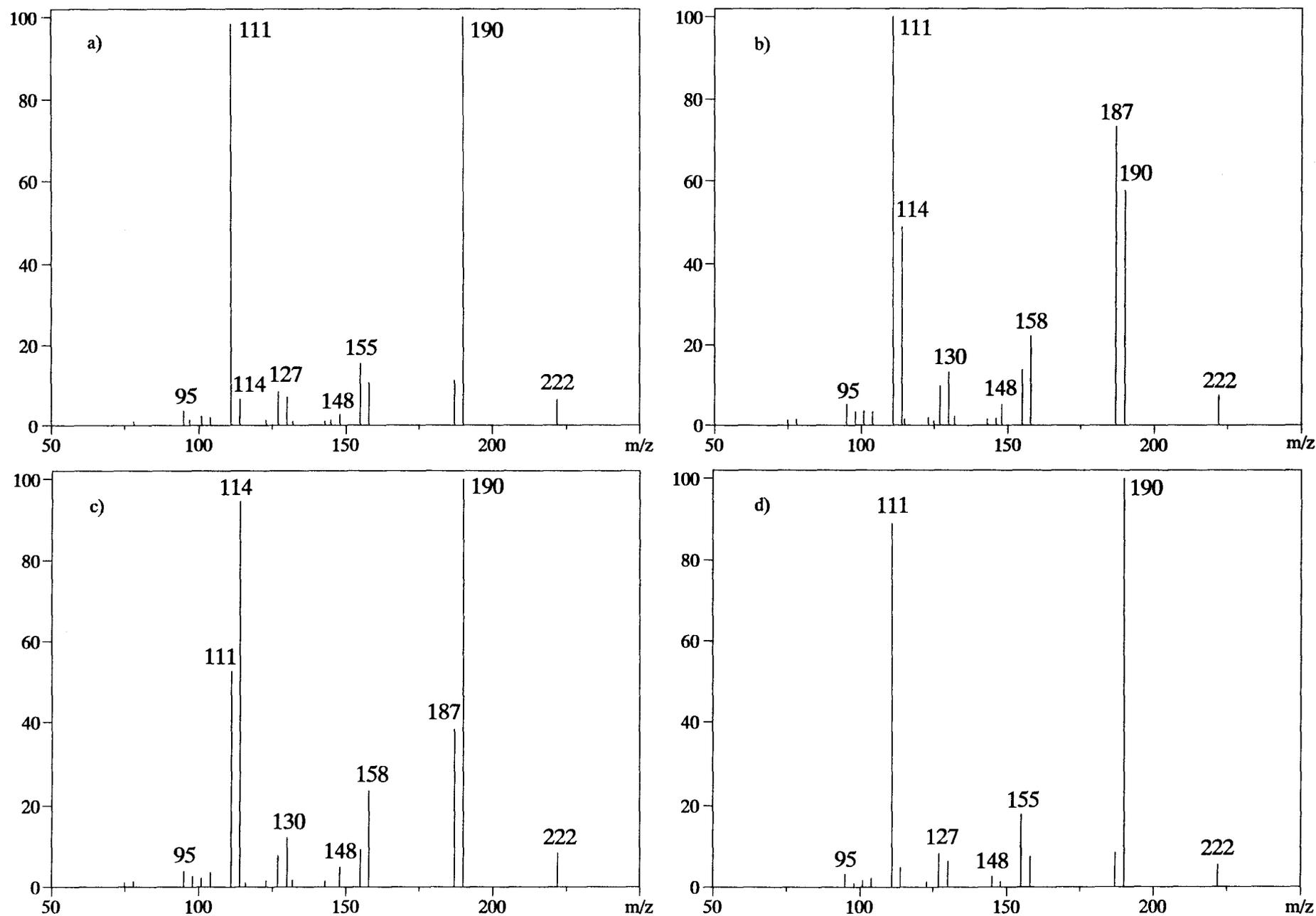


figure 76 - Spectres CIMS/MS des ions B des dérivés PMDE du mannose (a) Man-2CD₃, (b) Man-3CD₃, (c) Man-4CD₃, (d) Man-6CD₃

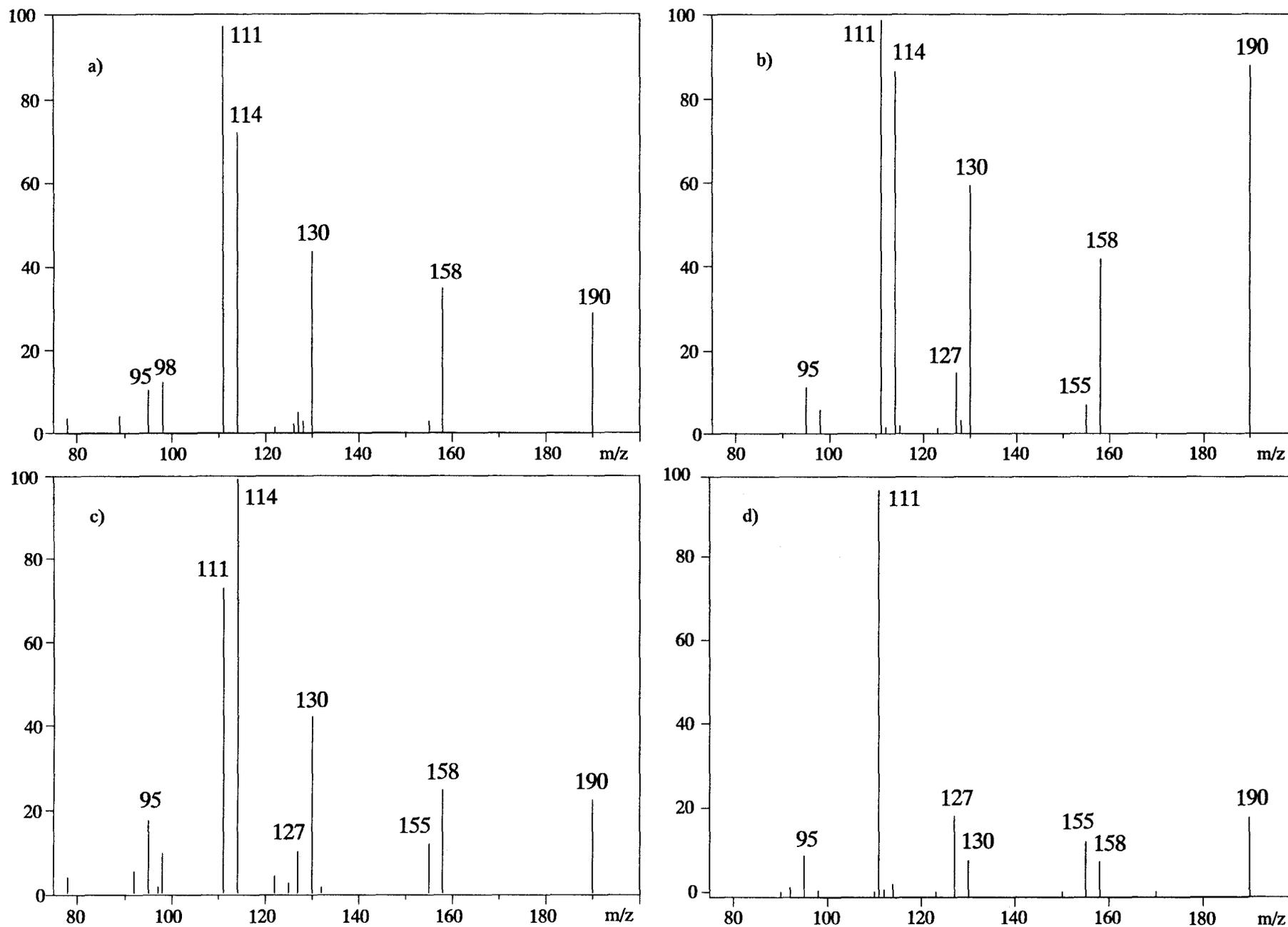


figure 77 - Spectres CIMS/MS des ions à m/z 190 des dérivés PMDE du mannose (a) Man-2CD₃, (b) Man-3CD₃, (c) Man-4CD₃, (d) Man-6CD₃

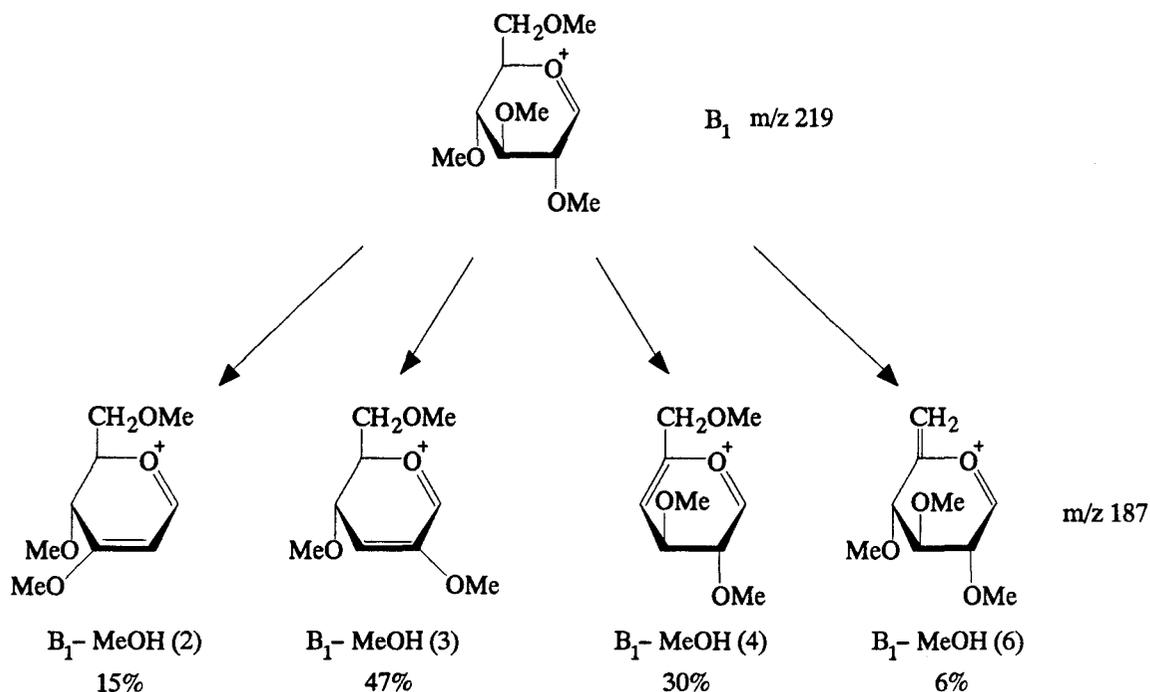


figure 78 – Proportions des différents fragments obtenus par élimination d'une molécule de méthanol à partir de l'ion B_1 . Pour la clarté du schéma, seules les formes pyranosidiques ont été représentées.

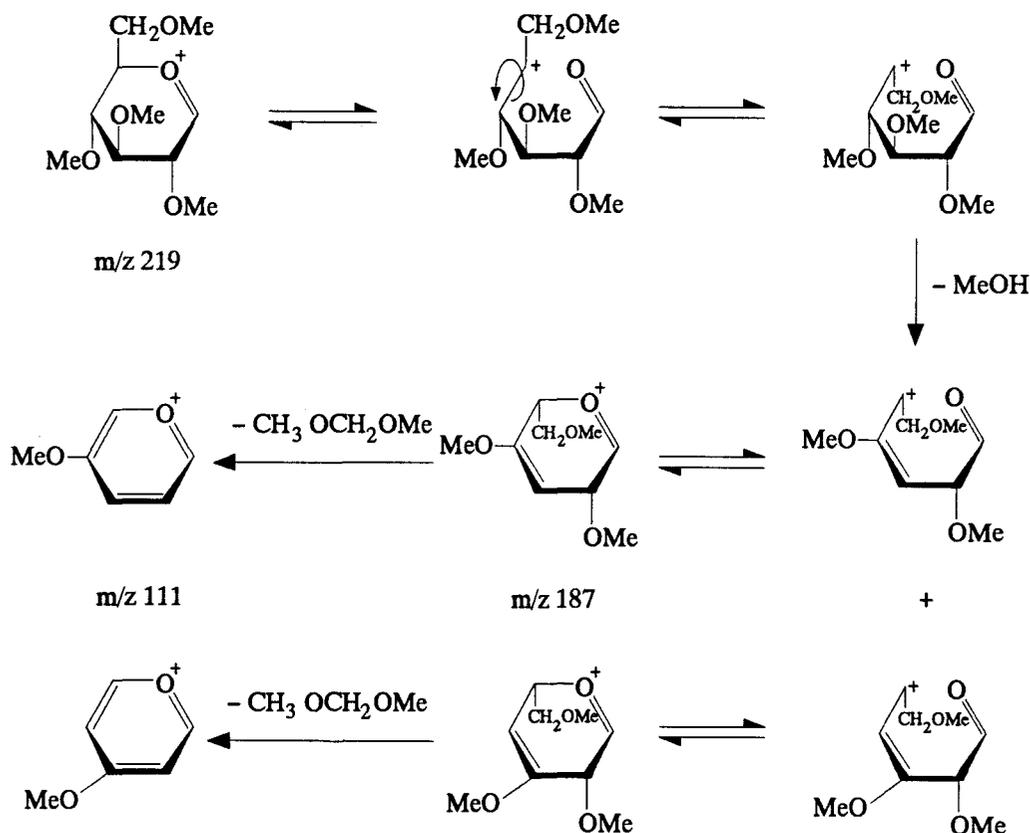


figure 79 – Mécanisme proposé pour la formation de l'ion m/z 111

L'étude détaillée des différents mécanismes de fragmentation dépasse le cadre de ce travail, car elle requiert des dérivés deutérés tant au niveau des groupements méthyles que des hydrogènes du squelette glycosidique. Nous nous limiterons donc ici à la formulation d'hypothèses de mécanismes.

L'analyse par GC/MS des éthylgalactosides perméthylés a mis en évidence l'existence d'une proportion non négligeable de dérivés furannosidiques. Ce type de dérivé donne lieu à des spectres de masse en MS/MS différents de ceux observés dans le cas de dérivés pyrannosidiques discutés jusqu'à présent, notamment caractérisés par l'absence de l'ion à m/z 111 et la proportion dominante de fragments à m/z 155 et 127. Les deux processus générant les fragments observés sont présentés de façon synthétique dans la figure 80.

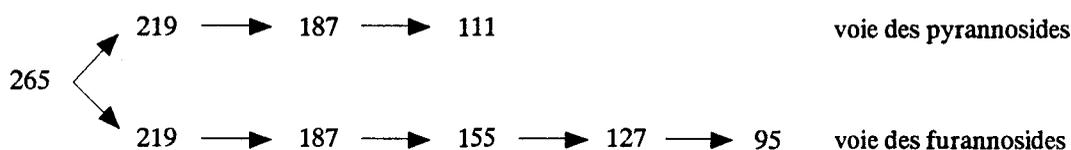


figure 80 – Processus de fragmentation des voies pyrannosidique et furannosidique

Cependant, les processus ne sont pas indépendants les uns des autres, car l'on peut constater que les fragments caractéristiques des dérivés furannosidiques, à m/z 155, 127 et 95, sont également présents dans les spectres des dérivés pyrannosidiques. Ceci nous amène donc à conclure que les dérivés pyrannosidiques subissent une isomérisation partielle dans la source. Celle-ci peut être expliquée par une protonation de l'atome d'oxygène acétalique du cycle, provoquant une ouverture de ce dernier suivie par une migration du groupement méthoxy de la position 4 à la position 5, pour finalement donner lieu à une recyclisation (fig. 81).

Dans leur étude, Domon *et al.* (1996) ont également démontré que la nature de l'hexose, glucose, galactose ou mannose, n'affectait pratiquement pas les caractéristiques du spectre MS/MS. Ces résultats sont présentés de façon succincte dans le tableau 11. Une série d'expériences complémentaires a par ailleurs été menée pour laquelle la séquence permettant la préparation des dérivés est deutérométhylation, éthanolyse et méthylation. Les résultats obtenus sont figurent dans le tableau 12. L'absence d'influence sur l'empreinte des spectres, de la stéréochimie du dérivé glycosidique considéré, contraste avec des résultats obtenus

tableau 11 – Intensités relatives des ions à m/z 111/114 et m/z 187/190 des dérivés PMDE du glucopyrannose, du galactopyrannose et du mannopyrannose

Monosubstitution	Intensités relatives	
	m/z 111/114	m/z 187/190
Glc – 2	93 : 7	14 : 86
Glc – 3	67 : 33	46 : 54
Glc – 4	38 : 62	30 : 70
Glc – 6	96 : 4	9 : 91
Gal – 2	84 : 16	4 : 96
Gal – 3	72 : 28	55 : 45
Gal – 4	43 : 57	29 : 71
Gal – 6	91 : 9	10 : 90
Man – 2	94 : 6	10 : 90
Man – 3	66 : 34	56 : 44
Man – 4	36 : 64	28 : 72
Man – 6	95 : 5	8 : 92

tableau 12 – Intensités relatives des ions à m/z 111/114 et m/z 193/196 des dérivés complémentaires (deutérométhylation, éthanolyse, méthylation) des PMDE du glucopyrannose, du galactopyrannose et du mannopyrannose

Position du groupement CH ₃	Intensités relatives	
	m/z 111/114	m/z 187/190
Glc – 2	7 : 93	83 : 17
Glc – 3	30 : 70	57 : 43
Glc – 4	54 : 46	73 : 27
Glc – 6	7 : 93	83 : 17
Gal – 2	2 : 98	97 : 3
Gal – 3	21 : 79	40 : 60
Gal – 4	52 : 48	76 : 24
Gal – 6	5 : 95	94 : 6
Man – 2	5 : 95	90 : 10
Man – 3	30 : 70	49 : 51
Man – 4	55 : 45	69 : 31
Man – 6	3 : 97	92 : 8

antérieurement avec des dérivés peracétylés (Richter *et al.*, 1990), mais est en accord avec les mécanismes de fragmentation proposés ci-dessus. En effet, ceux-ci impliquent des intermédiaires acycliques permettant la rotation libre autour des liaisons C-C et, par conséquent, favorisent certaines réactions d'élimination, indépendamment de la stéréochimie du composé initial.

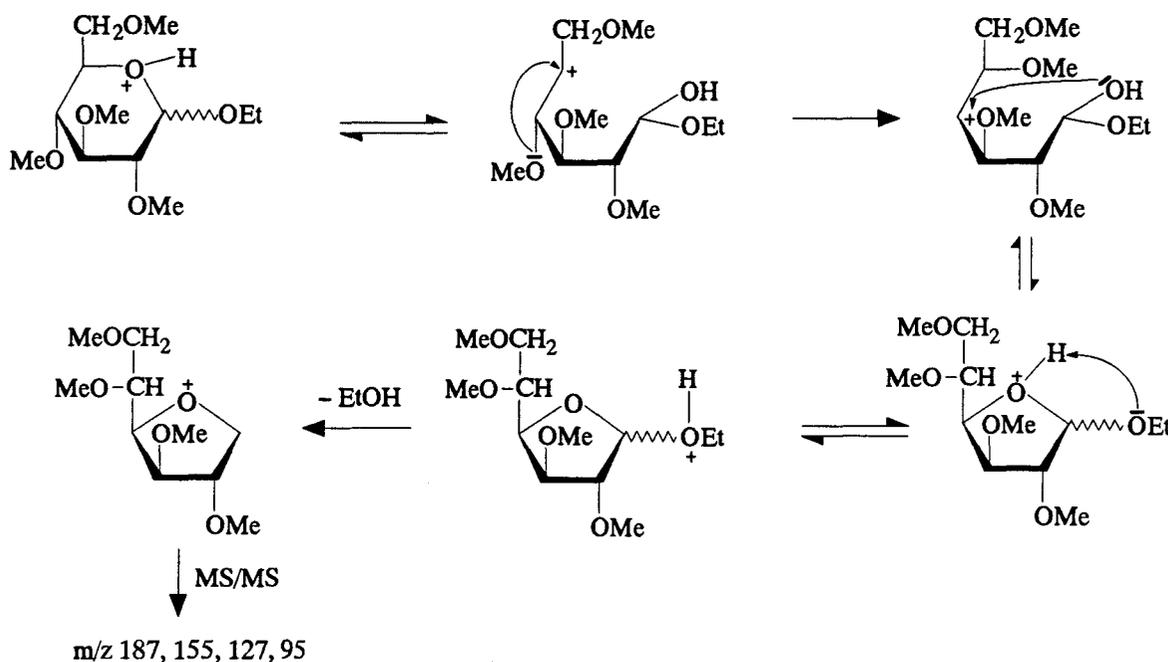


figure 81 – Mécanisme proposé pour l'isomérisation pyranne/furanne en source des dérivés PMDE

Notre travail a pour objet, non seulement d'appliquer la méthode précédemment décrite aux hexoses constitutifs de glycanes issus de glycoconjugués, mais également de l'étendre aux autres types de monosaccharides, en particulier aux N-acétylhexosamines.

Le spectre CI du dérivé PMDE de la N-acétylglucosamine est présenté dans la figure 82. La présence de la fonction amide favorise la protonation de ce résidu, dont l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ est détectée sous forme d'un signal intense à m/z 309. L'élimination d'éthanol donne naissance à l'ion B_1 , à m/z 263, pouvant, à son tour, éliminer une molécule de méthanol, pour générer l'ion à m/z 231. La figure 83 reproduit les spectres MS/MS des dérivés PMDE à m/z 263 de trois résidus de N-acétylhexosamine sélectivement deutérométhylés en position 3, 4 ou 6. Comme dans le cas des hexoses, la distinction entre les différents isomères

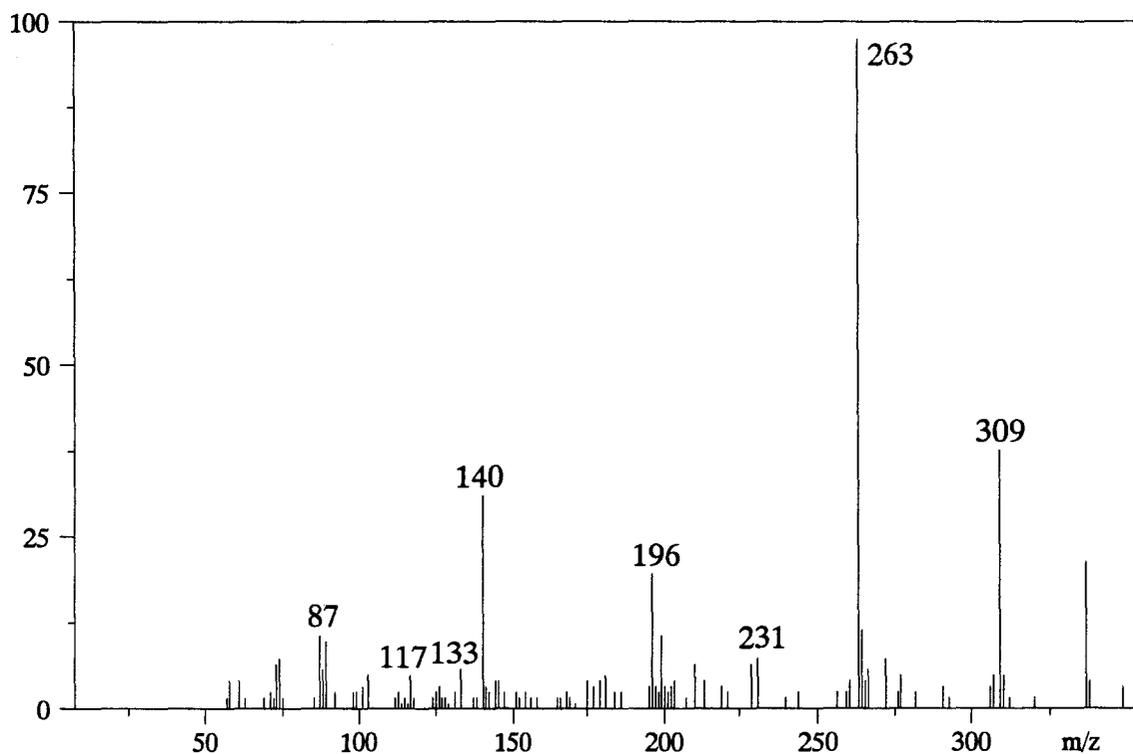


figure 82 – Spectre CIMS du dérivé PMDE deutérométhylé en 3 de la N-acétylglucosamine

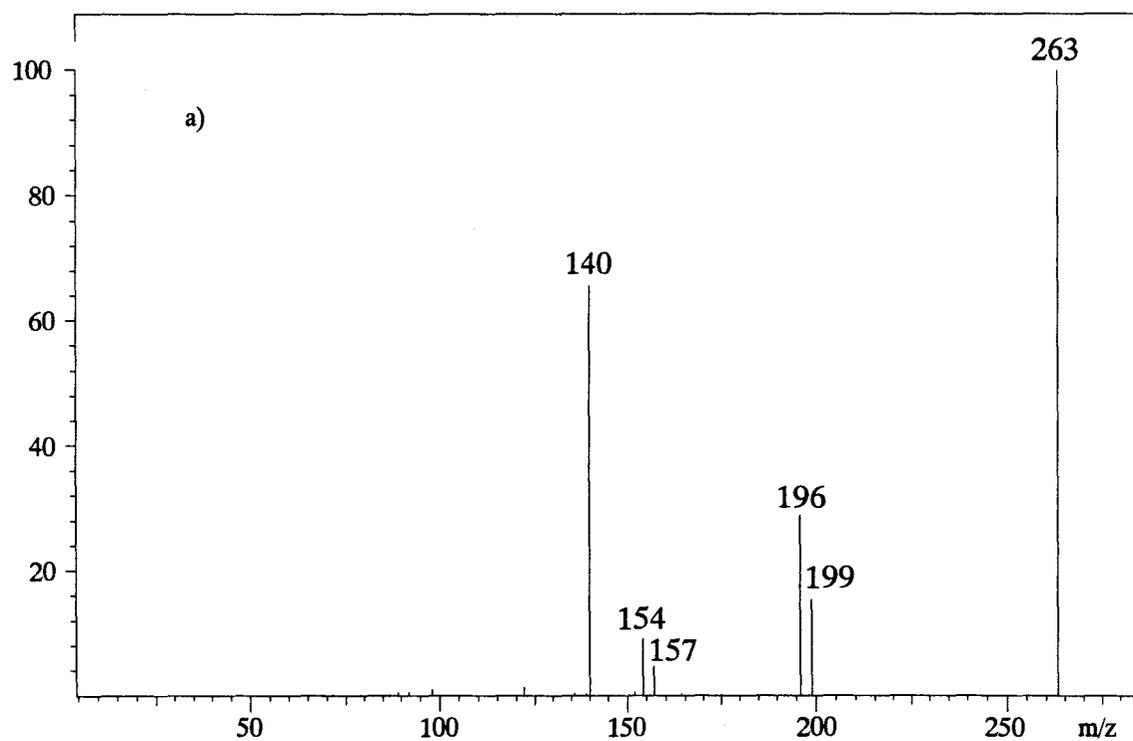


figure 83 – Spectres CIMS/MS des ions B à m/z 263 des dérivés PMDE des N-acétylhexosamines : (a) HexNAc-3-CD₃

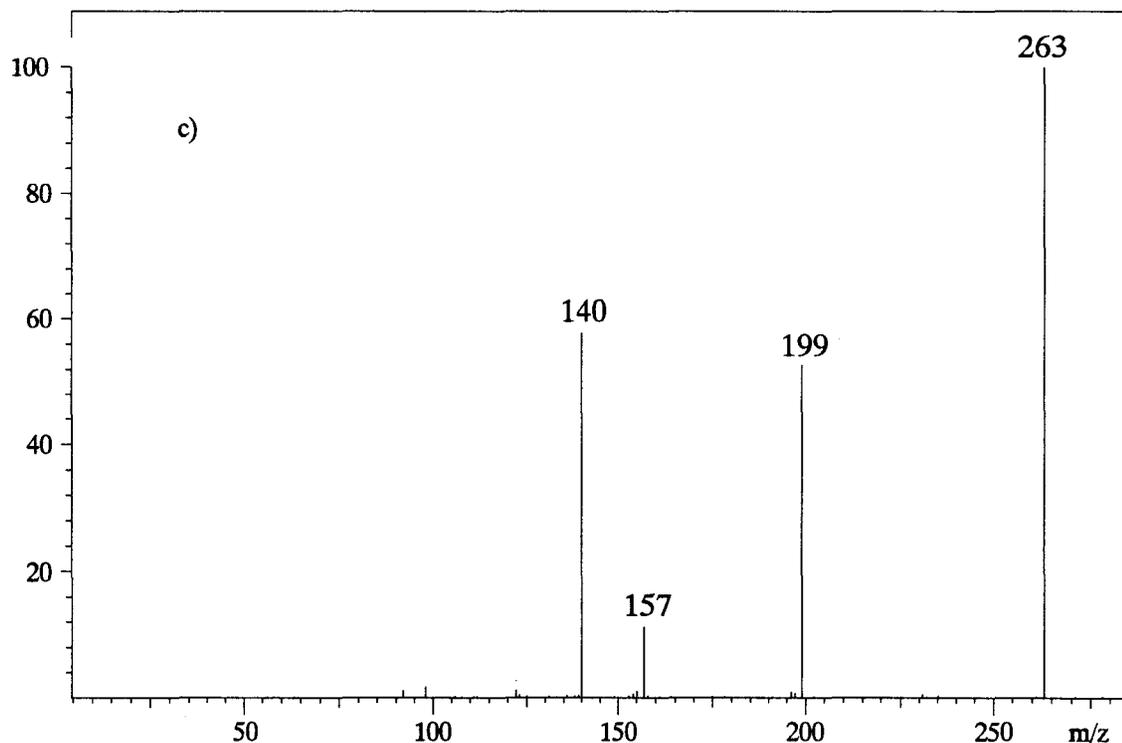
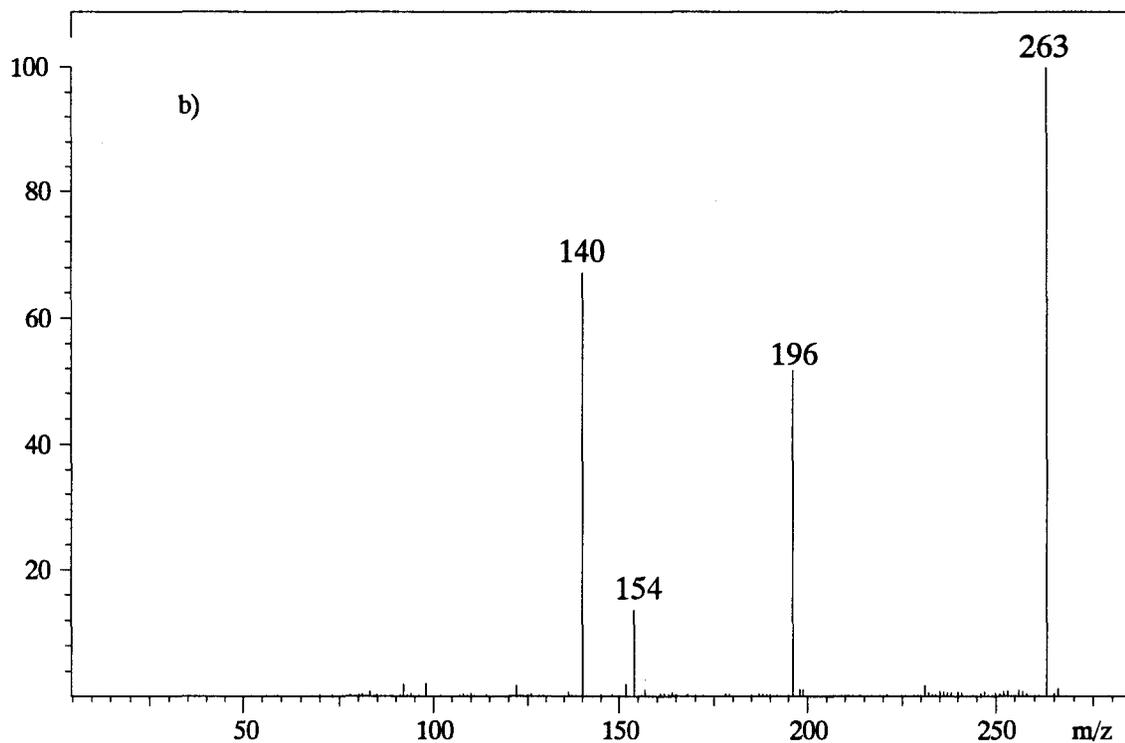


figure 83 (suite) – Spectres CIMS/MS des ions B à m/z 263 des dérivés PMDE des N-acétylhexosamines : HexNAc-4-CD₃ (b) et HexNAc-6-CD₃ (c)

est immédiate. Les mécanismes de fragmentation des ions B_1 des dérivés PMDE des N-acétylhexosamines sont donnés dans les figures 84 et 85.

Une des voies de fragmentation possible génère, après élimination de deux molécules de méthanol, un ion à m/z 196. Ce dernier peut encore perdre une molécule de cétène pour donner un fragment à m/z 154. Un mécanisme concomitant, formulé dans la figure 85, conduit à la formation de l'ion à m/z 140. Dans ce cas, une ouverture du cycle osidique se produit à partir de l'ion B_1 , suivie d'une recyclisation impliquant l'atome d'azote. Celle-ci favorise l'élimination ultérieure de CO et de $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$ pour donner naissance à un intermédiaire, qui perd une molécule de méthanol et génère l'ion à m/z 140.

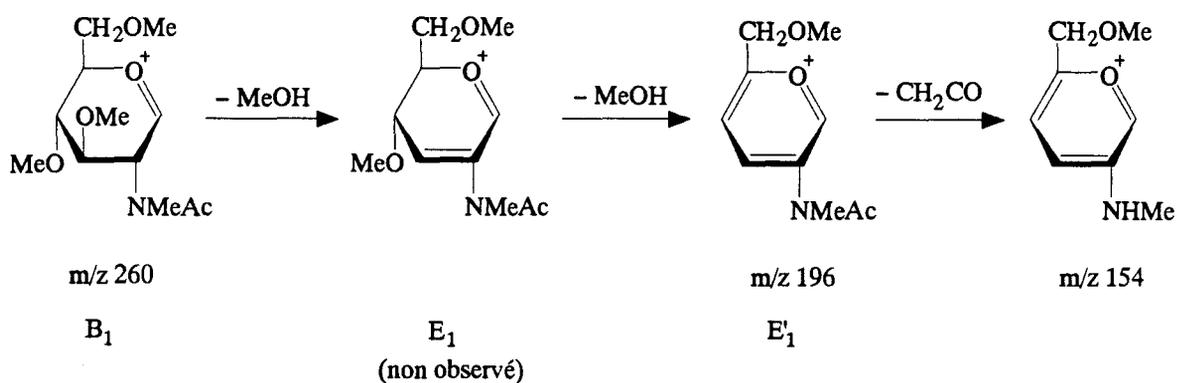


figure 84 - Fragmentation de l'ion B_1 du dérivé PMDE de la N-acétylglucosamine

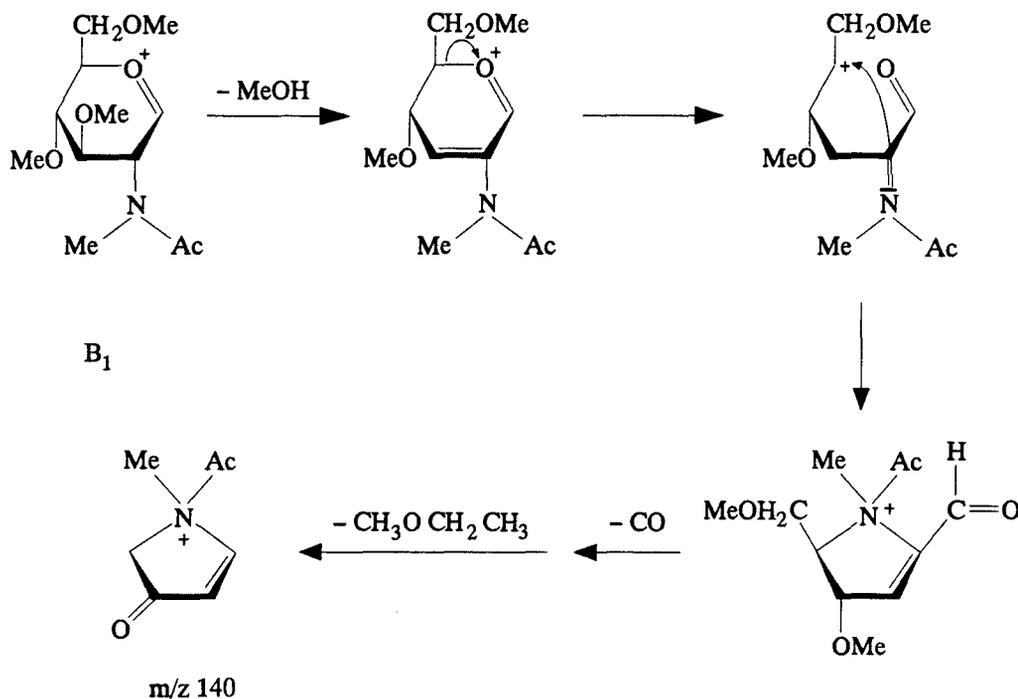


figure 85 - Mécanisme proposé pour la formation du fragment m/z 140

3.4. Additivité

Les dérivés bis-tridéutérométhyl-diméthyl-éthylglucosides ont également fait l'objet d'une étude systématique par MS/MS (Domon *et al.*, 1996). Ces dérivés, suivant le principe décrit pour les PMDE monodeutérométhylés, constituent les empreintes d'une disubstitution et sont par conséquent les marqueurs de points de branchement. Leurs ions B_1 sont observés à m/z 225. La première élimination d'alcool, sous forme d'une molécule de méthanol ou de deutérométhanol, est quantifiable comme précédemment par des ions spécifiques, respectivement à m/z 193 et 190. Les résultats obtenus montrent que le rapport entre l'élimination de deutérométhanol et celle de méthanol correspond à la somme des contributions quantifiées pour chacune des positions observées dans le cas d'une monoglycosylation. Cette règle est illustrée dans le tableau 13.

Les valeurs expérimentales déterminées pour les rapports des intensités des ions à m/z 111 et 114 et à m/z $[B_1-35]$ et $[B_1-32]$, pour les monosaccharides porteurs d'un unique groupement CD_3 , reflet d'une monosubstitution par un autre monosaccharide, sont rappelées dans ce tableau. Deux exemples de disubstitution, illustrant une double glycosylation initiale d'un monosaccharide, sont proposés. Les résultats obtenus pour les dérivés bis-tridéutérométhyl-diméthyl-éthylglucosides sont tout à fait concordants avec les valeurs calculées à partir des dérivés monodeutérométhylés. Ainsi, les valeurs mesurées pour les deux rapports étudiés d'un dérivé PMDE bis-tridéutérométhylé en position 2 et 3 est de 38 et 62%, pourcentages qui sont en complet accord avec les données calculées, respectivement de 40 et 60%. De même que pour une disubstitution en 4 et en 6, où aux résultats expérimentaux de 66 et 37%, correspondent les valeurs calculées de 66 et 39%. L'ensemble des combinaisons possibles pour les doubles et triples substitutions de monosaccharides suivent cette additivité (Domon *et al.*, 1996).

Il est donc possible de définir une véritable règle d'additivité et de prévoir en conséquence les proportions des rapports des ions marqueurs pour tout type de monosaccharide polysubstitué. Cette propriété est illustrée graphiquement dans la figure 86.

tableau 13 – Intensités relatives des paires d'ions à m/z 111/114 et [B₁-35]/[B₁-32]

Position des groupements CD ₃	Ion B ₁ m/z	I ₁₁₁ /(I ₁₁₁ +I ₁₁₄)		I _[B₁-35] /(I _[B₁-35] +I _[B₁-32])	
		calc.	exp.	calc.	exp.
- 2	222	-	7	-	14
- 3	222	-	33	-	46
- 4	222	-	62	-	30
- 6	222	-	4	-	9
- 2,3	225	40	38	60	62
- 4,6	225	66	66	39	37

Valeurs normalisées sur la base des sommes des intensités des ions à m/z 111 et 114 et [B₁-35] et [B₁-32].

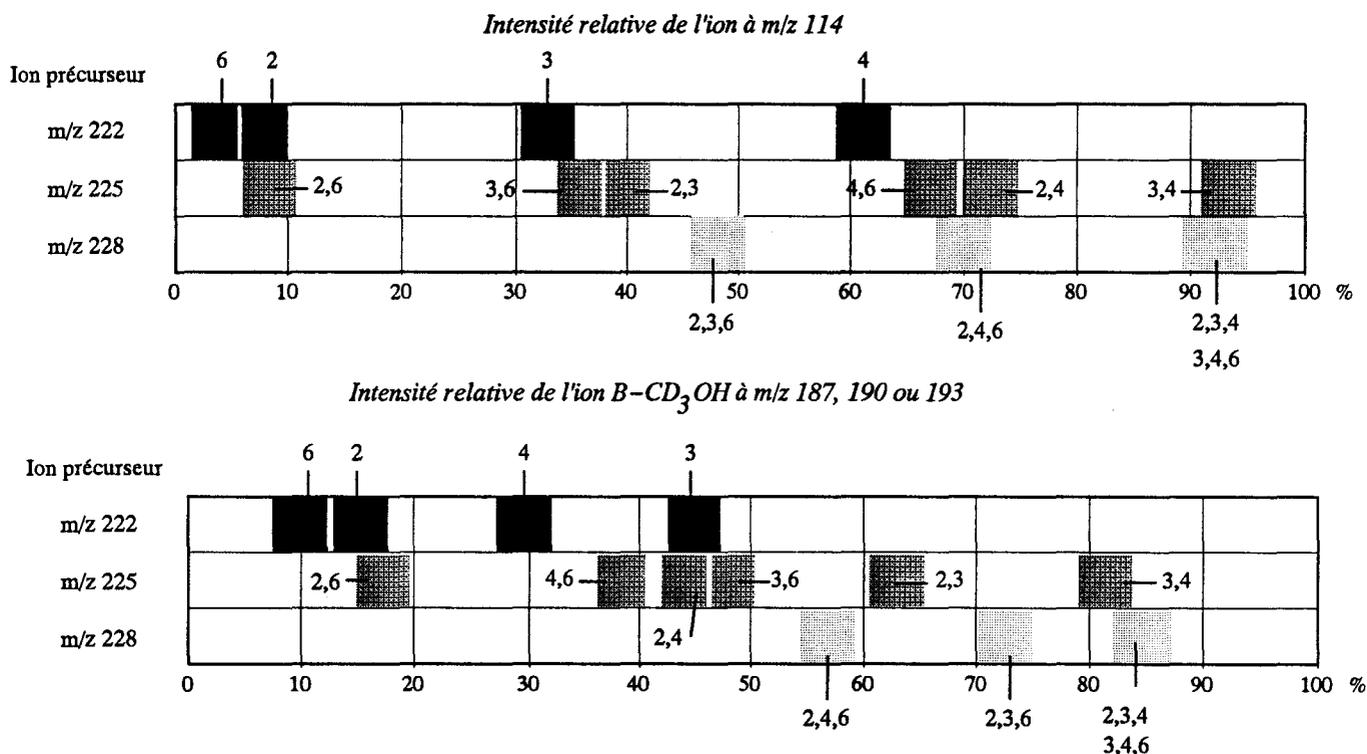


figure 86 – Carte d'additivité pour l'incorporation du taux de deutérium dans les ions marqueurs

3.5. Application à la détermination des liaisons glycosidiques d'oligosaccharides

La méthode développée dans les pages précédentes a été appliquée à l'oligosaccharide LNF-2. Ce dernier, comme précédemment pour les témoins, a été soumis à la séquence de réactions perméthylation, éthanolyse et deutérométhylation. Le mélange de monosaccharides

préparé a été analysé par GC/MS/MS. Le chromatogramme obtenu ainsi que le tracé représentant la détection spécifique des ions B_1 est présenté dans la figure 87.

La combinaison des temps de rétention et des masses obtenues pour les ions B_1 des monosaccharides ainsi séparés permet de caractériser le type de monosaccharides et leur degré de substitution relatif à leur position terminale non réductrice, interne ou au niveau d'un point de branchement. La multiplicité des pics constatée, d'un nombre maximum de quatre, est concordante avec l'existence des différents isomères d'un glycoside. A partir des temps de rétention comparés avec ceux déterminés pour les différents monosaccharides perméthylés, l'on met en évidence la présence, dans l'oligosaccharide étudié, des résidus de fucose, de glucose, de N-acétylglucosamine et de deux résidus de galactose. Les masses enregistrées permettent, plus spécifiquement, et à partir des monosaccharides ainsi identifiés, de positionner les résidus glucidiques. Le fucose et le galactose sont, sur la base de la masse de leurs ions B_1 , respectivement à m/z 189 et 219, localisés aux extrémités terminales non réductrices de l'oligosaccharide, le résidu de galactose restant, ainsi que le glucose, sont positionnés au sein de la chaîne glucidique, du fait de leur monosubstitution identifiée par l'ion à m/z 222. Enfin, le résidu de N-acétylglucosamine est l'objet d'une double substitution comme en témoigne l'ion à m/z 266.

Afin de préciser la nature de ces substitutions, les ions B_1 des monosaccharides porteurs de groupements CD_3 sont soumis à collision. Les spectres MS/MS obtenus sont reproduits dans les figures 88 à 90. Chaque spectre est reproduit accompagné du spectre du dérivé PMDE de référence, mesuré dans les mêmes conditions expérimentales, permettant la détermination de la position du groupe CD_3 et par delà, de la liaison portée par le monosaccharide au sein de la structure initiale. Ainsi l'on peut immédiatement identifier par leur empreinte caractéristique, la substitution en 4 du résidu de glucose (fig. 88), la substitution en 3 du résidu de galactose (fig. 89). La substitution en 3 et 4 du résidu de N-acétylglucosamine (fig. 90) est déduite de la comparaison du spectre obtenu avec celui du témoin complémentaire, en l'occurrence le dérivé de la N-acétylglucosamine deutérométhylé en position 6. Nous pouvons ainsi par cette méthode caractériser indiscutablement les liaisons de l'oligosaccharide étudié.

La figure 91 reproduit l'éclaté de la structure de l'oligosaccharide LNF-2 telle qu'elle a

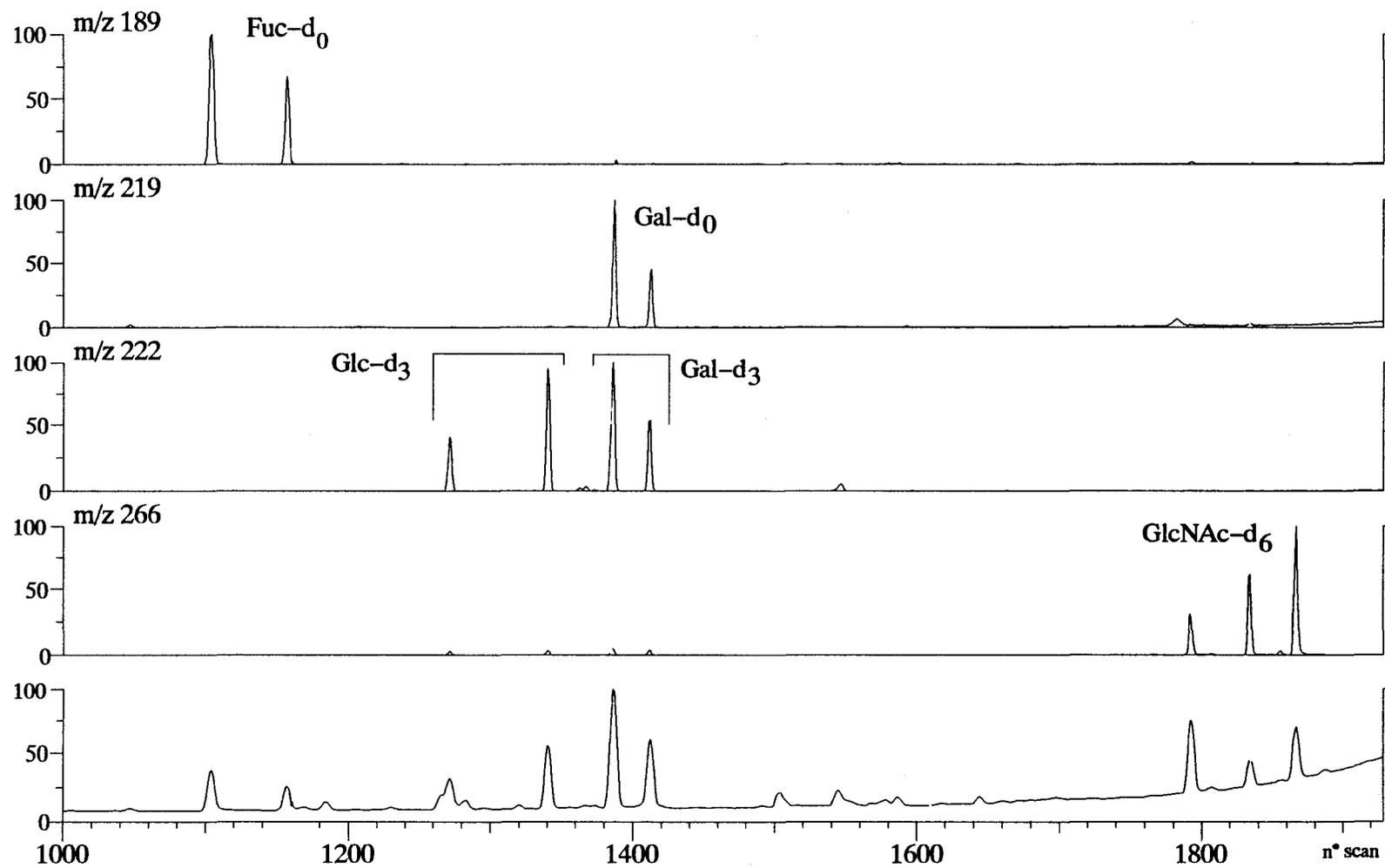


figure 87 - Chromatogramme en phase gazeuse du mélange des dérivés PMDE de l'oligosaccharide LNF-2

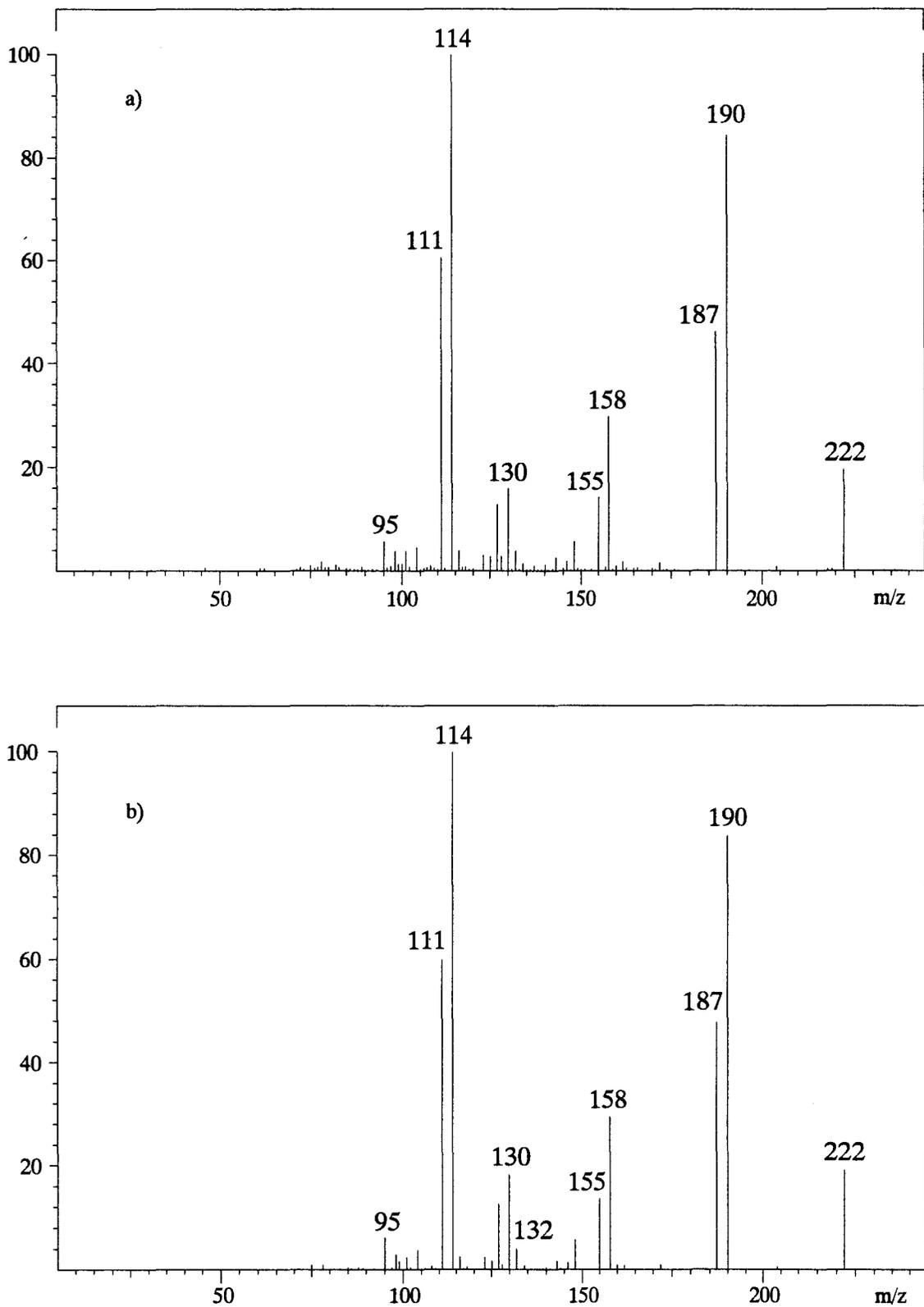


figure 88 – Spectres CIMS/MS des ions à m/z 222 du dérivé PMDE du résidu de Glc monosubstitué du LNF-2 (a) et du dérivé PMDE témoin Glc-4-CD₃ (b)

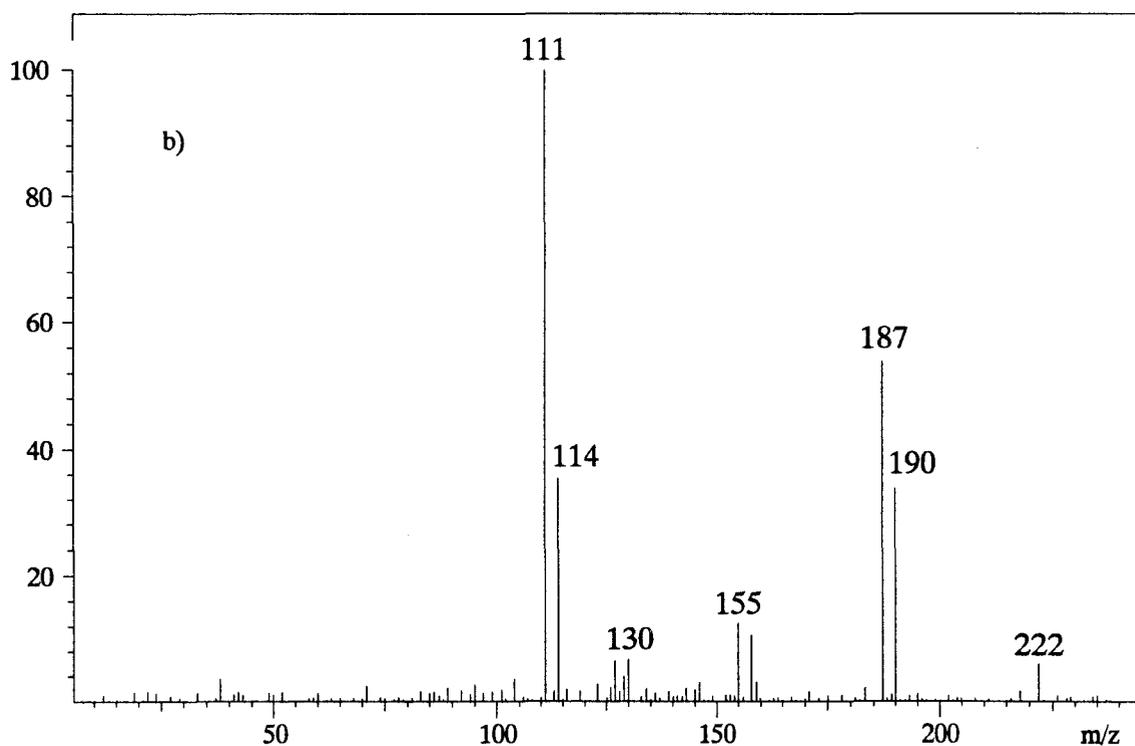
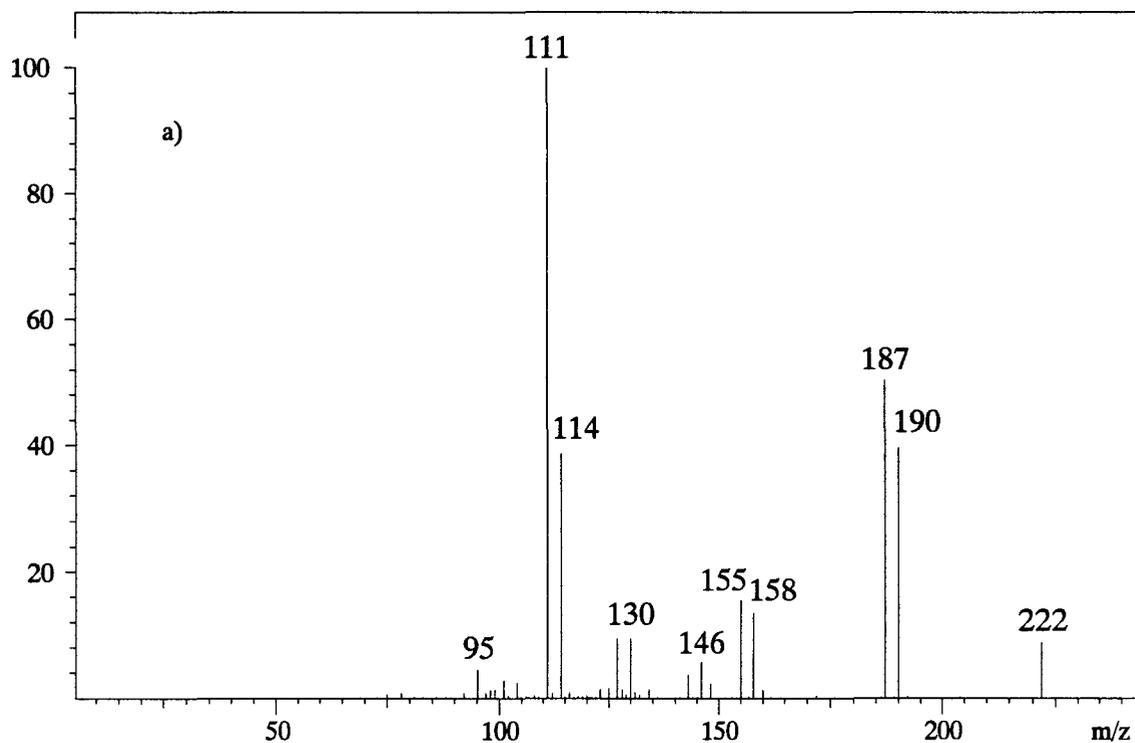


figure 89 – Spectres CIMS/MS des ions à m/z 222 du dérivé PMDE du résidu de Gal monosubstitué du LNF-2 (a) et du dérivé PMDE témoin Gal-3-CD₃ (b)

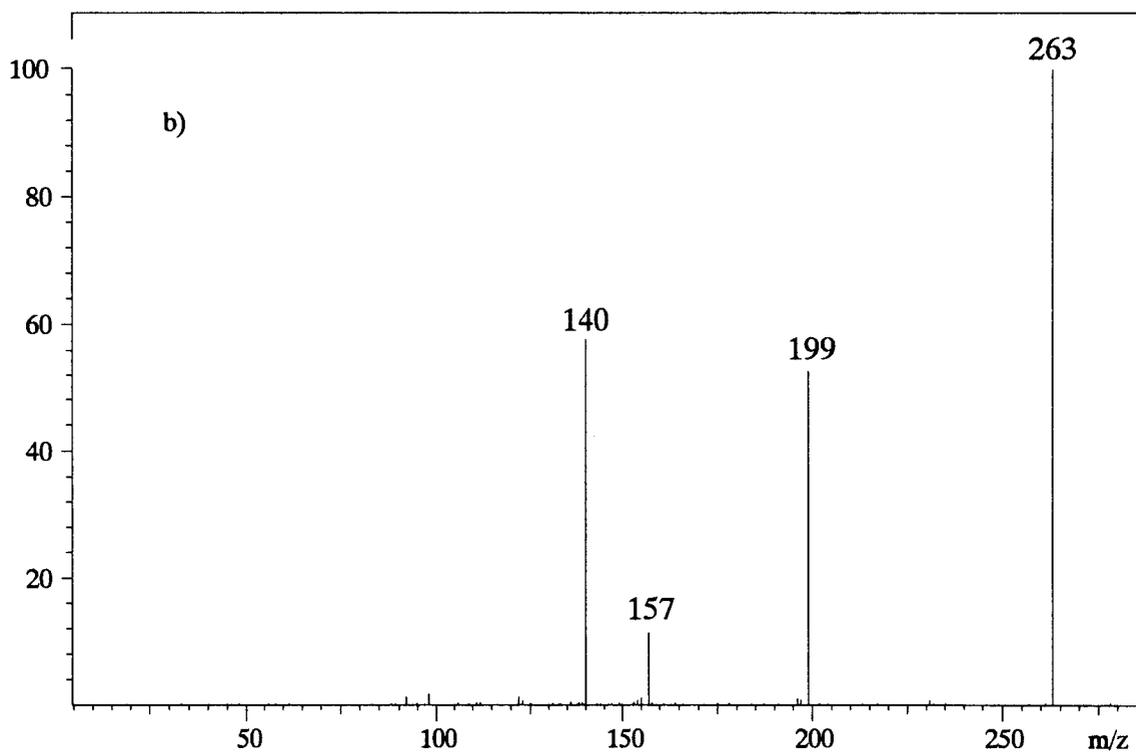
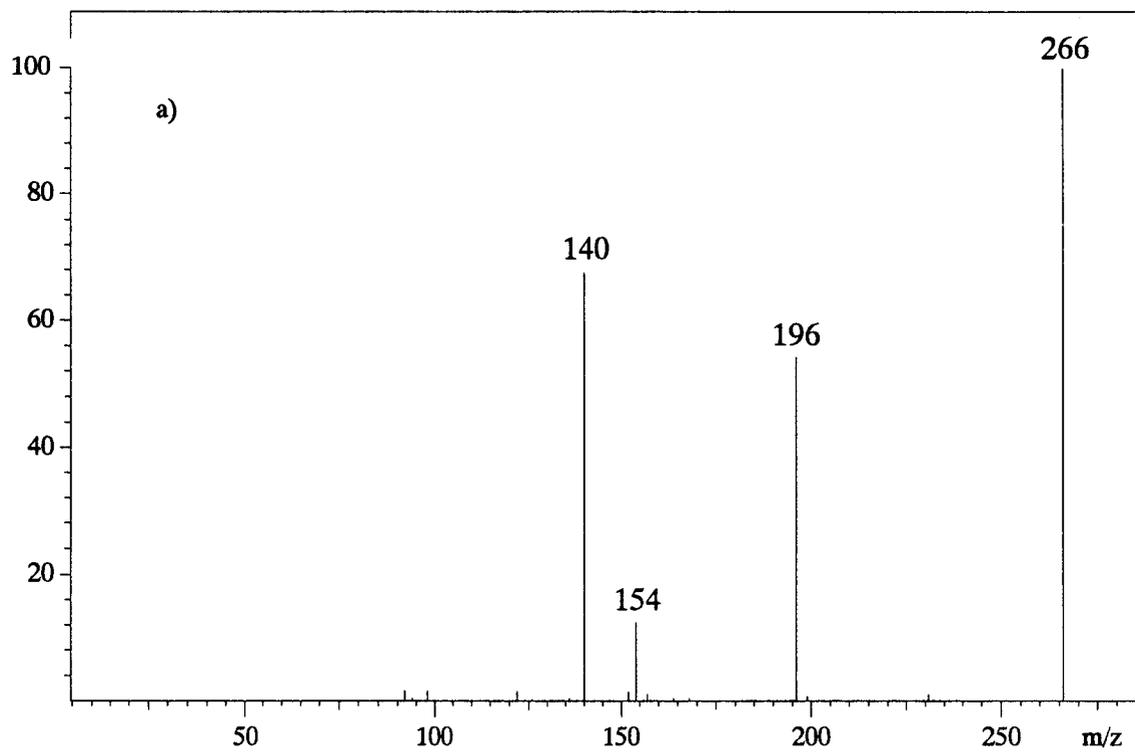


figure 90 – Spectres CIMS/MS de l'ion à m/z 266 du dérivé PMDE du résidu de GlcNAc disubstitué du LNF-2 (a) et de l'ion correspondant à m/z 263 du dérivé PDME témoin GlcNAc-6-CD₃ (b)

pu être déterminée quant aux positions des monosaccharides et aux types de liaison.

La caractérisation complète de la séquence est effectuée grâce aux résultats discutés dans le chapitre précédent et obtenus par ESMS/MS de l'oligosaccharide perméthylé (§ 2.3.1).

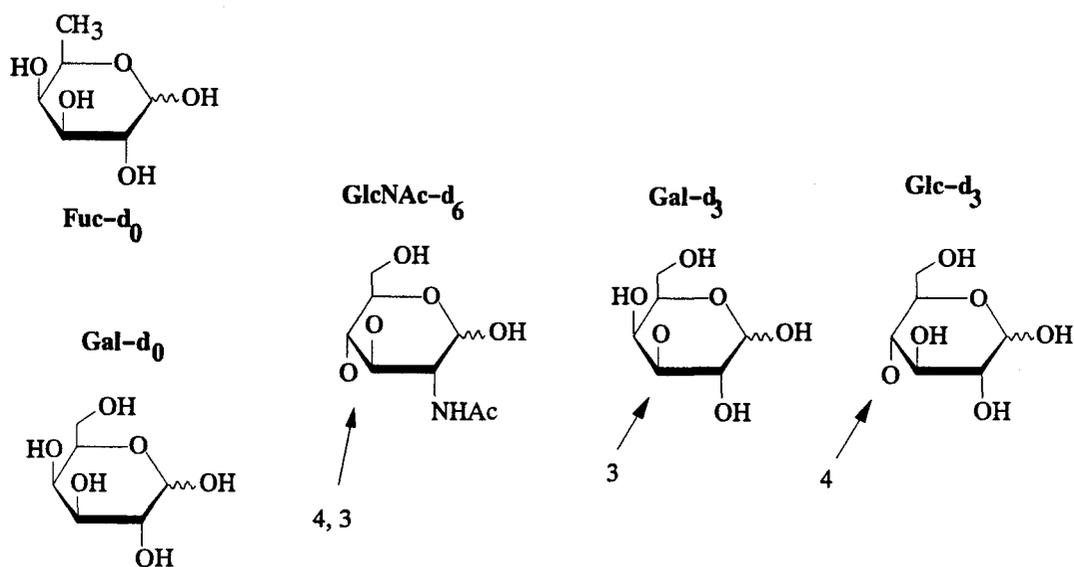


figure 91 – Structure de l'oligosaccharide LNF-2

Avantages et limites de la méthode développée

Comparativement à la méthode de Lindberg dont elle s'inspire, la méthode des dérivés PMDE offre l'avantage de donner naissance à des mélanges analysables en GC relativement simples. En effet, les dérivés préparés, sont, dans tous les cas de substitutions, des éthylglycosides perméthylés, élués ensemble lors de l'analyse. Il est donc nécessaire de ne préparer qu'un nombre limité de références – éthylglucoside perméthylé, éthylmannoside perméthylé, éthyl-2-désoxy-2-acétamido-glucoside perméthylé pour n'en citer que quelques-uns – afin de déterminer les temps de rétention des différents types de monosaccharides. De plus, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse permet, outre la détermination de la nature des monosaccharides constitutifs, de confirmer les proportions relatives de ces monosaccharides.

La masse de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$, ou de l'ion B_1 correspondant, obtenu après perte de la molécule d'éthanol, permet de quantifier l'incorporation de deutérium (d_0 , d_3 , d_6 ...) et ainsi de caractériser le degré de substitution des monosaccharides. Ceci livre des informations structurales précieuses sur la séquence, en particulier sur le nombre d'extrémités

terminales non réductrices et la présence ainsi que le type de points de branchement.

La détermination univoque du type de liaison est réalisée à partir des spectres MS/MS des ions B_1 ou, dans le cas de monosaccharides substitués en 2 ou en 6, à partir de l'ion correspondant B_1 -MeOH ou MeOH- d_3 . Il est ainsi possible par comparaison avec des spectres de références, des différents types de liaison d'élucider indiscutablement la position des groupements CD_3 au sein des dérivés PMDE examinés. De plus, l'existence de la règle d'additivité permet d'étendre cette détermination des monosubstitutions aux di- et trisubstitutions, englobant par conséquent l'ensemble des possibilités de glycosylation pour un monosaccharide au sein d'une structure glycosidique.

Toutefois, cette approche présente un inconvénient, dans le fait qu'elle ne permet pas la séparation chromatographique de monosaccharides monosubstitués selon différents types, par exemple, entre un mannose substitué en position 3 ou 4. Ces deux monosaccharides étant élués en même temps, leurs ions B_1 possédant la même masse, le spectre MS/MS obtenu à partir de cet ion, en cas de mélange, donne une empreinte qui ne correspond à aucune des références établies, mais qui équivaut, en fait, à un mélange de plusieurs espèces, selon les proportions relatives des monosaccharides. Dans un tel cas, des simulations pourraient quantifier les proportions des différents composants, mais ceci reste, d'un point de vue expérimental, peu satisfaisant. Une alternative consiste dès lors à procéder à une analyse complémentaire, à partir de l'oligosaccharide perméthylé, en générant des dérivés partiellement éthylés, séparables par chromatographie en phase gazeuse.

3.6. Les deutérométhylglycosides perméthylés sélectivement éthylés

Les deutérométhylglycosides perméthylés sélectivement éthylés (partially methylated ethylated deuteriomethylglycosides, PMED) sont préparés, à partir d'un oligosaccharide donné perméthylé, par deutérométhanolyse (page 208) puis éthylation des monosaccharides libérés. Le principe de l'analyse est le même que celui suivi précédemment pour l'analyse des PMDE. Les ions B_1 des monosaccharides dérivés monosubstitués ont pour masse 233 et les spectres MS/MS des ions correspondants des dérivés PMED du galactose et du mannose sélectivement éthylés en position 2, 3, 4 et 6 sont reproduits dans les figures 92 et 93. Ces spectres montrent

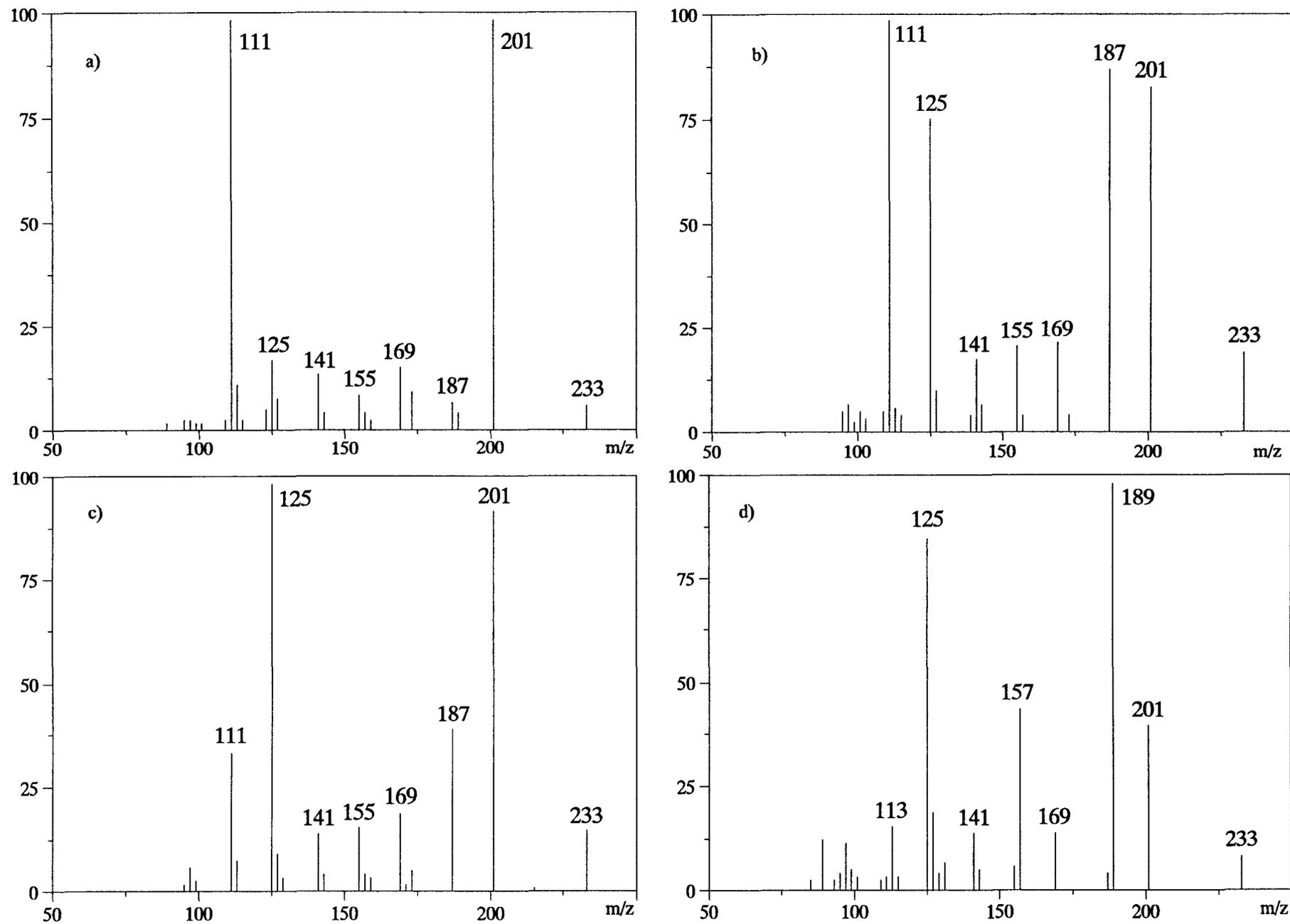


figure 92 – Spectres CIMS/MS des ions B des dérivés PMED du galactose (a) Gal-2Et, (b) Gal-3Et, (c) Gal-4Et, (d) Gal-6Et

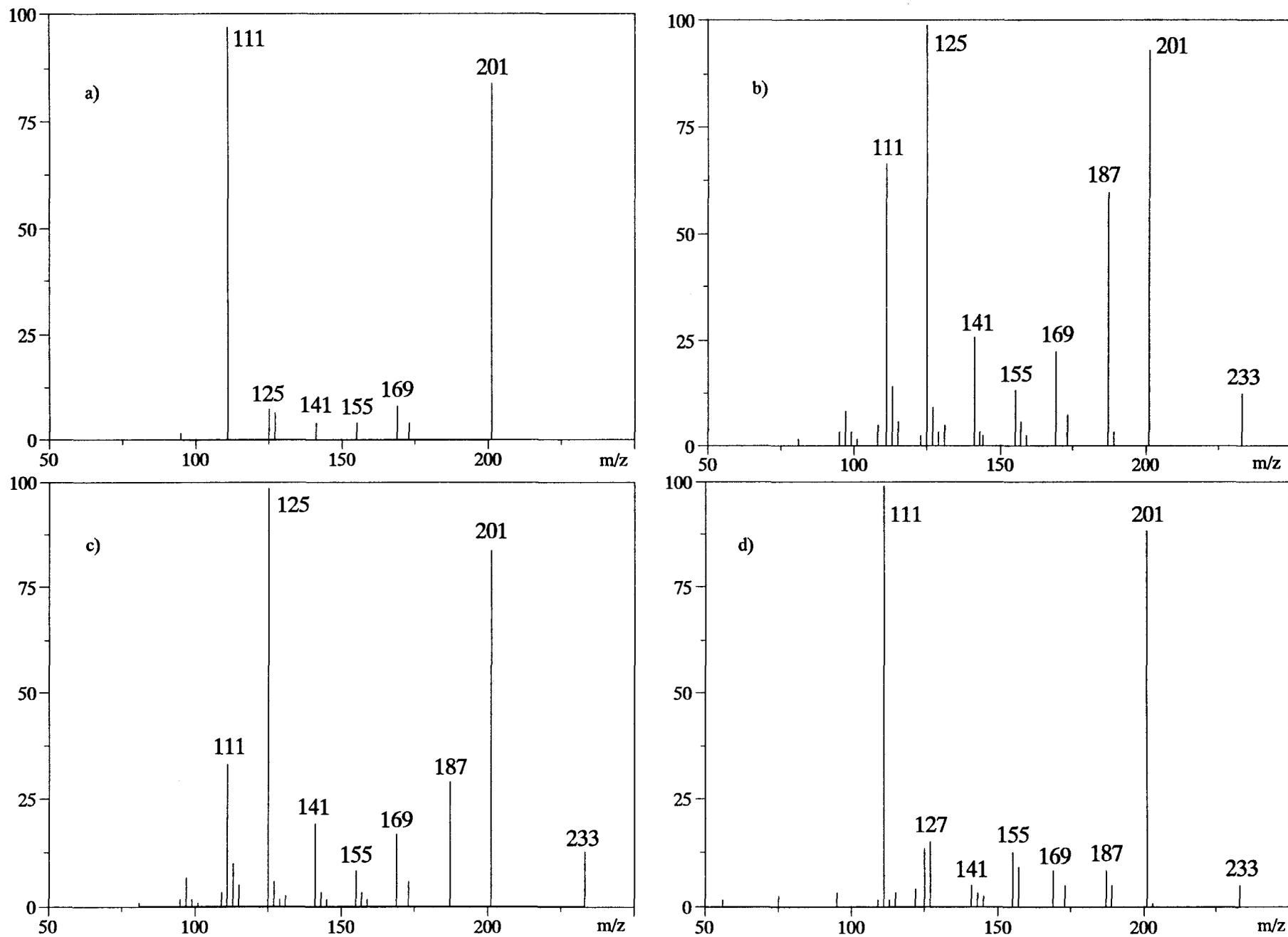
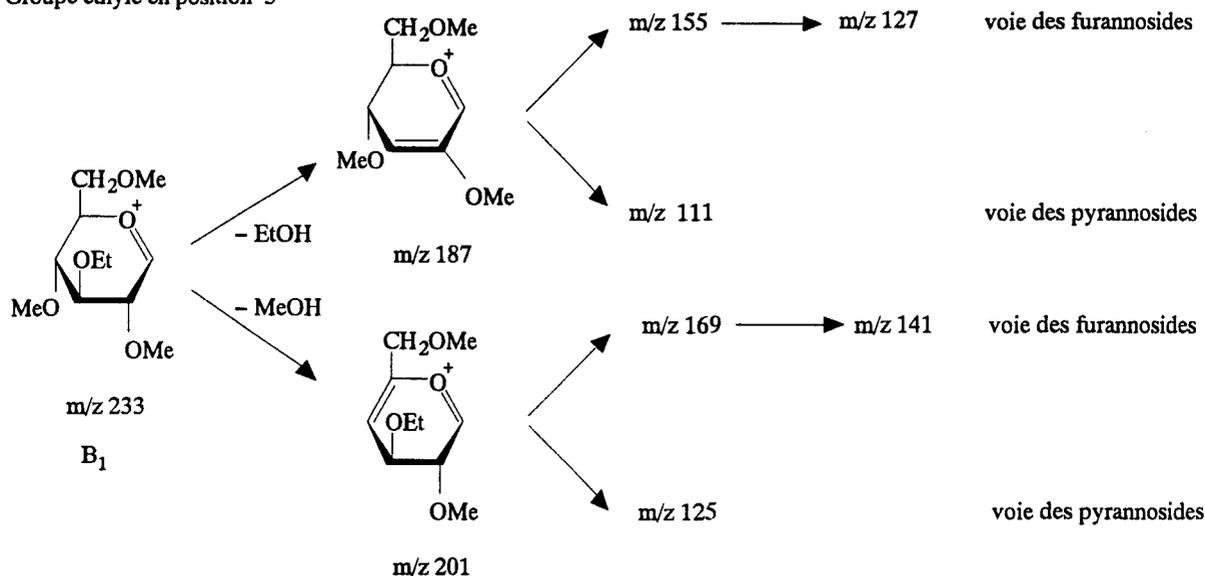


figure 93 – Spectres CIMS/MS des ions B des dérivés PMED du mannose (a) Man-2Et, (b) Man-3Et, (c) Man-4Et, (d) Man-6Et

une nette similitude avec les spectres des produits deutérométhylés présentés précédemment. Toutefois, les voies de fragmentation des dérivés PMED sont plus complexes en raison du comportement particulier du groupement éthyle. Celui-ci peut en effet donner lieu à des réactions plus spécifiques telles que la perte d'éthylène (C_2H_4). L'on peut, pour ces dérivés, identifier des formes pyraniques et furanniques qui ont des mécanismes propres de fragmentation. Les deux voies sont schématisées dans la figure 94, à partir des dérivés PMED portant un groupement éthyle en position 3 ou 4.

Groupe éthyle en position 3



Groupe éthyle en position 4

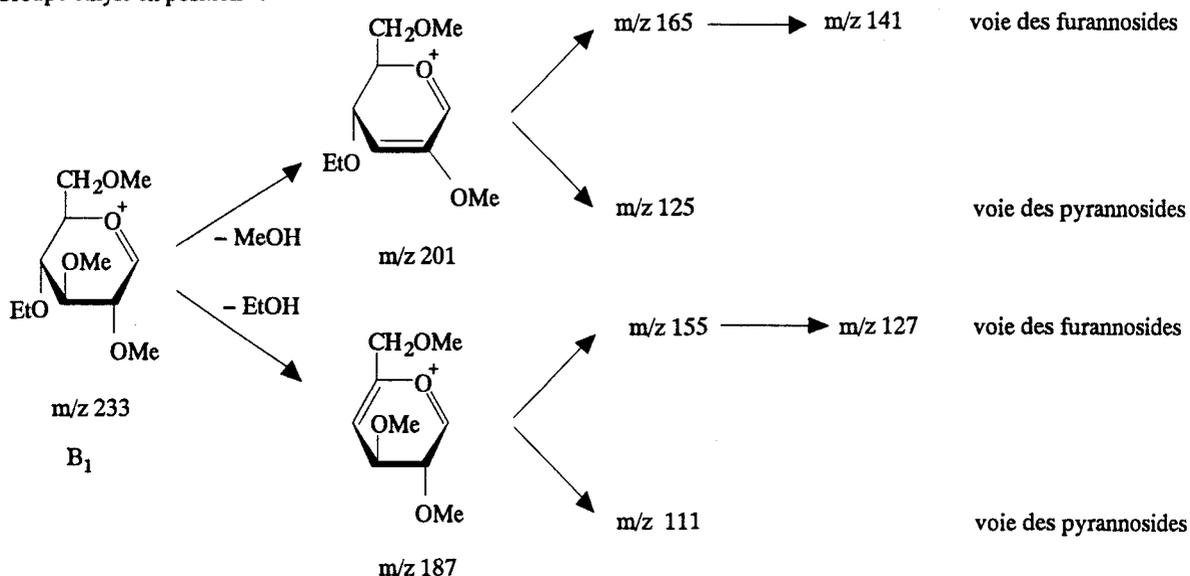


figure 94 - Fragmentation des dérivés PMED sélectivement éthylés en position 3 ou 4

Les spectres MS/MS des quatre analogues du galactose sont présentés dans la figure 92. Les empreintes sont très similaires à celles observées pour les dérivés du mannose (fig. 93), à l'exception, cependant, du monosaccharide éthylé en position 6. Ce dernier montre deux signaux intenses à m/z 125 et 189. Le premier de ces ions résulte vraisemblablement de l'élimination d'une molécule d'acétaldéhyde (44 uma) à partir de l'ion oxonium B_1 . Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la préparation de l'analogue deutéroéthylé (C_2D_5). En effet, l'élimination d'acétaldéhyde porteur de 4 hydrogènes deutérés à partir de ce composé donnerait une perte de 48 uma.

Parmi les ions secondaires observables, figurent des signaux à m/z 201 correspondant aux ions B_1 ayant éliminé une molécule de méthanol. Les spectres MS/MS de ces ions mesurés pour les dérivés PMED du mannose sont reproduits dans la figure 95. Les spectres des mêmes ions à m/z 201 des dérivés du galactose montrent des différences notables. Nous ne pouvons, à ce stade, faire une discussion exhaustive des fragmentations observées pour ce type de dérivés, un certain nombre de données complémentaires étant souhaitables. Cette étude préliminaire démontre toutefois que la séquence méthylation, deutérométhanolyse, éthylation permet une analyse plus poussée, dans le cas d'isomères coéluant en un seul pic chromatographique.

3.7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit une méthode simple et performante, utilisant la séquence méthylation, éthanolyse, deutérométhylation et permettant la détermination des liaisons glycosidiques. Il s'agit, en fait, d'une variante de la méthode de Lindberg (PMAA) et de la technique apparentée des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés.

Notre approche possède deux atouts. En premier lieu, elle donne naissance à un faible nombre de dérivés formés, favorisant l'obtention de chromatogrammes simplifiés, et n'impliquant la préparation que d'un nombre restreint de standards chromatographiques (éthylglycosides perméthylés) pour la détermination de la nature des monosaccharides sur la base des temps de rétention des dérivés. L'analyse par CIMS apporte des informations sur la position des monosaccharides dans la séquence glycosidique (résidu en position terminale non

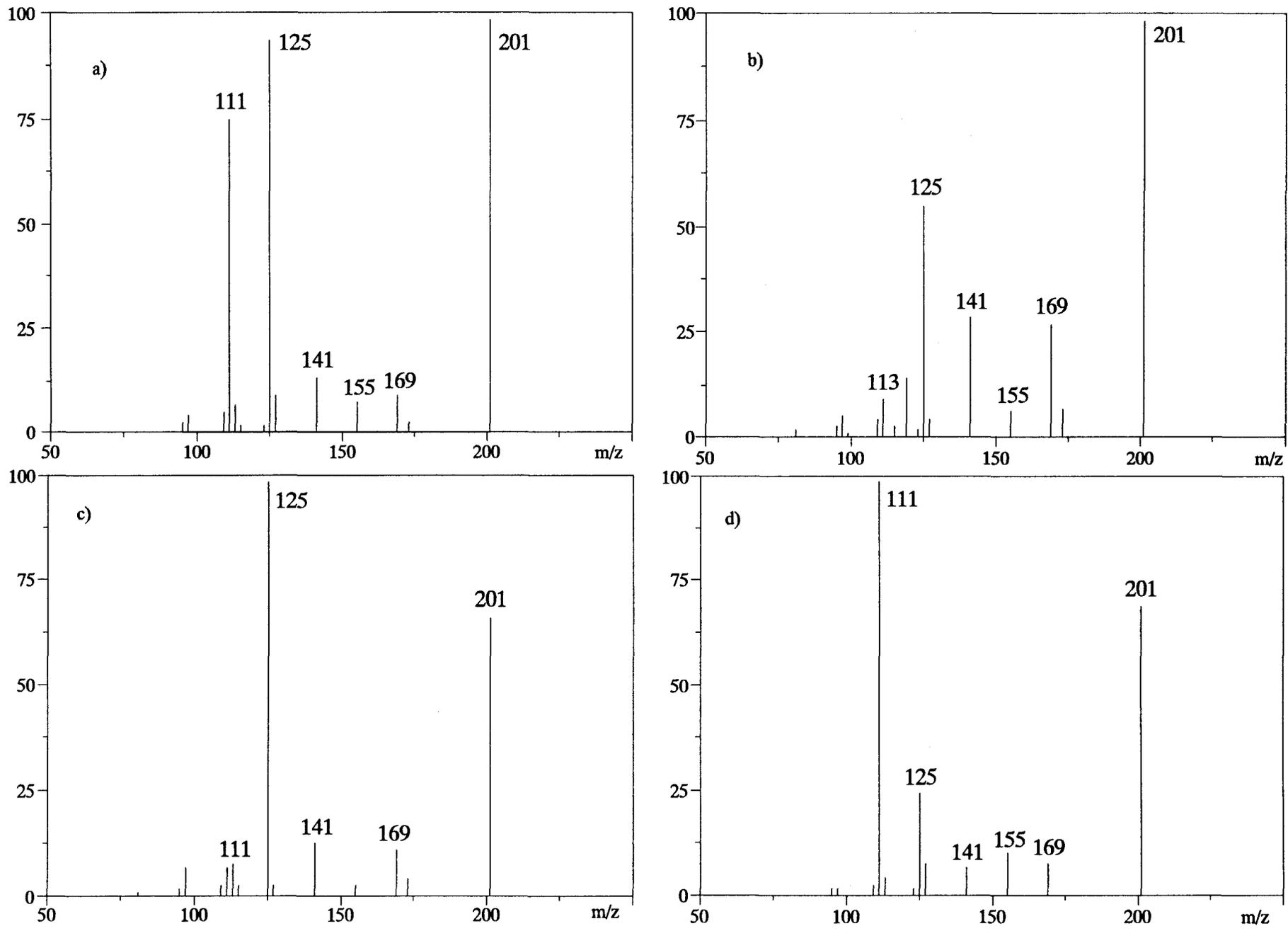


figure 95 - Spectres CIMS/MS des ions à m/z 201 des dérivés PMED du mannose (a) Man-2Et, (b) Man-3Et, (c) Man-4Et, (d) Man-6Et

réductrice, interne ou constituant un point de branchement) en fonction du nombre d'atomes de deutérium incorporés, respectivement 0, 3, 6 ou 9. Cette méthode permet en outre la détermination du type de liaison des monosaccharides, grâce à la mémorisation de l'empreinte de la liaison par la position des groupes deutérométhyles. Les types de substitution sont déterminés par l'analyse en spectrométrie de masse en tandem du fragment B_1 , ion oxonium résultant de la perte de la molécule d'éthanol liée sur le carbone 1. En fonction de la position du monosaccharide considéré, cet ion est observé respectivement à m/z 219 (cas d'un ose en position terminale non réductrice), 222 (cas d'un ose monosubstitué, dérivé ayant incorporé d_3), 225 (ose disubstitué, incorporation de d_6), ou 228 (ose trisubstitué, incorporation de d_9) pour les hexoses et 260 (d_0), 263 (d_3), 266 (d_6) pour les résidus de N-acétylhexosamines. En cas d'ambiguïté, la détermination précise de la liaison peut être réalisée par une expérience complémentaire de spectrométrie de masse en tandem sur l'ion $[B_1-MeOH]^+$. Notre étude a montré que, dans le cas de monosaccharides di- et trisubstitués, l'empreinte des spectres MS/MS pouvait être calculée à partir des spectres de référence obtenus pour les dérivés des monosaccharides monosubstitués.

Les spectres MS/MS caractéristiques de la position du ou des groupes CD_3 sur les dérivés formés ne sont pas affectés par la nature du monosaccharide considéré (glucose, galactose, mannose ou N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine). Nous avons donc développé une méthode pouvant s'appliquer à un large éventail de structures glycosidiques.

Le cas de monosaccharides de même nature et de degré de substitution équivalent (par exemple, Gal substitué en position 3 et Gal substitué en position 6), au sein d'un même glycanne, peut être résolu en ayant recours à des calculs de proportion des fragments, à partir des spectres témoins, ou en réalisant l'analyse complémentaire de séquence méthylation, deutérométhanolyse et éthylation.

L'usage des instruments utilisés en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et permettant des analyses par MS/MS (triple-quadrupôles, ion trap) s'étant considérablement développé au cours de la dernière décennie, notre approche est susceptible de trouver un champ d'application beaucoup plus large que les techniques classiques évoquées au début de ce chapitre. Sa mise en oeuvre apparaît des plus simples puisqu'elle ne nécessite

que 5 témoins sous forme d'éthylglycosides perméthylés, pour la caractérisation chromatographique des dérivés des oses les plus couramment rencontrés dans les structures glycaniques, ainsi qu'un nombre restreint de spectres de références (hexose substitué en 2, 3, 4 ou 6, N-acétylhexosamine substituée en 3, 4 ou 6), aisément obtenus à partir de dérivés préparés via des disaccharides disponibles commercialement.

4. DETERMINATION DE LA CONFIGURATION DES CARBONES ANOMERIQUES PAR LA COMBINAISON DE DIGESTIONS ENZYMATIQUES ET DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

4.1. Introduction

Les deux premiers volets de notre stratégie, développés dans les chapitres précédents, nous permettent, à partir d'oligosaccharides perméthylés, d'acquérir les informations structurales relatives à la séquence, aux points de branchements et aux types de liaisons glycosidiques. Il subsiste un dernier paramètre non encore élucidé de la structure primaire et qui concerne la configuration des carbones anomériques. Classiquement, la RMN permet d'obtenir ce type d'information, toutefois, le problème posé oblige à recourir à une autre alternative, moins consommatrice d'échantillon.

Les exoglycosidases, comme nous avons pu le voir dans l'introduction de ce travail, constituent une voie différente attrayante alliant spécificité et miniaturisation potentielle. Leur utilisation est classiquement conjuguée à une technique de détermination de la masse moléculaire permettant de caractériser, par la diminution de celle-ci, la digestion effective du composé étudié et de valider ainsi l'hypothèse concernant le type de liaison du monosaccharide en position terminale non réductrice. Si la perméation de gel est une des techniques possibles de la détermination de la masse moléculaire des produits (Kobata *et al.*, 1990), la spectrométrie de masse offre un avantage appréciable par sa sensibilité de détection et la précision des mesures effectuées, notamment par MALDMS (Harvey *et al.*, 1994; Sutton *et al.*, 1996).

L'emploi des enzymes requiert des milieux tamponnés dont la richesse en sels est souvent peu compatible avec des analyses en spectrométrie de masse, exception faite de la désorption laser assistée par matrice. Ceci apparaît déterminant dans le cas de faibles quantités. Un dessalage préalable permet, dès lors, d'augmenter considérablement la qualité des spectres. L'HPLC en phase inverse est une des techniques les plus rapides et les plus efficaces pour purifier ainsi les échantillons. Se pose malgré tout le problème de la rétention des oligosaccharides sur ce type de support chromatographique. Les molécules glucidiques, pour être l'objet de digestions enzymatiques, qui plus est, de façon séquentielle, doivent être conservées à l'état natif, ce qui ne donne lieu qu'à peu ou pas de rétention des composés en RP-HPLC. De plus, les oligosaccharides natifs sont difficilement détectables de façon

sensible. Pour pallier à l'ensemble de ces problèmes, une solution de choix est apportée par la dérivation par amination réductive. Cette dernière permet, par le marquage de la seule extrémité terminale réductrice, de préserver l'oligosaccharide sous sa forme native, et par un choix judicieux du dérivé greffé, en l'occurrence une amine aromatique, d'en retarder l'élution et de le détecter spécifiquement, par absorbance UV voire par fluorescence. De plus, nous avons pu illustrer préalablement l'intérêt de la dérivation par amination réductive dans l'augmentation de la sensibilité de détection en spectrométrie de masse (§ 2.1.).

Dans le but de déterminer la configuration des carbones anomériques, nous avons ainsi combiné l'utilisation des digestions séquentielles par exoglycosidases d'oligosaccharides dérivés par amination réductive avec l'analyse par spectrométrie de masse en mode MALD.

4.2. Dérivation par amination réductive

4.2.1. Dérivation d'oligosaccharides neutres

Nous avons appliqué la dérivation par amination réductive dont le principe a été schématisé dans la figure 15 page 42 à différents oligosaccharides. Plusieurs dérivés ont été testés. Il s'agit de l'aniline (An), de la 2-aminopyridine (2AP) et de la 2-aminobenzamide (2AB). Leurs formules respectives sont présentées dans la figure 96.

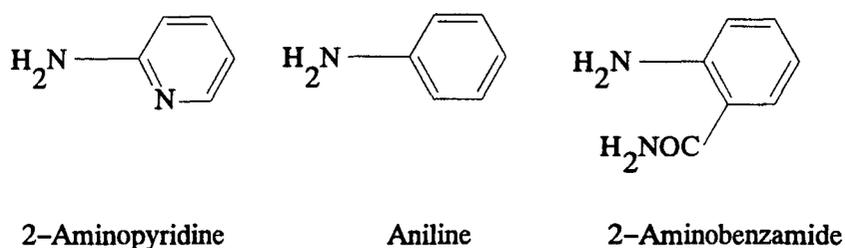


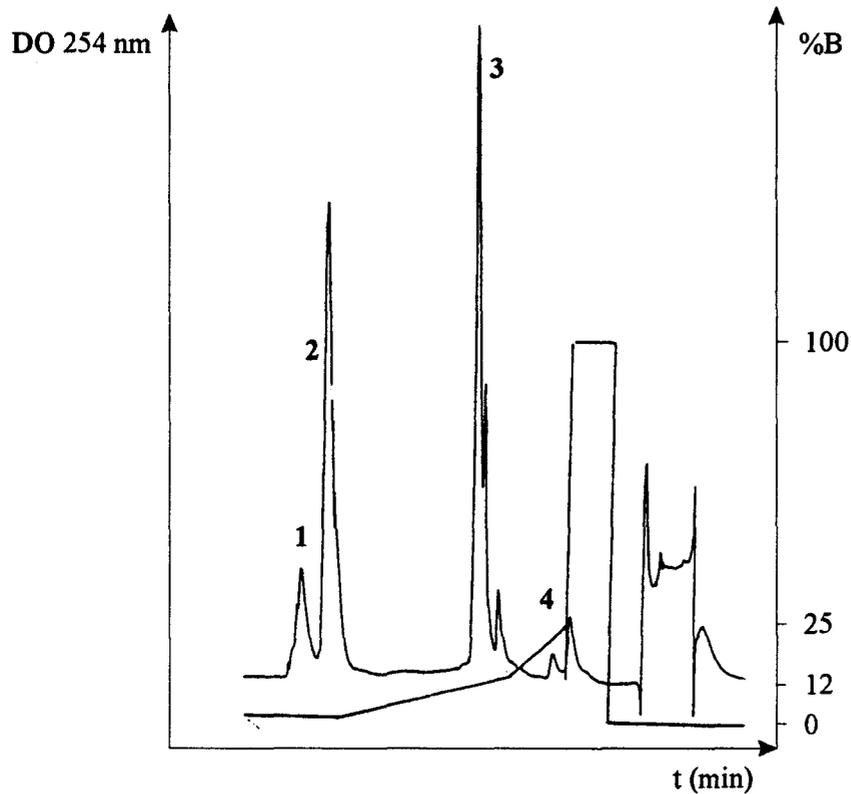
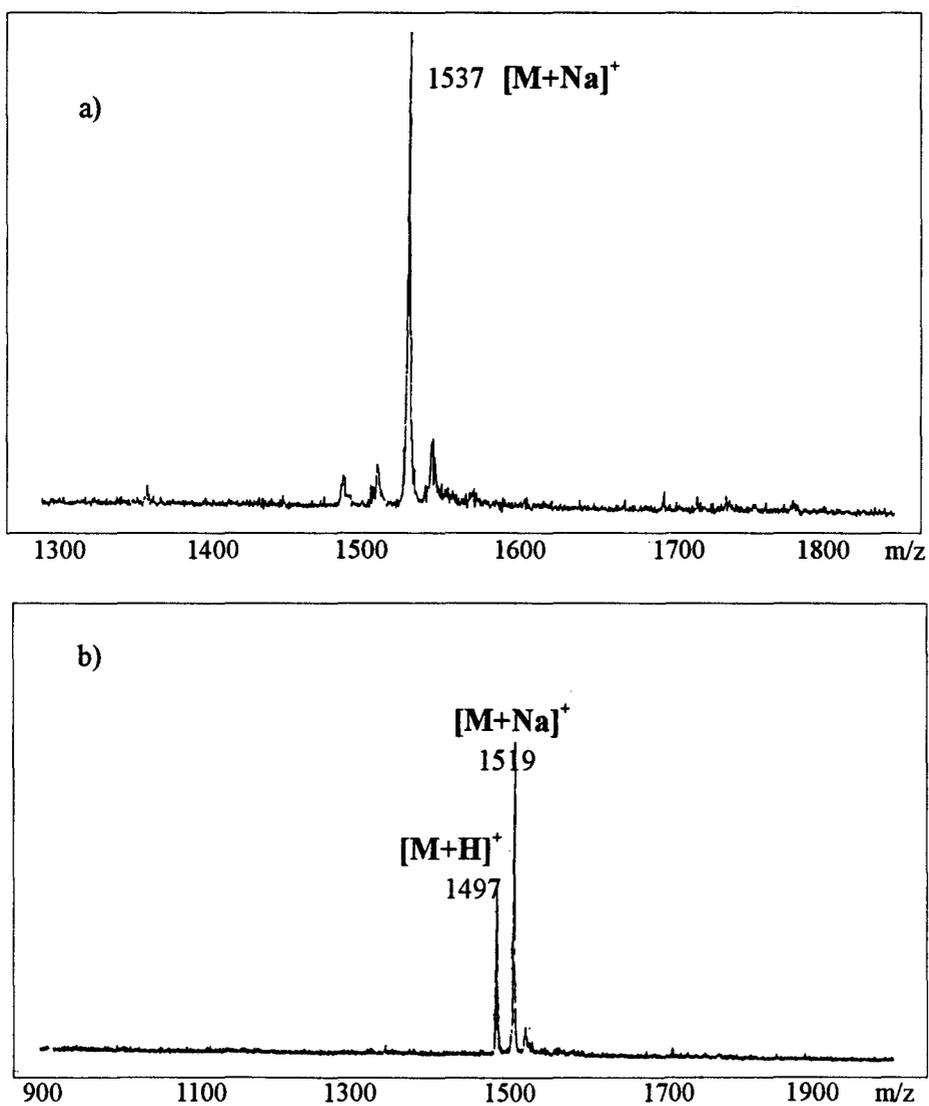
figure 96 – Formules des dérivés utilisés pour l'amination réductive

Ces trois types de dérivés présentent des caractéristiques différentes.

La 2-aminopyridine est un chromophore fortement basique dont l'utilisation a été largement discutée par Hase et coll. (pour références, Hase, 1994). La dérivation par amination réductive d'oligosaccharides par ce composé met toutefois en jeu des quantités importantes de réactifs, tant pour le chromophore que pour le réducteur, quantités nécessitant un protocole de purification long et laborieux, notamment à cause des extractions chloroformiques répétées

requis avant l'analyse par HPLC. De plus, la réponse UV de ce type de dérivé n'est pas des plus sensibles. L'ensemble de ces contraintes nous a amené à rechercher un autre chromophore.

L'aniline est un composé compatible avec la purification par RP-HPLC, absorbant en UV, dont l'utilisation reste peu répandue. Nous avons préparé un certain nombre de dérivés marqués par ce chromophore parmi lesquels le 2AGN1-An (annexe 3) selon un protocole analogue à celui que nous indiquerons pour le 2AB. Le profil chromatographique obtenu lors de la purification de cet oligosaccharide dérivé est reproduit dans la figure 97. Il présente 4 pics, ou séries de pics, identifiés comme suit sur la base d'analyses chromatographiques effectuées par TLC (solvant nBuOH/AcOH/H₂O, révélation orcinol sulfurique, page 202). Au volume mort de la colonne sont élués les sels résiduels ainsi que la fraction de l'oligosaccharide non dérivée (1), puis le complexe chromophore-réducteur (2). L'excès d'aniline, plus fortement retenu sur la colonne, est élué en fin de gradient (4). L'oligosaccharide dérivé est détecté sous la forme de 2 pics (3). Les spectres obtenus par analyse MALDMS de ces produits mettent en évidence que le dérivé recherché est élué sous la forme du second pic minoritaire (fig. 98a). Le pic principal correspond à un composé présentant une masse inférieure de 18 uma par rapport à celle attendue (fig. 98b), différence que l'on peut attribuer à une déshydratation. L'absence d'une telle dichotomie de pics lors de l'amination réductive d'un tétramère de glucose nous laisse supposer que ce phénomène est lié à la présence d'un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. La confirmation du lien possible entre la présence de ce monosaccharide et la masse du dérivé préparé est obtenue lors de l'amination réductive d'un échantillon de N-acétyllactosamine effectuée dans les mêmes conditions. Dans l'optique d'une stratégie globale applicable à l'ensemble des glycanes de glycoconjugués, un comportement particulier des N-glycanes n'est pas souhaitable. Ceci, allié au fait que l'aniline présente une absorption en UV comparativement faible par rapport à d'autres chromophores nous a incité à reporter notre choix sur un autre chromophore, la 2-aminobenzamide.

figure 97 - Chromatogramme HPLC en phase inverse du dérivé 2AGN₁-Anfigure 98 - Spectres MALDMS du dérivé 2AGN₁-An

Ce chromophore présente de nombreux avantages, tels que des conditions de réaction peu contraignantes, notamment en ce qui concerne la solubilité, une forte réponse en UV lors de la purification par HPLC, une facilité de détection en TLC, l'obtention d'un pic unique, quel que soit l'oligosaccharide dérivé, et un comportement favorable lors de l'analyse par MALDMS. Le protocole utilisé tout au long de ce travail pour la préparation des oligosaccharides dérivés au 2AB est présenté page 203. Par rapport aux protocoles décrits dans la littérature, les conditions retenues favorisent le rendement de l'amination réductive en effectuant de façon séquentielle l'étape de condensation puis l'étape de réduction. Ceci prévient la réduction de l'oligosaccharide avant que ne survienne la greffe du chromophore. Les rendements obtenus avec le 2AB, même si ils n'ont pas fait l'objet d'une étude systématique poussée, sont estimés de l'ordre d'un minimum de 90% sur la base de la comparaison des produits de réaction avec des témoins quantifiés, ce qui constitue un autre avantage de ce chromophore.

4.2.2. Dérivation d'oligosaccharides sialylés

La dérivation par amination réductive a été largement discutée dans la littérature, dans son application à différents types d'oligosaccharides neutres. Un problème surgit lors de l'utilisation de cette technique pour le marquage d'oligosaccharides sialylés. Hase et coll. (Hase *et al.*, 1984; Kondo *et al.*, 1990) ont décrit une méthode permettant d'obtenir des oligosaccharides sialylés dérivés à la 2-aminopyridine, mais elle demeure incertaine et utilise un chromophore peu pratique, Parekh et coll. (Bigge *et al.*, 1995) ont, pour leur part, discuté succinctement des conditions compatibles avec de tels échantillons dans le cas du 2AB. Les informations demeurent cependant fragmentaires et les applications rares. Notre stratégie devant s'appliquer à tous les types de glycannes de façon générale et, en particulier, aux N-glycannes sialylés, il a donc été nécessaire d'établir les conditions de l'amination réductive de tels échantillons, le dérivé choisi pour l'homogénéité du travail étant le 2AB.

Afin de cerner le comportement des N-glycannes, nous avons choisi comme témoin la sialyl-N-acétyllactosamine sialylée en position 3 ou 6 du galactose, permettant ainsi de tester le comportement des deux types de liaison de l'acide N-acétylneuraminique ainsi que celui de la N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, vis-à-vis des conditions de réaction.

Une première série d'expériences a été réalisée à titre de témoin, en utilisant le protocole standard développé pour les oligosaccharides neutres. Comme prévu, l'amination réductive dans ces conditions entraîne la désialylation de la sialyl-N-acétyllactosamine. Les conditions acides utilisées combinées à la température de la réaction (80°C) provoquent de façon concomitante la désialylation de l'échantillon et la dérivation du résidu de N-acétylglucosamine terminal réducteur, générant de la N-acétyllactosamine-2AB.

A partir de cette constatation, nous avons modifié le protocole en diminuant la température de réaction (60°C), suivant en cela les conclusions de Bigge *et al.* (1995). L'estérification de la fonction carboxyle est réalisée en utilisant du MeOH/HCl 0,5N avant la dérivation dans le but de prévenir l'hydrolyse du résidu d'acide N-acétylneuraminique. Elle offre l'avantage d'être une protection réversible de l'acide sialique. En effet, l'exposition du dérivé préparé, à des conditions basiques, permet de restituer cette fonction sous sa forme native.

La mise au point de ce protocole de dérivation des oligosaccharides sialylés (page 204) constitue une innovation car ce type de dérivés n'a été que peu ou pas décrit et elle permet d'envisager d'étendre à cette famille de glycanes toute la stratégie basée sur ces dérivés. Nous avons pu déjà discuter de l'application de cette dérivation par amination réductive aux oligosaccharides sialylés de type LST dans l'étude des processus de fragmentation des oligosaccharides dérivés par ESMS/MS, mettant en évidence, pour la première fois, l'existence d'ions doublement chargés (§ 2.1.).

4.3. Digestions par les exoglycosidases

A partir de différents oligosaccharides dérivés par le 2AB et choisis comme modèles, nous avons développé l'aspect de la stratégie concernant la détermination de la configuration des carbones anomériques. Le principe adopté comprend, pour chaque digestion enzymatique, trois étapes. L'oligosaccharide dérivé étudié est en premier lieu soumis à l'action de l'enzyme choisie, puis purifié par RP-HPLC (mode opératoire page 207). Cette étape chromatographique a pour principal objectif de dessaler l'oligosaccharide digéré, mais, dans le

cas de témoins de petite taille, il est déjà possible de prouver l'efficacité de la digestion par la variation des temps de rétention comme nous pourrions le décrire plus loin. Suite à l'obtention de l'échantillon digéré sous une forme purifiée, la masse moléculaire de ce dernier est déterminée par MALDMS. Une nouvelle étape de digestion peut alors être envisagée.

Pour l'étude des N-glycannes, nous avons eu recours à un certain nombre d'exoglycosidases. Leur choix a été motivé par la nature des monosaccharides constitutifs des branches des N-glycannes, en l'occurrence, des résidus de galactose, N-acétylglucosamine et mannose. Le cas de l'hydrolyse des acides sialiques a été traité par dégradation chimique, étant donné que les éléments bibliographiques concernant les sialidases présentent des résultats contradictoires quant à l'efficacité de leur action spécifique. Au sein d'une même famille d'exoglycosidases, le choix s'est effectué en regard de la spécificité des enzymes considérées. N'ayant pas pour but de déterminer de façon précise le type de liaison glycosidique du monosaccharide en position terminale non réductrice, information obtenue lors des analyses du deuxième volet de notre stratégie, les enzymes choisies présentent une spécificité glyconnique, relative à la liaison, suffisamment large. Ceci constitue une facilité d'utilisation, étant donné que les concentrations utilisées en enzyme et en substrat peuvent être définies plus souples que pour des enzymes à spécificité restreinte. Cet aspect est un facteur non négligeable, si l'on considère que, plus les enzymes utilisées sont spécifiques, plus leur coût d'utilisation est élevé.

Afin d'optimiser les conditions de digestion des différentes enzymes, nous avons procédé à des essais préliminaires sur des modèles choisis, essais que nous allons maintenant décrire.

4.3.1. Mise au point des conditions de digestions spécifiques

Quatre types d'enzymes ont été retenus, en liaison avec les monosaccharides les plus couramment rencontrés. Il s'agit de deux β -galactosidases, d'une β -N-acétylhexosaminidase, d'une α -mannosidase. L'utilisation d'une α -galactosidase a été également discutée du fait de la structure particulière du N-glycane choisi pour l'application et qui est un biantenné monosialylé et mono- α -galactosylé en positions terminales non réductrices (code 2ANeuAc).

*Digestion par les β -galactosidases de *Streptococcus pneumoniae* et bovine testis*

Les β -galactosidases de *Streptococcus pneumoniae* et de bovine testis présentent une différence notable de spécificité (annexe 2). La première enzyme hydrolyse exclusivement les résidus de galactose liés en $\beta(1-4)$ à la différence de l'enzyme de bovine testis qui peut libérer les résidus de galactose tant en $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ que $\beta(1-6)$. Afin de tester la spécificité de ces enzymes, trois oligosaccharides modèles dérivés par le 2AB ont été choisis. Il s'agit du lactose-2AB, du LNT-2AB et du N-glycane biantenné 2AGN1-2AB.

Les protocoles suivis lors de ces digestions sont présentés pages 205-207. Comme pour les autres enzymes, le choix des conditions a été réalisé, en fonction des données du fournisseur (Oxford Glycosystems, Abingdon, Grande-Bretagne) et à partir des différents éléments bibliographiques disponibles.

L'illustration des spécificités enzymatiques est basée sur la digestion des témoins LNT-2AB et lactose-2AB. Les chromatogrammes HPLC obtenus pour ces échantillons sont reproduits dans la figure 99. Les profils comportent deux pics majeurs, le premier, au volume mort de la colonne, correspondant aux sels et le second, à l'oligosaccharide dérivé, digéré ou non. Dans le cas du LNT-2AB, l'on note une différence dans le profil chromatographique, qui se traduit au niveau des temps de rétention. Suite à la mise en présence de la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae*, le LNT-2AB, comme attendu, n'est pas digéré, le temps de rétention est sensiblement le même que celui obtenu dans le cas de l'injection du LNT-2AB témoin. A contrario, l'action de la β -galactosidase de bovine testis génère un composé dont le temps de rétention est différent de celui du témoin. Ceci montre que la simple absence du résidu de galactose en position terminale non réductrice permet d'influer sensiblement sur le comportement chromatographique du dérivé. Dans le cas du lactose-2AB, pour lequel l'on peut attendre une digestion par les deux enzymes, l'on constate que, si tel est le cas pour la β -galactosidase de bovine testis, pour l'échantillon soumis à la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae*, aucune modification du temps de rétention n'est constatée, laissant présager une absence de digestion. Par comparaison, l'échantillon 2AGN1-2AB (fig. 99 page 184) présente dans les deux cas de digestions, une élution plus rapide n'établissant aucune différence entre les deux enzymes. L'ensemble de ces résultats est confirmée par MALDMS.

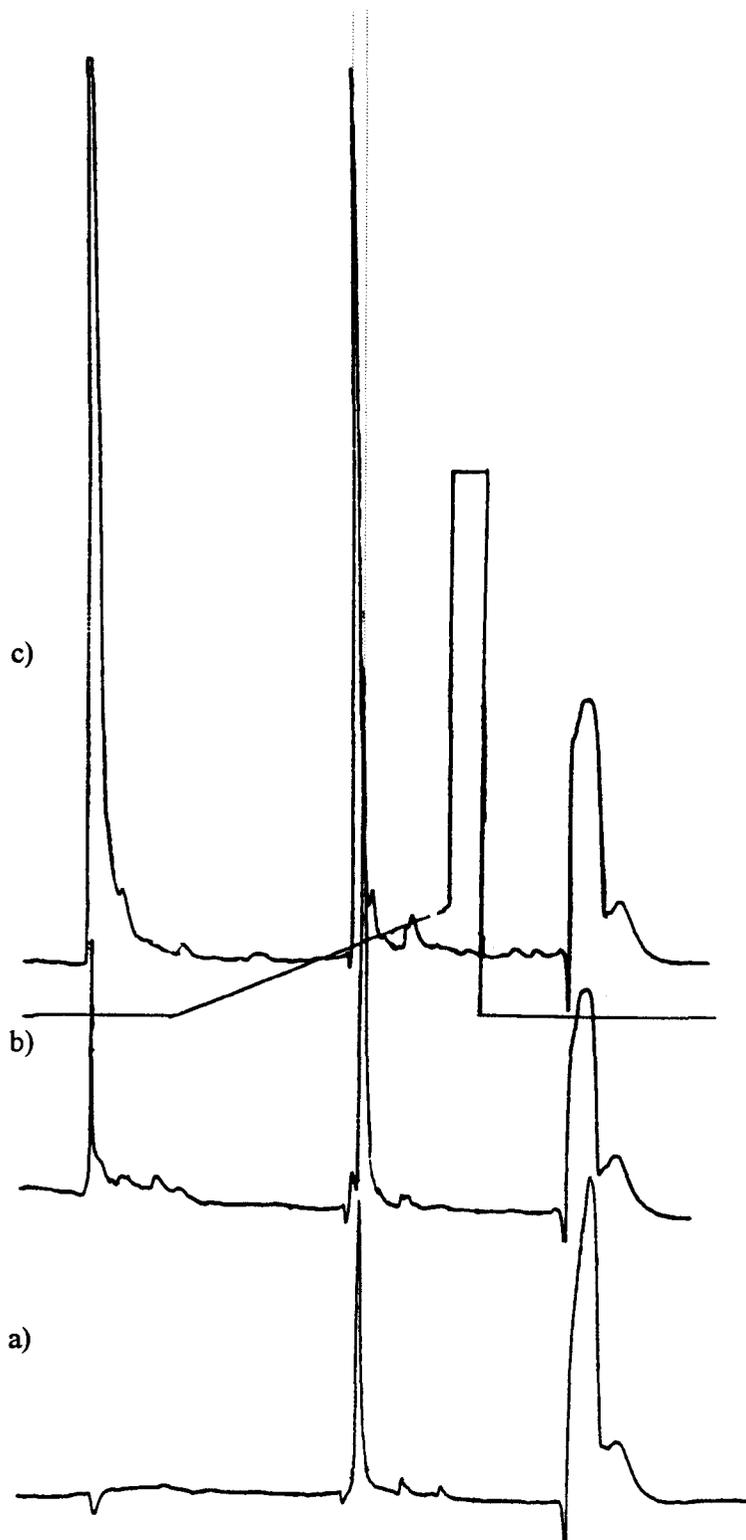


figure 99 (suite) - Chromatogrammes HPLC en phase inverse du dérivé LNT-2AB (a), du LNT-2AB digéré par la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (b), du LNT-2AB digéré par la β -galactosidase de bovine testis (c)

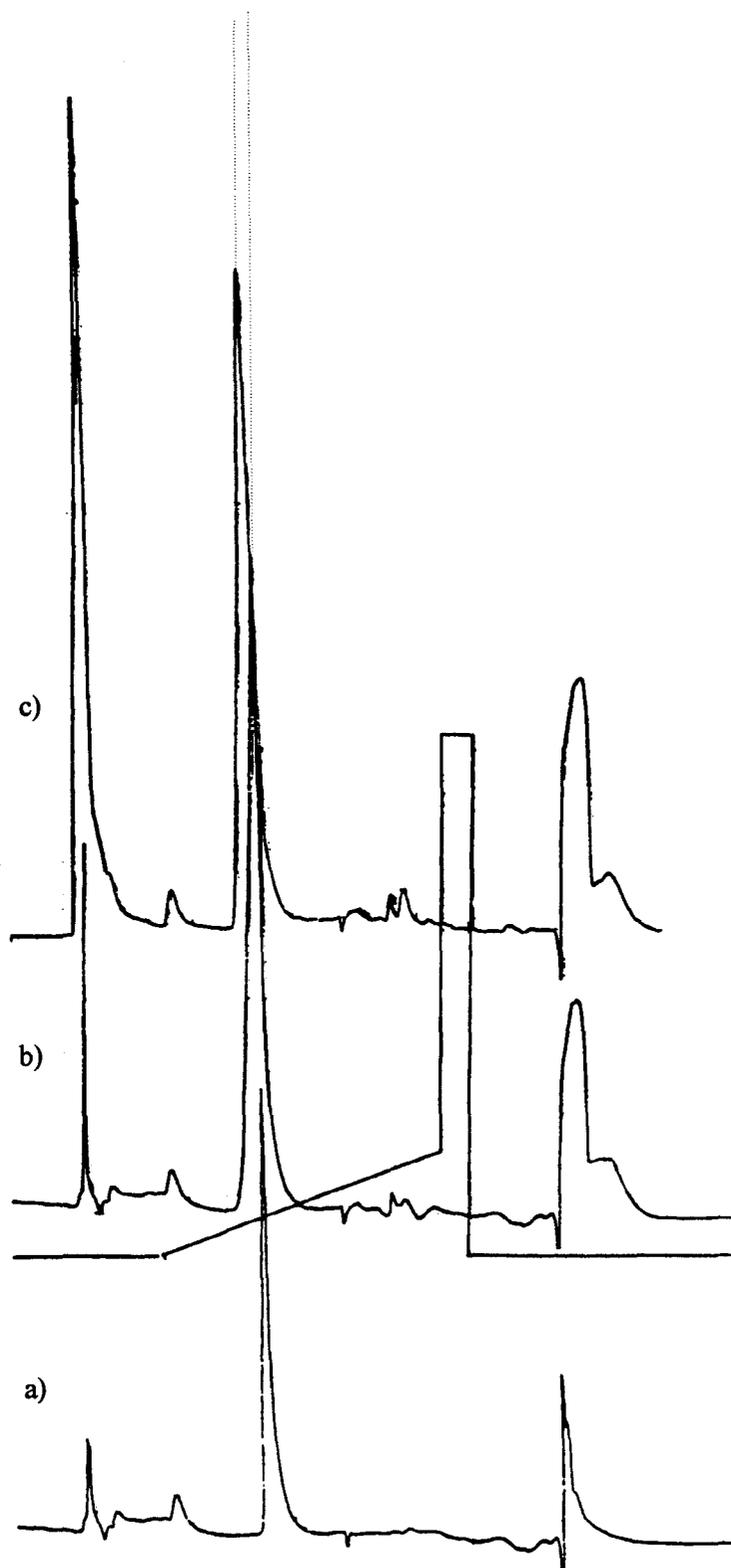


figure 99 (suite) - Chromatogrammes HPLC en phase inverse du dérivé Lac-2AB (a), du Lac-2AB digéré par la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (b), du Lac-2AB digéré par la β -galactosidase de bovine testis (c)



figure 99 (suite) - Chromatogrammes HPLC en phase inverse du dérivé 2AGN₁-2AB (a), du 2AGN₁-2AB digéré par la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (b), du 2AGN₁-2AB digéré par la β -galactosidase de bovine testis (c)

Les spectres obtenus avant et après digestions sont présentés dans la figure 100. Les masses enregistrées confirment la digestion du LNT-2AB par la β -galactosidase de bovine testis et l'absence de digestion par celle de *Streptococcus pneumoniae*, la digestion par les deux enzymes de l'oligosaccharide 2AGN1-2AB. Ces résultats sont en tout point concordants avec les spécificités annoncées des enzymes et les structures établies des témoins. Le cas du lactose-2AB illustre la spécificité aglyconnique de l'enzyme bactérienne. Il s'avère que cette dernière n'a pas libéré, comme attendu, le résidu de galactose du lactose-2AB, alors que les conditions choisies sont efficaces pour la digestion du 2AGN1-2AB. Or, pour les deux témoins, le type de liaison est le même. L'on peut supposer que la nature du résidu porteur du galactose, en l'occurrence Glc-2AB, empêche l'action enzymatique. Ces expériences montrent que, même dans le cas du choix d'enzymes à spécificité large, des contraintes liées notamment à la nature de l'aglycone existent.

Digestion par la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean

Seconde enzyme étudiée en suivant la séquence classique des branches d'un N-glycane, la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean a été testée selon les conditions établies page 206. Les digestats purifiés précédemment lors de l'étude des β -galactosidases sont utilisés comme témoins. Le profil chromatographique obtenu dans le cas du 2AGN1-2AB dégalactosylé (fig 101a) met en évidence un pic unique, prouvant ainsi que la réaction a été totale, le temps de rétention du produit étant nettement inférieur à celui de départ, ceci permet de supposer que la digestion est effective. Dans le cas du LNT-2AB dégalactosylé (fig 101b), on détecte un pic à un temps de rétention concordant avec celui du lactose-2AB, résultat attendu, mais également un pic largement majoritaire au temps de rétention du produit de départ, manifestement non complètement digéré. Ces hypothèses sont confirmées par les spectres MALDMS des digestats purifiés. Le 2AGN1-2AB dégalactosylé et digéré par la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean donne naissance à un composé détecté par le signal $[M+Na]^+$ à m/z 850 (fig. 102), correspondant à un résidu de GlcNAc-2AB porteur de 3 mannoses. Les deux pics du digestat du LNT confirment le profil chromatographique, à savoir une digestion partielle de

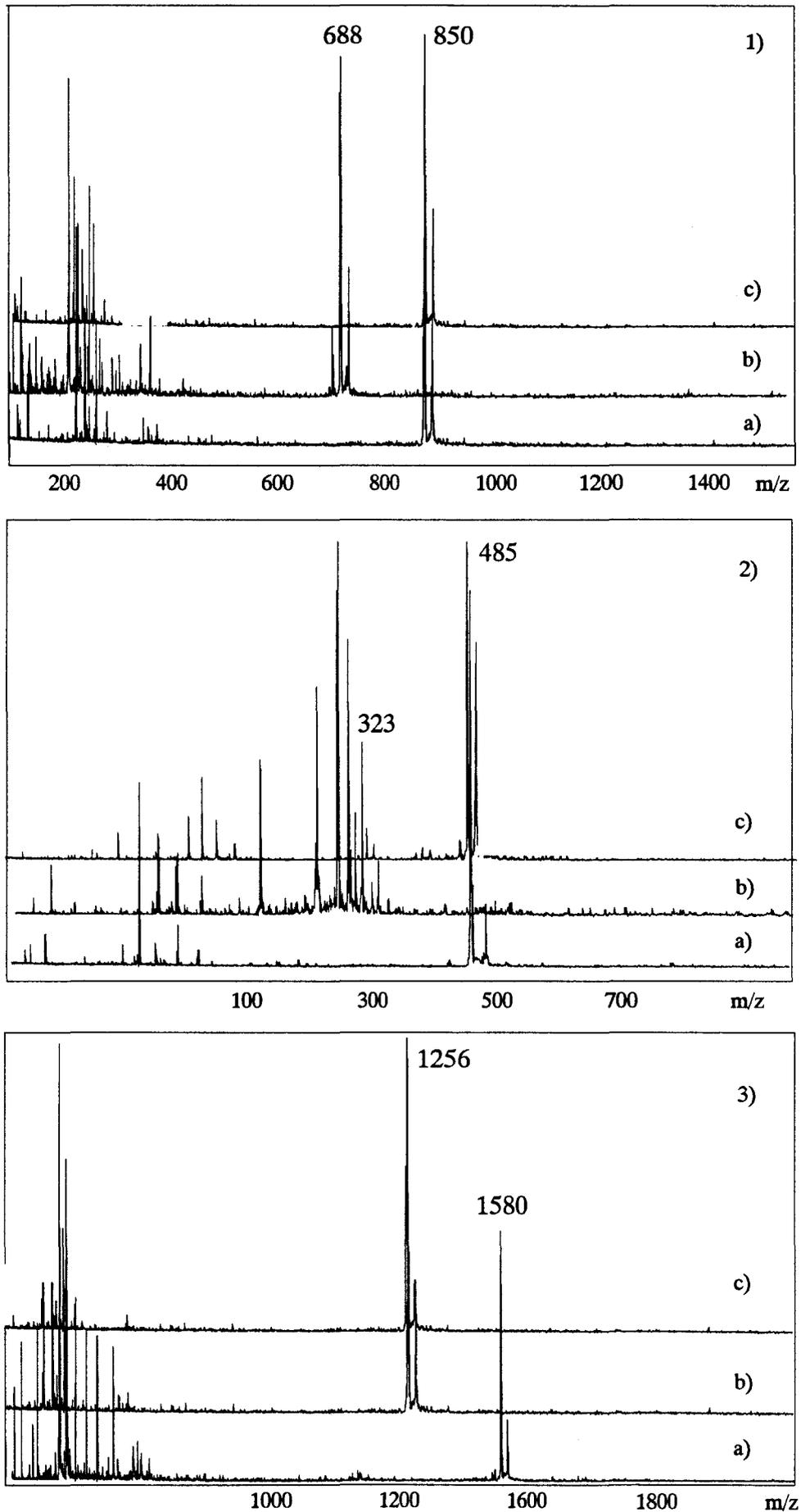


figure 100 – Spectres MALDMS des oligosaccharides dérivés par amination réductive (a) et des digestats enzymatiques correspondants par la β -galactosidase de bovine testis (b) et par la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (c) : LNT-2AB (1), Lac-2AB (2), 2AGN1-2AB (3)

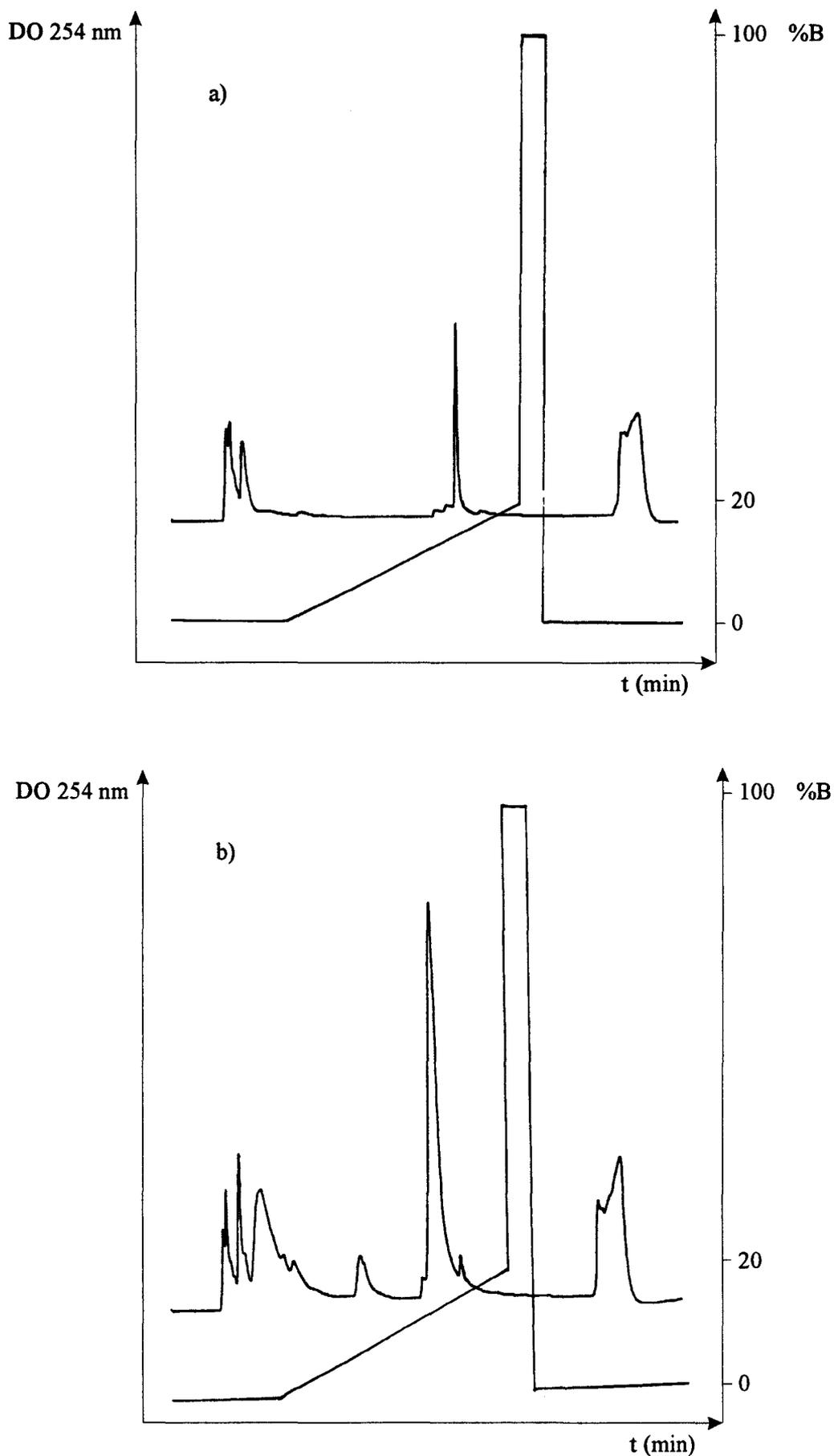


figure 101 - Chromatogrammes HPLC en phase inverse du 2AGN₁-2AB dégalactosylé digéré par la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean (a), du LNT-2AB dégalactosylé digéré par la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean (b)

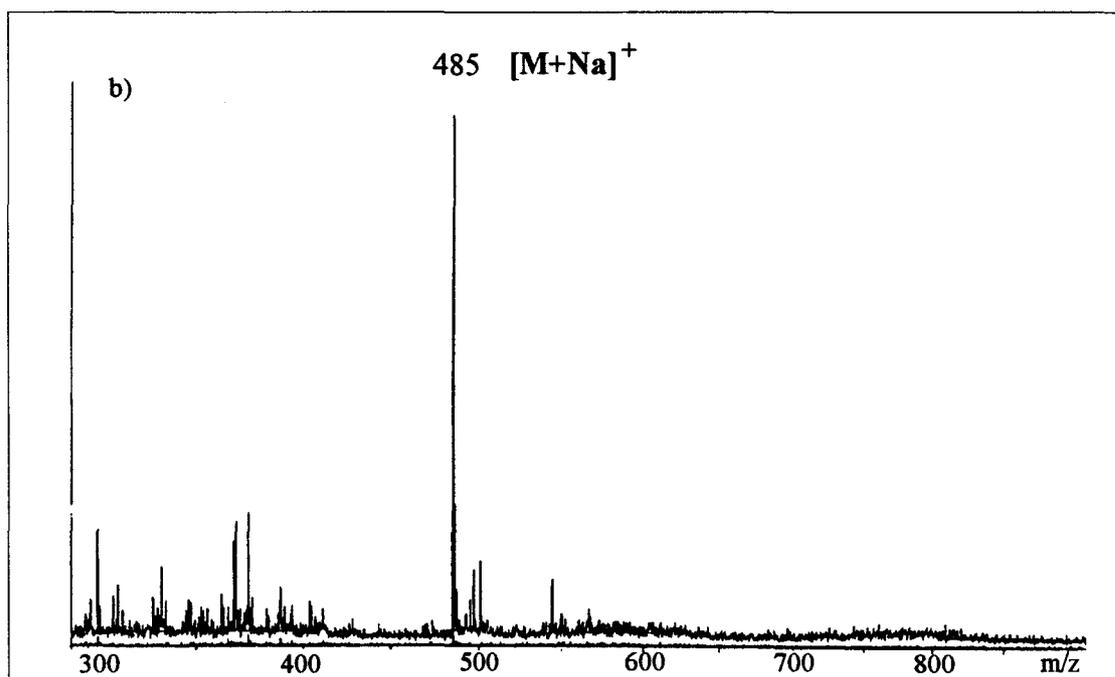
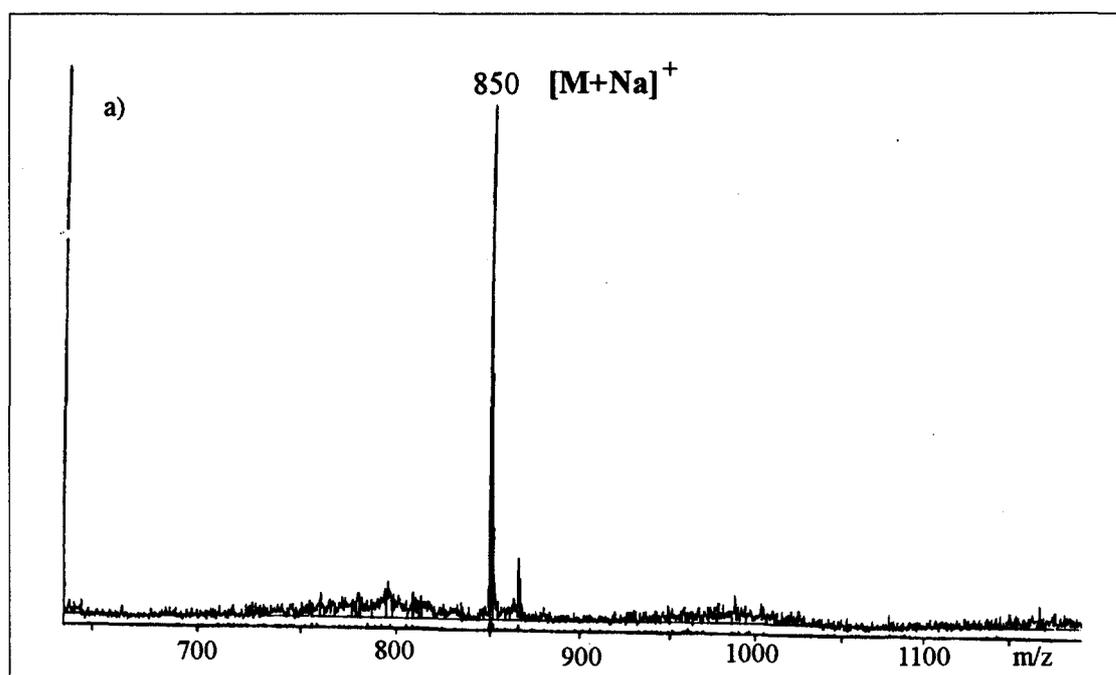


figure 102 - Spectres MALDMS du 2AGN₁-2AB dégalactosylé digéré par la β-N-acétylhexosaminidase de Jack bean (a), du LNT-2AB dégalactosylé digéré par la β-N-acétylhexosaminidase de Jack bean (b)

l'échantillon donnant naissance à du lactose-2AB. Un tel comportement de l'enzyme est explicable au regard de sa spécificité. La différence entre l'oligosaccharide issu de 2AGN1-2AB et celui provenant du LNT-2AB consiste dans le type de liaison du résidu de N-acétylhexosamine, respectivement en $\beta(1-2)$ Man et $\beta(1-3)$ Gal. Nous mettons ainsi en évidence l'existence d'une différence d'hydrolyse non mentionnée dans les caractéristiques de l'enzyme considérée et qui ont trait tant au type de liaison qu'au monosaccharide porteur. Cependant, dans la stratégie développée, cette différence ne constitue pas un handicap majeur, puisque le motif GlcNAc $\beta(1-3)$ Gal, constitutif des structures poly-N-acétyllactosaminiques, peut être ainsi indirectement mis en évidence.

Digestion par l' α -galactosidase de green coffee bean

La mise au point des conditions proposées pour l'utilisation de cette enzyme (page 206) a été réalisée à partir de deux témoins, le lactose-2AB et un digalactoside dérivé de formule Gal $\alpha(1-4)$ Gal-2AB. Comme prévu, la chromatographie des digestats enzymatiques de ces échantillons permet de mettre en évidence la spécificité de l'enzyme, par l'absence de digestion du lactose dérivé et par l'obtention confirmée par MALDMS de Gal-2AB, à partir du digalactoside dérivé.

Digestion par l' α -mannosidase de Jack bean

L' α -mannosidase de Jack bean est une enzyme présentant une spécificité particulière, comparativement aux enzymes décrites jusqu'à présent. Elle peut hydrolyser la liaison glycosidique d'un résidu de mannose lié en $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-2)$ et $\alpha(1-3)$, avec des différences cinétiques. Mais surtout, elle possède la capacité de distinguer les résidus de mannose liés en α au sein du core pentasaccharidique. Elle peut ainsi libérer le mannose en liaison $\alpha(1-3)$ alors que le même résidu en $\alpha(1-6)$ est résistant à l'hydrolyse (Yoshima *et al.*, 1980). Les conditions de digestion permettant ce type de distinction n'ont, toutefois, pas pu être établies faute de témoins utilisables dans les conditions décrites. Nous reviendrons sur la discussion du comportement de cette enzyme lors de l'analyse de l'échantillon 2ANeuAc-2AB.

4.3.2. Application des digestions enzymatiques à la caractérisation de N-glycannes

L'ensemble des conditions telles qu'elles ont pu être définies précédemment a été appliqué à la caractérisation d'un N-glycane, dénommé 2ANeuAc et dont la formule est donnée dans l'annexe 3. Ce N-glycane a été fourni par les Docteurs Plancke et Strecker que nous remercions. Il présente la particularité de porter en positions terminales réductrices de ses deux antennes, un résidu d'acide N-acétylneuraminique et un résidu de galactose lié en α .

Cet oligosaccharide sialylé a été soumis à la dérivation par amination réductive (protocole page 204) et purifié par RP-HPLC. La figure 103 montre le chromatogramme obtenu. On y distingue deux pics importants laissant supposer l'existence d'au moins deux composés dans cette fraction glycanique. L'analyse par MALDMS de ces composés confirme ce fait en mettant en évidence une série d'oligosaccharides neutres dans le premier pic chromatographique et une série d'oligosaccharides sialylés éluée dans le second pic (fig. 104). Cet échantillon s'avère être un mélange comme une analyse par MALDMS de la fraction native le laissait supposer. La masse moléculaire des espèces détectées permet de poser des hypothèses de structures que nous allons tenter de confirmer par les digestions enzymatiques séquentielles. L'hypothèse générale est que chaque famille d'oligosaccharides, neutre ou sialylée, renferme des structures déduites les unes des autres, ces mélanges devant se simplifier progressivement par l'action des enzymes. Le principe adopté lors de cette caractérisation est le même que celui décrit pour les oligosaccharides témoins lors de la mise au point des conditions de digestion, à savoir la séquence digestion enzymatique-purification par RP-HPLC et analyse par MALDMS. Toutefois, chaque fraction étant un mélange relativement complexe, il n'est pas possible d'établir l'efficacité des enzymes par la seule comparaison des temps de rétention, ceux-ci ne variant pas de façon significative par rapport au chromatogramme obtenu lors de la purification des dérivés. Nous discuterons donc des résultats en nous basant sur les spectres MALDMS.

Analyse de la fraction sialylée de l'échantillon 2ANeuAc

A partir du second pic collecté lors de la purification du produit de l'amination réductive, nous avons procédé à une série de digestions faisant intervenir en séquence l' α -galactosidase

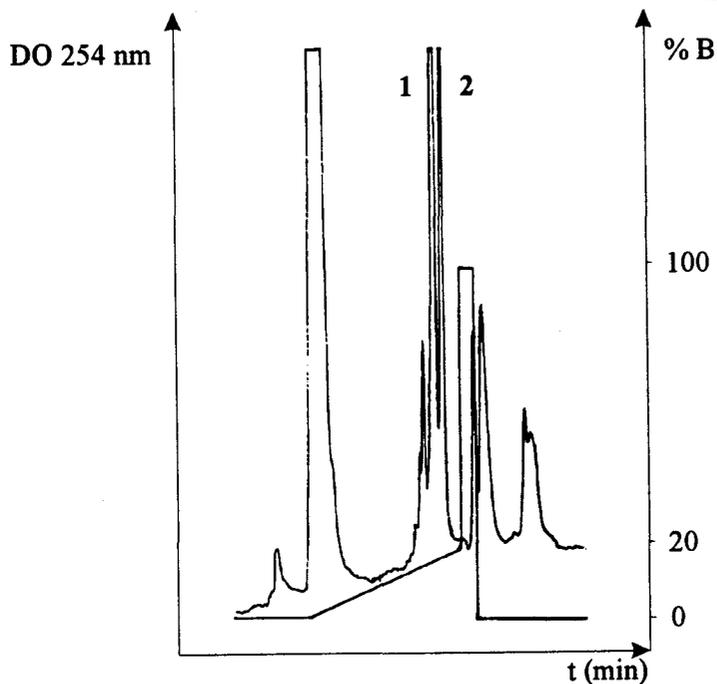


figure 103 – Chromatogramme HPLC en phase inverse de l'échantillon dérivé 2ANeuAc-2AB

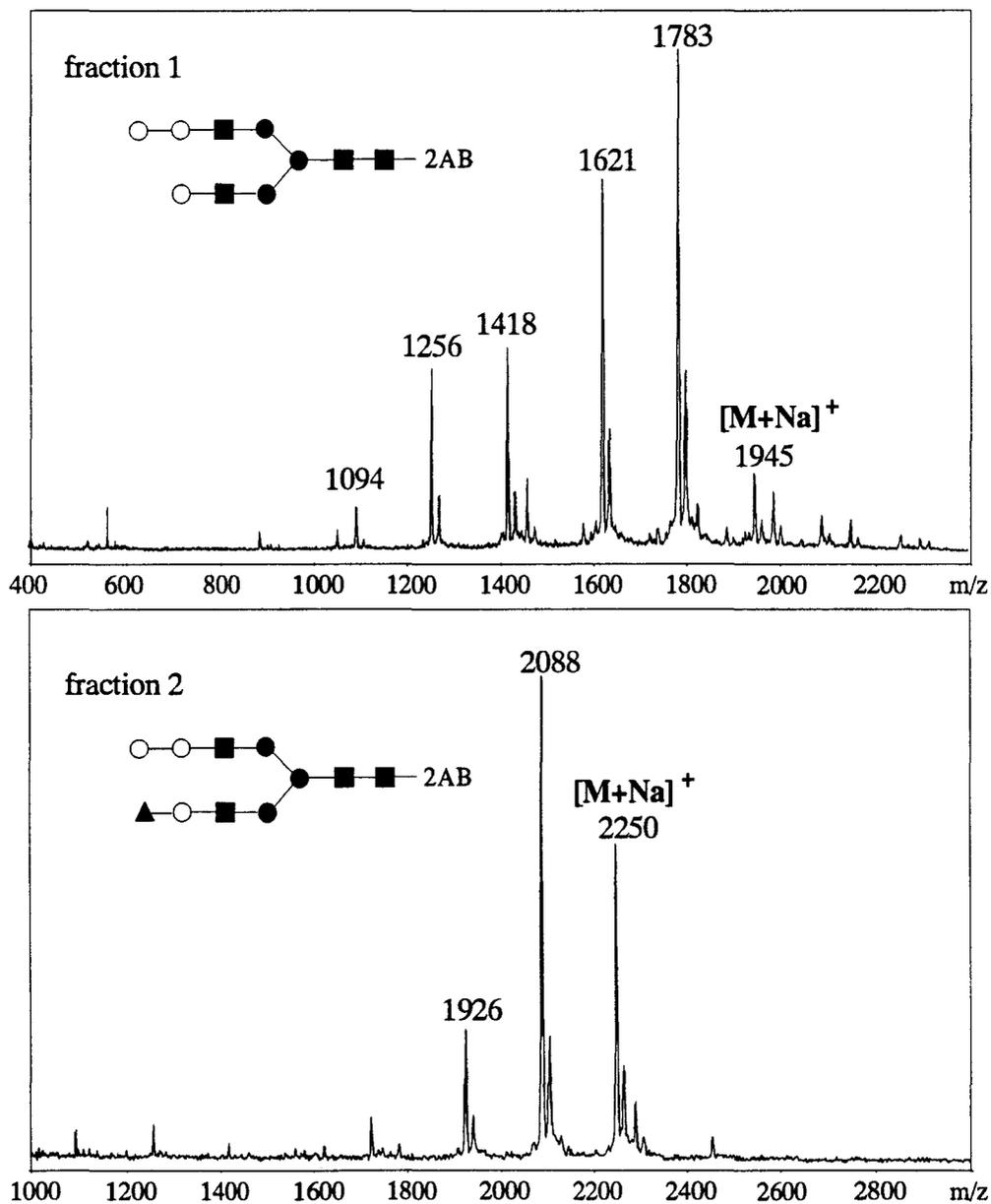


figure 104 – Spectres MALDMS des deux fractions composant l'échantillon 2ANeuAc-2AB

de green coffee bean, la β -galactosidase de bovine testis, puis la β -N-acétylhexosaminidase et l' α -mannosidase de Jack bean.

L'ensemble des spectres obtenus est intégré dans la figure 105. Comme supposé, le mélange initial se résout à chaque digestion enzymatique. Suite à la digestion par la β -galactosidase de bovine testis, ne subsiste qu'un pic unique dont la masse moléculaire est successivement égale à 1903 uma, puis 1700 uma après action de la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean. Le spectre obtenu, suite à la digestion par l' α -mannosidase de Jack bean, montre un signal $[M+Na]^+$ dominant à m/z 1723 ainsi qu'un signal, équivalant à 20% du précédent, à m/z 1561. La différence de masse entre les deux signaux concorde avec le clivage de la liaison glycosidique d'un hexose. L'on peut donc conclure que l'enzyme n'est parvenue que partiellement à libérer un résidu de mannose. Etant donnée sa spécificité, l'on peut en déduire que ce résidu est sans nul doute lié au mannose disubstitué du core pentasaccharidique par une liaison en $\alpha(1-6)$, ce qui suggère la position du résidu d'acide sialique sur la branche inférieure de l'oligosaccharide.

Analyse de la fraction neutre de l'échantillon 2ANeuAc

Une étude similaire est réalisée sur la fraction neutre de l'échantillon 2ANeuAc-2AB. La séquence enzymatique fait, dans ce cas, intervenir la β -galactosidase de bovine testis, puis la β -N-acétylhexosaminidase et l' α -mannosidase de Jack bean. Cette fraction est plus complexe puisque l'on ne distingue pas moins de 6 signaux attribuables à des oligosaccharides dérivés (fig. 106). Le mélange se résout progressivement générant respectivement 4 puis 3 signaux après l'action des deux premières enzymes. A partir du mélange obtenu, l' α -mannosidase de Jack bean donne naissance à 3 composés. Un premier signal $[M+Na]^+$ à m/z 1418 met en évidence la libération quantitative d'un résidu de mannose. Etant donnée la spécificité de cette enzyme, on peut en conclure que le résidu libéré est lié en $\alpha(1-3)$ au sein de la structure oligosaccharidique. Ce résultat confirme la conclusion obtenue précédemment lors de l'étude de la fraction sialylée de l'échantillon 2ANeuAc. Il est ainsi possible de positionner relativement le résidu de galactose en α sur la branche supérieure de l'oligosaccharide et le résidu d'acide N-acétylneuraminique sur la branche inférieure. L'on détecte également la

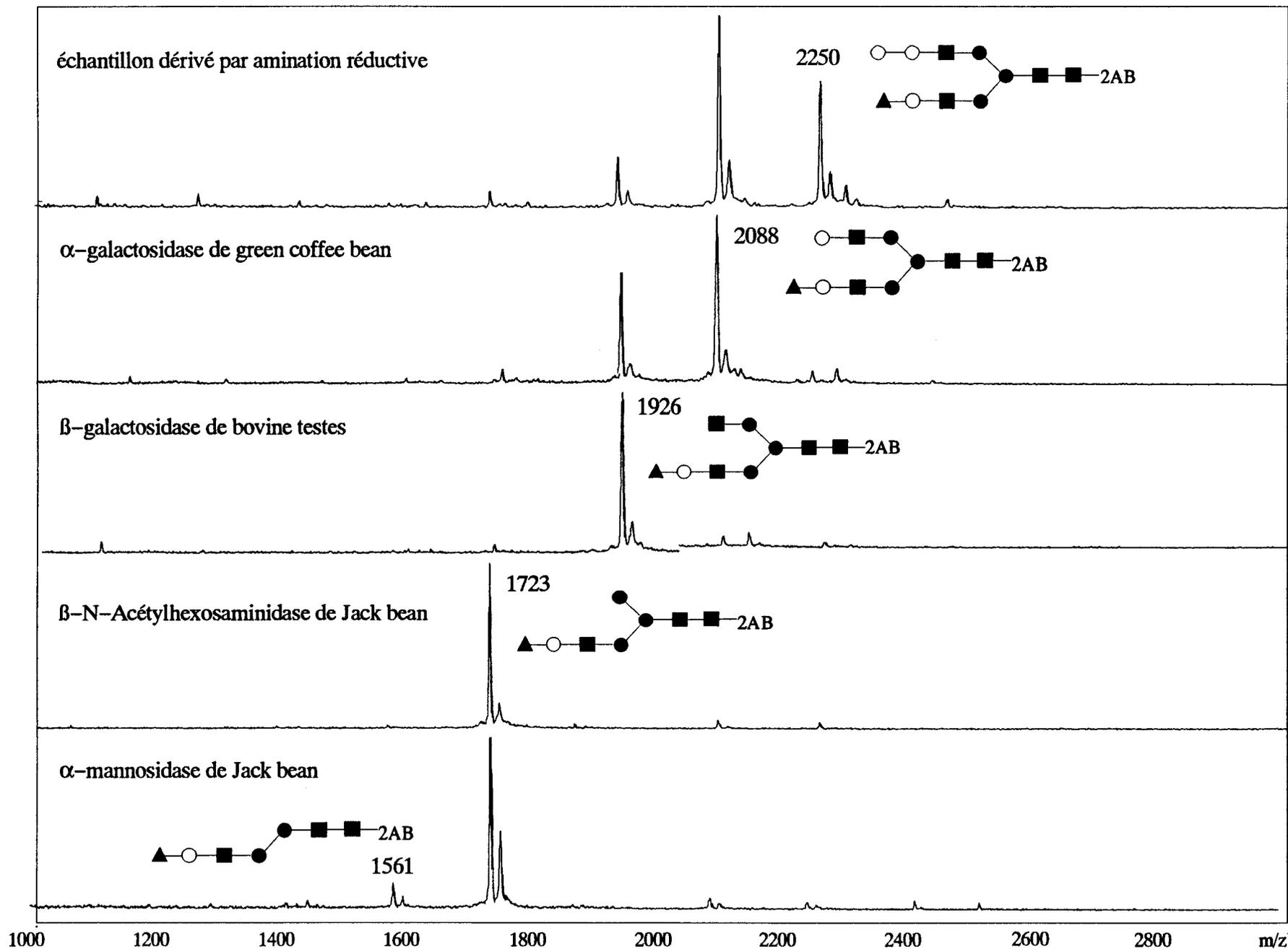


figure 105 - Spectres MALDMS des digestats enzymatiques successifs de la fraction sialylée de l'échantillon 2ANeuAc-2AB

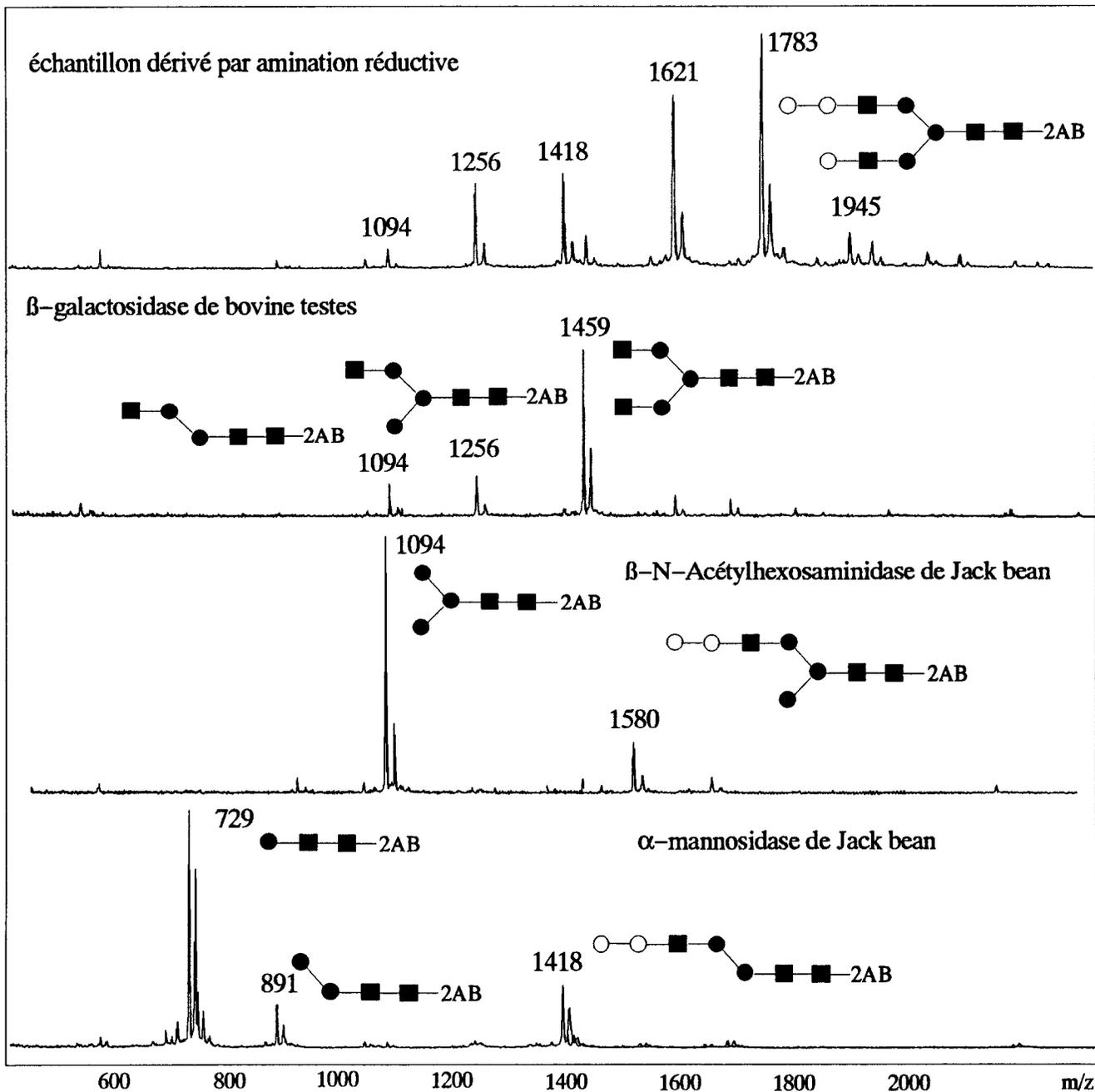


figure 106 – Spectres MALDMS des digestats enzymatiques successifs de la fraction neutre de l'échantillon 2ANeuAc-2AB

présence d'un signal $[M+Na]^+$ à m/z 729. Ce dernier est issu d'une digestion poussée de l'oligosaccharide détecté par le signal $[M+Na]^+$ à m/z 891. Cette digestion n'est cependant pas quantitative. On peut ainsi en déduire la liaison en $\alpha(1-6)$ du mannose partiellement libéré et la structure de cet oligosaccharide.

4.4. Conclusion

Le dernier volet de la stratégie, développé dans ce chapitre, nous permet d'élucider sans ambiguïté les configurations des carbones anomériques, par l'utilisation en séquence d'exoglycosidases et de l'analyse des produits de digestion par MALDMS. L'application de cette technique à un échantillon renfermant des N-glycannes, de type complexe, illustre la faisabilité de la méthode. Les anoméries de liaison, ainsi que la séquence, des monosaccharides constitutifs des branches de ces N-glycannes sont ainsi confirmées. Il nous est également possible, par la détermination de la nature du résidu de mannose porteur de chaque branche, de positionner relativement les extrémités terminales non réductrices différentes, en l'occurrence un résidu de galactose lié en α et un résidu d'acide N-acétylneuraminique.

La résolution progressive des mélanges d'oligosaccharides dérivés, neutres et sialylés, confirme, en outre, notre hypothèse de base. Les différentes structures des fractions glycaniques composant l'échantillon 2A-NeuAc se déduisent les unes des autres par addition d'un ou plusieurs monosaccharides. La technique mise au point apparaît ainsi applicable à l'analyse de mélanges complexes.

Conclusion et Perspectives

Les résultats obtenus, au cours de ce travail, nous permettent de proposer trois approches distinctes, applicables à la caractérisation structurale détaillée de glycannes de glycoconjugués et utilisant le potentiel de la spectrométrie de masse, notamment par l'analyse en tandem et l'usage des nouvelles techniques d'ionisation que sont l'électrospray ou la désorption laser assistée par matrice.

Dans un premier temps, nous avons démontré l'intérêt de la dérivation, et plus particulièrement de la méthylation, dans l'obtention d'informations structurales pertinentes relatives à la séquence des glycannes, grâce à l'emploi de la spectrométrie de masse en tandem (ESMS/MS, MALD/PSDMS). Les fragments observés nous permettent de déterminer, sans ambiguïté, la séquence des monosaccharides constitutifs et de localiser les points de branchement. Dans le cas plus particulier des résidus de N-acétylhexosamine, la rupture préférentielle de leurs liaisons glycosidiques génère des fragments permettant la détermination du type de liaison des substituants de ces monosaccharides. Ces mêmes ions sont observables dès la source et peuvent être analysés par spectrométrie de masse en tandem, confirmant indiscutablement par leur fragmentation et la structure qui en découle, les substitutions des résidus de N-acétylhexosamine. Cette approche novatrice, apparentée à la MS³, nous permet d'envisager l'application de cette technique à l'analyse d'échantillons glycaniques de structure complexe grâce à la mise en évidence de tels motifs.

La deuxième approche élaborée concerne plus particulièrement la détermination du type de liaison des monosaccharides constitutifs par l'analyse par GC/MS/MS des produits de dégradation des oligosaccharides perméthylés. Cette technique, variante de la méthode de Lindberg, est d'utilisation simple et performante. Elle présente deux atouts majeurs par la simplicité des chromatogrammes obtenus et du nombre restreint de standards chromatographiques nécessaires pour la détermination de la nature des dérivés monosaccharidiques. L'analyse par CIMS des ions oxoniums issus des dérivés préparés nous permet de positionner les oses au sein de la séquence glycosidique. L'examen par spectrométrie de masse en tandem des fragments secondaires de ces ions, obtenus par perte de méthanol, livre le type de liaison de chaque dérivé considéré. Les résultats montrent l'application possible de cette technique à

tout type d'hexose ou de N-acétylhexosamine couramment rencontrés dans les structures glycaniques, et ce, indépendamment de leur degré de substitution. Les éventuelles coélutions d'oses de substitution équivalente, mais de type de liaison différent, peuvent être également solutionnées par une approche analogue utilisant des dérivés éthylés.

Le dernier volet de notre travail a pour objet la détermination de la configuration des carbones anomériques, au sein des glycannes. Ces données sont aisément obtenues par l'utilisation conjointe de digestions enzymatiques séquentielles d'oligosaccharides dérivés par amination réductive et de l'analyse des produits par MALDMS. Une telle technique permet, en outre, de confirmer la séquence glycosidique et de positionner, aux extrémités non réductrices des branches, différents monosaccharides comme des résidus d'acide sialique, de galactose...

L'ensemble des analyses développées tout au long de ce travail a porté sur des oligosaccharides témoins, mimant tout ou partie des structures glycaniques. Dans tous les cas, le facteur limitant n'est pas la spectrométrie de masse, quel que soit le mode considéré, mais bien les étapes chimiques, et dans une moindre mesure, enzymatiques. Classiquement les analyses effectuées ont permis de traiter des quantités d'échantillons inférieures ou égales à la nanomole. Des expériences préliminaires ont montré la possibilité d'appliquer ces techniques à des quantités de glycannes de l'ordre de la dizaine de picomoles. Les travaux ultérieurs vont tendre à confirmer voire dépasser cette limite.

Nous nous proposons, dans l'introduction de ce travail, de mettre en oeuvre une stratégie intégrée de caractérisation de la structure de glycannes issus de glycoconjugués. Nous avons pu démontrer, qu'à partir d'un oligosaccharide dérivé par amination réductive, il nous est possible, après méthylation, d'établir sa séquence glycosidique par ESMS/MS. L'analyse par GC/MS/MS des dérivés préparés, à partir du même oligosaccharide perméthylé, nous livre les types de liaison des oses constitutifs. La digestion séquentielle de l'oligosaccharide dérivé par amination réductive, grâce à des exoglycosidases choisies en fonction de la séquence déduite des résultats obtenus précédemment, nous permet de déterminer la configuration des carbones anomériques. Se trouvent ainsi aisément solutionnées, grâce aux trois approches composant notre stratégie, les principales caractéristiques structurales des glycannes, à savoir, la séquence,

les liaisons glycosidiques et la configuration des carbones anomériques. Le prolongement d'une telle stratégie va consister en son application à un éventail plus large d'oligosaccharides, afin de solutionner des problèmes spécifiques comme l'antennarisation, la présence de motifs poly-N-acétyllactosaminiques ou de substituants non osidiques.

Appendice Technique

**CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE MOLECULES GLUCIDIQUES ET
REVELATION A L'ORCINOL SULFURIQUE**

Réactifs

- Feuilles d'aluminium pour chromatographie sur couche mince gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck)
- n-Butanol
- Acide acétique glacial
- Acide sulfurique
- 3,5 Dihydroxytoluène (Merck)

Méthode

1 – Solvant de chromatographie

nBuOH/AcOH/H₂O 2:1:1,5

2 – Réactif de révélation à l'orcinol

Dissoudre 2g de 3,5 dihydroxytoluène dans 1l d'acide sulfurique à 20%.

Pulvériser le réactif sur la plaque et révéler la coloration à température élevée (100°C)

3 – Exploitation des résultats

Avant révélation à l'orcinol sulfurique, une lecture sous lampe UV est possible pour la détection spécifique des oligosaccharides dérivés par amination réductive.

**DERIVATION PAR AMINATION REDUCTIVE DES OLIGOSACCHARIDES
REDUCTEURS PAR LA 2-AMINOBENZAMIDE**

Réactifs

- 2-Aminobenzamide (Fluka)
- Méthanol
- Acide acétique glacial
- Cyanoborohydrure de sodium (Aldrich)

Méthode**1 – Préparation de l'oligosaccharide dérivé**

Dissoudre 100 nmoles d'oligosaccharide réducteur dans un vial par 25 μ l d'eau.

Ajouter successivement 10 μ l de méthanol, 650 μ g de 2-aminobenzamide et 2,5 μ l d'acide acétique glacial. Chauffer 1h à 80°C. Refroidir à température ambiante.

Préparer la solution réductrice en mélangeant 60 μ l d'eau, 30 μ l de méthanol, 1mg de 2-aminobenzamide, 2,7 mg de cyanoborohydrure de sodium et 10 μ l d'acide acétique glacial.

Ajouter la totalité de la solution réductrice dans le vial. Chauffer 1h à 80°C. Refroidir à température ambiante.

L'oligosaccharide dérivé ainsi préparé peut être stocké à -20°C avant purification.

2 – Purification de l'oligosaccharide dérivé

Evaporer le milieu réactionnel sous azote.

Ajouter un volume d'eau. Extraire l'excès de 2-aminobenzamide par un même volume de chloroforme, éliminer la phase chloroformique. Procéder à deux lavages identiques de la phase aqueuse. Eliminer les traces éventuelles de chloroforme sous courant d'azote.

Purifier l'oligosaccharide dérivé par chromatographie de la phase aqueuse par HPLC sur colonne C18 (Vydac) (250 x 4 mm, 300Å, 5 μ m) en suivant un gradient linéaire utilisant les tampons A - H₂O + TFA 0,05% - et B - CH₃CN + TFA 0,05% -, débit 0,7 ml/min, détection UV à 254 nm.

**DERIVATION PAR AMINATION REDUCTIVE DES OLIGOSACCHARIDES
SIALYLES REDUCTEURS PAR LA 2-AMINOBENZAMIDE**

Réactifs

- 2-Aminobenzamide (Fluka)
- Méthanol
- Méthanol chlorhydrique 1N
- Acide acétique glacial
- Cyanoborohydrure de sodium (Aldrich)

Méthode**1 – Estérification de la fonction carboxylique de l'acide sialique**

Sur 100 nmoles d'oligosaccharide sialylé préalablement séché sous vide en présence de P_2O_5 , ajouter 100 μ l de méthanol chlorhydrique 1N. Laisser la réaction se dérouler à température ambiante 7h durant.

Evaporer le réactif sous courant d'azote.

2 – Préparation de l'oligosaccharide dérivé

Dissoudre l'oligosaccharide sialylé réducteur ainsi méthylestérifié par 25 μ l d'eau.

Ajouter successivement 10 μ l de méthanol, 650 μ g de 2-Aminobenzamide et 2,5 μ l d'acide acétique glacial. Chauffer 1h à 60°C. Refroidir à température ambiante.

Préparer la solution réductrice en mélangeant 60 μ l d'eau, 30 μ l de méthanol, 1mg de 2-aminobenzamide, 2,7 mg de cyanoborohydrure de sodium et 10 μ l d'acide acétique glacial.

Ajouter la totalité de la solution réductrice dans le vial. Chauffer 1h à 60°C. Refroidir à température ambiante.

L'oligosaccharide dérivé ainsi préparé peut être stocké à -20°C avant purification.

2 – Purification de l'oligosaccharide dérivé

Evaporer le milieu réactionnel sous azote.

Ajouter un volume d'eau. Extraire l'excès de 2-aminobenzamide par un même volume de chloroforme, éliminer la phase chloroformique. Procéder à deux lavages identiques de la phase aqueuse. Eliminer les traces éventuelles de chloroforme par bullage d'azote.

Purifier l'oligosaccharide dérivé par chromatographie de la phase aqueuse par HPLC sur colonne C18 (Vydac) (250 x 4 mm, 300Å, 5 μ m) suivant un gradient linéaire utilisant les tampons A - H₂O + TFA 0,05% - et B - CH₃CN + TFA 0,05% -, débit 0,7 ml/min, détection UV à 254 nm.

**DIGESTION ENZYMATIQUE D'OLIGOSACCHARIDES DERIVES AU 2-AB
PAR DIFFERENTES EXOGLYCOSIDASES****Réactifs**

- β -galactosidase de bovine testis (Oxford Glycosystems)
- β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (Oxford Glycosystems)
- β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean (Oxford Glycosystems)
- α -galactosidase de green coffee bean (Oxford Glycosystems)
- α -mannosidase de Jack bean (Oxford Glycosystems)

Méthode

A partir d'une quantité estimée d'oligosaccharide dérivé à la 2-aminobenzamide, purifié par RP-HPLC et séché dans un vial,

- **Digestion par la β -galactosidase de bovine testis**

Conditions de digestion :

- concentration du substrat : 120 μ moles/l de Gal accessible
- concentration de l'enzyme : 0,2 U/ml

Dissoudre l'échantillon par le tampon citrate de sodium/phosphate de sodium 100mM, pH 4,0. Le volume additionné correspond au 1/5ème du volume total.

Additionner le volume correspondant de solution enzymatique ainsi que le complément en eau afin de respecter les conditions prédéfinies en concentration de substrat et d'enzyme.

- **Digestion par la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae***

Conditions de digestion :

- concentration du substrat : 115 μ moles/l de Gal accessible
- concentration de l'enzyme : 80 mU/ml

Dissoudre l'échantillon par le tampon acétate de sodium 100mM, pH 6,0. Le volume additionné correspond au 1/5ème du volume total.

Additionner le volume correspondant de solution enzymatique ainsi que le complément en eau afin de respecter les conditions prédéfinies en concentration de substrat et d'enzyme.

• **Digestion par la β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean**

Conditions de digestion :

- concentration du substrat : 260 μ moles/l de HexNAc accessible
- concentration de l'enzyme : 10 U/ml

Dissoudre l'échantillon par le tampon citrate de sodium/phosphate de sodium 100mM, pH 5,0. Le volume additionné correspond au 1/5ème du volume total.

Additionner le volume correspondant de solution enzymatique ainsi que le complément en eau afin de respecter les conditions prédéfinies en concentration de substrat et d'enzyme.

• **Digestion par la α -galactosidase de green coffee bean**

Conditions de digestion :

- concentration du substrat : 350 μ moles/l de Gal accessible
- concentration de l'enzyme : 5 U/ml

Dissoudre l'échantillon par le tampon citrate de sodium/phosphate de sodium 100mM, pH 6,0. Le volume additionné correspond au 1/5ème du volume total.

Additionner le volume correspondant de solution enzymatique ainsi que le complément en eau afin de respecter les conditions prédéfinies en concentration de substrat et d'enzyme.

• **Digestion par la α -mannosidase de Jack bean**

Conditions de digestion :

- concentration du substrat : 50 μ moles/l de Man accessible
- concentration de l'enzyme : 2,5 U/ml

Dissoudre l'échantillon par le tampon acétate de sodium 100mM, 2mM Zn^{2+} , pH 5,0. Le volume additionné correspond au 1/5ème du volume total.

Additionner le volume correspondant de solution enzymatique ainsi que le complément en eau afin de respecter les conditions prédéfinies en concentration de substrat et d'enzyme.

Incuber chaque digestat 24h à 37°C.

Arrêter la digestion enzymatique par ébullition 2 minutes à 100°C.

- **Exploitation des résultats**

Les digestats enzymatiques peuvent être analysés directement par TLC comme décrit page 202 ou après purification de l'oligosaccharide dérivé digéré suivant les conditions d'HPLC décrites page 203. La mesure de la masse moléculaire de l'oligosaccharide peut s'envisager notamment par MALDMS (page 213).

**ETHANOLYSE/DEUTEROMETHANOLYSE DES OLIGOSACCHARIDES
PERMETHYLES**

Réactifs

- Ethanol ou 1,1,1-trideutérométhanol (Fluka)
- Chlorure d'acétyle (Fluka)
- Pyridine
- Anhydride acétique

Méthode

1 – Préparation de l'éthanol ou du deutérométhanol chlorhydrique

L'agent de solvolysé peut être préparé selon l'une ou l'autre des méthodes répertoriées par Chaplin (1994) à partir d'alcool anhydre.

2 – Ethanolyse ou deutérométhanolysé

La réaction est menée dans un tube Sovirel ou un vial sur un échantillon de 100 μg par 100 μl de réactif chlorhydrique 0,5M, 24h à 80°C.

Dans le cas d'échantillons renfermant des résidus de N-acétylhexosamine, une étape supplémentaire de N-réacétylation est effectuée après solvolysé en additionnant au milieu réactionnel refroidi, 5 μl de pyridine et 10 μl d'anhydride acétique. Laisser la réaction se dérouler une nuit à température ambiante et à l'obscurité.

MARQUAGE DE L'EXTREMITÉ TERMINALE REDUCTRICE D'OLIGOSACCHARIDES PAR L'OXYGENE 18

Réactifs

- H₂¹⁸O (Aldrich)
- Méthanol anhydre
- 2-Aminopyridine (Aldrich)
- Acide acétique glacial
- Triéthylamine

Méthode

A partir de 200 nmoles d'oligosaccharide séché dans un vial une nuit sous vide en présence de P₂O₅,

• **Préparation de la solution de catalyse**

Dissoudre 2,7 mg de 2-amino-pyridine dans 1 ml de méthanol anhydre.

• **Marquage de l'oligosaccharide**

Dissoudre l'échantillon dans 100 µl d'eau marquée à l'oxygène 18, additionner 10 µl de solution de catalyse préparée avant l'emploi et 2 µl d'acide acétique.

Mettre à chauffer 5h à 90°C.

Après refroidissement, évaporer le milieu réactionnel au Speed Vac en présence de 100 µl de triéthylamine.

L'oligosaccharide ainsi marqué peut être soumis à peralkylation (page 210)

**METHYLATION/ DEUTEROMETHYLATION/ ETHYLATION
DES OLIGOSACCHARIDES**

Réactifs

- Diméthylsulfoxyde anhydre (Pierce)
- Hydroxyde de soude (pastilles) (Fluka)
- Iodure de méthyle/ Iodure de deutérométhyle/ Iodure d'éthyle (Fluka)
- Thiosulfate de sodium anhydre
- Dichlorométhane (Merck)

Méthode

A partir de 100 nmoles d'oligosaccharide préalablement séché sous vide en présence de P_2O_5 dans un tube Sovirel, disposé sous une cloche saturée en argon,

Ajouter 200 μ l de diméthylsulfoxyde et l'équivalent d'une demi pastille d'hydroxyde de soude préalablement pulvérisée au mortier.

Boucher hermétiquement le tube et soumettre l'ensemble à sonication durant 1/2h.

Congeler le tube.

Ajouter, sous argon, 200 μ l d'iodure de méthyle, deutérométhyle ou éthyle suivant le cas.

Boucher hermétiquement le tube et soumettre à nouveau à sonication durant 1h.

Stopper la réaction de dérivation par addition de 2 ml d'eau et détruire l'iode formé par addition de quelques grains de thiosulfate de sodium anhydre.

Extraire l'oligosaccharide méthylé par 1 ml de chloroforme.

Laver la phase chloroformique à 10 reprises par un volume équivalent d'eau. Evaporer la phase chloroformique précautionneusement sous courant d'azote. Répéter l'opération après addition d'un faible volume de dichlorométhane.

**METHYLATION/ DEUTEROMETHYLATION/ ETHYLATION
DES OLIGOSACCHARIDES SIALYLES**

Réactifs

- Diméthylsulfoxyde anhydre (Pierce)
- Hydroxyde de soude (pastilles) (Fluka)
- Iodure de méthyle/ Iodure de deutérométhyle/ Iodure d'éthyle (Fluka)
- Thiosulfate de sodium anhydre
- Dichlorométhane (Merck)
- Acide acétique 5 p. 100

Méthode

A partir de 100 nmoles d'oligosaccharide sialylé préalablement séché sous vide en présence de P_2O_5 dans un tube Sovirel, disposé sous une cloche saturée en argon,

Ajouter 200 μ l de diméthylsulfoxyde et l'équivalent d'une demi pastille d'hydroxyde de soude préalablement pulvérisée au mortier.
Boucher hermétiquement le tube et soumettre l'ensemble à sonication durant 1/2h.

Congeler le tube.

Ajouter, sous argon, 200 μ l d'iodure de méthyle, deutérométhyle ou éthyle suivant le cas.

Boucher hermétiquement le tube et soumettre à nouveau à sonication durant 1h.

Stopper la réaction de dérivation par addition de quelques grains de thiosulfate de sodium anhydre et de 1ml de chloroforme préalablement refroidi dans un bain de glace. Agiter. Centrifuger rapidement de façon à obtenir un culot formé par l'excès d'hydroxyde de sodium. Transférer le surnageant dans un autre tube Sovirel. Additionner de l'acide acétique 5 % pour atteindre un pH d'environ 2.

Récupérer la phase chloroformique.

Laver cette phase à 10 reprises par un volume équivalent d'eau.

Evaporer la phase chloroformique précautionneusement sous courant d'azote.

Répéter l'opération après addition d'un faible volume de dichlorométhane.

PERACETYLATION DES OLIGOSACCHARIDES

Réactifs

- Pyridine (Merck)
- Anhydride acétique (Fluka)
- Méthanol

Méthode

A partir de 100 nmoles d'oligosaccharide préalablement séché sous vide en présence de P_2O_5 dans un tube Sovirel ou dans un vial,

Procéder à l'évaporation à sec, sous courant d'azote, d'un volume de méthanol, à plusieurs reprises

Ajouter 300 μ l du mélange pyridine/ anhydride acétique 1:1

Laisser la réaction se dérouler 1 nuit à température ambiante à l'obscurité

Evaporer le milieu réactionnel sous azote, en présence de quelques gouttes de toluène, à plusieurs reprises

SPECTROMETRIE DE MASSE***Analyse des oligosaccharides dérivés par ESMS/MS***

Les spectres ESMS et ESMS/MS sont mesurés sur un appareil à triple-quadrupôles TSQ 7000 (Finnigan MAT) équipé d'un système HPLC AS3000 Spectrasystem (Thermo Separation Products).

Les échantillons sont chromatographiés sur une colonne de RP-HPLC de type C18 (Alltech Adsorbosphere) et élués isocratiquement dans le solvant MeOH/H₂O 80:20 contenant 1% d'acide acétique.

La différence de potentiel appliquée sur le capillaire est de 5,0 kV et le potentiel d'extraction est de 20V. La dissociation induite par collision est obtenue en utilisant le xénon comme gaz de collision à une pression de 1mTorr.

Analyse des monosaccharides dérivés par GC/MS/MS

Les spectres GC/MS et GC/MS/MS sont mesurés sur un appareil triple-quadrupôles TSQ-700 (Finnigan MAT) en mode ionisation chimique. Le gaz réactant utilisé est le mélange méthane/hémioxyde d'azote 75:25. Les spectres MS/MS sont obtenus avec une énergie de collision variant de 5 à 20 eV suivant les cas, en utilisant le xénon comme gaz de collision.

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur une colonne capillaire Carbowax 20M (0,32 mm D.I. x 25 m) avec un gradient en température de 2°C/min de 120 à 240°C.

Analyse des oligosaccharides dérivés par MALDMS et MALD/PSDMS

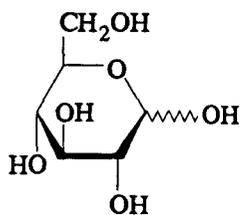
Les analyses en MALDMS et MALD/PSDMS sont réalisées sur un appareil à temps-de-vol Vision 2000 (Finnigan MAT). Les échantillons sont déposés sur une cible amovible permettant l'irradiation de zones sélectives. Un faisceau laser à azote de longueur d'onde d'émission 337 nm et de durée de pulse 3 ns est utilisé. Les spectres sont mesurés en mode positif avec une énergie d'accélération de 5keV et une post-accélération de 15kV. Les oligosaccharides (10–50 pmoles) sont dissous dans du méthanol ou un mélange eau-méthanol suivant les dérivés étudiés (1µl), et mélangés avec une solution de matrice (1µl) (12 mg ml⁻¹ d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dissous dans un mélange méthanol-eau 80:20 ou acétonitrile-eau 50:50).

Les spectres de masse sont obtenus avec un voltage d'accélération de 5kV et les spectres PSD, par segments de 20%, sont obtenus par décroissance successive du potentiel du réflecteur. Le réflecteur est calibré en utilisant le troisième segment du spectre de la substance P.

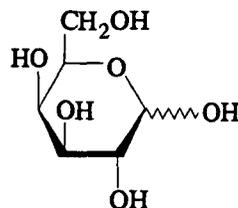
Annexes

Annexe 1 – Formules des principaux monosaccharides

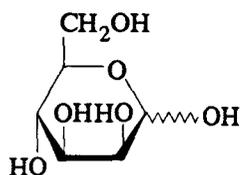
Les formules des principaux monosaccharides constitutifs des glycoconjugués sont données ci-dessous, selon la représentation de Haworth :



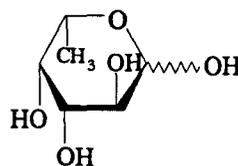
D-Glucose



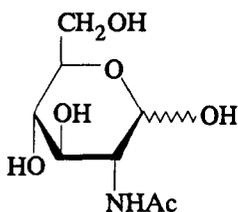
D-Galactose



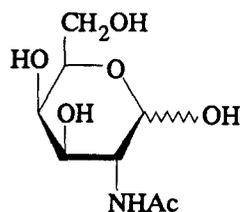
D-Mannose



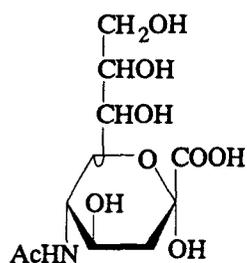
L-Fucose



D-N-Acétyleglucosamine



D-N-Acétylegalactosamine



Acide N-acétylneuraminique

Annexe 2 – Principales exoglycosidases de spécificité connue et disponibles commercialement

Les renseignements complémentaires et le tableau présentés dans cette annexe concernent les principales familles d'exoglycosidases utilisées pour la caractérisation structurale de molécules glucidiques et, plus particulièrement, de glycanes de glycoconjugués. Sont répertoriées dans le tableau les enzymes disponibles commercialement ainsi que leurs sources commerciales.

Neuraminidases, Sialidases ou Acylneuraminyldéshydrogénases EC 3.2.1.18

L'origine biologique des neuraminidases est variée (myxo- et paramyxovirus, bactéries, vertébrés), à l'exception des plantes (Gottschalk et Drzeniek, 1972). Leur spécificité glyconique prend en compte les substitutions de l'acide neuraminique : absence d'hydrolyse en cas de substitution du groupement carboxylique (Drzeniek, 1973), hydrolyse plus lente des acides N-glycolylneuraminiques par rapport aux acides N-acétylneuraminiques (Corfield *et al.*, 1981), hydrolyse lente des acides neuraminiques O-acétylés (Corfield *et al.*, 1986).

Fucosidases ou α -L-fucoside fucohydrolases EC 3.2.1.51

Les α -L-fucosidases disponibles commercialement présentent une spécificité aglyconique large. D'autres fucosidases ont été purifiées et caractérisées à partir de micro-organismes tels qu'*Aspergillus niger* (Bahl, 1970), *Bacillus fulminans* (Kochibe, 1973) ou *Clostridium perfringens* (Aminoff et Furukawa, 1970). Elles possèdent une spécificité exclusive pour l'hydrolyse de la seule liaison Fuc(α 1-2)Gal. Aucune n'est actuellement commercialisée.

Galactosidases ou galactoside galactohydrolases

Seules deux α -galactosidases (EC 3.2.1.22) utilisables comme outil d'étude structurale sont commercialisées. Comparativement, un nombre important de β -galactosidases (EC 3.2.1.23) d'origines biologiques et de spécificité différentes sont disponibles.

N-acétylhexosaminidases

Cette famille regroupe principalement des exoglycosidases hydrolysant les liaisons glycosidiques de N-acétylhexosamines, dérivées indistinctement du glucose ou du galactose. Les cas d' α -N-acétylglucosaminidases (EC 3.2.1.50) (Muramatsu, 1968), d' α -N-acétylgalactosaminidases (EC 3.2.1.49) (McDonald *et al.*, 1972; McGuire *et al.*, 1972), de β -N-acétylglucosaminidases (EC 3.2.1.30) (Frohwein et Gatt, 1967; Bahl et Agrawal, 1968;

McGuire *et al.*, 1972) et de β -N-acétylgalactosaminidases (EC 3.2.1.53) (Frohwein et Gatt, 1967), de spécificité plus étroite, liée à un unique type d'hexosamines, restent rares.

L'existence d'une double activité N-acétylhexosaminidasique chez une même enzyme a été décrite par Woollen *et al.* (1961) pour une β -N-acétylhexosaminidase de testicules de bélier et par Li et Li (1970) pour une β -N-acétylhexosaminidase de Jack bean. Un schéma réactionnel théorique a été proposé à partir d'études cinétiques de la β -N-acétylhexosaminidase de rein de rat (Walker *et al.*, 1961) et ce modèle a été généralisé à différentes sources enzymatiques - bactéries, champignons, gastéropodes, vertébrés - (Woollen *et al.*, 1961).

Mannosidases ou D-Mannoside Mannohydrolases

Comme dans le cas des α -L-fucosidases, deux classes d' α -mannosidases (EC 3.2.1.24) sont décrites. La première classe regroupe les α -mannosidases hydrolysant la seule liaison Man(α 1-2)R, la seconde comprend des enzymes hydrolysant tous les types de liaisons. Ces deux types d'activité - α 1,2-mannosidase et α -mannosidase - peuvent être décrites chez une même source telle que *Aspergillus niger* (Swaminathan *et al.*, 1972; Matta et Bahl, 1972) ou *Aspergillus saitoi* (Yamashita *et al.*, 1980; Amano et Kobata, 1986).

La spécificité aglyconique des β -mannosidases (EC 3.2.1.25) est beaucoup plus uniforme. Dans le cas d'enzymes de gastéropodes, commercialisées, ou comme chez *Aspergillus niger* (Elbein *et al.*, 1977; Bouquelet *et al.*, 1978), la seule liaison hydrolysée est Man(β 1-4)R.

Glucosidases

Ces exoglycosidases sont commercialisées sous des dénominations ayant trait à la nature de leur substrat ou à leur utilisation. L' α -glucosidase d'*Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3) est également connue sous le nom d'amylase amyloglucosidase ou 1,4 D glucan glucohydrolase, l' α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20) sous celui de maltase et la β -glucosidase d'amande douce (EC 3.2.1.21) sous celui d'hexosidase.

tableau 8 – Principales exoglycosidases de spécificité connue et disponibles commercialement

Enzyme	Spécificité	Source commerciale	Références bibliographiques
Origine biologique			
Neuraminidase			
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	NeuAc/Gc ($\alpha 2-6$)R > ($\alpha 2-3$)R > ($\alpha 2-8$)Neu où R : Gal, GalNAc ou GlcNAc NeuAc($\alpha 2-?$)x > NeuGc ($\alpha 2-?$)x hydrolyse lente des acides neuraminiques O-acétylés en 7,8,9	Boehringer Mannheim Calbiochem Oxford Glycosystem Sigma	Uchida <i>et al.</i> (1977 (p), 1979 (s)), Corfield <i>et al.</i> (1981 (s), 1986 (s))
<i>Clostridium perfringens</i>	NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal > ($\alpha 2-6$)Gal, ($\alpha 2-8$)NeuAc > NeuGc ($\alpha 2-3$)Gal > ($\alpha 2-6$)Gal, ($\alpha 2-8$)NeuAc hydrolyse lente des acides neuraminiques O-acétylés en 7,8,9	Boehringer Mannheim Calbiochem Oxford Glycosystem Sigma	Cassidy <i>et al.</i> (1965) (p,s), Corfield <i>et al.</i> (1981 (s), 1986 (s)), Bouwstra <i>et al.</i> (1987) (p)
Newcastle Disease Virus	NeuAc ($\alpha 2-3$)Gal, ($\alpha 2-3$)GalNAc > ($\alpha 2-8$)NeuAc hydrolyse lente des acides neuraminiques O-acétylés en 4,7,8,9	Boehringer Mannheim Oxford Glycosystem Sigma	Drzeniek <i>et al.</i> (1966) (p), Corfield <i>et al.</i> (1981) (s), Paulson <i>et al.</i> (1982) (s), Corfield <i>et al.</i> (1986) (s)
<i>Salmonella typhimurium</i> enzyme clonée chez <i>E. coli</i>	Neu ($\alpha 2-3$)x >> ($\alpha 2-6$)x	Oxford Glycosystem Sigma	Hoyer <i>et al.</i> (1991) (p,s)
<i>Streptococcus</i> K 6646	Neu ($\alpha 2-3$)x, ($\alpha 2-6$)x, ($\alpha 2-8$)x	G-Enzyme ICN Seikagaku Sigma	Hughes et Jeanloz (1964) (p), Kiyohara <i>et al.</i> (1974) (p), Glasgow <i>et al.</i> (1977) (p)
<i>Vibrio cholerae</i>	NeuAc/Gc ($\alpha 2-3$)R > ($\alpha 2-6$)R > ($\alpha 2-8$)Neu où R : Gal, GalNAc ou GlcNAc NeuAc ($\alpha 2-?$)x > NeuGc ($\alpha 2-?$)x hydrolyse lente des acides neuraminiques O-acétylés en 7,8,9	Boehringer Mannheim Calbiochem Oxford Glycosystem Sigma	Ada <i>et al.</i> (1961) (p), Laver <i>et al.</i> (1964), Corfield <i>et al.</i> (1981 (s), 1986 (s))

Référence bibliographique ayant trait à la purification de l'enzyme considérée (p), à sa spécificité (s) ou aux deux (p,s). x : monosaccharide quelconque

Enzyme	Spécificité	Source commerciale	Références bibliographiques
Origine biologique			
α-L-Fucosidase			
Almond emulsin	I - Fuc (α 1-4)GlcNAc, (α 1-3)GlcNAc, (α 1-3)Glucitol II - Fuc (α 1-2)Gal	Oxford Glycosystem Sigma	Ogata-Arakawa <i>et al.</i> (1977) (p,s), Yoshima <i>et al.</i> (1979) (p), Scudder <i>et al.</i> (1990) (p)
bovine epididyme	Fuc (α 1-6)x	Oxford Glycosystem Sigma	Ogata-Arakawa <i>et al.</i> (1977) (p,s)
<i>Charonia lampas</i>	Fuc (α 1-2)Gal, (α 1-6)GlcNAc > (α 1-4) GlcNAc >> (α 1-3)GlcNAc	Seikagaku	Iijima et Egami (1971) (p), Nishigaki <i>et al.</i> (1974) (s), Butters <i>et al.</i> (1991) (p,s)
chicken liver	Fuc (α 1-2)x, (α 1-3)x, (α 1-4)x, (α 1-6)x	Oxford Glycosystem	
<i>Streptomyces</i> sp	Fuc (α 1-3)x, (α 1-4)x	Boehringer Mannheim	
α-Galactosidase			
green coffee beans	Gal (α 1-3)Gal, (α 1-4)Gal, (α 1-6)Gal, (α 1-3)Glc, (α 1-4)Glc, (α 1-6)Glc	Boehringer Mannheim Oxford Glycosystem Sigma	Courtois et Petek (1966) (p) Harpaz <i>et al.</i> (1974) (p)
β-Galactosidase			
<i>Aspergillus niger</i>	Gal (β 1-3)Gal > (β 1-4)GlcNAc > (β 1-4)Glc, (β 1-6)GlcNAc > (β 1-3)GlcNAc	Sigma	Bahl et Agrawal (1969 (p,s), 1972 (p)), Sykes <i>et al.</i> (1983) (p,s)
bovine testes	Gal (β 1-3)GlcNAc > (β 1-4)GlcNAc > (β 1-6)GlcNAc	Boehringer Mannheim Oxford Glycosystem Sigma	Distler et Jourdian (1973 (p,s), 1978 (p,s))
<i>Charonia lampas</i>	Gal (β 1-4)GlcNAc > (β 1-3)GlcNAc	Seikagaku	Nishigaki <i>et al.</i> (1974) (s)
chicken liver	Gal (β 1-3)GalNAc, (β 1-4)GlcNAc	Oxford Glycosystem	
<i>Escherichia coli</i>	Gal (β 1-4)x	Boehringer Mannheim Calbiochem, Sigma	

Référence bibliographique ayant trait à la purification de l'enzyme considérée (p), à sa spécificité (s) ou aux deux (p,s). x : monosaccharide quelconque

Enzyme	Spécificité	Source commerciale	Références bibliographiques
Origine biologique			
β-Galactosidase (suite)			
jack bean	à faible concentration enzymatique : Gal (β1-6)GlcNAc > (β1-4)GlcNAc > (β1-3)GlcNAc à forte concentration enzymatique : Gal(β1-6)GlcNAc > (β1-4)GlcNAc, (β1-3) GlcNAc Gène stérique de Fuc lié sur GlcNAc	Oxford Glycosystem Seikagaku Sigma	Li et Li (1968 (p), 1972 (p)), Arakawa <i>et al.</i> (1974) (p,s), Li <i>et al.</i> (1975) (p,s)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gal (β1-4)Glc, (β1-4)GlcNAc	Boehringer Mannheim Oxford Glycosystem Sigma	Hughes et Jeanloz (1964) (p), Glasgow <i>et al.</i> (1977) (p,s), Paulson <i>et al.</i> (1978) (s), Yoshima <i>et al.</i> (1980) (s)
<i>Streptococcus</i> 6646 K	Gal (β1-4)GlcNAc > (β1-3)GlcNAc	Seikagaku	Kiyohara <i>et al.</i> (1976) (p)
α-N-Acetylgalactosaminidase			
chicken liver	GalNAc (α1-3)x, Ser, Thr	Oxford Glycosystem Sigma	
β-N-Acetylhexosaminidase			
<i>Aspergillus niger</i>	HexNAc (β1-6)Man > (β1-2)Man > (β1-4)Man > (β1-3)Gal > (β1-4)Gal	Sigma	Bahl et Agrawal (1969 (p), 1972 (p,s))
bovine kidney	HexNAc (β1-4)x	Boehringer Mannheim Sigma	
jack bean	HexNAc (β1-2)x, (β1-3)x, (β1-4)x, (β1-6)x	Oxford Glycosystem Seikagaku Sigma	Li et Li (1968 (p,s), 1970 (p,s), 1972 (p))

Référence bibliographique ayant trait à la purification de l'enzyme considérée (p), à sa spécificité (s) ou aux deux (p,s). x : monosaccharide quelconque

Enzyme	Spécificité	Source commerciale	Références bibliographiques
Origine biologique			
β-N-Acetylhexosaminidase (suite)			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	HexNAc (β 1-2)Man, (β 1-3)Gal, (β 1-6)Gal Gène stérique de GlcNAc sur la branche Man α 1-6 (GlcNAc β 1-2)Man du core	Boehringer Mannheim Oxford Glycosystem Sigma	Hughes et Jeanloz (1964) (p), Glasgow <i>et al.</i> (1977) (p), Yoshima <i>et al.</i> (1980) (s), Yamashita <i>et al.</i> (1981) (s)
β-N-Acetylglucosaminidase			
chicken liver	GlcNAc (β 1-3)x, (β 1-4)x	Oxford Glycosystem	
α-Mannosidase			
<i>Aspergillus saitoi</i>	I - Man (α 1-2)Man II - Man (α 1-3)Man > (α 1-2)Man, (α 1-6)Man Gène stérique de GlcNAc bissectrice ou de GlcNAc, point d'attache d'une nouvelle antenne	- Oxford Glycosystem	Yamashita <i>et al.</i> (1980) (s), Ichishima <i>et al.</i> (1981) (p,s) Amano et Kobata (1986) (p,s), Kobata et Amano (1987) (p,s)
jack bean	Man (α 1-2)x, (α 1-6)x > (α 1-3)x Man (α 1-3) [R] Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc avec R branche supérieure du N-glycane considéré	Boehringer Mannheim ICN Oxford Glycosystem Seikagaku Sigma	Li (1966 (p), 1967 (p,s)), Li et Li (1968 (p), 1972 (p,s)), Yoshima <i>et al.</i> (1980) (s)
β-Mannosidase			
<i>Achatina fulica</i>	Man (β 1-4)GlcNAc	Seikagaku Sigma	
<i>Helix pomatia</i>	Man (β 1-4)x	Oxford Glycosystem Sigma	Sugahara et Yamashina (1972 (p)), Sugahara <i>et al.</i> (1972) (p,s)

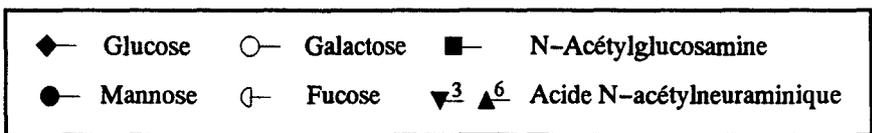
Référence bibliographique ayant trait à la purification de l'enzyme considérée (p), à sa spécificité (s) ou aux deux (p,s). x : monosaccharide quelconque

Enzyme	Spécificité	Source commerciale	Références bibliographiques
Origine biologique			
α-Glucosidase			
<i>Aspergillus niger</i> appelée également amylase amyloglucosidase ou 1,4 α D glucan glucohydrolase EC 3.2.1.3	Glc (α ;1-4)Glc, (α 1-6)Glc	Boehringer Mannheim ICN Seikagaku	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> appelée également maltase EC 3.2.1.20	Glc (α 1-4)x > (α 1-3)x, (α 1-2)x > (α 1-6)x	Boehringer Mannheim Sigma	
β-Glucosidase			
sweet almond appelée également hexosidase EC 3.2.1.21	Glc/Gal/Fuc (β 1-?)x	Boehringer Mannheim Sigma	Schwartz <i>et al.</i> (1970) (p,s)

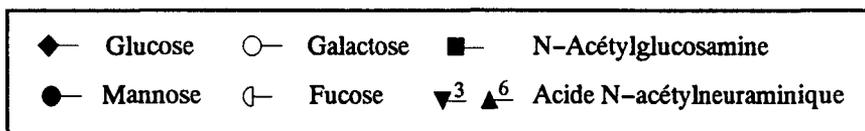
Référence bibliographique ayant trait à la purification de l'enzyme considérée (p), à sa spécificité (s) ou aux deux (p,s). x : monosaccharide quelconque

Annexe 3 – Nomenclature et structures des oligosaccharides étudiés

Code	Oligosaccharide	Structure détaillée
Structure symbolisée		
LNT	Lacto-N-tétraose	
		Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc
LNTnT	Lacto-N-néotétraose	
		Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc
LNH	Lacto-N-hexaose	
		Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) Gal (β1-4) Glc Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3)
LNTnH	Lacto-N-néohexaose	
		Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) Gal (β1-4) Glc Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3)
LNF-1	Lacto-N-fucopentaose 1	
		Fuc (α1-2) Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc
LNF-2	Lacto-N-fucopentaose 2	
		Fuc (α1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc Gal (β1-3)
LNF-3	Lacto-N-fucopentaose 3	
		Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc Fuc (α1-3)
LNF-5	Lacto-N-fucopentaose 5	
		Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc Fuc (α1-3)



Code	Oligosaccharide	Structure détaillée
Structure symbolisée		
LNDFH-1	Lacto-N-difuco-hexaose 1	
	$\begin{array}{l} \text{Fuc } (\alpha 1-4) \\ \text{Fuc } (\alpha 1-2) \text{ Gal } (\beta 1-3) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Fuc } (\alpha 1-4) \\ \text{Fuc } (\alpha 1-2) \text{ Gal } (\beta 1-3) \end{array}} \right\} \text{GlcNAc } (\beta 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ Glc}$	
LNDFH-2	Lacto-N-difuco-hexaose 2	
	$\begin{array}{l} \text{Fuc } (\alpha 1-4) \\ \text{Gal } (\beta 1-3) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Fuc } (\alpha 1-4) \\ \text{Gal } (\beta 1-3) \end{array}} \right\} \text{GlcNAc } (\beta 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{GlcNAc } (\beta 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \end{array}} \right\} \text{Glc} \\ \text{Fuc } (\alpha 1-3)$	
LST-a	Sialyllactotétraose a	
	$\text{NeuAc } (\alpha 2-3) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNAc } (\beta 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ Glc}$	
LST-b	Sialyllactotétraose b	
	$\begin{array}{l} \text{NeuAc } (\alpha 2-6) \\ \text{Gal } (\beta 1-3) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{NeuAc } (\alpha 2-6) \\ \text{Gal } (\beta 1-3) \end{array}} \right\} \text{GlcNAc } (\beta 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ Glc}$	
LST-c	Sialyllactotétraose c	
	$\text{NeuAc } (\alpha 2-6) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNAc } (\beta 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ Glc}$	
2AGN1	N-glycane biantenné neutre	
	$\begin{array}{l} \text{Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-6) \\ \text{Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-3) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-6) \\ \text{Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-3) \end{array}} \right\} \text{Man } (\beta 1-4) \text{ GlcNAc}$	
2ANeuAc	N-glycane biantenné sialylé	
	$\begin{array}{l} \text{Gal } (\alpha 1-4) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-6) \\ \text{NeuAc } (\alpha 2-6) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-3) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal } (\alpha 1-4) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-6) \\ \text{NeuAc } (\alpha 2-6) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNAc } (\beta 1-2) \text{ Man } (\alpha 1-3) \end{array}} \right\} \text{Man } (\beta 1-4) \text{R}$ <p style="text-align: right;">R = GlcNAc (β1-4) GlcNAc</p>	



Annexe 4 – Calcul de la masse d'une structure saccharidique, à partir du tableau des incréments de masse

Le tableau présenté dans les pages suivantes permet le calcul des masses de monosaccharides et d'oligosaccharides, natifs ou dérivés selon différents modes. La procédure d'utilisation de ce tableau est décrite ci-dessous et nous proposons, à titre d'exemple, le calcul d'un oligosaccharide perméthylé, en l'occurrence le LNF-2.

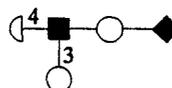
Procédure de calcul de la masse d'une structure saccharidique :

- Détermination de la nature des oses constitutifs et de leur degré respectif de substitution,
- Nature de la dérivation choisie et des traitements éventuels (réduction, amination réductive),
- Lecture des masses calculées pour chaque monosaccharide dans le mode de dérivation choisi et selon son degré de substitution,
- Lecture de la masse concernant l'extrémité terminale réductrice dans les conditions définies,
- Calcul de la masse de la structure saccharidique étudiée par addition de l'ensemble des masses ainsi déterminées, selon l'algorithme suivant :

$$MM = \sum_{i=1}^n NR_i + \sum_{i=1}^m M_i + \sum_{i=1}^d D_i + \sum_{i=1}^t T_i + R$$

avec n, m, d, t, nombres de monosaccharides terminaux non réducteurs (NR), mono- (M), di- (D), et trisubstitués (T) et R masse de l'extrémité terminale réductrice

Exemple proposé : LNF-2 perméthylé.



Séquence	Degré de substitution	Dérivation	Masse correspondante
Hexose	0	Méthylation	219,12
Desoxyhexose	0	Méthylation	189,11
N-Acétylexosamine	2	Méthylation	230,10
Hexose	1	Méthylation	204,10
Hexose	1	Méthylation	204,10
Extrémité terminale réductrice	-	Méthylation	31,02
Masse moléculaire de l'oligosaccharide considéré :			1077,55

Annexe 4 – Masses des différents monosaccharides natifs et dérivés

Nature du monosaccharide	MONOSACCHARIDES NATIFS				MONOSACCHARIDES METHYLES				MONOSACCHARIDES DEUTEROMETHYLES			
	Terminal non réducteur	Monosubstitué	Disubstitué	Trisubstitué	Terminal non réducteur	Monosubstitué	Disubstitué	Trisubstitué	Terminal non réducteur	Monosubstitué	Disubstitué	Trisubstitué
Pentose	133,05	132,04	131,03	130,03	175,10	160,07	145,05	130,03	184,15	166,11	148,07	130,03
Desoxyhexose	147,07	146,06	145,05	144,04	189,11	174,09	159,07	144,04	198,17	180,13	162,08	144,04
Hexose	163,06	162,05	161,04	160,04	219,12	204,10	189,08	174,05	231,20	213,16	195,11	177,07
N-acétyl-hexosamine	204,09	203,08	202,07	201,06	260,15	245,13	230,10	215,08	272,22	254,18	236,14	218,10
Acide N-acétyl-neuraminique	292,10	291,10	290,09	289,08	376,20	361,17	346,15	331,13	394,31	376,27	358,22	340,18
Acide N-glycolyl-neuraminique	308,10	307,09	306,08	305,08	406,20	391,18	376,16	361,14	308,10	307,09	306,08	305,08

Nature de l'extrémité terminale réductrice	native		réduite		dérivée par amination réductrice		native		réduite		dérivée par amination réductrice et N-acétylée		native		réduite		dérivée par amination réductrice	
	-OH	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	-OCH ₃	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	-OCD ₃	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	-OCD ₃	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An		
Formule	-OH	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	-OCH ₃	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	-OCD ₃	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	-OCD ₃	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An		
Incément de masse	17,00	+ 19,02 + 20,03	137,07	94,07	31,02	+ 47,05 + 48,05	222,14	nd	34,04	+ 53,09 + 54,10	nd	nd	34,04	+ 53,09 + 54,10	nd	nd		

Les masses répertoriées dans ce tableau sont de nature monoisotopique et prennent en compte les masses atomiques des isotopes les plus abondants des éléments considérés :
 C = 12,000000; H = 1,007825; D = 2,014102; N = 14,003074; O = 15,994915

nd = non déterminé

Nature du monosaccharide	MONOSACCHARIDES ETHYLES				MONOSACCHARIDES ACETYLES				MONOSACCHARIDES DEUTEROACETYLES			
	Terminal non réducteur	Monosubstitué	Disubstitué	Trisubstitué	Terminal non réducteur	Monosubstitué	Disubstitué	Trisubstitué	Terminal non réducteur	Monosubstitué	Disubstitué	Trisubstitué
Pentose	217,14	188,10	159,06	130,03	259,08	216,06	173,04	130,03	268,14	222,10	176,06	130,03
Desoxyhexose	231,16	202,12	173,08	144,04	273,10	230,08	187,06	144,04	282,15	236,12	190,08	144,04
Hexose	275,18	246,15	217,11	188,07	331,10	288,08	245,07	202,05	343,18	297,14	251,10	205,07
N-acétyl-hexosamine	316,21	287,17	258,13	229,09	330,12	287,10	244,08	201,64	339,17	293,14	247,10	201,06
Acide N-acétyl-neuraminique	460,29	431,25	402,21	373,17	460,15	417,13	374,11	331,09	472,22	426,18	380,15	334,11
Acide N-glycolyl-neuraminique	504,32	475,28	446,24	417,20	518,15	475,13	432,11	389,09	488,21	442,18	396,14	350,10

Nature de l'extrémité terminale réductrice	native		réduite		dérivée par amination réductive			
	- OEt	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	- OAc	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An
Formule	- OEt	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	- OAc	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An
Incrément de masse	45,03	+ 75,08 + 76,09	nd	nd	59,01	+ 103,04 + 104,05	nd	nd

Nature de l'extrémité terminale réductrice	native		réduite		dérivée par amination réductive			
	- OAc-d3	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	- OAc-d3	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An
Formule	- OAc-d3	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An	- OAc-d3	NaBH ₄ NaBD ₄	par 2-AB	par An
Incrément de masse	59,01	+ 109,09 + 110,09	nd	nd	59,01	+ 109,09 + 110,09	nd	nd

Les masses répertoriées dans ce tableau sont de nature monoisotopique et prennent en compte les masses atomiques des isotopes les plus abondants des éléments considérés : C = 12,000000; H = 1,007825; D = 2,014102; N = 14,003074; O = 15,994915

nd = non déterminé

Références Bibliographiques

Ada G.L., French E.L., Lind P.E.

J. Gen. Microbiol. (1961) 24, 409–421

Purification and properties of neuraminidase from *Vibrio cholerae*

Agrawal K.M.L., Bahl O.P.

J. Biol. Chem. (1968) 243, 103–111

Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*, II. Isolation and general properties

Akiyama T.

J. Chromatogr. (1991) 588, 53–59

Separation of neutral mono- and oligosaccharides derivatized with ethyl p-aminobenzoate by high-performance liquid chromatography on an amine-bonded vinyl alcohol copolymer column

Albersheim P., Nevins D.J., English P.D., Karr A.

Carbohydr. Res. (1967) 5, 340–345

A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography

Amano J., Kobata A.

J. Biochem. (1986) 99, 1645–1654

Purification and characterization of a novel α -mannosidase from *Aspergillus saitoi*

Aminoff D., Furukawa K.

J. Biol. Chem. (1970) 245, 1659–1669

Enzymes that destroy blood group specificity, purification and properties of α -L-fucosidase from *Clostridium perfringens*

Angel A-S., Nilsson B.

Biomed. Env. Mass Spectrometry (1990a) 19, 721–730

Analysis of glycoprotein oligosaccharides by fast atom bombardment mass spectrometry

Angel A.S., Nilsson B.

Methods Enzymol. (McCloskey J.A., Ed) (1990b) 193, 721–730

Linkage positions in glycoconjugates by periodate oxidation and fast atom bombardment mass spectrometry

Angel A-S., Lipniunas P., Erlansson K., Nilsson B.

Carbohydr. Res. (1991) 221, 17–35

A procedure for the analysis by mass spectrometry of the structure of oligosaccharides from high-mannose glycoproteins

Anumula K.R.

Anal. Biochem. (1994) 220, 275–283

Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection

Arakawa M., Ogata S.I., Muramatsu T., Kobata A.

J. Biochem. (1974), 75, 707–714

β -Galactosidases from Jack bean meal and almond emulsin

Arsequell G., Dwek R.A., Wong S.Y.C.

Anal. Biochem. (1994) 216, 165–170

9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-glycine coupling of saccharide β -glycosylamines for the fractionation of oligosaccharides and the formation of neoglycoconjugates

Baenziger J.U.

Methods Enzymol. (1994) 230, 237–249

High-performance liquid chromatography of oligosaccharides

Bahl O.P., Agrawal K.M.L.

J. Biol. Chem. (1968) 243, 98–102

Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*, I. Isolation and characterization of β -N-acetylglucosaminidase

Bahl O.P., Agrawal K.M.L.

J. Biol. Chem. (1969) 244, 2970–2978

Glycosidases of *Aspergillus niger*, 1. Purification and characterization of α - and β -galactosidases and β -N-acetylglucosaminidase

Bahl O.P.

J. Biol. Chem. (1970) 245, 299–304

Glycosidases of *Aspergillus niger*, II. Purification and general properties of 1,2- α -L-fucosidase

Bahl O.P., Agrawal K.M.L.

Methods Enzymol. (1972) 28, 728–734

α -Galactosidase, β -galactosidase and β -N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus niger*

Baldwin M.A., Stahl N., Reinders L.G., Gibson B.W., Prusiner S.B., Burlingame A.L.

Anal. Biochem. (1990) 191, 174–182

Permethylation and tandem mass spectrometry of oligosaccharides having free hexosamine: analysis of the glycoinositol phospholipid anchor glycan from the scrapie prion protein

Ballistreri A., Montaudo G., Garozzo D., Giuffrida M., Impallomeni G.

Rapid Commun. Mass Spectrom. (1989) 3, 302–304

Determination of linkage position in disaccharides by negative-ion fast atom bombardment mass spectrometry

Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler J.

J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1981) 7, 325–332

Fast atom bombardment of solids (FAB): a new ion source for mass spectrometry

BeMiller J.N.

Adv. Carbohydr. Chem. (1967) 22, 25–108

Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides

Biemann K., Dejongh D.C., Schnoes H.K.

J. Amer. Chem. Soc. (1963) 85, 1763

Application of mass spectrometry to structure problems. XIII Acetates of pentoses and hexoses

Biermann C.J.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1988) 46, 251–271

Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides

Bigge J.C., Patel T.P., Bruce J.A., Goulding P.N., Charles S.M., Parekh R.B.

Anal. Biochem. (1995) 230, 229–238

Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-aminobenzamide and anthranilic acid

Björndal H., Lindberg B., Svensson S.

Carbohydr. Res. (1967) 5, 433–440

Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates

Björndal H., Hellerqvist C.G., Lindberg B., Svensson S.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1970) 9, 610–619

Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides

Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A.

Carbohydr. Res. (1983) 113, 291–299

A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis

Blok-Tip L., Van der Kerk-van-Hoof A., Heerma W., Haverkamp J., Kovácik V., Hirsch J.

J. Biol. Mass Spectrom. (1993) 22, 474–480

Determination of linkage positions in peracetylated (methyl) xylo-oligosaccharides with fast atom bombardment mass spectrometry

Bochkov A.F., Zaikov G.E.

in *Chemistry of the O-glycosidic Bond* Pergamon Press Oxford (1979) 177–201

Cleavage of O-glycosidic bonds

Bouquelet S., Spik G., Montreuil J.

Biochim. Biophys. Acta (1978) 522, 521–530

Properties of a β -mannosidase from *Aspergillus niger*

Bouwstra J.B., Deyl C.M., Vliegthart J.F.G.

Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1987) 368, 269–275

Purification and kinetic properties of sialidase from *Clostridium perfringens*

Bunton C.A., Lewis T.A., Llewellyn D.R., Vernon C.A.

J. Chem. Soc. (1955) 4419 cité par BeMiller (1967)

Burlingame A.L., Boyd R.K., Gaskell S.J.

Anal. Chem. (1994) 66, 667R–671R

Mass spectrometry

Butters T.D., Scudder P., Rotsaert J., Petursson S., Fleet G.W.J., Willenbrock F.W., Jacob G.S.

Biochem. J. (1991) 279, 189–195

Purification to homogeneity of *Charonia lampas* α -fucosidase by using sequential ligand–affinity chromatography

Capon B.

Chem. Rev. (1969) 69, 407

Mechanisms in carbohydrate chemistry

Carlsson D.M.

J. Biol. Chem. (1968) 243, 616–626

Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins

Caroff M., Bundle D.R., Perry M.B.

Eur. J. Biochem. (1984) 139, 195–200

Structure of the O chain of the phenol phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9

Carr S.A., Reinhold V.N., Green B.N., Hass J.R.

Biomed. Mass Spectrom. (1985) 12, 288–295

Enhancement of structural information in FAB ionized carbohydrate samples by neutral gas collision

Carr S.A., Huddleston M.J., Bean M.F.

Protein Sci. (1993) 2, 183–196

Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography–mass spectrometry

Cassidy J.T., Jourdain G.W., Roseman S.

J. Biol. Chem. (1965) 240, 3501–3506

The sialic acids, VI. Purification and properties of sialidase from *Clostridium perfringens*

Chambers R.E., Clamp J.R.

Biochem. J. (1971) 125, 1009–1018

An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials

Chaplin M.F.

in *Carbohydrate Analysis, a Practical Approach* (Chaplin M.F., Kennedy J.F., Eds) IRL Press, Oxford (1994) 1–42

Chen T.F., Yu H., Barofsky D.

Anal. Chem. (1992) 64, 2014–2019

Centrifugal size–exclusion chromatographic method for rapid desalting and filtering of carbohydrate samples prior to fast atom bombardment mass spectrometry

Ciucanu I., Kerek F.

Carbohydr. Res. (1984) 131, 209–217

A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates

Ciucanu I., Luca C.

Carbohydr. Res. (1990) 206, 71–77

Avoidance of degradation during the methylation of uronic acids

Clamp J.R., Bhatti T., Chambers R.E.

Methods Biochem. Anal. (Glick D., Ed) Interscience, New York (1971) 19, 229–344

The determination of carbohydrates in biological materials by gas–liquid chromatography

Clamp J.R., Bhatti T., Chambers R.E.

in *Glycoproteins* (Gottschalk A., Ed) (1972), A, 300–321

The examination of carbohydrates in glycoproteins by gas–liquid chromatography

Conboy J.J., Henion J.

Biol. Mass Spectrometry (1992) **21**, 397–407

High-performance anion exchange chromatography coupled with mass spectrometry for the determination of carbohydrates

Corfield A.P., Veh R.W., Wember M., Michalski J.-C., Schauer R.

Biochem. J. (1981) **197**, 293–299

The release of N-acetyl- and N-glycolloyl-neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases

Corfield A.P., Sander-Werver M., Veh R.W., Wember M., Schauer R.

Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1986) **367**, 433–439

The action of sialidases on substrates containing O-acetylsialic acids

Costello C.E., Vath J.E.

Methods Enzymol. (McCloskey J.A., Ed) (1990) **193**, 738–768

Tandem mass spectrometry of glycolipids

Courtois J.E., Petek F.

Methods Enzymol. (1966) **8**, 565–571

α -Galactosidase from coffee beans

Covey T.R., Huang E.C., Henion J.D.

Anal. Chem. (1991) **63**, 1193–1200

Structural characterization of protein tryptic peptides via liquid chromatography/mass spectrometry and collision-induced dissociation of their doubly charged molecular ions

Da Silva M.L.C., Tamura T., Rice K.G.

Arch. Biochem. Biophys. (1994) **315**, 460–466

Derivatization and purification of bisecting tyrosinamide-oligosaccharides from ovotransferrin

Dabrowski J.

Methods Enzymol. (1989) **179**, 122–156

Two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy

Dallinga J.W., Heerma W.

Biol. Mass Spectrom. (1991) **20**, 215–231

Reaction mechanism and fragment ion structure determination of deprotonated small oligosaccharides, studied by negative ion fast atom bombardment (tandem) mass spectrometry

Darvill A.G., McNeil M., Albersheim P.

Carbohydr. Res. (1980) **86**, 309–315

General and facile method for distinguishing 4-linked aldopyranosyl residues from 5-linked aldofuranosyl residues

De Belder A.N., Norrman B.

Carbohydr. Res. (1968) **8**, 1–6

The distribution of substituents in partially acetylated dextran

Defaye J., Gadelle A., Pedersen C.

Carbohydr. Res. (1982) **110**, 217–227

The behavior of cellulose, amylose and β -D-xylan towards anhydrous hydrogen fluoride

DeJongh E.G., Heerma W., Haverkamp J., Kamerling J.P.

Biomed. Mass Spectrom. (1987) **6**, 172

Dell A.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1987) **45**, 19–72

FAB-mass spectrometry of carbohydrates

Dell A., Carman N.H., Tiller P.R., Thomas-Oates J.E.

Biomed. Env. Mass Spectrom. (1988) **16**, 19–24

Fast atom bombardment mass spectrometric strategies for characterizing carbohydrate-containing biopolymers

Diabaté S., Geyer R., Stirm S.

Eur. J. Biochem. (1984) 139, 329–336

Structure of the major oligosaccharides in the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus

Distler J.J., Jourdian G.W.

J. Biol. Chem. (1973) 248, 6772–6780

The purification and properties of β -galactosidase from Bovine testes

Distler J.J., Jourdian G.W.

Methods Enzymol. (1978) 50, 514–520

β -Galactosidase from Bovine testes

Domon B., Costello C.E.

Glycoconj. J. (1988) 5, 397–409

A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FABMS/MS spectra of glycoconjugates

Domon B., Mueller D.R., Richter W.J.

Spectroscopy Int. J. (1989) 7, 23–28

Application of pattern recognition techniques to MS/MS spectra of glycoconjugates for structural assignment

Domon B., Mueller D.R., Richter W.J.

Biomed. Env. Mass Spectrom. (1990a) 19, 390–392

High performance tandem mass spectrometry for sequence, branching and interglycosidic linkage analysis of peracetylated oligosaccharides

Domon B., Mueller D.R., Richter W.J.

Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. (1990b) 100, 301–311

Determination of interglycosidic linkages in disaccharides by high performance tandem mass spectrometry

Domon B., Mueller D.R., Richter W.J.

Org. Mass Spectrom. (1994) 29, 713–719

Tandem mass spectrometric analysis of fixed-charge derivatized oligosaccharides

Domon B., Dubreucq G., de Hoffmann E.

J. Amer. Soc. Mass Spectrom. (1996) soumis à publication

Domon B. (1996) Communication personnelle

Drzeniek R., Seto J.T., Rott R.

Biochim. Biophys. Acta (1966) 128, 547–558

Characterization of neuraminidases from myxoviruses

Drzeniek R.

Histochem. J. (1973) 5, 271–290

Substrate specificities of neuraminidases

Dutton G.G.S.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1973) 28, 11–160

Applications of gas-liquid chromatography to carbohydrates : part I

Dutton G.G.S.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1974) 30, 10–110

Applications of gas-liquid chromatography to carbohydrates : part II

Dyer E., Glaudemans C.P.J., Koch M.J., Marchessault R.H.

J. Chem. Soc. (1962) 3361 cité par BeMiller (1967)

Edge C.J., Rademacher T.W., Wormald M.R., Parekh R.B., Butters T.D., Wing D.R., Dwek R.A.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 6338–6342

Fast sequencing of oligosaccharides: the reagent-array analysis method

Edmonds C.G., Smith R.D.

Methods Enzymol. (McCloskey J.A., Ed) (1990) 193, 412–431

Electrospray ionization mass spectrometry

Edward J.T.

Chem. Ind. (1955) 1102 cité par BeMiller (1967)

Egge H., Peter-Katalinic J.

Mass Spectrom. Rev. (1987) **6**, 331–393

Fast atom bombardment mass spectrometry for structural elucidation of glycoconjugates

Elbein A.D., Adya S., Lee Y.C.

J. Biol. Chem. (1977) **252**, 2026–2031

Purification and properties of a β -mannosidase from *Aspergillus niger*

Elvebak II L.E., Schmitt T., Gray G.R.

Carbohydr. Res. (1993) **246**, 1–11

Authentic standards for the reductive-cleavage method. The positional isomers of partially methylated and acetylated or benzoylated 1,5-anhydro-D-fucitol

Esko J.D.

Curr. Opin. Cell Biol. (1991) **3**, 805–816

Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism

Eylar E.H., Jeanloz R.W.

J. Biol. Chem. (1962) **237**, 622–625

Oligosaccharides from the α_1 acid glycoprotein of human plasma

Fan J.-Q., Huynh L.H., Lee Y.C.

Anal. Biochem. (1995) **232**, 65–68

Purification of 2-aminopyridine derivatives of oligosaccharides and related compounds by cation-exchange chromatography

Feather M.S., Harris J.F.

J. Org. Chem. (1965) **30**, 153 cité par BeMiller (1967)

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.

Science (1989) **246**, 64–71

Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.

Mass Spectrom. Rev. (1990) **9**, 37

Electrospray ionization – Principles and practice

Flowers H.M., Sharon N.

Adv. Enzymol. (1979) **48**, 29–95

Glycosidases – Properties and application to the study of complex carbohydrates and cell surfaces

Foster A.B., Overend W.G.

Chem. Ind. (1955) 566 cité par BeMiller (1967)

Fournet B., Strecker G., Leroy Y., Montreuil J.

Anal. Biochem. (1981) **116**, 489–502

Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans

Frohwein Y.Z., Gatt S.

Biochem. (1977) **6**, 2775–2782

Isolation of β -N-acetylhexosaminidase, β -N-acetylglucosaminidase and β -N-acetylgalactosaminidase from Calf brain

Fura A., Leary J.A.

Anal. Chem. (1993) **65**, 2805–2811

Differentiation of Ca^{2+} - and Mg^{2+} -coordinated branched trisaccharide isomers: an electrospray ionization and tandem mass spectrometry study

Galili et al.

J. Biol. Chem. (1987) **262**, 4683

Garozzo D., Giuffrida M., Impallomeni G.

Anal. Chem. (1990) **62**, 279–286

Determination of linkage position and identification of the reducing end in linear oligosaccharides by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry

Garozzo D., Green B.N.

Carbohydr. Res. (1991) 221, 253–257

Linkage analysis in disaccharides by electrospray mass spectrometry

Garozzo D., Impallomeni G., Montaudo G., Spina E.

Rapid Commun. Mass Spectrom. (1992) 6, 550–552

Structure of underivatized oligosaccharides by negative-ion fast-atom bombardment mass spectrometry

Geyer R., Geyer H., Kühnhardt S., Mink W., Stirm S.

Anal. Biochem. (1983) 133, 197–207

Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: capillary gas chromatography–mass fragmentography of methylalditols acetates obtained from N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides

Geyer R., Geyer H.

Methods Enzymol. (1994) 230, 86–108

Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques

Gillece-Castro B., Burlingame A.L.

Methods Enzymol. (Mc Closkey J.A., Ed) (1990) 193, 689–712

Oligosaccharide characterization with high-energy collision-induced dissociation mass spectrometry

Glasgow L.R., Paulson J.C., Hill R.L.

J. Biol. Chem. (1977) 252, 8615–8623

Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*

Goldstein I.J., Hay G.W., Lewis B.A., Smith F.

Methods Carbohydr. Chem. (1965) 5, 361–370

Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxydation, reduction and hydrolysis

Gooley A.A., Williams K.L.

Glycobiology (1994) 4, 413–417

Towards characterizing O-glycans: the relative merits of in vivo and in vitro approaches in seeking peptide motifs specifying O-glycosylation sites

Gottschalk A., Drzeniek R.

in *Glycoproteins : their composition, structure and function*, (Gottschalk A., Ed) 2nd Edn., Amsterdam, Elsevier (1972) 381–402

Neuraminidase as a tool in structural analysis

Gray G.R.

Methods Enzymol. (McCloskey J.A., Ed) (1987) 138, 26–38

Reductive cleavage of permethylated oligosaccharides

Gray G.R.

Methods Enzymol. (1990) 193, 573–587

Linkage analysis using reductive cleavage method

Gu J., Hiraga T., Wada Y.

Biol. Mass Spectrom. (1994) 23, 212–217

Electrospray ionization mass spectrometry of pyridylaminated oligosaccharides derivatives: sensibility and in source fragmentation

Gunnarsson A.

Glycoconjugate J. (1987) 4, 239–245

N- and O-alkylation of glycoconjugates and polysaccharides by solid phase in dimethyl sulphoxide/alkyl iodide

Guthrie R.D., McCarthy J.F.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1967) 22, 11–23

Acetolysis

Guzzetta A.W., Basa L.J., Hancoch W.S., Keyt B.A., Bennet W.F.

Anal. Chem. (1993) 65, 2953–2962

Identification of carbohydrate structures in glycoprotein peptide maps by the use of LC/MS with selected ion extraction with special reference to tissue plasminogen activator and a glycosylation variant produced by site directed mutagenesis

Hakomori S.

J. Biochem. (1964) 55, 205–208

A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide

Hara S., Yamaguchi M., Takemori Y., Furuhashi K., Ogura H., Nakamura M.

Anal. Biochem. (1989) 179, 162–166

Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography

Hardy M.R., Townsend R.W., Lee Y.C.

Anal. Biochem. (1988) 170, 54–62

Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection

Hardy M.R.

Methods in Enzymology (1989) 178, 76–81

Monosaccharide analysis of glycoconjugates by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection

Hardy M.R., Townsend R.R.

Methods Enzymol. (1994) 230, 208–225

High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates

Harpaz N., Flowers H.M., Sharon N.

Biochim. Biophys. Acta (1974) 341, 213–221

Purification of coffee bean α -galactosidase by affinity chromatography

Harrap G.J., Watkins W.M.

Biochem. J. (1970) 117, 667–675

Enzymes of *Trichomonas foetus*, separation and properties of two β -galactosidases

Harvey D.J., Rudd P.M., Bateman R.H., Bordoli R.S., Howes K., Hoyes J.B., Vickers R.G.

Organic Mass Spectrom. (1994) 29, 753–765

Examination of complex oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on time-of-flight and magnetic sector instruments

Harvey D.J., Naven T.J.P., Küster B., Bateman R.H., Green M.R., Critchley G.

Rapid Commun. Mass Spectrom. (1995) 9, 1556–1561

Comparison of fragmentation modes for the structural determination of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1978) 85, 257–263

Structure analysis of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound

Hase S., Ibuki T., Ikenaka T.

J. Biochem. (1984) 95, 197–203

Reexamination of the pyridylamination used for fluorescence labeling of oligosaccharides and its application to glycoproteins

Hase S., Kikuchi N., Ikenaka T., Inoue K.

J. Biochem. (1985) 98, 863–874

Structures of sugar chains of the third component of human complement

Hase S., Ikenaka T.

Anal. Biochem. (1990) 184, 135–138

Estimation of elution times on reverse-phase high-performance liquid chromatography of pyridylamino derivatives of sugar chains from glycoproteins

Hase S.

J. Biochem. (1992) **112**, 266–268

Conversion of pyridylamino sugar chains to 1-amino-1-deoxy derivatives, intermediates for tagging with fluorescein and biotin

Hase S.

Methods Enzymol. (1994) **230**, 225–237

High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides

Hellerqvist C.G., Lindberg B., Svensson S., Holme T., Lindberg A.A.

Carbohydr. Res. (1968) **8**, 43

Structural studies on the O specific side-chains of the cell-wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 395 MS

Hellerqvist C.G.

Methods in Enzymol. (McCloskey J.A., Ed) (1990) **193**, 554–573

Linkage analysis using Lindberg method

Hicks K.B.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1988) **46**, 17–72

Hillenkamp F., Karas M.

Methods Enzymol. (McCloskey J.A., Ed) (1990) **193**, 280–294

Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix assisted ultraviolet laser desorption/ionization

Hofmeister G.E., Zhou Z., Leary J.A.

J. Amer. Chem. Soc. (1991) **131**, 5964–5970

Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: tandem mass spectrometry and semiempirical calculations

Hofsteenge J., Müller D.R., De Beer T., Löffler A., Richter W.J., Vliegthart J.F.G.

Biochem. (1994) **33**, 13524–13530

New type of linkage between a carbohydrate and a protein C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U

Hokke C.H., Bergwerff A.A., Van Dedem G.W.K., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G.

Eur. J. Biochem. (1995) **228**, 981–1008

Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells

Honda S.

Anal. Biochem. (1984) **140**, 1–47

High-performance liquid chromatography of mono- and oligosaccharides

Honda S., Suzuki S., Nose A., Yamamoto K., Kakehi K.

Carbohydr. Res. (1981) **215**, 193–198

Capillary zone electrophoresis of reducing mono- and oligosaccharides as the borate complexes of their 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one derivatives

Honda S., Akao E., Suzuki S., Okuda M., Kakehi K., Nakamura J.

Anal. Biochem. (1989) **180**, 351–357

High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives

Hoyer L.L., Roggentin P., Schauer R., Vimr E.R.

J. Biochem. (1991) **110**, 462–467

Purification and properties of cloned *Salmonella typhimurium* LT2 sialidase with virus-typical kinetic preference for sialyl $\alpha 2 \rightarrow 3$ linkages

Huddleston M.J., Bean M.F., Carr S.A.

Anal. Chem. (1993) **65**, 877–884

Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests

Hughes R.C., Jeanloz R.W.

Biochem. (1964) **3**, 1535–1543

The extracellular glycosidases of *Diplococcus pneumoniae*, I. Purification and properties of a neuraminidase and a β -galactosidase action on the α_1 -acid glycoprotein of human plasma

Hughes R.C., Jeanloz R.W.

Biochem. (1964) 3, 1543–1548

The extracellular glycosidases of *Diplococcus pneumoniae*, II. Purification and properties of a β -N-acetylglucosaminidase. Action on a derivative of the α_1 -acid glycoprotein of human plasma

Ichishima E., Arai M., Shigematsu Y., Kumagai H., Sumida-Tanaka R.

Biochim. Biophys. Acta (1981) 658, 45–53

Purification of an acidic α -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* and specific cleavage of 1,2- α -D-mannosidic linkage in yeast mannan

Iijima Y., Egami F.

J. Biochem. (1971) 70, 75–78

Purification of α -L-fucosidase from the liver of a marine gastropod, *Charonia lampas*

Ishihara M., Fedarko N.S., Conrad H.E.

J. Biol. Chem. (1987) 262, 4708–4716

Involvement of phosphatidylinositol and insulin in the coordinate regulation of proteoglycan sulfate metabolism and hepatocyte growth

Jackson P.

Biochem. J. (1990) 270, 705–713

The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid

Jackson P.

Anal. Biochem. (1991) 196, 238–244

Polyacrylamide gel electrophoresis of reducing saccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone: subpicomolar detection using an imaging system based on a cooled charge-coupled device

Jackson P.

Methods Enzymol. (1994) 230, 250–265

High-resolution polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled reducing saccharides

Jacob G.S., Scudder P.

Methods Enzymol. (1994) 230, 280–299

Glycosidases in structural analysis

Juhasz P., Costello C.E.

J. Amer. Soc. Mass Spectrom. (1992) 3, 785–796

Matrix-assisted laser desorption of underivatized and permethylated gangliosides

Jun J.G., Gray G.R.

Carbohydr. Res. (1987) 163, 247–261

A new catalyst for reductive cleavage of methylated glycans

Takehi K., Suzuki S., Honda S., Lee Y.C.

Anal. Biochem. (1991) 199, 256–268

Pre-column labeling of reducing carbohydrates with 1-(p-methoxy) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone: analysis of neutral and sialic acid-containing oligosaccharides found in glycoproteins

Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R.

Biochem. J. (1975) 151, 491–495

Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides

Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G.

Biol. Magn. Reson. (1992) 10, 1–194 cité par Vliegthart J.F.G. et Montreuil J. in *New Comprehensive Biochemistry* (Montreuil J., Vliegthart J.F.G., Shachter H., Eds) (1995) 29B

Karas M., Hillenkamp F.

Anal. Chem. (1988) 60, 2299–2301

Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons

Karlsson K-A.

Biochem. (1974) 13, 3643-3647

Carbohydrate composition and sequence analysis of a derivative of brain disialoganglioside by mass spectrometry, with molecular weight ions at m/e 2245. Potential use in the specific microanalysis of cellular surfaces components

Kawasaki T., Ashwell G.

J. Biol. Chem. (1976) 251, 5292-5299

Carbohydrate structure of glycopeptides isolated from an hepatic membrane-binding protein specific for asialoglycoproteins

Kenne L., Lindberg B., Lugowski C., Svensson S.

Carbohydr. Res. (1986) 151, 349-358

Structural studies of the O specific side-chains of the *Escherichia coli* 010 lipopolysaccharide

Kimura K., Matsumoto K., Ishihara C., Harada K., Miyagi A.

Carbohydr. Res. (1995) 270, 33-42

Structure determination of galacto-oligosaccharides by pyridylation and NMR spectroscopy

Kiwitt-Haschemie K., Heims H., Steinhart H., Mischnick P.

Carbohydr. Res. (1993) 248, 267-275

The analysis of agarose by the reductive cleavage method

Kiyohara T., Terao T., Shioiri-Nakano K., Osawa T.

J. Biochem. (1976) 80, 9-17

Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidases and β -galactosidase from *Streptococcus* 6646 K

Kiyohara T., Terao T., Shioiri-Nakano K., Osawa T.

Arch. Biochem. Biophys. (1974) 164, 575-582

Purification and properties of a neuraminidase from *Streptococcus* K 6646

Knapp D.R.

in *Handbook of Analytical Derivatization Reaction* Wiley, New York (1979) 539-598

Carbohydrates

Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Mort A.J.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1989) 47, 167-202

Application of anhydrous hydrogen fluoride for the structural analysis of polysaccharides

Kobata A.

Anal. Biochem. (1979) 100, 1-14

Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates

Kobata A., Amano J.

Methods Enzymol. (1987) 138, 779-785

α -Mannosidases I and II from *Aspergillus saitoi*

Kobata A.

Eur. J. Biochem. (1992) 209, 483-501

Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins

Kobata A.

Methods Enzymol. (1994) 230, 200-208

Size fractionation of oligosaccharides

Kochetkov N.K., Wulfson N.S., Chizhov O.S., Zolotarev B.M.

Tetrahedron (1963) 19, 2209-2224

Mass spectrometry of carbohydrate derivatives

Kochetkov N.K., Chizhov O.S.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1966) 21, 39

Mass spectrometry of carbohydrate derivatives

Kochibe N.

J. Biochem. (1973) 74, 1141-1149

Purification and properties of α -L-fucosidase from *Bacillus fulminans*

Kocourek J., Ballou C.E.

J. Bact. (1969) 100, 1175–1181

Method for fingerprinting yeast cell wall mannans

Kondo A., Suzuki J., Kuraya N., Hase S., Kato I., Ikenaka T.

Agric. Biol. Chem. (1990) 54, 2169–2170

Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues

Kondo A., Kiso M., Hasegawa A., Kato I.

Anal. Biochem. (1994) 219, 21–25

Separation of pyridylamino oligosaccharides by high-performance liquid chromatography on an amine-bearing silica column

Kornfeld R., Kornfeld S.

Ann. Rev. Biochem. (1976) 45, 217–237

Comparative aspects of glycoprotein structure

Kornfeld R., Kornfeld S.

Ann. Rev. Biochem. (1985) 54, 631–664

Assembly of asparagine-linked oligosaccharides

Kováčik V., Hirsch J., Kovác P., Heerma W., Thomas-Oates J., Haverkamp J.

J. Mass Spectrom. (1995) 30, 949–958

Oligosaccharide characterization using collision-induced dissociation fast atom bombardment mass spectrometry: evidence for internal monosaccharide residue loss

König W.A. et al.

Chem. Ber. (1973) 106, 1905 cité par Knapp D.R. (1979)

Krotkiewski H., Lisowska E., Angel A-S., Nilsson B.

Carbohydr. Res. (1988) 184, 27–38

Structural analysis by fast-atom bombardment mass spectrometry of the mixture of alditols derived from the O-linked oligosaccharides of murine glycoporphins

Kuhn R., Wiegandt H.

Chem. Ber. (1963) 96, 866–880 cité par Lindberg B. et al. (1975) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31, 185–240

Kwon H., Kim J.

Anal. Biochem. (1993) 215, 243–252

Determination of monosaccharides in glycoproteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography

Laine R.A., Esselman W.J., Sweeley C.C.

Methods Enzymol. (1972) 28, 159–167

Gas-liquid chromatography of carbohydrates

Laine R.A., Pamidimukkala K.M., French A.D., Hall R.W., Abbas S.A., Jain R.K., Matta K.L.

J. Amer. Chem. Soc. (1988) 110, 6931–6939

Linkage position in oligosaccharides by fast atom bombardment ionization, collision-activated dissociation, tandem mass spectrometry and molecular modeling

Laine R.A., Yoon E., Mahier T.J., Abbas S., de Lappe B., Jain R., Matta K.

Biol. Mass Spectrom. (1991) 20, 505–514

Non-reducing terminal linkage position determination in intact and permethylated synthetic oligosaccharides having a penultimate amino sugar: fast atom bombardment ionization, collisional-induced dissociation and tandem mass spectrometry

Laver W.G., Pye J., Ada G.L.

Biochim. Biophys. Acta (1964) 81, 177–180

The molecular size of neuraminidase from *Vibrio cholerae* (strain 4Z)

Lee C.K., Gray G.R.

J. Amer. Chem. Soc. (1988) 110, 1292 cité par Gray (1990)

Lee Y.C., Ballou C.E.

Biochem. (1965) 4, 257–264

Preparation of mannobiose, mannotriose and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan

Lee Y.C.

Methods Enzymol. (1972) 28, 699–702

α -Mannosidase, β -glucosidase and β -galactosidase from sweet almond emulsin

Lee Y.C., Scocca J.R.

J. Biol. Chem. (1972) 247, 5753–5758

A common structural unit in asparagine-oligosaccharides of several glycoproteins from different sources

Lee Y.C.

Anal. Biochem. (1990) 189, 151–162

High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis

Lemoine J., Fournet B., Despeyroux D., Jennings K.R., Rozenberg R., de Hoffmann E.

J. Amer. Soc. Mass Spectrom. (1990) 4, 197–203

Lemoine J., Strecker G., Leroy Y., Fournet B., Ricart G.

Carbohydr. Res. (1991) 221, 209–217

Collisional activation tandem mass spectrometry of sodium adducts ions of methylated oligosaccharides: sequence analysis and discrimination between α -NeuAc-(2→3) and α -NeuAc-(2→6) linkages

Lemoine J., Chirat F., Domon B.

J. Mass Spectrom. (1996) 31, 908–912

Structural analysis of derivatized oligosaccharides using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

Leverly S.B., Roberts C.E., Salyan M.E.K., Bouchon B., Hakomori S-I.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1989) 162, 838–845

A novel strategy for unambiguous determination of inner esterification sites of ganglioside lactones

Leverly S.B., Salyan M.E.K., Roberts C.E., Bouchon B., Hakomori S-I.

Biomed. Env. Mass Spectrom. (1990a) 19, 303–310

Strategies for characterization of ganglioside inner esters I – Fast atom bombardment mass spectrometry

Leverly S.B., Roberts C.E., Salyan M.E.K., Bouchon B., Hakomori S-I.

Biomed. Env. Mass Spectrom. (1990b) 19, 311–318

Strategies for characterization of ganglioside inner esters II – Gas chromatography / mass spectrometry

Levrat C., Ardail D., Louisot P.

Int. J. Biochem. (1990) 22, 287–293

Li E., Tabas I., Kornfeld S.

J. Biol. Chem. (1978) 253, 7762–7770

The synthesis of complex-type oligosaccharides

Li E., Kornfeld S.

J. Biol. Chem. (1979) 254, 2754–2758

Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides

Li S-C., Li Y-T.

J. Biol. Chem. (1970) 245, 5153–5160

Studies on the glycosidases of Jack bean meal, III. Crystallization and properties of β -N-acetylhexosaminidase

Li S-C., Mazzotta M.Y., Chien S-F., Li Y-T.

J. Biol. Chem. (1975) 250, 6786–6791

Isolation and characterization of Jack bean β -galactosidase

Li Y-T.

J. Biol. Chem. (1966) 241, 1010–1012

Presence of α -mannosidic linkages in glycoproteins

Li Y-T.

J. Biol. Chem. (1967) 242, 5474–5480

Studies on the glycosidases in Jack bean meal, I. Isolation and properties of α -mannosidase

Li Y-T., Li S-C.

J. Biol. Chem. (1968) 243, 3994-3998

Studies on the glycosidases in Jack bean meal, II. Separation of various glycosidases by isoelectric focusing

Li Y-T., Li S-C.

Methods Enzymol. (1972) 28, 702-713

α -Mannosidase, β -N-acetylhexosaminidase and β -galactosidase from Jack bean meal

Lindberg B.

Methods Enzymol. (1972) 28, 178-195

Methylation analysis of polysaccharides

Lindberg B., Lönngren J.

Methods Enzymol. (1978) 50, 3-33

Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis

Linhardt R.J.

Methods Enzymol. (1994) 230, 265-280

Capillary electrophoresis of oligosaccharides

Lipniunas P., Grönberg G., Krotkiewski H., Angel A.S.

Arch. Biochem. Biophys. (1993) 300, 335-345

Investigation of the structural heterogeneity in the carbohydrate portion of a mouse monoclonal immunoglobulin A antibody

Lis H., Sharon N.

Eur. J. Biochem. (1993) 218, 1-27

Protein glycosylation, structural and functional aspects

Matta K.L., Bahl O.P.

J. Biol. Chem. (1972) 247, 1780-1787

Glycosidases of *Aspergillus niger*, IV. Purification and characterization of α -mannosidase

McBroom T., Stubbs H.J., Wadhwa M.S., Thomas V.H., Rice K.G.

Anal. Biochem. (1994) 222, 243-250

Reversal of tyrosinamide-oligosaccharide derivatization by Edman degradation

McDonald M.J., Bahl O.P.

Methods Enzymol. (1972) 28, 734-738

α -N-acetylgalactosaminidase from *Aspergillus niger*

McGuire E.J., Chipowsky S., Roseman S.

Methods Enzymol. (1972) 28, 755-763

β -N-acetylglucosaminidase, α -N-acetylgalactosaminidase and β -galactosidase from *Clostridium perfringens*

McNeil M., Albersheim P.

Carbohydr. Res. (1977) 56, 239-248

Chemical-ionization mass spectrometry of methylated hexitol acetates

Medzihradzky K.F., Maltby D.A., Hall S.C., Settineri C.A., Burlingame A.L.

J. Amer. Soc. Mass Spectrom. (1994) 5, 530-538

Characterization of protein N-glycosylation by reverse-phase microbore liquid chromatography / electrospray mass spectrometry, complementary mobile phases and sequential exoglycosidase digestion

Mega T., Hase S.

J. Biochem. (1991) 109, 600

Determination of lectin-sugar binding constants by microequilibrium dialysis coupled with high performance liquid chromatography

Menon A.K.

Methods Enzymol. (1994) 230, 418-442

Structural analysis of glycosylphosphatidylinositol anchors

Mizuochi T., Yonemasu K., Yamashita K., Kobata A.

J. Biol. Chem. (1978) 253, 7404-7409

The asparagine-linked sugar chains of subcomponent C1q of the first component of human complement

- Mizuochi T., Yamashita K., Fujikawa K., Kisiel W., Kobata A.**
J. Biol. Chem. (1979) 254, 6419–6425
The carbohydrate of bovine prothrombin
- Mohr M.D., Boernsen K.O., Widmer H.M.**
Rapid. Commun. Mass Spectrom. (1995) 9, 809–814
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: improved matrix for oligosaccharides
- Montreuil J.**
in *New Comprehensive Biochemistry* (Montreuil J., Vliegthart J.F.G., Shachter H., Eds) Elsevier, Amsterdam (1995) 29B, 1
- Mort A.J., Lampport D.T.**
Anal. Biochem. (1977) 82, 289–309
Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins
- Munson M.S.B., Field F.H.**
J. Amer. Chem. Soc. (1966) 88, 2621 cité par McLafferty F.W. et Turecek F. in *Interpretation of Mass Spectra* (1993) (4th Ed) University Science Books
- Muramatsu T.**
J. Biochem. (1968) 64, 521–531
N-acetylhexosaminidases from a gastropod, *Turbo cornutus*
- Naik S., Oates J.E., Dell A., Taylor G.W., Dey P.M., Pridham J.B.**
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1985) 132, 1–7
A novel mass spectrometric procedure for the rapid determination of the types of carbohydrate chains present in glycoproteins: application to α -galactosidase I from *Vicia faba* seeds
- Natsuka S., Hase S., Ikenaka T.**
Anal. Biochem. (1987) 167, 154–159
Fluorescence method for the structural analysis of oligomannose-type sugar chains by partial acetolysis
- Nishigaki M., Muramatsu T., Kobata A., Mayeama K-I.**
J. Biochem. (1974) 75, 509–517
The broad aglycon specificity of α -L-fucosidases from marine gastropods
- Oefner P.J., Chiesa C.**
Glycobiology (1994) 4, 397–412
Capillary electrophoresis of carbohydrates
- Ogata-Arakawa M., Muramatsu T., Kobata A.**
Arch. Biochem. Biophys. (1977) 181, 353–358
 α -L-fucosidases from almond emulsin: characterization of the two enzymes with different specificities
- Oh I.H., Gray G.R.**
Carbohydr. Res. (1995) 278, 329–338
Reductive cleavage of glycosides with borane complexes in the presence of boron trifluoride etherate
- Omichi K., Hase S.**
Anal. Biochem. (1995) 227, 404–407
Determination of the linkage positions of reducing-end residues of oligosaccharides by partial periodate oxidation of pyridylaminated derivatives
- Osawa T., Tsuji T.**
Ann. Rev. Biochem. (1987) 56, 21
Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins
- Palcic M.M.**
Methods Enzymol. (1994) 230, 300–316
Glycosyltransferases in glycobiology
- Parekh R.B., Tse A.G.D., Dwek R.A., Williams A.F., Rademacher T.W.**
EMBO J. (1987) 6, 1233–1244
Tissue-specific N-glycosylation site-specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition of rat Thy-1

Parekh R.B., Dwek R.A., Thomas J.R., Opdenakker G., Rademacher T.W., Wittwer A.J., Howard S.C., Nelson R., Siegel N.R., Jennings M.G., Harakas N.K., Feder J.

Biochem. (1989) 28, 7644–7662

Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator

Parekh R.B.

Methods Enzymol. (1994) 230, 340–348

Glycoform analysis of glycoproteins

Patel T., Bruce J., Merry A., Bigge C., Wormald M., Jaques A., Parekh R.

Biochem. (1993) 32, 679–693

Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins

Paulson J.C., Prieels J-P., Glasgow L.R., Hill R.L.

J. Biol. Chem. (1978) 253, 5617–5624

Sialyl- and fucosyltransferases in the biosynthesis of asparaginyl-linked oligosaccharides in glycoproteins

Paulson J.C., Weinstein J., Dorland L., van Halbeek H., Vliegthart J.F.G.

J. Biol. Chem. (1982) 257, 12734–12738

Newcastle Disease Virus contains a linkage-specific glycoprotein sialidase, application to the localization of sialic acid residues in N-linked oligosaccharides of α_1 -acid glycoprotein

Paz-Parente J., Cardon P., Leroy Y., Montreuil J., Fournet B., Ricart G.

Carbohydr. Res. (1985) 141, 41–47

A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion

Pfeiffer G., Dabrowski U., Dabrowski J., Stirm S., Strube K-H., Geyer R.

Eur. J. Biochem. (1992) 205, 961–978

Carbohydrate structure of a thrombin-like serine protease from *Agkistrodon rhodostoma*

Plummer Jr T.H., Elder J.H., Alexander S., Phelan A.W., Tarentino A.L.

J. Biol. Chem. (1984) 259, 10700–10704

Demonstration of peptide : N-glycosidase F activity in endo- β -N-acetylglucosaminidase F preparations

Poulter L., Burlingame A.L.

Methods Enzymol. (1990) 193, 661–689

Desorption mass spectrometry of oligosaccharides coupled with hydrophobic chromophores

Poulter L., Karrer R., Burlingame A.L.

Anal. Biochem. (1991) 195, 1–13

n-Alkyl p-aminobenzoates as derivatizing agents in the isolation, separation and characterization of submicrogram quantities of oligosaccharides by liquid secondary ion mass spectrometry

Prakash C., Vijay I.K.

Anal. Biochem. (1983) 128, 41–46

A new fluorescent tag for labeling of saccharides

Prehm P.

Carbohydr. Res. (1980) 78, 372–374

Methylation of carbohydrates by methyl trifluoromethanesulfonate in trimethyl phosphate

Rademacher T.W., Parekh R.B., Dwek R.A.

Ann. Rev. Biochem. (1988) 57, 785–838

Glycobiology

Radford T., DeJongh D.C.

in *Biochem. Applications of Mass Spectrometry* (Waller G.R. Ed) Wiley-Intersciences New York (1972) 313–350

Carbohydrates

Radford T., DeJongh D.C.

in *Biochem. Applications of Mass Spectrometry* (Waller G.R. Ed) Wiley-Intersciences New York (1980) 256–310

Carbohydrates

Rana S.S., Chandrasekaran E.V., Mendicino J.

J. Biol. Chem. (1987) **262**, 3654-3659

Structures of the sialylated oligosaccharide chains in swine trachea mucin glycoproteins

Rauvala H., Finne J., Krusius T., Kärkkäinen J., Järnefelt J.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1981) **38**, 389-417

Methylation techniques in the structural analysis of glycoproteins and glycolipids

Reinhold B.B., Chan S.Y., Reuber L., Walker G.C., Reinhold V.N.

J. Bacteriol. (1994) **176**, 1997-2002

Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021

Reinhold V.N., Reinhold B.B., Costello C.E.

Anal. Chem. (1995) **67**, 1772-1784

Carbohydrate molecular weight profiling, sequence, linkage and branching data: ESMS and CID

Roberts G.D., Johnson W.P., Burman S., Anumula K.R., Carr S.A.

Anal. Chem. (1995) **67**, 3613-3625

An integrated strategy for structural characterization of the protein and carbohydrate components of monoclonal antibodies: application to anti-respiratory syncytial virus MAb

Rocklin R.D., Pohl C.A.

J. Liquid Chromatogr. (1983) **6**, 1577-1590

Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection

Rolf D., Gray G.R.

J. Amer. Chem. Soc. (1982) **104**, 3539-3541

Reductive cleavage of glycosides

Rolf D., Bennek J.A., Gray G.R.

J. Carbohydr. Chem. (1983) **2**, 373-383

Reductive cleavage of glycosides. Stereochemistry of trapping of cyclic oxonium ions

Rosenfeld L., Ballou C.E.

Carbohydr. Res. (1974) **32**, 287-298

Acetolysis of disaccharides: comparative kinetics and mechanism

Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A.

Anal. Chem. (1965) **37**, 1602-1604

Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography

Schnaar R.L.

Methods Enzymol. (1994) **230**, 348-370

Isolation of glycosphingolipids

Schwartz J., Sloan J., Lee Y.C.

Arch. Biochem. Biophys. (1970) **137**, 122-127

Mannosidase, glucosidase and galactosidase in sweet almond emulsin

Scudder P., Neville D.C.A., Butters T.D., Fleet G.W.J., Dwek R.A., Rademacher T.W., Jacob G.S.

J. Biol. Chem. (1990) **265**, 16472-16477

The isolation by ligand affinity chromatography of a novel form of α -L-fucosidase from almond

Settineri C.A., Burlingame A.L.

Techniques in Protein Chemistry (1994) **5**, 97-103

Strategies for the characterization of carbohydrates from glycoproteins by mass spectrometry

Sharon N., Lis H.

Scientific American (1993) 74-81

Carbohydrates in cell recognition

Somme R.

Carbohydr. Res. (1986) **152**, 237-241

Degradation of glucuronic acid containing exopolysaccharide from *Rhizobium* by Hakomori methylation procedure

Srivastava V., Gray G.R.

Carbohydr. Res. (1993) **248**, 167–178

Structural analysis of sialic acid-containing carbohydrates by the reductive cleavage method

Stahl B., Steup N., Karas M., Hillenkamp F.

Anal. Chem. (1991) **63**, 1463

Stahl B., Klabunde T., Witzel H., Krebs B., Strup M., Karas M., Hillenkamp F.

Eur. J. Biochem. (1994) **220**, 321–330

The oligosaccharides of the Fe(III)–Zn(II) purple acid phosphatase of the red kidney bean

Stahl B., Thurl S., Zeng J., Karas M., Hillenkamp F., Steup M., Sawatzki G.

Anal. Biochem. (1994) **223**, 218–226

Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

Stewart T.S., Ballou C.E.

Biochem. (1968) **7**, 1855–1863

A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis

Sugahara K., Okumura T., Yamashina I.

Biochim. Biophys. Acta (1972) **268**, 488–496

Purification of β -mannosidase from a snail, *Achatina fulica*, and its action on glycopeptides

Sugahara K., Yamashina I.

Methods Enzymol. (1972) **28**, 769–772

β -Mannosidase from snails

Sutton C.W., O'Neill J.A., Cottrell J.S.

Anal. Biochem. (1994) **218**, 34–46

Site-specific characterization of glycoprotein carbohydrates by exoglycosidase digestion and laser desorption mass spectrometry

Suzuki H., Li S-C., Li Y-T.

J. Biol. Chem. (1970) **245**, 781–786

α -Galactosidase from *Mortierella vinacea*

Svensson S.

in *Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerization* (Marshall J.J. Ed.) Academic Press (1980) 387–391

Trifluoroacetolysis, a new versatile method for studies of glycoconjugates

Swaminathan N., Matta K.L., Bahl O.P.

Methods Enzymol. (1972) **28**, 744–749

1,2- α -D-mannosidase from *Aspergillus niger*

Sweeley C.C., Bentley R., Makita M., Wells W.W.

J. Amer. Chem. Soc. (1963) **85**, 2497–2507

Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances

Sykes D.E., Abbas S.A., Barlow J.J., Matta K.L.

Carbohydr. Res. (1983) **116**, 127–138

Substrate specificity and other properties of the β -D-galactosidase from *Aspergillus niger*

Tai T., Yamashita K., Ogata-Arakawa M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inoue Y., Kobata A.

J. Biol. Chem. (1975) **250**, 8569–8575

Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo- β -N-acetylglucosaminidase specificity

Tai T., Yamashita K., Ito S., Kobata

J. Biol. Chem. (1977) **252**, 6687

Takahashi N., Nakagawa H., Fujikawa K., Kawamura Y., Tomiya N.

Anal. Biochem. (1995) **226**, 139–146

Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides

- Takao T., Tambara Y., Nakamura A., Yoshino K.I., Fukuda H., Fukuda M., Shimonishi Y.**
Rapid. Commun. Mass Spectrom. (1996) **10**, 367-640
Sensitive analysis of oligosaccharide derivatized with 4-aminobenzoic acid-2(diethylaminoethyl)ester by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- Takasaki S., Ikehira H., Kobata A.**
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1980) **92**, 735-742
Increase of asparagine-linked oligosaccharides with branched outer chains caused by cell transformation
- Takasaki S., Mizuochi T., Kobata A.**
Methods Enzymol. (1982) **83**, 263-268
Hydrazinolysis of asparagine-linked sugar chains to produce free oligosaccharides
- Takasaki S., Kobata A.**
Biochem. (1986) **25**, 5710-5715
Asparagine-linked sugar chains of fetuin: occurrence of tetrasialyl triantennary sugar chains containing the Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc sequence
- Takemoto H., Hase S., Ikenaka T.**
Anal. Biochem. (1985) **145**, 245-250
Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high-performance liquid chromatography
- Tamura T., Wadhwa M.S., Rice K.G.**
Anal. Biochem. (1994) **216**, 335-344
Reducing-end modification of N-linked oligosaccharides with tyrosine
- Tomiya N., Awaya J., Kurono M., Endo S., Arata Y., Takahashi N.**
Anal. Biochem. (1988) **171**, 73-90
Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique
- Toomre D.K., Varki A.**
Glycobiology (1994) **4**, 653-663
Advances in the use of biotinylated diaminopyridine (BAP) as a versatile fluorescent tag for oligosaccharides
- Tsuda E., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S., Sasaki R.**
Eur. J. Biochem. (1990) **188**, 405-411
The role of carbohydrate in recombinant erythropoietin
- Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T.**
Biochim. Biophys. Acta (1974) **350**, 425-431
Production of microbial neuraminidases induced by colominic acid
- Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T.**
J. Biochem. (1977) **82**, 1425-1433
Distribution of neuraminidase in *Arthrobacter* and its purification by affinity chromatography
- Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T.**
J. Biochem. (1979) **86**, 1573-1585
Enzymatic properties of neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*
- Umamoto J., Bhavanandan V.P., Davidson E.A.**
J. Biol. Chem. (1977) **252**, 8609-8614
Purification and properties of an endo- α -N-acetyl-D-galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*
- Unkefer C.J., Gander C.E.**
J. Biol. Chem. (1990) **265**, 685-689
The 5-O- β -D-galactofuranosyl-containing peptidophosphogalactomannan of *Penicillium charlesii*
- Van Halbeek H.**
Methods Enzymol. (1994) **230**, 132-168
 ^1H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains of glycoproteins
- Varki A.**
FASEB J. (1991) **5**, 226-235
Radioactive tracer techniques in the sequencing of glycoprotein oligosaccharides

Varki A.

Glycobiology (1992) 2, 25–40
Diversity in the sialic acids

Varki A.

Glycobiology (1993) 3, 97–130
Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct

Varki A.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 7390–7397
Selectin ligands

Vijay I.K., Perdew G.H.

FEBS Letters (1982) 139, 321–324
Characterization of a new isomer of lipid-linked heptasaccharide formed during in vitro biosynthesis of mammary glycoproteins

Vliegthart J.F.G., Dorland L., Van Halbeek H.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1983) 41, 209–374
High-resolution, H^1 -nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins

Waechter C.J., Lennarz W.J.

Ann. Rev. Biochem. (1976) 45, 95–112
The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis

Walker P.G., Woollen J.W., Heyworth R.

Biochem. J. (1961) 79, 288–294
Studies on glucosaminidase, 5. Kidney N-acetyl- β -glucosaminidase and N-acetyl- β -galactosaminidase

Wang W.T., LeDonne Jr N.C., Ackerman B., Sweeley C.C.

Anal. Biochem. (1984) 141, 366–381
Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast-atom bombardment-mass spectrometry and exoglycosidase digestion

Wong-Madden S.T., Landry D.

Glycobiology (1995) 5, 19–28
Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas*

Woollen J.W., Walker P.G., Heyworth R.

Biochem. J. (1961) 79, 294–298
N-acetyl- β -glucosaminidase and N-acetyl- β -galactosaminidase activities of a variety of enzyme preparations

Yamamoto S., Hase S., Yamauchi H., Tanimoto T., Ikenaka T.

J. Biochem. (1989) 105, 1034–1039
Studies on the sugar chains of interferon- γ from human peripheral-blood lymphocytes

Yamashita K., Tachibana Y., Kobata A.

Arch. Biochem. Biophys. (1977a) 182, 546–555
Oligosaccharides of human milk: structures of three lacto-N-hexaose derivatized with H-haptenic structure

Yamashita K., Tachibana Y., Kobata A.

J. Biol. Chem. (1977b) 252, 5408–5411
Oligosaccharides of human milk

Yamashita K., Tachibana Y., Takada S., Matsuda I., Arashima S., Kobata A.

J. Biol. Chem. (1979) 254, 4820–4827
Urinary glycopeptides of fucosidosis

Yamashita K., Ichishima E., Arai M., Kobata A.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1980) 96, 1335–1342
An α -mannosidase purified from *Aspergillus saitoi* is specific for α -1,2 linkages

Yamashita K., Tachibana Y., Nakayama T., Kitamura M., Endo Y., Kobata A.

J. Biol. Chem. (1980) 255, 5635–5642
Structural studies of the sugar chains of human parotid α -amylase

Yamashita K., Ohkura T., Yoshima H., Kobata A.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981) **100**, 226–232

Substrate specificity of diplococcal β -N-acetylhexosaminidase, an useful enzyme for the structural studies of complex type asparagine-linked sugar chains

Yamashita K., Mizuochi T., Kobata A.

Methods Enzymol. (1982) **83**, 105–126

Analysis of oligosaccharides by gel filtration

Yang Y., Orlando R.

Anal. Chem. (1996) **68**, 570–572

Simplifying the exoglycosidase digestion/MALDI-MS procedures for sequencing N-linked carbohydrate side chains

Yoon E., Laine R.A.

Biol. Mass Spectrom. (1992) **21**, 479–485

Linkage position determination in a novel set of permethylated neutral trisaccharides by collisional-induced dissociation and tandem mass spectrometry

Yoshida T., Lee Y.C.

Carbohydr. Res. (1994) **251**, 175–186

Glycamine formation via reductive amination of oligosaccharides with benzylamine: efficient coupling of oligosaccharides to protein

Yoshima H., Takasaki S., Ito-Mega S., Kobata A.

Arch. Biochem. Biophys. (1979) **194**, 394–398

Purification of almond emulsin α -L-fucosidase I by affinity chromatography

Yoshima H., Takasaki S., Kobata A.

J. Biol. Chem. (1980) **255**, 10793–10804

The asparagine-linked sugar chains of the glycoproteins in calf thymocyte plasma membrane

Yoshino K-I., Takao T., Murata H., Shimonishi Y.

Anal. Chem. (1995) **67**, 4028–4031

Use of the derivatizing agent 4-aminobenzoic acid 2-(diethylamino)-ethyl ester for high-sensitivity detection of oligosaccharides by electrospray ionization mass spectrometry

Zanetta J.P., Breckenbridge W.C., Vincendon G.

J. Chromatogr. (1972) **69**, 291

Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids

Zhou Z., Ogden S., Leary J.A.

J. Org. Chem. (1990) **55**, 5444–5446

Linkages position determination in oligosaccharides: MS/MS study of lithium-cationized carbohydrates

