

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DE LILLE 1
Unité de Formation et de Recherche de Biologie

UNITE MIXTE DE RECHERCHE N°8576 DU CNRS
LABORATOIRE DE GLYCOBIOLOGIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE

ANNEE 2002-2003

N* Ordre : 3282

THESE

Présentée par

Xavier CZESZAK

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Spécialité : Biochimie

Ecole Doctorale : Biologie Santé ED 446

Titre de la Thèse :

**Nouvelle Stratégie de Positionnement des Structures
O-Glycanniques : β -Elimination et Dérivation à Charge Fixe**

Soutenue le 11 avril 2003

Devant la commission d'examen composée de:

M. le Docteur Olivier Laprèvote (rapporteur)
M. le Professeur Joël Vandekerckhove (rapporteur)
M. le Docteur Bernard Monsarrat (examineur)
M. le Docteur Gérard Strecker (examineur)
M. le Docteur Jean-Claude Michalski (Président)
M. le Professeur Jérôme Lemoine (Directeur de Thèse)

- Sommaire -

Avant-Propos

Remerciements

Considérations Historiques et Bibliographiques

Chapitre 1 : Introduction à la Spectrométrie de Masse

1.1/ Principe général de la spectrométrie de masse

1.2/ Fondements historiques de la spectrométrie de masse

1.3/ Les différentes techniques d'ionisations

1.3.1/ Ionisation par impact électronique (IE)

1.3.2/ Ionisation chimique (IC)

1.3.3/ Ionisation par désorption de champs (DC)

1.3.4/ Ionisation par désorption de plasma (^{252}Cf -DP)

1.3.5/ Ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS et FAB)

1.3.6/ Désorption / Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

1.3.7/ Ionisation par électronébulisation (Electrospray)

Evolution de la source d'ionisation électrospray : Source Nanospray

1.4/ Les différents analyseurs de masse

1.4.1/ Les analyseurs magnétiques

1.4.2/ Les analyseurs quadripolaires

1.4.3/ L'analyseur à temps de vol (TOF : *Time of flight*)

Décomposition Post-Source (PSD : Post Source Decay)

1.4.4/ L'analyseur hybride de type quadripôle-temps de vol (Q-TOF)

1.4.5/ L'analyseur à piège à ions (*ion-trap ou quistor*)

1.4.6/ L'analyseur à transformée de Fourier

1.5/ En résumé...

Chapitre 2 : Glycobiologie Structurale

2.1/ Introduction

2.2/ Rôles et importance biologique de la glycosylation

2.3/ Analyse de O-glycopeptides et localisation de sites de O-glycosylation

2.3.1/ Spectrométrie de masse MALDI

2.3.2/ Spectrométrie de masse Electrospray

Contribution de l'analyseur hybride de type Q-TOF pour la localisation des sites de glycosylation

2.3.3/ Spectrométrie de masse FT-MS

2.4/ Conclusion partielle

2.5/ Déglycosylation et marquage de sites

2.5.1/ Méthode enzymatique

2.5.2/ Méthodes chimiques

Hydrolyse acide ménagée

β -élimination

2.6/ En résumé...

Chapitre 3 : Dérivation à Charge Permanente pour l'Analyse des Peptides

- 3.1/ Introduction
- 3.2/ Dérivation à charge permanente N-terminale
 - 3.2.1/ Groupement Ammonium quaternaire
 - 3.2.2/ Groupement Phosphonium quaternaire
- 3.3/ Dérivation N-terminale à haute affinité protonique
- 3.4/ Dérivation C-terminale à charge permanente
- 3.5/ En résumé...

Développements et Résultats Personnels

Chapitre 4 : Action Catalytique de la Soude

- 4.1/ Introduction
 - Problématique*
- 4.2/ Evaluation de la méthode de Meyer pour la déglycosylation de O-glycopeptides
 - 4.2.1/ Analyse NANO-ESI/MS-MS des composés GTTPSPVP(EtS⁻)-18 (m/z=781), GTTPSPVP(EtS⁻) (m/z=799) et GTTPSPVP(EtS⁻)+44 (m/z=843)
 - 4.2.2/ Analyse NANO-ESI / MS-MS du composé P⁺-GTTPSPVP(EtS⁻)
- 4.3/ Evaluation de la méthode de Meyer pour la déglycosylation de O-glycopeptides longs
 - 4.3.1/ Etude du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)
 - 4.3.2/ Etude du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂
 - Etape de déglycosylation*
- 4.4/ En résumé...

Chapitre 5 : Dérivés Aminés et β-Elimination

- 5.1/ Evaluation de l'efficacité de la diméthylamine dans les réactions de β-élimination / marquage des sites de glycosylation des O-glycopeptides
 - 5.1.1/ Déglycosylation du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc)
 - 5.1.2/ Déglycosylation par la diméthylamine des glycopeptides de séquences TTSTTSAP(GalNAc) et TTSAPTT(SGalNAc) : obtention de peptides diméthylamino modifiés
 - Analyse NANO-ESI/MS-MS du composé TTSTTSAP(Me₂N-)*
 - Analyse NANO-ESI/MS-MS du composé TTSAPTT(SGalNAc)(Me₂N-)*
- 5.2/ Action conjointe de la méthylamine et de la diméthylamine : déglycosylation de longs glycopeptides de séquence GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)
 - Séquençage NANO-ESI/MS-MS des composés GTTPSPVPTTSTTSAP(MeNH⁻) et GTTPSPVPTTSTTSAP(Me₂N⁻)
- 5.3/ Déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide de séquence GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂
 - 5.3.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂
 - 5.3.2/ Séquençage du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(Me₂N⁻)(GalNAc)
- 5.4/ En résumé... Evaluation de l'efficacité des dérivés aminés dans les réactions de β-élimination / marquage des sites de glycosylation des O-glycopeptides
- 5.5/ Dérivation N-terminale des composés TTSTTSAP(Me₂N⁻) et

TTSAPTTs(Me₂N-)

5.6/ Régiosélectivité de la dérivation N-terminale :

dérivation des espèces déglycosylées GTTPSPVPTTSTTSAP(MeNH-)

et GTTPSPVPTTSTTSAP (Me₂N-)

5.7/ Dérivation N-terminale de l'espèce partiellement déglycosylée

GTTPSPVPTTSTTSAP(Me₂N-)(GalNAc)

5.8/ En résumé...

Chapitre 6 : β-Elimination et Dérivation N-terminale pour l'Analyse des O-Glycopeptides

6.1/ Etude structurale du composé TTSTTSAP(GalNAc)

6.1.1/ Déglycosylation du composé TTSTTSAP(GalNAc)

6.1.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé TMPP⁺-Ac-TTSTTSAP(EtS-)

Observation : Importance du niveau d'énergie collisionnelle dans la fragmentation des composés β-éliminés/dérivés

6.2/ Etude structurale du composé GTTPSPVP(GalNAc)

6.2.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVP(GalNAc)

6.2.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé TMPP⁺-Ac-GTTPSPVP(EtS-)

6.3/ Etude structurale du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)

6.3.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)

6.3.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé

TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-)

6.4/ Etude structurale du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)

6.4.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)

6.4.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé

TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-)

6.4.3/ Remarque

6.5/ Etude structurale du composé ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)

6.5.1/ Déglycosylation du composé ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)

6.5.2/ NANO-ESI-CID/MS-MS du composé TMPP⁺-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(PrS-)

6.6/ Note expérimentale : incidence des réactions de β-élimination/addition sur le squelette peptidique. Temps de réaction prolongés et condensation non-spécifique

6.6.1/ Etude NANO-ESI-CID/MS-MS des espèces générées après 6 heures de réaction

6.6.2/ Etude NANO-ESI-CID/MS-MS des espèces générées après 16 heures et plus de réaction

6.7/ En résumé...

Chapitre 7 : Influence de la Nature de la Charge sur la Fragmentation des O-Glycopeptides

7.1/ Introduction

7.2/ Etude de fragmentation du glycopeptide de séquence TTSAP(GalNAc)

7.2.1/ Etude du précurseur monochargé [MH]⁺

7.2.2/ Etude du précurseur monochargé [C]⁺

7.2.3/ Etude du précurseur dichargé [CH]²⁺

7.2.4/ Etude de fragmentation MALDI-PSD/MS du glycopeptide de séquence TTSAP(GalNAc)

7.3/ Etude de fragmentation du glycopeptide de séquence TTSAPTTs (GalNAc)

7.3.1/ Etude du précurseur monochargé [MH]⁺

7.3.2/ Etude du précurseur monochargé [C]⁺

- 7.3.3/ Etude du précurseur dichargé $[CH]^{2+}$
- 7.3.4/ Etude de fragmentation MALDI-PSD/MS du glycopeptide de séquence TTSAPTT(SGalNAc)

7.5/ En résumé...

Chapitre 8 : Localisation de site(s) de O-glycosylation par dérivation N-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

8.1/ Introduction

8.2/ Influence de la séquence en acide aminés

8.2.1/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTTPSPVP(GalNAc)$

8.2.2/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-TTSTTSAP(GalNAc)$

8.3/ Influence du nombre de sites de glycosylation

8.3.1/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)$

8.3.2/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_2$

8.3.3/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_3$

8.4/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)$

8.5/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)$

8.6/ Détermination de la séquence d'une réaction de glycosylation enzymatique d'un glycopeptide par dérivation N-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

8.7/ En résumé...

Chapitre 9 : Localisation de site(s) de O-glycosylation par dérivation C-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

9.1/ Introduction

9.2/ Synthèse du réactif de dérivation C-terminale

9.3/ Dérivation C-terminale à charge permanente : séquençage glycopeptidique et localisation des sites de O-glycosylation associés

9.3.1/ Etude MALDI-PSD/MS du composé $(GalNAc)GTTPSPVP-NH-Et-TPP^+$

9.3.2/ Etude MALDI-PSD/MS du composé $(GalNAc)TTSTTSAP-NH-Et-TPP^+$

9.3.3/ Etude MALDI-PSD/MS du composé $(GalNAc)_2GTTPSPVPTTSTTSAP-NH-Et-TPP^+$

9.4/ Note expérimentale : réaction d'addition non-spécifique du bromure de 2-amino-triphénylphosphonium

9.4.1/ Condensation du DCC

9.4.2/ Addition non-spécifique du bromure de 2-aminoéthyl triphénylphosphonium

9.5/ En résumé...

Chapitre 10 : Etude de la Fragmentation Préférentielle de la Liaison Glycopeptidique : Marquage des Hydrogènes Mobiles au Deutérium

10.1/ Introduction

10.2/ Etude comparative de la fragmentation des espèces hydrogénées/deutérees

Remarque préliminaire

Vers une explication de la fragmentation préférentielle de la liaison glycopeptidique

Travaux de Collaborations

Introduction

Publications associées

Conclusion Générale

Annexes

A₁

Matériels et Méthodes

11.1/ Spectrométrie de Masse

11.1.1/ Nanospray

11.1.2/ Nanospray-Q-TOF

11.1.3/ MALDI-MS et MALDI PSD-MS

Analyseurs

Matrices

11.2/ Préparation du matériel peptidique/glycopeptidique

11.2.1/ Micropurifications chromatographiques

11.2.2/ Déglycosylation des glycopeptides par réactions de β -élimination

Protocole de Meyer et collaborateurs

β -élimination par action de méthylamine/diméthylamine

β -élimination par action de diméthylamine/éthanethiol (propanethiol)/isopropanol

Protocole adapté

11.3/ Réaction de dérivation N-terminale

11.4/ Réaction de dérivation C-terminale

11.5/ Echanges hydrogène/deutérium

11.6/ Glycosylation enzymatique des peptides

11.7/ Glycopeptides étudiés

A₂

Schémas de Fragmentation

A₃

Ions peptidique à charge mobile et à charge permanente

A₄

Références Bibliographiques

Considérations Historiques et
Bibliographiques

Chapitre 1 :

Introduction à la Spectrométrie de Masse

Chapitre 1 : Introduction à la Spectrométrie de Masse

1.1/ Principe général de la spectrométrie de masse

1.2/ Fondements historiques de la spectrométrie de masse

1.3/ Les différentes techniques d'ionisations

1.3.1/ Ionisation par impact électronique (IE)

1.3.2/ Ionisation chimique (IC)

1.3.3/ Ionisation par désorption de champs (DC)

1.3.4/ Ionisation par désorption de plasma (^{252}Cf -DP)

1.3.5/ Ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS et FAB)

1.3.6/ Désorption / Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

1.3.7/ Ionisation par électronébulisation (Electrospray)

Evolution de la source d'ionisation électrospray : Source Nanospray

1.4/ Les différents analyseurs de masse

1.4.1/ Les analyseurs magnétiques

1.4.2/ Les analyseurs quadripolaires

1.4.3/ L'analyseur à temps de vol (TOF : *Time of flight*)

Décomposition Post-Source (PSD : Post Source Decay)

1.4.4/ L'analyseur hybride de type quadripôle-temps de vol (Q-TOF)

1.4.5/ L'analyseur à piège à ions (*ion-trap ou quistor*)

1.4.6/ L'analyseur à transformée de Fourier

1.5/ En résumé...

1.1/ Principe général de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse repose sur la transformation de molécules, alors à leur état naturel, en ions à l'état gazeux. Une fois ce changement d'état obtenu, elle permet de connaître leur masse moléculaire en analysant leur rapport masse sur nombre de charges noté m/z (m représentant la masse du composé et z sa charge associée).

Le principe même d'une mesure en spectrométrie de masse repose toujours sur **trois étapes primordiales** : l'ionisation, l'analyse et la détection. (*Figure 1.1*)

L'ionisation voit passer l'échantillon initialement sous forme liquide ou solide en phase gazeuse par évaporation, sublimation ou désorption. Elle peut subvenir simultanément à ces événements ou peut en représenter la conséquence. L'étape d'ionisation survient dans la source du spectromètre de masse et génère au final une entité d'intérêt qualifiable à tort d'ion moléculaire (molécules ionisées).

L'analyse va permettre la séparation des espèces chargées générées lors de l'ionisation en fonction de leur rapport masse sur nombre de charges (m/z).

La détection intègre le signal de chacune des espèces, en mesure l'intensité, permettant alors l'obtention du spectre de masse après traitement du signal complexe (basé sur l'association d'un nombre de coups à un rapport m/z).

Enfin, une analyse en spectrométrie de masse ne pourrait aboutir sans le concours d'un **enregistreur** pour le traitement du signal et la visualisation des spectres et d'un **système de calibration** permettant l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et la rapport m/z considéré.

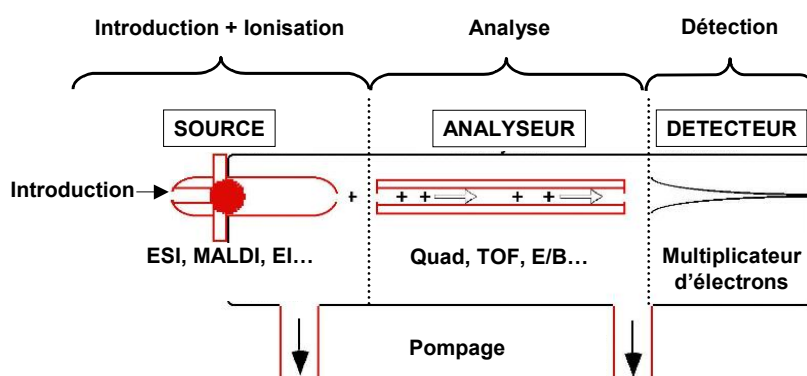


Figure 1.1 : Composantes générales d'un spectromètre de masse

1.2/ Fondements historiques de la spectrométrie de masse

L'implication grandissante de la spectrométrie de masse et ses applications à l'étude des composés biologiques et des processus qui en découlent peuvent être qualifiées de récentes puisque datant d'une vingtaine d'années ; en revanche, les principes physiques qui la commandent sont connus depuis plus d'un siècle. D'évolution en perfectionnement, la spectrométrie de masse est objectivement devenue un outil analytique incontournable dans des domaines d'application aussi variés que la physique, la chimie ou la biologie et il nous paraît pertinent, en guise de préambule, de consacrer une part de ce manuscrit à l'historique de cette(ces) technique(s).

Selon les dires du très averti Professeur McLafferty :



« La spectrométrie de masse est à l'origine de progrès scientifiques aussi exceptionnels que la caractérisation de nouveaux éléments, la découverte des isotopes et leur marquage, la mesure et la détermination exacte de la masse atomique, l'analyse quantitative de gaz, l'identification rapide de drogues et de polluants présents à l'état de traces, la caractérisation de structure supra-moléculaire... »

L'histoire de la spectrométrie de masse est intimement liée aux expériences de Goldstein en 1886 qui réussit à obtenir des ions positifs dans un tube à décharge (*Goldstein EF, 1886*). En 1897, Thomson mène une étude expérimentale sur les décharges électriques en milieu gazeux pour mettre en évidence le caractère corpusculaire de la matière. Dans ce cadre, il montre l'existence de l'électron (*Thomson JJ, 1897*) et, fort des expériences de Wien (*Wien W, 1898*), met au point le tout premier spectromètre de masse ou « spectrographe parabolique » lui permettant de mesurer le rapport m/z de cette même particule. Dans ce prototype, il sépare les constituants d'un faisceau d'ions positifs (par passage successif dans un champ électrique puis dans un champ magnétique) selon des trajectoires paraboliques caractéristiques d'un rapport m/z donné. Les raies ainsi émises sont détectées sur un écran fluorescent ou sur une plaque photographique. En 1906, Thomson se voit attribuer le prix Nobel de Physique « *en reconnaissance du grand mérite de ses*

recherches théoriques et expérimentales sur la conduction de l'électricité dans les gaz ». Un peu plus tard, Aston (*Aston FW, 1919*) sous la direction du même Thomson conçoit un spectromètre de masse à re-focalisation en vitesse. (**Figure 1.2**)

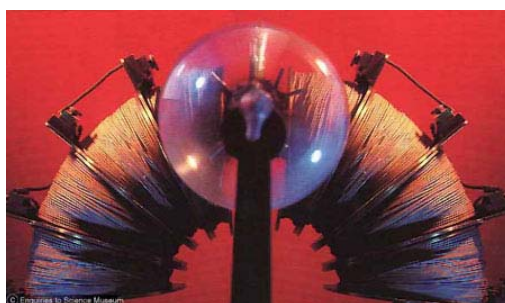


Figure 1.2 : Spectromètre (spectrographe) de masse d'Aston, 1919.

Ce système augmente le pouvoir de résolution du spectrographe de Thomson d'un ordre de grandeur. Aston étudie sur cet appareil les isotopes et reçoit pour la pertinence de ses travaux le prix Nobel de Chimie en 1922. Au même moment, Dempster développe un déflecteur magnétique à focalisation dirigée et met au point la première source à impact électronique (*Dempster AJ, 1918*). Celle-ci permet déjà d'ioniser des molécules gazeuses en utilisant un faisceau d'électrons généré par un filament chauffé, ce prototype étant aujourd'hui considéré à juste titre comme le premier spectromètre de masse à secteur magnétique. En un peu plus de vingt ans, les pionniers que sont Thomson, Aston et Dempster définissent les principes généraux de la spectrométrie de masse. L'évolution de cette dernière va ensuite dépendre des recherches menées sur les différentes techniques d'ionisation d'une part et sur les nouveaux concepts d'analyseurs d'autre part.

1.3/ Les différentes techniques d'ionisations

1.3.1/ Ionisation par impact électronique (IE)

L'ionisation par impact électronique proposée par Dempster permet d'appréhender pour la première fois l'ionisation de molécules organiques. L'échantillon natif ou en solution est déposé sur un filament porté à incandescence. L'évaporation de l'échantillon et le bombardement simultané de celui-ci par des électrons issus d'un filament de Tungstène aboutissent à son ionisation. (**Figure 1.3**)

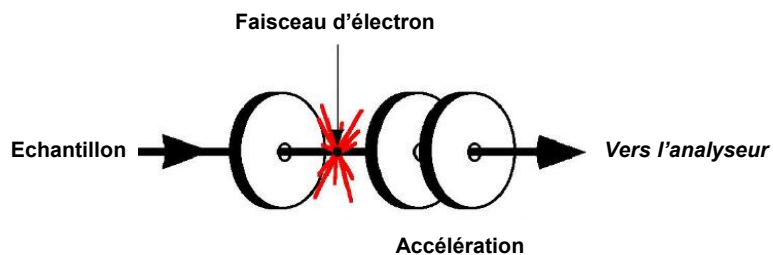


Figure 1.3 : Ionisation par impact électronique.

1.3.2/ Ionisation chimique (IC)

L'ionisation chimique décrite pour la première fois par Thomson (*Thomson JJ, 1912*) en 1912 (expérience sur l'hydrogène gazeux) née réellement des travaux de Munson et Field 50 ans plus tard (*Munson MSB et Field FH, 1966*). Elle repose sur des mécanismes d'interactions chimiques ion-molécule, l'échantillon étant mis en contact avec un gaz réactant présent dans la source du spectromètre.

Dans le cas de l'ammoniac, on a par exemple :



Constituant une technique d'ionisation douce, l'ionisation chimique en comparaison avec l'impact électronique génère beaucoup moins d'ions fragments.

L'ionisation de champ, décrite par Muller (*Muller EW, 1953*) autorise l'ionisation du composé à analyser sous l'effet d'un champ électrique fort et progressif.

1.3.3/ Ionisation par désorption de champs (DC)

Les techniques de désorption ont considérablement accru les capacités d'analyse de la spectrométrie de masse. L'une des premières techniques de désorption décrite est la technique de désorption de champ (*Beckey HD et Schuelten D, 1960*). L'échantillon d'intérêt en solution saline est déposé sur un filament recouvert d'aiguilles de carbone. Sous l'effet du chauffage et de la mise sous tension du filament, les ions générés migrent sur les aiguilles de carbone et sont désorbés par effet de pointe. La désorption de champ élargie véritablement les domaines

d'applications de la spectrométrie de masse aux problématiques de la biologie en rendant possible l'étude de composés non volatiles et thermiquement instables.

1.3.4/ Ionisation par désorption de plasma (^{252}Cf -DP)

La désorption par Plasma selon Macfarlane et Torgerson (*Macfarlane RD et Torgerson DF, 1976*) utilise des particules de la fission nucléaire de l'élément californium-252 pour bombarder et ioniser l'échantillon en phase solide à analyser (particules extrêmement énergétiques de l'ordre du MeV !!!). La désorption plasma démontre pour la première fois les capacités de la spectrométrie de masse pour les études de bio-molécules de haut poids moléculaire avec la description de complexes protéine-antibiotique, l'analyse de certains peptides non dérivés ou encore l'analyse de l'insuline.

1.3.5/ Ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (LSIMS et FAB)

Les techniques d'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides font leur apparition dans les années 1970. Benninghoven (*Benninghoven A et Jasper D, Sichter mann W, 1976*) reprend les travaux de Slodzian et utilise une source à émission d'ions secondaires pour ioniser des composés organiques (acides aminés) préalablement déposés sur un support métallique. Cependant, les signaux SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*) obtenus sont éphémères car la surface d'impact est rapidement détruite par le flux d'ions primaires de haute énergie.

En 1981, Barber et collaborateurs adaptent cette technique et proposent la spectrométrie de masse FAB-MS pour *Fast Atom Bombardment*, bombardement d'atomes rapides (**Figure 1.4**) (ou LSIMS pour *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*, spectrométrie de masse d'ionisation secondaire en phase liquide) (*Barber M et al, 1981*). La technique FAB utilise un faisceau d'atomes de bombardement (xénon ou argon) (3-10keV) pour l'ionisation douce des composés mélangés à une matrice liquide (glycérol, thioglycérol, metanitrobenzyl alcool/TFA 1%), rendant notamment possible l'analyse de composés organiques non-volatiles.

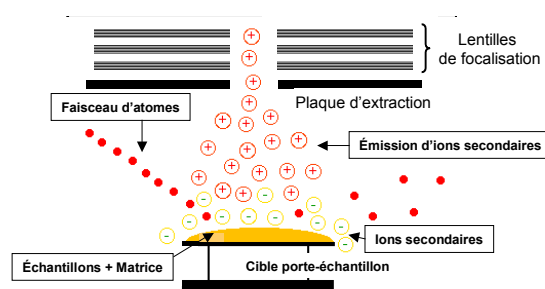


Figure 1.4 : Source d'ionisation FAB (LSIMS).

Quelques années plus tard, Aberth améliorera les rendements d'ionisation de la méthode précédemment décrite en utilisant des ions césium pour le bombardement (énergie de 20-30keV) (*Aberth W et Burlingame AL, 1984*).

Cependant, toutes ces techniques souffrent d'un certain nombre de limitations majeures. La gamme de masse est limitée, les cas les plus favorables atteignant 25kDa. La sensibilité reste plutôt mauvaise puisque plusieurs dizaines de picomoles sont nécessaires à l'analyse de protéines (cette notion de sensibilité étant optimisée par la « continuous flow FAB » (CFFAB) développée par Tomer). Enfin, l'analyse d'échantillons en mélange est notoirement caractérisée par des effets de suppression de signal, rendant ces techniques beaucoup trop sélectives. Il faut donc attendre l'apparition de sources d'ionisation d'un genre nouveau pour voir la spectrométrie de masse se mettre véritablement au diapason de l'échantillon biologique.

L'année 1988 voit apparaître deux nouvelles sources d'ionisation qui à elles seules préfigurent la véritable **révolution « BioSpectrométrie »**, l'ionisation par désorption laser assistée par matrice communément appelée **MALDI** et l'ionisation par électronébulisation ou **Electrospray**.

1.3.6/ Désorption / Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Lors de l'International Mass Spectrometry Conference à Bordeaux (France), Franz Hillenkamp (*Karas M et Hillenkamp F, 1988*) définit les principes de la désorption-ionisation laser assistée par matrice et expose pendant sa présentation une mesure de masse de protéine de 117kDa par utilisation d'un analyseur à temps de vol.

Pensés de manière concomitante mais complètement indépendante par Tanaka et collaborateurs (*Tanaka K et al, 1988*) (Shimadzu Corporation, Kyoto), les principes qui régissent cette technique s'apparentent à ceux du bombardement par

des particules rapides. L'échantillon en solution est déposé sur un support solide (cible acier/inox), mélangé à une solution de matrice (composé aromatique). La matrice permet non seulement l'évaporation et la constitution d'un réseau cristallin désorbable mais également l'ionisation du composé à analyser par transfert de protons et d'électrons. Le choix de la matrice se fait en fonction de la nature de la molécule à analyser, en fonction des rapports d'affinité protonique entre la molécule d'intérêt et la matrice mais aussi en fonction du « recul expérimental » du manipulateur. L'irradiation du réseau matriciel cristallin désolvaté se fait par un faisceau monochromatique de photons à la longueur d'onde d'excitation des molécules de matrice. Le laser utilisé est actuellement et dans la plupart des cas un laser pulsé à azote fonctionnant à une longueur d'onde d'excitation de 337nm. Chaque tir laser engendre une explosion des couches les plus superficielles du réseau cristallin et la formation d'un nuage moléculaire, siège de l'ionisation (**Figure 1.5**). De par le temps de résidence très faible des ions générés dans la source MALDI (quelques nano-secondes), les réarrangements ioniques sont statistiquement rares et par la même, la source d'ionisation MALDI génératrice d'espèces faiblement chargées. Aussi, de par sa sensibilité et son extrême tolérance vis à vis des solutions de force ionique ou de pouvoir détergent élevés, la technique d'ionisation MALDI généralement associée à un analyseur en temps de vol se présente comme un candidat de choix pour l'analyse de composés biologiques.

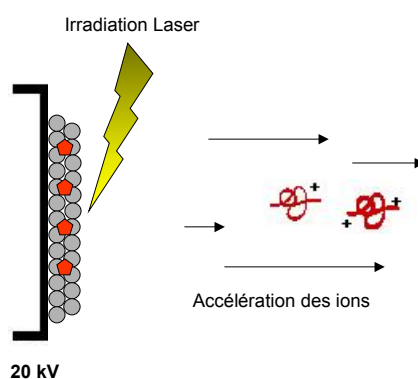


Figure 1.5 : Source d'ionisation MALDI.

1.3.7/ Ionisation par électronébulisation (Electrospray)

Le principe de l'ionisation par électronébulisation remonte aux travaux de Zeleny en 1917 qui parvient à produire des gouttelettes chargées à partir d'un jet moléculaire (*Zeleny J, 1917*). Aux regards de ces principes fondateurs et en validant les travaux de Dole (*Dole M et al, 1968*), Fenn et Yamashita (*Yamashita M et Fenn JB, 1984*) en parallèle aux travaux d'Aleksandrov (*Aleksandrov ML, 1984*) posent les bases fondamentales de l'ionisation par électronébulisation. Lors de l'American Society of Mass Spectrometry de Juin 1988 à San Francisco (Californie, Etats-Unis), John Fenn présente une application de la source par électronébulisation à l'analyse de protéines. En développant cette source d'ionisation douce, Fenn et Yamashita ont participé de manière certaine à l'accroissement du spectre d'application de la spectrométrie de masse, lui offrant un accessit à « *l'identification et l'analyse structurale des macromolécules biologiques* ». Ces derniers se sont vus décerner le Prix Nobel de Chimie 2002.

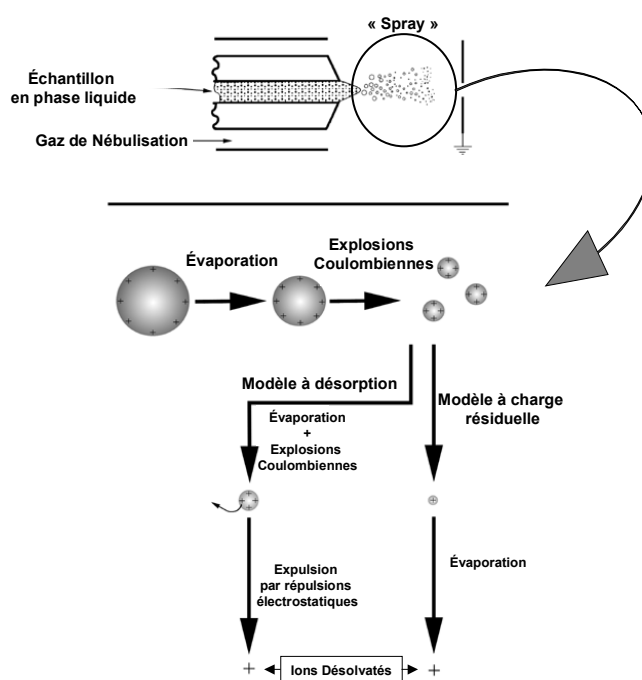


Figure 1.6 :Source d'ionisation electrospray.

Reposant sur le transfert d'ions d'une phase liquide (l'échantillon) vers une phase gazeuse, l'ionisation par électronébulisation utilise un capillaire porté à un

potentiel de quelques kilovolts (généralement entre 3 et 5). Si le champ électrique généré par cette différence de potentiel est suffisant, une pointe à l'extrémité du capillaire se forme, le cône de Taylor (*Taylor GI, 1964*). De par la valeur de ce même champ électrique et de par l'importance de la densité de charges au sein de l'échantillon, les tensions de surface à l'extrémité du cône de Taylor peuvent être dépassées, provoquant enfin l'émission, à pression atmosphérique, de fines gouttelettes. Ce phénomène est de plus favorisé par l'utilisation d'un gaz de nébulisation dont le rôle ne se limite pas seulement à créer une surpression pour surmonter les forces de tension de surface, mais aussi et surtout à envisager les premières étapes de désolvatation de ces gouttelettes. (**Figure 1.6**)

Emises au sein du « spray », les gouttelettes sont focalisées par le champ électrique et progressent vers l'entrée du spectromètre en subissant dans un même temps un processus de désolvatation par rencontre avec un flux d'azote chaud orthogonal et/ou coaxial. La température de la source du spectromètre et l'accroissement de la densité de charges par la diminution de la taille des gouttelettes augmentent considérablement l'agitation moléculaire propice à des événements de réarrangements et d'explosions. Quand la limite de stabilité de Rayleigh (*Rayleigh Lord, 1882*) est atteinte, les forces de répulsion coulombienne excèdent la tension de surface des gouttelettes. Celles-ci explosent pour donner naissance à des micro-gouttelettes de deuxième génération. D'explosions en explosions, les ions complètement désolvatés sont formés dans la source du spectromètre. Conduisant à la formation d'ions en phase gazeuse généralement porteurs de plusieurs charges, les événements qui siègent au sein même de la source électrospray n'ont pas encore été clairement définis ; néanmoins, deux mécanismes principaux perdurent encore de nos jours (*Dole M et al, 1968*), (*Iribarne JV et Thomson BA, 1976*).

Evolution de la source d'ionisation électrospray : Source Nanospray

Un développement récent de cette source électrospray utilise des tensions moindres et des capillaires d'introduction de diamètre réduit autorisant, par un faible débit, de limiter la consommation de la solution d'échantillon à analyser (*Caprioli RM et al, 1994*). Une source encore plus « économique » utilise un capillaire en verre borosilicaté recouvert d'une fine couche de métal conducteur (généralement un alliage Or/Palladium). L'aiguille remplie de quelques microlitres de solution à

analyser, est soumise à un potentiel électrique de quelques centaines de volts (600-900V) et autorise des débits de quelques dizaines de nanolitres par minute. Mise au crédit de Wilm et Mann, cette source Nanospray est aujourd'hui utilisée dans de nombreuses problématiques biologiques faisant intervenir la spectrométrie de masse (*Wilm M et Mann M, 1994*), (*Wilm M et Mann M, 1994b*), (*Wilm M et Mann M, 1996*).

1.4/ Les différents analyseurs de masse

Après les travaux des pères fondateurs de la spectrométrie de masse, l'essentiel des développements se portent sur les analyseurs magnétiques.

1.4.1/ Les analyseurs magnétiques (*Figure 1.7*)

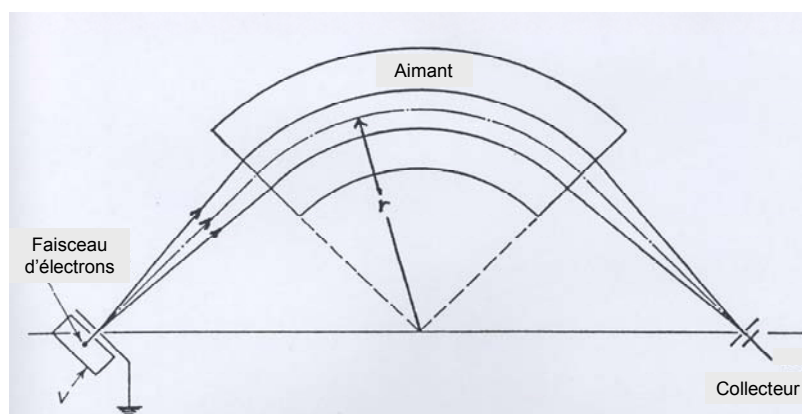


Figure 1.7 : Représentation schématique d'un analyseur magnétique à 90°.

Dempster (*Dempster AJ, 1916*) est le premier à utiliser les propriétés physiques des champs magnétiques pour dévier des particules chargées et développe un spectromètre à secteur magnétique dit à simple focalisation ou focalisation directionnelle. La double focalisation des ions apparaît un peu plus tard, entre 1930 et 1950. Cette double déflexion par un champ électrostatique et par un champ magnétique permet de corriger la dispersion en énergie en faisant coïncider au collecteur les focalisations en vitesse et en direction. On accède ainsi, avec ce genre de géométrie, à la haute résolution permettant l'analyse élémentaire des ions. Les optiques ioniques associées à un secteur magnétique de ce type de spectromètre sont celles de Nier-Johnson (*Johnson EG et Nier AO, 1953*) (focalisation en un point) et de Mattauch-Herzog (*Mattauch J et Herzog R, 1934*) (focalisation sur un plan)(*Figure 1.8a et b*).

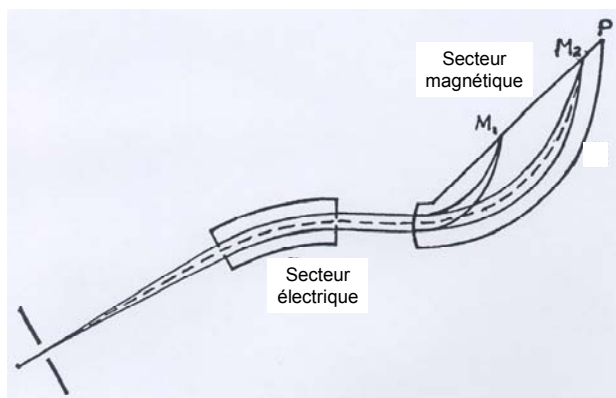


Figure 1.8a : géométrie Mattauch-Herzog.

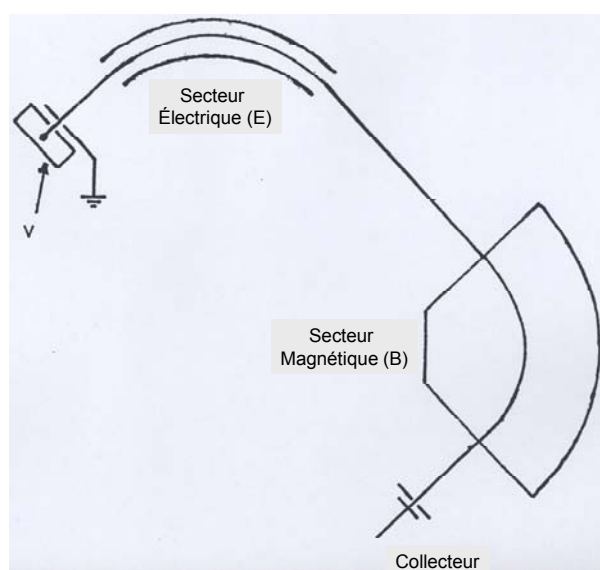


Figure 1.8b : géométrie Nier-Johnson.

Ensuite apparaîtront les appareils à géométrie inversée associant en tandem un secteur électrostatique à un secteur magnétique. Les années 40 voient apparaître la première application commerciale de la spectrométrie de masse avec le prototype 21-101 fabriqué par Consolidated Engineering Corporation (Pasadena, Californie, Etats-Unis) utilisant les principes précédemment décrits par Dempster. L'appareil est utilisé par l'industrie pétrolière pour l'analyse organique quantitative de mélanges gazeux. Dans un même temps, les travaux de Nier (*Nier AO et al, 1940*) sur l'analyse isotopique aboutissent à la séparation des isotopes 235 et 238 de l'Uranium grâce au développement et à l'utilisation d'un spectromètre de masse à deux secteurs, un secteur électrique couplé à un secteur magnétique. Grâce à la sensibilité accrue du détecteur, un multiplicateur d'électron, Nier et Johnson isolent à l'aide de cet outil le premier échantillon connu de Plutonium.

Bénéficiant de crédits sans précédent et jouissant de l'avancée des travaux de recherche menés pendant la Deuxième Guerre Mondiale, de nombreuses marques sont créées : la Metropolitan Vickers en Angleterre qui deviendra AEI (Associated Electrical Industries) puis Kratos d'une part et VG (Vacuum Generator) d'autre part puis Fisons et enfin Micromass. La Westing House and General Electric aux Etats Unis mais aussi l'Atlas Vercke en Allemagne deviennent Varian-MAT pour Mass und Analysen Technik puis Finnigan-MAT pour le département MALDI...voir matériels et méthodes...

On remarquera pour conclure l'importance de ces analyseurs à secteur magnétique dans la montée en puissance de la spectrométrie moderne. En effet, les instruments à simple (géométrie Dempster) ou à double focalisation (géométries Mattauch-Herzog et Nier-Johnson) vont ainsi dominer la spectrométrie de masse jusque dans les années 90, époque du véritable avènement des analyseurs quadripolaires et à temps de vol.

1.4.2/ Les analyseurs quadripolaires

Développés initialement par le groupe du Professeur Paul, les instruments utilisant des analyseurs de type quadripolaire apparaissent au milieu des années 50. Décrivant le principe de transmission sélective d'ions à travers un quadripôle (*Paul W et Steinwedel HS, 1953*), ce même groupe présente en 1958 le premier spectromètre de masse doté de cet analyseur (*Paul W, Reinhard HP, von Zahn U, 1958*). La pertinence des travaux de Paul sera d'ailleurs récompensée du prix Nobel de Physique en 1989.

Un quadripôle (**Figure 1.9**) est constitué comme son nom l'indique de quatre électrodes cylindriques couplées deux à deux selon un potentiel électrique $\pm \Phi_0$ composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V tel que $\Phi_0 = U - V \cos \omega t$ (t étant le temps dans cette expression). Les ions générés en source qui entrent dans l'analyseur sont soumis à une force résultante de ces deux champs électriques, définissant alors des zones de stabilité (*Watson JT, 1997*) (**Figure 1.10**). Les ions ainsi codés en radio-fréquence épousent des trajectoires oscillantes obéissant aux équations de Mathieu (1886) et sont transmis à travers le quadripôle en fonction de leurs stabilités.

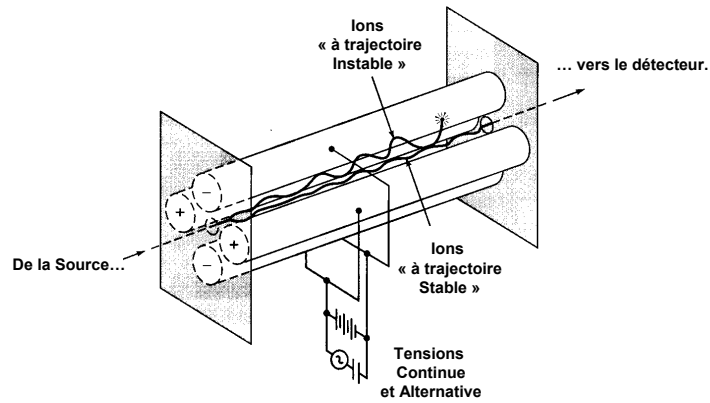


Figure 1.9 : Analyseur quadripolaire.

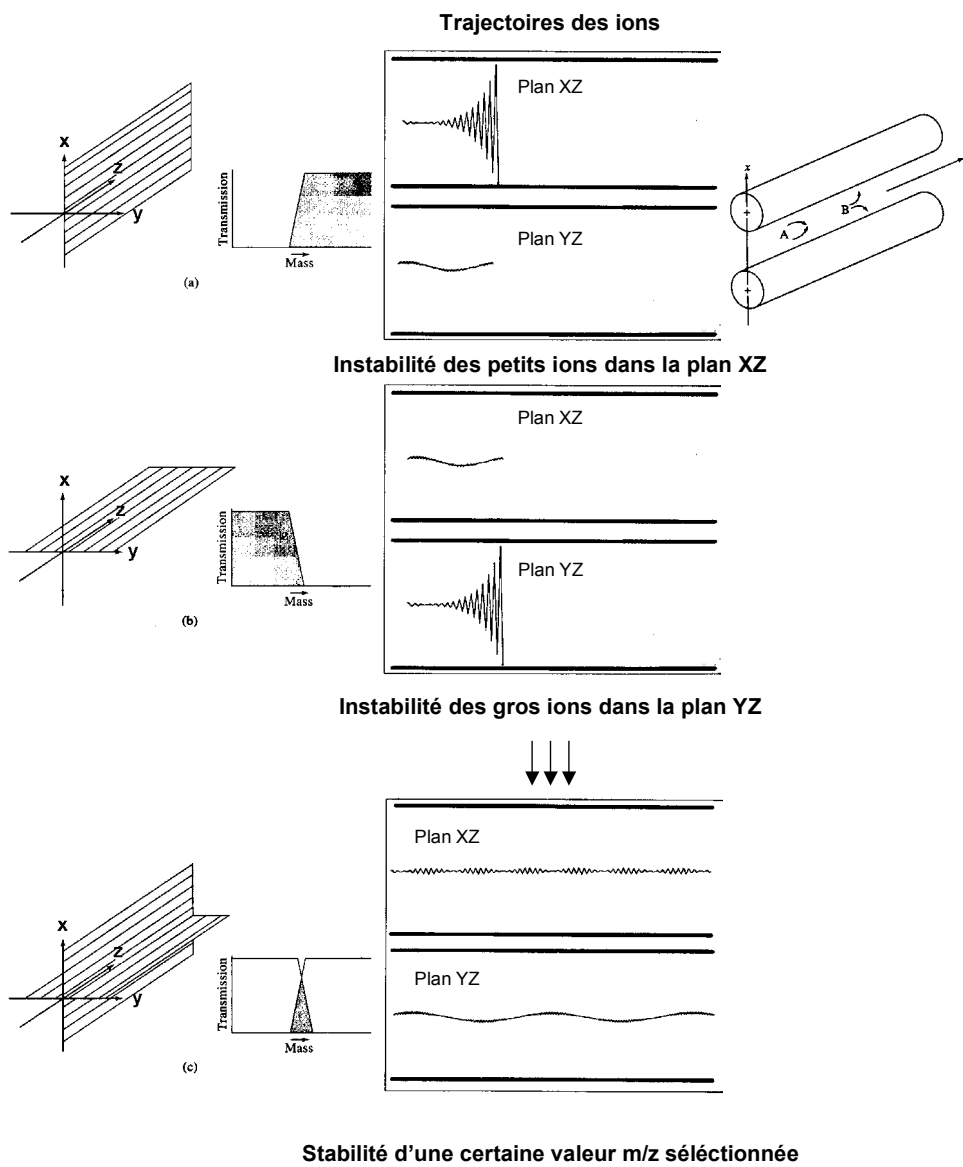


Figure 1.10 : Résultante de stabilité dans un analyseur quadripolaire.

Le plan XZ est dans cet exemple un filtre passe-haut.

L'intérêt majeur du quadripôle réside dans la possibilité d'associer plusieurs de ces analyseurs en série. Mis au point par les professeurs Yost et Enke en 1978 (*Yost RA et Enke CG, 1978*), le « triple-Quad » (**Figure 1.11**) résulte de l'association de trois quadripôles en série et permet (comme pour les appareils magnétiques à double focalisation) d'appréhender des analyses de spectrométrie de masse en tandem (ou MS-MS). Pour analyser la fragmentation d'un ion précurseur d'intérêt, le premier quadripôle est utilisé pour la sélection de l'ion à fragmenter, le deuxième quadripôle joue le rôle de cellule de collision dans laquelle est introduit un gaz inerte (gaz rare) permettant de faire subir à l'ion pré-sélectionné une ou plusieurs collisions. Quant au troisième quadripôle, il est utilisé pour l'analyse des fragments générés lors des événements de dissociation induite par collisions (CID ou CAD). La notion de dissociation induite par collision a d'ailleurs été introduite pour la première fois en 1968 par les professeurs Jennings et McLafferty.

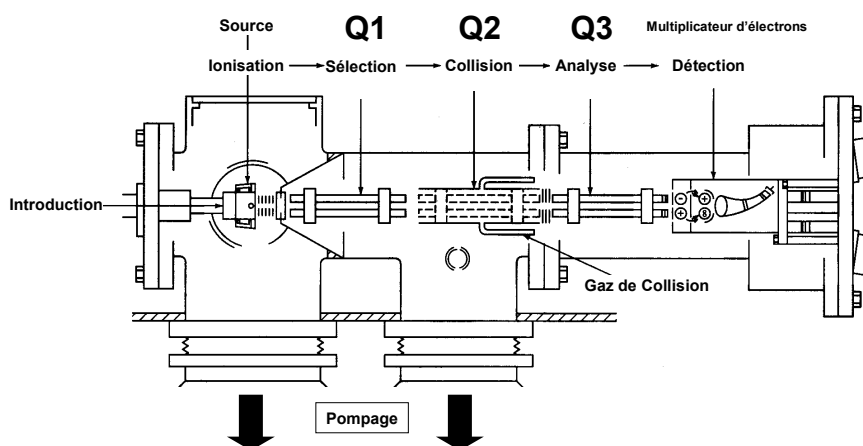


Figure 1.11 : Analyseur composite triple-quadripolaire.

Ce type d'analyseur composite est aussi compatible avec des analyses particulières ayant pour but de mettre en évidence des ions parents ou des pertes de neutres. Dans le cas des spectres d'ions parents, le premier quadripôle balaye la fenêtre de masse choisie et n'enregistre que les signaux donnant un ion fragment préalablement sélectionné et détecté par le troisième quadripôle. Le spectre d'ions parents ainsi reconstitué donne tous les ions précurseurs à l'origine de l'ion fragment pré-sélectionné. En mode perte de neutre, les premier et troisième quadripôles balayent simultanément en radio-fréquence la fenêtre de masse choisie.

L'expérimentateur indique l'écart de masse à détecter après collision dans le deuxième quadripôle, imposant ainsi au troisième quadripôle de ne laisser passer donc de détecter uniquement les ions à l'origine de cette perte de fragment neutre.

Nous verrons d'ailleurs toute l'importance de ces deux fonctions dans la suite de cette rédaction dans les parties dédiées au séquençage de glycopeptides et à la localisation des sites de O-glycosylation par spectrométrie de masse Nanospray MS-MS.

1.4.3/ L'analyseur à temps de vol (TOF : *Time of flight*)

Le concept de spectromètre de masse associé à un analyseur à temps de vol a été proposé pour la première fois par Stephens (*Stephens WE, 1946*) (voir aussi les travaux de Smythe et Mattauch (*Smythe WE et Mattauch J, 1932*)). Les principales avancées dans le développement de ce type d'analyseur ont été obtenues pour la plupart par Wiley et McLaren (*Wiley WC et McLaren IH, 1955*) qui imaginent un schéma de focalisation retardée augmentant la résolution en masse en corrigeant de manière simultanée la répartition en énergies cinétiques et en localisations spatiales des ions émis. Ils partent donc du principe que le rapport masse sur charge d'un ion peut être connu par analogie avec son énergie cinétique et sa vitesse. On a par exemple :

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} mv^2 &= zVo \text{ avec } v = d/t \\ \text{d'où } t^2 &= (m/z)(1/2Vo)(d^2) \\ \text{donc } t &= d.(m/z)^{1/2}/((1/2Vo)^{1/2}) \end{aligned}$$

Si d , la distance à parcourir et Vo , le potentiel appliqué sont des constantes finies, il y a corrélation directe comme l'avancent Wiley et McLaren entre le temps de vol d'un ion dans l'analyseur et son rapport masse sur charge. Pour une valeur de potentiel d'accélération, une population d'ions possède une même valeur d'énergie cinétique. Par contre, leurs masses différents, ces ions forment une population hétérogène en vitesse. Cette condition est à l'origine du pouvoir discriminatoire de l'analyseur à temps de vol : à énergie cinétique égale, un ion « léger » sera plus rapidement capté par le détecteur qu'un ion « lourd ». Le spectre de masse MALDI résulte donc de l'arrivée des ions de différentes masses percutants à des temps différents le détecteur. (**Figure 1.12**)

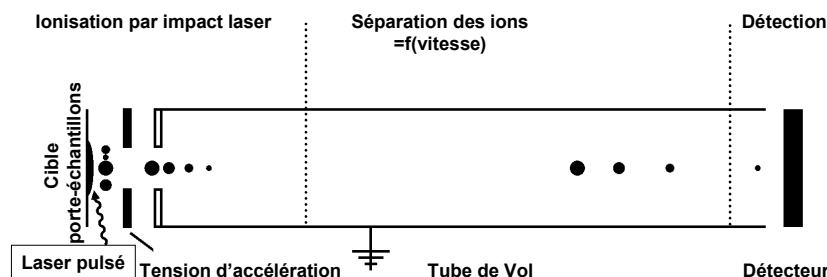


Figure 1.12 : Analyseur en temps de vol (TOF).

Il est néanmoins à noter que l'analyseur linéaire en temps de vol n'est que très peu résolutif. Des ions de masses strictement identiques (malgré d et V_0 constantes) ne peuvent arriver tous en même temps sur le détecteur. Deux raisons expliquent ce phénomène : la distribution hétérogène en énergie cinétique et la dispersion spatiale des ions. Pour accroître la résolution de l'analyseur, la dispersion en énergie cinétique peut être atténuée :

- en dissociant de manière temporelle la formation des ions dans la source de leur extraction/accélération dans le tube de vol (technologie d'extraction retardée) (*Wiley WC, McLaren IH et 1955*), (*Vestal ML et al, 1995*).

- en utilisant en extrémité du tube de vol un miroir électrostatique ou réflectron (*Mamyrin BA et al, 1973*) pour re-focaliser les ions de même masse mais possédant une énergie cinétique légèrement différente afin de les synchroniser à leur arrivée au niveau du détecteur.

Décomposition Post-Source (PSD : Post Source Decay)

Les analyseurs à temps de vol utilisant une source MALDI ne sont que très rarement à l'origine d'événements de fragmentation en source. L'essentiel des réarrangements moléculaires et des fragmentations se déroule dans le tube de vol après augmentation de la puissance laser par rapport au seuil.

Ces fragmentations peuvent être étudiées en jouant sur le potentiel du réflectron :

- A haut potentiel de réflectron, seuls les fragments les plus lourds (de plus grande énergie cinétique) pénètrent entièrement dans le miroir électrostatique pour heurter le détecteur, les fragments plus légers (de trop faible énergie cinétique) sont repoussés par le fort potentiel du réflectron et ne sont pas détectés.

-A plus bas potentiel, des fragments plus légers (de moindres énergie cinétique) sont à leur tour réfléchis dans le miroir électrostatique pour être détectés.

-En réduisant au fur et à mesure le potentiel du réflectron, l'ensemble de la gamme de masse d'intérêt (fonction de la masse du précurseur) sera étudiée permettant ainsi la détection de l'ensemble des fragments issus d'un même précurseur (la sélection de ce précurseur se faisant en temps par le « time ion selector »).

1.4.4/ L'analyseur hybride de type quadripôle-temps de vol (Q-TOF)

Dans l'optique de combiner les avantages des analyseurs quadripolaires (en terme de sélection d'ions précurseurs et d'analyses MS-MS vraies) et ceux des analyseurs à temps de vol (en terme de sensibilité/détection et précision de mesure/résolution) sont apparus assez récemment des analyseurs hybrides quadripôle-temps de vol (*Morris HR et al, 1996*), (*Shevchenko A et al, 1997*). (**Figure 1.13**)

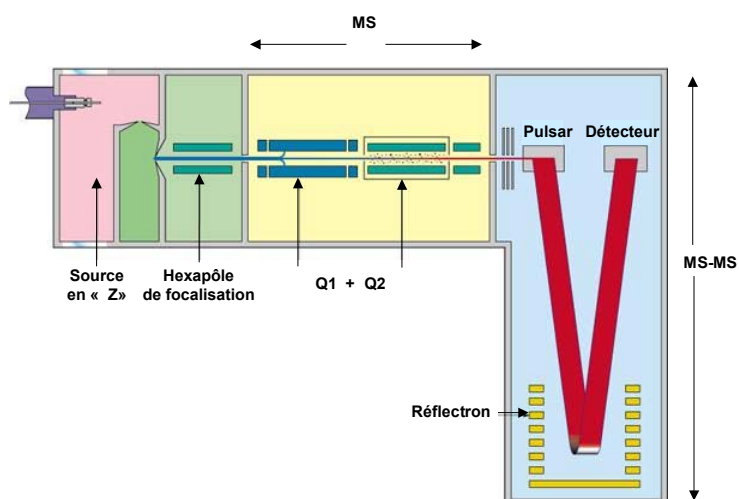


Figure 1.13 : Analyseur hybride Q-TOF.

Les ions formés en source (nanospray ou MALDI) sont focalisés/sélectionnés/fragmentés dans un système quadripôle de sélection/chambre de collision/hexapôle de re-focalisation, injectés par paquets d'ions dans le temps de vol où ils sont ré-accélérés orthogonalement pour analyse.

Cette dernière caractéristique liée à la géométrie de l'appareil permet ainsi d'analyser en « pulse » dans le temps de vol tous les ions préalablement générés dans l'analyseur quadripolaire. Cet effet de concentration permet d'obtenir une

sensibilité très importante, d'où l'utilisation massive de cet analyseur de masse hybride dans des thématiques biologiques comme par exemple dans le cadre de l'analyse protéomique.

1.4.5/ L'analyseur à piège à ions (*ion-trap* ou *quistor*)

Outre leurs travaux sur les analyseurs quadripolaires (voir ci-dessus), Paul et Steinwedel (*Paul W et Steinwedel H, 1953*) développent dans les années 1950 un piège à ions ou « ion-trap ». L'analyseur formé d'une électrode circulaire « en sandwich » entre deux électrodes chapeaux impose aux ions, par un potentiel +/- Φ_0 de composantes alternative et continue, une trajectoire oscillante « en 8 » régit par les équations de Mathieu. Il en résulte comme pour l'analyseur quadripolaire conventionnel, des zones de stabilité des ions à l'intérieur du piège. (**Figure 1.14**)

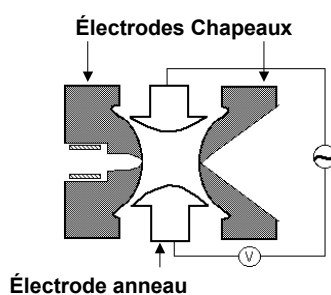


Figure 1.14 : Piège à ions.

Par simple modification des composantes alternative et continue de la tension +/- Φ_0 appliquée au piège, il est possible de ne conserver qu'une seule espèce d'ion en faisant sortir les autres espèces de la zone de stabilité. L'expulsion des ions ainsi contrôlée, il est aisé d'étudier un ion précurseur particulier et de s'intéresser à sa fragmentation. Cette opération est théoriquement reproductible à l'infini, on parle alors d'expérience de fragmentation MS^n . Toutefois, la valeur de n dépend grandement de la quantité d'échantillon disponible pour l'analyse et de la sensibilité de l'analyseur utilisé.

1.4.6/ L'analyseur à transformée de Fourier

Le principe de ce type d'analyseur est basé sur les notions de résonance ionique cyclotronique (ICR) décrites depuis 60 ans ; en revanche les applications

instrumentales des spectromètres de masse à transformée de Fourier (FT-MS) sont relativement récentes. Outre les travaux de Lawrence (*Lawrence EO et Edlefsen NE, 1930*) puis de Sommer (*Sommer H et al, 1949*), pionnier dans le domaine, nous retiendrons tout particulièrement la pertinence des travaux de Comisarow et Marshall (*Comisarow MB et Marshall AG, 1974*) qui ont démontré les potentialités de ce type d'analyseur pour l'analyse de masse principalement en termes de résolution et de sensibilité.

Les principes de la spectrométrie de masse par résonance ionique cyclotronique peuvent s'expliquer si l'on se rapporte à l'équation du mouvement d'une particule chargée dans un champ magnétique H . La force d'interaction $qv \times H$ de la charge q se déplaçant à une vitesse v dans ce même champ magnétique H peut-être égale à la force centrifuge d'une particule en mouvement soit mv^2/r . La particule chargée se déplace sur une orbite circulaire centrée sur l'axe du champ magnétique H . Il en résulte que la vitesse angulaire ω est égale à v/r égale à qH/m , caractéristique d'un rapport donné de la masse m à la charge q , tandis que le rayon de l'orbite $r = mv/qH$ est proportionnel à la vitesse de cette particule chargée.

Pour un ensemble d'ions ayant une distribution de vitesse v dans un champ magnétique uniforme H , il y aura une distribution d'orbites concentriques qui seront toutes parcourues à la même vitesse angulaire ω . L'idée consiste alors à disposer une paire de plaques parallèles entre lesquelles on établit un champ électrique alternatif perpendiculairement au champ magnétique H avec une fréquence de $\omega/2\pi$.

Lorsque $\omega/2\pi$ devient égal à la fréquence $\omega/2\pi$ caractéristique du mouvement cyclotronique d'une espèce ionique donnée, de l'énergie est absorbée par les ions sur leur orbite. Les ions ainsi excités voient le rayon de leurs trajectoires circulaires croître et des plaques réceptrices captent un signal du à la fréquence de passage de ces ions.

Le signal ainsi capté est transcrit sous forme de spectre par transformée de Fourier (relation ondes / fréquences et par conséquent des rapports m/z). (**Figure 1.15**)

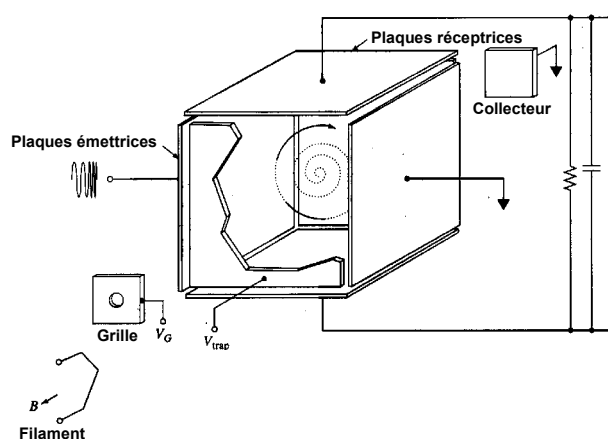


Figure 1.15 : Analyseur FT-ICR.

La physique même de ce type d'analyseur à résonance ionique cyclotronique permet d'obtenir une très grande résolution et autorise des mesures de masse exacte ou des études de composition élémentaire. Les analyses de spectrométrie de masse multidimensionnelle MS^n peuvent être envisagées de la même manière que pour les analyseurs à piège à ions (voir ci-dessus). De plus, en associant cet analyseur à une source d'électronébulisation, il est possible d'étudier la fragmentation d'ions multichargés de hautes masses moléculaires. Récemment, les potentialités de cette technique ont été mis à contribution dans le domaine d'étude qui nous intéresse tout particulièrement, la localisation des sites de O-glycosylation (*Zubarev RA, 1998*), (*Kruger NA, 1999*), (*Kruger NA, 1999*), (*Mirgorodskaya E, 1999*).

D'un point de vue personnel, nous remarquerons pour clore la paragraphe dédié aux analyseurs l'importance véritable des analyseurs triple-quadripolaires, à temps de vol et hybrides quadripolaire-temps de vol puisque faisant partie intégrante du travail de thèse présenté dans ce manuscrit.

1.5/ En résumé...

En dépit de son aspect non exhaustif, cette première partie dédiée à la spectrométrie de masse et aux réalités historiques qui en découlent, a pour mérite et c'est là mon intime conviction, de montrer comment cette technique est devenue de progrès en innovations l'un des plus puissant outil de bio-analyse que nous connaissons aujourd'hui.

De plus, avec le recul historique dont nous pouvons disposer, il est intéressant de remarquer l'aspect dynamique et évolutif de la spectrométrie de masse. En un siècle, de préoccupations en problématiques aussi bien théoriques qu'appliquées, elle a su s'imposer dans des domaines aussi variés que la physique, la chimie et plus récemment la biologie.

Si les débuts de la spectrométrie de masse sont inhérents à des réalités de physiques fondamentales, la mise au point des analyseurs à secteur magnétique est directement liée à la montée en puissance de la chimie de synthèse dans l'entre-deux guerre. Jusqu'à il y a environ trente ans, la spectrométrie de masse principalement organique faisait les beaux jours des chimistes en analysant et en caractérisant les produits de leurs synthèses. Aujourd'hui, les applications décrites en spectrométrie de masse sont pour une grande majorité associées à une problématique biologique.

La fin des années 90 a représenté une étape clé dans l'essor de la « bio-spectrométrie de masse ». Aujourd'hui, l'omniprésence des sources d'ionisation douce de type MALDI et électrospray dans les laboratoires et les nombreuses applications qui en découlent ne font que confirmer l'aspect révolutionnaire de ces types d'ionisations. Leurs multipotentialités en font des outils de choix pour les analystes que nous sommes, en citant pour conclure **Peter Roepstorff** s'exprimant en 1996 sur la question : ***"In fact, at present, I consider the two techniques to be highly complementary. They have both dramatically improved the perspectives for the application of mass spectrometry in protein chemistry to such an extent that protein chemistry laboratories without access to these techniques or at least one of them cannot be considered up to date."***

Concerné par des préoccupations d'ordre biologique et biochimique, l'ensemble de ce travail de thèse intègre, par leur performance et leur adaptabilité, les deux techniques d'ionisation précédemment citées.

Chapitre 2 :

Glycobiologie Structurale

Chapitre 2 : Glycobiologie Structurale

2.1/ Introduction

2.2/ Rôles et importance biologique de la glycosylation

2.3/ Analyse de O-glycopeptides et localisation de sites de O-glycosylation

2.3.1/ Spectrométrie de masse MALDI

2.3.2/ Spectrométrie de masse Electrospray

Contribution de l'analyseur hybride de type Q-TOF pour la localisation des sites de glycosylation

2.3.3/ Spectrométrie de masse FT-MS

2.4/ Conclusion partielle

2.5/ Déglycosylation et marquage de sites

2.5.1/ Méthode enzymatique

2.5.2/ Méthodes chimiques

Hydrolyse acide ménagée

β -élimination

2.6/ En résumé...

2.1/ Introduction

Dans la nature, de très nombreuses formes de glycoconjugués peuvent être rencontrées : des petits glycolipides aux complexes glycoprotéines, des mucines ultra glycosylées aux protéoglycannes, énormes édifices supra-moléculaires. De par la très grande hétérogénéité de taille, de liaison, d'isomérisation ou de conformation, ces composés ont intéressé de nombreuses générations de scientifiques, les rôles biologiques de ces différents glycoconjugués apparaissant donc identiques à leurs structures : multiples et complexes.

Les connaissances sur les glycoconjugués sont très importantes, mais comparativement aux travaux menés sur les acides nucléiques et les protéines, les recherches d'intérêts glycobiologiques possèdent un certain retard. La tendance passée de la communauté scientifique à ne pas considérer l'importance des glycoconjugués dans les mécanismes de régulation biologiques, liée aux difficultés inhérentes à l'étude de ces composés, fait que la tâche de la recherche glycobiologique aussi bien structurale que fonctionnelle s'avère aujourd'hui ardue. Devant ce réel challenge analytique, l'apport d'un recul chimique suffisant et de l'avènement des nouvelles techniques de spectrométrie de masse semble garantir toutefois des perspectives rassurantes.

2.2/ Rôles et importance biologique de la glycosylation

La glycosylation peut-être considérée à juste titre comme la modification post-traductionnelle la plus importante dans les systèmes eukaryotes. Partant de structures simples rencontrées dans les levures, les structures glycaniques gagnent en complexité dans les cellules d'organismes supérieurs. Cette sophistication va de paire avec l'expression d'enzymes de glycosylation : les glycosyl-transférases. Chez les vertébrés par exemple, l'ensemble des protéines qui participent à la biosynthèse des oligosaccharides représentent plus d'1% de l'ensemble des produits de la traduction (*Varki A et Marth J, 1995*). Par comparaison, la seule modification post-traductionnelle revêtant autant d'importance tant du point de vue qualitatif que quantitatif dans les systèmes biologiques complexes est la très étudiée phosphorylation.

Les rôles biologiques imputables à la glycosylation sont aussi complexes que variés :

La qualité de substitution des sites de glycosylation et le type des oligosaccharides substituant une entité protéique engendrent la différenciation et la spécialisation de types cellulaires : présentant des motifs de glycosylation anormaux comparativement à une cellule physiologiquement saine, les cellules cancéreuses peuvent par exemple échapper à la vigilance du système immunitaire (*Dennis JW et al, 1987*) ou voir leurs taux d'expression différer (cellules tumorales) (*Kukuruzinska MA et Lennon K 1998*).

Les voies de glycosylation, en fonction de l'expression des glycosyltransférases, sont cellule et/ou tissu spécifiques, modifiant différemment les protéines et leurs fonctions.

La glycosylation intervient dans la mise en conformation (« *fold*ing ») des protéines (*Helenius A et Aebi M, 2001*).

Les « antennes glycaniques » (structures N et/ou O-substituées) liées aux protéines membranaires ou sécrétées interviennent dans la communication intercellulaire, dans la reconnaissance des molécules de surface (*Hounsell EF et al, 1996*), dans les interactions intermoléculaires, dans les relations cellule-matrice extracellulaire (mucoviscidose) (*Scanlin TF et Glick MC, 1999*) ainsi que dans la modulation de la réponse immunitaire (*Easton RL et al, 2000*).

La glycosylation est associée à des pathologies touchant le système nerveux et liée à des processus neurodégénératifs (*Collinge J et al, 1996*), (*Prusiner SB, 1997*).

Il faut enfin remarquer l'existence de structures glycosylées plus simples de type O-GlcNAc solubles dans le cytoplasme et dans le noyau (*Hart GW, 1992*) pouvant intervenir dans des processus de régulation (balance phosphorylation/glycosylation) et dans des signaux de transduction.

De toutes les structures glycosylées, les N-glycoconjugués et plus particulièrement les N-glycopeptides ont été les structures les plus étudiées. De l'étendue des connaissances à propos des édifices qui les composent émerge des outils précieux pour leur analyse structurale. Il faut par exemple mentionner l'existence d'une séquence peptidique consensus du type Asn-X-Ser/Thr et d'une enzyme de N-déglycosylation, la peptidyl-N-glycosidase F (PNGase-F), capable d'hydrolyser la liaison N-glycopeptidique indépendamment de la nature du glycanne fixé.

Comparativement aux N-glycopeptides plus accessibles analytiquement parlant, leurs homologues O-liés sont plus délicats à appréhender et ceci pour quatre raisons principales :

- ✓ A ce jour, aucune séquence peptidique consensus caractéristique des sites de O-glycosylation n'a été décrite.
- ✓ Les structures O-glycanniques sont liées à de longues séquences peptidiques riches en acides aminés hydroxylés de type Serine ou Thréonine.
- ✓ Il n'existe pas, au même titre que la PNGase-F pour les N-glycannes, de O-glycannase dotée d'un spectre d'activité enzymatique suffisamment large pour hydrolyser tous types de structures O-liées.
- ✓ Les O-glycoconjugués se caractérisent enfin par une très grande hétérogénéité glycannique.

Certes, la grande majorité des structures O-glycanniques est simple et courte (**Figure 2.1**) (une seule entité de O-GlcNAc dans certaines cellules eukaryotes (*Wells L et al, 2001*), (*Hart GW et al, 1989*), un motif O-GalNAc-Ser/Thr associé à un ou plusieurs motifs GalNAc, GlcNAc et/ou Gal) mais leurs points d'ancrages peuvent être très proches les uns des autres au niveau de séquences répétitives ou « tandem-repeat »). En ajoutant à cela que la charge glycannique peut parfois représenter jusqu'à 50% du poids total de la molécule (mucines), (protection du peptide accepteur aux endoprotéases), nous pouvons comprendre pourquoi l'étude structurale des O-glycopeptides reste encore à ce jour un réel déficit analytique.

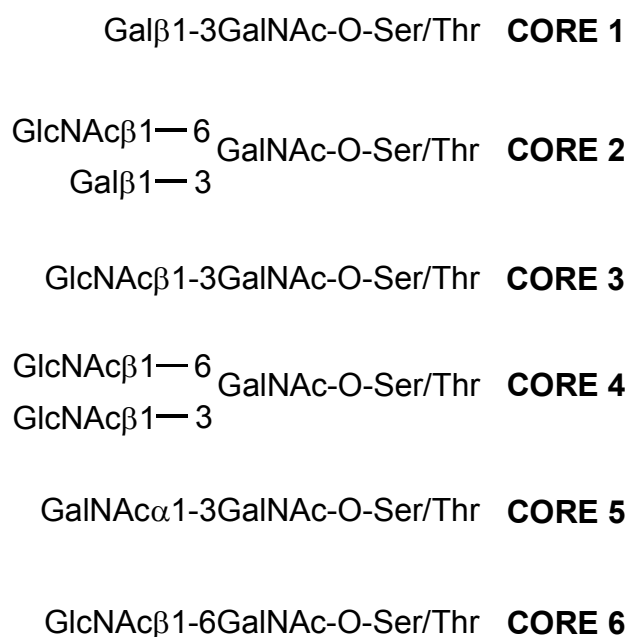


Figure 2.1 : Différents noyaux O-glycanniques connus à ce jour.

2.3/ Analyse de O-glycopeptides et localisation de sites de O-glycosylation

Dans un but didactique, il convient tout d'abord de définir la notion « d'analyse structurale ». La chimie analytique moderne pourrait considérer l'analyse structurale de glycopeptides comme regroupant la cartographie oligosaccharidique du modèle étudié, la séquence oligosaccharidique et la nature des liaisons qui les constituent, la localisation des sites de glycosylation et enfin l'hétérogénéité glycannique site par site. Devant la complexité et l'extrême variabilité de ces notions, une seule et même analyse ne pourrait aboutir sans l'utilisation de plusieurs méthodes orthogonales générant des informations complémentaires. De proche en proche et de recouplements en confirmations, l'analyste peut arriver au but initialement fixé (une caractérisation structurale exhaustive et pertinente) et accéder à des considérations relationnelles de structures et de fonctions.

Le thème de recherche qui nous a été confié se concentre principalement sur la localisation de sites de O-glycosylation, aussi, dans la suite de ce manuscrit pourra-t-on associer, par abus de langage, analyse structurale de O-glycopeptides et localisation de sites de O-glycosylation.

Il existe différentes manières d'appréhender l'analyse structurale de structure O-glycopeptidiques. La première et aussi la plus simple consiste à réaliser une analyse directe du composé, sans traitement ni modification, l'étude intégrant alors généralement la spectrométrie de masse.

Durant ces dix dernières années, les saisissantes avancées technologiques de la spectrométrie de masse tiennent une place centrale dans l'aboutissement de nombreuses études de glycobiologie structurale (*Setterini CA et al, 1995*). De manière certaine, les apports les plus significatifs sont liés à la montée en puissance des techniques d'ionisation douce que sont l'électrospray et le MALDI (voir chapitre 1).

Les précisions de mesure de masse obtenues avec les nouveaux types d'analyseurs et les possibilités offertes par la diversité des analyseurs dans les expériences de spectrométrie de masse multidimensionnelle (MS/MS ou MSⁿ) ont ainsi permis d'obtenir des résultats jusqu'alors inenvisageables en termes de sensibilité et de séquençage (*Harvey DJ, 1999*), (*Harvey DJ, 2001*).

2.3.1/ Spectrométrie de masse MALDI

La spectrométrie de masse MALDI a vu son pouvoir d'investigation augmenter avec le mode de décomposition post-source (PSD) (*Spengler B et al, 1991*), (*Spengler B et al, 1992*) pouvant ainsi répondre à des informations d'ordre structural. Goletz et collaborateurs ont mis en évidence les potentialités de la technique en proposant une stratégie de localisation des sites de O-glycosylation sur le modèle O-glycopeptidique MUC-1 (*Goletz S et al, 1997*). Profitant de l'importante hétérogénéité en acides aminés de ce modèle, l'auteur obtient des spectres PSD facilement exploitables.

Quand les glycopeptides à analyser possèdent des séquences répétitives, riches en acides aminés hydroxylés (Serine et/ou Thréonine) propices aux phénomènes de déshydratation (perte d'H₂O), la tâche est rendue plus difficile et les résultats des spectres PSD nécessitent confirmation par des données générées par d'autres types d'analyseurs (*Alving K et al, 1998*).

Les spectres PSD parfois complexes obligent à des études comparatives pour aboutir à la localisation des sites de glycosylation. Goletz et collaborateurs facilitent l'interprétation spectrale en établissant des comparaisons entre les spectres PSD de O-glycopeptides de type MUC1 avec les spectres de leurs homologues acétylés. Par la méthode proposée, ils détectent plus facilement les fragments porteurs de la

structure glycanique et accèdent au site d'attache de la glycosylation (*Goletz S et al, 1997b*).

La spectrométrie de masse MALDI-PSD MS présente donc comme on peut le remarquer un aptitude certaine pour la localisation des sites de O-glycosylation mais rencontre parfois des difficultés inhérentes à la nature du glycopeptide d'intérêt (grande taille, riche en proline et/ou en acides aminés hydroxylés).

2.3.2/ Spectrométrie de masse Electrospray

La spectrométrie de masse électrospray peut être mise à contribution pour l'analyse d'acides aminés et de peptides O-glycosylés (*Peter-Katalinic J et al, 1994*), (*Peter-Katalinic J et al, 1994b*). L'association de ce type d'ionisation aux analyseurs triple-quadripolaires et à piège d'ions permet, par exemple, l'élucidation de structures O-glycopeptidiques (aussi bien le séquençage de la structure oligosaccharidique que le squelette peptidique) des modèles muciniques MUC-4 et MUC-2 (*Alving K et al, 1999*).

L'utilisation d'une source électrospray et d'un analyseur triple quadripolaire autorise la détection en mode « parent ion-scan » de tous les précurseurs porteurs de l'ion diagnostic des N-acétyl Hexosamine (HexNAc) : l'ion oxonium à $m/z=204$. La méthode permet de détecter sélectivement des glycopeptides à partir de la digestion d'une glycoprotéine (*Carr SA et al, 1993*), (*Huddleston MJ et al, 1993*). Elle autorise aussi la différenciation des N-glycopeptides de leurs homologues O-liés par traitement de l'échantillon à la PNGase-F avant analyse. L'efficacité de la méthode est démontrée sur des modèles protéiques complets (*Spengler B et al, 1992*), (*Goletz S et al, 1997*). Dans le même esprit, une approche enzymatique utilise une galactosyl-transférase pour lier sélectivement un résidu de galactose sur des glycopeptides porteurs d'un motif O-GlcNAc. Les glycopeptides marqués de cette entité disaccharidique sont ensuite suivis en MS-MS par détection de l'ion parent $m/z=366$ (*Haynes PA et Aebersold R, 2000*).

Au regard des protocoles proposés, le couplage LC/MS-MS représente un concept méthodologique séduisant pour la détection de O-glycopeptides. En revanche, en raison de la labilité de la liaison O-glycanique la localisation des sites de O-glycosylation reste une tâche difficilement généralisable par ce type de spectromètre de masse car trop dépendante de la nature du O-glycopeptide étudié.

Contribution de l'analyseur hybride de type Q-TOF pour la localisation des sites de glycosylation

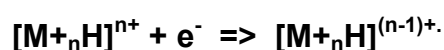
La fragmentation de O-glycopeptides natifs ne renseigne que très rarement sur le point d'attache du glycanne sur son peptide accepteur. Malgré la faible intensité des ions informatifs (*Medzihradsky KF et al, 1990*), (*Setterini CA et al, 1990*) porteurs du(des) sucre(s), il est parfois possible de localiser un ou plusieurs sites de glycosylation. Nécessitant sensibilité, précision de mesure et résolution, ce type d'analyse peut tout à fait convenir à l'analyseur Q-TOF (*Alving K et al, 1999*), (*Macek B et al, 2001*), en témoigne une application concernant un glycopeptide type MUC-1 de 25 acides aminés (TAP-25) porteur de 2 structures glycaniques (*Hanisch FG et al, 1998*).

Encore une fois, nous nous devons d'insister sur le caractère « ponctuel » de ces applications, la spectrométrie de masse en tandem ne réussissant généralement pas à se défaire des structures O-glycopeptidiques dans leurs formes natives.

2.3.3/ Spectrométrie de masse FT-MS

La dissociation par capture d'électron (ECD) est une méthode de fragmentation associée à certains spectromètres de masse à résonance ionique cyclotronique par transformée de Fourier (FT-ICR/MS).

Permettant de former des espèces radicalaires réactives selon le schéma suivant :



elle conduit à la rupture du squelette peptidique par transfert d'un hydrogène radicalaire H \cdot . Kelleher et collaborateurs (*Kelleher NL et al, 1999*) utilisent l'ECD pour localiser une modification post-traductionnelle excessivement labile, la γ -carboxylation de l'acide glutamique. Ils confrontent les résultats obtenus par fragmentation ECD à ceux obtenus par CID : la CID forme essentiellement des ions y_n et b_n provenant de la rupture de la liaison amide CO-NH alors que l'ECD conduit majoritairement à fragmentation de la liaison NH-C $_{\alpha}$ HR pour former les ions c (-CHR-COH=NH) et moins facilement les ions z' (CHR') (*Roepstorff P et Fohlman J, 1984*), (*Zubarev RA et al, 1998*). De par ce mode de fragmentation préférentiel, les auteurs

accèdent à des ions informatifs porteurs de la modification post-traductionnelle, rendant ainsi possible sa localisation. Mirgorodskaya et collaborateurs (*Mirgorodskaya E et al, 1999*) ont étendu avec succès l'utilisation de cette technique de fragmentation ECD pour la localisation des sites de O-glycosylation (**Figure 2.2**).

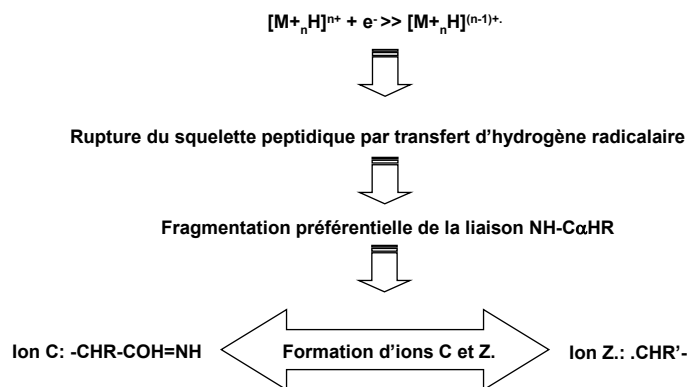


Figure 2.2 : Apport de la technologie ECD FT-MS pour le séquençage glycopeptidique et la localisation de sites de O-glycosylation. (d'après Mirgorodskaya et collaborateurs).

Permettant l'obtention d'ions porteurs de la modification post-traductionnelle, la FT-MS associée à la fragmentation par ECD pourrait s'imposer, outre les considérations financières liées à un tel appareillage, comme une méthode de choix dans l'analyse structurale de peptides porteurs de modifications post-traductionnelles.

2.4/ Conclusion partielle

La spectrométrie de masse biologique et les techniques d'ionisation que sont le MALDI et l'électrospray associées à des analyseurs comme le Q-TOF et la FT-MS possèdent donc des potentialités certaines dans l'étude structurale des O-glycopeptides (voir ci-dessus). Alors que la détection de O-glycopeptides au sein d'un pool peptidique complexe est aujourd'hui aisément accessible par couplage LC/MS-MS, les résultats les plus probants dans la localisation des sites de O-glycosylation sont obtenus par des analyses Q-TOF et ECD/FT-MS. Les difficultés à élucider la structure de ces composés O-glycopeptidiques restent étroitement liées à leurs natures pouvant même faire naître des incompatibilités avec l'analyseur de masse utilisé :

La séquence en acides aminés du glycopeptide peut limiter la qualité et l'exploitabilité des spectres générés (prévalence en proline, en thréonine et/ou serine) notamment en MALDI-PSD et ESI-CID/MS-MS.

La composante énergétique du type de fragmentation ainsi que l'état de charge de l'ion glycopeptidique précurseur doivent être considérés avec une attention toute particulière comme en témoignent les résultats obtenus par Q-TOF et ECD/FT-MS.

La nature des ions formés lors des processus de fragmentation semble être en relation avec la labilité de la liaison glycanique (notion toute relative) et avec le mode de fragmentation choisi (CID contre ECD).

Au final, il ressort de ces observations que la localisation des sites de O-glycosylation de glycopeptides natifs est possible par les techniques de spectrométrie de masse MALDI/PSD-MS et ESI-CID/MS-MS mais fortement dépendante de la nature de l'analyte.

Afin de s'affranchir de ce genre de considération, des spectromètres de masse Q-TOF ou ECD/FT-MS aux performances plus importantes (modes différents de fragmentation, sensibilité, précision de mesure, résolution) semblent représenter des partenaires « capables » dans le cadre de ces études structurales.

L'accès à ce type d'analyseur de masse (surtout pour la FT-MS) n'est généralement pas aisé et ce caractère exclusif peut alors représenter « le facteur limitant ».

Une autre approche consiste donc à adapter l'échantillon au type d'analyse, de nombreuses méthodes de modifications chimiques des O-glycopeptides ont été présentées dans cette optique et nous nous proposons maintenant d'en faire référence.

2.5/ Déglycosylation et marquage de sites

Les méthodes de déglycosylation enzymatique/chimique et de marquage de site(s) peuvent représenter une aide précieuse pour l'analyste désireux de localiser le(s) point(s) d'attache(s) peptidique(s) d'une modification post-traductionnelle aussi importante que la O-glycosylation. Les solutions apportées sont essentiellement basées sur une déglycosylation suivie d'un marquage covalent du(des) site(s)

concerné(s) par la modification, le composé ainsi modifié se prêtant alors au séquençage puisque stable dans les conditions d'analyse MS-MS.

2.5.1/ Méthode enzymatique

Les protéines dotées d'une activité enzymatique sont un outil inestimable de par la spécificité des réactions qu'elles catalysent. Aussi, elles présentent des avantages certains de reproductibilité et de « contrôlabilité » sur les méthodes chimiques. L'utilisation de N-glycannases (*O'Neill RA, 1996*), autorisant le clivage spécifique de structures Oligosaccharidiques N-liées à des résidus d'asparagine, a véritablement révolutionné l'analyse des N-glycoconjugués (principalement les N-glycopeptides).

Mortz et collaborateurs prouvent toutes les potentialités des méthodes enzymatiques (*Mortz E et al, 1996*) en mettant en évidence l'existence d'une micro-hétérogénéité glycanique site par site sur le modèle humain de l'interféron- γ recombinant. Ces auteurs ont recours à l'électrophorèse pour séparer les différentes glycoformes, l'action de la trypsine permet de générer des glycopeptides qui sont alors sujet à des déglycosylations séquentielles par action simultanée d'exo et d'endoglycosidases. La méthode décrite donne à la fois accès à la localisation du site de glycosylation (puisque'il s'agit de N-glycannes...) mais aussi à la composition/séquence du motif oligosaccharidique.

Conscient de ces avantages, Küster et Mann (*Küster B et Mann M, 1999*) proposent en 1999 l'utilisation de la Peptide N-glycosidase F (PNGase-F) pour marquer spécifiquement des peptides porteurs de sites de N-glycosylation. La méthode (**Figure 2.3**) repose sur la déglycosylation d'une glycoprotéine d'intérêt dans un tampon contenant un mélange à volume équivalent d'eau ^{16}O et d'eau ^{18}O suivi de la digestion tryptique de cette glycoprotéine déglycosylée.

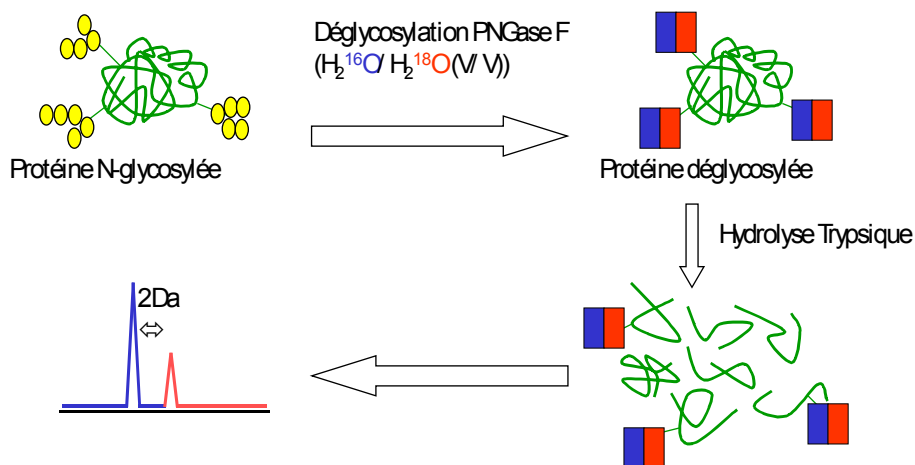


Figure 2.3 : Localisation des sites de N-glycosylation par action simultanée de PNGase F et de trypsine + analyse par spectrométrie de masse (selon Küster B et Mann M, 1999).

Les peptides ainsi générés sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-MS ; les glycopeptides en mélange apparaissent sous forme d'un couple d'ions séparés de 2Da (**Figure 2.3**). Küster et Mann prouvent par cette application toute la puissance d'investigation de l'outil enzymatique dans une stratégie de N-déglycosylation.

D'autres applications décrivent l'utilisation de la digestion protéolytique combinée à la glycolyse pour déterminer la nature du motif oligosaccharidique associée à l'entité protéique considérée. L'étude de la lactoperoxydase bovine représente à elle seule un exemple du genre puisque sur les 5 résidus d'asparagine présent dans la séquence sont retrouvés 5 structures oligosaccharidiques (de type oligomannosidique) (*Wolf SM et al, 2000*). La méthode fait ensuite école puisque utilisée avec succès pour étudier les sites de glycosylation de la sero-transferrine humaine, de l' α 1 antitrypsine et de la β -glucosylceraminidase (*Harris RJ et al, 1993*) ainsi que l'interféron γ humain isolé de cellule CHO en culture (*Alving K et al, 1998*).

Contrairement aux N-glycopeptides, la déglycosylation enzymatique de O-glycopeptides est difficilement envisageable de par l'absence à ce jour d'une enzyme de type peptide-O glycosidase possédant un spectre d'activité enzymatique suffisamment large pour hydrolyser tous types d'édifices O-glycopeptides. Dans une démarche d'objectivité, il convient toutefois de citer l'existence de l'endo- α -N-acétylgalactosaminidase (*Brooks MM et Savage AV, 1997*), (*Fan JQ et al, 1988*)

(hydrolysant le motif O-glycannique non-substitué de type **CORE1**)(voir *Figure 2.1*) d'utilisation sporadique... Iwase et collaborateur sont parmi les seuls à y faire référence dans l'étude de la glycosylation des chaînes lourdes de l'Immunoglobuline A₁ (*Iwase H et al, 1996*), (*Iwase H et al, 1998*).

Par défaut de méthode plus efficace, la O-déglycosylation est donc principalement menée par voie chimique.

2.5.2/ Méthodes chimiques

Hydrolyse acide ménagée

Les acides présentent certaines capacités de déglycosylation des glycoprotéines.

L'acide tri-fluoro-méthane-sulfonique est utilisé dans une réaction optimisée de déglycosylation conduisant à la formation de produits partiellement déglycosylés (*Gerken TA et al, 1992*). La méthode est compatible à la localisation des sites de O-glycosylation mais peut conduire, par son caractère « partiel » difficilement contrôlable, à une sous-estimation du nombre de sites.

Une autre voie d'accès aux sites de glycosylation réside dans l'hydrolyse ménagée du squelette peptidique du glycopeptide d'intérêt. La réaction ne touchant pas la liaison glycopeptidique, les fragments peptidiques et glycopeptidiques ainsi générés sont analysés par spectrométrie de masse. L'analyse de proche en proche (par soustraction) de ces fragments conduit à la localisation du(des) site(s) de glycosylation comme l'ont démontré Mirgoroskaya et collaborateurs (*Mirgorodska E et al, 1999b*). L'utilisation d'acide chlorhydrique et d'acide pentafluoropropionique en phase vapeur élimine certes les problèmes liés à la contamination de l'échantillon mais s'avère incompatible avec l'étude de glycopeptides en mélange.

Cette approche par hydrolyse acide ménagée est séduisante dans le cas des glycopeptides qui présentent une densité importante d'acides aminés serine et thréonine et qui offrent donc de nombreux sites de coupure à l'hydrolyse. Mais cette caractéristique peut rapidement représenter un inconvénient dans le cas des peptides à multiples sites de glycosylation, le travail d'analyse spectral en étant largement compliqué. Afin de se démarquer de ce souci analytique, il est possible de combiner l'hydrolyse acide partielle à la β -élimination utilisant des dérivés aminés (*Mirgorodskaya E et al, 2001*).

β -élimination

La chimie de la β -élimination est connue depuis de nombreuses années (*Carlson DM, 1968*), (*Plantner JJ et Carlson DM, 1975*), (*Wu AM et al, 1984*). Pour les réactions de O-déglycosylation, la liaison O-glycopeptidique particulièrement labile peut-être rompue suite à l'attaque par une base de l'hydrogène du carbone α se traduisant par le départ du nucléofuge que représente le glycanne. Il peut s'en suivre une attaque nucléophile en β de la double liaison activée ainsi formée : le réactif nucléophile peut-être de même nature ou de nature différente que la base attaquant le proton. En présence d'ammoniac ou d'amines (I ou II), on aboutit à une β -amino substitution du glycanne, pour un mélange amine/thiol, c'est une β -alkylmercapto substitution qui doit être considérée. L'amoniac et les amines jouent le rôle de base pour l'élimination et de nucléophile pour l'addition, en présence de thiol, c'est ce dernier qui s'additionne à la double liaison activée. (**figure 2.4**)

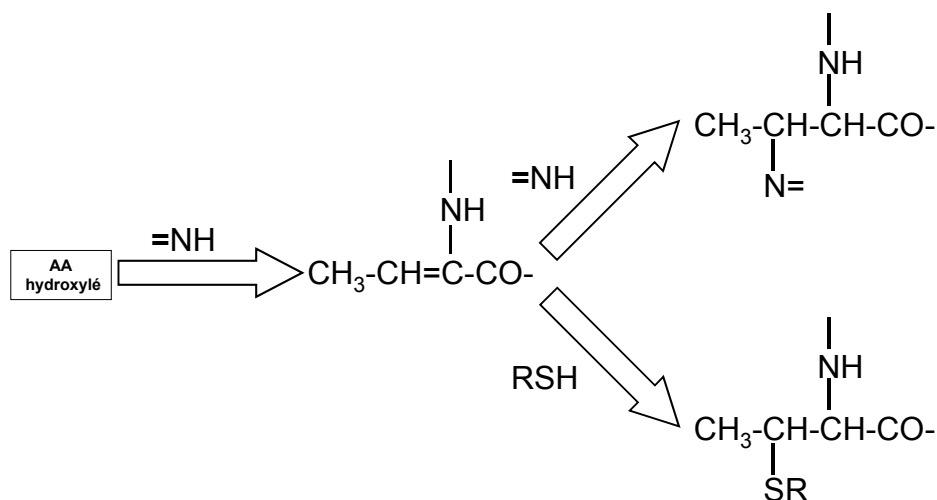
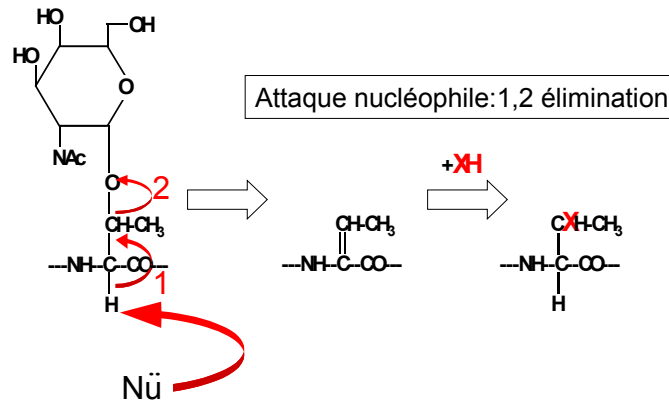


Figure 2.4 : mécanisme de β -élimination : élimination E2 et addition.

Il résulte de ces ré-associations une structure covalamment modifiée présentant un intérêt certain en spectrométrie de masse puisque plus stable dans les conditions d'analyses MS-MS.



Dans le cas de la soude (NaOH) et en présence de borohydrure de sodium, les résidus de serine et thréonine sont, suite à l'attaque de l'hydroxyde et l'addition de l'ion hydrure, respectivement réduits en résidus d'alanine et d'acide 2-amino butyrique (**Figure 2.5**). Cette β -élimination réductrice sélective a été associée à la spectrométrie de masse CID-FAB-MS/MS pour localiser des sites de O-glycosylation touchant des résidus de thréonine (*Rademaker GJ et al, 1993*). Néanmoins, les échantillons d'origine biologique sont généralement disponibles en faibles quantités et cette méthode consommant quelques nanomoles de glycopeptides ne semble pas représenter une sensibilité suffisante. Réalisée dans des conditions non-réductrices, cette réaction de β -élimination peut concerner quelques picomoles de glycopeptide (gain en sensibilité d'un facteur 1000) (*Greis KD et al, 1996*).

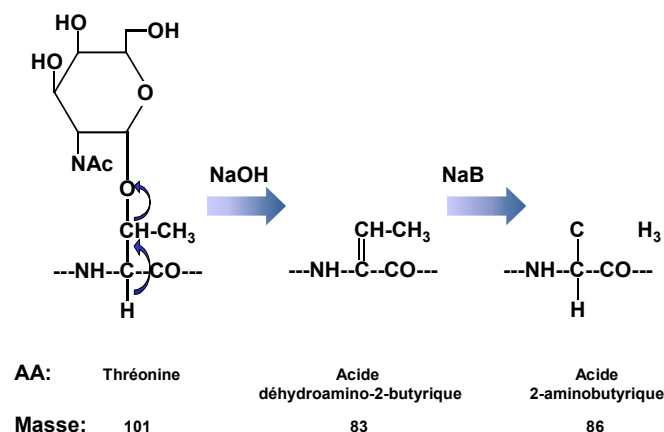


Figure 2.5 : Réaction de β -élimination catalysée par la soude en conditions réductrices. (d'après *Rademaker et al, 1993*).

Cette méthode nécessite des temps longs de réaction pour obtenir une déglycosylation suffisante aboutissant parfois à la dégradation du squelette peptidique (*Shimamura M et al, 1984*), (*Rademaker GJ, 1996*). De plus, l'utilisation de la soude nécessite d'intenses phases de purification chromatographique pour rendre les échantillons analysables en ESI-CID/MS-MS.

L'utilisation de réactifs de β -élimination/addition volatils peut s'avérer pratique afin de se soustraire des étapes de déssalage chromatographique (protocole prolongé, perte de matériel). L'ammoniac peut-être utilisé pour introduire un groupement $-NH_2$ à la place de la structure glycanique et marquer ainsi de manière covalente les résidus de serine et thréonine glycosylés (*Rademaker GJ et al, 1998*).

La démarche, par sa sensibilité, laisse entrevoir d'intéressantes perspectives pour la localisation de sites de glycosylation, et peut par conséquent, faire l'objet d'analyse Q-TOF/MS-MS (*Pittenauer E et al, 1993*), garantissant sensibilité, résolution et précision de mesures. Cependant la différence de masse d'1Da entre un acide aminé « $-NH_2$ modifié » et un acide aminé hydroxylé (porteur d'un $-OH$) est difficilement mesurable par spectrométrie de masse de basse résolution (MALDI/PSD-MS et ESI-CID/MS-MS). De plus, des temps de réaction longs conduisent à l'obtention de produits secondaires de réaction (*Mirgorodskaya E et al, 2001*) (interaction avec les hydroxyles libres de la chaîne peptidique) aboutissant à une surestimation du nombre de sites de glycosylation.

L'utilisation de bases plus fortes que l'ammoniac comme les dérivés aminés éthyl, méthyl ou diméthylamine semblent plus appropriées à la β -élimination douce des O-glycopeptides (*Hanisch FG et al, 2001*). Dans certains cas, l'amine peut être utilisée conjointement avec des thiols (*Czeszak X et al, 2002*).

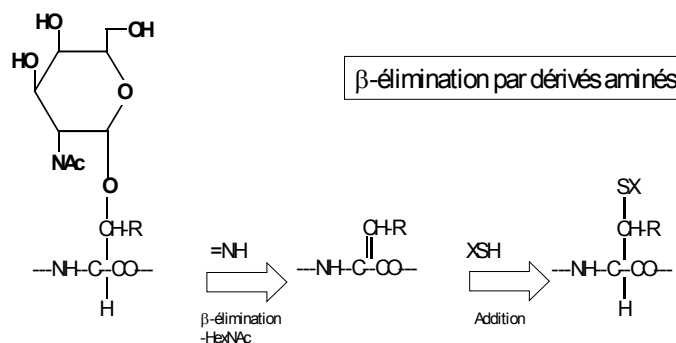


Figure 2.6 : Réaction de déglycosylation par action de dérivés aminés.

(d'après *Czeszak X et al, 2002*)

Stable dans les conditions d'analyse MS-MS et PSD, la modification de l'acide aminé glycosylé est plus importante en masse et de ce fait aisément détectable pendant le séquençage.

2.6/ En résumé...

Force est de constater que la localisation des sites de O-glycosylation représente encore aujourd'hui un réel challenge analytique, la grande diversité des méthodes proposées ne faisant que conforter cette idée.

Le séquençage direct de glycopeptides par spectrométrie de masse (à partir de glycopeptides natifs sans modifications) serait avantageux mais la trop forte relation qualité des résultats \leftrightarrow dissociation collisionnelle interdit l'adaptabilité de ces méthodes à tous types de glycopeptides. Les méthodes enzymatiques par le peu d'applications proposées et par le manque d'outils réellement à disposition ne sont pas véritablement exploitables. Restent donc les méthodes chimiques de déglycosylation / marquage. Certes imparfaites, ces approches très diverses présentent des avantages certains d'efficacité et de souplesse des plus intéressants dans ce type d'études.

C'est pour cette raison que l'essence même de ce manuscrit traite de méthodes chimiques de modification et de marquage dans le cadre de la localisation de site(s) de O-glycosylation.

Chapitre 3 :

Dérivation à Charge Permanente pour l'Analyse des Peptides

Chapitre 3 : Dérivation à Charge Permanente pour l'Analyse des Peptides

3.1/ Introduction

3.2/ Dérivation à charge permanente N-terminale

3.2.1/ Groupement Ammonium quaternaire

3.2.2/ Groupement Phosphonium quaternaire

3.3/ Dérivation N-terminale à haute affinité protonique

3.4/ Dérivation C-terminale à charge permanente

3.5/ En résumé...

3.1/ Introduction

Une fois ionisé, un peptide peut subir des événements de fragmentation qui, en fonction de la localisation de la charge, conduisent à la formation de différents ions (*Roepstorff P et Fohlman J, 1984*), (*Martin SA et Biemann K, 1987*). Ces fragmentations siègent majoritairement au niveau du squelette peptidique et les 6 populations ioniques potentiellement formées (x_n , y_n , z_n , a_n , b_n et c_n)(voir A₃) sont représentatives de l'enchaînement en acides aminés de la séquence du peptide (**Figure 3.1**).

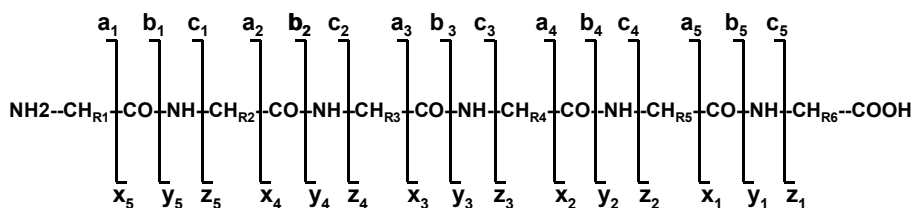


Figure 3.1 : Nomenclature de fragmentation peptidique proposée par Roepstorff et Fohlman, modifié par Biemann.

Sur la base de ce principe, Klaus Biemann (*Biemann K et al, 1959*) est le premier, dès 1960, à utiliser la spectrométrie de masse pour déterminer la structure primaire d'un peptide. Les travaux de Barber (*Barber M et al, 1965*) puis Wulfson (*Wulfson NS et al, 1965*) en 1965 viennent ensuite confirmer ces résultats prometteurs. L'avènement des techniques d'ionisations FAB (*Barber M et al, 1981*), MALDI (*Karas M et Hillenkamp F, 1988*) et Electrospray (*Yamashita M et Fenn JB, 1984*) et la fragmentation induite par collision (CID) accroissent significativement les capacités de la technique dans l'analyse bidimensionnelle de ces composés. Malgré toutes les capacités de la spectrométrie de masse dans ce domaine d'analyse, deux inconvénients majeurs peuvent rendre difficile le travail de séquençage peptidique :

- ✓ Une sensibilité relative due à la détection difficile des fragments de plus basse intensité (hydrophobicité importante (*Yamashita M et Fenn JB, 1984*), rendements d'ionisation très faibles (*Caprioli RM et Moore WT, 1988*)).
- ✓ Une hétérogénéité importante des ions fragments, fonction de la localisation N- ou C-terminale de la charge, engendrant une interprétation spectrale parfois difficile (*Papayannopoulos IA, 1995*).

Face au caractère « peu pratique » du peptide, il devient fort logique de modifier l'entité pour la rendre plus facilement analysable par spectrométrie de masse. Pour cette raison, des techniques de dérivation chimique sont alors proposées.

Les premières voies explorées dans ce domaine sont à mettre au profit des équipes de McLafferty (*Senn M et McLafferty FW, 1966*) et Biemann (*Biemann K et al, 1966*), qui indépendamment l'une de l'autre, développent les réactions de méthyl-esterification pour la dérivation de peptides. En augmentant les propriétés volatiles de l'analyte et en rendant la fragmentation plus informative, la méthode proposée par ces deux équipes permet l'analyse de la structure d'un peptide par spectrométrie de masse d'ionisation par impact électronique. Cependant, l'application se restreint à des peptides de petites tailles et la spectrométrie de masse d'ionisation par impact électronique atteint rapidement ses limites dans le domaine.

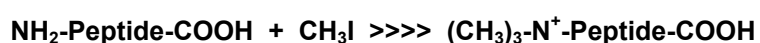
Dans les années 80, Falick et collaborateurs s'attachent à augmenter l'activité de surface des échantillons peptidiques pour en faciliter l'analyse FAB (*Falick AM et al, 1989*). Pour répondre aux besoins d'analyses par désorption/ionisation, des réactifs qui augmentent la capacité d'ionisation de certains échantillons « froids » sont proposés (*Busch KL et al, 1982*).

Quelques soit l'époque ou le type d'analyseur de masse choisi, les méthodes de dérivation peptidiques tendent toutes vers un double objectif, favoriser l'ionisation et orienter la fragmentation. Dans la suite de ce chapitre, nous nous proposons d'étudier en détail les différentes techniques de dérivations existantes, tant N- que C-terminale, et de lever des prédispositions compatibles au sujet qui nous intéresse.

3.2/ Dérivation N-terminale à charge permanente

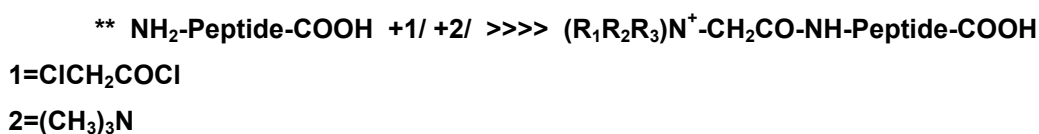
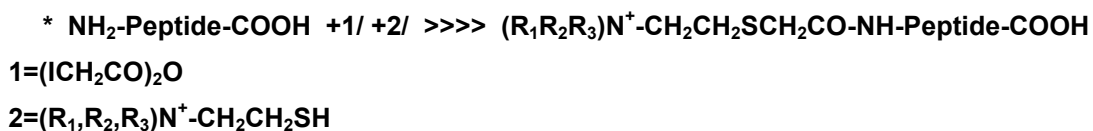
3.2.1/ Groupement Ammonium quaternaire

Sur la base des premières applications décrites dans les années 60 (voir ci-dessus), Kidwell et collaborateurs utilisent de l'iodure de méthyle (*Kidwell DA et al, 1984*) et obtiennent une forme peptidique dérivée amino-terminale de type triméthylammonium.



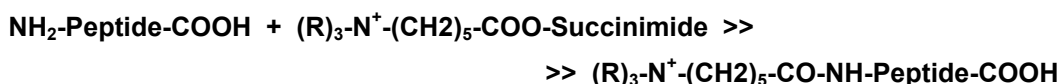
Biemann (*Zaia J et Biemann K, 1995*), (*Vath JE et Biemann K, 1990*), (*Vath JE et al 1988*), et Stults (*Wetzel R et al, 1990*), (*Stults JT et al, 1993*), (*Stults JT, 1992*) s'attachent quant à eux au développement de méthode de dérivation N-terminale en plusieurs étapes réactionnelles.

Stults fait référence à l'anhydride iodo-acétique et à l'iodure de thiocholine*, Biemann** au chlorure de chloro-acétyle et à la triméthylamine.



De fortunes diverses, ces méthodes conduisent toutes deux à la formation d'ammoniums quaternaires, souffrent de mauvais rendement de couplage et de réactions secondaires indésirables (groupements -NH₂ terminaux non-protégés de chaînes latérales des lysines et chaînes latérales des cystéines). Elles sont rapidement abandonnées au profit des méthodes à acides aminés quaternarisés de type bêtaïne qui coordonnent dérivation et ionisation.

Bartlet-Jones et collaborateurs sont les premiers à proposer ce type de composé porteur d'une charge positive permanente et atteignent ainsi des rendements de couplage jusqu'alors inaccessibles (dérivation de 50 femtomoles de peptides) (*Bartlet-Jones M et al, 1994*).

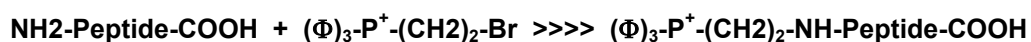


Ils associent cette méthode de dérivation à une analyse MALDI-PSD/MS mais sont contraints à modifier au préalable les résidus d'arginine et de lysine pour obtenir des spectres spécifiquement composés d'ions fragments N-terminaux (*a_n et *b_n) (*Hines W et al, 1995*).

D'autres composés eux aussi porteur d'une charge positive permanente semblent présenter des capacités considérables voir supérieures à celles des dérivés aminés : les sels de phosphonium.

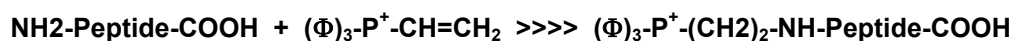
3.2.2/ Groupement Phosphonium quaternaire

Le bromure de 2-bromoéthyl-triphénylphosphonium est proposé par Wagner et collaborateurs. Ce composé autorise un couplage d'une nanomole de peptide et atteint, selon ces auteurs, des rendements de 75%. De plus, il augmente l'activité de surface pendant l'analyse FAB-MS (*Watson JT et al, 1991*) ainsi que l'hydrophobicité des composés à analyser et permet de baisser significativement le seuil de détection en spectrométrie de masse (*Ligon VW, 1986*).



Cependant, des réactions indésirables avec les groupements NH_2 radicalaires des acides aminés basiques sont décrites et la spécificité amino-terminale de la dérivation passe par un contrôle rigoureux du pH du milieu.

Bunk et Macfarlane (*Bunk DM et Macfarlane RD, 1991*) décrivent quant à eux l'utilisation du bromure de vinyltriphénylphosphonium pour la dérivation N-terminale de la bradykinine et obtiennent principalement des ions fragments a_n .



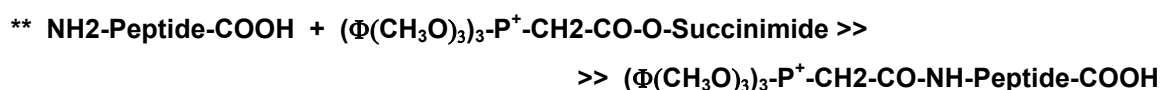
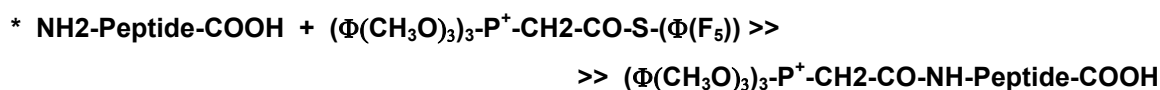
La méthode s'avère par ailleurs insatisfaisante pour l'étude de peptides de grandes tailles (*Bunk DM et Macfarlane RD, 1993*).

En reprenant les travaux de Wagner (voir ci-dessus), Liao et Allison (*Liao PC et Allison J, 1995*) comparent les spectres MALDI-MS obtenus à partir d'une picomole de peptide avant/après dérivation. Pour cela, ils dérivent en N- et en C-terminal les peptides de leur étude par un substituant de type éthyl-triphénylphosphonium et prouvent que ce type de dérivation augmente ostensiblement l'intensité du signal détecté.

Nous venons de voir que l'ensemble des réactifs de dérivation N-terminale jusque-là présentés possèdent une racine *-(triphénylphosphonium)-* commune.

Considérant avec rigueur les capacités de ces réactifs, d'autres auteurs vont tout de même travailler à l'optimisation de cette famille de composé. Ces travaux concernent le groupe phosphonium d'une part et la nature du groupement partant d'autre part.

Huang et collaborateurs sont les premiers à faire référence au groupement [tris-(2, 4, 6-triméthoxyphényl)-phosphonium] acétyl. Deux esters actifs sont décrits comme réactifs (*Huang ZH et al, 1997*) pour la dérivation N-terminale de peptides : le bromure de tris-(2, 4, 6-triméthoxyphénylphosphonium) acétate de S-pentafluorothiophényle* ainsi que le bromure de tris-(2, 4, 6-triméthoxyphénylphosphonium) acétate de N-hydroxysuccinimidyle**.



Parce qu'ils augmentent la solubilité du réactif en milieu aqueux et maintiennent le peptide dérivé soluble dans des combinaisons de solvants aqueux et organiques, ces réactifs atteignent des rendements de couplage nettement supérieurs à ceux obtenus avec les réactifs précédemment décrits et s'avèrent directement analysables en spectrométrie de masse FAB, ESI (*Sadagopan N et al, 1997*) et MALDI. Le pH du milieu réactionnel permet d'éviter les réactions compétitives avec les groupements des chaînes latérales. Quant au réactif de type N-hydroxysuccinimidyle, il possède une meilleure stabilité vis à vis de l'hydrolyse (comparativement à son homologue pentafluorothiophényle) et une meilleure sensibilité puisque applicable à de très petites quantités de matériel d'origine biologique (digestion trypsique) (*Huang Z H et al, 1999*).

Indépendamment de la nature du groupement partant et en nous basant sur la qualité des résultats obtenus, les sels de phosphonium présentent, comparativement aux ammoniums quaternaires, des capacités supérieures pour la dérivation N-terminale. Orientant véritablement la fragmentation des composés dérivés, ils conduisent à la formation de séries complètes d'ions fragments (généralement *a_n)

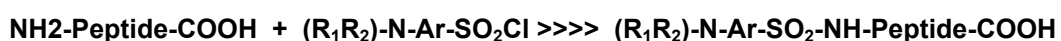
(Wagner DS et al, 1991) et facilitent considérablement le travail de séquençage (Liao P et al, 1997), (Huang ZH et al, 1997b), (Roth KDW et al, 1998), (Kaufmann R et al, 1994).

Garantissant des rendements de couplage élevés et très spécifiques car rarement à l'origine de réactions de dérivation indésirables (ϵ -NH₂...) (Huang et al, 1997), les sels de phosphonium se placent en toute logique comme des partenaires des plus intéressants dans le séquençage peptidique.

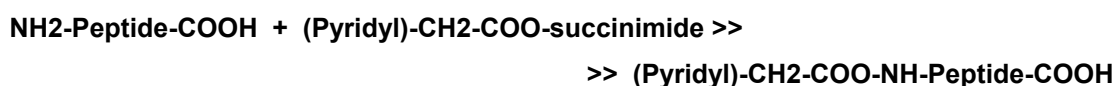
3.3/ Dérivation N-terminale à haute affinité protonique

En plus de la dérivation à charge fixe, la dérivation N-terminale peut utiliser des réactifs intrinsèquement neutres mais dotés d'une forte affinité protonique. L'action de ces réactifs sur la fragmentation s'apparente à la présence d'acides aminés basiques proches de l'extrémité N-terminale d'un peptide. Porteurs de groupements aminés, les réactifs de dérivation se protonent pendant l'analyse, au sein même du spectromètre de masse comme le décrivent Renner et Spiteller (Renner D et Spiteller G, 1985) avec le chlorure de dansyle et le chlorure de 2-bromo-5-diméthylaminobenzène-sulfonyle.

Ces réactifs portent tous deux une amine aromatique figurant le site de protonation préférentielle et conduisent pendant l'analyse FAB à la formation de fragments a_n et b_n.



Sherman et collaborateurs (Sherman NE et al, 1995) utilisent quant à eux le 2-(3-pyridyl)acétate de succinimidyle (SPA) pour la dérivation N-terminale des peptides avant analyse par ESI-MS (Cardenas MS et al, 1997) et mettent en évidence des ions fragments a_n et b_n. Il faut cependant noter avec ces deux méthodes que la dérivation des chaînes latérales des lysine et tyrosine peut compliquer la fragmentation.



Dernièrement, Naven (Naven TJP et al, 1997) et collaborateurs font référence à ce même réactif SPA pour une analyse de peptide réalisée en MALDI-PSD/MS. La dérivation présentée peut être réalisée sur cible ou sur membrane de PVDF à partir

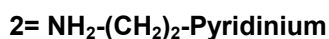
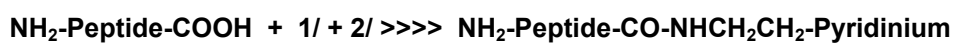
d'infimes quantités de matériel peptidique. Les spectres PSD obtenus présentent principalement des ions b_n ainsi que quelques ions a_n et y_n .

La dérivation N-terminale par réactif de forte affinité protonique est donc moins spécifique que son homologue à charge fixe puisqu'elle conduit, pour la majorité des méthodes ici décrites, à la formation de populations ioniques hétérogènes (a_n , b_n et y_n). Pouvant être avantageux dans certaines applications, l'obtention d'ions N- et C-terminaux limite tout de même l'analyse en compliquant les spectres.

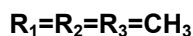
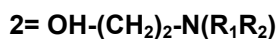
3.4/ Dérivation C-terminale à charge permanente

Comme pour la dérivation N-terminale précédemment décrite, les réactions de dérivation C-terminale à charge fixe font majoritairement intervenir des structures quaternarisées.

Les sels de pyridinium de type 2-amino-éthyl pyridinium associés au 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) peuvent être utilisés pour la dérivation peptidique C-terminale (*Kidwell DA et al, 1984b*).



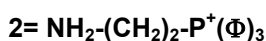
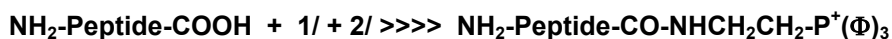
Ils sont cependant à l'origine de réactions secondaires avec les groupements carboxyliques des chaînes latérales des acides aminés acides et donc délicats à contrôler. Des dérivés aminés comme la N, N diméthyléthanolamine associés à l'anhydride acétique forment en C-terminal un groupement amine tertiaire pouvant être aisément quaternarisé par réaction avec de l'iodure de méthyle (*Benett BD et Day DA, 1987*).



Cependant la méthode souffre d'une sensibilité toute relative (100 nanomoles de peptides sont nécessaires pour la dérivation) et d'un temps de réaction important. Enfin, ce type de dérivation n'augmente aucunement l'intensité du signal (*Vath JE et al, 1988*).

Hirayama (*Hirayama K et al, 1993*) et collaborateurs développent la même approche sans recourir à la quaternarisation de l'amine par l'iodure de méthyle. L'analyse FAB-CAD/MS-MS donne aussi bien des fragments N-terminaux $*b_n$ et plus attendus des fragments $*y_n$ C-terminaux. Le spectre de précurseur $m/z=72$ (fragment N,N-diméthyléthanolamino) reconstitue quant à lui uniquement les signaux porteurs d'une charge localisée en C-terminal.

Les dérivés de type phosphonium peuvent aussi être mis à contribution pour la dérivation C-terminale : le réactif de couplage 2-aminoéthyltriphenylphosphonium en association avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) conduit à pH contrôlé (pH=5) à la dérivation C-terminale des peptides d'intérêt et l'obtention de spectres informatifs aussi bien en FAB-MS (*Wagner DS et al, 1991*) qu'en MALDI MS (*Liao PC et Allison J, 1995*).



Se caractérisant par des spectres MALDI significativement plus intenses, la méthode démontre une fois encore tout le potentiel des réactifs de dérivation de type phosphonium pour la dérivation C- et N-terminale des peptides.

3.5/ En résumé...

Nous avons recensé dans ce chapitre les dérivés chargés qui favorisent l'ionisation, orientent la fragmentation et facilitent l'interprétation spectrale. De l'ensemble des composés décrits pour les dérivations N- et C-terminales, les dérivés à charge permanente témoignent d'une plus grande efficacité comparativement à

leurs homologues à affinité protonique élevée. La dérivation N-terminale est globalement la plus utilisée puisque la plus facile à maîtriser. Cependant la dérivation C-terminale peut être d'une grande utilité si se présente le besoin d'informations complémentaires. Aussi, le choix et l'utilisation de l'un ou de l'autre des composés est gouverné par des impératifs analytiques : souplesse et efficacité.

Les composés de dérivation ne sont pas disponibles commercialement et le rendement de la synthèse de ceux-ci, la purification, la stabilité et la conservation sont autant de critères à considérer avec attention.

L'efficacité d'un réactif de dérivation doit se juger par la facilité de mise en œuvre autorisant un rendement élevé de couplage pour un temps de réaction raisonnable.

Pour toutes ces raisons et par compatibilité évidente avec l'application qui est la nôtre, nous nous consacrerons essentiellement dans ce manuscrit à l'utilisation de sels de phosphonium et à leurs apports, outre leurs potentialités déjà largement décrites, dans le séquençage de glycopeptides et la localisation de sites de glycosylation.

Développements et Résultats
Personnels

Chapitre 4 :

Action Catalytique de la Soude

Chapitre 4 : Action Catalytique de la Soude

4.1/ Introduction

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont l'aboutissement d'une collaboration scientifique et d'un effort commun initié en 1998 par le Docteur Guy Ricart du Centre Commun de Mesures de Spectrométrie de Masse de l'Université de Lille 1 et le Docteur Daniel Tetaert de l'Unité de Biologie et Physiopathologie des Cellules Mucipares (Unité INSERM 377) de l'Université de Lille 2.

La préoccupation principale du Docteur Daniel Tetaert et de son équipe de recherche réside dans l'étude de motifs peptidiques de différents modèles muciniques (MUC 1, MUC 4, MUC 5AC et MUC 7 notamment). Désireux de comprendre toute l'importance des mécanismes de glycosylation siégeant au sein de cellules mucipares, le Docteur Daniel Tetaert et son équipe a construit un modèle reposant sur des peptides accepteurs de séquences connues (séquences répétitives « tandem-repeat » à haute densité d'acides aminés hydroxylés de type sérine et thréonine caractéristiques des polypeptides muciniques) soumis à l'action de différentes glycosyl-transférases recombinantes. Ce modèle permet, par l'étude structurale des glycopeptides ainsi générés, de mettre en exergue des activités enzymatiques spécifiques des glycosyl-transférases utilisées, et le cas échéant, d'appréhender toute l'importance de ces mécanismes de O-glycosylation dans la physiopathologie cellulaire.

La clef de voûte de ce modèle réside dans l'acquisition qualitative et quantitative d'informations de structures concernant ces O-glycopeptides enzymatiquement glycosylés. Les O-glycopeptides intéressant ce projet, sont préparés par plusieurs dizaines de cycles d'électrophorèse capillaire (parfois 70 cycles...) et le séquençage est initialement effectué par dégradation d'Edman. Cette dernière technique, en dépit de son haut pouvoir analytique, s'avère peu adapté à la méthode de par trois inconvénients majeurs : le séquençage d'Edman est peu sensible, il ne s'applique pas aux peptides et glycopeptides en mélange et l'acide aminé modifié par la glycosylation laisse « un blanc-signal » pendant le séquençage (*Tomita M et Marchesi VT, 1975*) rendant ainsi l'interprétation hasardeuse.

Le séquençage d'Edman se prête donc peu à la thématique précédemment introduite et le projet auquel nous avons été associés intègre donc fort logiquement la spectrométrie de masse (notamment pour la sensibilité des analyseurs proposés et les capacités de ceux-ci à appréhender des échantillons complexes et en mélange).

Problématique

Dans le contexte bibliographique du début de ce projet, la spectrométrie de masse est utilisée seule (sur des échantillons natifs) ou en association (avec traitements chimiques préalables de ces échantillons) pour le séquençage de structures glycopeptidiques. Malgré toutes les potentialités des analyseurs massiques, les O-glycopeptides se caractérisent, à leurs dépens, par une capacité d'ionisation médiocre et par d'importants phénomènes de suppression de signal en présence d'ions peptidiques (alors qu'ils présentent des aptitudes à l'ionisation très supérieure). Aussi, ils sont régulièrement décrits comme hautement instables dans les conditions d'analyse MS-MS (départ préférentiel de la structure glycanique) comme en témoigne le spectre de la **figure 4.1**.

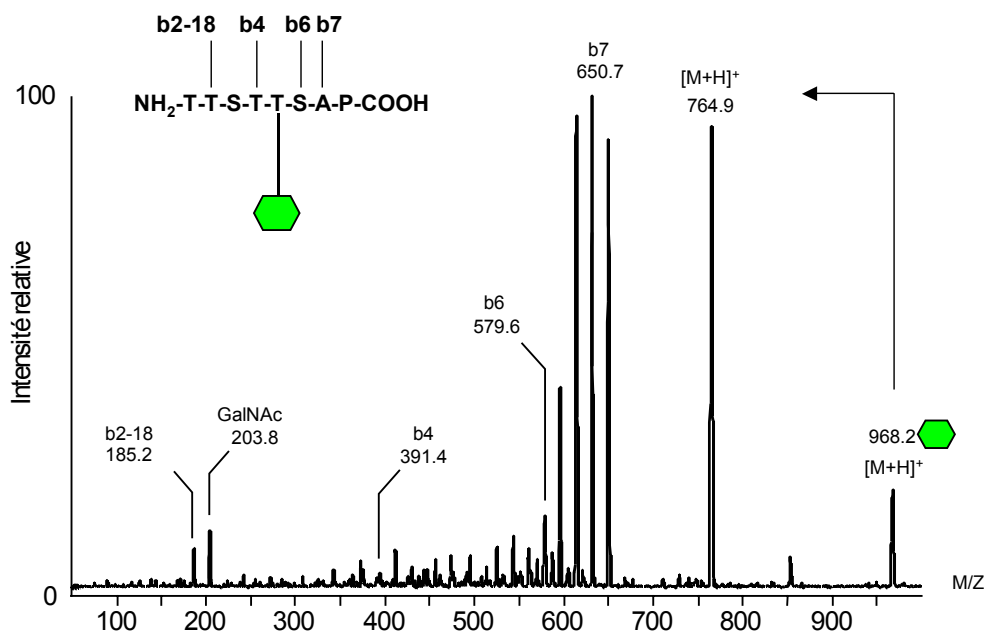


Figure 4.1 : Spectre Nanospray-ESI/MS-MS du glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) à $m/z=968.2$ correspondant à l'espèce $[\text{MH}]^+$.

⬡ = GalNAc

Partant du comportement dissociatif de ces espèces dans les conditions d'analyse MS-MS, l'élucidation structurale (incluant le séquençage peptidique et la localisation du(des) site(s) de glycosylation) des composés O-glycopeptidiques représente donc une tâche ardue (*Reason AJ et al, 1992*), (*Roquemore EP et al, 1992*). Aussi, les pré-traitements qui facilitent l'analyse ne sont pas obligatoires mais aident grandement. L'acétylation N-terminale décrite comme favorisant la fragmentation des espèces monochargées (*Summerfield SG et al, 1997*) permet par exemple de se défaire de certaines structures O-glycopeptidiques de type MUC-1 par l'analyse du peptide modèle TAP-25 (*Goletz S et al, 1997*), (*Goletz et al, 1997b*), (*Hanisch FG et al, 1998*). Pour ces raisons et mis à part les cas les plus favorables pour lesquels la fragmentation de la liaison glycopeptidique est mineure (*Medzihradszky KF, 1996*), les applications les plus marquantes font appel à la modification chimique covalente du glycopeptide étudié. Parmi toutes les solutions proposées, les traitements chimiques les plus usités sont sans nul doute les réactions de β -élimination/addition. Marquant de manière spécifique les structures porteuses de O-glycane (*Downs F et al, 1973*), elles représentent un outil de choix dans une stratégie de séquençage/localisation de sites porteur de modifications post-traductionnelles. Limitée jusque là par une sensibilité moyenne (*Medzihradszky KF et al, 1990*), (*Setterini CA et al, 1990*), la β -élimination se voit appliquée à l'étude des échantillons d'origine biologique avec les méthodes proposées par Rademaker d'une part et Greis d'autre part (*Rademaker GJ et al, 1993*), (*Rademaker GJ et al, 1998*), (*Greis KD et al, 1996*).

Dans ce contexte, la soude de par sa basicité et son pouvoir « β -éliminant » puissant est largement utilisée. Dans des conditions réductrices (i.e. $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$), le glycane lié est transformé en alditol stable en milieu basique et les résidus de serine et de thréonine glycosylés sont respectivement convertis en résidus d'alanine et d'acide 2-amino butyrique. (**Figure 4.2**)

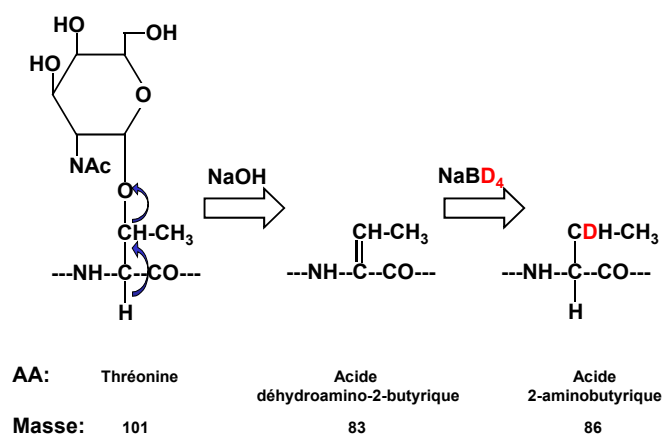


Figure 4.2 : β -élimination / addition par la soude en conditions réductrices.

Cette β -élimination sélective est associable à la spectrométrie de masse CID-FAB-MS/MS pour localiser des sites de O-glycosylation touchant des résidus de thréonine (*Rademaker GJ et al, 1993*). En condition non-réductrice, cette réaction peut concerner quelques picomoles de matériel (*Greis KD et al, 1996*) et fort logiquement s'appliquer à l'étude structurale de glycopeptides d'origine biologique. Néanmoins, des temps de réaction prolongés sont parfois nécessaires pour la déglycosylation et peuvent provoquer, notamment dans des conditions réductrices, une dégradation irréversible du squelette peptidique (*Shimamura M et al, 1984*), (*Rademaker GJ, 1996*).

En outre, la soude peut elle être utilisée en association avec d'autres réactifs dans le but de catalyser la réaction de β -élimination. Par exemple, un mercaptan présent dans le milieu s'ajoute à l'intermédiaire réactionnel α - β -insaturé. Cette réaction de β -élimination / addition d'un réactif nucléophile est utilisée dans le cadre de la localisation des sites de phosphorylation comme le décrit Jaffe et collaborateurs (*Jaffe H et al, 1988*) (d'après les travaux préalables de Meyer (*Meyer HE et al, 1986*), (*Meyer HE et al, 1987*), (*Swiderek K et al, 1988*), (*Meyer HE et al, 1990*), (*Meyer HE et al, 1993*)).

Par l'homologie forte qui existe entre un site de phosphorylation et un site de O-glycosylation (tant du point de vue de la nature des liaisons phospho et glycopeptidiques que du point de vue du comportement dissociatif de ces composés lors d'analyses MS²), il nous paraît donc concevable d'adapter les méthodes proposées à la problématique qui est la nôtre. Nous nous proposons dans un premier temps d'étudier l'action conjointe de la soude et de thiols dans les réactions de β -élimination/addition des O-glycopeptides.

4.2/ Evaluation de la méthode de Meyer pour la déglycosylation de O-glycopeptides

Le glycopeptide de séquence GTTPSPVP(GalNAc) se caractérise par une composition en acides aminés toute particulière puisque constitué de 3 prolines sur un total de 8 résidus. De par la prévalence et la répartition sur la séquence de ces acides aminés, l'unique entité de *N*-Acétyl Galactosamine présente sur le squelette peptidique semble particulièrement « protégée » au sein de cette structure compacte.

En considérant les propriétés chaotropiques de la soude (dénaturation de protéines), « le mélange de Meyer » peut apporter une solution des plus intéressantes dans ce cas.

En effet, la déglycosylation du glycopeptide d'intérêt de masse mesurée 958Da $[MH]^+$ est totale et permet l'obtention de l'espèce attendue à $m/z=799$ (correspondant à l'ion moléculaire monochargé GTTPSPVP(EtS-) (754+44+1)) ainsi que d'une espèce à $m/z=781$ provenant de la perte d'une molécule d'eau. Dans un soucis d'objectivité, il nous faut aussi remarquer sur le spectre la présence d'un ion très intense à $m/z=843$ dont la structure sera discutée ci-après. (**Figure 4.3**)

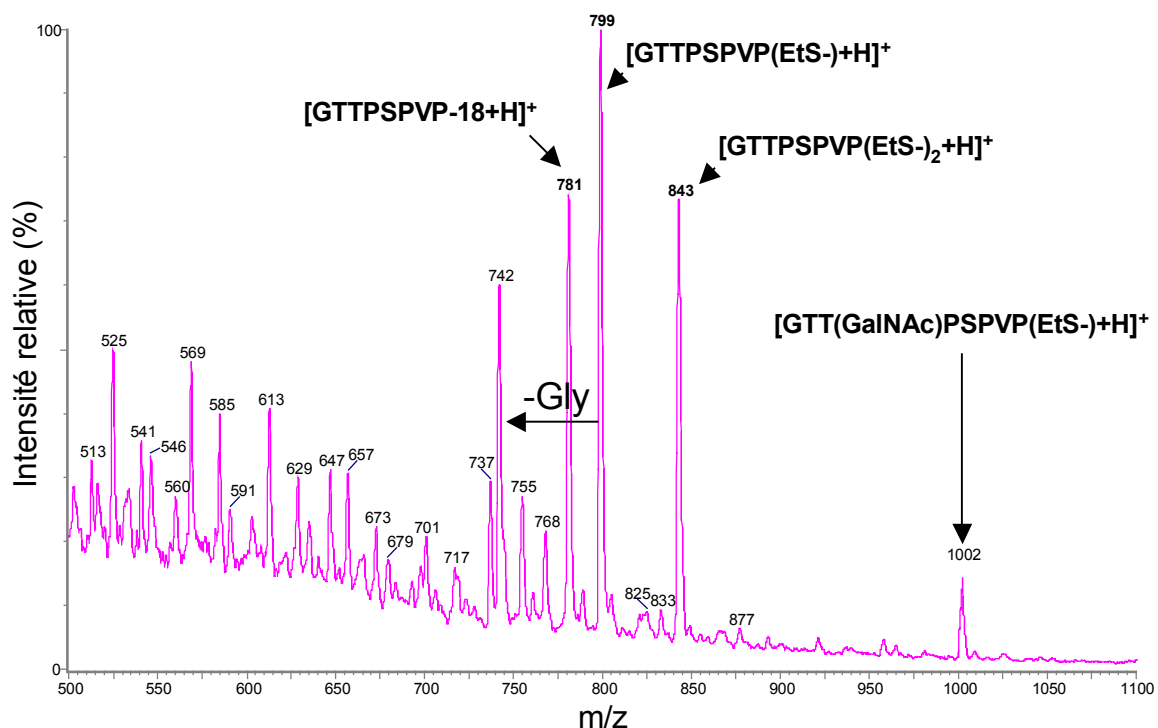


Figure 4.3: Spectre NanoSpray-MS du composé GTTPSPVP(EtS-) à $m/z=899$ (ion $[MH]^+$) correspondant au glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc) après déglycosylation par la méthode de Meyer et collaborateurs.

4.2.1/ Analyse NANO-ESI/MS-MS des composés GTTPSPVP(EtS-)-18 ($m/z=781$), GTTPSPVP(EtS-) ($m/z=799$) et GTTPSPVP(EtS-)+44 ($m/z=843$)

Le spectre de fragmentation du précurseur monochargé à $m/z=799$ correspondant au glycopeptide d'intérêt après incorporation d'un radical EtS- $[MH+44]^+$ montre une série complète d'ions fragments y_n de y_1 à y_5 non modifiés indiquant l'appartenance de l'acide aminé modifié par le thiol à la séquence GTT- N-terminale. Sur ce même spectre sont aussi détectés des ions de série b_n incrémentés de 44uma (b_5+44 , b_6+44 et b_7+44 respectivement à $m/z=488.5$, 585.6 et 684.7) venant confirmer la localisation N-terminale en GTT- de l'acide aminé modifié. Néanmoins, par absence de tout autre ion fragment informatif, la localisation précise du site de glycosylation (thréonine 2 ou thréonine 3) ne peut être envisagée par cette seule analyse. (**Figure 4.4**)

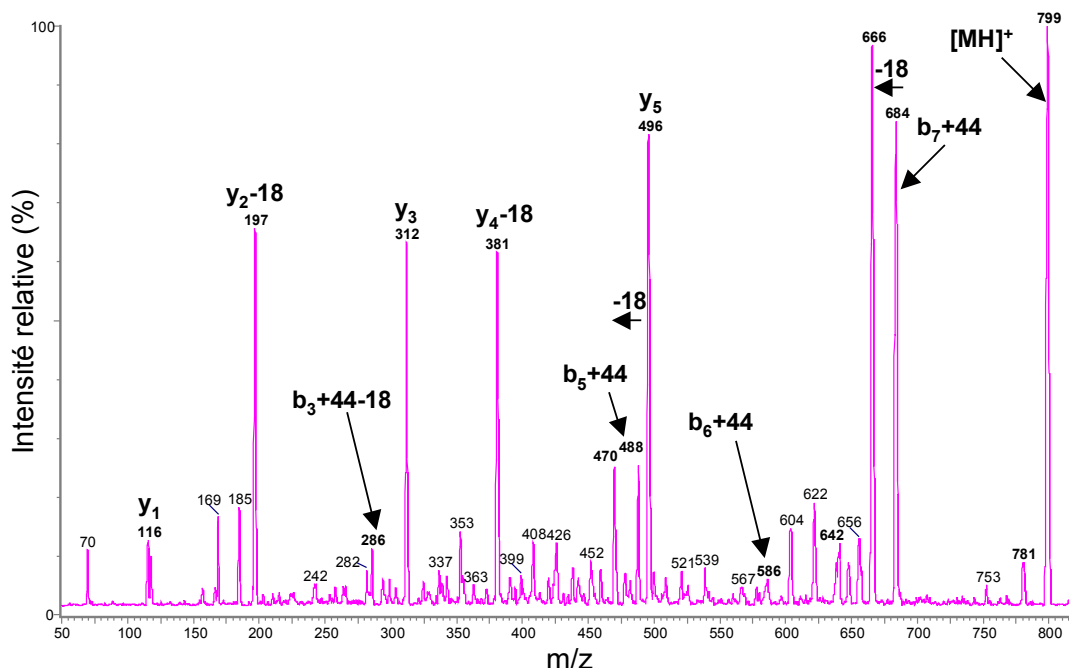


Figure 4.4 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé $[MH]^+=799$ correspondant à l'espèce GTTPSPVP(EtS-) après déglycosylation du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc) par la méthode de Meyer.

Le spectre de fragmentation de l'espèce monochargé à $m/z=781$ (correspondant à une perte d'eau par rapport à l'espèce moléculaire $[MH+44]^+$) est soumis à une étude collisionnelle dans le but d'en éclaircir la structure. La fragmentation de cette espèce montre comme précédemment décrit pour le

précurseur à $m/z=799$ une série ininterrompue d'ions fragments y_n de y_1 à y_5 non modifiés. En revanche, un signal à $m/z=642$ est détecté et correspond à l'ion incrémenté y_6+44 . Le radical EtS- de cette espèce déshydratée est donc lié à la thréonine 3 de la séquence peptidique. De plus une série d'ions fragments b_5+26 , b_6+26 et b_7+26 est mesurée à $m/z=470.5$, 567.6 et 666.7 . Cette fragmentation bilatérale confirme donc la fixation du radical EtS-, consécutif à la β -élimination du glycopeptide, sur le résidu de thréonine 3 et indique un lieu de déshydratation préférentiel de ce même glycopeptide au niveau de la thréonine 2 de la séquence. (Figure 4.5)

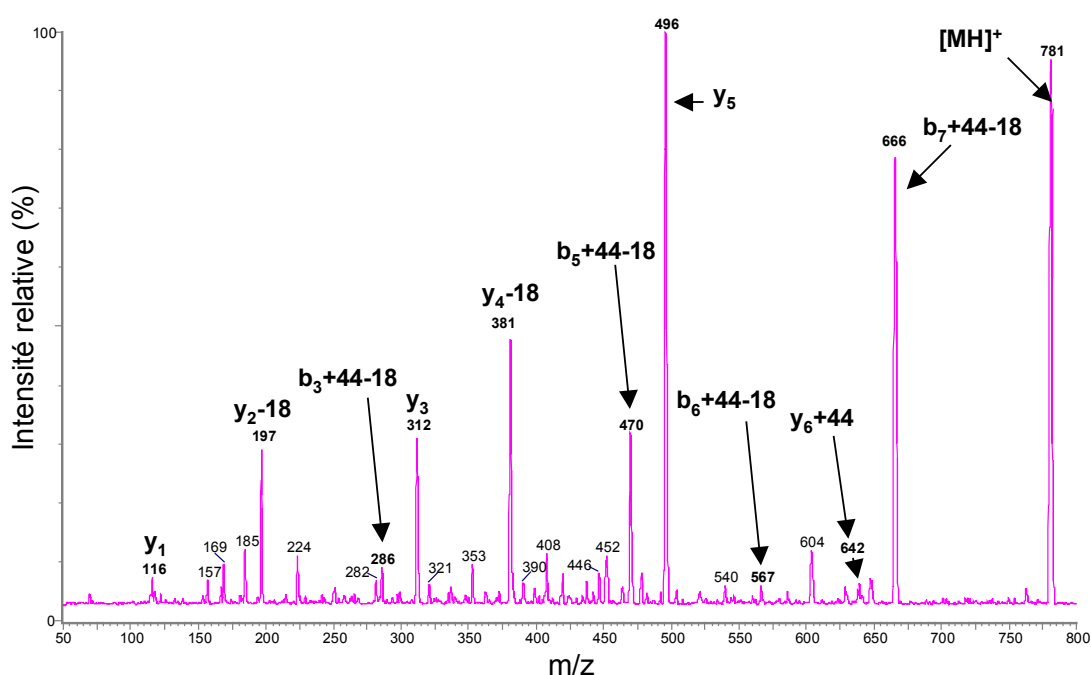


Figure 4.5: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé $[MH]^+=781$ correspondant à l'espèce GTTPSPVP(EtS-)-18.

L'étude collisionnelle du précurseur monochargé de masse 843Da fournit enfin des informations de première importance sur la structure de ce composé inattendu. Comme pour les deux autres précurseurs monochargés de cette étude (781 et 799), le spectre de fragmentation de ce composé montre clairement une série complète d'ions fragments y_n dont l'ion y_6+44 à $m/z=642$. L'intérêt de la présente application réside cette fois dans la détection d'un couple d'ions fragments b_n incrémentés de 88uma. (b_5+88 en 532.5, b_7+88 en 728.7) indiquant l'addition non

spécifique de 2 radicaux EtS⁻ à hauteur des thréonines 2 et 3 de la séquence. (Figure 4.6)

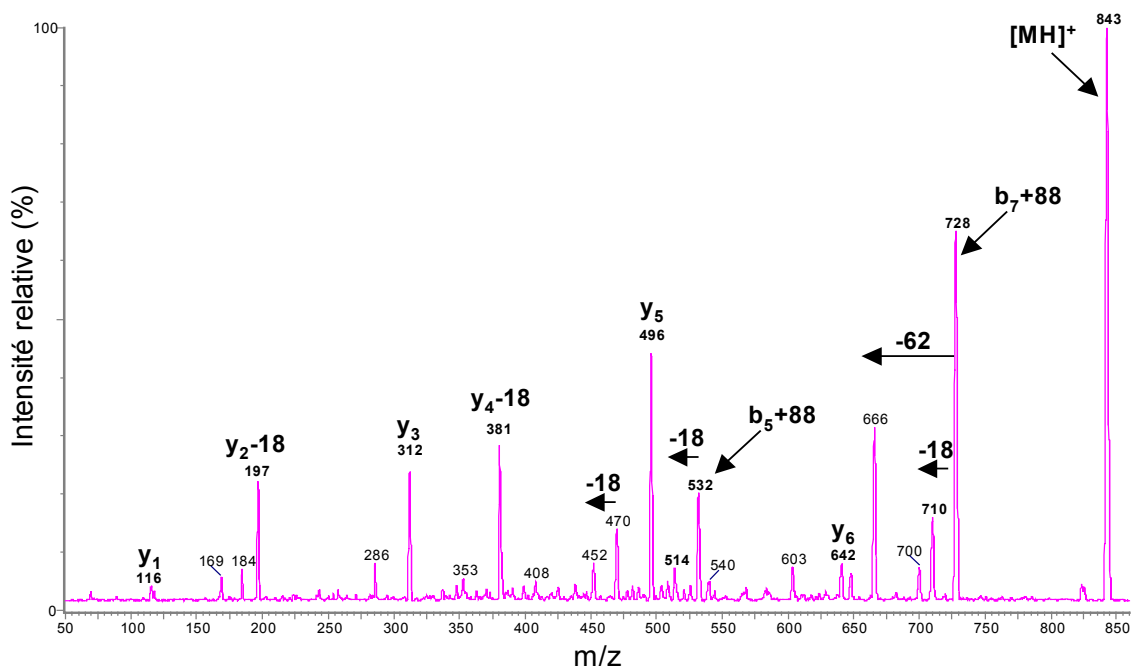


Figure 4.6: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé $[MH]^+ = 843$ correspondant à l'espèce GTTPSPVP(EtS)₂.

4.3/ Evaluation de la méthode de Meyer pour la déglycosylation de O-glycopeptides longs

4.3.1/ Etude du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)

Le composé glycopeptidique GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc) est de la même façon le sujet d'une étude de déglycosylation. Ce substrat est traité par l'action conjuguée de la soude et de l'éthanethiol comme préconisé dans le protocole de Meyer et collaborateur.

Après traitement, le glycopeptide d'intérêt se retrouve totalement déglycosylé comme en témoigne la présence d'un signal à $m/z = 1545$ relatif à l'incorporation d'un résidu EtS⁻ sur le squelette peptidique.

Néanmoins, le spectre MALDI de contrôle est anormalement hétérogène de par la détection de deux autres signaux non négligeables à $m/z = 1589$ et 1633 . Ces 2 pics sont en fait le résultat d'additions non spécifiques et surnuméraires de groupements EtS⁻ et représentent respectivement les structures peptidiques 2 et 3 fois modifiées $[MH+88]^+$ et $[MH+132]^+$. (Figure 4.7)

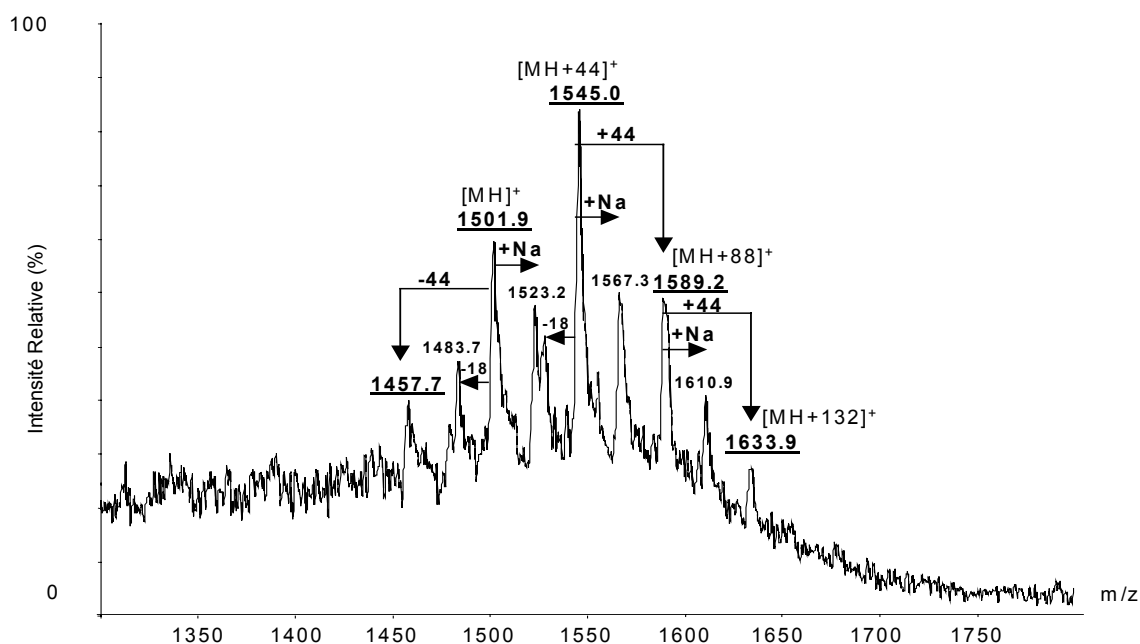


Figure 4.7: Spectre MALDI-MS du glycopeptide GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc) après déglycosylation par la méthode proposée par Meyer et collaborateurs.

4.3.2/ Etude du glycopeptide GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ Étape de déglycosylation

Le composé de structure GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ porteur de deux résidus de N-acétyl Galactosamine semble représenter un candidat de plus forte résistance (de par sa structure plus complexe) à la déglycosylation telle que la conçoivent Meyer et collaborateurs.

La déglycosylation de ce composé est menée selon le protocole préconisé par ces auteurs (dans des conditions réactionnelles identiques à celles des exemples développés ci-avant) et conduit contre toutes attentes à sa déglycosylation totale.

Le spectre MALDI correspondant montre le signal attendu à $m/z=1589$ correspondant à l'espèce porteuse de 2 radicaux EtS⁻ (**Figure 4.8**) mais conduit, et nous nous devons de le remarquer, à l'addition surnuméraire et non-spécifique de 2 autres radicaux EtS⁻ (détection de 2 signaux, l'un à $m/z=1633$ et l'autre à $m/z=1677$)

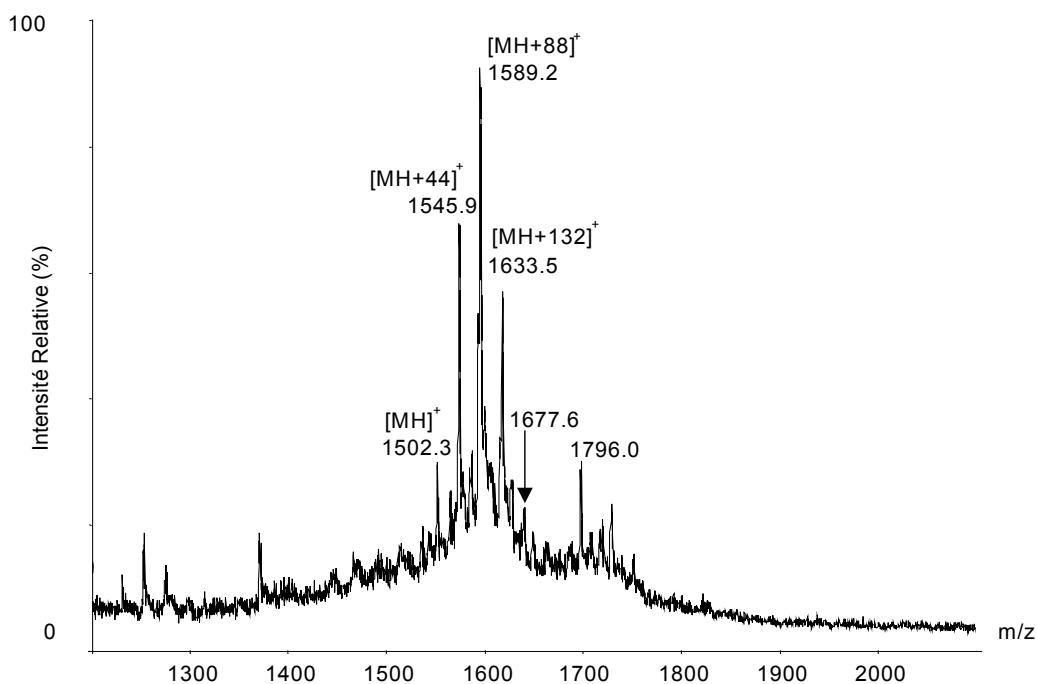


Figure 4.8: Spectre MALDI-MS du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ après déglycosylation par la méthode proposée par Meyer et collaborateurs.

L'action conjointe de la soude et de l'éthanedithiol engendre donc des réactions d'addition non spécifiques et peut conduire à la surestimation du nombre de sites de glycosylation dans le cas d'un glycopeptide de structure totalement inconnue.

4.4/ En résumé...

Les rendements de déglycosylation des espèces O-glycopeptidiques à N-AcétylGalactosamine sont cinq fois plus faibles que ceux obtenus avec des glycopeptides à O-GlcNAc (*Greis KD, et al 1996*). De par l'encombrement stérique du groupement, une structure de type GalNAc-O-Thréonine est beaucoup plus difficilement déglycosylable que son homologue lié à une sérine.

La séquence en acides aminés du glycopeptide d'intérêt est aussi sujet de toutes les attentions : une prévalence importante de résidus de proline peut conférer au glycopeptide une conformation repliée « stabilisante » (comme présenté ci-dessus) rendant ainsi le travail de déglycosylation délicat.

Les glycopeptides de notre étude regroupent toutes ces difficultés puisque dotés de structures de type O-GalNAc associées à des résidus de thréonine.

De plus, certains de ces modèles ont leur(s) motif(s) oligosaccharidique(s) lié(s) à une thréonine voisine d'un résidu de proline.

Ces composés difficilement déglycosylables sont toutefois β -éliminés par l'action conjointe de la soude et de l'éthanethiol comme le démontrent les résultats décrits dans ce chapitre. Le protocole de β -élimination selon Meyer et collaborateurs initialement développé pour les sites de phosphorylation s'applique donc aisément au marquage des sites de O-glycosylation. **Cependant, la méthode proposée reste limitée et délicate puisque responsable de phénomène de déshydratation (perte de groupements H₂O se matérialisant sur les spectres par des -18).**

En outre, il convient de retenir avec attention que **la méthode proposée par Meyer et collaborateurs n'est ni spécifique** (puisque pouvant s'appliquer sans distinctions à des sites de phosphorylation et/ou à des sites de O-glycosylation), **ni qualitative** (puisque conduisant à des phénomènes d'addition surnuméraires de groupements EtS- (+44 sur les spectres))

D'une orientation « technologique », **l'utilisation de la soude à de telle concentration finale dans le milieu réactionnel oblige à des étapes de dessalage par micro-purifications** pour se montrer totalement compatible à la spectrométrie de masse.

La méthode s'avère donc difficilement associable à l'analyse considérée, **incompatible avec l'estimation du nombre précis de sites de glycosylation et leur localisation dans le cas d'un échantillon parfaitement inconnu** et ne convient pas à l'analyste désireux de s'appuyer sur une approche qualitative.

De ce fait, il convient de considérer le pouvoir déglycosylant de la soude avec précaution, l'utilisation de cette base minérale dans une stratégie de β -élimination laissant entrevoir certaines incompatibilités.

Plus souples dans leurs utilisations (volatilité plus importante...) et présentant un caractère nucléophile suffisant, **les bases organiques aminées de type éthyl ou méthylamine semblent donc plus adaptées** à la β -élimination douce des O-glycopeptides (*Hanisch FG et al, 2001*). Les modifications chimiques résultant de l'utilisation de ces composés sur des substrats glycopeptidiques sont variables en fonction de la substitution, stables dans les conditions d'analyse MS-MS / PSD-MS et aisément détectables pendant le séquençage. L'alkylation rend le peptide

modifié plus basique et facilite l'ionisation positive de l'ensemble en introduisant un site de protonation supplémentaire au niveau du groupement aminé fixé.

Il nous paraît fort logique d'évaluer le pouvoir « β -éliminant » de la méthylamine et de la diméthylamine sur nos O-glycopeptides. S'appuyant sur la spectrométrie de masse NANO-ESI pour la fragmentation et le séquençage de ces espèces aux acides aminés modifiés, **l'essentiel du travail présenté dans la suite de ce manuscrit tend à décrire toutes les aptitudes et avantages de ces réactifs dans une stratégie de β -élimination / marquage de sites de O-glycosylation.**

Chapitre 5 :

Dérivés Aminés et β -Elimination

Chapitre 5 : Dérivés Aminés et bêta-Elimination

5.1/ Evaluation de l'efficacité de la diméthylamine dans les réactions de β -élimination/ marquage des sites de glycosylation des O-glycopeptides

5.1.1/ Déglycosylation du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc)

Le glycopeptide de structure GTTPSPVP(GalNAc) est soumis comme précédemment (voir §4.2 : Evaluation de la méthode de Meyer...) à une réaction de déglycosylation. Cette réaction est conduite sur la nuit à 45°C et fait ici intervenir une solution de diméthylamine à 40% dans l'eau. **Dans ces conditions réactionnelles, la déglycosylation du glycopeptide d'intérêt n'aboutit pas** comme en témoigne la détection d'un intense signal à $m/z=958.7$ relatif au substrat glycopeptidique initial (ion $[MH]^+$). (Figure 5.1)

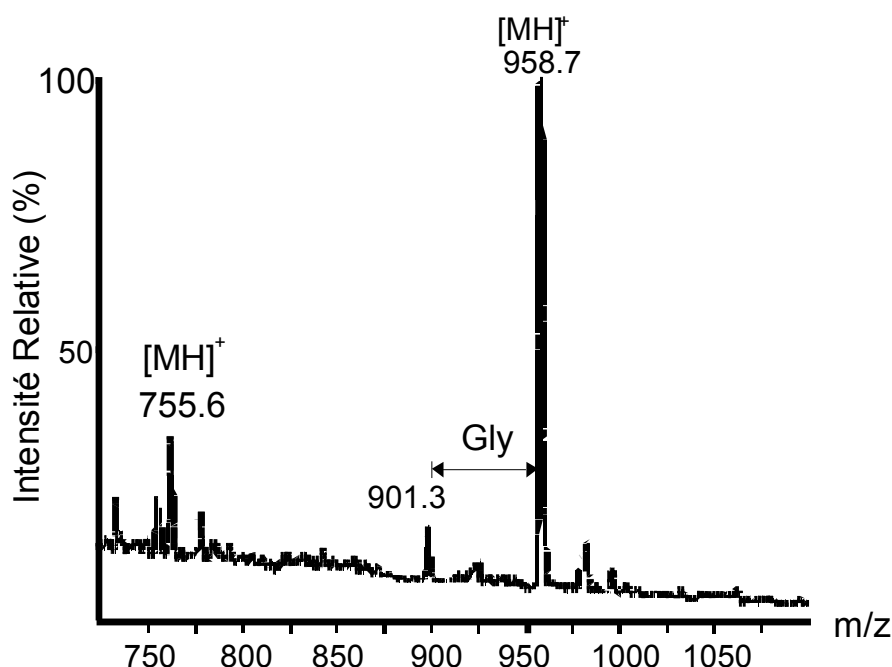


Figure 5.1 : Spectre NANO-ESI/MS du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc) après déglycosylation sur la nuit à 45°C par une solution de diméthylamine à 40% dans l'eau.

5.1.2/ Déglycosylation par la diméthylamine des glycopeptides de séquence TTSTTSAP(GalNAc) et TTSAPTTTS(GalNAc) : obtention de peptides diméthylamino modifiés

Les étapes de déglycosylation des composés de séquences TTSTTSAP(GalNAc) et TTSAPTTTS(GalNAc) sont réalisées selon le même protocole avancé pour l'exemple précédent.

Après une nuit de réaction, le signal relatif au glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) de masse initiale 968 disparaît totalement du spectre de contrôle au profit de l'espèce β -éliminée suivie de l'addition de la diméthylamine à $m/z=792$ ($764+1+27$) (spectre non fourni). De la même façon, le glycopeptide TTSAPTTTS(GalNAc) de masse relative 990 $[MNa]^+$ est totalement déglycosylé. En témoigne le spectre MALDI obtenu après traitement chimique, caractérisé par la présence de 2 signaux à $m/z=787$ et $m/z=814$. Ces signaux correspondent respectivement au peptide natif $[MNa]^+$ et au glycopeptide déglycosylé $[MNa+27]^+$.

(Figure 5.2)

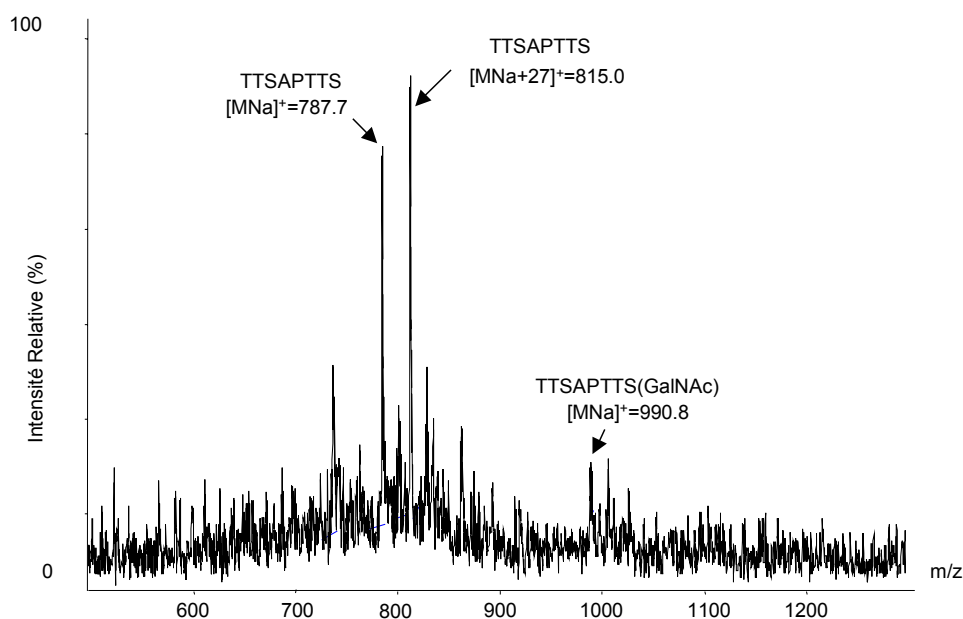


Figure 5.2 : Spectre MALDI-MS du composé TTSAPTTTS(Me₂N-) après déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide TTSAPTTTS(GalNAc).

Analyse NANO-ESI/MS-MS du composé TTSTTSAP(Me₂N-)

L'étude de fragmentation du composé TTSTTSAP(Me₂N-) de masse relative 792 [MH]⁺ est réalisée à un potentiel de cône de 55Volts et à 28eV d'énergie de collision. Le spectre obtenu montre essentiellement des ions b_n incrémentés de 27uma (b₅ à m/z=519.5, b₆-18 à m/z=588.6 et b₇ à m/z=677.7 avec b₇ très intense en raison de la proximité de la proline). En outre, il permet d'affirmer que l'incrément de masse dû à l'incorporation du radical Me₂N- (+27) se situe dans la zone TTSTT (présence du fragment b₅) mais n'autorise aucunement la localisation précise de l'acide aminé chimiquement modifié. (**Figure 5.3**)

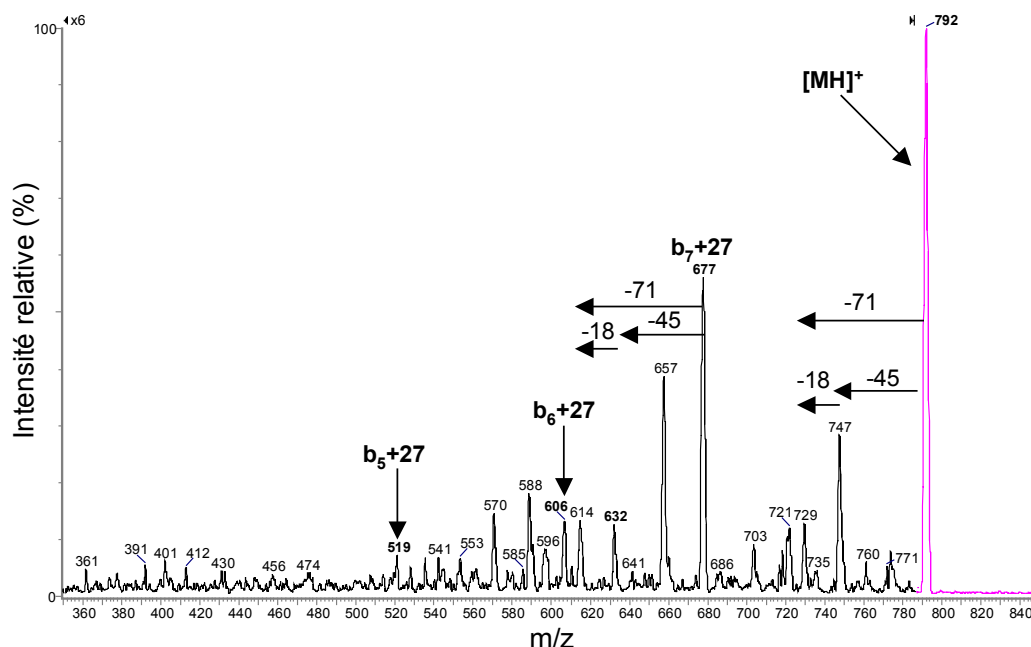


Figure 5.3 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé [MH]⁺=792 de l'espèce TTSTTSAP(Me₂N-) après déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc). (Energie de collision=28eV)

Analyse NANO-ESI/MS-MS du composé TTSAPTTT (Me₂N-)

Les propriétés volatiles de la diméthylamine (et des dérivés aminés...) permettent d'éviter les étapes de purifications. La déglycosylation du glycopeptide TTSAPTTT (Me₂N-) peut donc être suivie par une analyse NANO-ESI/MS directement sur le mélange réactionnel. Malgré la détection d'un signal en 968 relatif au glycopeptide de départ (montrant une déglycosylation partielle), un signal intense

en 792 montre l'espèce déglycosylée attendue (+27uma par incorporation d'un radical Me_2N -). L'acquisition réalisée à un potentiel de cône élevé (#60Volts) engendre la détection en source des ions fragments y_5 et y_6 à 475.8 et 563.1 (tous deux porteurs d'un groupe Me_2N - puisque qu'incrémenté de 27uma). (**Figure 5.4**)

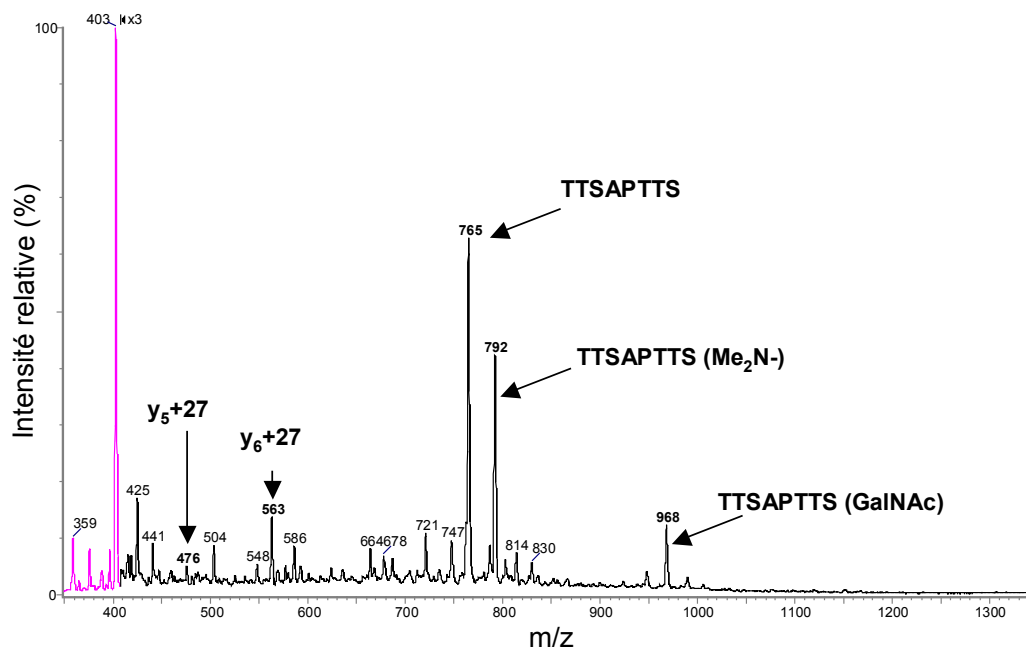


Figure 5.4 : Spectre Nanospray MS de l'espèce TTSAPTTS(Me_2N -) après déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide TTSAPTTS (GalNAc).

Les spectres de fragmentation du précurseur $m/z=702$ réalisés à un potentiel de 25 et 35 eV pour la cellule de collision mettent en évidence un signal intense de basse masse à $m/z=72$ correspondant à la formation de l'immonium $\text{Me}_2\text{N}^+\text{CHMe}$ ainsi que les ruptures internes à $m/z=199$ (fragment PT) et $m/z=300$ (fragment PTT). Il faut aussi noter la présence d'ions résultant de la perte de fragments Me_2NH et/ou $\text{CH}_2=\text{CHNMe}_2$, respectivement détectés à $m/z=747.1$ et $m/z=721$. La présence des trois fragments de type y_n non modifiés (y_4 à y_6 respectivement à $m/z=405.4$, $m/z=476.5$ et à $m/z=563.6$ avec y_4 très intense dû à la présence de la proline) nous autorise enfin à « restreindre » la localisation potentielle de l'acide aminé chimiquement modifié à la thréonine 1 ou à la thréonine 2 de la séquence. (**Figure 5.5a**)

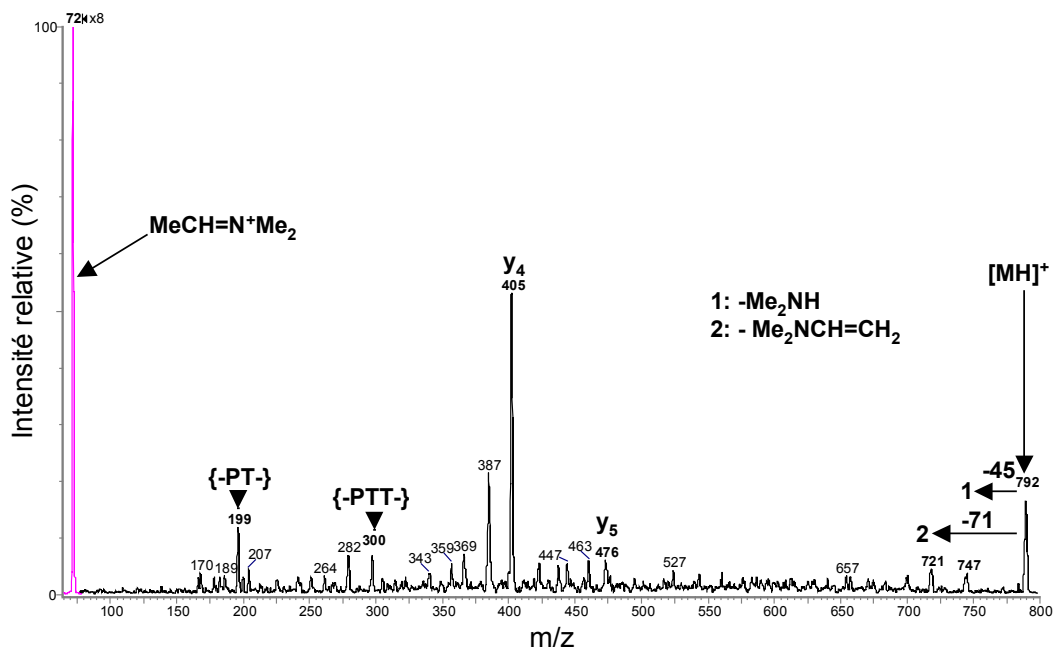


Figure 5.5a

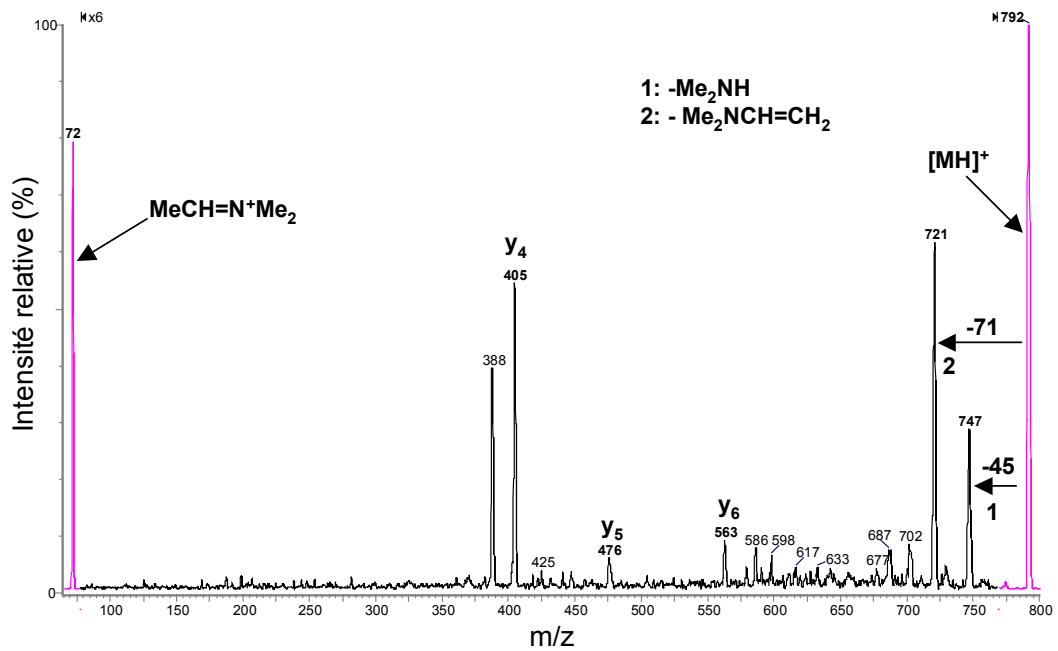


Figure 5.5b

Figure 5.5 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé [MH]⁺=792 de l'espèce TTSAPPTS(Me₂N-) après déglycosylation du glycopeptide TTSAPPTS(GalNAc) par la diméthylamine.

a : Energie de collision=25eV. / b : Energie de collision=35eV.

L'utilisation de dérivés aminés de type diméthylamine sur des O-glycopeptides permet la déglycosylation de ces structures. Cette chimie de β -élimination / addition est compatible avec l'analyse NANO-ESI / MS-MS. **En revanche, l'obtention d'ions b_n dans un cas et y_n dans l'autre indique une fragmentation bilatérale et engendre des spectres de fragmentation peu informatifs** de ces précurseurs modifiés.

Dans tous les cas, l'analyse CID MS-MS conduit à la formation de signaux relatifs à la perte de « l'étiquette » diméthylamine par l'immonium $\text{Me}_2\text{N}^+=\text{CHMe}$ ou par la perte de neutres de type amine (Me_2NH) ou énamine ($\text{Me}_2\text{NCH}=\text{CH}_2$).

5.2/ Action conjointe de la méthylamine et de la diméthylamine : Déglycosylation de longs glycopeptides de séquence GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)

Séquençage NANO-ESI/MS-MS des composés
GTPSPVPTTSTTSAP(MeNH -) et GTPSPVPTTSTTSAP(Me_2N -)

La déglycosylation par la méthylamine du composé de structure GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc) conduit à l'obtention d'un composé de masse moléculaire 1514 (1704-203+13). La fragmentation du précurseur dichargé de cette même espèce à $m/z=758.3$ donne un spectre informatif caractérisé par une région de basse masse complexe (liée à la séquence) et composé majoritairement en haute masse d'une série complète d'ions y_n de y_9 à y_{15} . Cette série d'ions incrémentés de 13uma (et surtout la présence de l'ion y_9+13 à $m/z=875.4$) nous permet uniquement de localiser l'acide aminé modifié sur la partie N-terminale PTT- du squelette peptidique. (**Figure 5.6**)

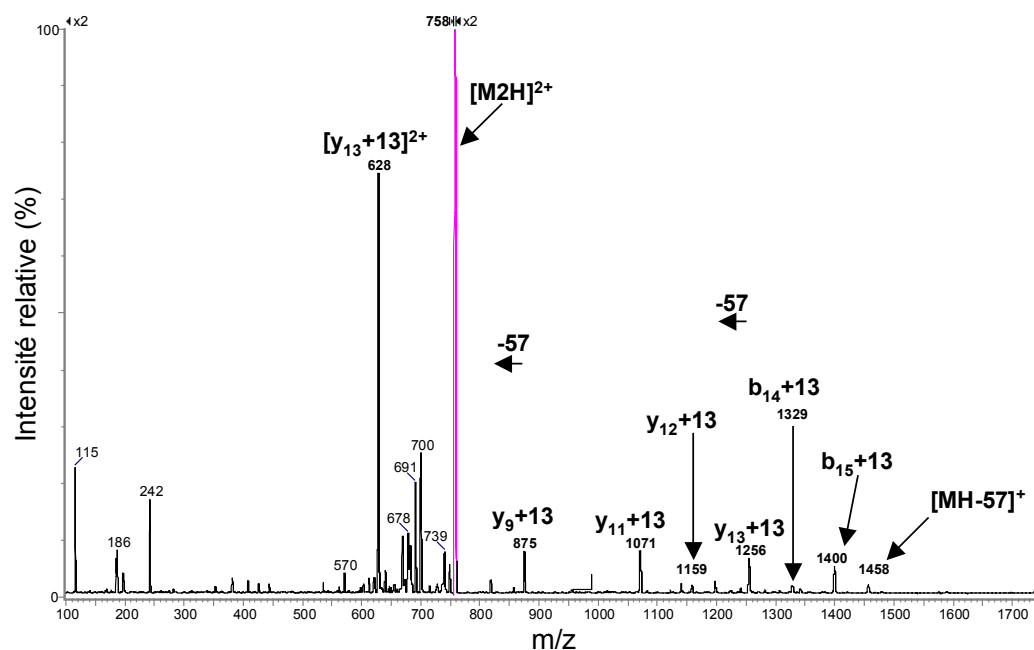


Figure 5.6 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[M2H]^{2+}=758.3$ de l'espèce GTTPSPVPTTSTTSAP(MeNH-) (déglycosylation par la méthylamine du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)).

La déglycosylation de ce même glycopeptide par la diméthylamine conduit à l'obtention d'un composé de masse moyenne 1528.6 ($1704-203+27$). L'analyse collisionnelle du précurseur dichargé de cette même espèce à $m/z=765.3$ reconstitue un signal très intense à $m/z=1458.6$ (ion $[MH-71]^+$) et permet d'obtenir la même série d'ions y_n+27 (avec détection de l'ion y_9+27 à $m/z=889.4$) ; ce résultat permettant de confirmer les données préalablement obtenues. (**Figure 5.7**)

Il faut enfin noter sur ce spectre la détection d'intenses signaux y_n-71 provenant de la perte de groupements de type $Me_2NCH=CH_2$ et caractéristiques du départ de la chaîne latérale de l'acide aminé alkylamino-modifié dans son entièreté.

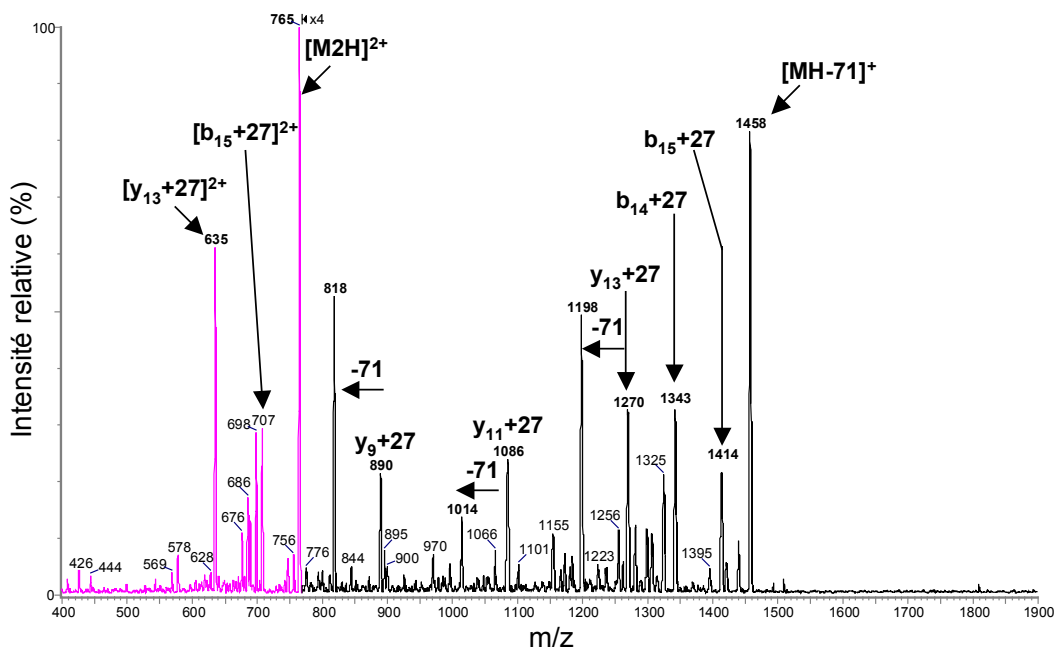


Figure 5.7 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[M2H]^{2+}=765$ de l'espèce GTTPSPVPTTSTTSAP(Me_2N-) (déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)).

L'association de la β -élimination par les dérivés aminés au séquençage par NANO-ESI/MS-MS n'aboutit pas, dans le cas de long squelette peptidique (ici 16 acides aminés), à la localisation définitive de l'acide aminé chimiquement modifié correspondant au site de glycosylation.

La β -élimination utilisant la diméthylamine fait naître des signaux consécutifs à la perte de neutres $Me_2NCH=CH_2$ et l'immonium $Me_2N^+=CHMe$ et complique donc le travail de séquençage de par la présence d'ions fragments eux-aussi modifiés.

5.3/ Déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide de séquence GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂

5.3.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂

La déglycosylation par la diméthylamine de l'espèce glycopeptidique GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ est menée durant 16 heures à une température réactionnelle de 45°C. Dans ces conditions, la réaction est incomplète et aboutie à la

formation d'une espèce partiellement déglycosylée comme en témoigne le signal détecté sur le spectre MALDI-MS de contrôle à $m/z=1731.8$ (correspondant à l'espèce $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{GalNAc})(\text{Me}_2\text{N}-)$). (**Figure 5.8**)

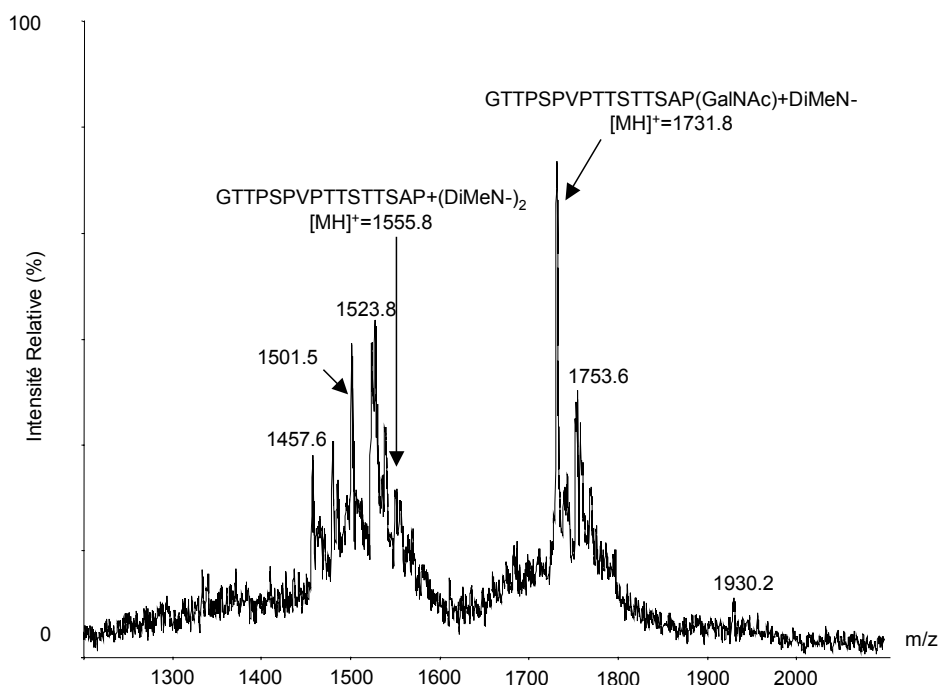


Figure 5.8 : Spectre MALDI-MS des composés $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N}-)_2$ et $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N}-)(\text{GalNAc})$ après déglycosylation par la diméthylamine du glycopeptide $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{GalNAc})_2$.

La déglycosylation d'une structure complexe de type $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{GalNAc})_2$ par l'action unique de la diméthylamine n'est pas réalisable.

5.3.2/ Séquençage du composé $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N}-)(\text{GalNAc})$

L'analyse par spectrométrie de masse en tandem réalisée sur le précurseur doublement chargé à $m/z=866$ $((1501+203+27+1)/2)$ de l'espèce partiellement déglycosylée $\text{GTPSPVPTTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N}-)(\text{GalNAc})$ donne un spectre peu informatif caractérisé par la détection en basse masse de deux signaux à $m/z=72$ et $m/z=204$ correspondant respectivement à l'immonium $\text{MeCH}=\text{N}^+\text{Me}_2$ (voir ci-dessus) et à l'ion oxonium caractéristique des N-acétyl Hexosamines. De plus, le spectre

reconstitue un signal de plus forte intensité à $m/z=764.5$ correspondant à l'ion peptidique dichargé porteur d'un groupe Me_2N^- ($1501+27$) et un doublet d'ions en 1528 / 1456 (respectivement l'ion peptidique monochargé porteur d'un radical Me_2N^- et ce même ion après perte d'un fragment de 71uma). Des ions fragments C- et N-terminaux sont aussi détectés sur ce spectre : b_3-18 ($m/z=241.7$), y_9 , y_{11} et y_{13} ($m/z=888.8$, 1084.9 et 1268.9) (spectre non fourni).

5.4/ En résumé...Evaluation de l'efficacité des dérivés aminés dans les réactions de β -élimination / marquage des sites de glycosylation des O-glycopeptides

Les dérivés mono et diméthylaminés peuvent être utiliser pour la déglycosylation de structures O-glycopeptidiques. Pour les glycopeptides les plus simples, squelette peptidique court ou site unique de glycosylation, les rendements de déglycosylation sont proches des 100%. En revanche, cette chimie de β -élimination n'est pas suffisante à la déglycosylation totale des glycopeptides complexes (plusieurs sites de glycosylation...).

Les dérivés aminés de ce type présentent aussi une compatibilité évidente à l'analyse NANO-ESI/MS-MS mais l'introduction d'un site basique supplémentaire sur la structure peptidique (pouvant être considéré comme un site de protonation préférentiel) suite à la β -élimination / addition **conduit** :

1=> à l'obtention de précurseurs dichargés.

2=> à l'obtention d'ions b_n et y_n , témoins d'une fragmentation bilatérale.

Par ce phénomène, les spectres de fragmentation de ces précurseurs modifiés sont peu informatifs et le travail de séquençage (dans l'optique de localiser le(s) site(s) de glycosylation) reste délicat.

3=> à la formation de signaux relatifs à la perte de « l'étiquette » méthylamine / diméthylamine.

Les spectres montrent des fragments immoniums $\text{Me}_2\text{N}^+=\text{CHMe}$ ou des fragments résultant de la perte de neutres de type amine (Me_2NH) ou énamine ($\text{Me}_2\text{NCH}=\text{CH}_2$ ou $\text{CH}_2=\text{CH-NH-Me}$) (protonation préférentielle du groupe alkylamine introduit surtout dans la cas de l'analyse MS-MS des précurseurs dichargés).

Aussi, devant les difficultés rencontrées pendant le travail de séquençage, **le protocole présenté n'autorise pas de manière précise à conclure sur la localisation du(des) site(s) de glycosylation** (notion fortement dépendante de l'enchaînement en acides aminés)

Il semblerait fort avantageux de pouvoir disposer de précurseurs à processus de fragmentation favorisée/orientée. Dans ce but, nous nous proposons dans la suite de ce travail d'explorer l'intérêt de la dérivation à charge permanente dans le travail de séquençage et d'adapter cette dernière, le cas échéant, au peptides chimiquement modifiés qui nous intéressent.

Les techniques de dérivation à charge permanente sont utilisées depuis longtemps pour accroître les capacités d'ionisation de composés difficilement ionisables et pour orienter la fragmentation d'espèces peptidiques afin de faciliter le travail d'analyse des études de spectrométrie de masse en tandem. Après avoir pris connaissance des différents réactifs utilisables (*Roth KDW et al, 1998*) dans ce domaine, nous avons arrêté notre choix sur l'ester N-hydroxysuccinimidylique de l'acide tris[(2, 4, 6 triméthoxyphényl) phosphonium] acétique.

Ce réactif, dont l'utilisation première est à mettre au crédit de Huang et collaborateurs (*Huang ZH et al, 1999*), possède des avantages en terme de sensibilité, de sélectivité et de rendement de couplage. (voir matériels et méthodes). En outre, il permet lors d'événements de fragmentation de basse énergie (ESI-CID/MS-MS ou PSD-MS) de générer préférentiellement des ions à charge fixe de type $*a_n$ ou $*b_n$ (en fonction de l'état de charge du précurseur sélectionné)(voir nomenclature en A₃).

La synthèse de ce réactif est réalisée par nos soins (voir matériels et méthodes).

Le contrôle de synthèse du réactif de dérivation N-terminale est réalisé par analyse en spectrométrie de masse MALDI-MS et montre un ion intense à $m/z=688$. (**Figure 5.8**)

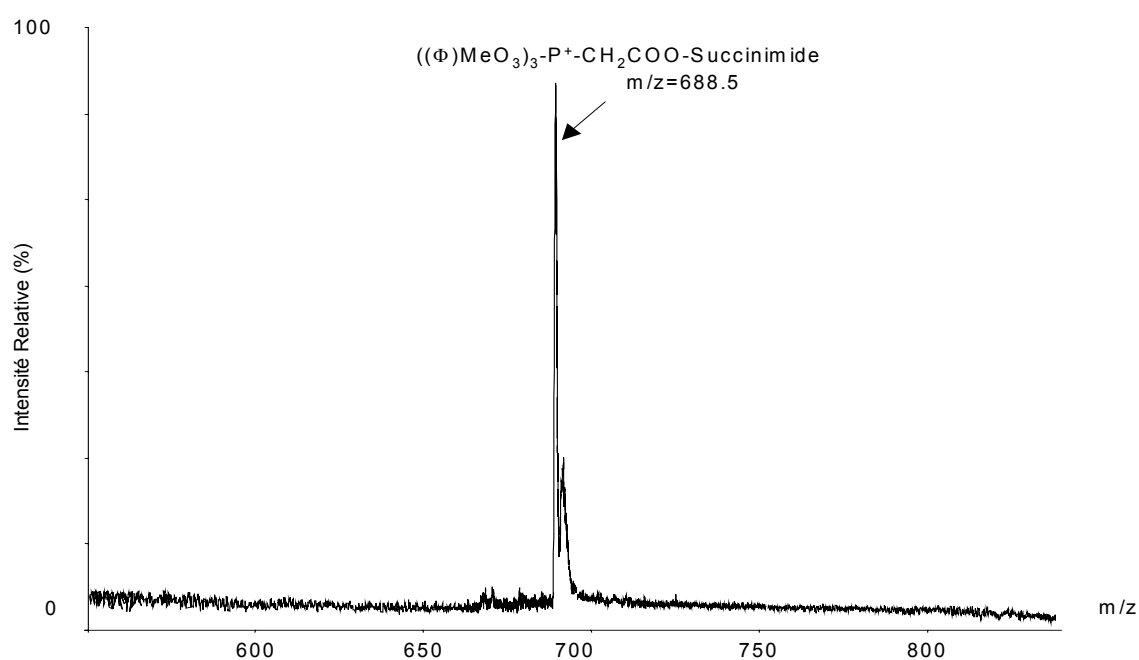


Figure 5.9: Synthèse de l'ester N-hydroxysuccinimidique de l'acide tris[2, 4, 6 triméthoxyphényl] phosphonium] acétique. Spectre MALDI-MS de contrôle.

Le réactif est ensuite placé en solution dans un mélange ACN/eau (2/8) à une concentration de 1 ou 10mM et permet la dérivation N-terminale sélective des composés glycopeptidiques à analyser.

5.5/ Dérivation N-terminale des composés TTSTTSAP(Me₂N-) et TTSAPTTs(Me₂N-)

La dérivation N-terminale par l'ester tris(2, 4, 6-triméthoxyphényl)phosphonium acétique de N-hydroxysuccinimide des espèces déglycosylées par la diméthylamine peut orienter la fragmentation de ces composés, générer des ions informatifs et ainsi faciliter la localisation du(des) site(s) de glycosylation.

Le spectre du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}$, l'espèce $[\text{CH}]^{2+}$ représente ici le glycopeptide déglycosylé porteur d'une charge permanente en N-terminal (forme cationique $[\text{C}]^+$) et d'une deuxième charge mobile matérialisée par un proton, à $m/z=682.5$ du glycopeptide déglycosylé $\text{P}^+\text{-TTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N-})$ est effectué à 20eV d'énergie de collision. Des fragments y_n de y_1 à y_3 respectivement à $m/z=116.1$,

$m/z=187.2$ et $m/z=274.3$ sont principalement détectés en basse masse indiquant que l'acide aminé modifié par la fixation du radical Me_2N - n'est pas la serine C-terminale de la séquence. Des couples d'ions $^*a_n/^*b_n$ de $^*a_1/^*b_1$ à $^*a_7/^*b_7$ apparaissent sur le spectre sans interruption mais avec un déficit à partir de b_5 inclus permettant de considérer avec certitude (détection de l'ion $^*b_{5-71}$ à $m/z=1019.4$) la thréonine#5 (ici marqué G comme glycine dans la séquence, consécutivement à la perte de 71) comme l'acide aminé modifié, donc l'acide aminé porteur du glycanne avant déglycosylation. La présence de l'ion immonium $\text{Me}_2\text{N}^+=\text{CHMe}$ et la perte importante de $\text{CH}_2=\text{CHNMe}_2$ est remarqué sur ce spectre par la présence des ions à $m/z=72$ et $[\text{C}-71]^+$. (**Figure 5.10**)

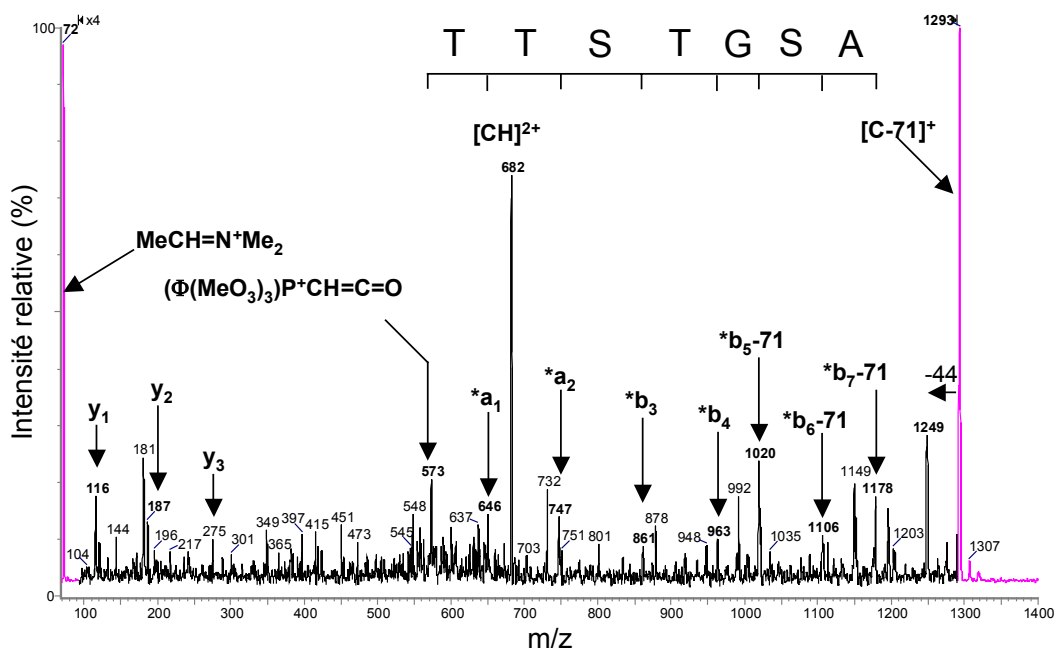


Figure 5.10 : Spectre Nanospray/MS-MS du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+} = 682$ de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N-})$ (déglycosylation puis dérivation N-terminale du glycopeptide $\text{TTSTTSAP}(\text{GalNAc})$).

Le spectre du précurseur dichargé à $m/z=682.5$ du glycopeptide déglycosylé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSTTSAP}(\text{Me}_2\text{N-})$ met en évidence un fragment de basse masse relatif au composé de dérivation N-terminale à $m/z=572.9$ ($\Phi(\text{MeO}_3)_3\text{P}^+\text{-CH=C=O}$). Il montre de même 2 séries ininterrompue d'ions *a_n et *b_n de 1 à 7 avec un déficit à partir de $^*a_2/^*b_2$ inclus dû à la perte de la chaîne latérale démontrant le greffage du glycanne sur le deuxième résidu de thréonine de la séquence. (**Figure 5.11**)

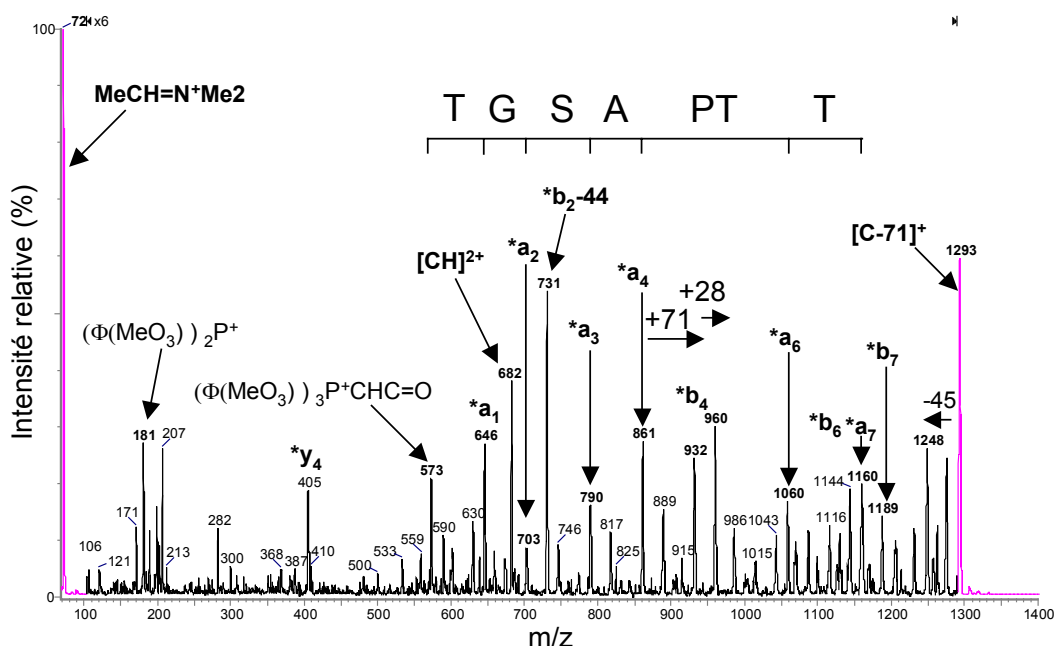


Figure 5.11 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=682$ de l'espèce $TMPP^+-Ac-TTSAPPTS (Me_2N-)$ (déglycosylation + dérivation N-terminale du glycopeptide TTSAPPTS(GalNAc)).

L'association de la déglycosylation par la diméthylamine et de la dérivation N-terminale par l'ester tris(2, 4, 6-triméthoxyphényl)phosphonium acétique de N-hydroxysuccinimide ($TMPP-AcOSu$) facilite la localisation des sites de glycosylation de O-glycopeptides. Cependant, le passage de la thréonine en acide 2-amino-3-diméthylamino butyrique se traduit par une grande labilité de la chaîne latérale et les spectres MS/MS des O-glycopeptides modifiés par la diméthylamine montrent une glycine (G) au niveau de l'acide aminé porteur du glycanne et présente le marqueur $m/z=72$ résultant de la formation de l'immonium ($Me_2N^+=CHMe$).

Nous remarquerons enfin que cette fragmentation préférentielle, qui se matérialise par le départ de 71, peut aussi être considéré comme un inconvénient majeur dans le cas d'un glycopeptide de structure totalement inconnue.

5.6/ Régiosélectivité de la dérivation N-terminale :

**dérivation des espèces déglycosylées GTTPSPVPTTSTTSAP(MeNH-)
et GTTPSPVPTTSTTSAP (Me₂N-)**

La dérivation N-terminale représente une aide précieuse dans le travail de séquençage à fortiori pour les glycopeptides les plus longs. La fragmentation de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(MeNH-)}$ (déglycosylation par la monométhylamine et dérivation N-terminale) sous la forme du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}$ à $m/z=1044.3$ permet la détection des ions $*a_7/*b_7$ très intense. Contrairement aux données de la littérature (prévoyant principalement l'obtention d'ions $*a_n$, $*b_n$ ou $*c_n$ par utilisation de ces dérivants amino-terminaux), le spectre donne en haute masse accès à série d'ions $*y_n$ de $*y_9$ à $*y_{12}$ incrémentée de 13uma (**Figure 5.13**). Cette série d'ions pourrait en toute logique permettre de détecter l'acide aminé modifié chimiquement et par la même aboutir à la localisation du site de glycosylation. Cependant, l'analyse spectrale révèle un incrément de masse de 573uma sur toute cette série d'ions $*y_n$. Ceci résulte de l'addition non spécifique du réactif de dérivation N-terminale sur l'acide aminé modifié porteur d'un MeNH-. Il y a donc réaction de compétition entre l'extrémité N-terminale du glycopeptide déglycosylé et le groupement méthylamine de l'acide aminé qui portait le glycanne. (**Figure 5.12**)

Le précurseur à $m/z=1044$ peut donc être une espèce composite et toutes interprétations concernant la localisation du site de glycosylation à partir de ce spectre n'est pas recevable.

La dérivation sélective du groupement NH_2 amino-terminal ($\text{pKa}=8$) vis à vis des groupements $\epsilon\text{-NH}_2$ des radicaux de lysine ($\text{pKa}=10.5$) est primordiale pour le séquençage peptidique. Il a été ainsi démontré qu'une maîtrise précise du pH du milieu réactionnel pouvait garantir une telle spécificité de couplage (**Wetzel R et al, 1990**), (**Stults JT et al, 1993**). Le TMPP-AcOSu ici utilisé pour la dérivation N-terminale possède une régiosélectivité amino-terminale de 95% à $\text{pH}=8.2$ (**Huang ZH et al, 1999**).

Dans notre cas, nous avons recours à la méthylamine pour déglycosyler et substituer le site de glycosylation. **L'introduction d'un groupe MeNH- suffit à perturber la régiosélectivité du dérivant TMPP-AcOSu. L'amine secondaire**

formée entre en compétition avec l'extrémité N-terminale du glycopeptide déglycosylé et provoque en plus la formation, pendant la fragmentation, d'ions $*y_n$ porteurs du phosphonium.

La méthylamine bien qu'utilisable dans le cadre de la déglycosylation seule, sera abandonnée dans la suite de ce travail en raison d'un schéma de fragmentation complexe expliqué par la compétitivité de la réaction amenant une charge permanente sur le peptide (TMPP-AcOSu).

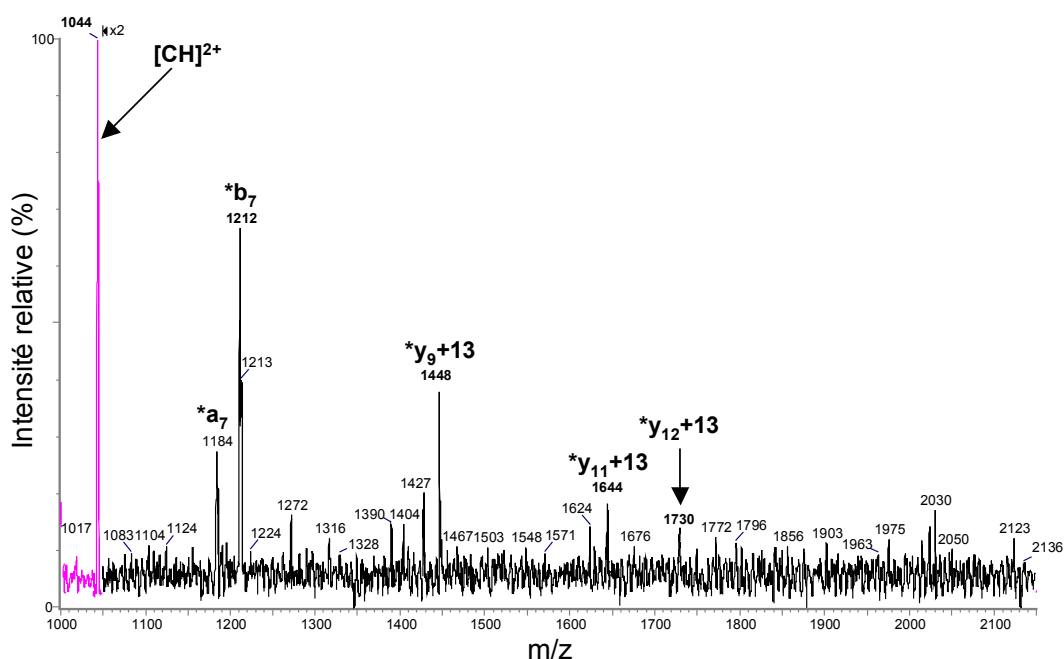


Figure 5.13 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=1044$ de l'espèce $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP$ (MeNH-) (déglycosylation par la méthylamine puis dérivation N-terminale du glycopeptide $GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)$).

La fragmentation du précurseur dichargé $[CH]^{2+}$ à $m/z=1051$ correspondant au glycopeptidique déglycosylé sous forme $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(Me2N-)$ donne un spectre MS-MS beaucoup plus informatif (*voir ci-dessus*) : la zone de basse masse est dominée par un signal intense à $m/z=404.5$ que l'on peut attribuer au fragment y_5-71 . Un couple d'ions fragments est détecté en 1185/1213 et correspond au couple $*a_7/*b_7$ dans la zone de haute masse, une série ininterrompue d'ions

*b_n-71 (de *b₉-71 à *b₁₅-71) permet de conclure quant à la localisation du site de glycosylation sur la thréonine 9. Enfin, le spectre reconstitue principalement l'ion moléculaire [C-71]⁺ à m/z=2029. (**Figure 5.14**)

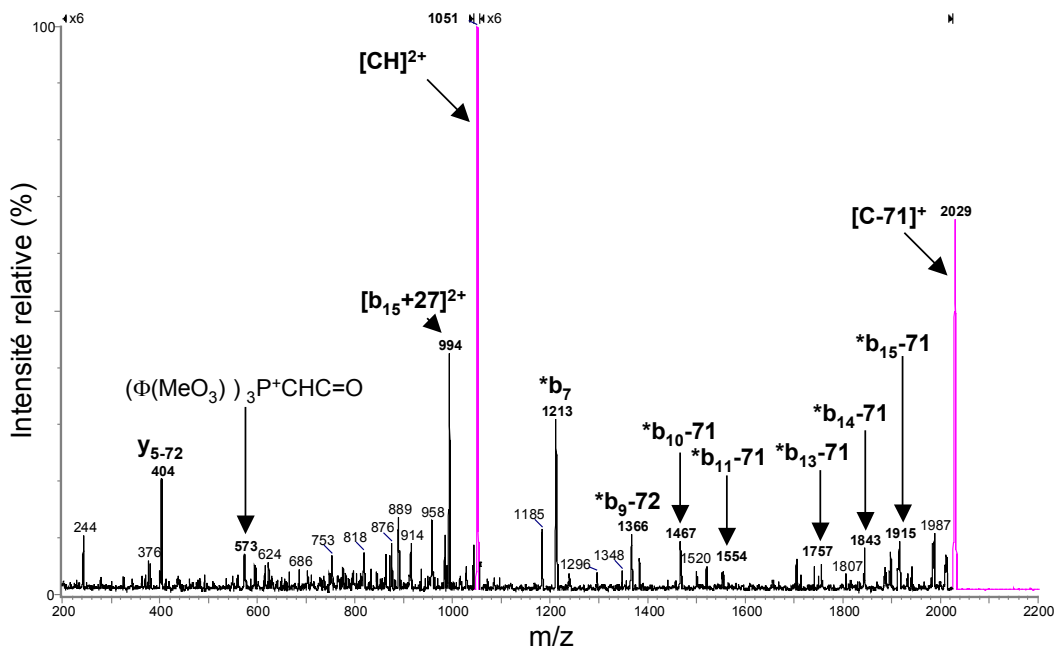


Figure 5.14 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé [CH]²⁺=1051 de l'espèce **TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP (Me₂N-)** (déglycosylation par la diméthylamine puis dérivation N-terminale du glycopeptide **GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)**).

Malgré l'obtention de signaux consécutifs à la perte d'énamine (T=>G), (*b_n-71), l'association de la β-élimination par la diméthylamine à la dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu aboutit par séquençage NANO-ESI/MS-MS à la localisation précise de l'acide aminé chimiquement modifié correspondant au site de glycosylation.

5.7/ Dérivation N-terminale de l'espèce partiellement déglycosylées **GTTPSPVPTTSTTSAP(Me₂N-)(GalNAc)**

La fragmentation de l'espèce dichargée correspondant au glycopeptide partiellement déglycosylé **TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(Me₂N-)(GalNAc)** (à m/z=1152) peut être étudiée à un potentiel de cône de 55Volts et à 25 eV de cellule

de collision. (spectres non fournis). Le spectre MS-MS montre principalement en basse masse la perte de la structure glycanique par la détection du fragment oxonium caractéristique à $m/z=204$. En haute masse, des ions fragments de série $*b_n$ sont essentiellement détectés avec notamment la présence des ions peptidiques $*b_7$ à $m/z=1213$, $*b_9$ à $m/z=1411$ et $*b_{13-71}$ à $m/z=1756$, cette dernière espèce permettant de conclure sur la localisation du motif aminé...

5.8/ En résumé...

La dérivation N-terminale du glycopeptide complexe GTTPSPVPTTSTTSAP(Me₂N-)(GalNAc) partiellement déglycosylé ne nous permet pas de localiser les deux sites de glycosylation de ce composé. Deux raisons principales peuvent expliquer cet échec : la longueur de la chaîne peptidique et la perte de la chaîne latérale de l'acide aminé modifié empêchent pour l'un des sites l'obtention d'un spectre clair de par la présence de séries ininterrompues d'ions informatifs. D'autre part, le caractère partiel de la déglycosylation menée par la diméthylamine laisse une structure glycanique de type N-Acétyl Galactosamine sur le squelette peptidique. La perte du sucre est inévitable dans ces conditions d'analyse (laissant un acide aminé non modifié) et strictement incompatible avec la localisation du deuxième site de glycosylation.

Quoi qu'il en soit, il résulte de cette étude que les dérivés mono et diméthylaminés sont nécessaires mais aucunement suffisants au marquage/localisation du(des) site(s) de glycosylation de O-glycopeptides.

Pour aboutir sans ambiguïté à la localisation précise du(des) dit site(s), la dérivation N-terminale utilisant un réactif à charge permanente représente un précieux partenaire. Cette dérivation s'avère cependant incompatible à une première étape de déglycosylation faisant intervenir la monométhylamine (réaction de compétition). **En outre, le séquençage MS-MS des structures peptidiques modifiées par cette voie fait naître, principalement à partir des précurseurs dichargés de type $[CH]^{2+}$ des signaux relatifs à la perte de l'étiquette aminée. Pouvant faire figure d'ions diagnostics dans une stratégie de « recherche d'ions parents », ces signaux peuvent pourtant représenter un inconvénient majeur pour le séquençage de glycopeptide de structure inconnue (voir la perte de 71 et le passage de T à G...).**

Le(s) groupe(s) aminé(s) fixé(s) de manière covalente sur le squelette peptidique peuvent engendrer, par le(s) site(s) basique(s) qu'il(s) apporte(nt), une fragmentation caractéristique du précurseur. Cet événement dissociatif se manifeste essentiellement par des ions traduisant la perte de la chaîne latérale de l'acide aminé « amino-modifié » dans son entièreté (détection de fragments y_n , $*b_n-71$ et $*b_n-57$, des ions $[C-71]^+$ et $[MH-71]^+$ et de l'immonium 72^+). Afin de simplifier les spectres MS-MS et d'éviter ces pertes, il conviendrait de recourir à d'autres agents nucléophiles pour l'étape d'addition.

Par l'expérience acquise dans l'utilisation de la soude et des bases aminées comme réactifs de β -élimination et à la vue des résultats générés par l'addition de groupements thiols ou amines sur nos structures glycopeptidiques d'intérêt, il nous est paru pertinent de développer une approche combinant au mieux les avantages des protocoles antérieurement estimés. Suite aux essais de nombreux réactifs, nous nous sommes arrêtés sur l'utilisation conjointe de diméthylamine (β -élimination) et d'éthanethiol ou propanethiol (addition) en milieu aqueux et isopropanol (miscibilité).

La méthode a permis de nous défaire de la majorité des structures glycopeptidiques étudiées et s'est avérée, en combinaison avec la dérivation N-terminale par l'ester tris-(2, 4, 6 triméthoxyphénylphosphonium) acétique de N-hydroxysuccinimide, efficace dans le séquençage des glycopeptides pour la localisation des sites de O-glycosylation associés.

Nous nous proposons très logiquement dans la suite de ce manuscrit d'en prouver toutes les potentialités.

Chapitre 6 :

β -Elimination et Dérivation N-terminale
pour l'Analyse des O-Glycopeptides

Chapitre 6 : β -Elimination et Dérivation N-terminale pour l'Analyse des O-Glycopeptides

6.1/ Etude structurale du composé TTSTTSAP(GalNAc)

6.1.1/ Déglycosylation du composé TTSTTSAP(GalNAc)

La déglycosylation de ce glycopeptide est réalisée dans le mélange composé de diméthylamine, d'éthanethiol et d'isopropanol pendant 6h à 45°C. Au bout de ce temps réactionnel, le glycopeptide initial de masse mesurée 968 (ion $[MH]^+$) est totalement déglycosylé comme en témoigne la **Figure 6.1** (détection majoritaire d'un ion à $m/z=809$ correspondant à l'espèce TTSTTSAP(EtS-) (ion $[MH]^+$)).

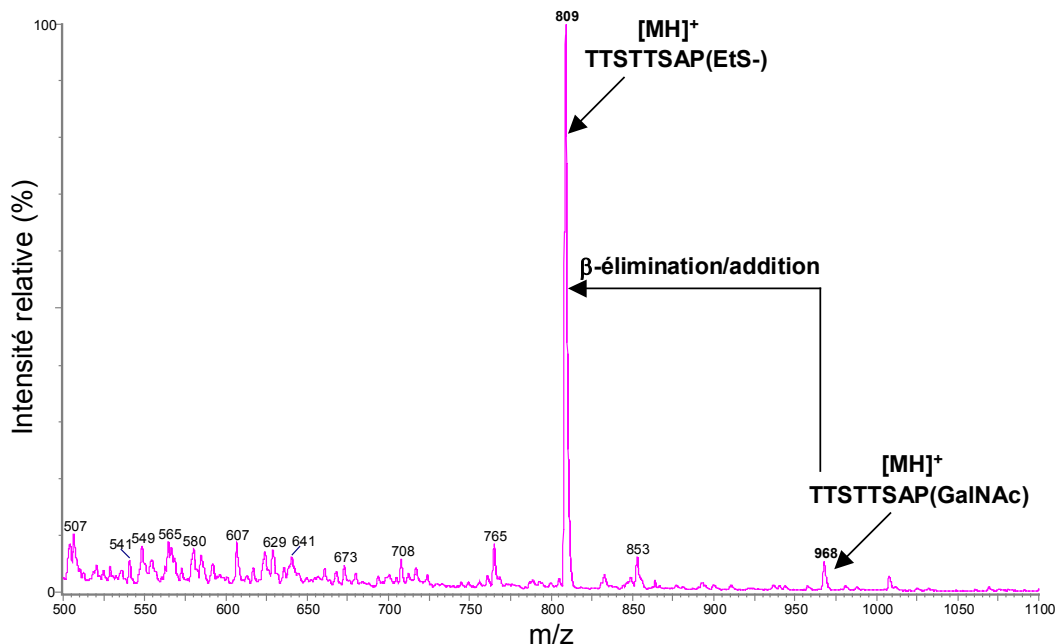


Figure 6.1: Spectre Nanospray-MS de l'espèce TTSTTSAP(EtS-) après déglycosylation du glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) par le mélange diméthylamine/éthanethiol/isopropanol .

6.1.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSTTSAP}(\text{EtS-})$

La fragmentation du précurseur dichargé de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSTTSAP}(\text{EtS-})$ à $m/z=691$ est effectuée à 20eV d'énergie de collision. Elle donne quelques ions $*a_n$ de $*a_4$ à $*a_7$ de faible intensité et montre essentiellement des ions fragments de série $*b_n$ de $*b_1$ à $*b_7$ sans 'blanc' dans la séquence. La différence de masse de 145uma constatée entre les ions $*b_4$ et $*b_5$ détectés à 964.0 et 1109.2 nous permet de conclure sans aucune ambiguïté sur la localisation du site de glycosylation au niveau de la thréonine 5 de la séquence. (**Figure 6.2**)

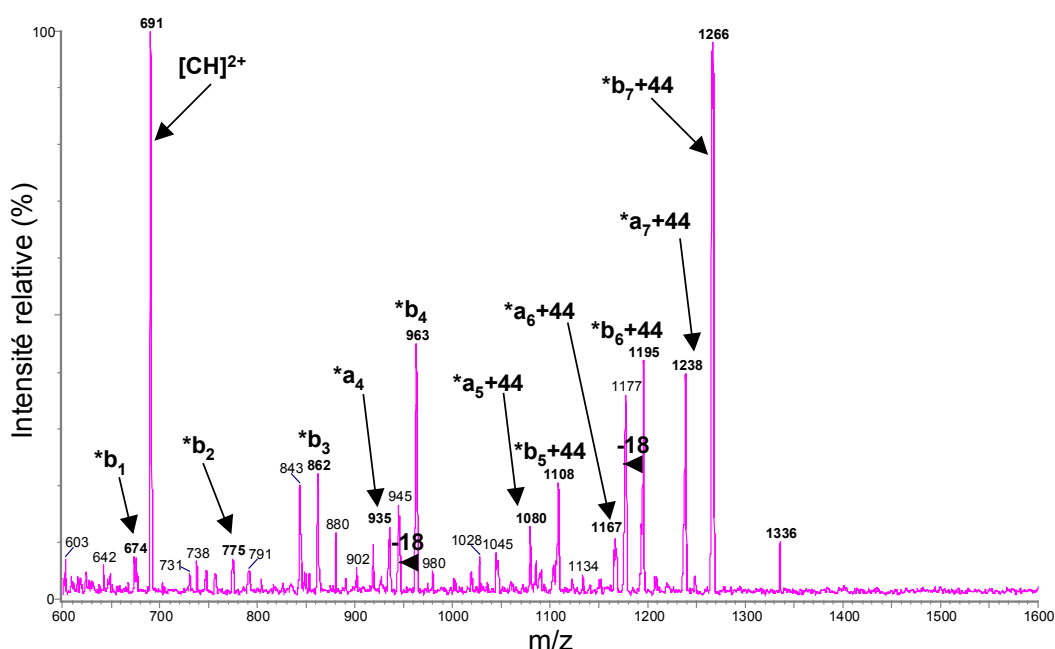


Figure 6.2: Spectre Nanospray/MS-MS du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}=691$ de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSTTSAP}(\text{EtS-})$ (déglycosylation + dérivation N-terminale du glycopeptide $\text{TTSTTSAP}(\text{GalNAc})$). (Energie de collision=20eV)

Une étude menée sur l'ion monochargé de ce même composé à $m/z=1381$ nécessite une augmentation de l'énergie collisionnelle, la fragmentation de cette espèce est obtenue à 35eV et montre une série ininterrompue d'ions $*a_n$ de $*a_1$ à $*a_8$ confirmant le résultat préalable (différence de masse calculée de 145uma entre les ions fragments $*a_4$ en 935.9 et $*a_5$ en 1081.2). (**Figure 6.3**)

Nous devons aussi remarquer sur le spectre la présence de signaux relatifs à la perte d'un groupe de 44uma. De par la série complète d'ions $*a_n-44$ et informé des descriptions faites précédemment dans la littérature à ce sujet, nous considérerons, sous réserve d'une confirmation (voir plus loin, action du propanethiol) cette perte de neutre comme résultant du départ d'une structure de type $\text{CH}_3\text{CH}=\text{O}$.

Il faut d'ores et déjà noter que la séquence du peptide, et surtout sa prévalence en acides aminés hydroxylés de type thréonine et sérine (6/8), favorise fortement la perte des chaînes latérales de ce genre.

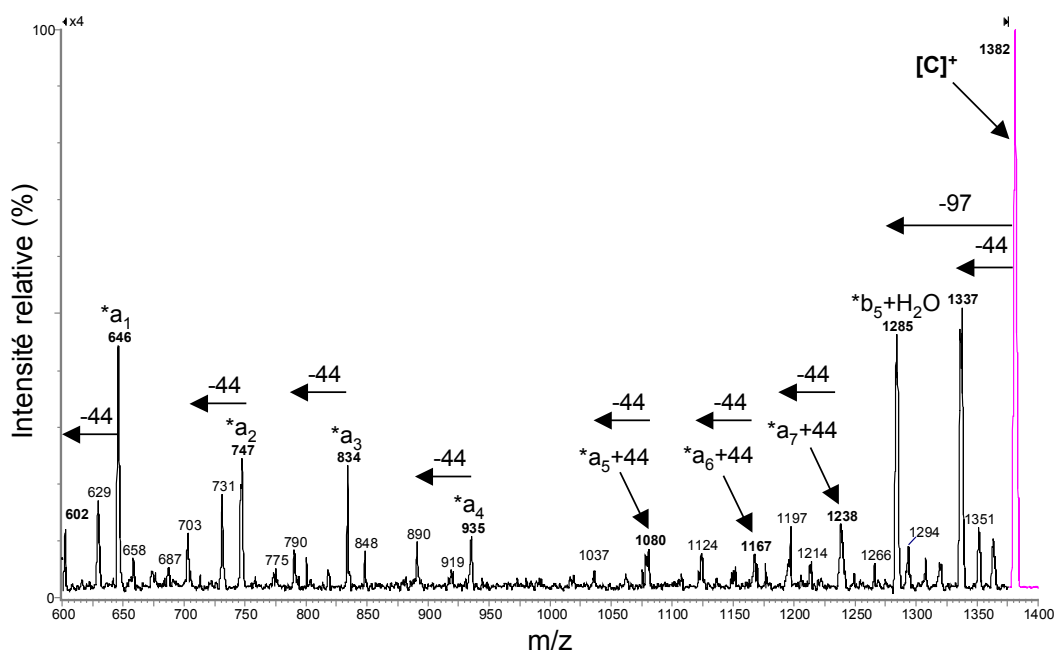


Figure 6.3: Spectre Nanospray/MS-MS du précurseur monochargé $[C]^+=1382$ de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSTTSAP(EtS)}$ (déglycosylation + dérivation N-terminale du glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc)).

Remarque : la fragmentation CID des composés β -éliminés/dérivés conduit préférentiellement à l'obtention d'ions $*a_n$ à partir du précurseur monochargé et à l'obtention majoritaire d'ions $*b_n$ à partir du précurseur dichargé.

Observation : Importance du niveau d'énergie collisionnelle dans la fragmentation des composés β -éliminés/dérivés

La fragmentation des espèces β -éliminées alkylmercapto-dérivés est dépendante de l'énergie de collision utilisée lors du processus de fragmentation CID. Il ressort de la précédente étude que la fragmentation du précurseur monochargé nécessite comme attendu plus d'énergie collisionnelle que celle de son homologue dichargé. Par ailleurs, la lisibilité du spectre et la facilité d'interprétation qui en résultent, dépendent elles aussi de l'énergie collisionnelle appliquée à l'ion sélectionné. De plus, la fragmentation du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}$ de l'espèce $\text{TMPP}^+-\text{Ac-TTSTTSAP}(\text{EtS}-)$ a été conduite à 3 énergies de collision différentes, 17, 20 et 25eV. En comparant les spectres, l'acquisition de plus haute énergie possède pour chaque fragments 4 signaux $*a_n$, $*b_n$, $*b_n-18$ a_n-16 (d_n) et $*a_n-44$ qui compliquent sensiblement le travail de séquençage à fortiori dans le cas de séquences peptidiques répétitives en acides aminés. (**Figure 6.4**)

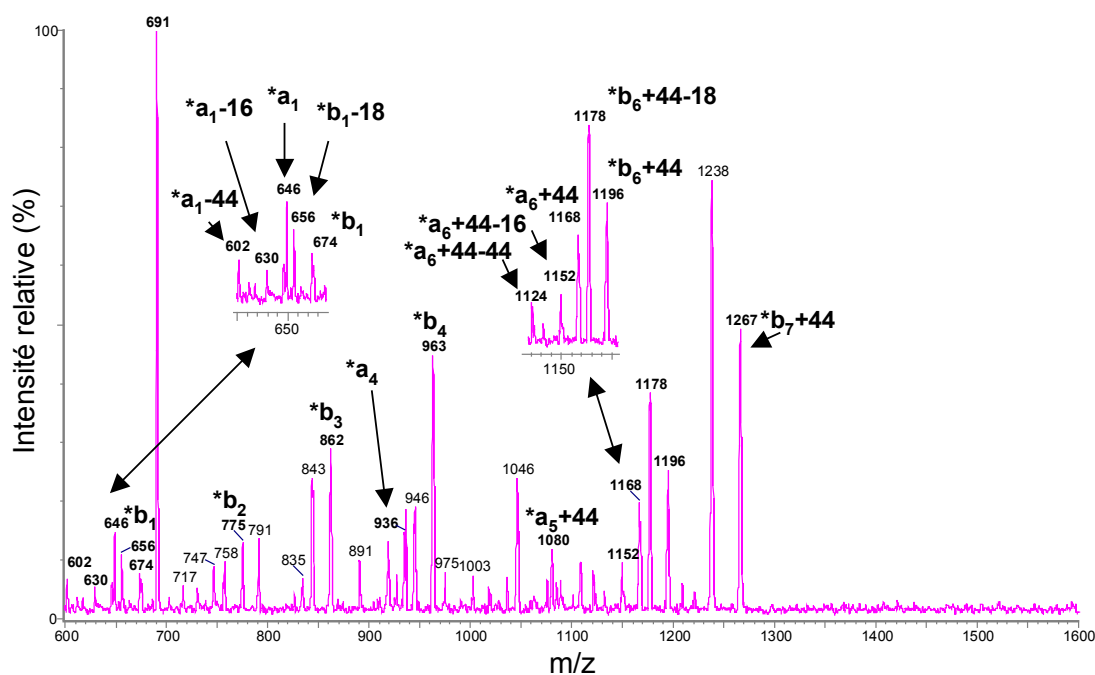


Figure 6.4: Spectre Nanospray/MS-MS du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}=691$ de l'espèce $\text{TMPP}^+-\text{Ac-TTSTTSAP}(\text{EtS}-)$ (déglycosylation + dérivation N-terminale du glycopeptide $\text{TTSTTSAP}(\text{GalNAc})$). Fragmentation à 25eV d'énergie de collision.

Il convient donc de travailler au seuil énergétique d'apparition des ions fragments pour minimiser les départs d'atomes ou groupements des chaînes latérales et ainsi faciliter le séquençage et la localisation des sites de glycosylation.

6.2/ Etude structurale du composé GTTPSPVP(GaINAc)

6.2.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVP(GaINAc)

La déglycosylation de ce glycopeptide est réalisée dans le mélange précédemment décrit sur une plage de temps de réaction allant de 6 à 16h entre 45 et 60°C. Suite à ces incubations, le glycopeptide initial de $m/z=958$ n'est que très partiellement déglycosylé comme en témoigne la **Figure 6.5a** : détection majoritaire de l'ion glycopeptidique initial $[MH]^+$ à $m/z=958$ et absence de l'ion attendu à $m/z=799$ (GTTPSPVP(EtS-)).

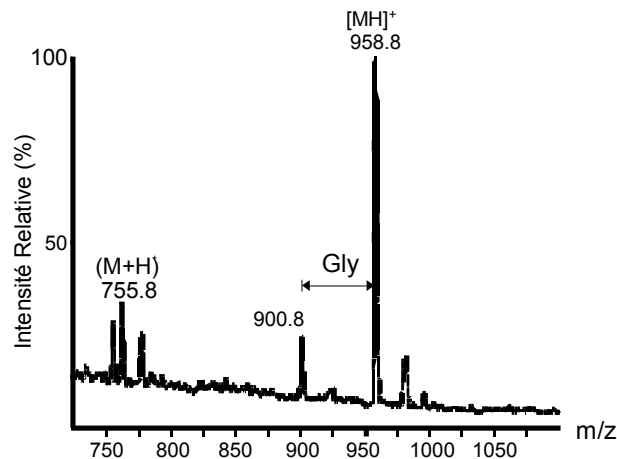


Figure 6.5a: Déglycosylation du glycopeptide de structure GTTPSPVP(GaINAc) après 16h de réaction à 60°C dans le mélange diméthylamine/éthanethiol/isopropanol.

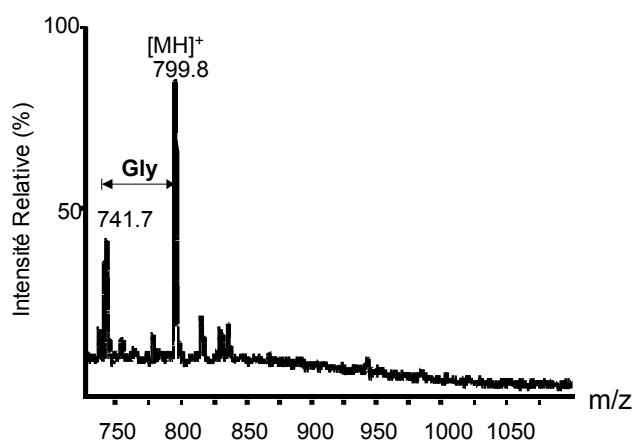


Figure 6.5b: Déglycosylation du glycopeptide de structure GTTPSPVP(GalNAc) après 16h de réaction à 60°C dans le mélange diméthylamine/éthanethiol/isopropanol + NaOH.

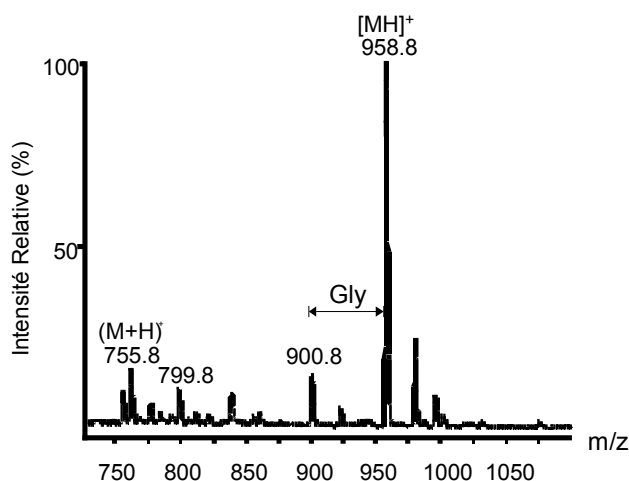


Figure 6.5c : Déglycosylation du glycopeptide de structure GTTPSPVP(GalNAc) après 16h de réaction à 60°C dans le mélange eau/éthanethiol/isopropanol + NaOH.

Nous avons pu nous rendre à l'évidence que certains glycopeptides présentent une résistance certaine à la déglycosylation et que la soude peut représenter un outil de choix dans la désorganisation de ces structures stables. Aussi, désireux de faire évoluer le protocole proposé, nous avons ajouté de la soude (0.15M final, voir matériels et méthodes) au milieu diméthylamine/éthanethiol/isopropanol.

Les résultats de la déglycosylation sont alors sans commune mesure comme en témoigne la **Figure 6.5b**.

Ce mélange complexe fait donc évoluer la soude comme agent chaotrope « débobinant » du glycopeptide et la diméthylamine comme β -éliminant vrai responsable à part entière de la déglycosylation. (voir l'expérience témoin sans diméthylamine) (**Figure 6.5c**). Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous nous permettrons d'avancer le rôle non négligeable de l'acide aminé proline. En effet, la proximité de ce résidu pourrait avoir un effet « stabilisateur » vis à vis de l'hydrogène du carbone α de la thréonine vicinale (la proline rendrait donc ce proton inaccessible aux réactifs de β -élimination...).

Remarque : Des temps longs et des températures élevées de réaction (16h à 60°C) ne provoquent pas, à la différence de l'action conjointe de la soude et de l'éthanthiol dans les conditions réactionnelles préconisées par Meyer et collaborateurs, d'addition surnuméraire et non spécifique de radical EtS-.

6.2.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé TMPP⁺-Ac-GTTPSPVP(EtS-)

Ce travail de séquençage est classiquement mené sur les précurseurs mono [C]⁺ et dichargés [CH]²⁺ à m/z=1371 et m/z=686. Comme précédemment décrit, le précurseur monochargé donne, à une énergie de collision de 60eV des ions fragments de série *a_n de *a₁ à *a₇ (avec des ions *a_n-44 résultant du départ de groupe CH₃CH=O), le précurseur dichargé quant à lui offre à 20eV une fragmentation conduisant à des ions *b_n de *b₁ à *b₇. Les ions relatifs aux résidus de proline en 4 et 6 sur la chaîne ne sont pas détectés. Dans les deux cas, la différence de masse de 145uma entre les résidus 2 et 3 désigne catégoriquement la thréonine 3 comme acide aminé accepteur de la glycosylation. (**Figure 6.6**)

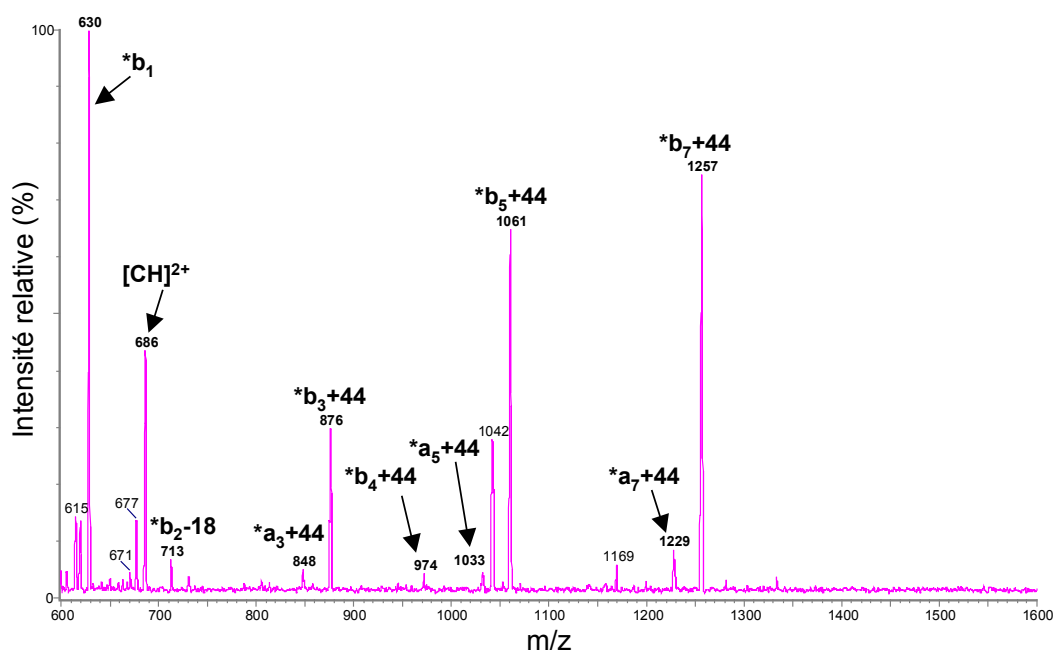


Figure 6.6: Spectre Nanospray/MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=686$ de l'espèce **TMPP⁺-Ac-GTTPSPVP(EtS-)** (déglycosylation + dérivation N-terminale du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc)).

6.3/ Etude structurale du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)

6.3.1/ Déglycosylation du composé GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)

La β -élimination/addition du glycopeptide est menée pendant 6h à 45°C et conduit à une déglycosylation suffisante pour l'analyse (détection d'un intense signal en $[MH]^+$ 1545 représentatif de l'espèce GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-). (**Figure 6.7**)

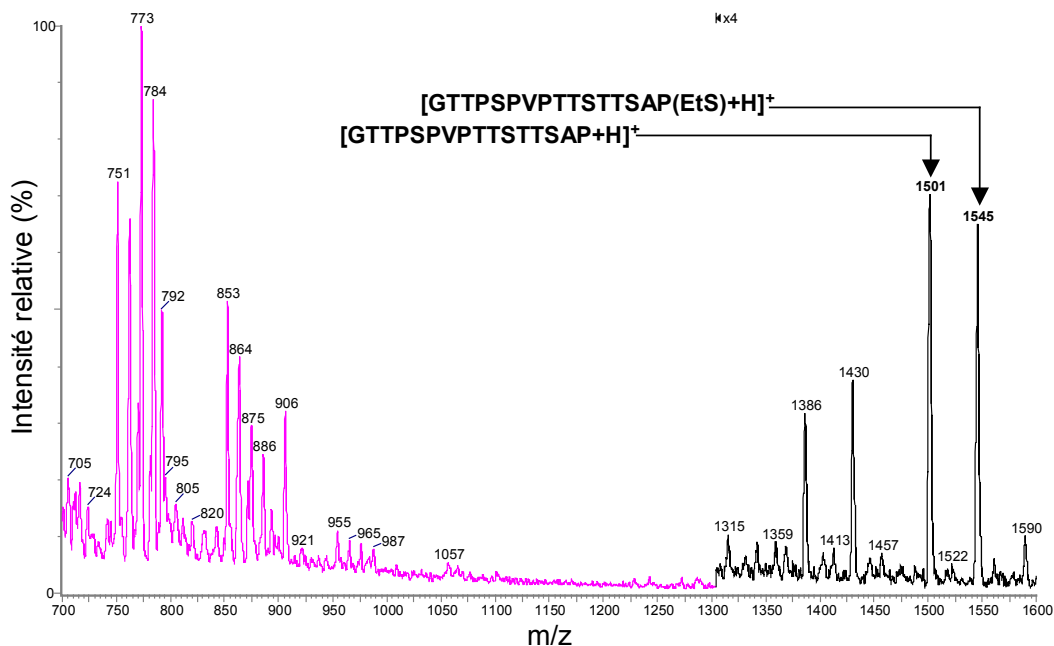


Figure 6.7: Spectre Nanospray-MS du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc) après déglycosylation par le mélange diméthylamine/éthanethiol/isopropanol.

Détection de la forme déglycosylée $[MH]^+$ =1545 correspondant à la structure GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-).

Après dérivation N-terminale de cette espèce déglycosylée par action du TMPP-AcOSu et obtention de l'ion monochargé $[C]^+$ attendu en 2118, l'ion précurseur dichargé $[CH]^{2+}$ à $m/z=1059.5$ détecté en source est sujet à une analyse collisionnelle.

6.3.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-)

L'analyse du composé TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-) se fait par comparaison avec son homologue peptidique non modifié TMPP⁺-Ac-

GTTPSPVPTTSTTSAP. Le spectre de fragmentation du peptide dérivé à son extrémité amino-terminale exhibe en haute masse une série complète de fragments $*b_n$ comme en témoigne la **figure 6.8a**. Le spectre de fragmentation de l'ion 1059 fourni, en comparaison du spectre précédent, une série complète d'ions $*b_n$ dont le fragment $*b_9$ à $m/z=1455.5$ incrémenté de 44uma. (**Figure 6.8b**)

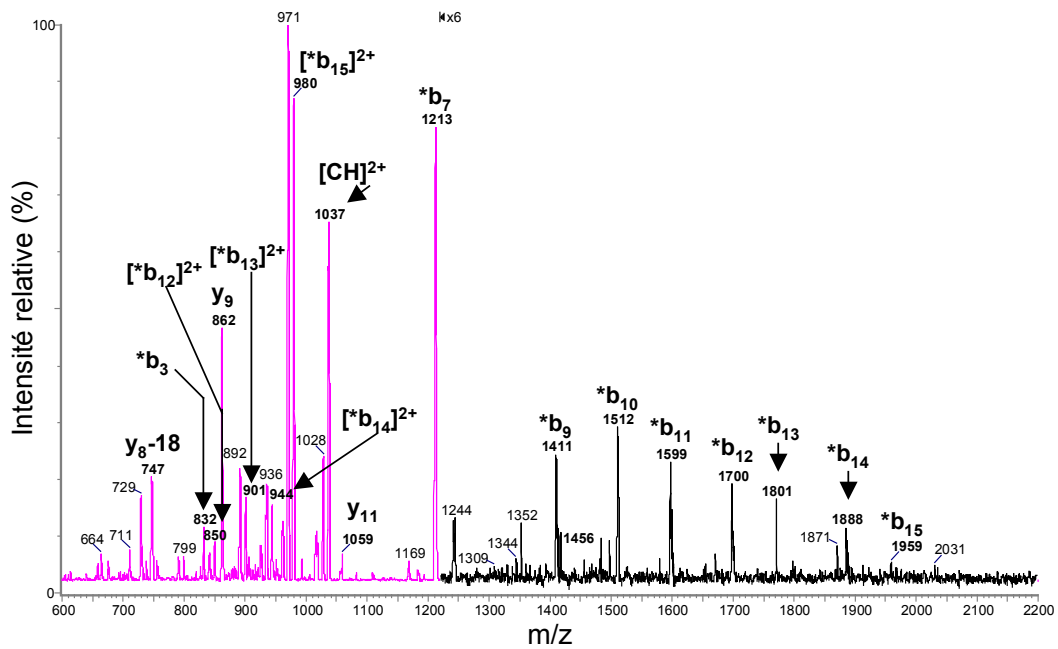


Figure 6.8a: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=1037$ de l'espèce $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP$ (déglycosylation et dérivation N-terminale du glycopeptide $GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)$).

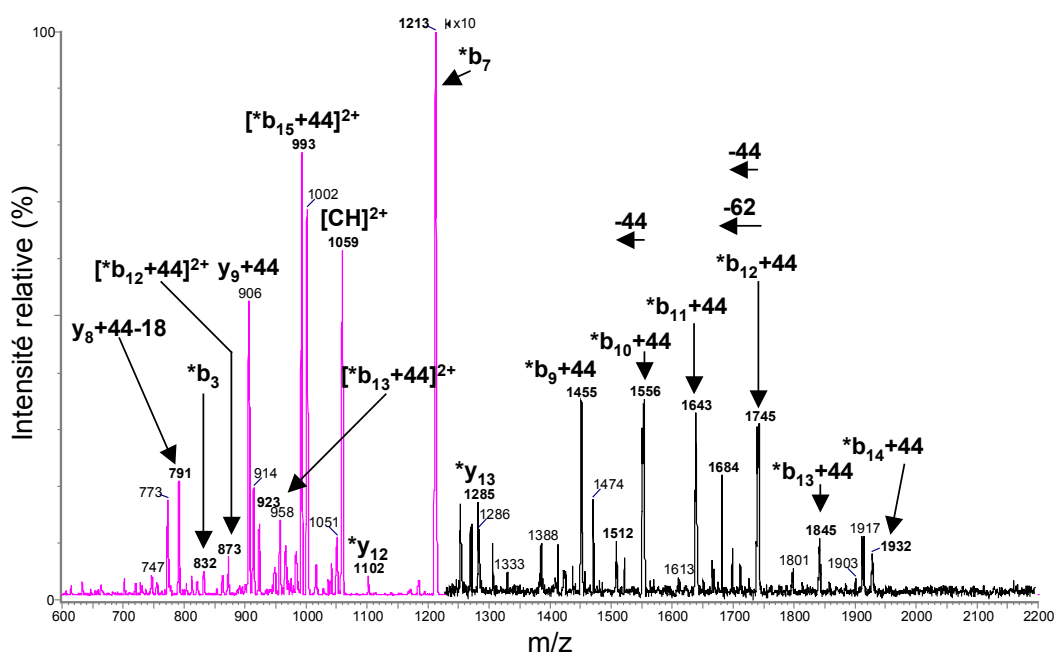


Figure 6.8b: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=1059$ de l'espèce $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS^-)$.

Les fragments $*b_3$ et $*b_7$ sont toujours mesurés à $m/z=832$ et 1213 , contrairement aux fragments y_8-18 et y_9 tous deux incrémentés de 44 uma relatif à l'addition d'un radical EtS^- . De par la présence de ces fragments et en comparant les spectres des précurseurs dichargés 1037 et 1059 , nous pouvons fort logiquement localiser le site de glycosylation sur la thréonine 9.

Afin de compléter le travail de séquençage sur ce glycopeptide, le fragment $*b_7$ à $m/z=1212.9$ est généré en source et fragmenté lors d'une analyse pseudo MS^3 . L'ion précurseur considéré conduit à l'obtention d'ions $*a_n$ permettant d'accéder à la séquence complète. (**Figure 6.9**)

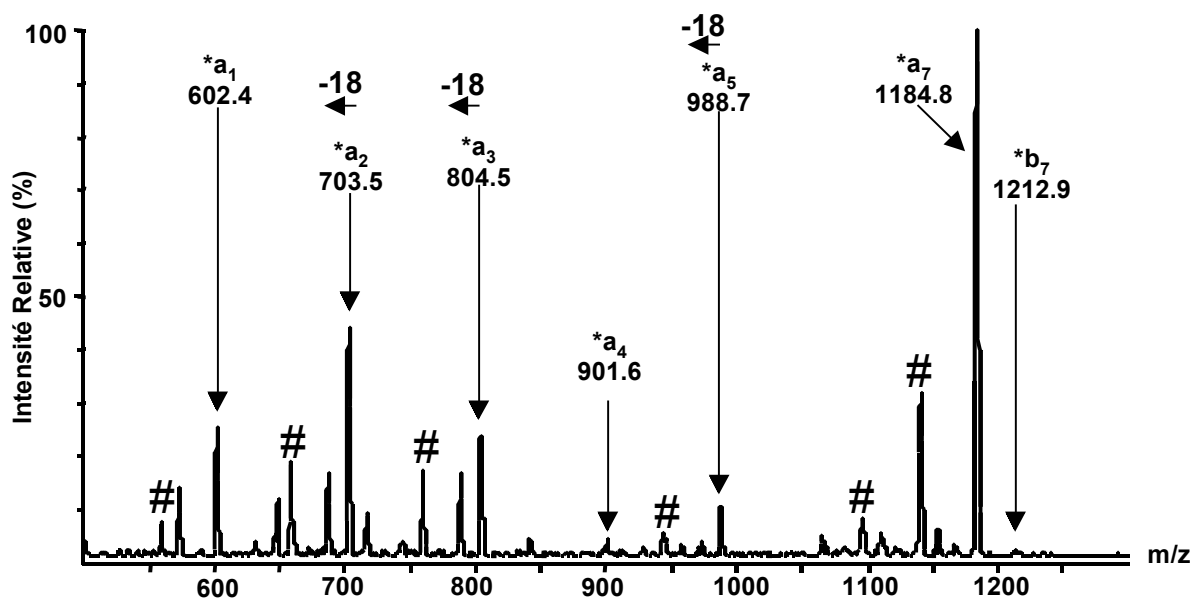


Figure 6.9: Spectre de fragmentation pseudo-MS³ de l'ion fragment *b₇ à m/z=1212.9. Les signaux marqués d'un « # » sont consécutifs à la perte d'un groupe CH₃CH=O (-44Da) à partir de l'ion *a_n correspondant.

6.4/ Etude structurale du composé GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)

Afin d'estimer les capacités de déglycosylation du mélange diméthylamine/ethanethiol/isopropanol, une étude est réalisée sur un glycopeptide porteur d'une structure glycanique plus conséquente composée de l'association d'une unité de N-Acetyl Galactosamine et d'une unité de Galactose.

6.4.1/ Déglycosylation du composé GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)

La déglycosylation du glycopetide d'intérêt se fait de manière séquentielle, sucre après sucre, en partant du glycopetide natif à m/z=1905 [MK]⁺ pour aboutir après 16h de réaction à l'espèce totalement déglycosylée à m/z=1583, forme [MK]⁺ de l'espèce GTPSPVPTTSTTSAP(EtS-). (Figure 6.10a et b)

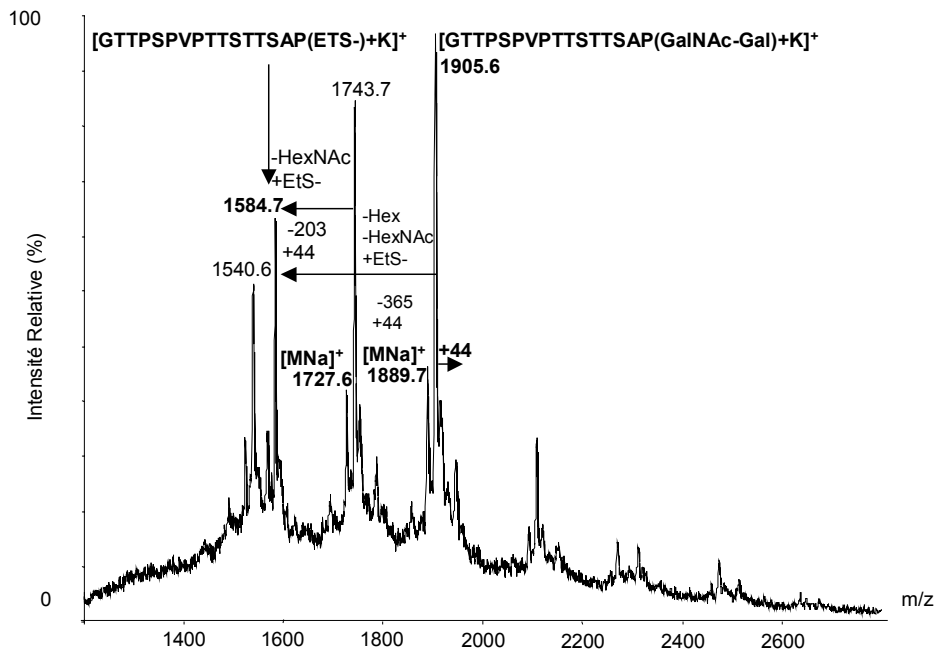


Figure 6.10a: Réaction de déglycosylation par le mélange diméthylamine/ ethanethiol/ isopropanol du glycopeptide GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal) (12H de réaction/45°C)

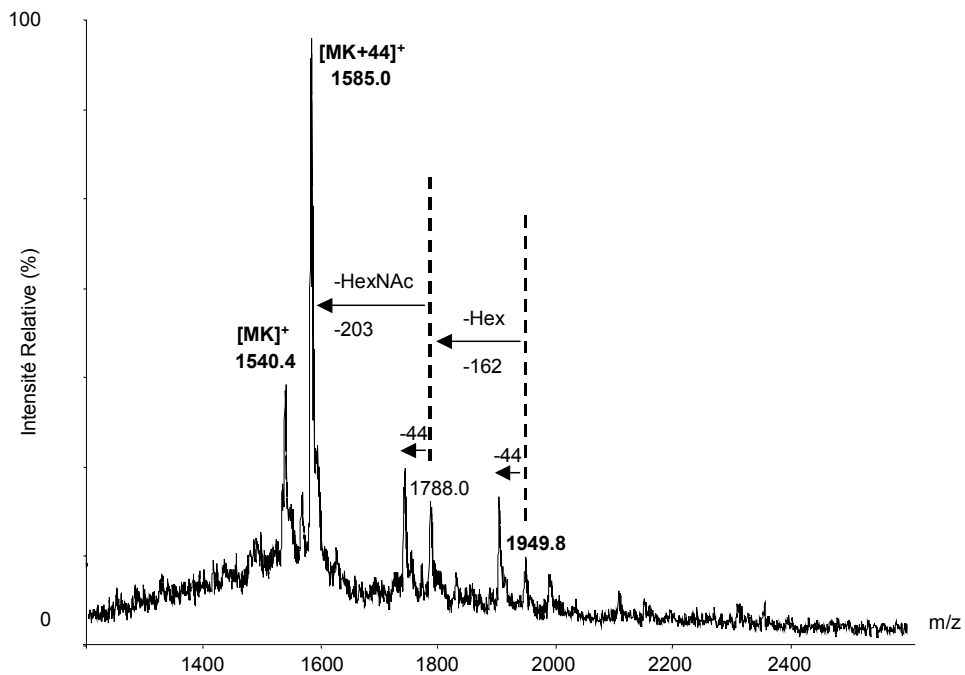


Figure 6.10b: Réaction de déglycosylation par le mélange diméthylamine/ ethanethiol/ isopropanol du glycopeptide GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal) (16H de réaction/45°C)

Par ailleurs, la démarche a été conduite en utilisant cette fois le propanethiol pour donner les mêmes résultats avec la détection d'un $[MH]^+$ en 1559 (GTTSPVPTTSTTSAP(PrS-)) (Figure 6.11), cette réaction de propylmercapto-substitution montre la souplesse du protocole proposé, permettant aussi de se démarquer de certains inconvénients de la β -élimination, plus précisément des pertes de 44 sur les spectres de masse (pour éviter les +/- 44Da précédemment décrits).

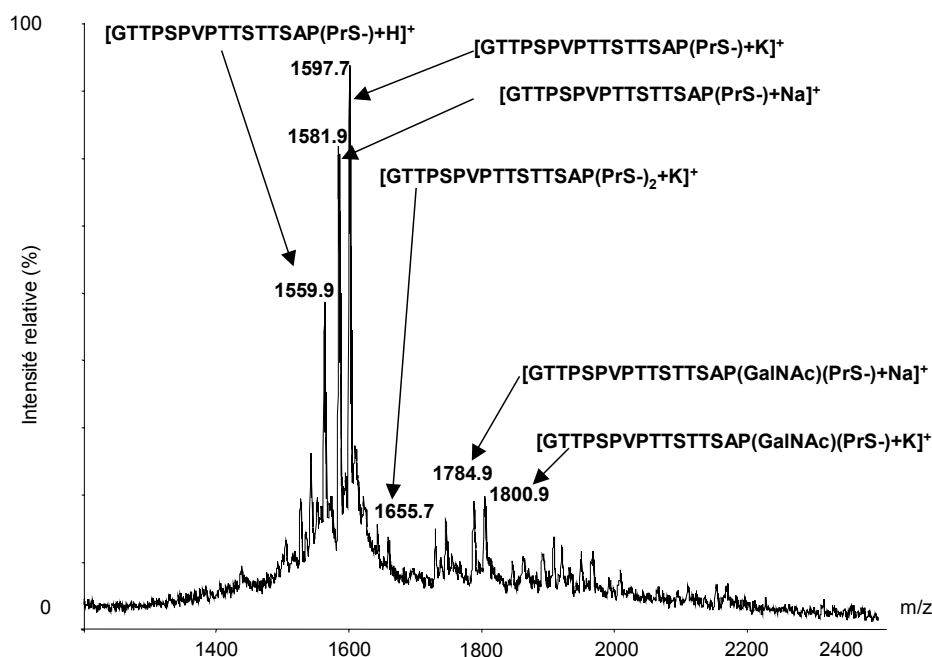


Figure 6.11: Réaction de déglycosylation par le mélange diméthylamine/ propanethiol/ isopropanol du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal) (16H de réaction/45°C)

6.4.2/ Analyse NANO-ESI-CID/MS-MS du composé $TMPP^+$ -Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-)

Cette analyse part certes d'un glycopeptide différent de ceux déjà étudiés mais aboutit, étant donné le même enchaînement peptidique existant, à la même espèce après déglycosylation. Reste toutefois à en déterminer la localisation du site de glycosylation.

Après dérivation N-terminale, le précurseur dichargé de masse 1059 donne les mêmes informations de par la présence d'un ion informatif $*b_9$ à $m/z=1455.5$ et d'un ion $*y_9$ à 920 venant confirmer la présence initiale du résidu oligosaccharidique GalNAc-Gal sur la thréonine 9. (Figure 6.12)

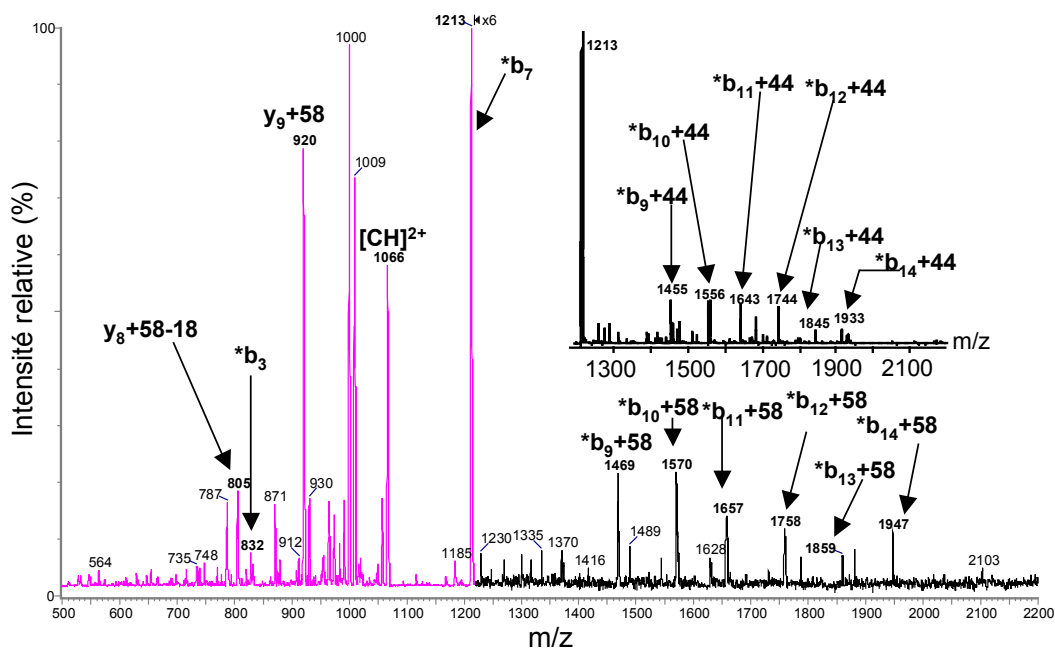


Figure 6.12: Spectres Nanospray MS-MS des précurseurs dichargés $[CH]^{2+}=1059$ et 1066 des espèces $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(EtS-)$ et $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(PrS-)$ (obtenus après déglycosylation et dérivation N-terminale du glycopeptide $GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)$). L'encart représente uniquement la région de haute masse d'intérêt pour la localisation de l'acide aminé chimiquement modifié (suite à l'addition dans ce cas précis d'un radical éthylthio-). Le spectre principal représente la substitution au propanethiol.

6.4.3/ Remarque

Des études structurales complètes comportant une étape de déglycosylation et de dérivation N-terminale ont été réalisées sur les glycopeptides complexes de structures $GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_2$ et $GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)_2$. Les résultats de ces analyses (non fournis) font apparaître, en accord avec nos observations préalables (voir chapitre 4), une stabilité importante du site de glycosylation situé sur la thréonine 3 pour les deux composés cités et montrent dans les meilleurs dispositions la déglycosylation totale du deuxième site à hauteur de la thréonine 13 de la séquence.

Aboutissant à une structure du type $GTT(GalNAc/GalNAc-Gal)PSPVPTTSTT(EtS-/PrS-)SAP$ mais devant faire face au caractère « inachevé » qu'elles pourraient présenter, nous nous permettons simplement d'en faire références sans toutefois les développer.

6.5/ Etude structurale du composé ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)

6.5.1/ Déglycosylation du composé ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)

La déglycosylation par le mélange diméthylamine/propanethiol/isopropanol du glycopeptide ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc) nécessite une réaction de 16h à 60°C et permet ainsi la déglycosylation totale du composé et la détection d'un signal nettement majoritaire à $m/z=1599$ (ion $[MH]^+$). (**Figure 6.13**)

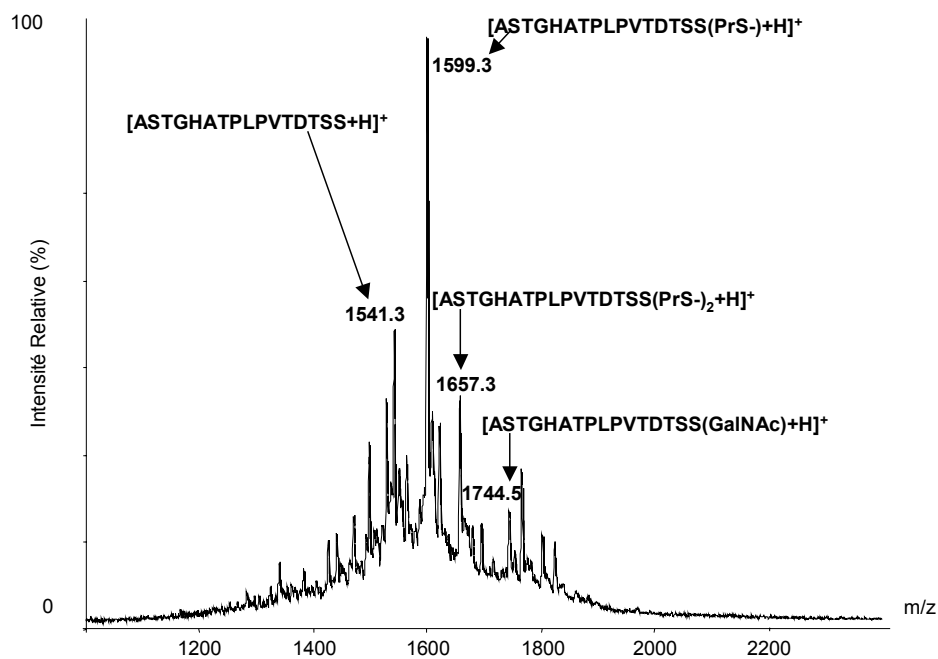


Figure 6.13: Spectre MALDI-MS de l'espèce ASTGHATPLPVTDTSS(PrS-) après réaction de déglycosylation du glycopeptide ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc) par le mélange diméthylamine/ propanethiol/ isopropanol (16h à 60°C).

Après dérivation N-terminale par le dérivé TMPP-Ac-Osu, un signal attendu à $m/z=2172$ (correspondant à l'ion $[C]^+$) est détecté (**Figure 6.14**).

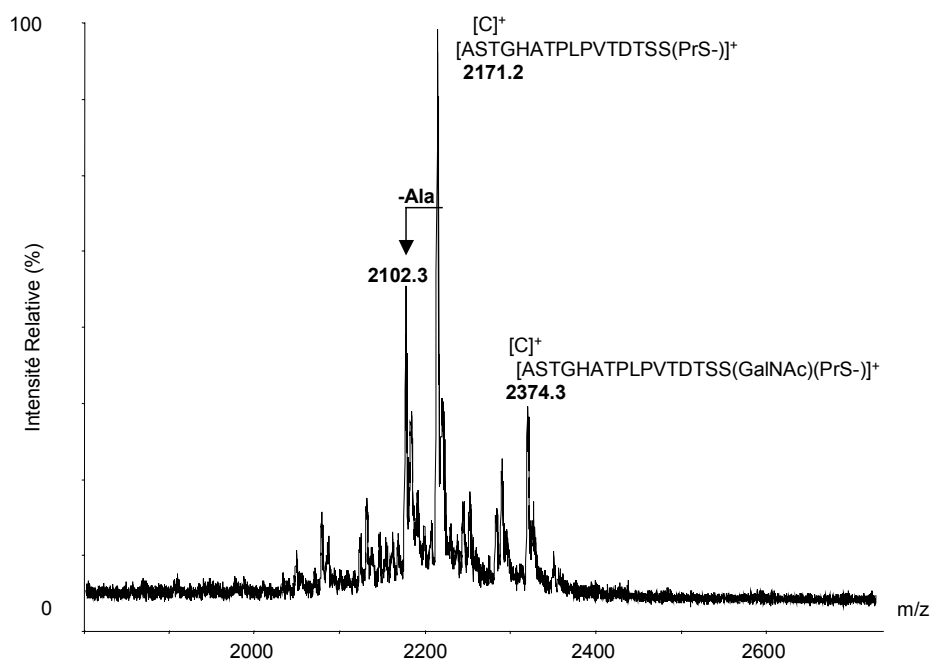


Figure 6.14: Spectre MALDI-MS de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(PrS-)}$ après réaction de déglycosylation du glycopeptide $\text{ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)}$ par le mélange diméthylamine/ propanethiol/ isopropanol et dérivation N-terminale par le TMPP-AcOSu .

6.5.2/ NANO-ESI-CID/MS-MS du composé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(PrS-)}$

La fragmentation MS-MS du précurseur dichargé à $m/z=1086.5$ correspondant au dérivé peptidique déglycosylé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(PrS-)}$ est représenté sur le spectre de la **Figure 6.15**.

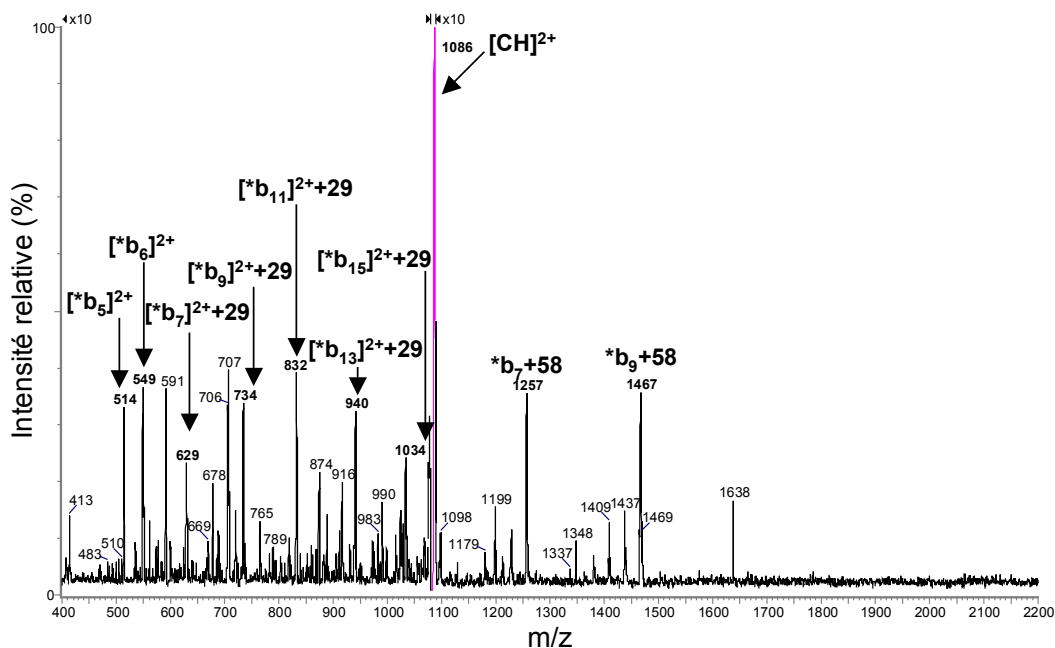


Figure 6.15: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=1086.5$ de l'espèce $TMPP^+-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(Pr-)$ (déglycosylation + dérivation N-terminale du glycopeptide $ASTGHATPLPVTDTSS(GalNac)$).

Ce spectre montre une série complète d'ions fragments $*b_n$ de $*b_5$ à $*b_{15}$ sous formes dichargées en basses masses ($*b_5$ en 514, $*b_6$ en 549.5, $*b_7$ en 629, $*b_8$ en 677.5, $*b_9$ en 734, $*b_{11}$ en 832, $*b_{12}$ en 882.5, $*b_{13}$ en 940.5, $*b_{14}$ en 991 et $*b_{15}$ en 1034.5) et sous formes monochargées en hautes masses pour $*b_7$ et $*b_9$ (respectivement en 1257 et 1467). Ces nombreux ions obtenus suffisent à conclure sur la localisation du site de glycosylation sur la thréonine 7 de cette séquence hétérogène en acides aminés. Dans un souci d'exhaustivité, la fragmentation pseudo- MS^3 du $*b_7$ générée en source fournit une série ininterrompue de fragments $*a_n$ de $*a_1$ à $*a_7$ (entre 616 et 1228 avec confirmation de l'incrémentation due à l'incorporation d'un radical propylthio- à partir du fragment $*a_7$) et termine le travail de séquençage initié. Il faut de nouveau remarquer la présence forte de signaux relatifs au départ de fragments de 44uma. (**Figure 6.16**)

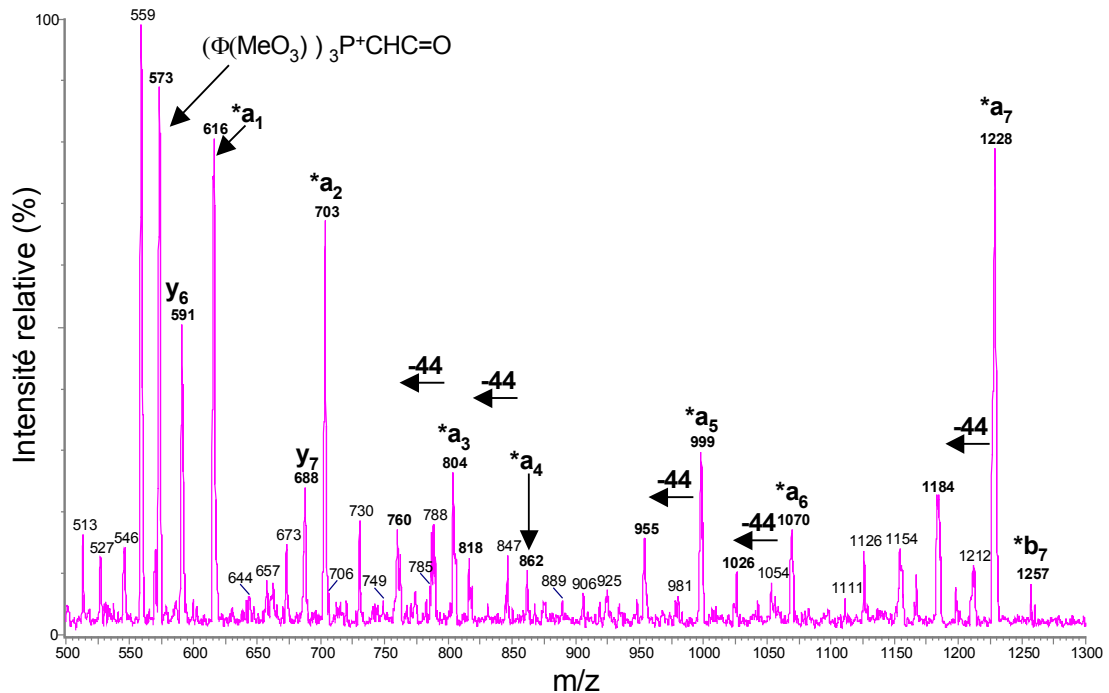


Figure 6.16: Spectre Nanospray de fragmentation Pseudo-MS³ de l'ion $*b_7$ à $m/z=1257$ de l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-ASTGHATPLPVTDTSS(PrS-)}$.

6.6/ Note expérimentale : Incidence des réactions de β -élimination/addition sur le squelette peptidique. Temps de réaction prolongés et condensation non-spécifique

Les glycopeptides de cette étude résultent de la glycosylation enzymatique de peptides accepteurs d'origine synthétique. Ces structures peptidiques possèdent en leurs séquences bon nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés de type sérine/thréonine réactifs vis à vis des réactions d'addition nucléophile.

Nous avons pu voir dans le chapitre consacré à l'action catalytique de la soude que les réactions de β -élimination/addition étaient accompagnées de réactions concurrentes conduisant à des espèces présentant des déficits de masse de 18 ou 44Da ainsi que d'autres espèces alkylthio- substituées (présence de substituants surnuméraires non spécifiques des glycanes).

Dans le but de valider qualitativement la méthode de substitution par élimination/thiol addition proposée, le peptide accepteur de séquence **GTTSPVPTTSTTSAP** (sans glycosylation) choisi pour son grand nombre d'acides

aminés hydroxylés (9/16) a été le sujet de différentes expériences de β -élimination/addition par action conjointe de diméthylamine et propanethiol.

Le propanethiol est ici choisi pour l'incrémentation de 58 uma qu'il provoque lors de son addition au peptide (contre les 44uma de l'éthanethiol) et évite ainsi des interférences avec les pertes des entités CH_3CHO .

Les réactions sont menées à 45-60°C pendant 6h, 16h et 24h.

6.6.1/ Etude NANO-ESI-CID/MS-MS des espèces générées après 6 heures de réaction

Quand l'expérience de β -élimination/PrS- addition est conduite sur un temps réactionnel court (6 heures par exemple), le peptide accepteur ne présente pas de modifications chimiques significatives. La dérivation N-terminale par le TMPP de ce substrat et son séquençage apportent des informations pouvant vérifier cette affirmation.

Le spectre de fragmentation du précurseur doublement chargé à $m/z=1037$ génère une séquence caractéristique d'ions fragments $*b_n$ qui s'étend de $*b_7$ à $*b_{15}$. (**Figure 6.17a**) Concernant les fragments de basse masse, le signal est délicat à analyser sur ce spectre et le recourt à une « pseudo-analyse MS^3 » est pratique. L'ion ($*b_7$) déjà décrit apparaît en source après augmentation du potentiel de cône et peut donc être soumis à une fragmentation. L'analyse du précurseur monochargé $[\text{C}]^+$ à $m/z=1213$ laisse apparaître une série complète de fragments $*a_n$ de $*a_1$ à $*a_7$ permettant d'accéder à la séquence complète du peptide GTTPSPVPTTSTTSAP. (**Figure 6.17b**)

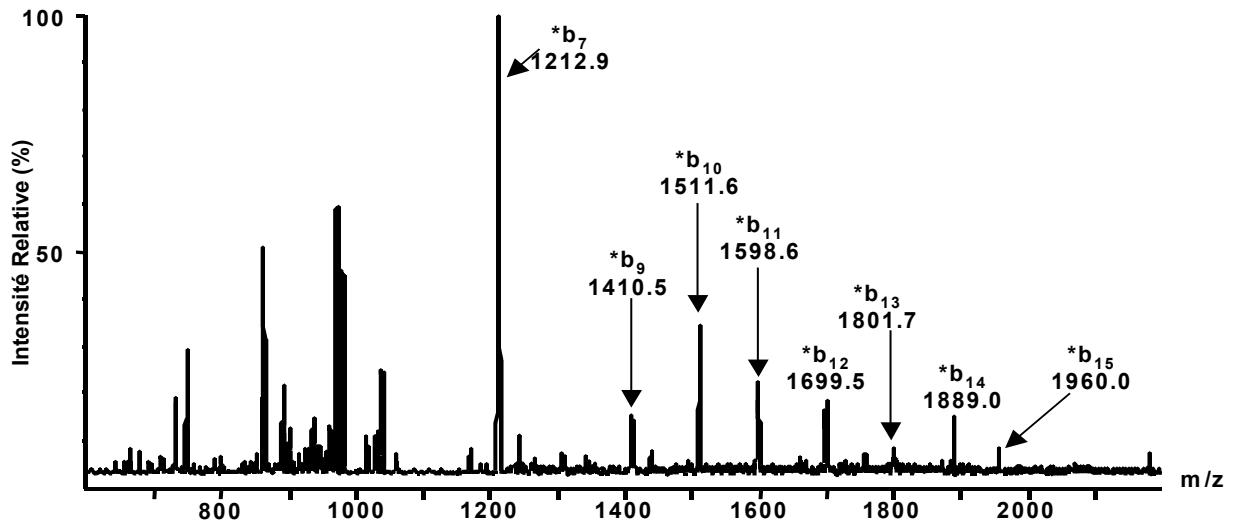


Figure 6.17a: Spectre de fragmentation de l'espèce glycopeptidique $\text{TMPP}^+ \text{-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP}$, Précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}$ à $m/z=1037$.

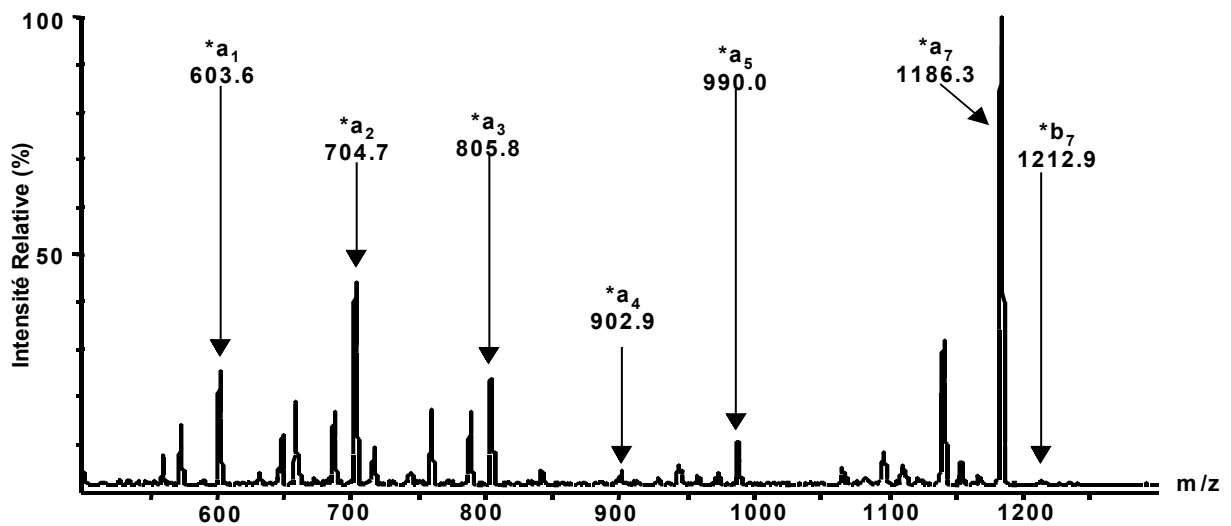


Figure 6.17b: Spectre de fragmentation pseudo- MS^3 de l'ion monochargé $*b_7$ à $m/z=1213$ de l'espèce glycopeptidique $\text{TMPP}^+ \text{-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP}$.

Après 6 heures de contact dans le milieu utilisé pour le déglycosylation, le substrat peptidique GTTPSPVPTTSTTSAP n'est donc pas modifié chimiquement comme en témoignent les spectres de fragmentation des espèces correspondantes.

6.6.2/ Etude NANO-ESI-CID/MS-MS des espèces générées après 16 heures et plus de réaction

Quand l'expérience de « β -élimination/propanethiol addition » est conduite pendant des temps plus longs (16 à 24h de réaction), des modifications sont remarquables de par la présence d'une population ionique plus hétérogène.

Ainsi, après dérivation N-terminale, 4 précurseurs différents sont observés à $m/z=1015$, $m/z=1037$, $m/z=1044$ et $m/z=1066$. (**Figure 6.18**)

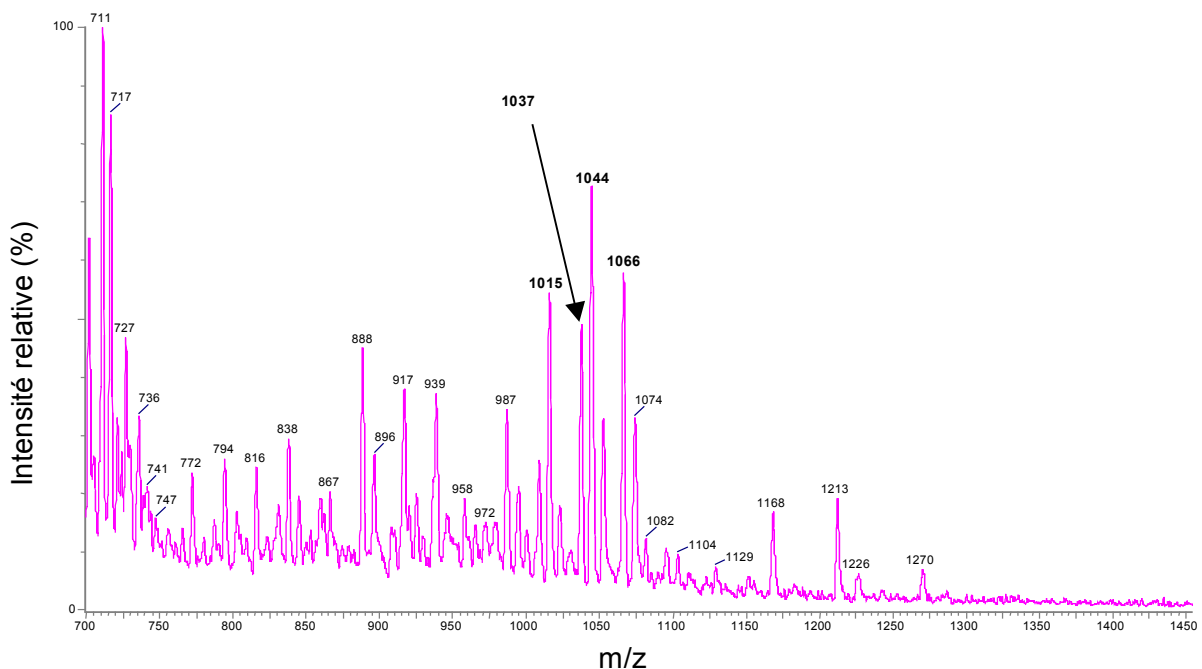


Figure 6.18: Spectre ESI-MS de contrôle après 16-24h de réaction de β -élimination / PrSH-addition sur le modèle peptidique GTTPSPVPTTSTTSAP.

La fragmentation du précurseur 1037 donne majoritairement un ion $*b_7$ en 1213 et la fragmentation de ces 2 espèces est rigoureusement identique à celle décrite précédemment. (voir plus haut).

La présence de l'ion dichargé 1015 peut quant à elle être révélatrice d'une perte d'un radical de type $\text{CH}_3\text{CH}=\text{O}$: la fragmentation de ce précurseur génère un fragment majoritaire en 1169 ($*b_7-44$) accompagné de toute une série d'ions $*b_n-44$ indiquant que la perte du radical $\text{CH}_3\text{CH}=\text{O}$ se trouve située avant l'ion $*b_7$. En

généralisant cet ion en source, l'analyse pseudo MS³ révèle en position 3 un résidu de glycine à la place initiale d'une thréonine, la perte du résidu de 44uma se fait donc à ce niveau de la séquence. (**Figure 6.19**).

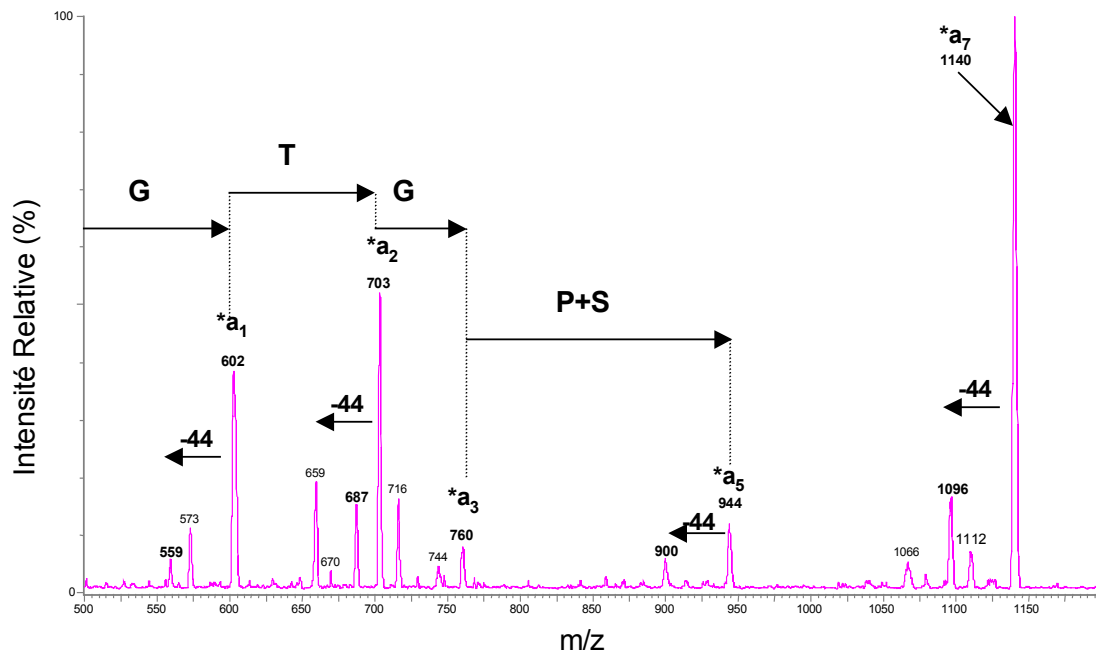


Figure 6.19: Spectre de fragmentation pseudo-MS³ du précurseur monochargé à $m/z=1169$ représentatif de l'ion fragment $*b_{7-44}$ généré en source. (Energie de collision, 60eV)

Toutefois, il faut noter sur le spectre de fragmentation de l'ion 1015 la présence non négligeable d'un fragment $*b_7$ normal puisqu'à 1213 confirmé par la présence de deux autres fragments $*b_9$ et $*b_{11}$. Ils indiquent clairement qu'une perte de 44uma peut aussi subvenir plus loin dans la séquence, vraisemblablement au niveau des thréonines 12 et 13. La fragmentation pseudo MS³ de l'ion 1213 généré en source confirme cette hypothèse puisque le schéma obtenu avec ce spectre est rigoureusement identique au spectre de référence (voir plus haut).

L'ion de masse mesurée 1044 semble correspondre à une espèce porteuse d'un groupe PrS- ayant de même perdu une entité $\text{CH}_3\text{CH}=\text{O}$ $[\text{C}+58-44]^+$, sa fragmentation conduit principalement à l'obtention d'un fragment $*b_{7-44}$ à $m/z=1169$. La nature de ce fragment ayant déjà été élucidée ci-avant (glycine en position 3 matérialisant la thréonine 3 initiale comme responsable de la perte de 44 constatée), nous nous intéressons alors principalement aux fragments $*b_n$ de haute masse : deux séries distinctes cohabitent sur le spectre et indiquent clairement les deux

acides aminés porteurs du groupe PrS- consécutif à la β -élimination comme étant la sérine 14. (**Figure 6.20**)

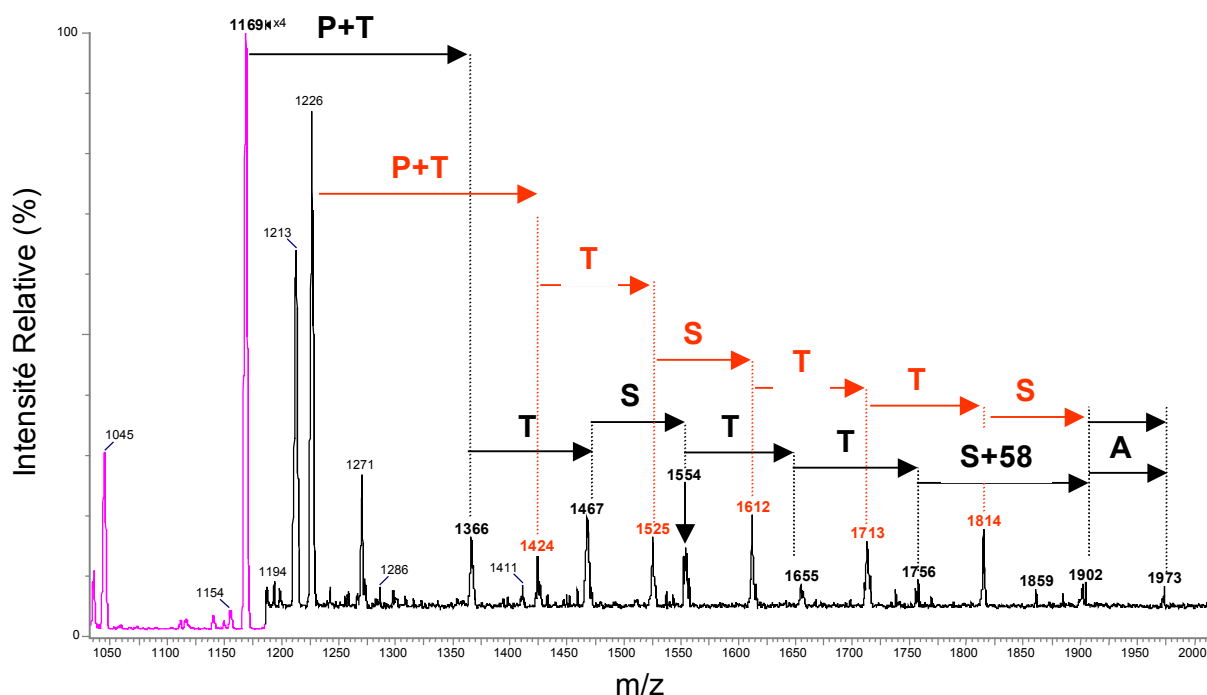


Figure 6.20: Spectre de fragmentation du précurseur dichargé $[CH]^{2+}$ à $m/z=1045$ représentatif de l'espèce peptidique modèle $TMPP^+-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP$ après réaction de β -élimination/PrSH addition.

Enfin, le précurseur doublement chargé à $m/z=1068$ génère 2 fragments monochargés $*b_7$ et $*b_7+58$ à $m/z=1213$ et $m/z=1271$. Accompagnant le fragment $*b_7$ sur ce spectre, une 1^{ère} série d'ion $*b_n$ nous indique la localisation du radical PrS- additionné de manière non spécifique après β -élimination sur la sérine 14 (détection d'un ion $*b_{14}$ incrémenté de 58uma en 1902.0). Mais cet incrément de masse peut être situé à un autre endroit sur la séquence comme l'indique une série complète d'ion $*b_n+58$ et surtout la détection de l'ion $*b_7+58$ en 1271. La fragmentation pseudo MS^3 de ce composé répond à notre question par la détection d'un ion $*a_n$ en 761.7 représentatif de l'ion $*a_2+58$. (**Figure 6.21**)

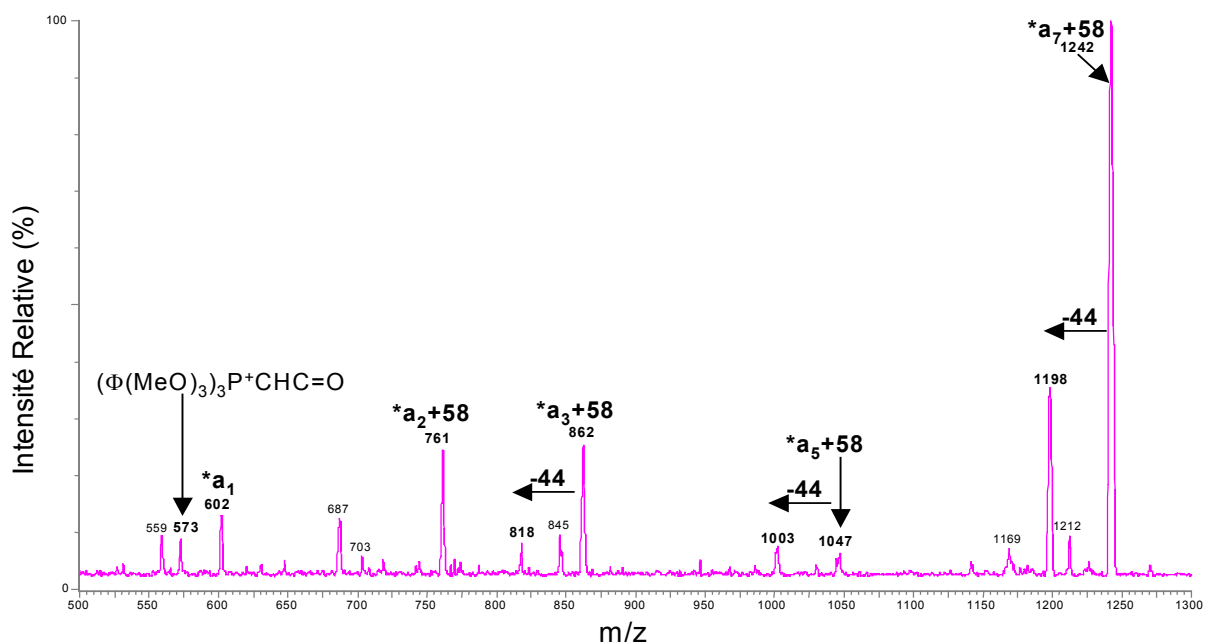


Figure 6.21: Spectre de fragmentation pseudo-MS³ du précurseur monochargé à $m/z=1271$ représentatif de l'ion fragment $*b_7+58$ généré en source. (Energie de collision, 60eV)

Les différentes analyses MS-MS et pseudo MS³ pouvant alors être récapitulées dans le tableau de la **Figure 6.22:**

Précurseurs [CH] ²⁺ (pour l'analyse MS/MS)	Fragments *b ₇ [C] ⁺	Structures Peptidiques Proposées
1015 (-44)	1169 + 1213	GT G PSPVPTTSTTSAP G T TPSPVPTTST G SAP G T TPSPVPTT S GTSAP
1037	1213	G T TPSPVPTTSTTSAP
1044 (-44+58)	1169>>1213#1227>>1271	GT* G PSPVPTTSTTSAP GT G PSPVPTTSTTS*AP G T TPSPVPTT S TTSAP (+58-44) GT*TPSPVPTT S TTSAP (+58-44)
1066 (+58)	1213 1271	G T TPSPVPTTST*TSAP GT*TPSPVPTTSTTSAP

T*: thréonine modifiée par l'addition non-spécifique d'un groupe CH₃CH₂CH₂S- (+58Da).

G: thréonine 'transformée' en glycine par la perte d'un groupe CH₃CHO (-44Da).

Figure 6.22 : Tableau récapitulatif des structures issues des modifications non-spécifiques dues aux réactions de β -élimination/PrSH addition sur le peptide natif GTTPSPVPTTSTTSAP.

6.7/ En résumé...

La méthode de substitution de glycanne β -élimination/addition que nous proposons présente des potentialités certaines dans le marquage spécifique des sites de O-glycosylation.

Possédant une capacité de déglycosylation similaire à celle obtenue avec la méthode proposée par Meyer et collaborateurs, l'utilisation conjointe de diméthylamine et des thiols (éthane ou propanethiol) en milieu aqueux et en présence d'isopropanol permet de mieux contrôler la réaction de substitution et montre plus de souplesse d'utilisation pour la spectrométrie de masse puisque ne nécessitant pas d'étapes de purifications chromatographiques (de par la volatilité des réactifs utilisés).

Ayant démontré ses aptitudes face à des structures complexes et variées (motifs GalNAc-Gal, multiple sites de glycosylation, séquence hétérogène en acides aminés, « tandem repeat » difficilement analysable), **la méthode ci-avant proposée semble être adaptable à la plupart des structures O-glycopeptidiques.**

Néanmoins, dans un souci évident d'objectivité, il faut noter que cette méthode aussi capable soit-elle, présente tout de même quelques inconvénients indissociables de ces techniques de β -élimination :

1=> La nature du substrat glycopeptidique (taille et nature de la chaîne peptidique, charge et qualité glycanne) **conditionne l'efficacité de la réaction** de β -élimination / addition.

2=> Certains sites de glycosylation **restent difficilement accessibles soit pour des raisons conformationnelles** (site voisin d'un résidu de proline et stabilisation du proton α de l'acide aminé vicinal), **soit plus vraisemblablement par absence de proton amidique.**

3=> Des réactions mineures de substitution non-spécifiques au glycanne **sont à déplorer pour des temps trop long de réaction.**

4=> Bien que fixée de manière covalente, l'étiquette chimique modifiant l'acide aminé initialement porteur de la glycosylation **est à l'origine de réarrangements** qui se traduisent par **des pertes de groupements représentatifs** de cette

étiquette chimique (perte de 71...)(pertes pouvant se traduire par un bouleversement de la séquence en acides aminés (T=>G)).

En considérant les difficultés relatives à l'analyse structurale des composés de nature O-glycopeptidique, **les méthodes de β -élimination/addition peuvent apparaître comme des outils intéressants** pour la localisation des sites de O-glycosylation **sans pour autant être universelles** dans ce domaine **et aucunement généralisables** à tous les glycopeptides **(en ajoutant à cela les éventuels faux positifs obtenus avec des phosphopeptides chimiquement très proches)**.

D'un point de vue purement dissociatif, les glycopeptides (lorsqu'ils ne sont pas chimiquement modifiés) se caractérisent principalement par une rupture de la liaison glycanne \rightleftharpoons peptide (voir plus haut), mais les mécanismes qui conduisent à cette rupture favorisée sont, comparativement aux mécanismes de fragmentation peptidiques, beaucoup moins illustrés.

Les travaux réalisés sur les entités peptidiques établissent une corrélation entre la nature des ions obtenus (et donc des informations générées par ces mêmes ions fragments) et les conditions physiques de fragmentation (CID de haute ou de basse énergie pour ne citer que ce type de fragmentation...) ainsi que les mécanismes favorisés par ces mêmes conditions (« CDF » et/ou « CRF ») :

1=> La CID de haute énergie, en favorisant le mécanisme CRF, conduit essentiellement à la formation d'ions a_n , d_n ou w_n (*Johnson RS et al, 1987*) (*Johnson RS et al, 1988*).

2=> En basse énergie, la dissociation induite par collision favorise quant à elle principalement le mécanisme de fragmentation dirigé par la charge et se matérialise par l'obtention majoritaire d'ions b_n (*Somogyi A et al, 1994*).

3=> Les mécanismes de fragmentation sont dépendants de la localisation de résidus basiques le long de la chaîne peptidique (voir chapitre 5) (*Burlet O et al 1992*) (*Tang XJ et al, 1993*) et résultent essentiellement, en basse énergie, de transferts intramoléculaires de protons après activation collisionnelle en phase gazeuse (comme le démontre Mueller (*Mueller DR et al, 1988*) et Johnson (*Johnson RS et al, 1995*) qui travaillent sur des espèces deutérées).

Il en ressort donc une incidence considérable de la charge et de sa nature (fixe ou plus localisée) sur la fragmentation du squelette peptidique (*Dongré AR et al, 1996*).

Sans parler de stricte homologie, mais en avançant prudemment un éventuel mimétisme comportemental, il nous est paru pertinent, comme dans le cas des peptides d'étudier l'influence de la charge (et de sa nature) sur la fragmentation des espèces glycopeptidiques de notre étude. Nous nous proposons donc dans la suite de ce manuscrit d'appréhender la problématique O-glycopeptidique sous cet angle.

Chapitre 7 :

Influence de la Nature de la Charge
sur la Fragmentation des O-Glycopeptides

Chapitre 7 : Influence de la Nature de la Charge sur la Fragmentation des O-Glycopeptides

7.1/ Introduction

Nous avons pu voir précédemment qu'un glycopeptide natif se fragmente préférentiellement au niveau du point d'attache glycanique et les spectres qui en découlent présentent majoritairement des pics résultant du départ du ou des structures glycaniques initialement fixée(s) sur le peptide. La séquence en acides aminés du peptide accepteur peut-être déduite de ces spectres de fragmentation mais aucune information liée à la localisation initiale du site de glycosylation n'est accessible.

Mirgorodskaya et collaborateurs considèrent cette voie de fragmentation préférentielle (*Mirgorodskaya E et al, 2001*) comme résultante d'un mécanisme de fragmentation induite par la charge et avancent par la même le rôle primordial joué par le proton mobile dans la fragmentation de ces espèces glycopeptidiques.



Partant de ce postulat, il nous paraît fort intéressant d'étudier cette notion relative de « labilité » de la liaison glycanique en comparant le comportement dissociatif d'espèces glycopeptidiques modifiées par dérivation à charge fixe. En nous proposant d'analyser les précurseurs $[\text{MH}]^+$, $[\text{C}]^+$ et $[\text{CH}]^{2+}$, nous allons tenter d'élucider l'importance et le rôle de la nature de la charge, charge fixe contre charge mobile, dans les processus de fragmentation des glycopeptides d'intérêt.

Les composés porteurs d'une charge fixe, respectivement $[\text{C}]^+$ et $[\text{CH}]^{2+}$, résultent de l'attache en N-terminal d'un groupe tris(2, 4, 6-triméthoxyphényl) phosphonium-acétyle (TMPP-Ac) (voir ci-après).

Les analyses de spectrométrie de masse sont réalisées en NANO-ESI-CID/MS-MS ainsi qu'en MALDI-PSD/MS.

7.2/ Etude de fragmentation Nano-Electrospray du glycopeptide de séquence TTSAP(GalNAc)

7.2.1/ Etude du précurseur monochargé $[MH]^+$

L'étude MS-MS du précurseur monoprotoné $[MH]^+$ de séquence TTSAP(GalNAc) à $m/z=679$ nécessite peu d'énergie collisionnelle et est réalisée à 20eV (initiée à environ 10eV) avec une pression de gaz de collision située entre 1.5 et 4.5×10^{-3} mBar. La fragmentation principale due au départ de l'unité N-acétyl Hexosamine fait naître un signal intense $[MH-203]^+$ mesuré à $m/z=476$ et un fragment mesuré à $m/z=204$ correspondant à l'ion oxonium (N-Acétyle Hexosamine). Un ion fragment de nature peptidique (sans la structure glycanique) est détecté à $m/z=361$ et correspond à l'ion b_4 . Il faut de plus noter la présence d'un signal de très faible intensité à $m/z=564$ relatif à l'ion glycopeptidique b_4+203 porteur de la structure N-acétyl Galactosamine. (**Figure 7.1**)

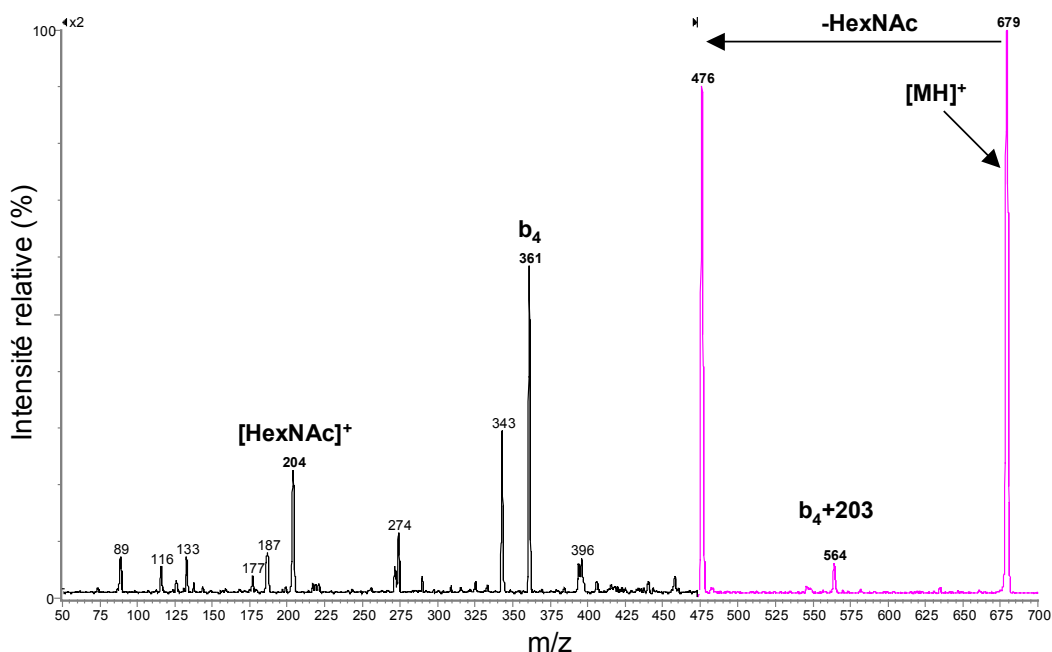


Figure 7.1: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé $[MH]^+=679$ du glycopeptide TTSAP(GalNAc).

La fragmentation préférentielle de l'espèce glycopeptidique monochargée $[MH]^+$ siège au niveau de la liaison glycannique.

7.2.2/ Etude du précurseur monochargé $[C]^+$

Un potentiel de cône de 90Volts met principalement en évidence l'ion précurseur monochargé à $m/z=1251$. La fragmentation de cette espèce monochargée se produit entre 60 et 66eV. Le spectre issu de la fragmentation du cation 1251 se caractérise par la détection de 2 fragments à $m/z=181$ et 573 relatifs au groupement phosphonium de dérivation N-terminale (respectivement $(\Phi(\text{MeO})_3)\text{CH}_2^+$ et $(\Phi(\text{MeO})_3)_3\text{P}^+\text{-CH}=\text{C}=\text{O}$). Des ions fragments de série $*a_n$ sont détectés en 646 et 602 (correspondant respectivement aux ions peptidiques $*a_1$ et $*a_1-44$) ; pour n supérieur ou égal à 2, les ions fragments sont dédoublés selon $*a_n$ et $*a_n+203$, ces derniers étant majoritaires et d'une intensité nettement supérieure.

On remarquera pour le précurseur de type $[C]^+$ l'absence de l'ion oxonium de la N-acétyl Hexosamine. Au regard de ces résultats, le site de glycosylation peut-être attribué à la thréonine 2 de la séquence. (*Figure 7.2*)

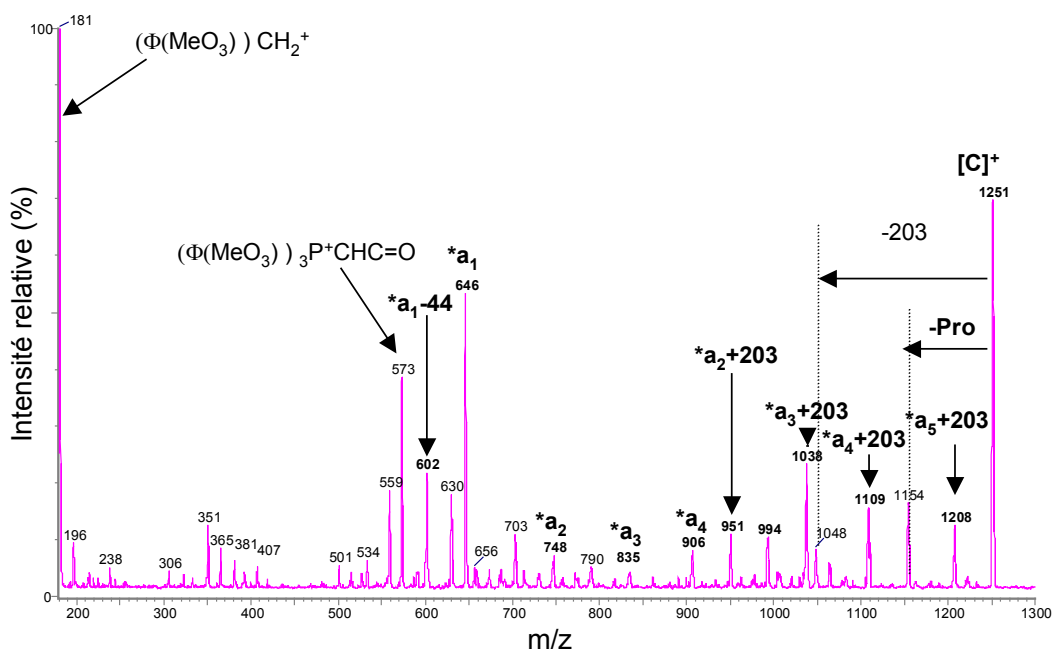


Figure 7.2 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé $[C]^+=1251$ de l'espèce glycopeptidique $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSAP}(\text{GalNAc})$.

De par l'obtention de fragments glycopeptiques, ce spectre de fragmentation de l'espèce monochargée $[C]^+$ nous autorise à insister sur l'importance du caractère fixe de la charge dans les mécanismes de fragmentation des glycopeptides.

7.2.3/ Etude du précurseur dichargé $[CH]^{2+}$

Le précurseur dichargé $[CH]^{2+}$ à $m/z=626$ est généré à un potentiel de cône de 40Volts. Pour sa fragmentation, nous avons adopté une énergie collisionnelle de 33eV. La fragmentation conduit à l'obtention de 2 ions majoritaires à $m/z=204$ et $m/z=1048$ correspondant respectivement à l'ion oxonium caractéristique de la N-acétyl Hexosamine et à l'ion $[C-203]^+$. Le spectre montre enfin une série ininterrompue d'ions fragments « peptidiques » $*a_n$ (dépourvus de glycanne) de $*a_1$ à $*a_5$ ainsi que quelques équivalents quant à eux porteurs du résidu N-acétyl Hexosamine. (**Figure 7.3**)

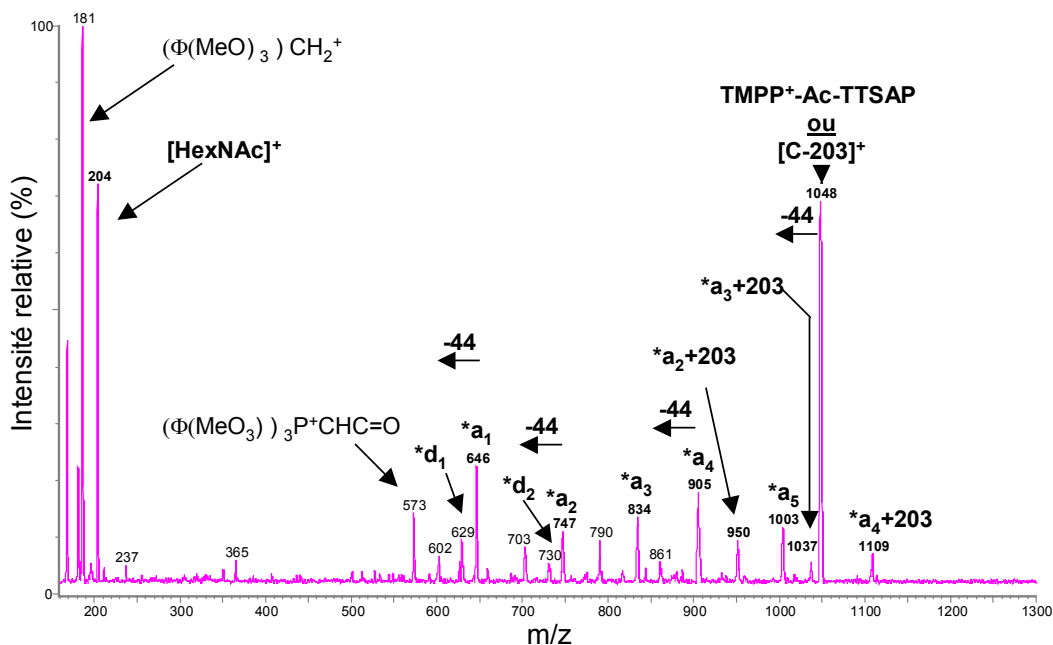


Figure 7.3 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[CH]^{2+}=626$ de l'espèce glycopeptidique $\text{TMPP}^+-\text{Ac-TTSAP}(\text{GalNAc})$.

L'étude de cette espèce dichargée $[CH]^{2+}$ souligne de par la nature des fragments générés l'importance de la charge mobile, ici le proton, sur les processus de fragmentation des glycopeptides N-dérivés.

7.2.4/ Etude de fragmentation MALDI-PSD/MS du glycopeptide de séquence TTSAP(GalNAc)

La spectrométrie de masse MALDI-MS offre de par la physique d'ionisation qui la caractérise la possibilité de générer essentiellement des espèces ioniques monochargées et permet de rassembler des informations de structure par re-focalisation des fragments post-source (PSD-MS). La spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS apparaît donc comme totalement adaptée à l'application ici développée.

L'ion de masse 1251 $[C]^+$ est sélectionné comme précurseur. (**Figure 7.4**)

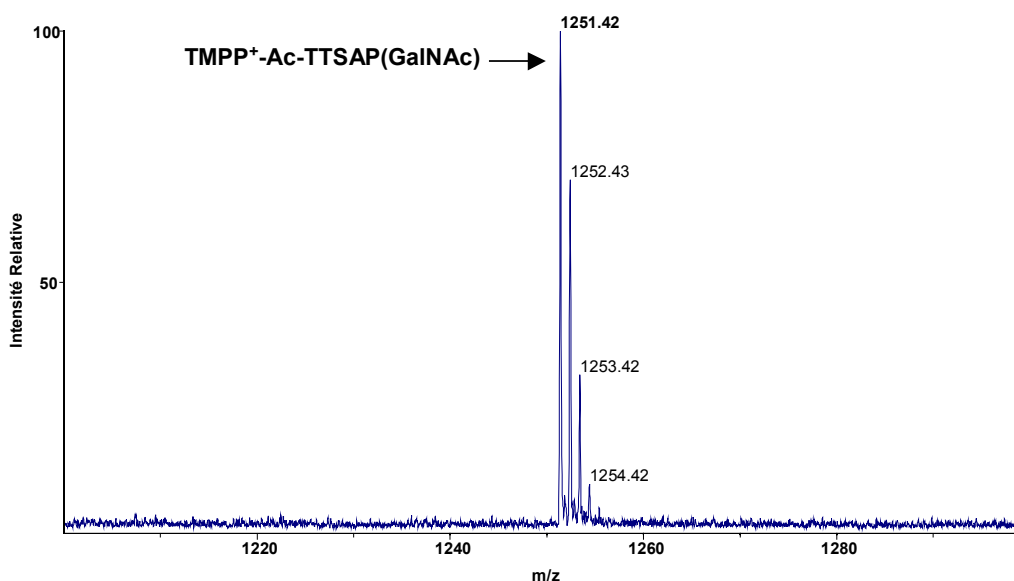


Figure 7.4 : Spectre MALDI-MS de l'ion $[C]^+=1251$ correspondant à l'espèce glycopeptidique TMPP⁺-Ac-TTSAP(GalNAc).

La fragmentation PSD conduit en basse masse à la détection d'un fragment à 573 relatif au réactif de dérivation (voir ci-dessus) et à l'obtention exclusive d'ions fragments glycopeptidiques de série $*a_n$ (série ininterrompue de $*a_1$ à $*a_5$). Enfin, il

faut remarquer la présence du signal lié à la perte de neutre CH_3CHO de la thréonine #2 et l'absence totale d'ions caractérisant une éventuelle perte de sucre. (**Figure 7.5**)

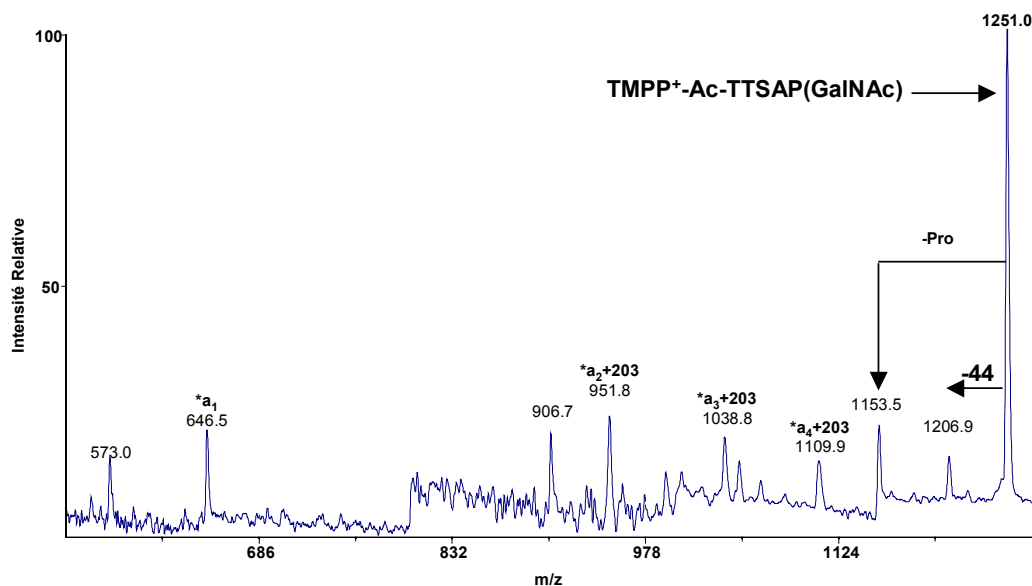


Figure 7.5 : Spectre de fragmentation MALDI-PSD/MS de l'ion $[\text{C}]^+=1251$.
(correspondant à l'espèce $\text{TMPP}^+\text{-Ac-TTSAP}$)

L'ionisation MALDI autorise la formation privilégiée d'un précurseur monochargé $[\text{C}]^+$. La fragmentation PSD de ce précurseur conduit exclusivement à des ions $*a_n$ porteurs du glycanne. La liaison glycopeptidique fait ici preuve d'une réelle stabilité (aucune perte de sucre) dans ces conditions d'analyse.

7.3/ Etude de fragmentation Nano-Electrospray/MS-MS du glycopeptide de séquence TTSAPTTTS (GalNAc)

7.3.1/ Etude du précurseur monochargé $[\text{MH}]^+$

Le glycopeptide TTSAPTTTS (GalNAc) de masse sur charge 968 est soumis à une fragmentation CID/MS-MS à 28eV. Comme dans le cas précédent (voir ci-dessus), la principale fragmentation provient de la perte du sucre et se matérialise par les ions 204 et 765 respectivement l'ion oxonium et l'ion $[\text{MH}-203]^+$.

Le spectre est dominé par des ions fragments « peptidiques » $*b_n$ en relation avec la perte préalable du sucre. (spectre non fourni).

La présence d'un proton mobile sur le glycopeptide facilite grandement la rupture de la liaison glycopeptidique et conduit à la formation d'ions fragments de type $*b_n$.

7.3.2/ Etude du précurseur monochargé $[C]^+$

L'étude de fragmentation de l'espèce monochargée à charge fixe du glycopeptide de séquence TTSAPTTT (GalNAc) à $m/z=1541$ est réalisée à une énergie de collision de 60eV. Le spectre montre une série d'ions fragments $*a_n$ (de $*a_1$ à $*a_7$, $*a_5$ et $*a_6$ ne sont toutefois pas présents) de nature glycopeptidique. En effet, ces fragments sont incrémentés de 203uma par rapport aux fragments peptidiques initiaux, ceci indiquant la conservation du glycanne lors de la fragmentation de ce précurseur monochargé. Les ions $[MH-203]^+$ et oxonium à $m/z=204$ ne sont logiquement pas détectés sur ce spectre. (**Figure 7.6**)

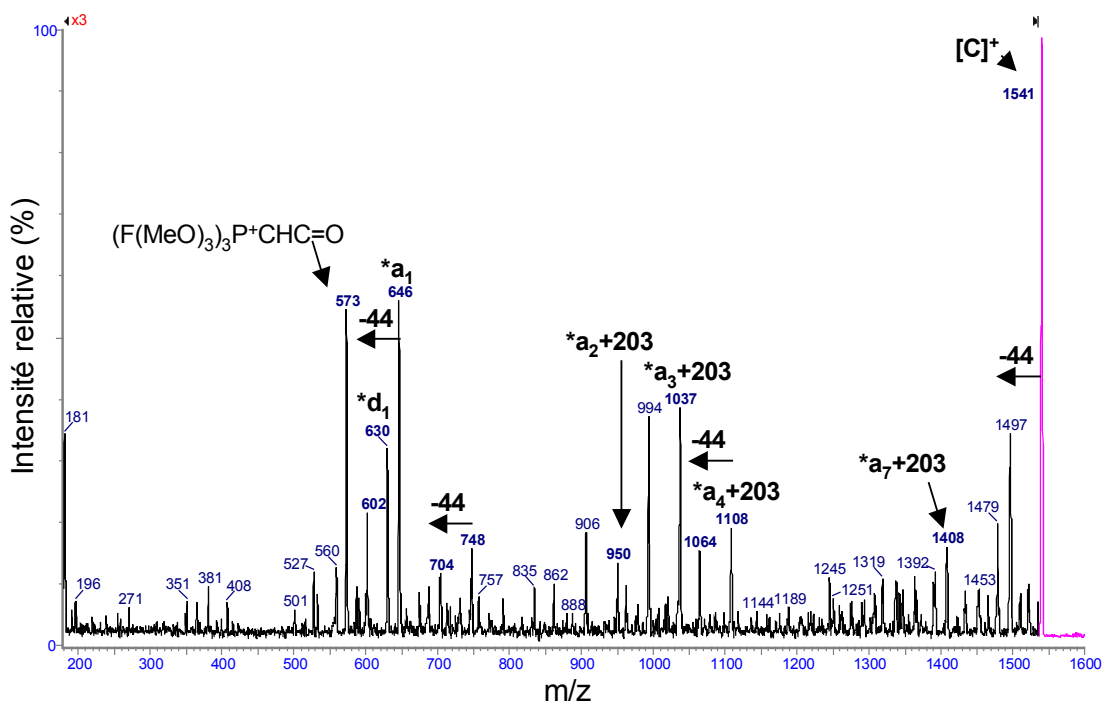


Figure 7.6 : Spectre Nanospray MS-MS du précurseur monochargé $[C]^+=1540$ de l'espèce glycopeptidique $TMPP^+-Ac-TTSAPTTT(GalNAc)$.

La nature fixe de la charge de ce précurseur permet encore une fois de conserver le glycanne lors de sa fragmentation.

7.3.3/ Etude du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}$

L'ion précurseur à $m/z=770$ est fragmenté à 33eV d'énergie de collision. Le spectre obtenu est principalement marqué par 2 pics très intenses à $m/z=204$ (non représentés sur la figure) et $m/z=1336.8$ représentatif du glycanne.

Les ions fragments détectés de part et d'autre du précurseur sont essentiellement des ions de série $*b_n$ de nature peptidique puisque ayant perdu le glycanne lors de l'événement de fragmentation. (**Figure 7.7**)

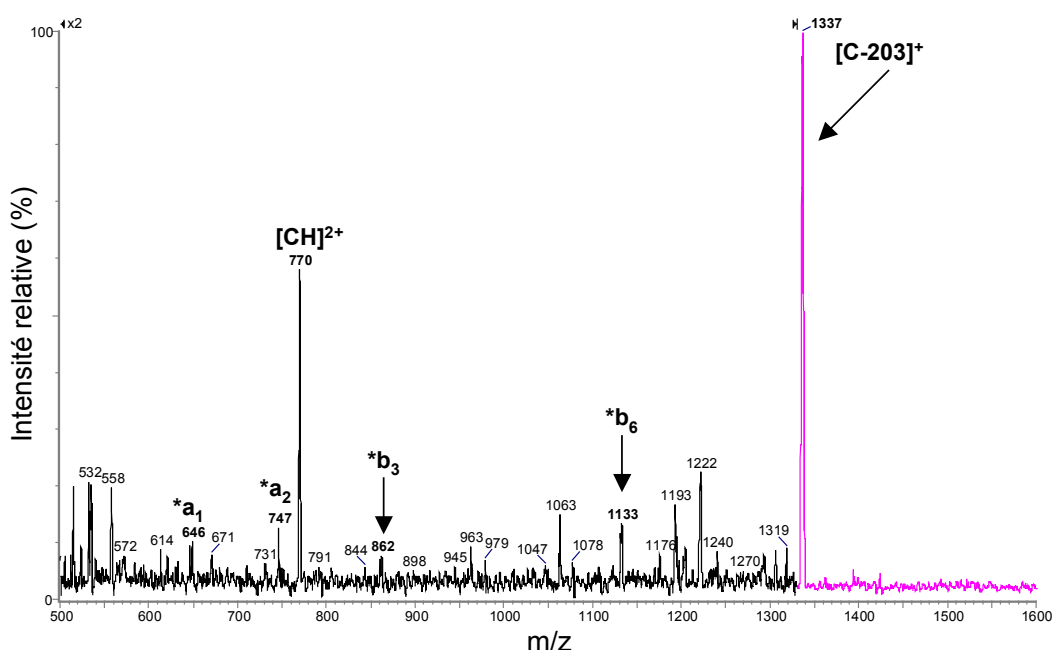


Figure 7.7: Spectre Nanospray MS-MS du précurseur dichargé $[\text{CH}]^{2+}=770$ de l'espèce glycopeptidique $\text{TMPP}^+-\text{Ac-TTSAPPTS}(\text{GalNAc})$.

La fragmentation de l'espèce dichargée, de par la présence d'un proton mobile, conduit à la perte du sucre. La longueur du squelette peptidique et l'état de charge de l'ion parent favorisent la formation d'ions fragments de série $*b_n$.

7.3.4/ Etude de fragmentation MALDI-PSD/MS du glycopeptide de séquence TTSAPTTT(GalNAc)

Une analyse PSD-MS est réalisée sur le précurseur de masse 1540.3 relatif au glycopeptide TTSAPTTT(GalNAc) porteur à son extrémité N-terminale d'un groupement tris(2,4,6 triméthoxyphosphonium) acétyle-. (**Figure 7.8**)

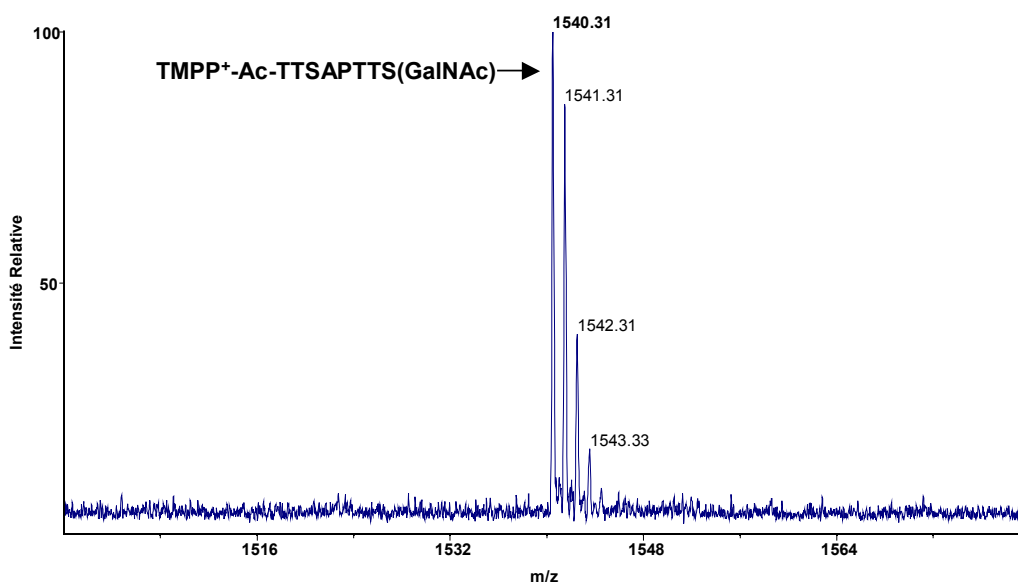


Figure 7.8 : Spectre MALDI-MS de l'ion $[C]^+=1540.3$ correspondant au glycopeptide TTSAPTTT(GalNAc) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

Le spectre confirme les résultats obtenus précédemment avec le même type de précurseur $[C]^+$: détection de l'ion à $m/z=573.0$ (relatif au groupement phosphonium de dérivation) et obtention d'une série continue d'ions fragments $*a_n$ (de $*a_1$ à $*a_8$) avec incrément de masse relatif à la N-Acétyle Galactosamine à partir du fragment $*a_2$. Il est à noter qu'aucune perte de sucre et fragments associés à ce phénomène n'est détectée sur ce spectre. (**Figure 7.9**)

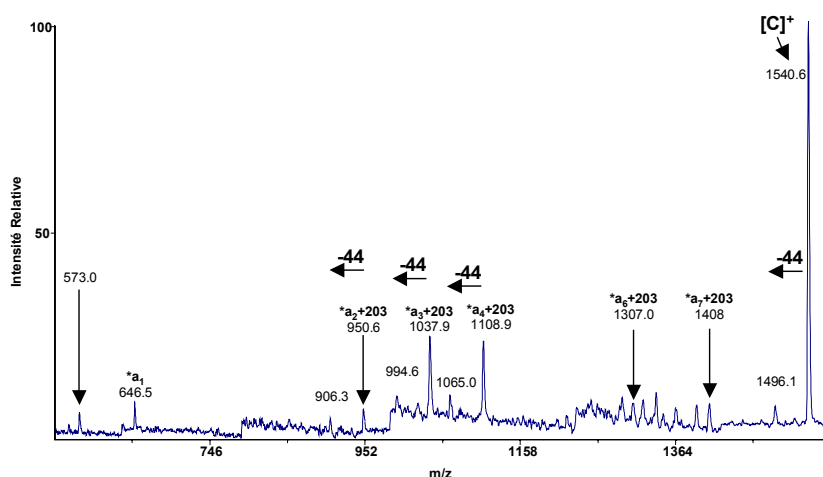


Figure 7.9: Spectre de fragmentation MALDI-PSD/MS de l'ion $[C]^+ = 1540.6$ résultant de la dérivation N-terminale du glycopeptide TTSAPPTS(GalNAc) par le réactif TMPP-AcOSu.

La présence d'une charge fixe sur un glycopeptide a un effet stabilisant fort et empêche la rupture de la liaison glycopeptidique et le départ du glycanne.

7.5/ En résumé...

Cette étude nous permet donc de remettre en cause la « labilité » de la liaison glycopeptidique, notion plus que relative avancée jusque là dans la littérature. Il ressort de ce travail l'importance prépondérante de la nature de la charge dans les mécanismes de fragmentation intéressant des espèces O-glycopeptidiques.

En comparant les ions $[MH]^+$, $[C]^+$ et $[CH]^{2+}$, nous pouvons établir une corrélation entre la nature de la(les) charge(s) associée(s) à un précurseur et son comportement dissociatif. Ainsi, nous pouvons avancer que le principal événement de fragmentation siégeant au niveau des espèces glycopeptidiques à charges mobiles $[MH]^+$ et $[CH]^{2+}$ représente la perte de la structure glycanne. Ceci se matérialise sur les spectres par d'intenses signaux correspondant en basse masse à l'ion oxonium caractéristique des résidus de N-acétyl-Hexosamine et à l'ion pseudo-moléculaire après perte du glycanne détecté à $[MH-203]^+$.

Le précurseur monochargé $[MH]^+$ est doté d'un proton mobile qui peut se répartir de manière aléatoire sur la structure glycopeptidique. Il semble que ce proton

s'associe préférentiellement à la liaison glycopeptidique, provoquant des délocalisations électroniques et au final le départ de la structure glycanne (*Mirgorodskaya E et al, 1999*). **La présence d'une charge mobile sur un glycopeptide engendre donc un processus de fragmentation dirigé** (comme décrit précédemment sur le modèle peptidique (*Dongré AR et al, 1996*)).

Le précurseur dichargé $[CH]^{2+}$ est quant à lui composé d'une charge permanente à son extrémité N-terminale et d'une seconde charge positive matérialisée par un proton mobile. La « nature double » de ce précurseur dichargé favorise le mécanisme de fragmentation dirigé par la charge (CDF) au dépend du mécanisme de fragmentation indépendant de la charge (CRF). Malgré la charge fixe il est donc logique de remarquer la perte du glycanne et l'obtention de fragments $*b_n$ (en tous les cas pour les glycopeptides à longues chaînes).

Enfin, les ions glycopeptidiques monochargés $[C]^+$ se caractérisent par l'absence totale de mobilité de la charge (se traduisant par un moindre départ du sucre en NANO-ESI/MS-MS et par une absence totale de ce phénomène en PSD-MS). **La fragmentation de ces espèces passe par un mécanisme CRF dicté par une réaction de $\frac{1}{2}$ élimination avec départ d'hydrogène** (*Johnson RS et al, 1988*), (*Vath JE et al, 1990*) et conduit à l'obtention d'ions $*a_n$.

Ceci a pour effet principal de maintenir la liaison glycopeptidique comme en témoignent les spectres PSD de ces espèces monochargées dépourvus de tous signaux relatifs à la perte du sucre.

Fort de ces résultats, il semble essentiel de générer des ions monochargés dotés d'une charge fixe pour préserver la liaison glycopeptidique. En conséquence, la conjonction des techniques de dérivation à charge permanente (communément appelée charge piégée) et de la spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS (de par la physique même de la source d'ionisation) semble représenter une intéressante association pour l'étude structurale des composés O-glycopeptidiques.

Nous nous proposons donc logiquement d'utiliser cette démarche analytique dans le but de localiser des sites de glycosylation de O-glycopeptides.

Chapitre 8 :

Localisation de site(s) de O-glycosylation par dérivation
N-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

Chapitre 8 : Localisation de site(s) de O-glycosylation par dérivation N-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

8.1/Introduction

Le paragraphe précédent a montré l'importance de la nature de la charge dans les phénomènes de fragmentation des O-glycopeptides.

Comme une charge fixe conduit préférentiellement à un événement de type CRF et que ce type de fragmentation semble garantir la stabilité de la liaison glycopeptidique jusque là considérée comme instable, nous nous proposons de recourir aux techniques de dérivation à charge permanente pour étudier des glycopeptides et en localiser le(s) site(s) de glycosylation associé(s).

L'ensemble des résultats présentés résultent de réactions de dérivations N-terminales ([tris(2, 4, 6 triméthoxyphényl)phosphonium]acétyl (comme décrit au chapitre précédent)) des mélanges contenant à la fois le peptide accepteur et le(s) glycopeptide(s).

Puisque générer des précurseurs monochargés devient chose difficile dans une source Nanospray avec l'augmentation de la masse des composés à analyser et que de plus, ces mêmes précurseurs monochargés sont primordiaux à la tâche qui nous incombe, les analyses de spectrométrie de masse présentées dans la suite de ce manuscrit sont réalisées en mode MALDI-MS et MALDI-PSD/MS. En outre, nous noterons que les étapes de micro-purification chromatographique ne sont pas nécessaires à l'acquisition de résultats.

8.2/ Influence de la séquence en acide aminés

8.2.1/ Analyse PSD du composé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-GTTPSPVP}(\text{GalNAc})$

Le glycopeptide de séquence GTTPSPVP(GalNAc) est soumis à une dérivation N-terminale par action du réactif TMPP-AcOSu et fournit de ce fait l'ion précurseur monochargé $[\text{C}]^+$ à $m/z=1531$.

La fragmentation post-source de cette espèce glycopeptidique dérivée donne un spectre PSD des plus clairs avec détection exclusive d'ions fragments *a_n de *a_1 jusqu'à *a_7 . Les ions *a_4 et *a_6 correspondant à des résidus de proline ne sont pas détectés conformément aux données disponibles à ce sujet dans la littérature. La différence de masse de 304uma mesurée entre les fragments *a_2 à $m/z=703.7$ et *a_3 à $m/z=1008.0$ indique sans équivoque la présence du résidu de N-acétyl Galactosamine sur la thréonine #3 de la séquence. (**Figure 8.1**)

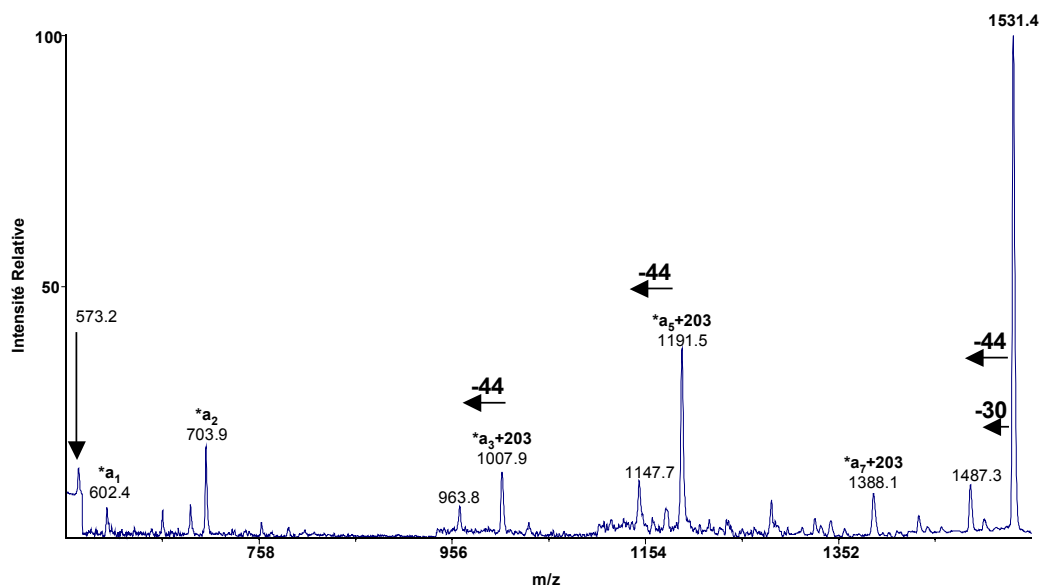


Figure 8.1 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[\text{C}]^+=1531$ correspondant au glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

La dérivation N-terminale par le TMPP-AcOSu d'espèces glycopéptidiques conduit, à partir de précurseurs monochargés de type $[C]^+$, à la formation exclusive d'ions fragments $*a_n$.

Les ions ainsi générés présentent un très bon rapport signal/bruit excepté pour les ions correspondant aux résidus de glycine (faible intensité) et de proline (pas détectés).

8.2.2/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-TTSTTSAP(GalNAc)$

Le glycopeptide de séquence TTSTTSAP(GalNAc) après dérivation N-terminale donne le précurseur monochargé de masse mesurée 1540 (**Figure 8.2**).

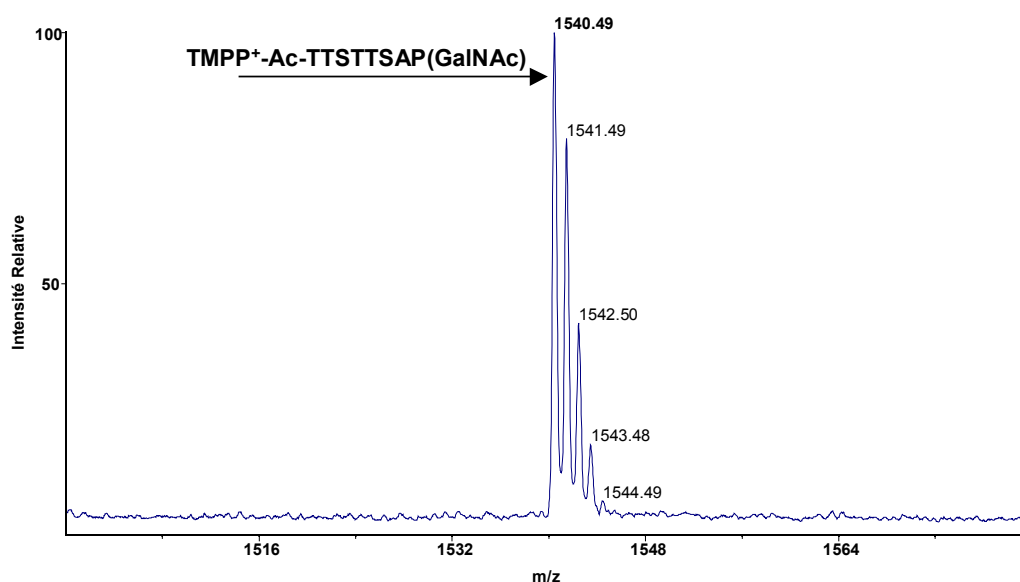


Figure 8.2 : Spectre MALDI-MS de l'ion $[C]^+=1540$ correspondant au glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

La fragmentation de ce précurseur donne une série ininterrompue d'ions $*a_n$ de $*a_1$ à $*a_7$ doublée d'une série d'ions $*a_n-44$ provenant de la perte de radicaux CH_3CHO . De par ces pertes, ce spectre est moins clair que le spectre PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTTPSPVP(GalNAc)$ mais permet tout de même de localiser aisément la thréonine #5 comme porteuse de la N-Acétyle Galactosamine par détection de l'ion à $m/z=1240.2$. (**Figure 8.3**)

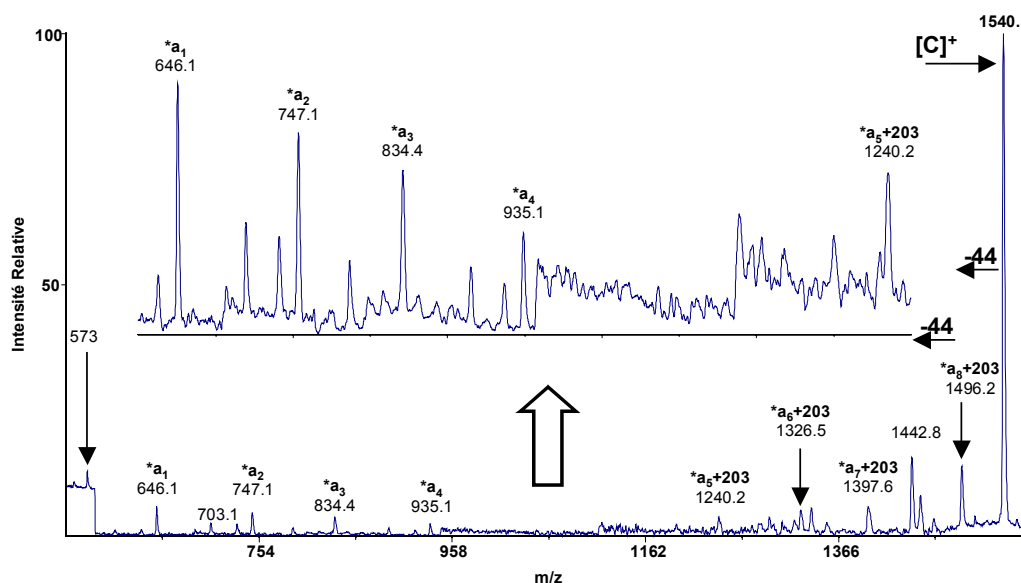


Figure 8.3 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+$ = 1540 correspondant au glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

La présence d'acides aminés hydroxylés comme la thréonine favorise les réarrangements des chaînes latérales et la perte de groupes $\text{CH}_3\text{CH}=\text{O}$ à partir des ions formés d'où la présence de 2 pics séparés de 44 uma pour la plupart des fragments (a_n et a_n-44).

La prévalence de ces acides aminés divise les signaux et complique les spectres.

8.3/ Influence du nombre de sites de glycosylation

8.3.1/ Analyse PSD du composé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)}$

Le spectre MALDI-PSD du glycopeptide dérivé $\text{TMPP}^+\text{-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)}$ montre un précurseur $[C]^+$ à $m/z=2277$. Une série d'ions fragments $*a_n$ de $*a_1$ ($m/z=602$, Gly) à $*a_{14}$ ($m/z=2135$, Ser) interrompue aux positions 4, 6 et 8 (correspondant aux ruptures de type $*a_n$ des prolines) est obtenue. Deux zones distinctes sont facilement discernables sur ce spectre : La zone de basse masse est caractérisée par d'intenses ions de rupture de la chaîne peptidique

de $*a_1$ à $*a_7$ permettant le séquençage du squelette peptidique du résidu de glycine jusqu'à la valine. La deuxième partie du spectre en haute masse est plus complexe dans son interprétation du fait de l'augmentation de masse des fragments correspondants plus lourds mais surtout de par la nature de la séquence en acides aminés (riche en sérine et thréonine). Quoi qu'il en soit et malgré la faible intensité des pics observés dans cette zone, la détection d'un ion informatif à $m/z = 1586.7$ localise le site d'attache de la N-acétyl Galactosamine au niveau de la thréonine #9 de la séquence. (**Figure 8.4**)

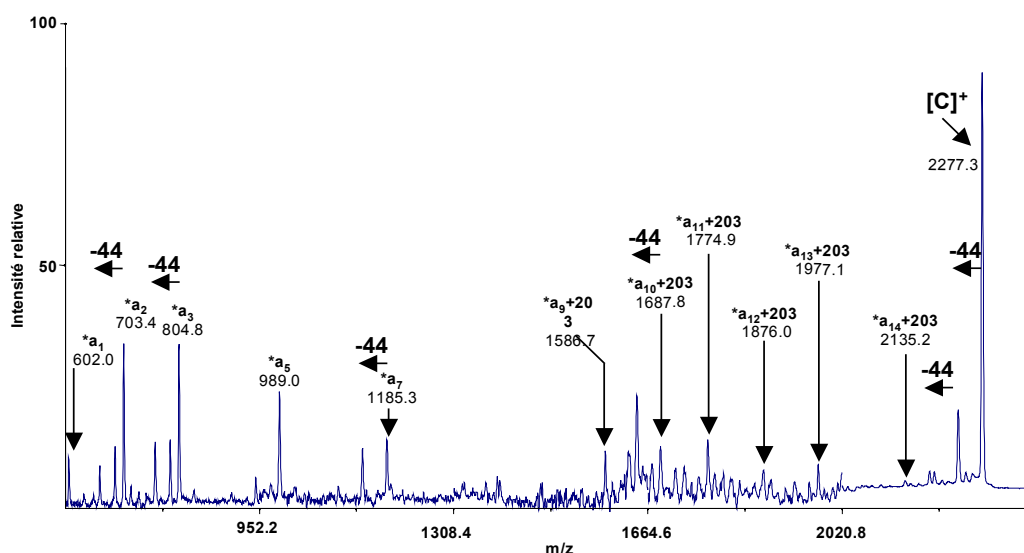


Figure 8.4 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2277.3$ correspondant au glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

8.3.2/ Analyse PSD du composé $TMPP^+ - Ac - GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_2$

Comparativement à l'application précédente, l'analyse PSD réalisée sur le glycopeptide $GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_2$ après dérivation N-terminale fournit un spectre sensiblement identique (même séquence peptidique) et permet par la nette détection des ions $*a_3$ en 1007.7 et $*a_{13}$ en 2180.9 de localiser les 2 sites de glycosylation sur les thréonines 3 et 13 de cette séquence. (**Figure 8.5**)

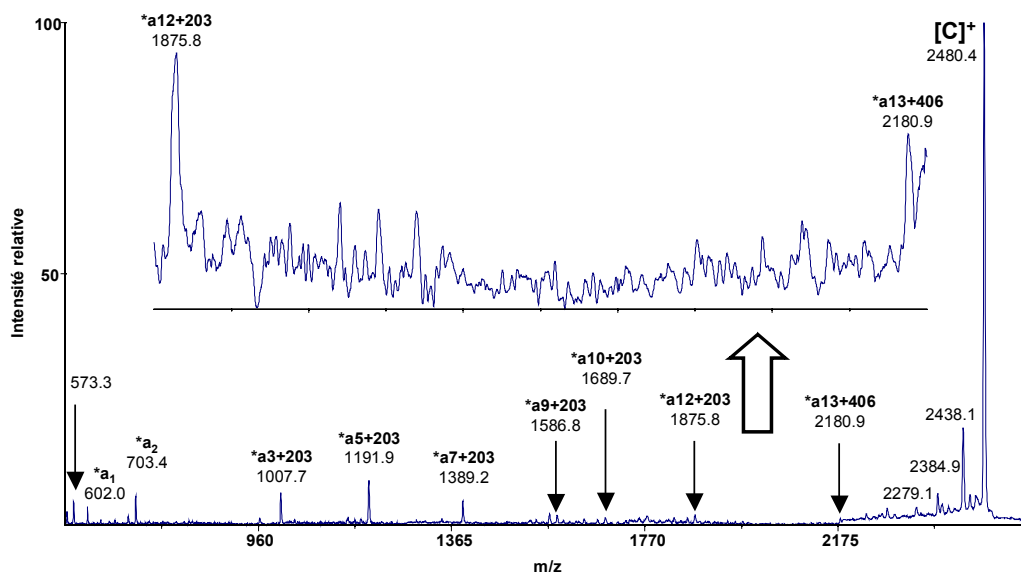


Figure 8.5 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2480.4$ correspondant au glycopeptide $GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_2$ après dérivation N-terminale par le réactif $TMPP-AcOSu$.

8.3.3/ Analyse PSD du composé $TMPP^+-Ac-GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_3$

Le glycopeptide $GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_3$ dérivé des séquences répétitives de MUC5AC contient 9 sites de O-glycosylation potentiels (6 thréonines et 3 sérines) sur un total de 16 acides aminés. Portant 3 structures glycaniques, cette structure peut statistiquement revêtir 504 formes isomères différentes. L'élucidation structurale de ce composé, passant par la localisation précise de ses 3 sites de glycoylation, représente donc un réel challenge analytique.

La forme N-terminale dérivée du glycopeptide est détectée à une masse relative de 2683uma (**Figure 8.6**).

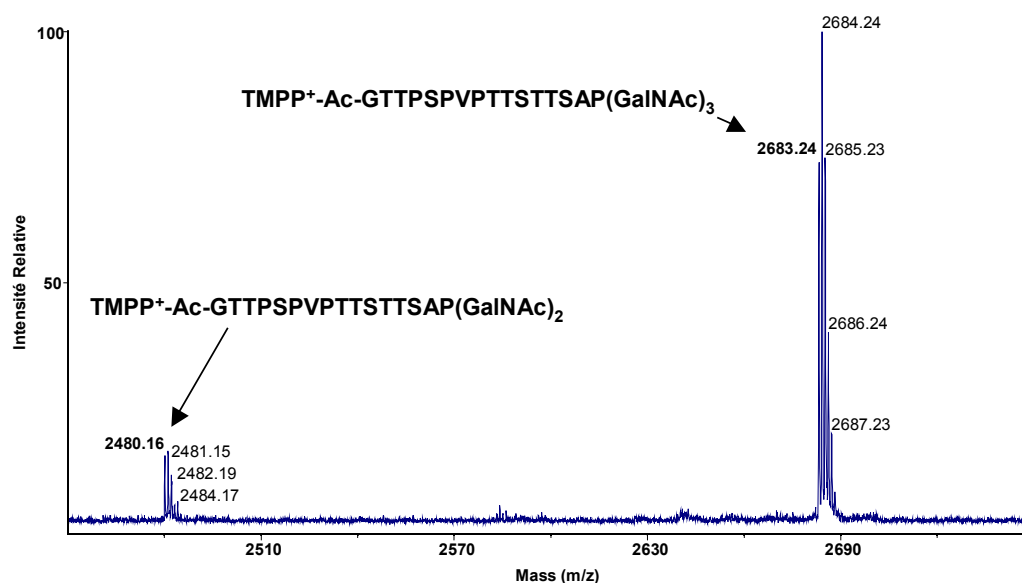


Figure 8.6 : Spectre MALDI-MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2683$ correspondant au glycopeptide **GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₃** après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

Comme décrit précédemment avec les autres structures glycopeptidiques étudiées, d'intenses fragments $*a_n$ de $*a_1$ ($m/z=602.6$) à $*a_{13}$ ($m/z=2383.5$) sont détectés. Aussi, les ions $*a_3$ ($m/z=1008.0$), $*a_{12}$ ($m/z=2079.2$) et $*a_{13}$ ($m/z=2383.5$) désignent sans équivoque les sites de glycosylation respectivement en 3, 12 et 13 sur la séquence. (**Figure 8.7**)

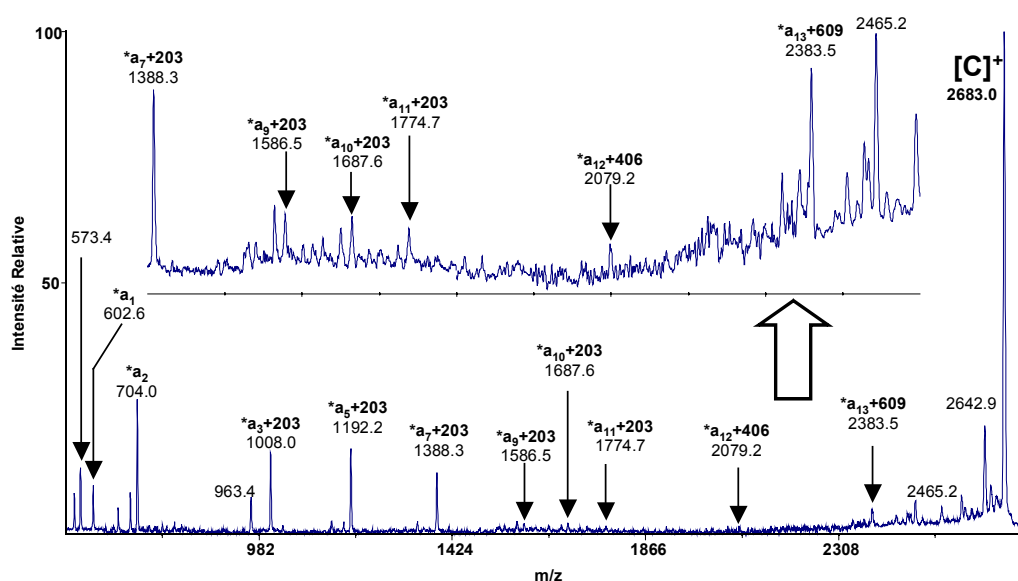


Figure 8.7 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2683.0$ correspondant au glycopeptide $GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)_3$ après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

L'augmentation de la masse des précurseurs à analyser due à la dérivation N-terminale et au nombre croissant de site de glycosylation aurait pu rendre délicate la fragmentation et empêcher le travail de localisation des sites de glycosylation.

Le succès obtenu avec le glycopeptide triplement glycosylé nous autorise tout de même à insister sur les potentialités certaines de la méthode proposée même pour des précurseurs glycopeptidiques de taille conséquente.

8.4/ Analyse PSD du composé $TMPP^+ - Ac - ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)$

Le spectre MALDI du glycopeptide $ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)$ après dérivation N-terminale par le $TMPP - AcOSu$ montre un précurseur $[C]^+$ à $m/z = 2317$. (Figure 8.8)

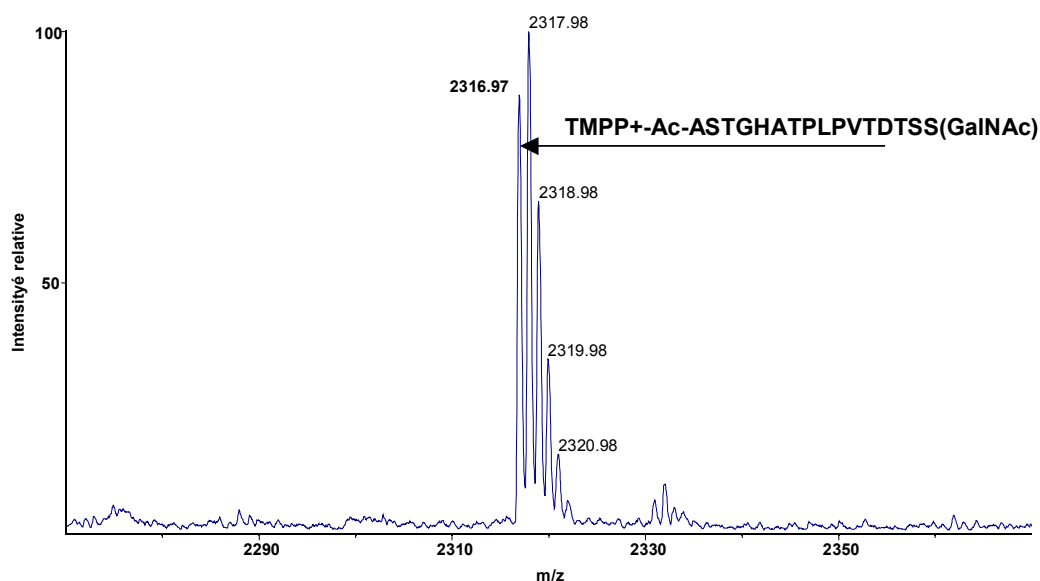


Figure 8.8 : Spectre MALDI-MS de l'ion monochargé $[C]^+$ à $m/z=2317$ correspondant au glycopeptide **ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc)** après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

Une analyse PSD-MS est d'abord réalisée sur l'entité peptidique après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-Ac-OSu. Le spectre de fragmentation du précurseur $[C]^+$ à $m/z=2113.4$ est principalement dominé par des ions $*a_n$ comme décrit plus haut pour ce genre de composé. Néanmoins, le spectre se caractérise par la présence en 1724 et 1750 et 1822 d'un triplet d'ions $*c_{12}$, $*d_{13}$ et $*b_{13}$ signature caractéristique de l'acide aspartique (Shen TL et al, 1999) (Sadagopan N et Watson JT, 2000). (Figure 8.9a)

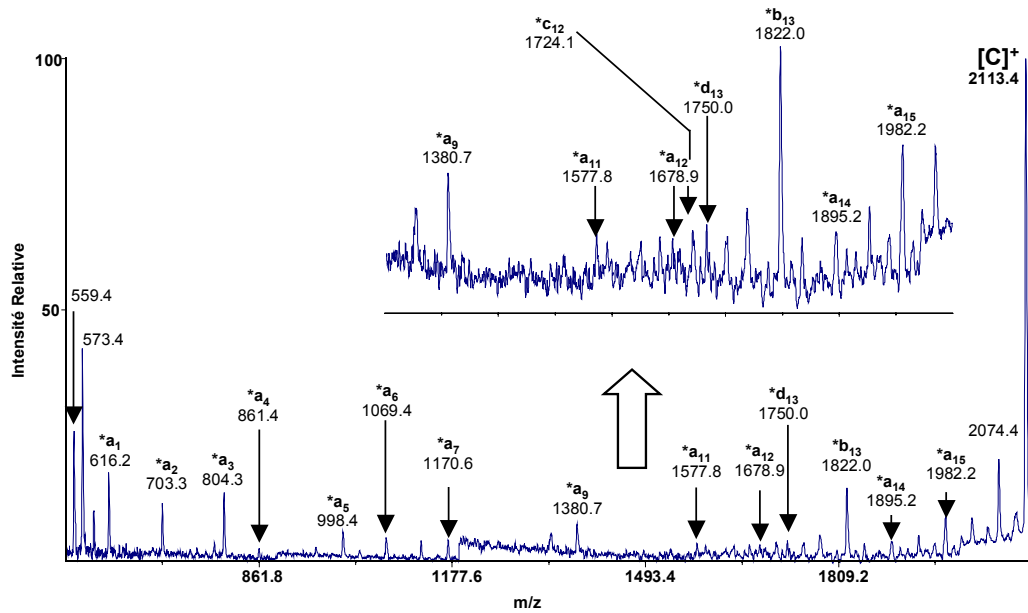


Figure 8.9a : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2113$ correspondant au glycopeptide ASTGHATPLPVTDTSS après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

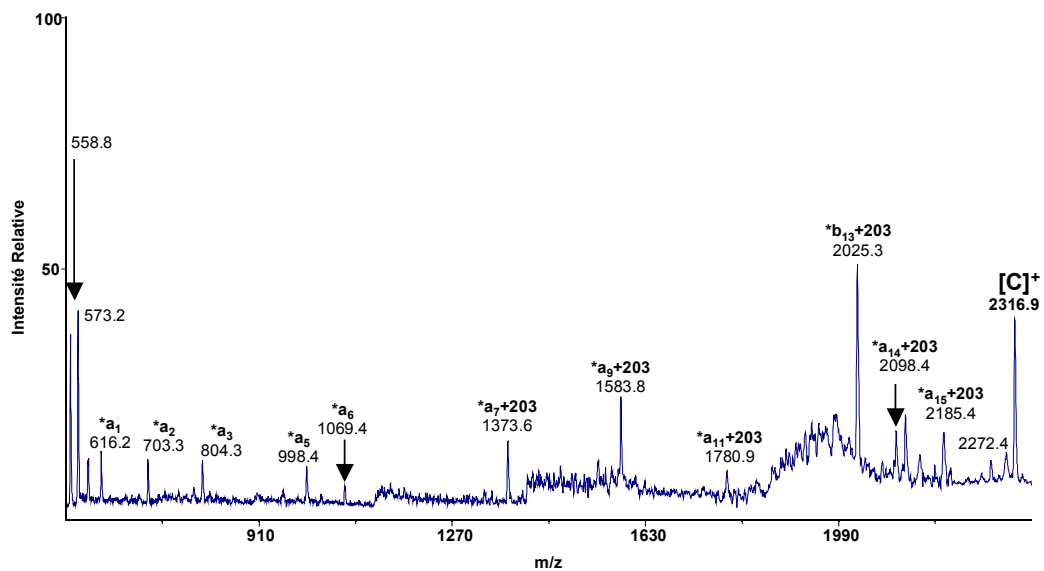


Figure 8.9b : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2317$ correspondant au glycopeptide ASTGHATPLPVTDTSS(GalNAc) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

Quant à la fragmentation PSD du glycopeptide après dérivation N-terminale à $m/z=2316.9$, elle montre en basse masse les ions caractéristiques du produit de dérivation N-terminale en 573 (voir chapitre précédent) ainsi qu'une série d'ions $*a_n$ de $*a_1$ à $*a_{15}$ (de 616.2 à 2185.4). Les ions fragments $*a_8$ et $*a_{10}$ ne sont pas détectés et semblent tous deux indiquer la présence de prolines.

La série $*a_n$ est interrompue au niveau du 13^{ème} résidu par la présence d'un ion très intense en 2025.1 correspondant au fragment $*b_{13}$ (*Shen TL et al, 1999*), (*Sadagopan N et Watson JT, 2000*). Enfin, l'ion de masse relative 1373.6, correspondant au fragment $*a_7+203$, nous indique la localisation du site de glycosylation sur la thréonine #7 de la séquence. (**Figure 8.9b**)

La fragmentation de cette espèce glycopeptidique de 16 acides aminés est beaucoup plus homogène que celle obtenue avec le glycopeptide long précédemment analysé.

La comparaison des séquences des deux derniers exemples montre à quel point les séquences répétitives de type -TTS- peuvent être contraignantes dans ce type d'analyse.

8.5/ Analyse PSD du composé TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)

Un glycopeptide de 16 acides aminés porteur d'un motif O-glycosidique de type N-acétyl Galactosamine-Galactose est soumis à une dérivation N-terminale et donne un précurseur dérivé à $m/z=2438$.

L'analyse PSD de ce composé permet de par la détection d'un fragment $*a_9$ à $m/z=1747.7$ la localisation du site de glycosylation sur la thréonine 9 de la séquence. (**Figure 8.10**)

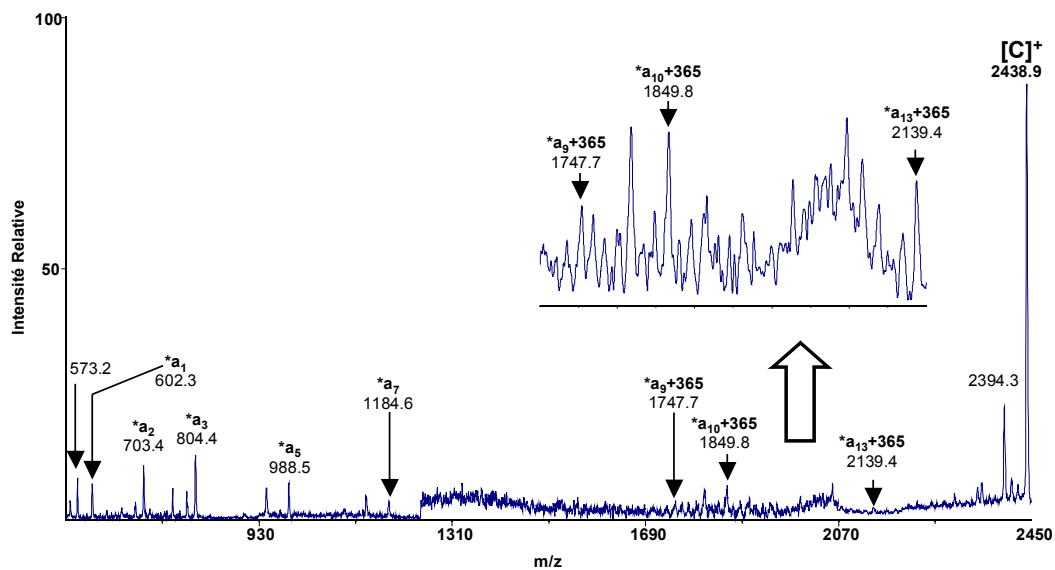


Figure 8.10 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé [C]⁺=2439 correspondant au glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

8.6/ Détermination de la séquence d'une réaction de glycosylation enzymatique d'un glycopeptide par dérivation N-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

Les glycopeptides sujets de notre étude sont issus de réaction de glycosylation enzymatique et l'analyse structurale de ces composés s'effectue à partir du mélange complexe constitué du peptide accepteur initial et des glycopeptides aux différents stades de glycosylation.

Un glycopeptide de structure GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)₂ résulte de l'action successive de 2 glycosyltransférases : une N-Acétylgalactosaminyl-transférase puis un Galactosyl-transférase.

Le spectre MALDI-MS (**Figure 8.11**) montre les différents intermédiaires de glycosylation qui conduisent finalement au glycopeptide complexe précédemment cité. L'ion $[MNa]^+$ détecté à $m/z=1929$ représente la forme porteuse de 2 résidus de N-Acétyl Galactosamine et la structure dérivée correspondante a déjà été élucidée précédemment (site de glycosylation en thréonine 3 et thréonine 13).

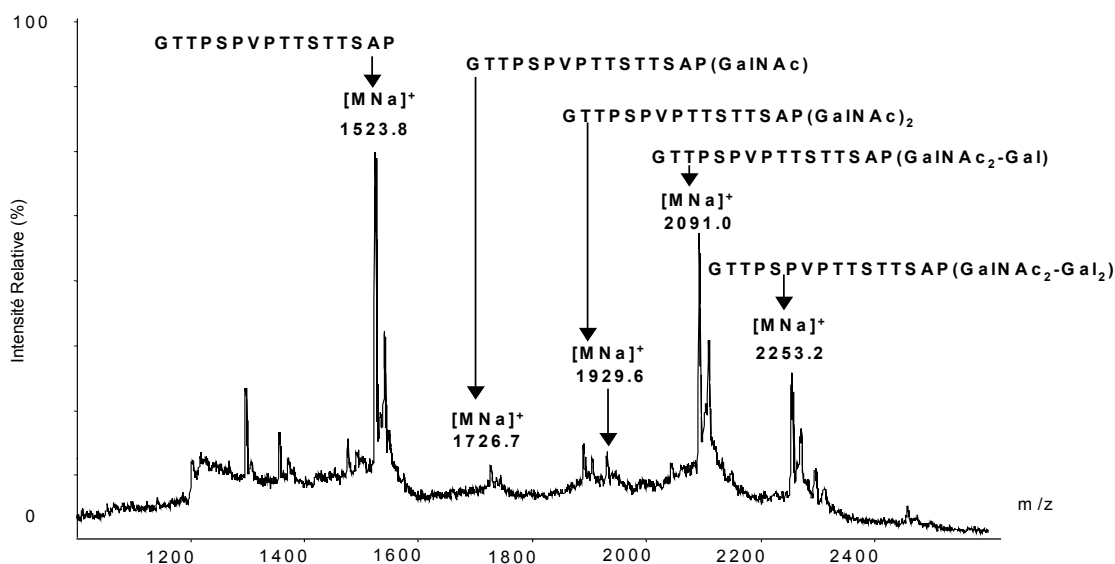


Figure 8.11 : Spectre MALDI-MS du mélange glycopeptidique de structure $GTTPSPVPTTSTTSAP(GaINAc-Gal)_2$ (à $m/z=2253.2$). Le pic détecté à $m/z=1524$ est relatif à l'ion $[MNa]^+$ du peptide accepteur. Les signaux détectés à 1726.7, 1929.6 et 2091.0 représentent les intermédiaires de glycosylation de ce peptide (respectivement porteurs d'1 résidu de GalNAc, de 2 résidus de GalNAc et de 2 résidus de GalNAc + 1 résidu de Gal).

L'ion $[MNa]^+$ de masse mesurée 2091 représente le glycopeptide décrit ci-avant mais porteur d'un résidu de galactose sur les 2 sites (3 ou 13) potentiellement saturables. Après dérivation N-terminale de cette espèce et détection d'un ion précurseur à $m/z=2641$, l'analyse PSD du précurseur $[C]^+$ nous fournit une série informative d'ions $*a_n$ en basse masse de $*a_1$ à $*a_7$. La différence de masse calculée entre les fragments $*a_2$ en 703.3 et $*a_3$ en 1007.4 de 304uma indique clairement la présence d'une thréonine modifiée par un seul et unique résidu de N-acétyl Galactosamine. Le site en 3 porte donc une GalNAc alors que le site en 13 porte une structure du type GalNAc-Gal. (**Figure 8.12**)

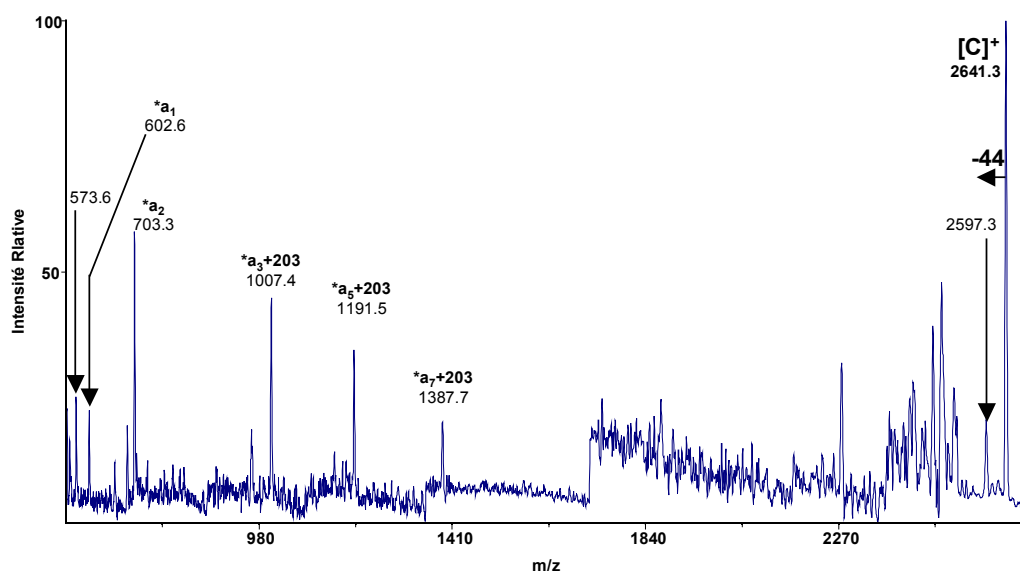


Figure 8.12 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé [C]⁺=2641 correspondant au glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc₂-Gal) après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

Enfin, l'ion [MNa]⁺ de masse mesurée 2253 après dérivation N-terminale (précurseur [C]⁺ à m/z=2803) est analysé en PSD-MS et présente un ion *a₃ en 1169.3 modifié par la présence du résidu GalNAc-Gal. (**Figure 8.13**)

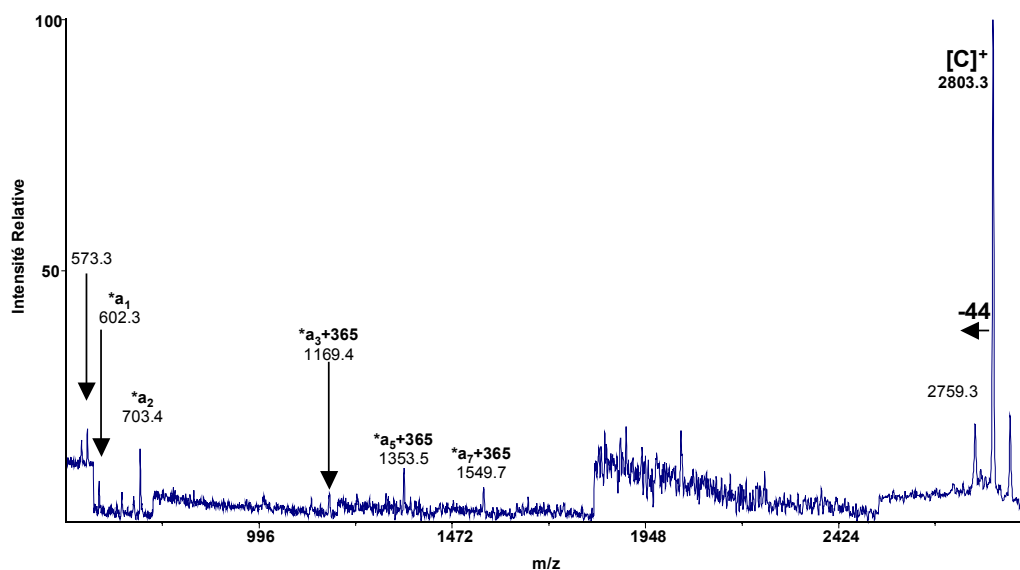


Figure 8.13 : Spectre MALDI-PSD/MS de l'ion monochargé $[C]^+ = 2803$ correspondant au glycopeptide $GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)_2$ après dérivation N-terminale par le réactif TMPP-AcOSu.

Le composé de structure $GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc-Gal)_2$ résulte donc de l'action séquentielle d'une N-Acétyl Galactosaminyl transférase d'abord au niveau de la thréonine 13 puis au niveau de la thréonine 3. L'action de la Galactosyl transférase suit le même schéma avec glycosylation totale du site en 13 suivie de la saturation du site en 3 comme en témoigne les spectres PSD des différents intermédiaires de glycosylation.

8.7/ En résumé...

La dérivation N-terminale sous forme [tris(2, 4, 6 triméthoxyphényl) phosphonium] acétyle- **représente, vu le travail présenté dans ce chapitre, une méthode plus que satisfaisante pour le séquençage des O-glycopeptides et la localisation des sites de glycosylation associés.**

Basée sur une simple réaction de couplage N-terminal et sur l'analyse PSD-MS du(des) composé(s) dérivé(s), la méthode proposée se caractérise essentiellement par une grande flexibilité. Aussi, elle est adaptable à l'étude de

composés d'origine biologique puisque sensible à la picomole et réellement qualitative de par sa spécificité (en interdisant toute surestimation du nombre de sites de glycosylation).

Adaptable à de nombreux types de O-glycopeptides (voir ci-dessus) et autorisant l'étude de composés en mélange, **la dérivation N-terminale à charge piégée se place comme une alternative intéressante aux méthodes de β -élimination.**

Nous pouvons toutefois avouer une limite des plus logiques de cette méthode de localisation utilisant la dérivation N-terminale : l'augmentation de la masse consécutive à la dérivation N-terminale rend l'analyse des glycopeptides lourds délicate ; dans ce cas la fragmentation de ces composés devient difficile tant d'un point de vue énergétique que d'un point de vue formation d'ions diagnostics de m/z élevés (qui présentent alors des rapports signal/bruit très faibles). Pour des structures complexes, initialement de haut poids moléculaire et de charge glycanique conséquente, la dérivation à charge fixe carboxy-terminale peut alors apporter de nombreuses informations.

Chapitre 9 :

Localisation de site(s) de O-glycosylation par dérivation
C-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

Chapitre 9 : Localisation de site(s) de O-glycosylation par dérivation C-terminale et spectrométrie de masse MALDI-PSD/MS

9.1/Introduction

Suivant la même logique que son homologue amino-terminal, la dérivation C-terminale doit naturellement permettre de générer la même qualité d'informations glycopeptidiques.

Elle peut simplement se placer en méthode de contrôle dans la confirmation de résultats obtenus par dérivation N-terminale ou peut, beaucoup plus pertinemment, fournir des informations complémentaires. Nous nous proposons dans cette partie d'utiliser ce type de dérivation afin d'en souligner tous les avantages.

9.2/ Synthèse du réactif de dérivation C-terminale

La synthèse du bromure de 2-aminoéthyltriphénylphosphonium, réactif de dérivation C-terminale, est réalisée en deux étapes conformément au protocole initialement proposé par Wagner (*Wagner DS et al, 1991*). La première de ces deux étapes par action de dibromoéthane et de triphénylphosphine voit naître le 2-bromoéthyl-triphénylphosphonium de masses 369/371Da (isotopes 79 et 81 du Brome). La suite de la synthèse voit intervenir un large excès (15x) d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) pour aboutir au produit final de la réaction : le bromure de 2-aminoéthyl-triphénylphosphonium (TPP-Et-NH₂) de masse 306Da. (**Figure 9.1**)

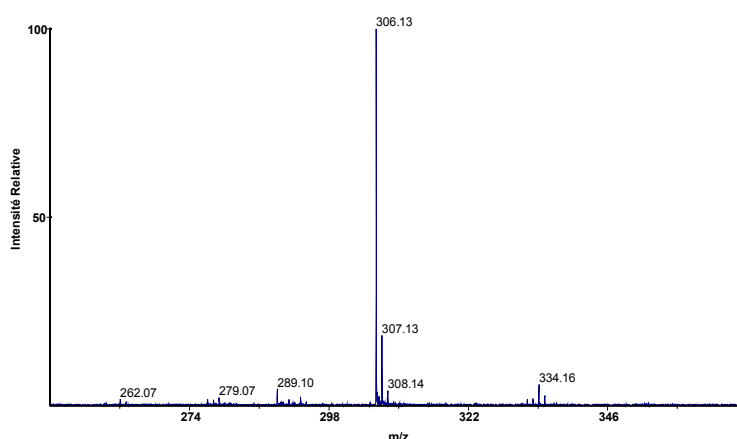


Figure 9.1 : Spectre MALDI-MS, contrôle de synthèse du bromure de 2-aminoethyltriphénylphosphonium ($[C]^+$ =306Da).

La dérivation C-terminale des glycopeptides d'intérêt est réalisée par action conjointe de TPP-Et-NH₂ (10µl) et d'une solution à 10nM de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) à pH=5 (10µl) pendant 45minutes à 1heure à température ambiante et sous agitation (bain ultrasonique).

9.3/ Dérivation C-terminale à charge permanente : séquençage glycopeptidique et localisation des sites de O-glycosylation associés

9.3.1/ Etude MALDI-PSD/MS du composé (GalNAc)GTPSPVP-NH-Et-TPP⁺

La dérivation C-terminale par le bromure de 2-aminoéthyltriphénylphosphonium du glycopeptide de séquence GTPSPVP(GalNAc) conduit à la détection sur le spectre de l'ion précurseur $[C]^+$ à m/z=1245. (**Figure 9.2**)

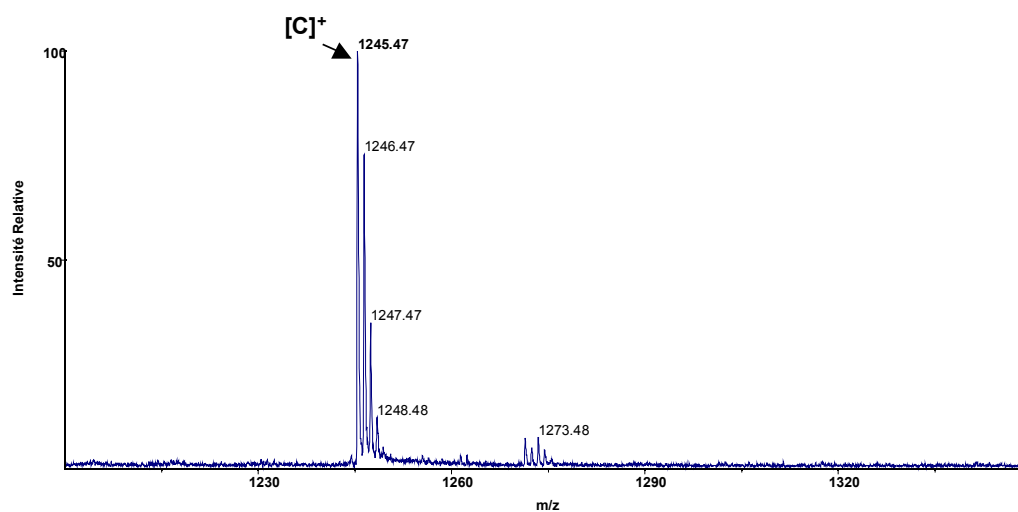


Figure 9.2 : Spectre MALDI-MS du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc) après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, [C]⁺=1245.

L'étude de fragmentation en mode PSD de cet ion précurseur met en avant, en basse masse, un fragment majoritaire à m/z=289 caractéristique du réactif de dérivation C-terminale ainsi qu'une série complète d'ions fragments *y_n de *y₁ à *y₆ (de 402.8 à 1087.6). La différence de masse calculée de 304.3uma entre les fragments vicinaux *y₅ et *y₆ permet de localiser le résidu N-acétyl Galactosamine (en accord avec les données obtenues par dérivation N-terminale) au niveau de la thréonine#3 de la séquence de ce glycopeptide. (**Figure 9.3**)

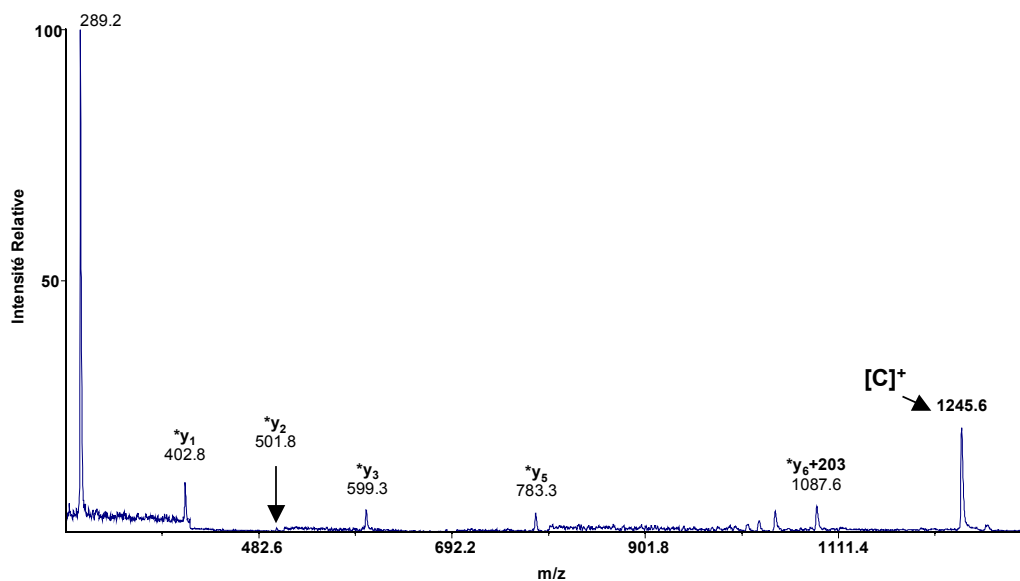


Figure 9.3 : Spectre MALDI-PSD/MS du glycopeptide GTTPSPVP(GalNAc) après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, fragmentation du précurseur monochargé [C]⁺=1245.

A noter : l'importance des ions *y₁, *y₃ et *y₅ correspondant aux résidus de proline de la séquence.

9.3.2/ Etude MALDI-PSD/MS du composé (GalNAc)TTSTTSAP-NH-Et-TPP⁺

Le glycopeptide de séquence TTSTTSAP(GalNAc) soumis à une réaction de dérivation C-terminale est représenté sous la forme de son précurseur [C]⁺ à m/z=1255. (**Figure 9.4**)

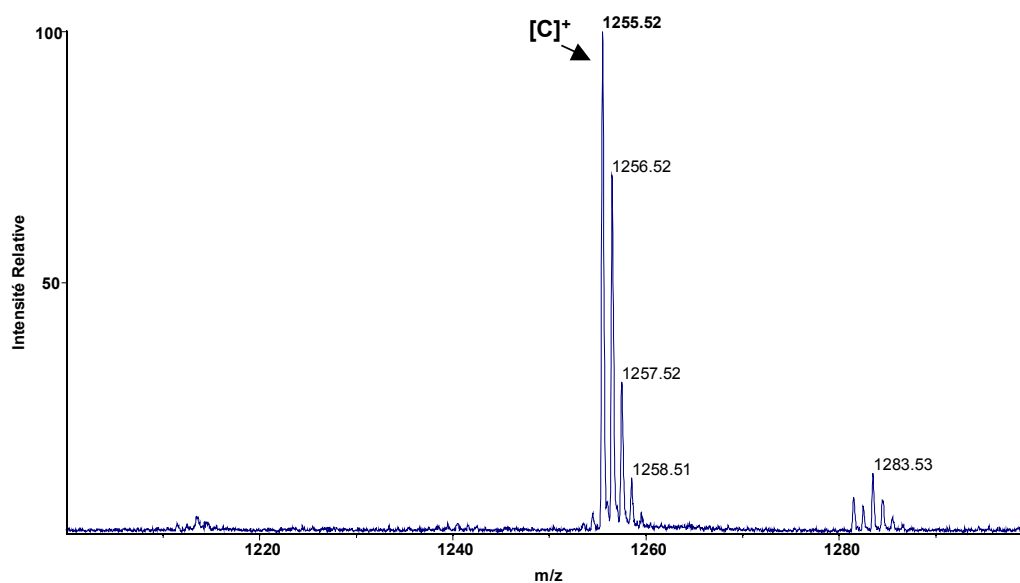


Figure 9.4 : Spectre MALDI-MS du glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, [C]⁺=1255.

La fragmentation PSD-MS de ce précurseur monochargé fournit des ions fragments *y_n de *y₁ à *y₇ de manière ininterrompue. Les fragments *y₄, *y₅, *y₆ et *y₇ mesurés respectivement à m/z=865.7, 965.9, 1053.7 et 1155.5 présentent tous les 4 un incrément de masse de 203uma consécutif à la fixation d'une entité de N-Acétyl Galactosamine sur la thréonine #5. Le spectre PSD présenté ici permet, de par l'absence totale de ruptures de liaison GalNAc-Ser/Thr, la localisation, en accord avec les données générées par la dérivation N-terminale, du site de glycosylation. **(Figure 9.5)**

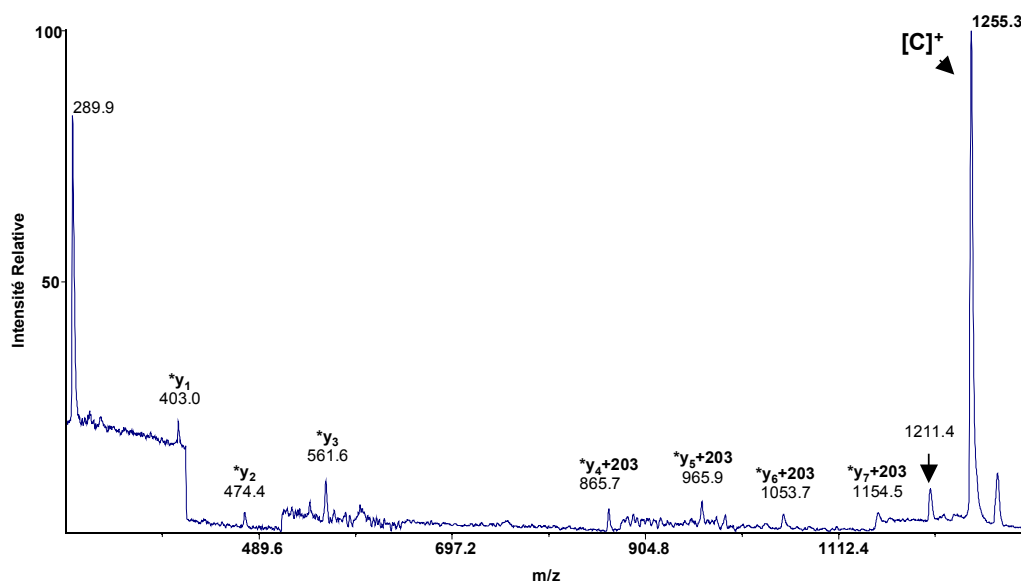


Figure 9.5 : Spectre MALDI-PSD/MS du glycopeptide TTSTTSAP(GalNAc) après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, fragmentation du précurseur monochargé [C]⁺=1255.

9.3.3/ Etude MALDI-PSD/MS du composé (GalNAc)₂GTTPSPVPTTSTTSAP-NH-Et-TPP⁺

La structure complexe de ce glycopeptide d'intérêt impose l'analyse préalable du peptide correspondant présent dans le même échantillon.

La dérivation C-terminale de ces deux composés conduit à l'obtention de deux signaux à m/z=1788 et m/z=2194 (**Figure 9.6**)

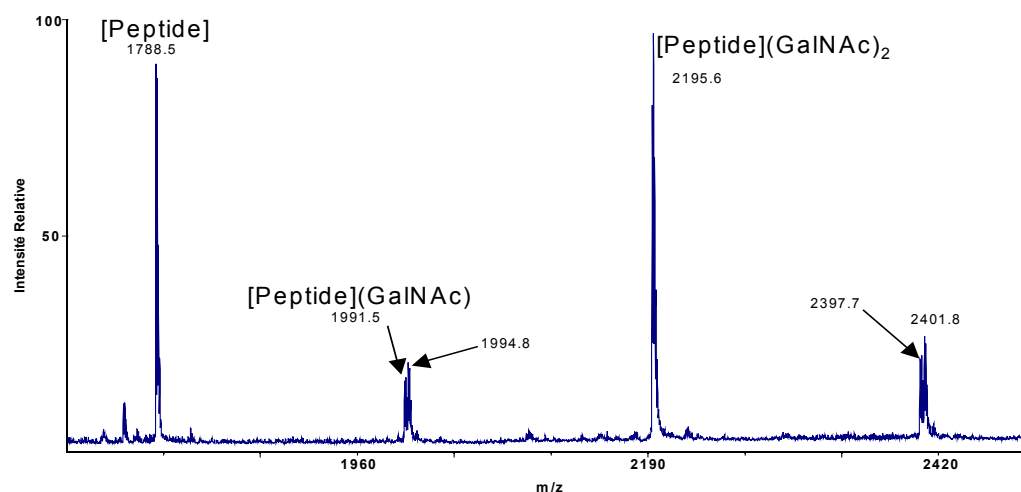


Figure 9.6 : Spectre MALDI-MS du glycopeptide GTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, [C]⁺=2194.

Le signal [C]⁺=1788 correspond à la forme peptidique initiale accompagnant l'espèce di-GalNAc après dérivation C-terminale.

La fragmentation du peptide ainsi dérivé à m/z=1788 donne une séquence ininterrompue d'ions *y_n de *y₁ à *y₁₄. Des « blancs » dans la séquence apparaissent néanmoins entre les fragments *y₇, *y₉, *y₁₁ et *y₁₃, ils correspondent aux associations thréonine/proline (entre 7 et 9), valine/proline (entre 9 et 11) et enfin serine/proline entre 11 et 13) et permettent tout de même le séquençage C-terminal complet de la structure peptidique. (**Figure 9.7**)

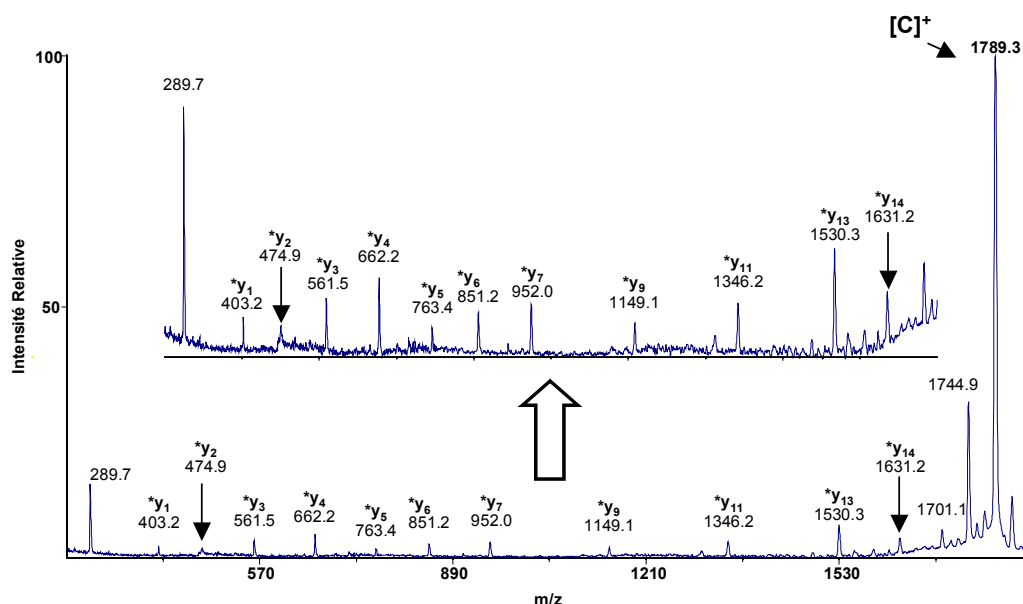


Figure 9.7 : Spectre MALDI-PSD/MS du peptide GTTPSPVPTTSTTSAP après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, fragmentation du précurseur monochargé [C]⁺=1788.

Disposant d'un tel schéma de fragmentation, l'étude de la structure glycopeptidique associée en est alors facilitée. En effet, la fragmentation suivie par le glycopeptide diglycosylé dérivé à m/z=2194 est, en tous points, comparable au modèle peptidique : la simple comparaison des spectres et la détection d'un ion *y₄ à m/z=865.2 et d'un ion *y₁₄ (certes faible) à m/z= 2037.0 permet de localiser les 2 sites de glycosylation associés sur la thréonine #13 et sur la thréonine #3 (confirmant de nouveau les données obtenues par dérivation N-terminale de ce même composé). **(Figure 9.8)**

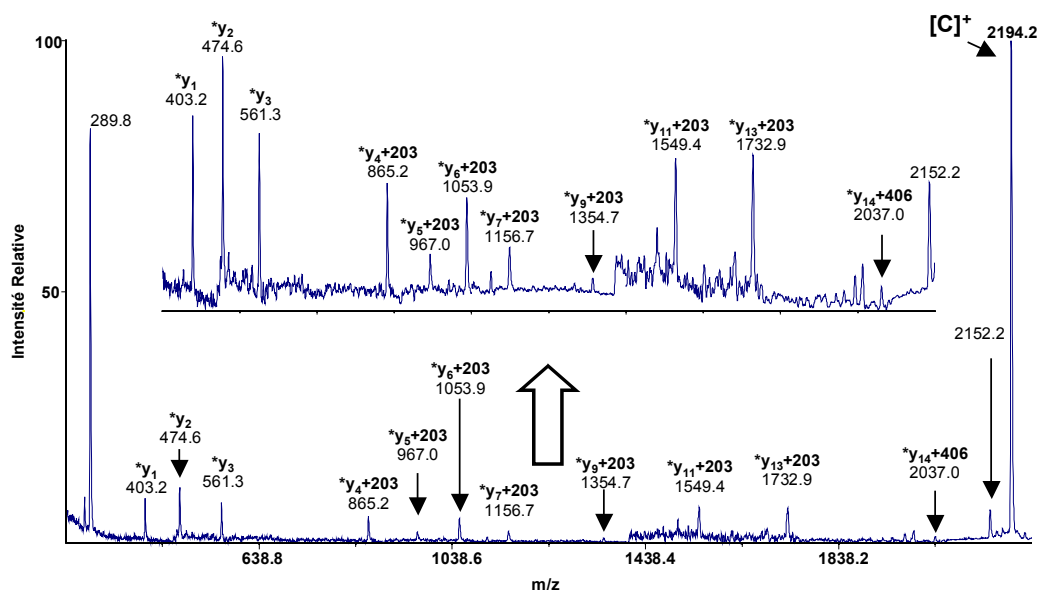


Figure 9.8 : Spectre MALDI-PSD/MS du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP, fragmentation du précurseur monochargé [C]⁺=2194.

9.4/ Note expérimentale : réaction d'addition non-spécifique du bromure de 2-amino-triphénylphosphonium

La dérivation C-terminale est basée sur l'action conjointe à pH acide (pH=5) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de bromure de 2-aminoéthyl triphénylphosphonium. Ce sel de phosphonium, par élimination de NH₃ et par l'intermédiaire de sa forme vinylique activée (de type ((Φ)₃)P⁺CH=CH₂) peut être à l'origine de réactions de dérivations N-terminales (*Wagner DS et al, 1992*) et les conditions réactionnelles comme la stoechiométrie ou le pH doivent être scrupuleusement contrôlées pour garantir un couplage exclusivement C-terminal.

9.4.1/ Condensation du DCC

L'utilisation du DCC semble permettre la spécificité réactionnelle précédemment citée, toutefois ce carbodiimide peut se condenser au glycopeptide d'intérêt comme en témoignent les signaux à $m/z=1995$, 2197 et 2401 (**Figure 9.9a**).

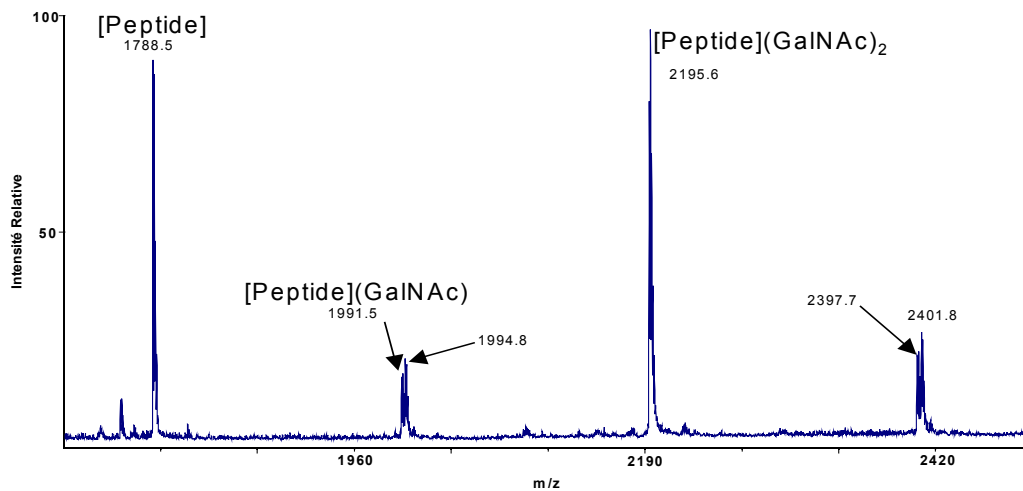


Figure 9.9a : Spectre MALDI-MS du glycopeptide GTTPSPVPTTSTTSAP(GalNAc)₂ après dérivation C-terminale par le dérivé NH₂-Et-TPP. Les signaux mesurés à $m/z=1994.8$, 2195.6 et 2401.8 confirment la condensation du dicyclohexyl-carbodiimide sur le glycopeptide.

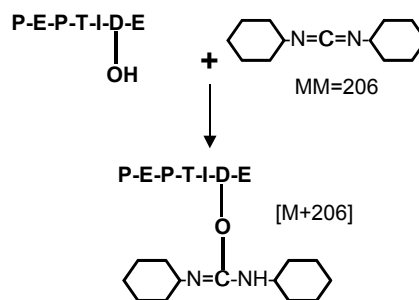


Figure 9.9b : Condensation non spécifique du DCC sur le squelette peptidique (réaction hypothétique).

L'addition non spécifique du DCC provoque une augmentation de masse de 206uma (**Figure 9.9b**) et cet incrément peut fort logiquement être confondu avec le gain de masse de 203uma relatif aux résidus de N-Acétyl galactosamine. Dans ces conditions, le pouvoir discriminant du sélecteur d'ions de l'analyseur de masse MALDI-TOF (TIS) n'est pas assez important pour séparer les 2 signaux distants de 3Da, l'analyse PSD se fait alors sur le massif composite et ne peut aboutir à des résultats recevables.

La dérivation C-terminale par action conjointe d'un sel de phosphonium et de dicyclohexyl-carbodiimide est possible mais délicate dans le cas d'échantillons en mélange et qui présentent des degrés de glycosylation variables. Concernant ce dernier aspect, il semblerait intéressant de pouvoir disposer d'un analyseur de masse plus discriminant tel que l'analyseur hybride Q-TOF ou encore l'analyseur en tandem TOF-TOF.

9.4.2/ Addition non-spécifique du bromure de 2-aminoéthyl triphénylphosphonium

Le réactif de dérivation C-terminal peut aussi, à lui seul, être responsable de réaction d'addition non-spécifique. Nous avons pu remarquer au cours de différentes expériences de dérivation notre incapacité à former des ions pendant l'analyse PSD sans pouvoir instantanément expliquer ce phénomène. Après analyse des massifs isotopiques, l'explication tient dans la nature du précurseur sélectionné :

Une dérivation C-terminale, de façon classique, aboutit à un signal $[M+288]^+$ relatif à l'addition spécifique du bromure de 2-aminoéthyl triphénylphosphonium sur l'extrémité carboxylique libre du squelette peptidique. La fragmentation PSD qui en résulte fait naître très naturellement des ions fragments C-terminaux de série *y_n autorisant à la fois le séquençage peptidique et la localisation des sites de glycosylation.

Cependant, dans de même conditions, la dérivation C-terminale peut conduire à l'obtention d'un précurseur $[M+289]^+$ (Figure 9.10a, b et c) qui résulte de l'addition non-spécifique d'un phosphonium quaternaire de structure indéterminée sur le squelette peptidique. Partant de ce précurseur indésirable, il est impossible de détecter des ions et les analyses PSD des espèces $[M+289]^+$ n'aboutissent pas. (spectre PSD non fourni)

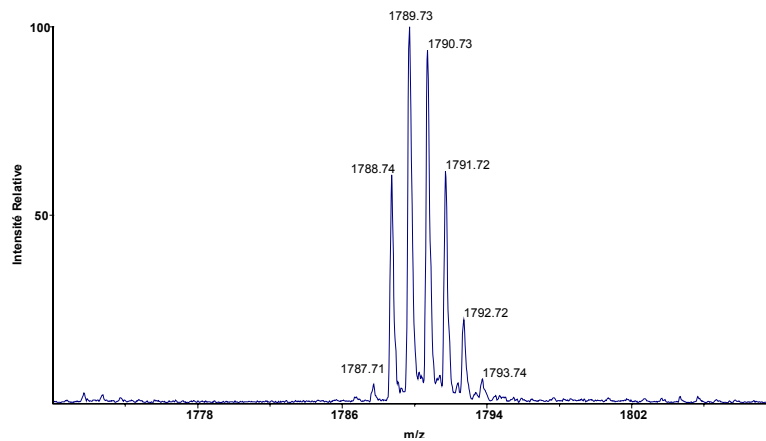


Figure 9.10a : Spectre MALDI-MS du précurseur monochargé $[C]^+=1788$ après dérivation C-terminale par le NH_2 -Et-TPP.

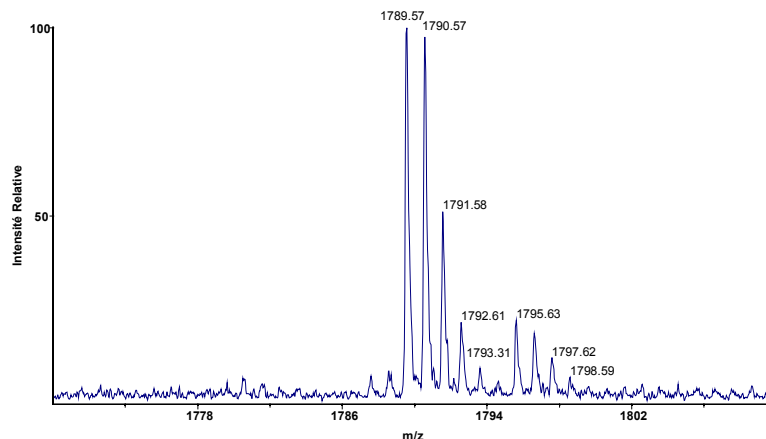


Figure 9.10b : Spectre MALDI-MS du précurseur monochargé $[C]^+=1789$ après dérivation C-terminale du peptide GTTPSPVPTTSTTSAP par le NH_2 -Et-TPP. L'analyse PSD de ce précurseur n'aboutit pas.

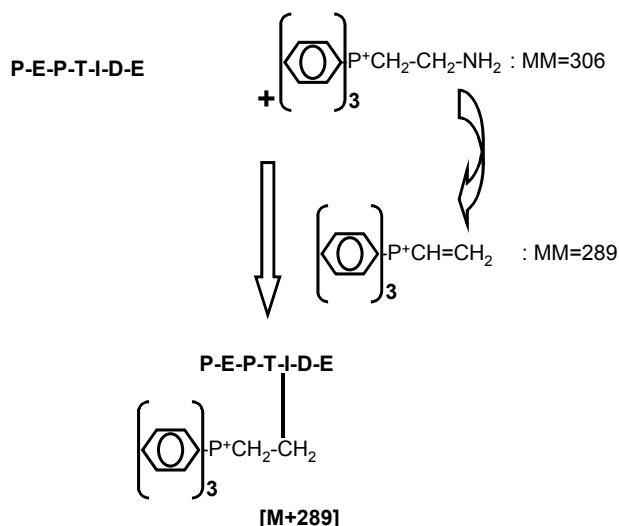


Figure 9.10c : Condensation non spécifique du 2-aminoéthyl-triphénylphosphonium sur le squelette peptidique (réaction hypothétique).

Nos observations personnelles sur la question des réactions de condensation non spécifiques peuvent ainsi appuyer les dires de Wagner et collaborateurs, avançant dans leurs travaux de 1991 les possibles réactions de l'aminoéthyl triphénylphosphonium avec les chaînes latérales des acides aminés acides. (*Wagner DS et al, 1991*)

9.5/ En résumé...

La fragmentation des espèces glycopeptidiques dérivées en C-terminal est gouverné par un mécanisme indépendant de la charge (CRF) comme en témoigne l'obtention exclusive d'ions fragments $*y_n$.

La dérivation C-terminale par action conjointe d'aminoéthyl TPP et de DCC permet, tout comme la dérivation N-terminale, le séquençage du peptide et la localisation précise des sites de glycosylation associés.

La technique présente donc un intérêt dans la confirmation de données générées par la dérivation N-terminale ou peut représenter un outil d'investigation à part entière dans le cas des glycopeptides les plus complexes (action conjointe des dérivations N- et C-terminale pour les glycopeptides à longues chaînes ou à multiples sites de glycosylation).

A noter : les inconvénients liés à la méthode de dérivation C-terminale en terme de spécificité de réaction et d'additions non-spécifiques.

Chapitre 10 :

Etude de la Fragmentation Préférentielle de la Liaison Glycopeptidique
Marquage des Hydrogènes Mobiles au Deutérium

Chapitre 10 : Etude de la Fragmentation Préférentielle de la Liaison Glycopeptidique : Marquage des Hydrogènes Mobiles au Deutérium

10.1/ Introduction

Nous avons pu mettre en évidence dans les paragraphes précédents des comportements de fragmentation différents en fonction de l'état de charge des ions précurseurs glycopeptidiques. Dès l'apparition d'une charge mobile (plus particulièrement la présence d'un proton...), l'événement de fragmentation majoritaire est matérialisé par la rupture de la liaison glycanne-peptide. Aussi, en fonction de l'état de charge du précurseur sélectionné voit-on apparaître sur les spectres des ions de masses relatives $[MH-203]^+$ et $m/z=204$ liés au départ de cette même structure glycanne. Devant le peu d'explications existantes sur le phénomène, il nous est paru pertinent de comparer ces mêmes espèces glycopeptidiques hydrogénées et deutérées, à charge fixe et mobile afin de lever certaines incertitudes quant à la nature des ions formés pendant cette fragmentation. Les hydrogènes acides du glycopeptide (-CONH, -OH et -COOH) sont rapidement échangés par les deutériums des solvants CD_3OD et D_2O (en mélange volume/volume). L'analyseur hybride quadripôle-temps de vol (Q-TOF) alliant précision de mesure et résolution, est utilisé pour ce type d'étude. Nous avons choisi comme modèle le glycopeptide de structure TTSTT(GalNAc)SAP en comparant les spectres de fragmentation des espèces hydrogénées à leurs homologues deutérés.

Le glycopeptide choisi se caractérise par une masse moléculaire théorique de 967.4Da ($C_{38}H_{65}N_9O_{20}$) et comporte 18 atomes d'hydrogène échangeables ; la masse de l'espèce totalement deutérée est de 985.4Da ($C_{38}H_{47}D_{18}N_9O_{20}$).

Après dérivation N-terminale par un radical de type [tris(2,4,6 triméthoxyphényl)phosphonium]acétyl-, le glycopeptide sous forme hydrogénée a pour formule élémentaire ($C_{67}H_{99}N_9O_{30}P$) soit m/z 1540.6.

Sous forme deutérée, l'espèce acquiert une masse de 1557.7Da ($C_{67}H_{82}D_{17}N_9O_{30}P$) après l'échange des 17 hydrogènes « mobiles ». Il en résulte le

tableau suivant résumant les différentes espèces moléculaires et ioniques relatives à ce glycopeptide modèle :

NH ₂ -TTSTT(GalNAc)SAP-COOH		P ⁺ NH-TTSTT(GalNAc)SAP-COOH	
Moléculaire _H : 967.4	Formule : C ₃₈ H ₆₅ N ₉ O ₂₀		
Monochargé MH ⁺ : 968.4	Formule : C ₃₈ H ₆₆ N ₉ O ₂₀	Monochargé C _H ⁺ : 1540.6	Formule : C ₆₇ H ₉₉ N ₉ O ₃₀ P
Dichargé M2H ²⁺ : 484.7	Formule : C ₃₈ H ₆₇ N ₉ O ₂₀	Dichargé CH ²⁺ : 770.8	Formule : C ₆₇ H ₁₀₀ N ₉ O ₃₀ P
Moléculaire _D : 985.4	Formule : C ₃₈ H ₄₇ D ₁₈ N ₉ O ₂₀		
Monochargé MD ⁺ : 987.4	Formule : C ₃₈ H ₄₇ D ₁₉ N ₉ O ₂₀	Monochargé C ⁺ : 1557.7	Formule : C ₆₇ H ₈₂ D ₁₇ N ₉ O ₃₀ P
Dichargé M2D ²⁺ : 494.7	Formule : C ₃₈ H ₄₇ D ₂₀ N ₉ O ₂₀	Dichargé CD ²⁺ : 779.8	Formule : C ₆₇ H ₈₂ D ₁₈ N ₉ O ₃₀ P

10.2/ Etude comparative de la fragmentation des espèces
hydrogénées/deutérees

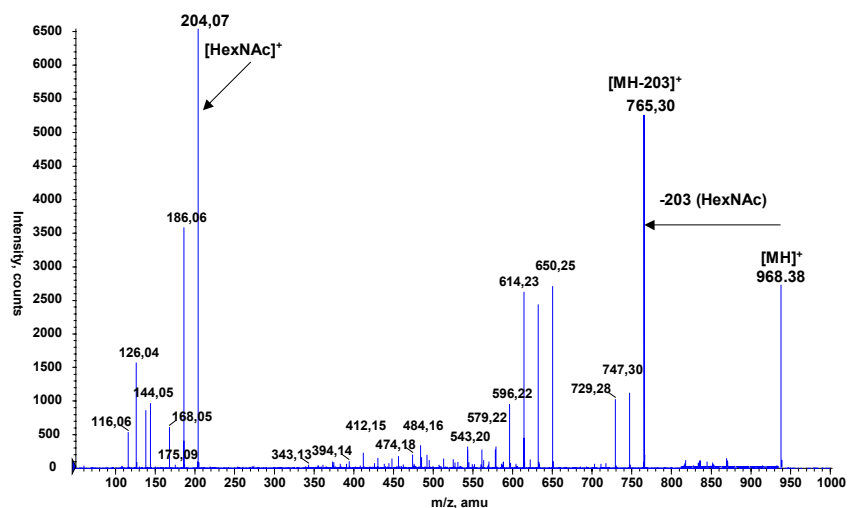


Figure 10.1a : Spectre de fragmentation du précurseur monochargé $[MH]^+$ à $m/z=968.38$ de l'espèce TTSTT(GalNAc)SAP (Energie de collision : 40eV).

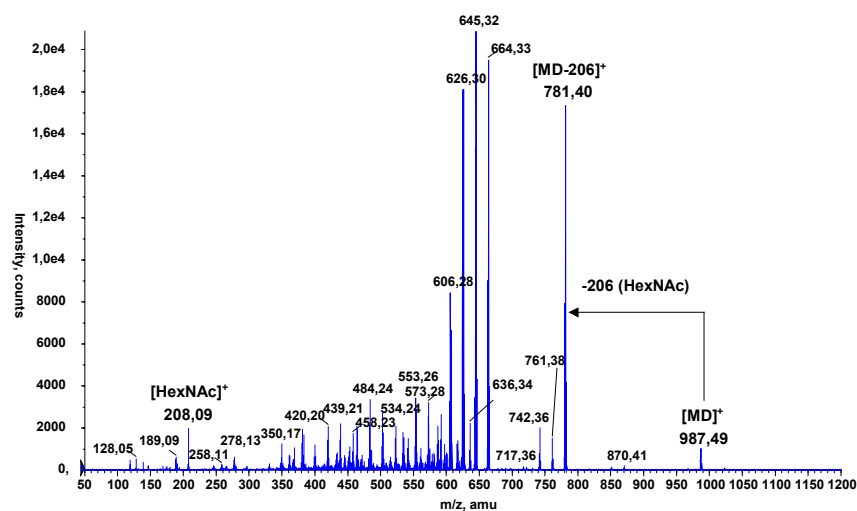


Figure 10.1b : Spectre de fragmentation du précurseur monochargé $[MD]^+$ à $m/z=987.49$ de l'espèce deutérée d18-TTSTT(GalNAc)SAP (Energie de collision : 50eV).

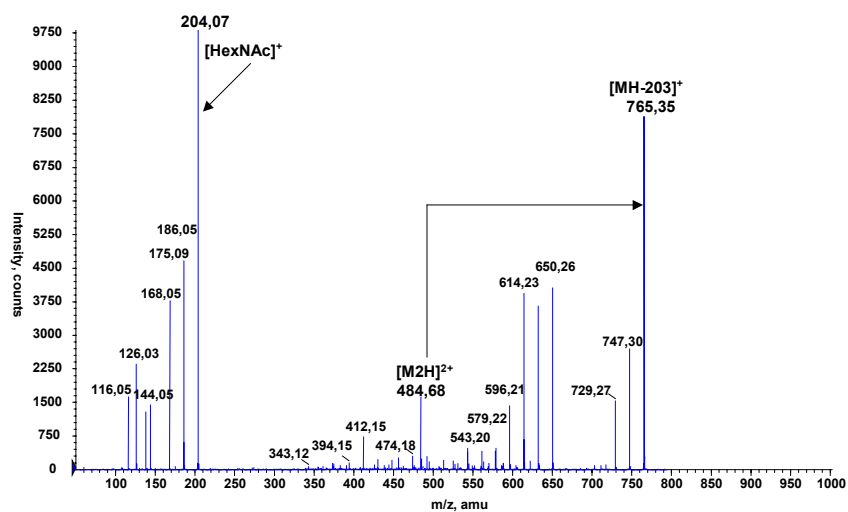


Figure 10.2a : Spectre de fragmentation du précurseur dichargé $[M2H]^{2+}$ à $m/z=484.68$ de l'espèce TTSTT(GalNAc)SAP (Energie de collision : 20eV).

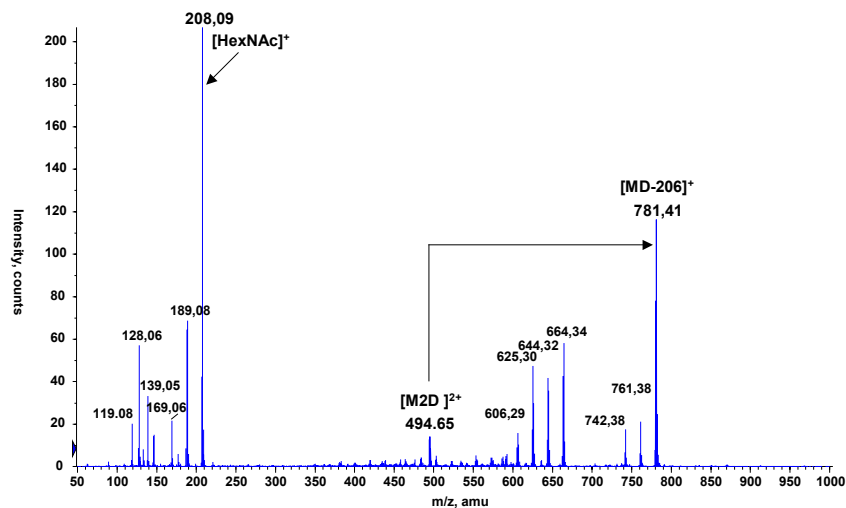


Figure 10.2b : Spectre de fragmentation du précurseur dichargé $[M2D]^{2+}$ à $m/z=494.65$ de l'espèce deutérée d18-TTSTT(GalNAc)SAP (Energie de collision : 20eV).

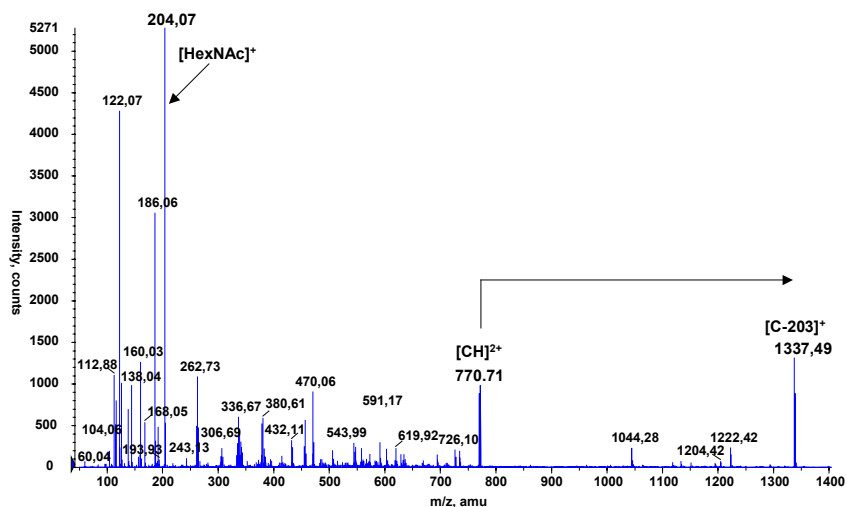


Figure 10.3a : Spectre de fragmentation du précurseur dichargé $[CH]^{2+}$ à $m/z=770.71$ de l'espèce $TMPP^+-Ac-TTSTT(GalNAc)SAP-COOH$ (Energie de collision : 30eV).

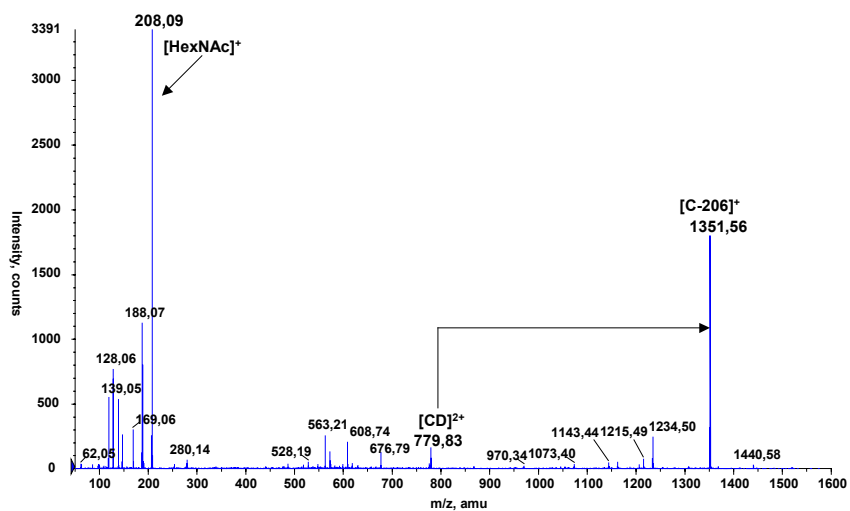


Figure 10.3b : Spectre de fragmentation du précurseur dichargé $[CD]^{2+}$ à $m/z=779.83$ de l'espèce deutérée $d17-TMPP^+-Ac-TTSTT(GalNAc)SAP$ (Energie de collision : 30eV).

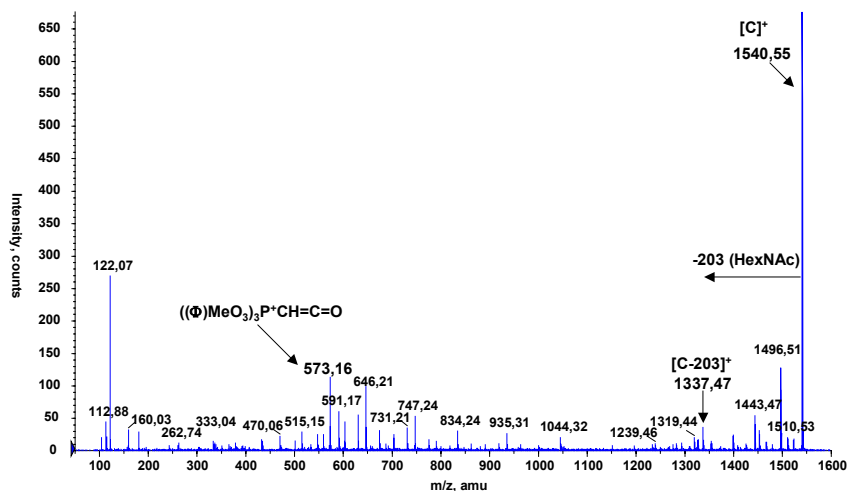


Figure 10.4a : Spectre de fragmentation du précurseur monochargé [C]⁺ à m/z=1540.55 de l'espèce TMPP⁺-Ac-TTSTT(GalNAc)SAP (Energie de collision : 90eV).

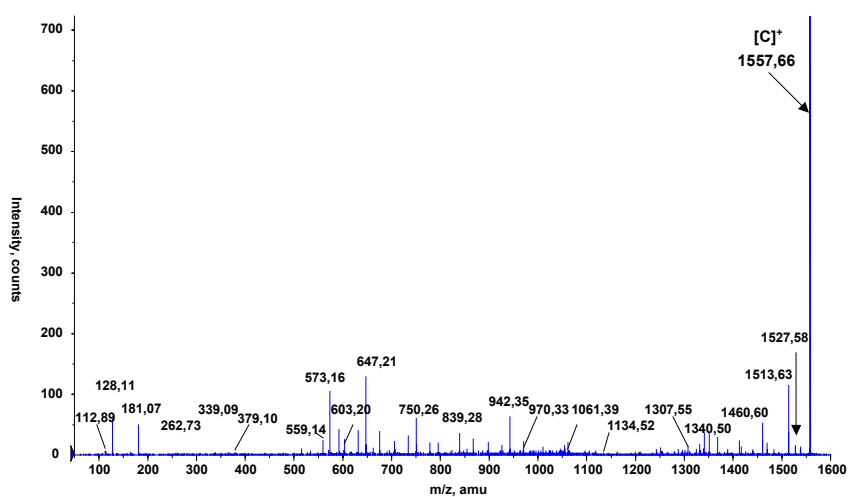


Figure 10.4b : Spectre de fragmentation du précurseur monochargé [C]⁺ à m/z=1557.66 de l'espèce deutérée d17-TMPP⁺-Ac-TTSTT(GalNAc)SAP (Energie de collision : 90eV).

Remarque préliminaire :

Le but de cette application n'est aucunement de décrire le comportement de fragmentation des différents précurseurs $[MH/D]^+$, $[M2H/D]^{2+}$, $[C]^+$ et $[CH/D]^{2+}$, l'application précédente nous ayant permis de le faire. **Il convient toutefois de rappeler que les charges mobiles facilitent le départ du glycanne.**

Vis à vis de ce seul événement de fragmentation, la charge fixe est nécessaire mais pas suffisante à la stabilisation de la liaison glycopeptidique. Aussi, seul le précurseur monochargé $[C]^+$ empêche, de par la stricte nature fixe de son ionisation, le départ du sucre, autorisant une réelle fragmentation glycopeptidique (sans doute régit par un mécanisme de fragmentation de type CRF) et par la même, une localisation du/des sites de glycosylation. (**Figure 10.4a et b**)

Les précurseurs hydrogénés $[MH]^+$, $[M2H]^{2+}$ et $[CH]^{2+}$ forment des ions 204, $[MH-203]^+$ et $[C-203]^+$ (**Figures 10.1a, 10.2a et 10.3a**). Pour les précurseurs deutérés, la décomposition se traduit par la formation des ions 208, $[MD-206]^+$ et $[_{d17}C-206]^+$. (**Figures 10.1b, 10.2b et 10.3b**)

De par les glissements de masse existants entre ces différents signaux, il nous est donc possible d'avancer quelques idées quant aux mécanismes de fragmentation et de réarrangements électroniques au niveau de la liaison glycopeptidique.

Vers une explication de la fragmentation préférentielle de la liaison glycopeptidique

Nous avons constaté que l'introduction d'une seule charge mobile suffisait à déstabiliser la structure glycopeptidique, conduisant celle-ci à sa rupture préférentielle par rapport aux liaisons peptidiques de la chaîne.

L'examen de la fragmentation du précurseur monochargé $[MD]^+$ (**Figure 10.1b**) fournit un enseignement des plus intéressants au sujet du départ du résidu GalNAc. Le pic de plus haute intensité correspond à un signal de type $[MD-206]^+$. La deutériation ionisante siégeant sans doute au niveau de l'oxygène de type hétéroxyde, engendre un réarrangement faisant intervenir le deutérium du résidu N-acétyl en C₂ de la GalNAc. Après départ du sucre sous forme de fragment neutre, un premier deutérium vient saturer l'oxygène de la thréonine du site de glycosylation et

un second ionise alors l'ensemble peptidique, expliquant la détection de l'intense signal correspondant à l'ion $[MD]^+$ (**Figure 10.5**).

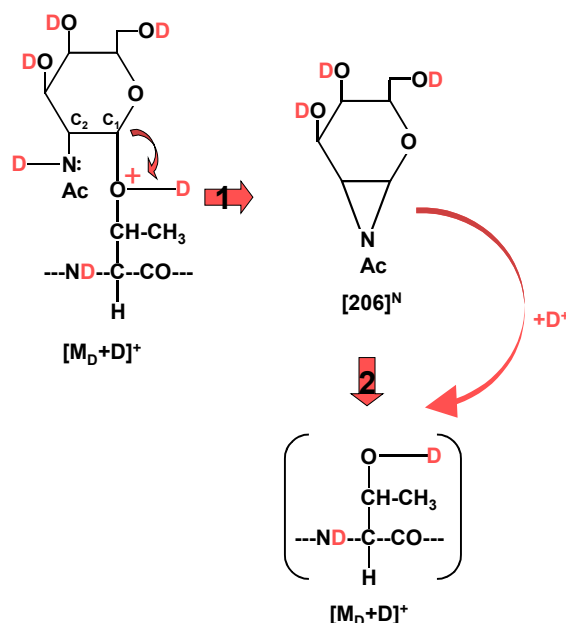


Figure 10.5 : Mécanisme hypothétique de fragmentation de l'espèce glycopeptidique $[MD]^+$ pouvant conduire à la formation d'un fragment oligosaccharidique neutre et d'un ion peptidique $[MD]^+$.

Les comportements similaires des espèces dichargées $[M_2D]^{2+}$ (**Figure 10.2b**) et $[CD]^{2+}$ (**Figure 10.3b**) renseignent sur la nature de l'ion oxonium généré lors de la fragmentation de ces espèces glycopeptidiques. L'ion oxonium hydrogéné se caractérise par une masse calculée (confirmée par les spectres) de 204Da (**Figure 10.1a, 10.2a et 10.3a**). Cette structure oligosaccharidique ionisée possède 4 protons échangeables (3 $-OH$ et 1 $-NH$ amide) qui expliquent un incrément de masse de 4uma en présence de solvants deutérés, soit $m/z=208$ pour l'oxonium formé. L'oxonium deutéré est détecté à 208Da et porte donc, sans aucune ambiguïté 4 deutériums au niveau des groupements hydroxyles précédemment cités. Un fragment peptidique est aussi détecté sur les spectres en $[MD]^+$ et $[C]^+$ et apparaît à une masse correspondant à $[MD-206]^+$ (ou $[_{d17}\text{-C}-206]^+$) (**Figures 10.1b, 10.2b et 10.3b**). L'ensemble de ces observations pouvant ainsi être expliqué sur la **Figure 10.6**.

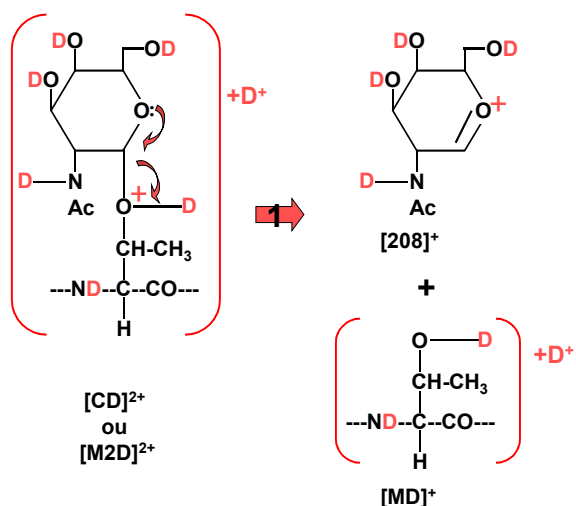


Figure 10.6 : Mécanisme hypothétique de fragmentation des espèces glycopeptidiques $[CD]^{2+}$ et $[M2D]^{2+}$ pouvant conduire à la formation d'un fragment oligosaccharidique de type oxonium $[208]^+$ et d'un ion peptidique $[MD]^+$.

Il résulte de ce mécanisme proposé une séparation des charges vraie qui permet, d'une part l'ionisation du squelette peptidique et d'autre part l'ionisation du glycanne et la détection d'un oxonium caractéristique.

Enfin, la lecture des spectres de fragmentation de l'espèce $[C]^+$ confirme les résultats déjà décrits, la fragmentation de ces composés faisant intervenir vraisemblablement un mécanisme indépendant de la charge de type CRF (comme en témoignent les valeurs importantes d'énergie collisionnelle nécessaires à la fragmentation de ce composé (90eV contre une moyenne de 30eV pour les autres précurseurs de l'étude).

Pour conclure sur ce complément d'information relatif à la fragmentation préférentielle de la liaison glycopeptidique de O-glycopeptides, nous pourrions envisager l'implication de l'hydrogène/deutérium mobile de l'azote en C_2 de la structure oligosaccharidique (formation d'un radical neutre) mais aussi de l'oxygène hétérocyclique de cette même structure aboutissant à la formation d'un ion de type oxonium. Intéressante au possible, notre étude ne parvient toutefois pas à appréhender les mécanismes subtils qui conduisent préférentiellement à l'une ou l'autre des voies supposées.

Travaux de Collaborations

Mon exercice de thèse ayant eu pour cadre le Centre Commun de Mesures de Spectrométrie de Masse de l'Université de Lille 1, il m'aurait été difficile, outre les développements méthodologiques développés ci-avant, de ne pas être sensibilisé et impliqué dans des applications de biospectrométrie de masse, parties intégrantes et prépondérantes de travaux d'analyse protéomique.

L'analyse protéomique, analogie protéique de l'expression « génome », s'attache à inventorier l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule (ou dans un type cellulaire) et autorise l'étude de la distribution protéique dans différentes « strates biologiques » (tissulaires ou sub-cellulaires). Parce qu'elle permet une description dynamique de la régulation de l'expression des gènes, l'analyse protéomique est considérée aujourd'hui à raison comme l'outil de choix du biologiste désireux d'appréhender des événements physiologiques aussi bien que pathologiques.

Utilisant la formidable ressource informative générée par la recherche génomique, cette approche combine les potentialités résolutive de l'électrophorèse bi-dimensionnelle et de l'HPLC, utilise la puissance d'analyse de la spectrométrie de masse moderne ainsi que le pouvoir d'investigation de la bio-informatique. Par ses capacités toujours grandissantes, elle constitue un allier des plus précieux tant en recherche fondamentale qu'en médecine ou en pharmacologie : l'analyse protéomique peut tout aussi bien intervenir « en aval » dans une dynamique d'identification de marqueurs associés à une maladie ou au contraire finaliser un projet visant à retenir/exclure un principe actif « candidat ».

Aussi, par le biais de mon directeur de thèse, j'ai pu, durant mon activité de recherche, être mis en relation avec différentes équipes aux modèles et problématiques biologiques diverses. Les travaux initiés en

partenariat et les résultats découlants de ces collaborations ont donné lieu aux publications scientifiques suivantes :

Day A, Dehorter B, Neutelings G, Czeszak X, Chabbert B, Belingheri L, David H. *Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase enzyme activity, protein and transcript accumulation in flax (*Linum usitatissimum*) stem during development.* *Physiol Plant* 2001 Oct;113(2):275-284.

Vercoutter-Edouart AS, Czeszak X, Crepin M, Lemoine J, Boilly B, Le Bourhis X, Peyrat JP, Hondermarck H. *Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells.* *Exp Cell Res* 2001 Jan 1;262(1):59-68.

Lottin S, Vercoutter-Edouart AS, Adriaenssens E, Czeszak X, Lemoine J, Roudbaraki M, Coll J, Hondermarck H, Dugimont T, Curgy JJ. *Thioredoxin post-transcriptional regulation by H19 provides a new function to mRNA-like non-coding RNA.* *Oncogene* 2002 Feb 28;21(10):1625-31.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Au regard de la croissance exponentielle du nombre de publications intégrant le terme protéome, l'intégration des stratégies analytiques pour l'analyse protéomique (électrophorèse bidimensionnelle, DIGE, spectrométrie de masse, ICAT...) est maintenant réalisée dans la plupart des laboratoires de biochimie des protéines. Elle est ici démontrée par les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de collaborations, en particulier avec les équipes des Professeurs H Hondermarck et J.J. Curgy. Cependant, la mise en évidence des modifications post-traductionnelles reste un réel défi et demande la mise en œuvre de techniques à la fois robustes, répétables et pourquoi pas automatisables. Une illustration en a été donnée ici au travers de l'exemple de la localisation des sites de O-glycosylation pour laquelle les techniques classiques de spectrométrie de masse en tandem sont impuissantes. L'explication tient dans une voie de fragmentation prédominante de la liaison glycanne-peptide.

Pour contourner ce phénomène, nous avons en premiers lieux et par analogie avec des travaux antérieurs concernant la localisation des sites de phosphorylation, développé et optimisé un protocole de β -élimination en condition non réductrice de la fraction glycanne en utilisant la diméthylamine. Les acides aminés initialement glycosylés sont déshydratés et, de manière concomitante à la réaction de β -élimination, « étiqueter » par de l'éthanthiol (ou du propanethiol). Pour obtenir une couverture de séquence suffisante à la localisation des résidus alkylamino-modifiés, nous avons été amenés à dériver l'extrémité N-terminale de ces peptides par une charge permanente apportée par un groupement phosphonium.

Ce travail de thèse aura montré que le rendement de β -élimination était étroitement dépendant du site de glycosylation. Ainsi, la liaison O-glycosidique apparaît-elle particulièrement résistante si la structure glycanne concerne une thréonine en position N-terminale d'une proline. Par conséquent, les conditions réactionnelles de β -élimination (temps, température) ne peuvent, à priori, pas être généralisées d'un glycopeptide à un autre. Aussi, l'avancement de la réaction doit-il être impérativement suivi par spectrométrie de masse.

Par comparaison avec la diméthylamine, la β -élimination utilisant la soude ne nous semble pas aussi performante car cette base minérale puissante engendre des réactions de déshydratation non spécifiques des résidus de sérine et/ou thréonine. Il nous semble donc essentiel de considérer que l'ensemble des approches récemment apparues (*Meyer HE et al, 1993*), (*Wells L et al, 2002*), (*Goshe MB et al, 2001*) qui reposent

Conclusion générale

sur la β -élimination par la soude et le marquage par une sonde biotinylée, dédiées à la localisation des sites de O-phosphorylation ou de O-glycosylation, induisent, à n'en pas douter, la formation et la détection de faux-positifs. Cette observation met en exergue la difficulté à transposer une méthode optimisée à partir d'échantillons parfaitement définis à la caractérisation structurale « de novo » de molécules totalement inconnues. Se pose alors la pertinence et la recevabilité de l'information ainsi générée.

La seconde partie de nos travaux de recherche démontre le rôle essentiel de la protonation des ions précurseurs de glycopeptides dans le mécanisme de rupture préférentielle de la liaison glycanne-peptide, au travers de la comparaison des spectres de dissociation du cation phosphonium $[C]^+$ et du cation phosphonium protoné $[CH]^{2+}$. Cette étude montre l'influence d'une charge mobile dans la formation de signaux consécutifs à la rupture de cette liaison : les ions fragments $[C-203]^+$ et $[204]^+$. En effet, que ce soit en mode ESI/CID ou MALDI/PSD, seul le précurseur à charge fixe $[C]^+$ montre des ions fragments glycopeptidiques « vrais » de type $*a_n+203$. Dans cette configuration, la lecture de la séquence peptidique et la localisation du/des sites de glycosylation sont particulièrement évidentes.

En conséquence, il nous semble que les stratégies de dérivation des extrémités N ou C-terminales des peptides par une charge fixe, cationique (ainsi que anionique), devraient être plus largement prises en considération dans une stratégie de localisation des modifications post-traductionnelles.

Indéniablement, la technique de capture d'électron dissociative (ECD) répond également à cette attente. Tout au moins l'a-t-elle prouvé, là encore, à partir de molécules de références (*Mirgorodskaya E et al, 1999*). Cependant, et contrairement aux spectres obtenus à partir de nos espèces à cation phosphonium, les spectres acquis en mode ECD apparaissent plus complexes du point de vue de la lecture de la séquence peptidique. Par ailleurs, un gain dans le seuil de sensibilité doit être réalisé puisque à ce jour 1 nanomole d'échantillon est approximativement nécessaire à l'acquisition d'un tel spectre.

Enfin, en guise de conclusion, les expériences d'échanges hydrogène/deutérium sans paraître finalisées, ouvrent une voie dans la compréhension du mécanisme de fragmentation de la liaison glycopeptidique. En se basant sur les données de l'étude, nous pouvons envisager l'implication d'une part

Conclusion générale

de l'hydrogène acétamidique en C₁ du cycle de la structure oligosaccharidique (donnant l'espèce [MH-203]⁺) et d'autre part de l'oxygène hétérocyclique (à l'origine de l'oxonium [204]⁺).

Annexes

A₁ : Matériels et Méthodes

11.1/ Spectrométrie de Masse

11.1.1/ Nanospray-3Q

11.1.2/ Nanospray-Q-TOF

11.1.3/ MALDI-MS et MALDI PSD-MS

Analyseurs

Matrices

11.2/ Préparation du matériel peptidique/glycopeptidique

11.2.1/ Micropurifications chromatographiques

11.2.2/ Déglycosylation des glycopeptides par réactions de β -élimination

Protocole de Meyer et collaborateurs

β -élimination par action de méthylamine/diméthylamine

β -élimination par action de diméthylamine/éthanethiol (propanethiol)/isopropanol

Protocole adapté

11.3/ Réaction de dérivation N-terminale

11.4/ Réaction de dérivation C-terminale

11.5/ Echanges hydrogène/deutérium

11.6/ Glycosylation enzymatique des peptides

11.7/ Glycopeptides étudiés

11.1/ Spectrométrie de Masse

11.1.1/ Nanospray-3Q

Les analyses de spectrométrie de masse Nanospray-MS et Nanospray CID/MS/MS ont été réalisées, exceptées pour les expériences d'échanges hydrogène/deutérium, sur un spectromètre de masse triple-quadripolaire de type QUATTRO 2 développé par la firme Micromass (Manchester).

L'ensemble des spectres de masse présentés ont été obtenus en mode d'ionisation positive par application d'une tension de capillaire variant de 800 à 1200Volts et d'un potentiel de cône optimisé selon l'analyse entre 20 et 70Volts.

La température de la source du spectromètre a été adaptée à la nature des échantillons traités et stabilisée à une valeur définitive de 30°C. L'azote a été utilisé classiquement comme gaz de collision pour les expériences de fragmentation à une pression de l'ordre de 3×10^{-3} mBar dans la chambre de collision, l'énergie de collision appliquée aux ions précurseurs sélectionnés variant de 10 à 60eV selon l'état de charge.

Nous avons apporté au cours de l'exercice quelques modifications au niveau de la source électrospray du spectromètre (**Figure 11.1**), autorisant, sans aucune assistance d'un gaz de nébulisation, des acquisitions « nano-débits » à des flux d'échantillons de 20 à 30nl/min. Les capillaires porte-échantillons utilisés sont des capillaires 'non-métallisés' en verre borosilicaté de 580 et/ou 680 μ m de diamètre interne (World Precision Instrument) étirés par nos soins à l'aide d'une étireuse de capillaires Héka PIP5 « pipet-puller ».

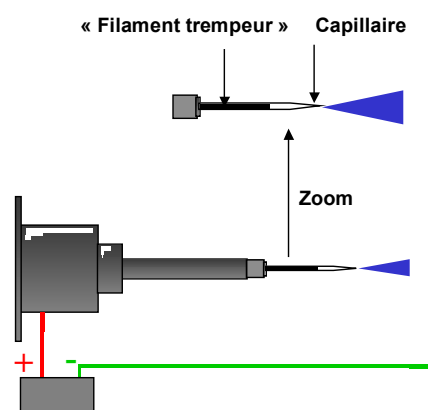


Figure 11.1 : Source Nanospray à canne modifiée, filament trempeur et capillaire 'non-métallisé'.

Les spectres MS-MS ont été acquis dans une fenêtre de masse située entre 50 et 3000 uma selon une vitesse de balayage maximale de 400 uma/s (mode MCA) et en additionnant les signaux de quelques 30 acquisitions successives. Le logiciel de commande et d'acquisition des données est la version MassLynx 3.2 du constructeur.

Les glycopeptides analysés ont été placés en solution dans un mélange méthanol/eau volume/volume (pour favoriser l'obtention d'espèces monochargées) ou dans un mélange méthanol/eau volume/volume acidifié à l'acide formique (de 0.1 à 1% maximum) à une concentration approximative (puisque glycosylation enzymatique) de 5-10 picomoles/ μ l.

11.1.2/ Nanospray-Q-TOF

Le spectromètre de masse de géométrie Q-TOF et de type Q-Star Pulsar I (Applied Biosystems (Framingham USA, Courtaboeuf France)) en exercice au laboratoire a été mis à contribution pour les expériences d'échange hydrogène/deutérium. La résolution isotopique de l'appareil autant en mode MS

qu'en mode MS-MS en fait un partenaire idéal pour ce type d'application. Les expériences de fragmentation ont été menées sur les espèces glycopeptidiques natives/dérivées et/ou hydrogénées/deutérées à des valeurs de DP (« declustering potential ») de 220 et de FP (« focusing potential ») de 50. La tension appliquée au capillaire oscille entre 800 et 1000Volts.

L'énergie de collision appliquée aux précurseurs varie de 20 à 90eV en fonction de l'état de charge et de la stabilité de l'ion sélectionné. L'acquisition a été réalisée sans pulse d'ions (fonction « enhance » déconnectée), en mode MCA (« multi-channel acquisition ») et les spectres présentés résultent de l'accumulation de 50 à 100 cycles de balayage de la gamme de masse choisie.

11.1.3/ MALDI-MS et MALDI PSD-MS

Analyseurs

Les premières analyses MALDI-MS ont été réalisées en extraction continue sur un MALDI-TOF de type VISION-2000 développé par la firme Finnigan Mat (Bremen, Allemagne). L'appareil a essentiellement été utilisé en mode réflectron positif (longueur du tube de vol : 1.50m). Une tension d'accélération de 5000Volts a été appliquée aux ions désorbés par tir laser (laser à azote ($\lambda=337\text{nm}$) pulsé (pulses de 2ns)). Les spectres présentés dans ce manuscrit résultent majoritairement de l'accumulation de 30 à 50 tirs.

Avec le renouvellement du parc machine du centre commun de mesures de spectrométrie de masse, nous avons pu aussi bénéficier, pendant notre exercice de thèse, de l'apport d'un spectromètre de masse MALDI-TOF de type Voyager DE STR développé par la firme Perseptive Biosystem (Framingham USA, Courtaboeuf France). Equipé d'un analyseur à temps de vol long (longueur du tube=3m en mode réflectron) et d'une source à extraction retardée, ce spectromètre MALDI-TOF de nouvelle génération se caractérise par une grande précision de mesures et une résolution importante et représente un partenaire des plus efficaces pour les analyses MALDI-MS et surtout PSD-MS.

Les spectres présentés ont été obtenus à une puissance laser minimale autorisant la détection d'ions par application d'une tension d'accélération de 20kV (potentiel de grille primaire fixé à 66% et délai d'extraction de 200ns). Quant aux spectres PSD, ils ont été obtenus par réduction progressive (de 20% en 20%) du

potentiel de réflectron. Le traitement de ces spectres et la recombinaison des différentes plages PSD étant réalisée par le logiciel de traitement Data Explorer, en accord avec les recommandations du fabricant.

Matrices

L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) ont été classiquement utilisés comme matrices pour les analyses par spectrométrie de masse MALDI. Le DHB est préparé à une concentration de 10mg/ml dans un mélange méthanol/eau (le rapport des deux solvants pouvant varier de 3 pour 7 à 7 pour 3 selon les cas) acidifié (0.1% d'acide trifluoroacétique, (TFA)). L'HCCA est quant à lui préparé à saturation dans un solvant acétonitrile/eau v/v ou 7/3 selon les applications.

Les échantillons à analyser (peptides comme glycopeptides) sont en solution dans un mélange eau/méthanol (classiquement en proportion 1 pour 1) acidifié par 0.1% de TFA ou 1% d'acide formique. Chaque échantillon (0.5 μ l) est alors mélangés à 0.5 μ l de matrice (HCCA ou DHB) et co-cristallisés sur une cible d'acier « inox » par séchage à température ambiante sous flux d'air (« dried droplet method ») avant analyse.

11.2/ Préparation du matériel peptidique/glycopeptidique

11.2.1/ Micropurifications chromatographiques

De par la présence de sels, de détergents ou d'excès de réactifs (dérivation N- et C-terminale), le matériel peptidique/glycopeptidique étudié est soumis, avant analyse par spectrométrie de masse, à une étape de purification chromatographique. Le protocole que nous avons utilisé, pré-établi par Kussman et collaborateurs (*Kussman M et al, 1997*), (*Gobom J et al, 1999*), a été adapté/optimisé par nos soins. Nous utilisons pour cela un cône de type « gel loader tip » (Eppendorf) (**Figure 11.2**) étiré à l'aide d'une pince plate afin de réduire le diamètre de sortie du cône à une valeur inférieure à la granulométrie de la phase utilisée (50 μ m). Un volume de 30 μ l de méthanol est déposé dans le cône avant le dépôt de quelques 2 μ l de phase inverse Poros 50R2 (Self Pack, Boehringer Mannheim) en suspension dans du méthanol. Le montage de la colonne chromatographique s'effectue par tassement de la phase à

l'extrémité du cône sous flux d'azote. La colonne est rincée par du méthanol puis équilibrée par passage d'eau acidifiée (0.1% TFA ou 1% d'acide formique).

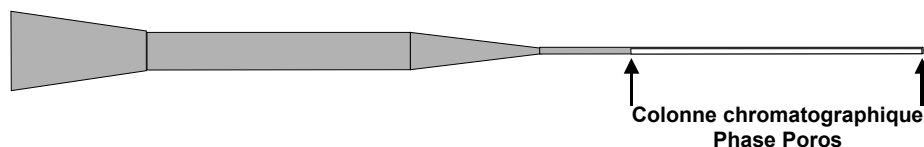


Figure 11.2 : Schéma représentatif d'une micro-colonne chromatographique de type « gel-loader » utilisée pour la purification des échantillons peptidiques/glycopeptidiques.

Ainsi prête, la colonne sert à la purification de peptides/glycopeptides en solution dans de l'eau acidifiée (acide formique 1% ou TFA 0.1%). Le passage très lent de la solution peptidique/glycopeptidique garantit une fixation optimale du matériel à purifier et une élution instantanée des sels contaminants non retenus sur la colonne (selon les principes classiques de la chromatographie en phase inverse). Le rinçage de l'échantillon est assuré par 3 à 4 passages d'eau acidifiée (acide formique ou TFA) et l'élution des peptides/glycopeptides est réalisée par passage de 5 à 10 μ l d'eau/méthanol (de proportions variables de 3/7 à 7/3) acidifié (0.1% TFA ou 1% acide formique). Le matériel peptidique/glycopeptidique ainsi désalé est séché au speed-vac et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

11.2.2/ Déglycosylation des glycopeptides par réactions de β -élimination

Protocole de Meyer et collaborateurs

Quelques 1 à 2 μ l de glycopeptides en solution dans l'eau sont ajoutés à 30 μ l d'un mélange composé d'eau (200 μ l), de DMSO (20 μ l), d'éthanol (100 μ l), de NaOH 5M (65 μ l) (concentration finale en NaOH : 0.7M) et d'éthanthiol (60 μ l). La réaction est menée dans un tube en verre borosilicaté hermétiquement clos pendant 4 à 6 heures entre 35 et 50 $^{\circ}\text{C}$ en fonction du substrat. Après refroidissement, la réaction est stoppée par addition de 6 μ l d'acide acétique concentré. Par la présence de quantité non négligeable de soude dans l'échantillon, le mélange post-réactionnel est dessalé sur microcolonnes chromatographiques (voir paragraphe

correspondant), puis stocké à -20°C avant dérivation N-terminale et/ou analyse par spectrométrie de masse.

β -élimination par action de méthylamine/diméthylamine

Quelques 1 à 2 μl de glycopeptides en solution dans l'eau sont ajoutés à 20 μl de méthylamine ou de diméthylamine (solution à 40% dans l'eau). La réaction est conduite sur la nuit dans un tube en verre borosilicaté hermétiquement clos à une température de 35°C à 45°C selon les cas. Après refroidissement, la réaction est arrêtée par séchage complet au speed-vac et les échantillons sont stockés à -20°C avant dérivation N-terminale ou analyse par spectrométrie de masse.

*β -élimination par action de diméthylamine/éthanethiol
(propanethiol)/isopropanol*

Quelques 1 à 2 μl de glycopeptides en solution dans l'eau sont ajoutés à 90 μl de solution de déglycosylation composée à volume équivalent de diméthylamine (à 40% dans l'eau), d'éthanethiol ou de propanethiol (selon les cas) et d'isopropanol.

L'isopropanol (préféré au DMSO car plus volatil) est ici utilisé comme homogénéisant du milieu réactionnel, les dérivés thiols et la diméthylamine n'étant pas miscibles. La réaction est menée dans un tube en verre borosilicaté hermétiquement clos à une température de 45 à 60°C pendant 6 à 16h selon les cas. L'arrêt de la réaction se fait par évaporation des réactifs au speed-vac, les échantillons sont alors stockés à -20°C avant dérivation N-terminale et/ou analyse par spectrométrie de masse.

Protocole adapté

Nos études de déglycosylation/marquage de sites de glycosylation nous ont conduit à remarquer la résistance de certains glycopeptides pour lesquels l'action conjointe de diméthylamine/éthanethiol (propanethiol)/isopropanol demeure sans « effet déglycosylant » (essentiellement des glycopeptides dont les sites de glycosylation sont voisins d'un acide aminé de type proline). Ces substrats délicats ont donc été soumis à l'action d'un mélange de diméthylamine (40% dans l'eau)/éthanethiol (propanethiol)/isopropanol/NaOH 10mM (30 μl /30 μl /30 μl /3 μl) (concentration finale en NaOH : 0.3mM). De par l'effet chaotropique de la soude, les glycopeptides les plus récalcitrants sont totalement déglycosylés par action de ce

mélange à des températures de 45 à 60°C pendant 6h. La présence de la soude impose toutefois une étape de purification chromatographique avant toute autre manipulation sur le matériel ainsi déglycosylé.

11.3/ Réaction de dérivation N-terminale

Nous avons recours au protocole proposé par Huang et collaborateurs pour la dérivation N-terminale des peptides-modifiés et des glycopeptides natifs. Ces substrats secs sont repris dans 2µl d'un mélange eau/acétonitrile (de proportion 2 pour 8) et mis en contact avec 2µl de tampon Tris/HCl 50mM à pH=8,2 dans l'eau et 1µl de l'ester tris(2, 4, 6-trimethoxyphényl)phosphonium acétique de N-hydroxysuccinimide. Le mélange est vortexé 30 secondes avant agitation dans un bain ultrasonique pendant 30 minutes (température de l'eau du bain en dessous de 30°C en fin de réaction de couplage). Après arrêt de la réaction par évaporation des solvants, les échantillons sont stockés à -20°C et/ou analysés par spectrométrie de masse.

Remarque: les phases de micropurifications chromatographiques peuvent ici être utilisées pour éliminer les excès conséquent de réactif de dérivation.

11.4/ Réaction de dérivation C-terminale

La synthèse du réactif de dérivation C-terminale a été réalisée conformément au protocole initialement proposé par Wagner (*Wagner DS et al, 1991*), (*Liao PC et Allison J, 1995*) et s'articule autour de deux étapes distinctes.

La première de ces deux étapes fait réagir un large excès de dibromoéthane (15x) sur la triphénylphosphine pour donner au bout de 24h à 80°C le bromure de 2-bromoéthyl-triphénylphosphonium. La suite de la synthèse consiste à déplacer le dérivé halogéné d'intérêt et de le substituer par un groupement amine primaire (action des amines sur les dérivés halogénés de type $R-X + NH_3 \Rightarrow R-NH_2 + H-X$) (selon Hofmann) par action d'un large excès de NH_4OH (15x). Les deux étapes ici décrites aboutissant alors au 2-aminoéthyl-triphénylphosphonium de masse 369/371Da (isotopes 79 et 81 du brome).

Les réactions de dérivation C-terminale de nos glycopeptides d'intérêt sont réalisées par action conjointe d'une solution à 100nM de bromure de 2-aminoéthyl

triphényl phosphonium (TPP-Et-NH₂) et d'une solution à 10nM de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) à pH=5. (l'adaptation stoechiométrique 100/10 n'étant pas celle décrite dans la communication d'origine mais représentant les conditions les plus adaptées aux modèles étudiés). La réaction de couplage s'effectuant sous agitation dans un bain ultrasonique, à température ambiante pendant 45minutes à 1heure.

11.5/ Echanges hydrogène/deutérium

Les expériences d'échanges hydrogène/deutérium menées sur les glycopeptides de structure TTSTT(GalNAc)SAP et GTT(GalNAc)PSPVP ont été réalisées comme suit : les glycopeptides secs dans un tube Eppendorf sont repris juste avant analyse par spectrométrie de masse Q-TOF dans 5µl de D₂O enrichie à 99.97%. Après agitation au vortex, 5µl de méthanol deutéré (CD₃OD) sont ajoutés. L'ensemble des hydrogènes échangeables se voyant instantanément déplacé par le large excès de deutérium du mélange, l'analyse des produits deutérés est envisagée à la suite même de la resolubilisation.

Remarque : le mélange D₂O/CD₃OD suffit à la formation d'un spray et à l'ionisation des composés à analyser. Désireux de favoriser la formation de précurseurs monochargés, nous n'utilisons donc pas d'acide comme habituellement lors d'analyses Nanospray.

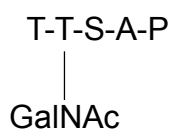
11.6/ Préparation et glycosylation enzymatique des peptides

N'ayant pas participé activement à ces étapes préparatives, nous nous contenterons simplement de mentionner ici les articles y faisant références : (*Tetaert et al, 2001*), (*Tetaert et al, 2001b*), (*Ten Hagen et al, 2001*), (*Soudan et al, 1999*), (*Ten Hagen et al, 1999*).

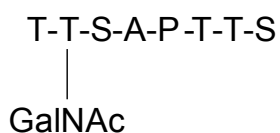
Les glycopeptides de cette étude ont été gracieusement mis à notre disposition par le Docteur Daniel Tetaert et résultent de réactions de glycosylation enzymatique (*Ten Hagen et al, 1999*). A 10µl de solution de peptides (peptides de synthèse produits par Néosystem, Strasbourg, 98% de pureté (contrôles de synthèse effectués par HPLC et spectrométrie de masse et séquences peptidiques pré-déterminées par séquençage d'Edman)) à 1mM dans l'eau sont ajoutés 40µl d'une solution composée de 10µl de tampon MES (pH 7.2) à 125mM final, de Triton X-100 à 0.2%

final, de $MnCl_2$ à 12.5mM final , d'inhibiteur E-64 à 1mM final, de PMSF à 1mM final, d'aprotinine à 1mM final, de leupeptine à 1mM final, d'AMP à 1.25mM à final (5 μ l), d'UDP-N-acetylgalactosamine froid à 1mM final et de 5 μ l de surnageant contenant des protéines recombinantes dotées d'activités enzymatiques de type N-AcetylGalactosaminyl transférase T1, T2 et T9 (gracieusement fournies par la laboratoire de Benett et Clausen). Les réactions de glycosylation enzymatiques sont stoppées par addition de 8 volumes (320 μ l) de tampon sodium borate à 20mM pH=9.1/EDTA 0.1mM. Les produits de réactions de glycosylation sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire analytique (jusqu'à 75 cycles) et échangés à travers une colonne de 2ml de résine AG 1-X8, élués par 3ml d'eau avant d'être désalés sur cartouche C18 SepPack.

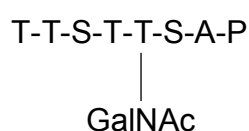
11.7/ Glycopeptides étudiés



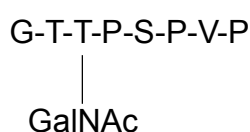
Glycopeptide 1

[M]_{monoisotopic}=678.3Da[C]⁺_{monoisotopic}=1250.5Da (N-ter)

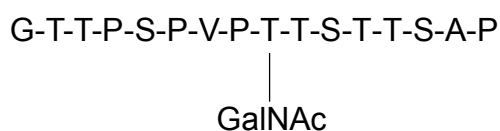
Glycopeptide 2

[M]_{monoisotopic}=967.4Da[C]⁺_{monoisotopic}=1539.6Da (N-ter)

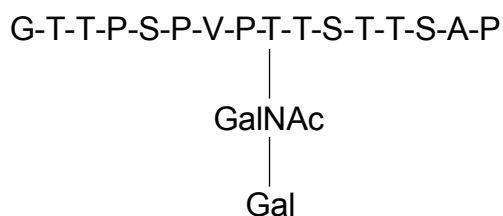
Glycopeptide 3

[M]_{monoisotopic}=967.4Da[C]⁺_{monoisotopic}=1539.6Da (N-ter)[C]⁺_{monoisotopic}=1254.5Da (C-ter)

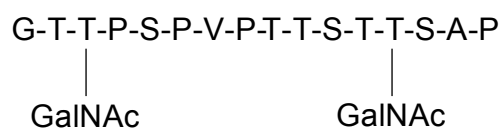
Glycopeptide 4

[M]_{monoisotopic}=957.5Da[C]⁺_{monoisotopic}=1529.6Da (N-ter)

Glycopeptide 5

[M]_{monoisotopic}=1703.8Da[C]⁺_{monoisotopic}=2276.0Da (N-ter)

Glycopeptide 6

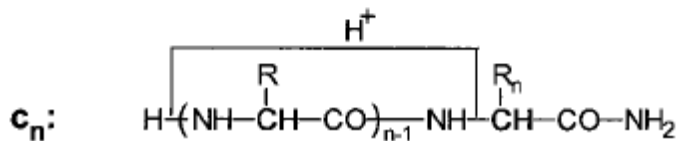
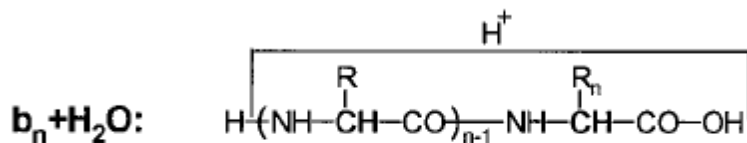
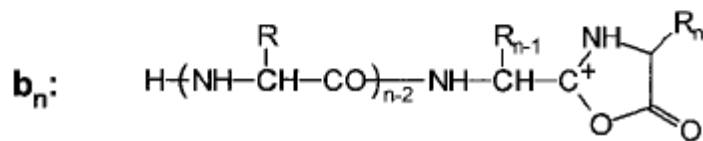
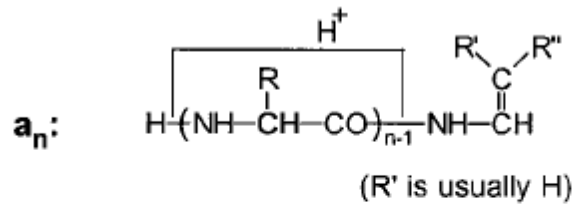
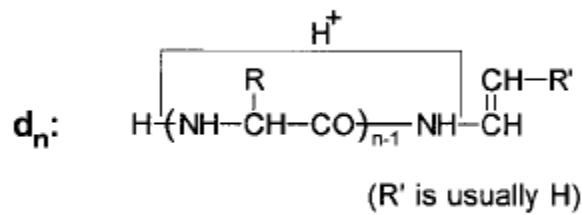
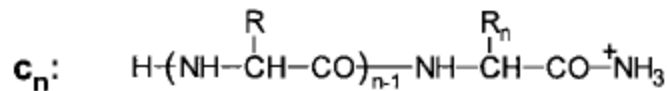
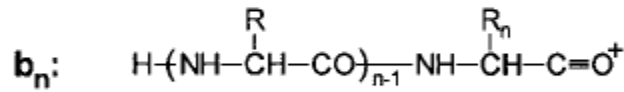
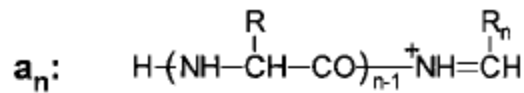
[M]_{monoisotopic}=1865.8Da[C]⁺_{monoisotopic}=2438.0Da (N-ter)

Glycopeptide 8

[M]_{monoisotopic}=1906.9Da[C]⁺_{monoisotopic}=2479.1Da (N-ter)[C]⁺_{monoisotopic}=2194.0Da (C-ter)

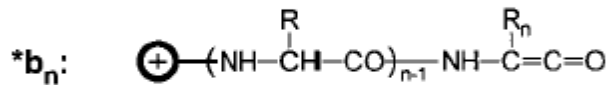
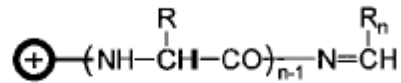
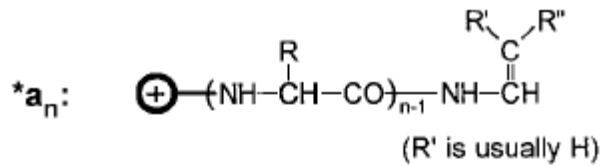
A₂ : Schémas de Fragmentation

Ions peptidiques N-terminaux à charge mobile:

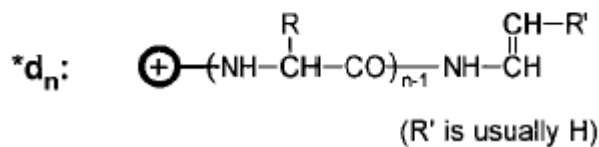
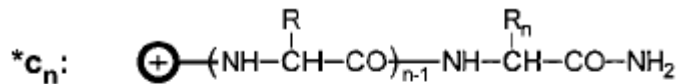
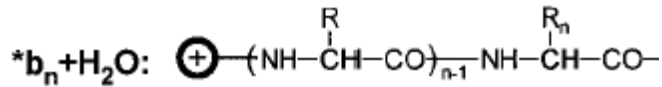
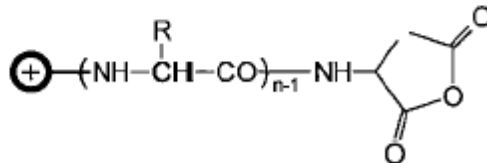


(d'après Roth KDW et al, 1998)

Ions peptidiques N-terminaux à charge permanente:



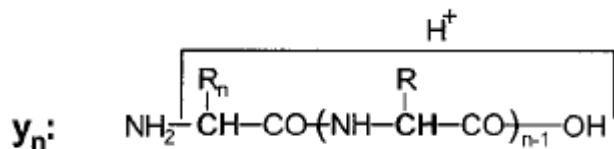
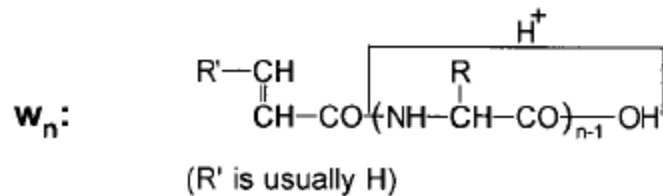
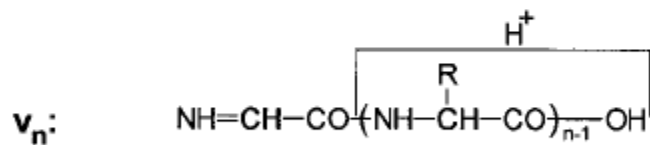
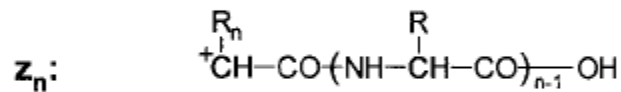
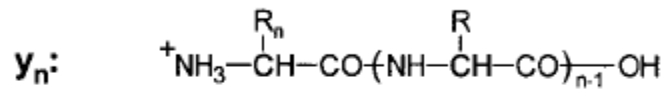
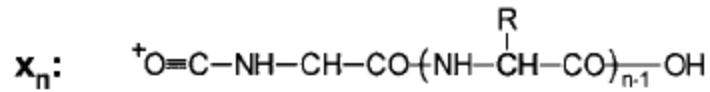
***b_n**: (when Asp is residue n)



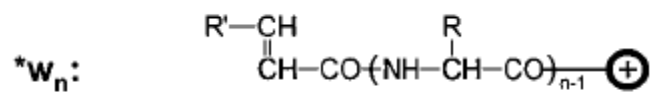
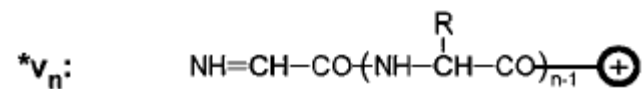
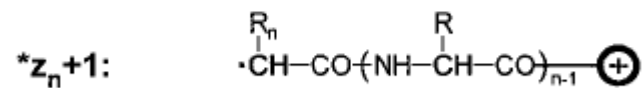
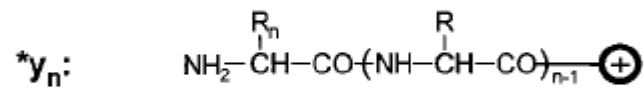
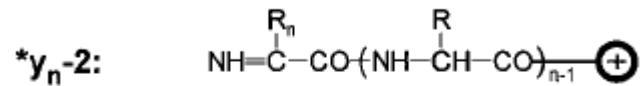
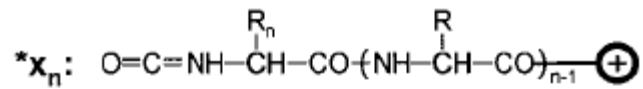
\oplus = fixed charge moiety

(d'après Roth KDW et al, 1998)

Ions peptidiques C-terminaux à charge mobile:



Ions peptidiques C-terminaux à charge permanente:



(R' is usually H)

\oplus = fixed charge moiety

(d'après Roth KDW et al, 1998)

Pertes et Fragments

-18 : perte d'H₂O

-44 : perte de CH₃-CHO

-45 : perte de (CH₃)₂-NH

-57 : perte de CH₂=CH-NH-CH₃

-71 : CH₂=CH-N-(CH₃)₂

72+: CH₃-CH=N⁺-(CH₃)₂

-97: perte d'un résidu de Proline

289⁺: ion C-terminal (Φ)₃-P⁺-CH=CH₂

573⁺: ion N-terminal ((CH₃O)₃Φ)₃-P⁺-CH=C=O

A₃ : lons peptidique à charge mobile
et à charge permanente

TT(GalNAc)SAP

Average Mass = 678.6942, Monoisotopic Mass = 678.3072

Residues: 1-5

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	74.1	378.2	465.2	536.3	-
b	102.1	406.2	493.2	564.3	-
c''	119.1	423.2	510.2	581.3	-
i	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1
	1	2	3	4	5
	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	5	4	3	2	1
x	-	604.2	300.1	213.1	142.1
y''	-	578.3	274.1	187.1	116.1
z	-	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TT(GalNAc)SAP

TMPP⁺-Ac-TT(GalNAc)SAP

Average Mass = 1251.2430, Monoisotopic Mass = 1250.4884

Residues: 1-5

N-Terminus = tmpp_ac_yI, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	646.2	950.4	1037.4	1108.4	-
b	674.2	978.4	1065.4	1136.4	-
c''	691.3	995.4	1082.4	1153.5	-
i	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1
	1	2	3	4	5
	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	5	4	3	2	1
x	-	604.2	300.1	213.1	142.1
y''	-	578.3	274.1	187.1	116.1
z	-	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-TT(GalNAc)SAP

TT(GalNAc)SAPTTS

Average Mass = 967.9827, Monoisotopic Mass = 967.4346

Residues: 1-8

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	74.1	378.2	465.2	536.3	633.3	734.4	835.4	-
b	102.1	406.2	493.2	564.3	661.3	762.4	863.4	-
c''	119.1	423.2	510.2	581.3	678.3	779.4	880.4	-
da	58.1	145.1	449.2	536.3	-	718.4	819.4	-
db	60.0	-	-	-	-	720.3	821.4	-
i	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1	74.1	74.1	60.0
a~	56.0	360.2	447.2	518.2	615.3	716.3	817.4	-
a*	57.0	361.2	448.2	519.2	616.3	717.3	818.4	-
b~	84.0	388.2	475.2	546.2	643.3	744.3	845.4	-
b*	85.0	389.2	476.2	547.2	644.3	745.3	846.4	-
c~	101.1	405.2	492.2	563.3	660.3	761.4	862.4	-
c*	102.1	406.2	493.2	564.3	661.3	762.4	863.4	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	-	867.4	563.3	476.2	405.2	308.1	207.1	106.1
y~	-	849.4	545.3	458.2	387.2	290.1	189.1	88.0
y*	-	850.4	546.2	459.2	388.2	291.1	190.1	89.0

Fragmentation théorique de l'espèce TT(GalNAc)SAPTTS

TMPP+-Ac-TT(GalNAc)SAPTTS

Average Mass = 1540.5315, Monoisotopic Mass = 1539.6158

Residues: 1-8

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	646.2	950.4	1037.4	1108.4	1205.5	1306.5	1407.6	-
b	674.2	978.4	1065.4	1136.4	1233.5	1334.5	1435.6	-
c''	691.3	995.4	1082.4	1153.5	1250.5	1351.6	1452.6	-
da	630.2	717.3	1021.4	1108.4	-	1290.5	1391.6	-
db	632.2	-	-	-	-	1292.5	1393.6	-
i	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1	74.1	74.1	60.0
a~	628.2	932.4	1019.4	1090.4	1187.5	1288.5	1389.6	-
a*	629.2	933.3	1020.4	1091.4	1188.5	1289.5	1390.6	-
b~	656.2	960.4	1047.4	1118.4	1215.5	1316.5	1417.6	-
b*	657.2	961.3	1048.4	1119.4	1216.5	1317.5	1418.6	-
c~	673.3	977.4	1064.4	1135.4	1232.5	1333.5	1434.6	-
c*	674.2	978.4	1065.4	1136.4	1233.5	1334.5	1435.6	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	-	867.4	563.3	476.2	405.2	308.1	207.1	106.1
y~	-	849.4	545.3	458.2	387.2	290.1	189.1	88.0
y*	-	850.4	546.2	459.2	388.2	291.1	190.1	89.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-TT(GalNAc)SAPTTS

TTSTT(GalNAc)SAP

Average Mass = 967.9827, Monoisotopic Mass = 967.4346

Residues: 1-8

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	74.1	175.1	262.1	363.2	667.3	754.3	825.4	-
b	102.1	203.1	290.1	391.2	695.3	782.3	853.4	-
c"	119.1	220.1	307.2	408.2	712.3	799.4	870.4	-
da	58.1	159.1	246.1	347.2	434.2	738.4	825.4	-
db	60.0	161.1	-	349.2	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1
a~	56.0	157.1	244.1	345.2	649.3	736.3	807.4	-
a*	57.0	158.1	245.1	346.2	650.3	737.3	808.4	-
b~	84.0	185.1	272.1	373.2	677.3	764.3	835.4	-
b*	85.0	186.1	273.1	374.2	678.3	765.3	836.4	-
c~	101.1	202.1	289.2	390.2	694.3	781.4	852.4	-
c*	102.1	203.1	290.1	391.2	695.3	782.3	853.4	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y"	-	867.4	766.3	679.3	578.3	274.1	187.1	116.1
y~	-	849.4	748.3	661.3	560.3	256.1	169.1	98.1
y*	-	850.4	749.3	662.3	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TTSTT(GalNAc)SAP

TMPP⁺-Ac-TTSTT(GalNAc)SAP

Average Mass = 1540.5315, Monoisotopic Mass = 1539.6158

Residues: 1-8

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	646.2	747.3	834.3	935.4	1239.5	1326.5	1397.6	-
b	674.2	775.3	862.3	963.4	1267.5	1354.5	1425.6	-
c''	691.3	792.3	879.3	980.4	1284.5	1371.5	1442.6	-
da	630.2	731.3	818.3	919.4	1006.4	1310.5	1397.6	-
db	632.2	733.3	-	921.4	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1
a~	628.2	729.3	816.3	917.4	1221.5	1308.5	1379.6	-
a*	629.2	730.3	817.3	918.3	1222.5	1309.5	1380.5	-
b~	656.2	757.3	844.3	945.4	1249.5	1336.5	1407.5	-
b*	657.2	758.3	845.3	946.3	1250.5	1337.5	1408.5	-
c~	673.3	774.3	861.3	962.4	1266.5	1353.5	1424.6	-
c*	674.2	775.3	862.3	963.4	1267.5	1354.5	1425.6	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	-	867.4	766.3	679.3	578.3	274.1	187.1	116.1
y~	-	849.4	748.3	661.3	560.3	256.1	169.1	98.1
y*	-	850.4	749.3	662.3	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-TTSTT(GalNAc)SAP

TTSTT(GalNAc)SAP-NH-Et-TPP⁺

Average Mass = 1255.3268, Monoisotopic Mass = 1254.5574

Residues: 1-8

N-Terminus = H, C-Terminus = TPPEAY

Fragment ions: Monoisotopic/Average (300) m/z ratios with 1 positive charge(s).

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
x'	-	1182.2	1081.1	994.0	892.9	588.6	501.6	430.5
y'	-	1154.2	1053.1	966.0	864.9	560.6	473.6	402.5
x~	-	1164.2	1063.1	976.0	874.9	570.6	483.6	412.5
x*	-	1165.2	1064.1	977.0	875.9	571.6	484.5	413.5
y~	-	1136.2	1035.1	948.0	846.9	542.6	455.5	384.5
y*	-	1137.2	1036.1	949.0	847.9	543.6	456.5	385.4

Fragmentation théorique de l'espèce TTSTT(GalNAc)SAP-NH-Et-TPP⁺

GTT(GalNAc)PSPVP

Average Mass = 958.0334, Monoisotopic Mass = 957.4655

Residues: 1-8

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	435.2	532.3	619.3	716.3	815.4	-
b	58.0	159.1	463.2	560.3	647.3	744.3	843.4	-
c"	75.1	176.1	480.2	577.3	664.3	761.4	860.4	-
da	-	115.1	202.1	-	603.3	-	801.4	-
db	-	117.1	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	277.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	12.0	113.1	417.2	514.3	601.3	698.3	797.4	-
a*	13.0	114.1	418.2	515.2	602.3	699.3	798.4	-
b~	40.0	141.1	445.2	542.2	629.3	726.3	825.4	-
b*	41.0	142.1	446.2	543.2	630.3	727.3	826.4	-
c~	57.0	158.1	462.2	559.3	646.3	743.4	842.4	-
c*	58.0	159.1	463.2	560.3	647.3	744.3	843.4	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y"	-	901.5	800.4	496.3	399.2	312.2	215.1	116.1
y~	-	883.4	782.4	478.3	381.2	294.2	197.1	98.1
y*	-	884.4	783.4	479.3	382.2	295.2	198.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTT(GalNAc)PSPVP

TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc)PSPVP

Average Mass = 1530.5822, Monoisotopic Mass = 1529.6467

Residues: 1-8

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	1007.4	1104.4	1191.5	1288.5	1387.6	-
b	630.2	731.3	1035.4	1132.4	1219.5	1316.5	1415.6	-
c''	647.2	748.3	1052.4	1149.4	1236.5	1333.5	1432.6	-
da	-	687.3	774.3	-	1175.5	-	1373.6	-
db	-	689.2	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	277.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	584.2	685.3	989.4	1086.4	1173.5	1270.5	1369.6	-
a*	585.2	686.3	990.4	1087.4	1174.4	1271.5	1370.6	-
b~	612.2	713.2	1017.4	1114.4	1201.5	1298.5	1397.6	-
b*	613.2	714.2	1018.4	1115.4	1202.4	1299.5	1398.6	-
c~	629.2	730.3	1034.4	1131.5	1218.5	1315.5	1414.6	-
c*	630.2	731.3	1035.4	1132.4	1219.4	1316.5	1415.6	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	-	901.5	800.4	496.3	399.2	312.2	215.1	116.1
y~	-	883.4	782.4	478.3	381.2	294.2	197.1	98.1
y*	-	884.4	783.4	479.3	382.2	295.2	198.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc)PSPVP

GTT(GalNAc)PSPVP-NH-Et-TPP+

Average Mass = 1245.3775, Monoisotopic Mass = 1244.5883

Residues: 1-8

N-Terminus = H, C-Terminus = TPPEAY

Fragment ions: Monoisotopic/Average (300) m/z ratios with 1 positive charge(s).

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
x'	-	1216.3	1115.2	810.9	713.8	626.7	529.6	430.5
y'	-	1188.3	1087.2	782.9	685.8	598.7	501.6	402.5
x~	-	1198.3	1097.2	792.9	695.8	608.7	511.6	412.5
x*	-	1199.3	1098.2	793.9	696.8	609.7	512.6	413.5
y~	-	1170.3	1069.2	764.9	667.8	580.7	483.6	384.5
y*	-	1171.3	1070.2	765.9	668.8	581.7	484.6	385.4

Fragmentation théorique de l'espèce GTT(GalNAc)PSPVP-NH-Et-TPP⁺

GTPSPVPT(GalNAc)TSTTSAP

Average Mass = 1704.8059, Monoisotopic Mass = 1703.8101

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	232.1	329.2	416.2	513.3	612.3	709.4
b	58.0	159.1	260.1	357.2	444.2	541.3	640.3	737.4
c ⁺	75.1	176.1	277.2	374.2	461.2	558.3	657.4	754.4
da	-	115.1	216.1	-	400.2	-	598.3	-
db	-	117.1	218.1	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	74.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a [~]	12.0	113.1	214.1	311.2	398.2	495.3	594.3	691.4
a [*]	13.0	114.1	215.1	312.2	399.2	496.2	595.3	692.4
b [~]	40.0	141.1	242.1	339.2	426.2	523.3	622.3	719.4
b [*]	41.0	142.1	243.1	340.2	427.2	524.2	623.3	720.4
c [~]	57.0	158.1	259.1	356.2	443.2	540.3	639.3	736.4
c [*]	58.0	159.1	260.1	357.2	444.2	541.3	640.3	737.4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y ⁺	-	1647.8	1546.7	1445.7	1348.6	1261.6	1164.6	1065.5
y [~]	-	1629.8	1528.7	1427.7	1330.6	1243.6	1146.6	1047.5
y [*]	-	1630.8	1529.7	1428.7	1331.6	1244.6	1147.5	1048.5

a	1013.5	1114.6	1201.6	1302.6	1403.7	1490.7	1561.8	-
b	1041.5	1142.6	1229.6	1330.6	1431.7	1518.7	1589.8	-
c ⁺	1058.5	1159.6	1246.6	1347.7	1448.7	1535.7	1606.8	-
da	780.4	1098.6	1185.6	1286.6	1387.7	1474.7	1561.8	-
db	-	1100.5	-	1288.6	1389.7	-	-	-
i	277.1	74.1	60.0	74.1	74.1	60.0	44.1	70.1
a [~]	995.5	1096.6	1183.6	1284.6	1385.7	1472.7	1543.7	-
a [*]	996.5	1097.5	1184.6	1285.6	1386.7	1473.7	1544.7	-
b [~]	1023.5	1124.5	1211.6	1312.6	1413.7	1500.7	1571.7	-
b [*]	1024.5	1125.5	1212.6	1313.6	1414.7	1501.7	1572.7	-
c [~]	1040.5	1141.6	1228.6	1329.7	1430.7	1517.7	1588.8	-
c [*]	1041.5	1142.6	1229.6	1330.6	1431.7	1518.7	1589.8	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	TGa	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y ⁺	968.4	664.3	563.3	476.2	375.2	274.1	187.1	116.1
y [~]	950.4	646.3	545.3	458.2	357.2	256.1	169.1	98.1
y [*]	951.4	647.3	546.2	459.2	358.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTPSPVPT(GalNAc)TSTTSAP

TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPT(GaINAc)TSTTSAP

Average Mass = 2277.3547, Monoisotopic Mass = 2275.9913

Residues: 1-16

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	804.3	901.4	988.4	1085.4	1184.5	1281.6	
b	630.2	731.3	832.3	929.4	1016.4	1113.4	1212.5	1309.6	
c''	647.2	748.3	849.3	946.4	1033.4	1130.5	1229.5	1326.6	
da	-	687.3	788.3	-	972.4	-	1170.5	-	
db	-	689.2	790.3	-	-	-	-	-	
i	30.0	74.1	74.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1	
a~	584.2	685.3	786.3	883.4	970.4	1067.4	1166.5	1263.6	
a*	585.2	686.2	787.3	884.3	971.4	1068.4	1167.5	1264.5	
b~	612.2	713.2	814.3	911.3	998.4	1095.4	1194.5	1291.6	
b*	613.2	714.2	815.3	912.3	999.4	1096.4	1195.5	1292.5	
c~	629.2	730.3	831.3	928.4	1015.4	1112.5	1211.5	1308.6	
c*	630.2	731.3	832.3	929.4	1016.4	1113.4	1212.5	1309.6	
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
		16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1647.8	1546.7	1445.7	1348.6	1261.6	1164.6	1065.5	
y~	-	1629.8	1528.7	1427.7	1330.6	1243.6	1146.6	1047.5	
y*	-	1630.8	1529.7	1428.7	1331.6	1244.6	1147.5	1048.5	

a	1585.7	1686.7	1774.9	1876.0	1977.1	2064.1	2135.2	-	
b	1613.7	1714.7	1802.9	1904.0	2005.1	2092.2	2163.2	-	
c''	1630.7	1731.8	1819.9	1921.0	2022.1	2109.2	2180.3	-	
da	1352.6	1670.7	1758.9	1860.0	1961.1	2048.1	2135.2	-	
db	-	1672.7	-	1861.9	1963.0	-	-	-	
i	277.1	74.1	60.0	74.1	74.1	60.0	44.1	70.1	
a~	1567.7	1668.7	1756.8	1857.9	1959.0	2046.1	2117.2	-	
a*	1568.7	1669.7	1757.8	1858.9	1960.0	2047.1	2118.2	-	
b~	1595.7	1696.7	1784.8	1886.0	1987.1	2074.1	2145.2	-	
b*	1596.7	1697.7	1785.8	1886.9	1988.0	2075.1	2146.2	-	
c~	1612.7	1713.8	1801.9	1903.0	2004.1	2091.2	2162.2	-	
c*	1613.7	1714.7	1802.9	1904.0	2005.1	2092.2	2163.2	-	
		9	10	11	12	13	14	15	16
		TGa	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
		8	7	6	5	4	3	2	1
y''	968.4	664.3	563.3	476.2	375.2	274.1	187.1	116.1	
y~	950.4	646.3	545.3	458.2	357.2	256.1	169.1	98.1	
y*	951.4	647.3	546.2	459.2	358.2	257.1	170.1	99.0	

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPT(GaINAc)TSTTSAP

GTPSPVPT(GalNAc-Gal)TSTTSAP

Average Mass = 1866.9483, Monoisotopic Mass = 1865.8629

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	232.1	329.2	416.2	513.3	612.3	709.4
b	58.0	159.1	260.1	357.2	444.2	541.3	640.3	737.4
c''	75.1	176.1	277.2	374.2	461.2	558.3	657.4	754.4
da	-	115.1	216.1	-	400.2	-	598.3	-
db	-	117.1	218.1	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	74.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	12.0	113.1	214.1	311.2	398.2	495.3	594.3	691.4
a*	13.0	114.1	215.1	312.2	399.2	496.2	595.3	692.4
b~	40.0	141.1	242.1	339.2	426.2	523.3	622.3	719.4
b*	41.0	142.1	243.1	340.2	427.2	524.2	623.3	720.4
c~	57.0	158.1	259.1	356.2	443.2	540.3	639.3	736.4
c*	58.0	159.1	260.1	357.2	444.2	541.3	640.3	737.4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1810.9	1708.8	1607.8	1510.7	1423.7	1326.6	1227.5
y~	-	1792.9	1690.8	1589.7	1492.7	1405.7	1308.6	1209.5
y*	-	1793.9	1691.8	1590.7	1493.7	1406.6	1309.6	1210.5

a	1175.6	1276.6	1363.6	1464.7	1565.7	1652.8	1723.8	-
b	1203.6	1304.6	1391.6	1492.7	1593.7	1680.8	1752.8	-
c''	1220.6	1321.6	1408.7	1509.7	1610.8	1697.8	1769.9	-
da	780.4	1260.6	1347.7	1448.7	1549.7	1636.8	1723.8	-
db	-	1262.6	-	1450.7	1551.7	-	-	-
i	439.2	74.1	60.0	74.1	74.1	60.0	44.1	70.1
a~	1157.6	1258.6	1345.6	1446.7	1547.7	1634.8	1705.8	-
a*	1158.5	1259.6	1346.6	1447.7	1548.7	1635.7	1706.8	-
b~	1185.6	1286.6	1373.6	1474.7	1575.7	1662.8	1733.8	-
b*	1186.5	1287.6	1374.6	1475.7	1576.7	1663.7	1734.8	-
c~	1202.6	1303.6	1390.7	1491.7	1592.8	1679.8	1751.8	-
c*	1203.6	1304.6	1391.6	1492.7	1593.7	1680.8	1752.8	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	TGaG	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	1130.5	664.3	563.3	476.2	375.2	274.1	187.1	116.1
y~	1112.5	646.3	545.3	458.2	357.2	256.1	169.1	98.1
y*	1113.5	647.3	546.2	459.2	358.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTPSPVPT(GalNAcGal)TSTTSAP

TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPT(GalNAc-Gal)TSTTSAP

Average Mass = 2439.4971, Monoisotopic Mass = 2438.0441

Residues: 1-16

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	804.3	901.4	988.4	1085.4	1184.5	1281.6
b	630.2	731.3	832.3	929.4	1016.4	1113.4	1212.5	1309.6
c''	647.2	748.3	849.3	946.4	1033.4	1130.5	1229.5	1326.6
da	-	687.3	788.3	-	972.4	-	1170.5	-
db	-	689.2	790.3	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	74.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	584.2	685.3	786.3	883.4	970.4	1067.4	1166.5	1263.6
a*	585.2	686.2	787.3	884.3	971.4	1068.4	1167.5	1264.5
b~	612.2	713.2	814.3	911.3	998.4	1095.4	1194.5	1291.6
b*	613.2	714.2	815.3	912.3	999.4	1096.4	1195.5	1292.5
c~	629.2	730.3	831.3	928.4	1015.4	1112.5	1211.5	1308.6
c*	630.2	731.3	832.3	929.4	1016.4	1113.4	1212.5	1309.6

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1810.9	1708.8	1607.8	1510.7	1423.7	1326.6	1227.5
y~	-	1792.9	1690.8	1589.7	1492.7	1405.7	1308.6	1209.5
y*	-	1793.9	1691.8	1590.7	1493.7	1406.6	1309.6	1210.5

a	1747.7	1849.9	1937.0	2038.1	2139.2	2226.3	2297.4	-
b	1776.8	1877.9	1965.0	2066.1	2167.2	2254.3	2325.4	-
c''	1793.9	1895.0	1982.0	2083.1	2184.2	2271.3	2342.4	-
da	1352.6	1833.9	1921.0	2022.1	2123.2	2210.3	2297.4	-
db	-	1835.9	-	2024.1	2125.2	-	-	-
i	439.2	74.1	60.0	74.1	74.1	60.0	44.1	70.1
a~	1729.7	1831.9	1919.0	2020.1	2121.2	2208.3	2279.3	-
a*	1730.7	1832.9	1920.0	2021.1	2122.2	2209.3	2280.3	-
b~	1758.8	1859.9	1947.0	2048.1	2149.2	2236.3	2307.4	-
b*	1759.8	1860.9	1948.0	2049.1	2150.2	2237.3	2308.3	-
c~	1775.8	1876.9	1964.0	2065.1	2166.2	2253.3	2324.4	-
c*	1776.8	1877.9	1965.0	2066.1	2167.2	2254.3	2325.4	-

	9	10	11	12	13	14	15	16
	TGaG	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	1130.5	664.3	563.3	476.2	375.2	274.1	187.1	116.1
y~	1112.5	646.3	545.3	458.2	357.2	256.1	169.1	98.1
y*	1113.5	647.3	546.2	459.2	358.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPT(GalNAcGal)TSTTSAP

GTT(GalNAc)PSPVPTTSTT(GalNAc)SAP
Average Mass = 1908.0009, Monoisotopic Mass = 1906.8895
Residues: 1-16
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	435.2	532.3	619.3	716.3	815.4	912.5
b	58.0	159.1	463.2	560.3	647.3	744.3	843.4	940.5
c"	75.1	176.1	480.2	577.3	664.3	761.4	860.4	957.5
da	-	115.1	202.1	-	603.3	-	801.4	-
db	-	117.1	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	277.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	12.0	113.1	417.2	514.3	601.3	698.3	797.4	894.5
a*	13.0	114.1	418.2	515.2	602.3	699.3	798.4	895.4
b~	40.0	141.1	445.2	542.2	629.3	726.3	825.4	922.5
b*	41.0	142.1	446.2	543.2	630.3	727.3	826.4	923.4
c~	57.0	158.1	462.2	559.3	646.3	743.4	842.4	939.5
c*	58.0	159.1	463.2	560.3	647.3	744.3	843.4	940.5
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y"	-	1852.0	1749.8	1445.7	1348.6	1261.6	1164.6	1065.5
y~	-	1833.9	1731.8	1427.7	1330.6	1243.6	1146.6	1047.5
y*	-	1834.9	1732.8	1428.7	1331.6	1244.6	1147.5	1048.5

a	1013.5	1114.6	1201.6	1302.6	1606.8	1693.8	1765.9	-
b	1041.5	1142.6	1229.6	1330.6	1634.8	1721.8	1793.9	-
c"	1058.5	1159.6	1246.6	1347.7	1651.8	1738.8	1810.9	-
da	997.5	1098.6	1185.6	1286.6	1373.7	1677.8	1765.9	-
db	999.5	1100.5	-	1288.6	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1
a~	995.5	1096.6	1183.6	1284.6	1588.8	1675.8	1746.8	-
a*	996.5	1097.5	1184.6	1285.6	1589.7	1676.8	1747.8	-
b~	1023.5	1124.5	1211.6	1312.6	1616.8	1703.8	1775.9	-
b*	1024.5	1125.5	1212.6	1313.6	1617.7	1704.8	1776.8	-
c~	1040.5	1141.6	1228.6	1329.7	1633.8	1720.8	1792.9	-
c*	1041.5	1142.6	1229.6	1330.6	1634.8	1721.8	1793.9	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y"	968.4	867.4	766.3	679.3	578.3	274.1	187.1	116.1
y~	950.4	849.4	748.3	661.3	560.3	256.1	169.1	98.1
y*	951.4	850.4	749.3	662.3	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTT(GalNAc)PSPVPTTSTT(GalNAc)SAP

TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc)PSPVPTTSTT(GalNAc)SAP
 Average Mass = 2480.5497, Monoisotopic Mass = 2479.0707
 Residues: 1-16
 N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH
 Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	1007.4	1104.4	1191.5	1288.5	1387.6	1484.6
b	630.2	731.3	1035.4	1132.4	1219.5	1316.5	1415.6	1512.6
c''	647.2	748.3	1052.4	1149.5	1236.5	1333.5	1432.6	1529.7
da	-	687.3	774.3	-	1175.5	-	1373.6	-
db	-	689.2	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	277.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	584.2	685.3	989.4	1086.4	1173.5	1270.5	1369.6	1466.6
a*	585.2	686.2	990.4	1087.4	1174.4	1271.5	1370.6	1467.6
b~	612.2	713.2	1017.4	1114.4	1201.5	1298.5	1397.6	1494.6
b*	613.2	714.2	1018.4	1115.4	1202.4	1299.5	1398.6	1495.6
c~	629.2	730.3	1034.4	1131.5	1218.5	1315.5	1414.6	1511.7
c*	630.2	731.3	1035.4	1132.4	1219.5	1316.5	1415.6	1512.6

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1852.0	1749.8	1445.7	1348.6	1261.6	1164.6	1065.5
y~	-	1833.9	1731.8	1427.7	1330.6	1243.6	1146.6	1047.5
y*	-	1834.9	1732.8	1428.7	1331.6	1244.6	1147.5	1048.5

a	1585.7	1686.7	1774.9	1876.0	2180.3	2267.3	2338.4	-
b	1613.7	1714.7	1802.9	1904.0	2208.3	2295.3	2366.4	-
c''	1630.7	1731.8	1819.9	1921.0	2225.3	2312.4	2383.5	-
da	1569.7	1670.7	1758.9	1860.0	1947.0	2251.3	2338.4	-
db	1571.7	1672.7	-	1861.9	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	277.1	60.0	44.1	70.1
a~	1567.7	1668.7	1756.8	1857.9	2162.2	2249.3	2320.4	-
a*	1568.7	1669.7	1757.8	1858.9	2163.2	2250.3	2321.4	-
b~	1595.7	1696.7	1784.8	1886.0	2190.3	2277.3	2348.4	-
b*	1596.7	1697.7	1785.8	1886.9	2191.2	2278.3	2349.4	-
c~	1612.7	1713.8	1801.9	1903.0	2207.3	2294.4	2365.4	-
c*	1613.7	1714.7	1802.9	1904.0	2208.3	2295.3	2366.4	-

	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	968.4	867.4	766.3	679.3	578.3	274.1	187.1	116.1
y~	950.4	849.4	748.3	661.3	560.3	256.1	169.1	98.1
y*	951.4	850.4	749.3	662.3	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc)PSPVPTTSTT(GalNAc)SAP

GTT(GaINAc)PSPVPTTSTT(GaINAc)SAP-NH-Et-TPP+

Average Mass = 2195.3450, Monoisotopic Mass = 2194.0123

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = TPPEAY

Fragment ions: Monoisotopic/Average (300) m/z ratios with 1 positive charge(s).

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
x'	-	2166.3	2065.2	1760.9	1663.8	1576.7	1479.6	1380.5
y'	-	2138.3	2037.2	1732.9	1635.8	1548.7	1451.6	1352.4
x~	-	2148.3	2047.2	1742.9	1645.8	1558.7	1461.6	1362.4
x*	-	2149.3	2048.2	1743.9	1646.8	1559.7	1462.6	1363.4
y~	-	2120.3	2019.2	1714.9	1617.8	1530.7	1433.6	1334.4
y*	-	2121.3	2020.2	1715.9	1618.7	1531.7	1434.5	1335.4

	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
x'	1283.3	1182.2	1081.1	994.0	892.9	588.6	501.6	430.5
y'	1255.3	1154.2	1053.1	966.0	864.9	560.6	473.6	402.5
x~	1265.3	1164.2	1063.1	976.0	874.9	570.6	483.6	412.5
x*	1266.3	1165.2	1064.1	977.0	875.9	571.6	484.5	413.5
y~	1237.3	1136.2	1035.1	948.0	846.9	542.6	455.5	384.5
y*	1238.3	1137.2	1036.1	949.0	847.9	543.6	456.5	385.4

Fragmentation théorique de l'espèce GTT(GaINAc)PSPVPTTSTT(GaINAc)SAP-NH-Et-TPP⁺

GTT(GalNAc-Gal)PSPVPTTSTT(GalNAc-Gal)SAP

Average Mass = 2232.2857, Monoisotopic Mass = 2230.9951

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	597.3	694.3	781.3	878.4	977.5	1074.5
b	58.0	159.1	625.3	722.3	809.3	906.4	1005.5	1102.5
c''	75.1	176.1	642.3	739.3	826.4	923.4	1022.5	1119.5
da	-	115.1	202.1	-	765.4	-	963.5	-
db	-	117.1	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	439.2	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	12.0	113.1	579.3	676.3	763.3	860.4	959.5	1056.5
a*	13.0	114.1	580.2	677.3	764.3	861.4	960.4	1057.5
b~	40.0	141.1	607.2	704.3	791.3	888.4	987.5	1084.5
b*	41.0	142.1	608.2	705.3	792.3	889.4	988.4	1085.5
c~	57.0	158.1	624.3	721.3	808.4	905.4	1004.5	1101.5
c*	58.0	159.1	625.3	722.3	809.3	906.4	1005.5	1102.5
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGaG	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	2176.2	2075.1	1607.8	1510.7	1423.7	1326.6	1227.5
y~	-	2158.2	2057.1	1589.7	1492.7	1405.7	1308.6	1209.5
y*	-	2159.2	2058.1	1590.7	1493.7	1406.6	1309.6	1210.5

a	1175.6	1276.6	1363.6	1464.7	1932.0	2019.1	2090.2	-
b	1203.6	1304.6	1391.6	1492.7	1960.0	2047.1	2118.2	-
c''	1220.6	1321.6	1408.7	1509.7	1977.0	2064.1	2135.2	-
da	1159.6	1260.6	1347.7	1448.7	1535.7	2003.1	2090.2	-
db	1161.6	1262.6	-	1450.7	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	439.2	60.0	44.1	70.1
a~	1157.6	1258.6	1345.6	1446.7	1914.0	2001.1	2072.1	-
a*	1158.5	1259.6	1346.6	1447.7	1915.0	2002.0	2073.1	-
b~	1185.6	1286.6	1373.6	1474.7	1942.0	2029.1	2100.1	-
b*	1186.5	1287.6	1374.6	1475.7	1943.0	2030.1	2101.1	-
c~	1202.6	1303.6	1390.7	1491.7	1959.0	2046.1	2117.2	-
c*	1203.6	1304.6	1391.6	1492.7	1960.0	2047.1	2118.2	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	TGaG	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	1130.5	1029.4	928.4	841.4	740.3	274.1	187.1	116.1
y~	1112.5	1011.4	910.4	823.4	722.3	256.1	169.1	98.1
y*	1113.5	1012.4	911.4	824.3	723.3	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTT(GalNAcGal)PSPVPTTSTT(GalNAcGal)SAP

TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc-Gal)PSPVPTTSTT(GalNAc-Gal)SAP

Average Mass = 2804.8345, Monoisotopic Mass = 2803.1763

Residues: 1-16

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	1169.4	1266.5	1353.5	1450.6	1549.6	1646.7	
b	630.2	731.3	1197.4	1294.5	1381.5	1478.6	1577.6	1674.7	
c ⁺	647.2	748.3	1214.5	1311.5	1398.5	1495.6	1594.7	1691.7	
da	-	687.3	774.3	-	1337.5	-	1535.6	-	
db	-	689.2	-	-	-	-	-	-	
i	30.0	74.1	439.2	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1	
a~	584.2	685.3	1151.4	1248.5	1335.5	1432.6	1531.6	1628.7	
a*	585.2	686.2	1152.4	1249.5	1336.5	1433.6	1532.6	1629.7	
b~	612.2	713.2	1179.4	1276.5	1363.5	1460.6	1559.6	1656.7	
b*	613.2	714.2	1180.4	1277.5	1364.5	1461.5	1560.6	1657.7	
c~	629.2	730.3	1196.5	1293.5	1380.5	1477.6	1576.7	1673.7	
c*	630.2	731.3	1197.4	1294.5	1381.5	1478.6	1577.6	1674.7	
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Gly	Thr	TGaG	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
		16	15	14	13	12	11	10	9
y ⁺	-	2176.2	2075.1	1607.8	1510.7	1423.7	1326.6	1227.5	
y~	-	2158.2	2057.1	1589.7	1492.7	1405.7	1308.6	1209.5	
y*	-	2159.2	2058.1	1590.7	1493.7	1406.6	1309.6	1210.5	

a	1747.7	1849.9	1937.0	2038.1	2504.5	2591.6	2662.7	-	
b	1776.8	1877.9	1965.0	2066.1	2532.6	2619.6	2690.7	-	
c ⁺	1793.9	1895.0	1982.0	2083.1	2549.6	2636.7	2707.7	-	
da	1731.8	1833.9	1921.0	2022.1	2109.2	2575.6	2662.7	-	
db	1733.7	1835.9	-	2024.1	-	-	-	-	
i	74.1	74.1	60.0	74.1	439.2	60.0	44.1	70.1	
a~	1729.7	1831.9	1919.0	2020.1	2486.5	2573.6	2644.7	-	
a*	1730.7	1832.9	1920.0	2021.1	2487.5	2574.6	2645.7	-	
b~	1758.8	1859.9	1947.0	2048.1	2514.5	2601.6	2672.7	-	
b*	1759.8	1860.9	1948.0	2049.1	2515.5	2602.6	2673.7	-	
c~	1775.8	1876.9	1964.0	2065.1	2531.6	2618.6	2689.7	-	
c*	1776.8	1877.9	1965.0	2066.1	2532.6	2619.6	2690.7	-	
		9	10	11	12	13	14	15	16
		Thr	Thr	Ser	Thr	TGaG	Ser	Ala	Pro
		8	7	6	5	4	3	2	1
y ⁺	1130.5	1029.4	928.4	841.4	740.3	274.1	187.1	116.1	
y~	1112.5	1011.4	910.4	823.4	722.3	256.1	169.1	98.1	
y*	1113.5	1012.4	911.4	824.3	723.3	257.1	170.1	99.0	

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAcGal)PSPVPTTSTT(GalNAcGal)SAP

GTT(GalNAc)PSPVPTTST(GalNAc)T(GalNAc)SAP
Average Mass = 2111.1959, Monoisotopic Mass = 2109.9690
Residues: 1-16
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	435.2	532.3	619.3	716.3	815.4	912.5
b	58.0	159.1	463.2	560.3	647.3	744.3	843.4	940.5
c''	75.1	176.1	480.2	577.3	664.3	761.4	860.4	957.5
da	-	115.1	202.1	-	603.3	-	801.4	-
db	-	117.1	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	277.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	12.0	113.1	417.2	514.3	601.3	698.3	797.4	894.5
a*	13.0	114.1	418.2	515.2	602.3	699.3	798.4	895.4
b~	40.0	141.1	445.2	542.2	629.3	726.3	825.4	922.5
b*	41.0	142.1	446.2	543.2	630.3	727.3	826.4	923.4
c~	57.0	158.1	462.2	559.3	646.3	743.4	842.4	939.5
c*	58.0	159.1	463.2	560.3	647.3	744.3	843.4	940.5
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	2055.2	1954.0	1648.8	1551.7	1464.7	1367.6	1268.6
y~	-	2037.1	1936.0	1630.8	1533.7	1446.7	1349.6	1250.6
y*	-	2038.1	1937.0	1631.8	1534.7	1447.7	1350.6	1251.5

a	1013.5	1114.6	1201.6	1505.7	1810.9	1898.0	1969.1	-
b	1041.5	1142.6	1229.6	1533.7	1838.9	1926.0	1997.1	-
c''	1058.5	1159.6	1246.6	1550.7	1855.9	1943.0	2014.1	-
da	997.5	1098.6	1185.6	1272.6	1576.8	1882.0	1969.1	-
db	999.5	1100.5	-	-	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	277.1	277.1	60.0	44.1	70.1
a~	995.5	1096.6	1183.6	1487.7	1792.9	1880.0	1951.0	-
a*	996.5	1097.5	1184.6	1488.7	1793.9	1881.0	1952.0	-
b~	1023.5	1124.5	1211.6	1515.7	1820.9	1908.0	1979.1	-
b*	1024.5	1125.5	1212.6	1516.7	1821.9	1909.0	1980.0	-
c~	1040.5	1141.6	1228.6	1532.7	1837.9	1925.0	1996.1	-
c*	1041.5	1142.6	1229.6	1533.7	1838.9	1926.0	1997.1	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	TGa	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	1171.5	1070.5	969.4	882.4	578.3	274.1	187.1	116.1
y~	1153.5	1052.5	951.4	864.4	560.3	256.1	169.1	98.1
y*	1154.5	1053.4	952.4	865.4	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTT(GalNAc)PSPVPTTST(GalNAc)T(GalNAc)SAP

TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc)PSPVPTTST(GalNAc)T(GalNAc)SAP
 Average Mass = 2683.7447, Monoisotopic Mass = 2682.1502
 Residues: 1-16

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	1007.4	1104.4	1191.5	1288.5	1387.6	1484.6
b	630.2	731.3	1035.4	1132.4	1219.5	1316.5	1415.6	1512.6
c''	647.2	748.3	1052.4	1149.5	1236.5	1333.5	1432.6	1529.7
da	-	687.3	774.3	-	1175.5	-	1373.6	-
db	-	689.2	-	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	277.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	584.2	685.3	989.4	1086.4	1173.5	1270.5	1369.6	1466.6
a*	585.2	686.2	990.4	1087.4	1174.4	1271.5	1370.6	1467.6
b~	612.2	713.2	1017.4	1114.4	1201.5	1298.5	1397.6	1494.6
b*	613.2	714.2	1018.4	1115.4	1202.4	1299.5	1398.6	1495.6
c~	629.2	730.3	1034.4	1131.5	1218.5	1315.5	1414.6	1511.7
c*	630.2	731.3	1035.4	1132.4	1219.5	1316.5	1415.6	1512.6
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	TGa	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	2055.2	1954.0	1648.8	1551.7	1464.7	1367.6	1268.6
y~	-	2037.1	1936.0	1630.8	1533.7	1446.7	1349.6	1250.6
y*	-	2038.1	1937.0	1631.8	1534.7	1447.7	1350.6	1251.5

a	1585.7	1686.7	1774.9	2079.2	2383.5	2470.5	2541.6	-
b	1613.7	1714.7	1802.9	2107.2	2411.5	2498.5	2569.6	-
c''	1630.7	1731.8	1819.9	2124.2	2428.5	2515.6	2586.7	-
da	1569.7	1670.7	1758.9	1845.9	2150.2	2454.5	2541.6	-
db	1571.7	1672.7	-	-	-	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	277.1	277.1	60.0	44.1	70.1
a~	1567.7	1668.7	1756.8	2061.1	2365.4	2452.5	2523.6	-
a*	1568.7	1669.7	1757.8	2062.1	2366.4	2453.5	2524.6	-
b~	1595.7	1696.7	1784.8	2089.1	2393.4	2480.5	2551.6	-
b*	1596.7	1697.7	1785.8	2090.1	2394.4	2481.5	2552.6	-
c~	1612.7	1713.8	1801.9	2106.2	2410.5	2497.6	2568.6	-
c*	1613.7	1714.7	1802.9	2107.2	2411.5	2498.5	2569.6	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	TGa	TGa	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	1171.5	1070.5	969.4	882.4	578.3	274.1	187.1	116.1
y~	1153.5	1052.5	951.4	864.4	560.3	256.1	169.1	98.1
y*	1154.5	1053.4	952.4	865.4	561.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce
 TMPP⁺-Ac-GTT(GalNAc)PSPVPTTST(GalNAc)T(GalNAc)SAP

ASTGHAT(GalNAc)PLPVTDTSS

Average Mass = 1744.8304, Monoisotopic Mass = 1743.8163

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	44.0	131.1	232.1	289.2	426.2	497.2	801.4	898.4
b	72.0	159.1	260.1	317.1	454.2	525.2	829.4	926.4
c''	89.1	176.1	277.2	334.2	471.2	542.3	846.4	943.4
da	44.0	115.1	216.1	-	360.2	497.2	568.3	-
db	-	-	218.1	-	-	-	-	-
i	44.1	60.0	74.1	30.0	110.1	44.1	277.1	70.1
a~	26.0	113.1	214.1	271.1	408.2	479.2	783.4	880.4
a*	27.0	114.1	215.1	272.1	409.2	480.2	784.3	881.4
b~	54.0	141.1	242.1	299.1	436.2	507.2	811.4	908.4
b*	55.0	142.1	243.1	300.1	437.2	508.2	812.3	909.4
c~	71.1	158.1	259.1	316.2	453.2	524.3	828.4	925.4
c*	72.0	159.1	260.1	317.1	454.2	525.2	829.4	926.4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Ala	Ser	Thr	Gly	His	Ala	TGa	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1673.8	1586.8	1485.7	1428.7	1291.6	1220.6	916.5
y~	-	1655.8	1568.7	1467.7	1410.7	1273.6	1202.6	898.5
y*	-	1656.8	1569.7	1468.7	1411.7	1274.6	1203.6	899.4

a	1011.5	1108.6	1207.6	1308.7	1423.7	1524.8	1611.8	-
b	1039.5	1136.6	1235.6	1336.7	1451.7	1552.7	1639.8	-
c''	1056.5	1153.6	1252.7	1353.7	1468.7	1569.8	1656.8	-
da	969.5	-	1193.6	1292.7	1379.7	1508.8	1595.8	-
db	-	-	-	1294.7	-	1510.7	-	-
i	86.1	70.1	72.1	74.1	88.0	74.1	60.0	60.0
a~	993.5	1090.6	1189.6	1290.7	1405.7	1506.7	1593.8	-
a*	994.5	1091.5	1190.6	1291.7	1406.7	1507.7	1594.8	-
b~	1021.5	1118.5	1217.6	1318.7	1433.7	1534.7	1621.8	-
b*	1022.5	1119.5	1218.6	1319.6	1434.7	1535.7	1622.8	-
c~	1038.5	1135.6	1234.6	1335.7	1450.7	1551.8	1638.8	-
c*	1039.5	1136.6	1235.6	1336.7	1451.7	1552.7	1639.8	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Leu	Pro	Val	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	819.4	706.3	609.3	510.2	409.2	294.1	193.1	106.1
y~	801.4	688.3	591.3	492.2	391.1	276.1	175.1	88.0
y*	802.4	689.3	592.2	493.2	392.1	277.1	176.1	89.0

Fragmentation théorique de l'espèce ASTGHAT(GalNAc)PLPVTDTSS

TMPP⁺-Ac-ASTGHAT(GalNAc)PLPVTDTSS

Average Mass = 2317.3792, Monoisotopic Mass = 2315.9975

Residues: 1-16

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	616.2	703.3	804.3	861.3	998.4	1069.4	1373.6	1470.6
b	644.2	731.3	832.3	889.3	1026.4	1097.4	1401.6	1498.6
c ⁺	661.3	748.3	849.3	906.4	1043.4	1114.4	1418.6	1515.6
da	616.2	687.3	788.3	-	932.4	1069.4	1140.5	-
db	-	-	790.3	-	-	-	-	-
i	44.1	60.0	74.1	30.0	110.1	44.1	277.1	70.1
a~	598.2	685.3	786.3	843.3	980.4	1051.4	1355.5	1452.6
a*	599.2	686.2	787.3	844.3	981.4	1052.4	1356.5	1453.6
b~	626.2	713.2	814.3	871.3	1008.4	1079.4	1383.5	1480.6
b*	627.2	714.2	815.3	872.3	1009.4	1080.4	1384.5	1481.6
c~	643.2	730.3	831.3	888.3	1025.4	1096.4	1400.6	1497.6
c*	644.2	731.3	832.3	889.3	1026.4	1097.4	1401.6	1498.6
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Ala	Ser	Thr	Gly	His	Ala	TGa	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y ⁺	-	1673.8	1586.8	1485.7	1428.7	1291.6	1220.6	916.5
y~	-	1655.8	1568.7	1467.7	1410.7	1273.6	1202.6	898.5
y*	-	1656.8	1569.7	1468.7	1411.7	1274.6	1203.6	899.4

a	1583.7	1680.7	1780.9	1882.0	1997.1	2098.2	2185.3	-
b	1611.7	1708.7	1808.9	1910.0	2025.1	2126.2	2213.3	-
c ⁺	1628.7	1725.8	1825.9	1927.1	2042.1	2143.2	2230.3	-
da	1541.6	-	1766.9	1866.0	1953.1	2082.2	2169.3	-
db	-	-	-	1868.0	-	2084.2	-	-
i	86.1	70.1	72.1	74.1	88.0	74.1	60.0	60.0
a~	1565.7	1662.7	1762.9	1864.0	1979.1	2080.2	2167.3	-
a*	1566.7	1663.7	1763.9	1865.0	1980.1	2081.2	2168.3	-
b~	1593.7	1690.7	1790.9	1892.0	2007.1	2108.2	2195.3	-
b*	1594.7	1691.7	1791.9	1893.0	2008.1	2109.2	2196.3	-
c~	1610.7	1707.8	1807.9	1909.0	2024.1	2125.2	2212.3	-
c*	1611.7	1708.7	1808.9	1910.0	2025.1	2126.2	2213.3	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Leu	Pro	Val	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser
	8	7	6	5	4	3	2	1
y ⁺	819.4	706.3	609.3	510.2	409.2	294.1	193.1	106.1
y~	801.4	688.3	591.3	492.2	391.1	276.1	175.1	88.0
y*	802.4	689.3	592.2	493.2	392.1	277.1	176.1	89.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-ASTGHAT(GalNAc)PLPVTDTSS

GTPSPVPTTSTTSAP

Average Mass = 1501.6109, Monoisotopic Mass = 1500.7307

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	30.0	131.1	232.1	329.2	416.2	513.3	612.3	709.4
b	58.0	159.1	260.1	357.2	444.2	541.3	640.3	737.4
c''	75.1	176.1	277.2	374.2	461.2	558.3	657.4	754.4
da	-	115.1	216.1	-	400.2	-	598.3	-
db	-	117.1	218.1	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	74.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	12.0	113.1	214.1	311.2	398.2	495.3	594.3	691.4
a*	13.0	114.1	215.1	312.2	399.2	496.2	595.3	692.4
b~	40.0	141.1	242.1	339.2	426.2	523.3	622.3	719.4
b*	41.0	142.1	243.1	340.2	427.2	524.2	623.3	720.4
c~	57.0	158.1	259.1	356.2	443.2	540.3	639.3	736.4
c*	58.0	159.1	260.1	357.2	444.2	541.3	640.3	737.4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1444.7	1343.7	1242.6	1145.6	1058.5	961.5	862.4
y~	-	1426.7	1325.7	1224.6	1127.6	1040.5	943.5	844.4
y*	-	1427.7	1326.6	1225.6	1128.5	1041.5	944.5	845.4

a	810.4	911.5	998.5	1099.6	1200.6	1287.6	1358.7	-
b	838.4	939.5	1026.5	1127.6	1228.6	1315.6	1386.7	-
c''	855.5	956.5	1043.5	1144.6	1245.6	1332.7	1403.7	-
da	794.4	895.5	982.5	1083.6	1184.6	1271.6	1358.7	-
db	796.4	897.5	-	1085.5	1186.6	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	74.1	60.0	44.1	70.1
a~	792.4	893.5	980.5	1081.6	1182.6	1269.6	1340.7	-
a*	793.4	894.5	981.5	1082.5	1183.6	1270.6	1341.7	-
b~	820.4	921.5	1008.5	1109.5	1210.6	1297.6	1368.7	-
b*	821.4	922.5	1009.5	1110.5	1211.6	1298.6	1369.6	-
c~	837.4	938.5	1025.5	1126.6	1227.6	1314.7	1385.7	-
c*	838.4	939.5	1026.5	1127.6	1228.6	1315.6	1386.7	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	765.4	664.3	563.3	476.2	375.2	274.1	187.1	116.1
y~	747.4	646.3	545.3	458.2	357.2	256.1	169.1	98.1
y*	748.3	647.3	546.2	459.2	358.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce GTPSPVPTTSTTSAP

TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP

Average Mass = 2074.1597, Monoisotopic Mass = 2072.9119

Residues: 1-16

N-Terminus = tmpp-ac_h, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	602.2	703.3	804.3	901.4	988.4	1085.4	1184.5	1281.6
b	630.2	731.3	832.3	929.4	1016.4	1113.4	1212.5	1309.6
c''	647.2	748.3	849.3	946.4	1033.4	1130.5	1229.5	1326.6
da	-	687.3	788.3	-	972.4	-	1170.5	-
db	-	689.2	790.3	-	-	-	-	-
i	30.0	74.1	74.1	70.1	60.0	70.1	72.1	70.1
a~	584.2	685.3	786.3	883.4	970.4	1067.4	1166.5	1263.6
a*	585.2	686.2	787.3	884.3	971.4	1068.4	1167.5	1264.5
b~	612.2	713.2	814.3	911.3	998.4	1095.4	1194.5	1291.6
b*	613.2	714.2	815.3	912.3	999.4	1096.4	1195.5	1292.5
c~	629.2	730.3	831.3	928.4	1015.4	1112.5	1211.5	1308.6
c*	630.2	731.3	832.3	929.4	1016.4	1113.4	1212.5	1309.6
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
y''	-	1444.7	1343.7	1242.6	1145.6	1058.5	961.5	862.4
y~	-	1426.7	1325.7	1224.6	1127.6	1040.5	943.5	844.4
y*	-	1427.7	1326.6	1225.6	1128.5	1041.5	944.5	845.4

a	1382.6	1483.7	1570.7	1671.7	1773.9	1860.9	1932.0	-
b	1410.6	1511.7	1598.7	1699.7	1801.9	1889.0	1960.0	-
c''	1427.6	1528.7	1615.7	1716.8	1818.9	1906.0	1977.1	-
da	1366.6	1467.7	1554.7	1655.7	1757.9	1844.9	1932.0	-
db	1368.6	1469.6	-	1657.7	1759.8	-	-	-
i	74.1	74.1	60.0	74.1	74.1	60.0	44.1	70.1
a~	1364.6	1465.7	1552.7	1653.7	1755.9	1842.9	1914.0	-
a*	1365.6	1466.6	1553.7	1654.7	1756.8	1843.9	1915.0	-
b~	1392.6	1493.6	1580.7	1681.7	1783.9	1870.9	1942.0	-
b*	1393.6	1494.6	1581.7	1682.7	1784.8	1871.9	1943.0	-
c~	1409.6	1510.7	1597.7	1698.8	1800.9	1888.0	1959.1	-
c*	1410.6	1511.7	1598.7	1699.7	1801.9	1889.0	1960.0	-
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
y''	765.4	664.3	563.3	476.2	375.2	274.1	187.1	116.1
y~	747.4	646.3	545.3	458.2	357.2	256.1	169.1	98.1
y*	748.3	647.3	546.2	459.2	358.2	257.1	170.1	99.0

Fragmentation théorique de l'espèce TMPP⁺-Ac-GTTPSPVPTTSTTSAP

GTPSPVPTTSTTSAP-NH-Et-TPP+

Average Mass = 1788.9550, Monoisotopic Mass = 1787.8535

Residues: 1-16

N-Terminus = H, C-Terminus = TPPEAY

Fragment ions: Monoisotopic/Average (300) m/z ratios with 1 positive charge(s).

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro
	16	15	14	13	12	11	10	9
x'	-	1759.9	1658.8	1557.7	1460.6	1373.5	1276.4	1177.3
y'	-	1731.9	1630.8	1529.7	1432.6	1345.5	1248.4	1149.2
x~	-	1741.9	1640.8	1539.7	1442.6	1355.5	1258.4	1159.2
x*	-	1742.9	1641.8	1540.7	1443.6	1356.5	1259.4	1160.2
y~	-	1713.9	1612.8	1511.7	1414.6	1327.5	1230.4	1131.2
y*	-	1714.9	1613.8	1512.7	1415.5	1328.5	1231.4	1132.2

	9	10	11	12	13	14	15	16
	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
	8	7	6	5	4	3	2	1
x'	1080.1	979.0	877.9	790.9	689.7	588.6	501.6	430.5
y'	1052.1	951.0	849.9	762.8	661.7	560.6	473.6	402.5
x~	1062.1	961.0	859.9	772.8	671.7	570.6	483.6	412.5
x*	1063.1	962.0	860.9	773.8	672.7	571.6	484.5	413.5
y~	1034.1	933.0	831.9	744.8	643.7	542.6	455.5	384.5
y*	1035.1	934.0	832.9	745.8	644.7	543.6	456.5	385.4

Fragmentation théorique de l'espèce GTPSPVPTTSTTSAP-NH-Et-TPP⁺

A₄ :Références Bibliographiques

- Références Bibliographiques -

A

Aberth W, Burlingame AL, **1984**, *Anal Chem*, 56 :2915.

Aleksandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko, VA, Shrkurov VA, **1984**, *Dokl Acad Nauk SSSR* 277 :319.

Alving K, Paulsen H, Peter-Katalinic J, **1999**, *J Mass Spectrom*, 34, 395.

Alving K, Körner M, Paulsen H, Peter-Katalinic J, **1998**, *J Mass Spectrom*, 33, 1124.

Aston FW, **1919**, *Phil Mag*, 38 :707.

B

Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler AN, **1981**, *J Chem Soc Chem Commun*, 7:325.

Barber M, Jolles P, Vilkas E, Lederer E, **1965**, *Biochem Biophys Res Comm*, 18:469.

Bartlet-Jones M, Jeffery WA, Hansen HF, Pappin DJC, **1994**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 8:737.

Beckey HD, Schuelten D, **1960**, *Z Instrum*, 68:302.

Benett BD, Day DA, **1987**, *Proc 35th ASMS Conf Mass Spectrom Allied Topics*.

Benninghoven A, Jasper D, Sichtermann W, **1976**, *Appli Phys* 11 :35.

Biemann K, Cone C, Webster BR, Arsenault GP, **1966**, *J Am Chem Soc*, 88:5598.

Biemann K, Gapp F, Siebl J, **1959**, *J Am Chem Soc*, 81, 2274.

Brooks MM, Savage AV, **1997**, *Glycoconjugate J*, 14:183.

Bunk DM, Macfarlane RD, **1993**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 126:123.

Bunk DM, Macfarlane RD, **1991**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 111:55.

Burlet O, Orkiszewski RS, Ballard KD, Gaskell SD, **1992**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 6, 658

Busch KL, Unger SE, Vincze A, Cooks RG, Keough T, **1982**, *J Am Chem Soc*, 104:1507.

C

Caprioli RM, Emmet ME, Andren P, **1994**, *Proc 42nd ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*, 3 :754.

Caprioli RM, Moore WT, **1988**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 86:187.

Cardenas MS, van der Heeft E, de Jong APJM, **1997**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 11:1271.

Carlson DM, **1968**, *J Biol Chem*, 243:616.

Carr SA, Huddleston MJ, Bean MF, **1993**, *Protein Sci*, 2:183.

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF, **1996**, *Nature*, 383:685.

Comisarow MB, Marshall AG, **1974**, *Chem Phys Lett*, 25, 282.

Czeszak X, Ricart G, Tetaert D, Michalski JC, Lemoine J, **2002**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16:27.

D

Dempster AJ, **1916**, *Phil Mag*, 31, 438.

Dempster AJ, **1918**, *Phys Rev*, 11, 316.

Dennis JW, Laferte S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS, **1987**, *Science*, 236:582.

Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB, **1968**, *J Chem Phys* 49 :2240.

Dongré AR, Jones JL, Somogyi A, Wysocki VH, **1996**, *J Am Chem Soc*, 118:8365.

Downs F, Herp A, Moschera J, Pigman W, **1973**, *Biochim Biophys Acta*, 328, 182.

E

Easton RL, Pantakar MS, Clars GF, Morris HR, Dell A, **2000**, *J Biol Chem*, 275:21928.

F

Falick AM, Maltby DA, **1989**, *Anal Biocm*, 182:165.

Fan JQ, Kadowaki S, Yamamamoto K, Kumagai H, Tochikura T, **1988**, *Agric Biol Chem*, 52:1715.

G

Gerken TA, Gupta R, Jentoft N, **1992**, *Biochemistry*, 31:639.

Gobom J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff P, **1999**, *J Mass Spectrom*, 34, 105.

Goldstein EF, 1886, *Berl Ber*, 39 :691.

Goletz S, Thiede B, Hanisch FG, Schultz M, Peter-Katalinic J, Müller S, Seitz O, Karsten U, 1997, *Glycobiology*, 7:881.

Goletz S, Leuck M, Franke P, Karsten U, 1997b, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 11 :1387.

Goshe MB, Veenstra TD, Panisko EA, Conrads TP, Angell NH, Smith RD, 2002, *Anal Chem*, 74, 607.

Greis KD, Hayes BK, Comer FI, Kirk M, Barnes S, Lowary TL, Hart GW, 1996, *Anal Biochem*, 234:38.

H

Hanisch FG, Jovanovic M, Peter-Katalinic J, 2001, *Anal Biochem*, 290:47.

Hanisch FG, Green BN, Bateman R, Peter-Katalinic J, 1998, *J Mass Spectrom*, 33 :358.

Harris RJ, Spellman MW, 1993, *GlycoBiology*, 3:219.

Hart GW, 1992, *Current Opin Cell Biol*, 4:1017.

Hart GW, Haltiwanger RS, Holt GDA, Kelly WG, 1989, *Annu Rev Biochem*, 58:841.

Harvey DJ, 2001, *Proteomics*, 1 :311.

Harvey DJ, 1999, *J Mass Spectrom Rev*, 18 :349.

Haynes PA, Aebersold R, 2000, *Anal Chem*, 72, 5402.

Helenius A, Aeibi M, 2001, *Science*, 291:2364.

Hines W, Peltier J, Hsieh F, Martin SA, 1995, *Proc 43rd ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*.

Hirayama K, Akashi S, Yuji R, Niitsu U, Fujimoto Y, 1993, *Organic Mass Spectrom*, 28:1516.

Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV, 1996, *Glycoconjugate J*, 13:19.

Huang Z H, Shen T, Wu J, Gage DA, Watson JT, 1999, *Anal Biochem*, 268:305.

Huang ZH, Wu J, Roth KDW, Yang Y, Gage DA, Watson JT, 1997, *Anal Chem*, 69, 137.

Huang ZH, Wu J, Gage DA, Watson JT, 1997b, *Proc 45th ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*.

Huddleston MJ, Bean MF, Carr SA, 1993, *Anal Chem*, 65:877.

I

Iribarne JV, Thomson BA, **1976**, *J Chem Phys*, 64 :2287.

Iwase H, Tanaka A, Hiki Y, Kokubo T, Ishii-Karakasa I, Hisatani K, Kobayashi Y, Hotta K, **1998**, *J Chromatogr B*, 709:145.

Iwase H, Tanaka A, Hiki Y, Kokubo T, Ishii-Karakasa I, Hisatani K, Kobayashi Y, Hotta K, **1996**, *J Biochem*, 120:393.

J

Jaffe H, Veeranna, Pant HC, **1998**, *Biochemistry*, 37:16211.

Johnson RS, Krylov D, Walsh KA, **1995**, *J Mass Spectrom*, 30, 386

Johnson RS, Martin SA, Biemann K, **1988**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 86:137.

Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT, **1987**, *Anal Chem*, 59, 2621.

Johnson EG, Nier AO, **1953**, *Phys Rev*, 91, 10.

K

Karas M, Hillenkamp F, **1988**, *Anal Chem*, 60 :2299.

Kaufmann R, Kirsch D, Spengler B, **1994**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 131, 355.

Kelleher NL, Zubarev RA, Bush K, Furie B, Furie BC, McLafferty FW, Walsh CT, **1999**, *Anal Chem*, 71 :4250

Kidwell DA, Ross MM, Colton RJ, **1984**, *J Am Chem Soc*, 106, 2219.

Kidwell DA, Ross MM, Colton RJ, **1984b**, *Springer Ser Chem Phys SIMS 4*, 36:412.

Kruger NA, Zubarev RA, Carpenter BK, Kelleher NL, Horn DM, McLafferty FW, **1999**, *Int J Mass Spectrom*, 183 :1.

Kruger NA, Zubarev RA, Horn DM, McLafferty FW, **1999b**, *Int J Mass Spectrom*, 187 :787.

Kukuruzinska MA, **1998**, Lennon K, *Crit Rev Oral Biol Med*, 9:415.

Kussman M, Nordhoff E, Rahbek-Nielsen H, Haebel S, Rossel-Larsen M, Jakobsen L, Gobom J, Mirgorodskaya E, Kroll-Kristensen A, Palm L, Roepstorff P, **1997**, *J Mass Spectrom*, 32:593.

Küster B, Mann M, **1999**, *Anal Chem*, 71, 1431.

L

Lawrence EO, Edlefsen NE, **1930**, *Science*, 72 :376.

Liao P C, Huang Z H, Allison J, *J Am Soc Mass Spectro*, **1997**, 8:501.

Liao PC, Allison J, **1995**, *J Mass Spectrom*, 30:511.

Ligon VW, **1986**, *Anal Chem*, 58:485.

M

Macek B, Hosteenge J, Peter-Katalinic J, **2001**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15:771.

Macfarlane RD, Torgerson DF, **1976**, *Science*, 191 :901.

Mamyrin BA, Karataev VI, Schmikk DV, Zagulin VA, **1973**, *Sov Phys JETP*, 37 :45.

Martin SA, Biemann K, **1987**, *Mass Spectrom Rev*, 6:1.

Mattauch J, Herzog R, **1934**, *Z. Physik*, 89, 786.

Medzihradzsky KF, Gillece-Castro BL, Townsend RR, Burlingame AL, Hardy MR, **1996**, *J Am Soc Mass Spectrom*, 7, 319.

Medzihradsky KF, Gillece-Castro BL, Setterini CA, Townsend RR, Masiarz FR, Burlingame AM, **1990**, *Biomed Environ Mass Spectrom*, 19:777.

Meyer HE, Eisermann B, Donella-Deanna A, Perich JW, Hoffmann-Posorske E, Korte H, **1993**, *Protein Sequences Data, Anal*, 5:197.

Meyer HE, Meyer GF, Dirks H, Heilmeyer LMG Jr, **1990**, *Eur J Biochem*, 188:367.

Meyer HE, Swiderek K, Hoffmann-Posorske E, Korte H, Heilmeyer LMG Jr, **1987**, *J Chromato*, 397:113.

Meyer HE, Hoffmann-Posorske E, Korte H, Heilmeyer LMG Jr, **1986**, *FEBS Lett*, 204:61.

Mirgorodskaya E, Hassan H, Clausen H, Roepstorff P, **2001**, *Anal Chem*, 73:1263.

Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Zubarev RA, **1999**, *Anal Chem*, 71:4431.

Mirgorodskaya E, Hassan H, Wandall HH, Clausen H, Roepstorff P, **1999b**, *Anal Biochem*, 269:54.

Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli RS, Hoyes J, Bateman RH, **1996**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10 :889.

Mortz E, Sareneva T, Haebel S, Julkunen I, Roepstorff P, **1996**, *Electrophoresis*, 17:925.

Munson MSB, Field FH, **1966**, *J Am Chem Soc*, 88, 2621.

Muller EW, **1953**, *Ergeb. Exakt. Naturw.*, 27, 290.

Mueller DR, Eckersley M, Richter W, **1988**, *Org Mass Spectrom*, 23, 217.

N

Naven TJP, Jeffery WA, Bartlet-Jones M, Rahman D, Pappin DJC, **1997**, *Proc 45th ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*.

Nier AO, Booth ET, Dunning JR, Grosse AV, **1940**, *Phys Rev*, 57, 546.

O

O'Neill RA, **1996**, *J Chromatogr A*, 720:201.

P

Papayannopoulos IA, **1995**, *Mass Spectrom Rev*, 14:49.

Paul W, Reinhard HP, von Zahn U, **1958**, *Z Phys*, 152 :143.

Paul W, Steinwedel HS, **1953**, *Z naturforsh*, 8a :448.

Peter-Katalinic J, Williger K, Egge H, Green B, Hanisch FG, Schindler D, **1994**, *J Carbohydr Chem*, 13:447.

Peter-Katalinic J, Ashcroft A, Green B, Hanisch FG, Nakahara Y, Ilijima H, Osawa T, **1994b**, *Org Mass Spectrom*, 29:747.

Pittenauer E, Schmid ER, Allmaier G, Pfanzagl B, Loffelhardt W, Fernandez CQ, de Pedro MA, Stanek W, **1993**, *Biol Mass Spectrom*, 22:524.

Plantner JJ, Carlson DM, *Anal Biochem*, **1975**, 65:153.

Prusiner SB, **1997**, *Science*, 278:245.

R

Rademaker GJ, Pergantis SA, Blok-Tip L, Langridge JI, Kleen A, Thomas-Oates J, **1998**, *J. Anal. Biochem.* 257:149.

Rademaker GJ, **1996**, *Mass Spectrometry: A Modern Approach to Solving Biological Structural Problems*, *Ph D Thesis*, Utrecht University.

Rademaker GJ, Haverkamp Y, Thomas-Oates J, **1993**, *Organic Mass Spectrom*, 28, 1536.

Rayleigh Lord, **1882**, *Philos Mag*, 14 :184.

Reason AJ, Morris HR, Panico M, Marais R, Treisman RH, Haltiwanger RS, Hart GW, Kelly WG, Dell A, **1992**, *J Biol Chem*, 267, 16911.

Renner D, Spitteller G, **1985**, *Angew Chem Int Ed Engl*, 24:408.

Roepstorff P, Fohlman J, **1984**, *Biomed Mass Spectrom*, 11 :601.

Roquemore EP, Dell A, Morris HR, Panico M, Reason AJ, Savoy L-A, Wistow GJ, Zigler JS, Earles BJ, Hart GW, **1992**, *J Biol Chem*, 267, 555.

Roth KDW, Huang ZH, Sadagopan N, Watson JT, **1998**, *Mass Spectrom Reviews*, 17:255.

S

Sadagopan N, Wu J, Yang Y, Huang ZH, Watson JT, **1997**, *Proc 45th ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*.

Scanlin TF, Glick MC, **1999**, *Biochim Biophys Acta*, 1455:241.

Senn M, McLafferty FW, **1966**, *Biochem Biophys Res Comm*,23:381.

Setterini CA, Burlingame AL, *In Carbohydrate Analysis*, El Rassi Z, Ed Elsevier: Amsterdam, **1995**, 447.

Setterini CA, Medzihradsky KF, Masiarz FR, Burlingame AM, Chu C, George-Nascimento C, **1990**, *Biomed Environ Mass Spectrom*, 19:665.

Shen TL, Huang ZH, Laivenieks M, Zeikus GJ, Gage DA, Allison J, **1999**, *J Mass Spectrom*, 34:1154.

Sherman NE, Yates NA, Shabanowitz J, Hunt DF, Jeffery W, Bartlet-Jones M, Pappin DJC, **1995**, *Proc 43rd ASMS Conf Mass Spectrom Allied Topics*.

Shevchenko A, Chernushevich I, Ens W, Standing KG, Thomson B, Wilm M, Mann M, **1997**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 11, 1055.

Shimamura M, Inoue Y, Inoue S, **1984**, *Arch Biochem Biophys*, 232:699.

Smythe WE, Mattauch J, **1932**, *Phys Rev*, 40 :429.

Sommer H, Thomas HA, Hipple JA, **1949**, *Phys Rev*, 76 :1877.

Somogyi A, Wysocki VH, Mayer I, **1994**, *J Am Soc Mass Spectrom*, 5, 704.

Soudan B, Hennebicq S, Tetaert D, Boersma A, Richet C, Demeyer D, Briand G, Degand P, **1999**, *J Chromato B*, 729, 65.

Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R, Jaeger E, **1992**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 6;105.

Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R, **1991**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 5;198.

Stephens WE, **1946**, *Phys Rev*, 69, 691.

Stults JT, Lai J, McCune S, Wetzel R, **1993**, *Anal Chem*, 65:1703.

Stults JT, **1992**, *Proc 40th ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*, (**PAGE**)

Summerfield SG, Gaskell SJ, **1997**, *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 165/166, 509.

Swiderek K, Jaquet K, Meyer HE, Schachtele C, Hofmann F, Heilmeyer LMG Jr, **1988**, *Eur J Biochem*, 176:335.

T

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **1988**, 2, 151.

Tang XJ, Thibault P, Boyd RK, **1993**, *Anal Chem*, 65, 2824

Taylor GI, **1964**, *Proc R Soc London A*, A280, 383.

Tetaert D, Richet C, Gagnon J, Boersma A, Degand P, **2001**, *Carbohydr Res*, 333, 165.

Tetaert D, Ten Hagen KG, Richet C, Boersma A, Gagnon J, Degand P, **2001b**, *Biochem J*, 357, 313.

Ten Hagen KG, Gurrinder BS, Tetaert D, Kingsley PD, Hagen FK, Balys MM, Beres TM, Degand P, Tabak LA, **2001**, *J Biol Chem*, 276, 17395.

Ten Hagen KG, Taetert D, Hagen FK, Richet C, Beres TM, Gagnon J, Balys MM, Van Wuyckhuysse B, Bedi GS, Degand P, Tabak LA, **1999**, *J Biol Chem*, 274, 27867.

Thomson JJ, **1897**, *Lecture at the Royal Institution*.

Thomson JJ, **1912**, *J Gas lighting*, 118, 429.

Tomita M, Marchesi VT, **1975**, *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 2964-2968.

V

Varki A, Marth J, **1995**, *Semin Dev Biol*, 6 :127.

Vath JE, Biemann K, **1990**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 100:287.

Vath JE, Zollinger M, Biemann K, Fresenius Z, **1988**, *Anal Chem*, 331:248.

Vestal ML, Juhasz P, Martin SA, **1995**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 9 :1044.

W

Wagner DS, Salari A, Gage DA, Leykam J, Fetter J, Hollingsworth R, Watson JT, **1991**, *Biol Mass Spectrom*, 20:419.

Wagner DS, Nieuwenhuis TJ, Chang YS, Gage DA, Watson JT, **1992**, *Proc 40th ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*, 1837.

Watson JT, **1997**, *Introduction to Mass Spectrometry*, Ed Lippincott-Raven, Philadelphia, PA

Watson JT, Wagner DS, Chang YS, Strahler JR, Hanash SM, Gage DA, **1991**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 11:191.

Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW, **2002**, *Mol Cell Proteomics*, 10, 791.

Wells L, Vosseller K, Hart GW, **2001**, *Science*, 291:2376.

Wetzel R, Halualani R, Stults JT, Quan C, **1990**, *Bioconjugate Chem*, 1:114.

Wien W, **1898**, *Ann Physik* 65 :440.

Wiley WC, McLaren IH, **1955**, *Rev Sci Instrum* 26 :1150.

Wilm M, Mann M, **1996**, *Anal Chem*, 68:1.

Wilm M, Mann M, **1994**, *Proc 42nd ASMS Conf Mass Spectrometry Allied Topics*, 77.

Wilm M, Mann M, **1994**, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 136:167.

Wolf SM, Ferrari RP, Traversa S, Biemann K, **2000**, *J Mass Spectrom*, 35:210.

Wu AM, Kabat EA, Nilsson B, Zopf DA, Gruezo FG, Liao J, **1984**, *J Biol Chem*, 259:7178

Wulfson NS, Puchkov VA, Rosinov BV, Denisov YV, Bochkarev VN, Shemyakin MM, Ovchinnikov YA, Kyriushkin AA, Vinogradova EI, Feigina MY, **1965**, *Tetrahedron Lett*, 2805.

Y

Yamashita M, Fenn JB, **1984**, *J Phys Chem*, 88 4451.

Yost RA, Enke CG, **1978**, *J Am Chem Soc*, 100 :2274.

Z

Zaia J, Biemann K, 1995, *J Am Soc Mass Spectrom*, 6:428.

Zeleny J, **1917**, *Phys Rev*, 5 :1.

Zubarev RA, Kelleher NK, McLafferty FW, 1998, *J Am Chem Soc*, 120, 3265.

Covalent post-translational modifications of proteins are key factors that modulate their biological activities. Both their nature and pattern can be strikingly affected in relation to diseases. In case of cancer, mucins and mucins-like exhibit shorter O-glycan structures which can represent antigenic properties. One way to identify the enzymes implicated in these abnormal glycosylation biosynthesis lies in *in vitro* glycosylation of synthetic peptides derived from tandem repeat sequence by recombinant glycosyl-transferases.

However, the lack of a consensus peptide sequence for O-glycosylation as well as the unavailability of O-glycan releasing enzyme makes the O-glycosylation sites localization a challenging task. Several chemical strategies based on NaOH or NH₃ β-elimination have been developed for the simultaneous removal of O-glycans and tagging of the formerly glycosylated Ser/Thr residues. Their lack of specificity inducing false positive sites of glycosylation (NaOH), as well as low β-elimination yield (NH₃) prompted us to develop a novel and optimized approach of beta elimination/addition to overcome these drawbacks. An exhaustive evaluation of alkylamines defined the dimethylamine as the best candidate for an efficient and specific beta elimination, carried out with concomitant tagging of the anhydro amino acids with ethylmercaptan through a Michael addition. The high content of hydroxylated amino acids in Muc5AC derived peptides required a phosphonium derivatization step prior MS-MS experiment in order to get extensive informations regarding the peptide sequence. Otherwise, the preferential fragmentations pathways involved the neutral loss of H₂O and CH₃CHO molecules, which preclude from the localization of the tagged residues.

In a second part, we evaluated the influence of charge state and its mobility on the dissociative behaviour of precursor ion of O-glycopeptides. A comparative study of the protonated [M+H]⁺, [M+2H]²⁺ and phosphonium cationized [C]⁺ [C+H]²⁺ species demonstrated without ambiguity the chartered role of a “mobile proton” in the preferential cleavage between the O-glycan and the peptide. In addition, a tandem mass spectrometry study on hydrogen/deuterium exchanged molecules highlighted the likely role of a non exchangeable proton from the sugar ring in the catalysis of this mechanism.

As a consequence, de novo O-glycopeptide sequencing and glycosylation sites localization can be performed, in a predictive and unambiguous way from their singly cationized fixed-charge derivatives. An illustration is given by the structural analysis of MUC5AC derived O-glycopeptides by MALDI-PSD-TOF.

Les modifications post-traductionnelles covalentes des protéines sont des facteurs essentiels de la modulation de leur activité biologique. Leur nature ainsi que leur représentation peuvent être profondément affectées lors d'apparition de pathologies tel que le cancer. Ainsi dans le cas des mucines, les structures O-glycanniques apparaissent-elles en général plus courtes et peuvent constituer des structures antigéniques. Afin d'identifier les différentes glycosyl-transférases impliquées dans l'élaboration de ces structures ainsi que leurs spécificités de transfert vis à vis des squelettes peptidiques, des peptides synthétiques correspondant aux séquences répétitives de ces mucines sont incubés en présence de différentes glycosyl-transférases.

La localisation des sites de glycosylation apparaît alors ardue, car contrairement aux sites de N-glycosylations, il n'existe pas d'enzyme permettant une libération qualitative et quantitative des structures O-glycanniques. Celles-ci sont donc habituellement libérées par la soude en milieu réducteur qui ne permet pas de conserver l'intégrité de la chaîne peptidique pourtant indispensable au positionnement de ces O-glycannes.

Aussi avons-nous optimisé différentes approches de β -élimination / addition surmontant cette difficulté. Une étude exhaustive de différentes amines nous a permis de définir la diméthylamine comme un bon candidat à une β élimination conservant l'intégrité des séquences peptidiques correspondant aux motifs répétés des mucines de type MUC5AC. Cette β -élimination / addition passe par la formation d'anhydro-acides aminés (action de la diméthylamine) et la fixation covalente sur ces substrats réactifs d'une étiquette chimique stable (action de l'éthanethiol ou du propanethiol). Le positionnement des acides aminés Sérine/Thréonine initialement glycosylés est alors réalisé par spectrométrie de masse en tandem. Une dérivation préalable de l'extrémité amino-terminale par une charge permanente apportée par un cation phosphonium est apparue indispensable au séquençage de ces peptides particulièrement riches en acides aminés hydroxylés. En effet, la dissociation des précurseurs protonés se traduit pour une large part par la perte d' H_2O ou de CH_3CHO (acétaldéhyde). Les spectres ne comportent pas de séries complètes d'ions y et/ou b indispensables à la localisation des acides aminés initialement glycosylés, la dérivation apparaissant dès lors essentielle.

Par ailleurs, une étude des comportements dissociatifs des précurseurs MH^+ , M_2H^{2+} , C^+ et CH^{2+} démontre le rôle catalytique d'un proton « mobile » dans la fragmentation prédominante des glycopeptides au niveau de la liaison glycanne-Sérine/Thréonine. Une étude par spectrométrie de masse en tandem des précurseurs deutérés permet en outre de démontrer l'implication d'un proton non-échangeable dans le mécanisme de rupture. Il ressort de cette étude que le séquençage et la localisation des structures O-glycopeptidiques peuvent-être envisagés de manière hautement prédictive et sans ambiguïté par l'analyse des spectres de dissociation des ions précurseurs monochargés cationisés à l'aide d'une charge permanente. Une illustration en est donnée par le séquençage et la localisation de l'ensemble des sites O-glycosylés de glycopeptides de type MUC5AC réalisés par spectrométrie de masse MALDI-PSD-TOF.