

Université des Sciences et Technologies de Lille



# THÈSE

Présentée

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

Spécialité: Biochimie

Par

**Alexandre PONS**

---

**Utilisation des dérivés heptafluorobutyrate pour l'analyse qualitative et quantitative des constituants des glycoconjugués par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.**

---

Soutenue le 25 novembre 2004 devant la commission d'examen:

Professeur Philippe DELANNOY : président  
Professeur Jean-Claude TABET : rapporteur  
Docteur Anthony CORFIELD : rapporteur  
Docteur Gérard STRECKER : examinateur  
Docteur Jean-Pierre ZANETTA : directeur de Thèse

# **REMERCIEMENTS**

A la mémoire du Professeur André VERBERT, ancien directeur du laboratoire. Il m'a fait confiance et m'a accueilli dans l'UMR 8576 alors que cela n'était pas évident.

Je remercie le Professeur Philippe DELANNOY pour avoir accepté de juger mon travail de son oeil critique. Bien que nos points de vue sur mon acceptation dans le laboratoire aient pu être divergents, il me faut souligner que je l'ai toujours reconnu comme un scientifique chevronné et intègre dont j'apprécie la franchise et la liberté de penser. Je suis honoré qu'il ait accepté la présidence de mon jury.

Je remercie le Professeur Jean-Claude TABET et de Docteur Anthony CORFIELD, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de me faire l'honneur de la juger. Votre réputation n'étant plus à faire, vous valorisez mon travail par vos critiques. Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements.

Lorsque l'on m'a demandé qui je désirais avoir comme examinateurs, j'ai immédiatement pensé au Docteur Gérard STRECKER. Dès mon arrivée dans notre laboratoire, j'ai été impressionné par la somme de ses connaissances, aussi bien scientifiques que de culture générale. En y ajoutant sa gentillesse naturelle, cela a fait que nos discussions, bien que parfois interminables, ont souvent été passionnantes. A la moindre incertitude ou problème scientifique, j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à traverser le couloir pour demander son avis, et je suis très honoré de le demander encore une fois, pour juger mon travail. Merci à toi Gérard!

Merci à mon directeur de thèse, le Docteur Jean-Pierre ZANETTA, sans qui je n'aurais certainement pas entrepris une thèse. Dès mon arrivé dans son équipe, il y a cinq ans, j'ai été accueilli avec gentillesse et sollicitude. J'ai découvert un homme passionné par son métier de chercheur, dissertant avec enthousiasme de nos résultats et pressé à l'idée de mener plus loin nos investigations. En ajoutant à cela son caractère enjoué et humaniste, j'ai pu bénéficier d'un encadrement à l'opposé de la tyrannie ou du dirigisme. Il a su accorder mes besoins d'indépendance aux nécessités de m'encadrer. Nous avons toujours discutés ensemble de nos résultats et de leurs interprétations. J'ai ainsi pu découvrir que seuls l'argumentation, le désir de rigueur et la recherche d'explications animent ses débats. Lorsqu'il y avait mésentente sur certains points, mon avis a toujours été respecté et pris en considération. J'ai donc rapidement ressenti un profond climat de confiance réciproque qui ne s'est jamais estompé depuis,

d'autant plus qu'il a reconnu mon travail en m'associant à de nombreuses publications. Ainsi, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à ses cotés et je souhaiterai que nous puissions continuer à collaborer ensemble. Pour toutes ces raisons, Jean-Pierre, sois assuré de mon indéfectible reconnaissance.

Je remercie notre directeur de laboratoire, le Docteur Jean-Claude MICHALSKI. Grâce à lui, j'ai obtenu un contrat d'un an comme ingénieur d'étude au CNRS, ce qui m'a permis de clore mes études dans de bonnes conditions en terminant quelques expérimentations et surtout, m'a laissé le temps de rédiger ma thèse. Ainsi, permets moi de t'assurer de ma profonde gratitude.

Je tiens beaucoup à remercier le Docteur Guy RICARD pour m'avoir formé avec patience au MALDI-TOF, puis accueilli une multitude de fois au centre commun de spectrométrie de masse. J'éprouve également une profonde gratitude envers Philippe TIMMERMAN et Yves LEROY qui m'ont initié aux joies de la GC-MS sans jamais compter leur temps et en me montrant une grande partie de leurs secrets. Par la suite, ils m'on toujours accueilli et épaulé avec sympathie en me considérant comme faisant partie de la famille des "massistes".

Je remercie les membres de notre équipe: Colette RICHET et Christelle CEBO, ainsi que mes camarades de laboratoire: Jérôme, Christophe, Christine, Luc, Xavier, Guy, Mélanie et Sylvain, mais surtout Yann et Bénédicte qui sont maintenant mes amis. Votre bonne humeur et votre camaraderie m'ont permis de travailler dans un milieu détendu et agréable, sans ajouter au stress des études, celui des rapports humains.

Enfin, je remercie sincèrement toutes les personnes du laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle qui n'ont pas été citées nommément pour la bonne ambiance de travail et l'entraide généralisée au sein de notre laboratoire.



A Heidi, ma compagne, et Nicolas, notre fils.

A mes parents :

Tout d'abord à ma mère, pour son amour, sa tendresse et sa bienveillance empreinte de compréhension. Durant la tumultueuse période de mon adolescence, tu as su m'entourer de ton affection et de tes conseils. Sans ta persévérance, je n'aurais certainement pas fait d'études. Ma thèse t'est donc dédiée, puisque sans toi, elle n'aurait jamais eu lieu.

A mon père qui pour toujours restera mon modèle masculin. Nous sommes unis par un profond respect et un indéfectible amour. Tu as largement contribué à la personne que je suis devenue et je suis fière d'être ton fils!

A la mémoire de mes grands-parents disparus.

A mon frère Raphaël, à mes deux sœurs Julie et Lili et à mon cousin Laurent. En souvenir de nos jeux et de notre complicité sans égale. En souhaitant que cela ne change jamais.

A mes amis les plus proches et les plus anciens: Benoit, Franck, Hervé, Bidou, Denis et Laurent. Depuis de nombreuses années, je recherche votre présence pour la chaleur de votre amitié et le plaisir qu'elle me procure.

Ce mémoire de thèse est également dédié à toutes les autres personnes qui me sont chères et qui ont croisé mon existence. Parmi elles je citerais ma belle-mère Joëlle et les différents membres de la famille Lessenne, notamment Laurence.

Par votre présence à tous, au cours de ma vie, vous avez contribué à mon histoire et au développement de ma personne. Chacun d'entre vous a donc participé pour une part à ce travail et je vous en remercie.



# **TABLE DES MATIERES**



|   |           |
|---|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS</b>  | <b>1</b>  |
| <b>TABLE DES MATIERES</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ABREVIATIONS</b>   | <b>12</b> |
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b>  | <b>15</b> |
| <b>GENERALITES</b>  | <b>18</b> |
| <b>GC-MS DES SUCRES.....</b>  | <b>19</b> |
| I. <u>INTRODUCTION</u> .....  | 19        |
| II. <u>LIBERATION DES MONOSACCHARIDES</u> .....   | 20        |
| III. <u>LES DIFFERENTS TYPES DE DERIVES</u> .....   | 23        |
| A. <u>Les dérivés gardant les sucres sous leur forme cyclique</u> .....                                 | 23        |
| 1) <u>Les per-méthyl-glycosides</u> .....   | 23        |
| 2) <u>Les glycosides partiellement méthylés</u> .....   | 28        |
| 3) <u>Les dérivés acylés</u> .....  | 29        |
| a) <u>Les per-acétyl-glycosides</u> .....   | 29        |
| b) <u>Les dérivés trifluoroacétylés</u> .....   | 30        |
| 4) <u>Les dérivés triméthyl-silylés</u> .....   | 31        |
| a) <u>Formation des dérivés, avantages et inconvénients</u> .....                                       | 31        |
| b) <u>La spectrométrie de masse</u> .....   | 35        |
| (1) <u>Pour les dérivés TMS des O-méthyl-hexoses</u> .....  | 35        |
| (2) <u>Pour les dérivés TMS des O-méthyl-glycosides des N-acétyl-hexosamines</u> .....                  | 36        |
| B. <u>Les dérivés linéaires</u> .....   | 37        |
| 1) <u>Cas des alditols</u> .....  | 37        |
| a) <u>Les méthyl-éthers d'alditols</u> .....  | 37        |
| b) <u>Les alditol-acétates</u> .....  | 38        |
| c) <u>Trifluoroacétates d'alditols</u> .....  | 39        |
| d) <u>Alditols triméthyl-silylés</u> .....  | 39        |
| e) <u>Alditol-acétates partiellement méthylés</u> .....   | 40        |
| (1) <u>Formation et utilisation de ces dérivés</u> .....  | 40        |
| (2) <u>La spectrométrie de masse</u> .....  | 41        |
| 2) <u>Les autres formes de dérivés de sucres réduits</u> .....  | 42        |
| a) <u>Les O-méthyl-oximes</u> .....   | 42        |
| b) <u>Les aldonitriles acétates</u> .....   | 43        |
| <b>GC-MS DES ACIDES SIALIQUES.....</b>  | <b>45</b> |
| I. <u>INTRODUCTION</u> .....  | 45        |
| II. <u>LIBERATION DES ACIDES SIALIQUES</u> .....  | 47        |
| A. <u>La méthanolyse acide</u> .....  | 47        |
| B. <u>L'hydrolyse ménagée</u> .....   | 49        |
| C. <u>Les neuraminidases</u> .....  | 50        |
| III. <u>LA SPECTROMETRIE DE MASSE</u> .....   | 50        |
| IV. <u>LES DIFFERENTS TYPES DE DERIVES ANALYSABLES EN GC-MS</u> .....                                   | 51        |
| A. <u>Les dérivés triméthyl-silylés</u> .....   | 51        |
| 1) <u>Les dérivés triméthyl-silylés de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques</u> ..... | 52        |
| 2) <u>Dérivés triméthyl-silylés de méthyl-ester d'acides sialiques</u> .....                            | 53        |
| B. <u>Dérivés acétylés de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques</u> .....              | 55        |
| C. <u>Dérivés méthylés de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques</u> .....              | 56        |
| D. <u>Les dérivés trifluoroacétylés d'acides sialiques</u> .....  | 58        |
| <b>GC-MS DES ACIDES GRAS .....</b>  | <b>60</b> |
| I. <u>INTRODUCTION</u> .....  | 60        |

|      |  |           |
|------|--|-----------|
| II.  | <u>LIBERATION DES ACIDES GRAS</u> .....  | 61        |
| A.   | <u>La saponification</u> .....   | 61        |
| B.   | <u>La trans-estérification</u> .....   | 61        |
| 1)   | <u>Trans-estérification catalysée par des acides</u> .....   | 61        |
| 2)   | <u>Trans-estérification catalysée par des bases</u> .....  | 62        |
| III. | <u>LES DIFFERENTS TYPES DE DERIVES ANALYSABLES EN GC-MS</u> .....                                    | 63        |
| A.   | <u>Les acides gras méthyl-estérifiés (FAMES)</u> .....   | 63        |
| 1)   | <u>Introduction</u> .....  | 63        |
| 2)   | <u>Formation des dérivés</u> .....   | 63        |
| 3)   | <u>Analyse des FAMES en chromatographie de phase gazeuse</u> .....                                   | 63        |
| 4)   | <u>Couplage à la spectrométrie de masse par impact électronique des FAMES</u> .....                  | 64        |
| a)   | <u>Positionnement de branchements</u> .....  | 65        |
| b)   | <u>Positionnement d'un groupement comportant un atome d'oxygène</u> .....                            | 66        |
| c)   | <u>Positionnement des insaturations</u> .....  | 66        |
| d)   | <u>Positionnement de cycles</u> .....  | 67        |
| 5)   | <u>Utilisation de dérivations supplémentaires sur les FAMES</u> .....                                | 67        |
| a)   | <u>Détermination de la position des doubles liaisons par réduction</u> .....                         | 67        |
| b)   | <u>Détermination de la position des doubles liaisons par oxydation</u> .....                         | 67        |
| (1)  | <u>L'oxydation</u> .....   | 67        |
| (2)  | <u>Formation de dérivés O-isopropylidènes</u> .....  | 68        |
| (3)  | <u>Formation de dérivés méthoxyles</u> .....   | 69        |
| (4)  | <u>Formation de dérivés triméthyl-silyles</u> .....  | 69        |
| (a)  | <u>Positionnement d'insaturations par ce type de dérivés</u> .....                                   | 70        |
| (b)  | <u>Détermination de la position d'hydroxyles par ce type de dérivés</u> .....                        | 70        |
| c)   | <u>Formation de dérivés Thio-méthylés</u> .....  | 71        |
| B.   | <u>Formation de dérivés comportant une fonction amine</u> .....                                      | 72        |
| 1)   | <u>Formation d'amides tertiaires par la pyrrolidine: les dérivés N-acyl-pyrrolidines</u> .....       | 72        |
| a)   | <u>Formation, intérêts et inconvénients</u> .....  | 72        |
| b)   | <u>Analyse des spectres de masse</u> .....   | 73        |
| (1)  | <u>Positionnement des insaturations</u> .....  | 74        |
| (2)  | <u>Positionnement des branchements</u> .....   | 75        |
| (3)  | <u>Positionnement de cycles</u> .....  | 75        |
| (4)  | <u>Positionnement des dérivés contenant un atome d'oxygène</u> .....                                 | 76        |
| c)   | <u>Conclusion</u> .....  | 76        |
| 2)   | <u>Formation d'esters picoliniques</u> .....   | 76        |
| a)   | <u>Formation, intérêts et inconvénients</u> .....  | 76        |
| b)   | <u>Analyse des spectres de masse</u> .....   | 77        |
| (1)  | <u>Positionnement des insaturations</u> .....  | 78        |
| (2)  | <u>Positionnement des groupements méthyles</u> .....   | 78        |
| (3)  | <u>Positionnement de cycles</u> .....  | 79        |
| 3)   | <u>Formation de dérivés à la 4,4-diméthyl-oxazoline (DMOX)</u> .....                                 | 79        |
| a)   | <u>Formation, intérêts et inconvénients</u> .....  | 79        |
| b)   | <u>Analyse des spectres de masse</u> .....   | 80        |
| (1)  | <u>Positionnement des groupements méthyles</u> .....   | 80        |
| (2)  | <u>Positionnement des insaturations</u> .....  | 81        |
| (3)  | <u>Positionnement des cycles</u> .....   | 81        |
| (4)  | <u>Positionnement de groupements comportant un atome d'oxygène</u> .....                             | 82        |
|      | <b>GC-MS DES BASES SPHINGOÏDES</b> .....   | <b>83</b> |
| I.   | <u>INTRODUCTION</u> .....  | 83        |
| II.  | <u>LIBERATION DES BASES SPHINGOÏDES</u> .....  | 84        |
| III. | <u>LES DIFFERENTS DERIVES UTILISES POUR L'ANALYSE DES BASES SPHINGOÏDES</u> .....                    | 85        |
| A.   | <u>Formation d'aldéhydes par oxydation periodique</u> .....  | 85        |
| B.   | <u>Formation d'acide gras par oxydation par le periodate-permanganate</u> .....                      | 87        |
| C.   | <u>Formation de dérivés silylés</u> .....  | 88        |
| 1)   | <u>Les dérivés O-triméthyl-silylés</u> .....   | 88        |
| 2)   | <u>Utilisation des dérivés N-acétyl-O-triméthyl-silylés</u> .....                                    | 90        |
| 3)   | <u>Utilisation de dérivations supplémentaires sur les dérivés triméthyl-silylés</u> .....            | 91        |
| D.   | <u>Formation de dérivés cycliques par des acides boroniques (Gaskell S. J. et coll., 1976)</u> ..... | 92        |
|      | <b>GC-MS DES ACIDES AMINES</b> .....   | <b>95</b> |
| I.   | <u>INTRODUCTION</u> .....  | 95        |
| II.  | <u>HYDROLYSE TOTALE DES PEPTIDES ET PROTEINES</u> .....  | 96        |
| III. | <u>LES DIFFERENTS DERIVES UTILISES POUR L'ANALYSE DES ACIDES AMINES</u> .....                        | 97        |
| A.   | <u>La silylation des acides aminés</u> .....   | 97        |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 1)  | <u>La triméthyl-silylation des acides aminés</u> .....   | 97  |
| 2)  | <u>La tert-butyl-diméthyl-silylation des acides aminés</u> .....                                     | 99  |
| B.  | <u>La N(O,S)-acylation d'acides aminés alkyl-estérifiés</u> .....                                    | 100 |
| 1)  | <u>Estérification de la fonction acide carboxylique</u> .....  | 100 |
| 2)  | <u>Les différentes possibilités d'acylation des acides aminés alkyl-estérifiés</u> .....             | 101 |
| a)  | <u>Les dérivés acétylés</u> .....  | 102 |
| b)  | <u>Les dérivés trifluoroacétylés</u> .....   | 102 |
| c)  | <u>Le cas particulier des dérivés heptafluorobutyrylés</u> .....                                     | 105 |
| (1) | <u>Introduction</u> .....  | 105 |
| (2) | <u>Les différentes estérifications rencontrées dans la littérature pour ce type de dérivés</u> ..... | 105 |
| (3) | <u>Les différentes méthodes d'acylation par des groupements HFB</u> .....                            | 106 |
| (4) | <u>Caractéristiques de cette technique</u> .....   | 107 |
| (5) | <u>La spectrométrie de masse</u> .....   | 107 |

**STRATEGIE D'ANALYSE QUALITATIVE UTILISEE DANS LE DOMAINE DES CONSTITUANTS DES GLYCOCONJUGUES. ....109**

**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**114**

**ANALYSE DES DERIVES HFB DES O-METHYL-GLYCOSIDES.....115**

|      |   |     |
|------|---|-----|
| I.   | <u>INTRODUCTION</u> .....   | 115 |
| II.  | <u>LES CONDITIONS ANALYTIQUES</u> .....   | 116 |
| A.   | <u>Protocole de la méthanolyse</u> .....  | 116 |
| B.   | <u>Acylation à l'anhydride heptafluorobutyrique</u> .....   | 117 |
| 1)   | <u>Protocole de dérivation</u> .....  | 117 |
| 2)   | <u>Discussion sur les conditions de l'acylation</u> .....   | 117 |
| C.   | <u>La chromatographie de phase gazeuse</u> .....  | 118 |
| D.   | <u>Cas du couplage à la spectrométrie de masse</u> .....  | 118 |
| E.   | <u>Choix du type de colonnes</u> .....  | 119 |
| III. | <u>DISCUSSION SUR LA STABILITE DES DERIVES HFB DES O-METHYL-GLYCOSIDES</u> .....  | 120 |
| IV.  | <u>DETERMINATION DES REPNSES RELATIVES MOLAIRES (RMR)</u> .....   | 121 |
| V.   | <u>DISCUSSION SUR LES INTERETS ET LES INCONVENIENTS DE LA METHODE DE LA METHANOLYSE POUR LA LIBERATION DES MONOSACCHARIDES AVANT LEUR DERIVATION EN HFB</u> ..... | 123 |
| A.   | <u>Normalité et présence de traces d'eau</u> .....  | 123 |
| B.   | <u>Problème de la dé-acétylation</u> .....  | 125 |
| C.   | <u>Coupage de la liaison N-glycosidique</u> .....   | 126 |
| D.   | <u>Cas de la détermination de la composition des protéoglycannes sulfatés</u> .....   | 132 |
| 1)   | <u>Composition du kératane sulfate (KS)</u> .....   | 135 |
| 2)   | <u>Composition des chondroïtines sulfates de type A (CSA = chondroïtine 4-sulfate)</u> .....  | 137 |
| 3)   | <u>Composition des chondroïtines sulfates de type C (CSC = chondroïtine 6-sulfate)</u> .....  | 138 |
| 4)   | <u>Composition des chondroïtines sulfates de type B (CSB = dermatane sulfate)</u> .....   | 138 |
| 5)   | <u>Composition de l'héparine</u> .....  | 140 |
| 6)   | <u>Conclusions</u> .....  | 142 |
| VI.  | <u>APPLICATION DE LA METHODE A L'ANALYSE DES GLYCOPROTEINES</u> .....   | 142 |
| A.   | <u>Analyse de N-glycannes</u> .....   | 142 |
| B.   | <u>Analyse des O-glycannes</u> .....  | 143 |
| C.   | <u>Qu'en est-il de la présence des contaminants ?</u> .....   | 144 |
| D.   | <u>Sensibilité de la technique et nano-analyses</u> .....   | 145 |
| E.   | <u>Analyse directe sur gel de polyacrylamide et membrane de PVDF</u> .....  | 145 |
| VII. | <u>COUPLAGE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE</u> .....   | 146 |
| A.   | <u>Analyse par ionisation chimique (CI-MS)</u> .....  | 146 |
| B.   | <u>Analyse par impact électronique (EI-MS)</u> .....  | 147 |
| 1)   | <u>Identification des monosaccharides par des ions spécifiques</u> .....  | 147 |
| 2)   | <u>Schémas probables des mécanismes de fragmentation des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides par analyse en mode EI-MS</u> .....                                  | 148 |
| a)   | <u>Schémas probables des mécanismes de fragmentation pour les pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, hexosamines et acides hexuroniques</u> .....                     | 149 |
| (1)  | <u>L'ion moléculaire M<sup>+</sup></u> .....  | 150 |
| (2)  | <u>Fragmentations suivant la série A</u> .....  | 151 |
| (3)  | <u>Fragmentations suivant la série B</u> .....  | 153 |
| (4)  | <u>Fragmentations suivant la série C</u> .....  | 157 |

|  |   |     |
|--|---|-----|
| (5)  | <i>Fragmentations suivant la série D</i> .....  | 161 |
| (6)  | <i>Fragmentations suivant la série E</i> .....  | 161 |
| (7)  | <i>Fragmentations suivant la série F</i> .....  | 163 |
| (8)  | <i>Fragmentations suivant la série H</i> .....  | 164 |
| (9)  | <i>Fragmentations suivant la série K</i> .....  | 166 |
| (10)   | <i>Les deux séries X et Z particulières aux dérivés HFB</i> .....   | 167 |
| (a)  | <i>Fragmentations suivant la série X</i> .....  | 169 |
| (11)   | <i>Cas particuliers</i> .....   | 173 |
| (11)   | <i>Cas particuliers</i> .....   | 174 |
| (a)  | <i>Cas des acides hexuroniques</i> .....  | 174 |
| i)   | <i>L'ion [M-HF-88]<sup>++</sup> des formes pyraniques</i> .....   | 174 |
| ii)  | <i>Les formes lactones</i> .....  | 174 |
| (b)  | <i>Cas des polyalcools (myo-inositol)</i> .....   | 177 |
| i)   | <i>La série X</i> .....   | 178 |
| ii)  | <i>Formation d'un ion à m/z 465</i> .....   | 179 |
| iii)   | <i>Formation des ions de la série H</i> .....   | 179 |
| (c)  | <i>Cas du 2-O-méthyl-Fucose</i> .....   | 180 |
| (d)  | <i>Cas du dérivé de la GlcN libre qui apparaît lors de la méthanolyse des N-glycannes</i> .....               | 180 |
| b)   | <u>Schémas probables des mécanismes de fragmentation des dérivés de la famille des acides sialiques</u> ..... | 183 |
| (1)  | <i>Remarque sur le comportement des acides sialiques lors de la méthanolyse</i> .....                         | 183 |
| (2)  | <i>Les schémas de fragmentation</i> .....   | 184 |
| (a)  | <u>Cas de l'acide neuraminique, du KDN et du KDO</u> .....  | 185 |
| i)   | <i>L'ion moléculaire M<sup>+</sup></i> .....  | 185 |
| ii)  | <i>La série de type A</i> .....   | 186 |
| iii)   | <i>La série de type b (B selon Kamerling)</i> .....   | 187 |
| iv)  | <i>La série B</i> .....   | 188 |
| v)   | <i>Fragmentations suivant la série C</i> .....  | 191 |
| vi)  | <i>Fragmentations suivant la série D</i> .....  | 192 |
| vii)   | <i>Fragmentations suivant la série E</i> .....  | 193 |
| viii)  | <i>Fragmentations suivant la série F</i> .....  | 194 |
| ix)  | <i>Fragmentations suivant la série H</i> .....  | 194 |
| x)   | <i>Fragmentations suivant la série K</i> .....  | 195 |
| xi)  | <i>Fragmentations suivant la série X</i> .....  | 195 |
| xii)   | <i>Fragmentations suivant la série Z</i> .....  | 196 |
| (b)  | <i>Cas du Neu-1,7lactone</i> .....  | 197 |
| i)   | <i>Discussion sur l'existence de la forme 1,7-lactone des acides sialiques</i> .....                          | 197 |
| ii)  | <i>Les fragmentations qui découlent de l'analyse du spectre de masse en mode EI</i> .....                     | 198 |
| VIII.  | <u>CONCLUSION</u> .....   | 205 |
| <b>ANALYSE DES DERIVES HFB DES ACIDES SIALIQUES LIBERES PAR HYDROLYSE DOUCE..207</b> |   |     |
| I.   | <u>INTRODUCTION</u> .....   | 207 |
| II.  | <u>LA PUBLICATION</u> .....   | 207 |
| III.   | <u>DISCUSSION SUR LE CHOIX DE LA METHODE D'HYDROLYSE DOUCE PAR L'ACIDE ACETIQUE 2M</u> .....                  | 208 |
| IV.  | <u>DISCUSSION SUR LE CHOIX DE LA METHYL-ESTERIFICATION PAR LE DIAZOMETHANE</u> .....                          | 210 |
| V.   | <u>DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS</u> .....   | 211 |
| A.   | <u>Non dérivation de l'hydroxyle semi-acétalique porté par le carbone 2</u> .....                             | 211 |
| B.   | <u>Chaque famille d'acides sialiques montre des ions diagnostiques en spectrométrie de masse</u> .....        | 211 |
| C.   | <u>Existence d'acides sialiques lactonisés</u> .....  | 212 |
| 1)   | <u>Les données de la spectrométrie de masse</u> .....   | 212 |
| a)   | <u>Fragmentations suivant la série A</u> .....  | 213 |
| b)   | <u>Fragmentations provenant d'une déshydratation</u> .....  | 214 |
| c)   | <u>Fragmentations par perte d'une molécule de HF</u> .....  | 215 |
| d)   | <u>Fragmentations par perte d'un radical [COOH]<sup>•</sup></u> .....   | 216 |
| 2)   | <u>Discussion sur l'existence in vivo de ces formes lactones d'acides sialiques</u> .....                     | 217 |
| D.   | <u>Problèmes engendrés par la limite de détection de masse</u> .....  | 218 |
| 1)   | <u>Difficultés d'analyser des spectres de masse tronqués</u> .....  | 218 |
| 2)   | <u>Possibilité d'une forme lactame uniquement pour les dérivés de la famille du Neu5Ac</u> .....              | 220 |
| VI.  | <u>CONCLUSION</u> .....   | 226 |
| VII.   | <u>PERSPECTIVES</u> .....   | 227 |
| A.   | <u>Expérimentations envisageables pour confirmer la véracité des formes lactames et lactones</u> .....        | 227 |
| 1)   | <u>Estérifications différentes de la méthyl-estérification</u> .....  | 227 |
| 2)   | <u>Utilisation de groupements acyles plus légers que les HFB</u> .....  | 228 |
| a)   | <u>Dérivation du méthyl-ester de Neu5Ac par des groupements TFA</u> .....                                     | 229 |
| b)   | <u>Dérivation du méthyl-ester de Neu5Ac par des groupements PFP</u> .....                                     | 231 |
| 3)   | <u>Expérimentations qui restent à entreprendre</u> .....  | 232 |



|   |  |     |
|---|--|-----|
| B.  | <i>Approfondissement des recherches sur les formes lactones des acides sialiques</i> .....   | 232 |
| <b>DETERMINATION DE LA COMPOSITION DE LA PARTIE LIPIDIQUE DES GLYCOLIPIDES....234</b> |  |     |
| I.  | <u>INTRODUCTION</u> .....  | 234 |
| II.   | <u>LES PUBLICATIONS</u> .....  | 234 |
| III.  | <u>DISCUTIONS SUR LES RESULTATS OBTENUS AU COURS DE CES TRAVAUX</u> .....  | 235 |
| A.  | <i>Effet de la méthanolyse anhydre en milieu acide sur la partie aglycone des glycolipides</i> .....                                 | 235 |
| 1)  | <u>Les céramides</u> .....   | 235 |
| 2)  | <u>Les diacylglycérols</u> .....   | 238 |
| 3)  | <u>Les acyl-alkylglycérols (AAG)</u> .....   | 238 |
| 4)  | <u>Les plasmalogènes</u> .....   | 239 |
| B.  | <i>Caractérisation des différents dérivés des composés lipidiques par la GC-MS après méthanolyse et dérivation par des HFB</i> ..... | 240 |
| 1)  | <u>Les acides gras</u> .....   | 240 |
| a)  | <u>Cas des acides gras hydroxylés</u> .....  | 240 |
| b)  | <u>Conclusion et perspectives</u> .....  | 242 |
| 2)  | <u>Les monoalkylglycérols</u> .....  | 244 |
| 3)  | <u>Les plasmalogènes</u> .....   | 246 |
| 4)  | <u>Les bases sphingoides</u> .....   | 247 |
| a)  | <u>Cas des sphingénines</u> .....  | 247 |
| (1)   | <i>Les spectres de masse</i> .....   | 247 |
| (2)   | <i>Schémas de fragmentations des principaux ions</i> .....   | 248 |
| (a)   | <i>Cas du dérivé HFB de la 5-O-méthyl-Sphe C18:1</i> .....   | 248 |
| (b)   | <i>Cas du dérivé HFB de la Sphe C18:1</i> .....  | 249 |
| (c)   | <i>Cas du dérivé HFB de la 3-O-méthyl-Sphe C18:1</i> .....   | 252 |
| b)  | <u>Cas des sphinganine</u> .....   | 253 |
| (1)   | <i>Les spectres de masse</i> .....   | 253 |
| (2)   | <i>Schémas de fragmentation des principaux ions</i> .....  | 254 |
| (a)   | <i>La voie de fragmentation provenant de la perte d'un atome de fluor</i> .....  | 254 |
| (b)   | <i>La voie de fragmentation provenant de la perte du radical <math>^{\bullet}C_3F_7</math></i> .....                                 | 255 |
| (c)   | <i>La voie de fragmentation provenant des séries X et Z</i> .....  | 255 |
| c)  | <u>Cas des phytosphingosines</u> .....   | 257 |
| (1)   | <i>Les spectres de masse</i> .....   | 257 |
| (2)   | <i>Schémas de fragmentation des principaux ions</i> .....  | 257 |
| (a)   | <i>Fragmentations du dérivé de la forme furanique</i> .....  | 257 |
| (b)   | <i>Fragmentations du dérivé de la forme intacte</i> .....  | 259 |
| d)  | <u>Cas des 6-hydroxy-sphingénines</u> .....  | 260 |
| (1)   | <i>Les spectres de masse</i> .....   | 260 |
| (2)   | <i>Schémas de fragmentation des principaux ions</i> .....  | 261 |
| (a)   | <i>Fragmentations du dérivé de la forme II (dérivé tri-HFB de la 4-O-méthyl-sphing-5-énine)</i> .....                                | 261 |
| (b)   | <i>Fragmentations du dérivé de la forme V (dérivé di-HFB de la 3,6-O-diméthyl-sphing-4-énine)</i> .....                              | 262 |
| IV.   | <u>EXEMPLE D'UTILISATION DES DERIVES HFB POUR L'ANALYSE DE COMPOSES GLYCOLIPIDIQUES</u> .....  | 266 |
| A.  | <i>Caractérisation de la structure des gangliosides des membranes plasmiques synaptosomales du cerveau de rat</i> .....              | 266 |
| 1)  | <u>Introduction</u> .....  | 266 |
| 2)  | <u>Problèmes de l'analyse structurale des gangliosides</u> .....   | 267 |
| a)  | <u>Rappels sur la structure des gangliosides</u> .....   | 267 |
| b)  | <u>La nomenclature abrégée de Svennerholm (1963)</u> .....   | 268 |
| c)  | <u>L'analyse de la structure des gangliosides par MALDI-TOF: avantages et inconvénients</u> .....                                    | 269 |
| 3)  | <u>Analyse de la composition gangliosidique totale des membranes plasmiques synaptosomales du cerveau de rat</u> .....               | 272 |
| a)  | <u>Matériels et méthodes</u> .....   | 272 |
| b)  | <u>Résultats et discussion</u> .....   | 274 |
| (1)   | <i>Les résultats obtenus pour le GMI</i> .....   | 275 |
| (a)   | <i>La GC-MS après hydrolyse douce et dérivation par l'HFBA</i> .....   | 275 |
| (b)   | <i>La GC-MS après méthanolyse et dérivation à l'HFBA</i> .....   | 275 |
| (c)   | <i>Analyse MALDI des échantillons natifs</i> .....   | 277 |
| (d)   | <i>Analyse MALDI des échantillons méthyl-estérifiés</i> .....  | 279 |
| (e)   | <i>Analyse MALDI des échantillons per-méthylés</i> .....   | 281 |
| (f)   | <i>Synthèse des résultats obtenus par les cinq analyses</i> .....  | 284 |
| (2)   | <i>Les résultats obtenus pour les 35 autres échantillons</i> .....   | 285 |
| B.  | <i>Détermination de la composition de GPI</i> .....  | 287 |
| 1)  | <u>Problèmes de l'analyse des GPI</u> .....  | 287 |
| 2)  | <u>Solution aux problèmes</u> .....  | 288 |
| 3)  | <u>Analyse de GPI dont la partie lipidique est constituée d'un alkyl-acyl-glycérol</u> .....   | 290 |
| 4)  | <u>Analyse de GPI dont la partie lipidique est constituée d'un céramide</u> .....  | 291 |

|   |   |            |
|---|---|------------|
| V.  | <u>CONCLUSION</u> .....   | 291        |
| <b>DETERMINATION DE LA COMPOSITION DE LA PARTIE PROTEIQUE DES GLYCOPROTEINES</b><br>..... |   | <b>293</b> |
| I.  | <u>INTRODUCTION</u> .....   | 293        |
| II.   | <u>LA PREMIERE PUBLICATION (PONS A. ET COLL., 2003A)</u> .....  | 293        |
| A.  | <u>Introduction à la première publication (Pons A. et coll., 2003a)</u> .....   | 293        |
| B.  | <u>La publication</u> .....   | 294        |
| C.  | <u>Discussions sur la première publication (Pons A. et coll., 2003a)</u> .....  | 295        |
| 1)  | <u>Les problèmes de l'analyse des acides aminés en GC-MS et les solutions que nous proposons</u> .....                              | 295        |
| a)  | <u>Raisons du choix de l'utilisation des isoamyl-esters des dérivés HFB d'acides aminés</u> .....                                   | 295        |
| b)  | <u>Problèmes engendrés par l'hydrolyse des liaisons peptidiques</u> .....   | 296        |
| (1)   | <u>Cas du tryptophane (Trp)</u> .....   | 296        |
| (2)   | <u>Cas de l'histidine (His)</u> .....   | 299        |
| (3)   | <u>Cas des acides aminés dont le radical contient une amide (Gln et Asn)</u> .....  | 300        |
| (4)   | <u>Problèmes d'oxydation de certains acides aminés</u> .....  | 300        |
| c)  | <u>Problèmes engendrés lors de la phase d'acylation par l'HFBAA</u> .....   | 301        |
| 2)  | <u>La spectrométrie de masse des dérivés HFB d'isoamyl-esters d'acides aminés</u> .....   | 302        |
| a)  | <u>L'ion moléculaire M<sup>+</sup></u> .....  | 302        |
| b)  | <u>L'ion de base des spectres</u> .....   | 303        |
| c)  | <u>Les ions diagnostiques permettant de caractériser les acides aminés</u> .....  | 303        |
| (1)   | <u>En général</u> .....   | 303        |
| (2)   | <u>Cas des isomères Leu, Ile et Nle</u> .....   | 304        |
| (3)   | <u>Cas des dérivés de Met</u> .....   | 306        |
| (4)   | <u>Cas des dérivés de l'Histidine (His<sup>#</sup> et His) et particularité des acides aminés aromatiques</u> .....                 | 309        |
| III.  | <u>LA DEUXIEME PUBLICATION (ZANETTA J. P. ET COLL., 2004)</u> .....   | 311        |
| A.  | <u>Introduction à la deuxième publication (Zanetta J. P. et coll., 2004)</u> .....  | 311        |
| B.  | <u>La publication</u> .....   | 311        |
| C.  | <u>Discussion sur la caractérisation de la structure du dérivé du (C-Man-)Trp par la spectrométrie de masse</u> .....               | 312        |
| 1)  | <u>L'ion moléculaire et les ions primaires</u> .....  | 313        |
| 2)  | <u>Les ions secondaires du spectre</u> .....  | 313        |
| 3)  | <u>L'ion caractéristique de la présence d'un groupement indole</u> .....  | 314        |
| 4)  | <u>Les ions caractéristiques de la présence d'un groupement O-méthyle</u> .....   | 315        |
| 5)  | <u>L'ion caractéristique de la présence d'un hexose</u> .....   | 316        |
| 6)  | <u>La perte d'un résidu de 354 u est à l'origine des ions les plus intenses du spectre</u> .....                                    | 317        |
| IV.   | <u>CONCLUSION</u> .....   | 318        |
| <br><b>CONCLUSION GENERALE ET RESUME</b>  |   | <b>320</b> |
| I.  | <u>GENERALITES</u> .....  | 321        |
| II.   | <u>ANALYSE DE LA COMPOSITION MONOSACCHARIDIQUE DES GLYCOCONJUGUES</u> .....   | 322        |
| III.  | <u>ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES SIALIQUES DES GLYCOCONJUGUES</u> .....   | 324        |
| IV.   | <u>ANALYSE DE LA COMPOSITION EN LIPIDES DES GLYCOCONJUGUES</u> .....  | 326        |
| V.  | <u>AVANTAGE DU PROTOCOLE EN TROIS ETAPES POUR L'ANALYSE DE GLYCOPROTEINES ET NOTAMMENT DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u> ..... | 327        |
| <br><b>ANNEXE</b>   |   | <b>329</b> |
| <br><b>BIBLIOGRAPHIE</b>  |   | <b>336</b> |
| <br><b>PUBLICATIONS</b>   |   | <b>354</b> |

# **ABBREVIATIONS**



## Liste des abréviations

**AAG** : acyl-alkylglycérol  
**Ara** : arabinose  
**BHA** : t-butyl-hydroxyanisol  
**BHT** : 2,6-di-t-butyl-hydroxytoluène  
**BSA** : N,O-bis(triméthyl)acétamide  
**BSTFA** : N,O-bis(triméthyl-silyl)trifluoroacétamide  
**CI** : ionisation chimique  
**CS** : chondroïtine sulfate  
**CSA** : chondroïtine sulfate A  
**CSB** : chondroïtine sulfate B  
**CSC** : chondroïtine sulfate C  
**DMOX** : 4,4-diméthyl-oxazoline  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**EI** : impact électronique  
**FAME** : méthyl-ester d'acide gras  
**FID** : détection par ionisation de flamme  
**Fuc** : fucose  
**GAG** : glycosaminoglycane  
**Gal** : galactose  
**GalA** : acide galacturonique  
**GalNAc** : N-acétylgalactosamine  
**GalNH<sub>2</sub>** : galactosamine  
**GC** : chromatographie gazeuse  
**Glc** : glucose  
**GlcA** : acide glucuronique  
**GlcNAc** : N-acétylglucosamine  
**GlcNH<sub>2</sub>** : glucosamine  
**GPI** : glycosyl-phosphatidylinositol  
**HexNAc** : N-acétylhexosamine  
**HFB** : heptafluorobutyrate  
**HFBA** : acide heptafluorobutyrique  
**HFBA** : anhydride heptafluorobutyrique  
**HMDS** : hexaméthyl-disilane  
**IdoA** : acide iduronique  
**Ins** : inositol  
**KDN** : acide 2-ceto-3-désoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonique  
**KDO** : acide 2-ceto-3-désoxy-D-manno-octulosonique  
**KS** : kératane sulfate  
**Man** : mannose  
**ManNAc** : N-acétylmannosamine  
**MS** : spectrométrie de masse  
**MSTFA** : N-méthyl-N-triméthyl-silyl-trifluoroacétamide  
**MTBSTFA** : N-méthyl-N-ter-butyl-diméthyl-silyl-trifluoroacétamide  
**Neu** : acide neuraminique  
**Neu-1,7Lac** : acide neuraminique-1,7-lactone  
**Neu5Ac** : acide 5-N-acétylneuraminique

**Neu5Ac-1,7Lac** : acide 5-N-acétylneuraminique-1,7-lactone  
**PFP** : pentafluoropropionate  
**Rha** : rhamnose  
**Rib** : ribose  
**RMR** : réponses relatives molaires  
**SPM** : membranes plasmiques synaptosomales  
**TBDMCS** : *tert*-butyl-diméthyl-chlorosilane  
**TBDMS** : *tert*-butyl-diméthyl-silyles  
**TFA** : trifluoroacétates  
**TFAA** : anhydride trifluoroacétique  
**TIC** : total ion curant (prise en charge de la totalité des ions)  
**TMCS** : triméthyl-chlorosilane  
**TMS** : triméthylsilyle  
**TMSDA** : triméthyl-silyl-diéthylamine  
**TMSI** : N-triméthyl-silyl-imidazole  
**u** : unité de masse atomique  
**Xyl** : xylose

# **INTRODUCTION GENERALE**





Tout au long du cursus universitaire des études en biochimie, une des règles fondamentales, inlassablement répétée, est la "sacro-sainte" relation entre structure et activité. En effet, il paraît illusoire de s'attaquer à la compréhension d'une activité biologique sans connaître la structure des molécules qui y sont impliquées. Le monde de la recherche en glycobiologie qui m'a accueilli durant ma thèse, ne déroge pas à cette règle. Quand en 1999, j'ai rejoint l'équipe du Dr Jean-Pierre ZANETTA au sein de l'UMR 8576 du CNRS, c'était pour déterminer la composition totale des gangliosides au niveau des membranes plasmiques synaptosomales du cervelet de rat. Evidemment, ce travail nécessitait la détermination de la structure de ces glycolipides. Cette tâche pouvait être réalisée par des méthodes analytiques connues et standardisées, notamment par l'analyse de différents types de dérivés en GC-MS (TMS, acétylés, per-méthylés, TFA, etc...). Toutefois, chacune de ces techniques présente quelques problèmes de quantification, de stabilité ou de comportement chromatographique envers certains composés et nécessite parfois de multiplier les analyses en croisant les résultats obtenus avec différentes méthodes. C'est pourquoi, en nous appuyant sur les travaux antérieurs de notre chef d'équipe sur la formation et l'utilisation des dérivés HFB de monosaccharides et d'acides aminés en vue de leur analyse en chromatographie de phase gazeuse, nous nous sommes dirigés vers ce type de dérivés pour l'analyse de nos échantillons. D'autant plus qu'il nous était possible de coupler la chromatographie de phase gazeuse à un appareil de spectrométrie de masse et, de ce fait, d'améliorer très nettement la sensibilité et les capacités analytiques de cette méthode.

Ainsi, au cours de nos investigations et tout comme cela avait déjà été avancé par les travaux antérieurs de J. P. Zanetta et coll., nous nous sommes aperçus que les possibilités offertes par les dérivés HFB sont parfaitement adaptées à l'analyse en GC-MS de la composition de tous les constituants des glycoconjugués. En effet, comme nous tentons de le décrire dans ce mémoire, il est actuellement possible de déterminer qualitativement et quantitativement, pour un seul et même échantillon, la composition de l'ensemble des constituants de ces molécules. C'est pourquoi, dans la partie "généralités" de ce mémoire et afin de comparer la technique de dérivation par les HFB à la plus part des autres méthodes qui ont déjà été décrites dans la littérature, nous avons résumé ces dernières tout en essayant de présenter brièvement leurs avantages et leurs inconvénients. Puis dans les différents chapitres de la partie "résultats et discussion", nous avons décrit le comportement des dérivés HFB de tous les constituants des glycoconjugués, c'est-à-dire des monosaccharides neutres (pentose, hexoses, désoxy-hexoses, hexosamines, etc...) et acides (acide hexuroniques ou acides sialiques), des différentes sortes de lipides (acides gras, monoalkylglycérols, bases sphingoïdes, etc...) et des acides aminés.

Nombre de ces composés, que nous pouvons maintenant aisément caractériser, sont décrits dans ce mémoire, ainsi que les spectres de masse EI qu'ils fournissent et les possibles mécanismes de fragmentation donnant ces spectres. Cette liste n'est d'ailleurs pas exhaustive, puisqu'au moment où nous écrivons ces lignes, nous découvrons de nouvelles molécules analysables par cette méthode. En outre, les mécanismes de fragmentation que nous décrivons dans ce mémoire ne sont qu'hypothétiques, car nous ne les avons pas déterminés par expérimentation mais par extension des règles de fragmentations déjà décrites dans la littérature pour d'autres types de dérivés. Cependant, nous pensons que la dérivation par des groupements HFB ne devrait pas donner des dérivés dont le comportement de fragmentation serait différent de celui d'autres dérivés de type acyle (acétylés, trifluoro-acétylés, etc.). Cette façon de faire permet donc: d'assigner, avec de fortes chances d'exactitude, une structure ionique à chaque ion abondant des spectres, et ainsi, d'attribuer un spectre à une structure moléculaire. Nous ferons également remarquer que bons nombres de ces mécanismes de fragmentation sont décrits dans ce mémoire à l'aide de figures présentant les molécules sous des formes qui peuvent parfois ne pas respecter les règles admises de la stéréochimie. Cela a souvent été le cas lorsque nous avons représenté des molécules contenant une double liaison après départ d'un groupement accompagné d'un réarrangement d'hydrogène. Par exemple, dans la figure 14 (p. 43) c'est le cas de la structure de l'ion de type H dont la fonction amine est représentée en position axiale, alors qu'elle devrait être en position horizontale formant un angle de  $120^\circ$  avec les liaisons impliquées dans le cycle, comme dans le schéma suivant:



Nous sommes bien conscients de cet état de fait, mais nous avons délibérément choisi cette option, puisqu'il est parfois difficile, pour des gens peu habitués à l'exercice, de visualiser à quelle partie de l'ion moléculaire correspondent les atomes formant un ion de fragmentation. Ainsi, en espérant ne pas trop heurter la sensibilité des chimistes, nous pensons que le fait de garder la stéréochimie de la structure de départ permet de retrouver plus facilement l'ion en question dans la structure de l'ion moléculaire ( $M^{++}$ ).

Enfin, au cours de nos travaux, les résultats obtenus ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques. Certaines d'entre elles, qui décrivent les particularités de protocoles analytiques ou certains résultats importants, ont été insérées directement dans le texte afin d'éviter de surcharger ce document par de laborieuses traductions qui n'auraient rien apporté. En revanche, nous avons préféré discuter les résultats annoncés dans ces publications, y ajouter des informations, voire parfois, les critiquer.

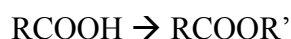
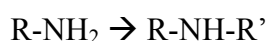
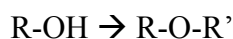
# **GENERALITES**



# GC-MS DES SUCRES

## **I. Introduction**

Dès les années 60 la chromatographie de phase gazeuse a commencé à être utilisée pour l'analyse des monosaccharides car elle combinait une grande sensibilité à une haute résolution. Mais, ces composés étant, non seulement instables à haute température, mais aussi non volatilisables sous leur forme native, il fut nécessaire de mettre au point différentes méthodes de dérivation afin de les rendre moins thermolabiles et plus volatils. Quelle que soit la méthode utilisée, elle doit permettre la dérivation des fonctions hydroxyles, amines et carboxyliques libres.



Les méthodes les plus utilisées sont la méthylation, des acylations diverses et la formation de dérivés triméthyl-silylés. Toutes ces techniques ont en commun le fait que chaque monosaccharide apparaît sous la forme de plusieurs pics en équilibre sur les chromatogrammes. Ce phénomène est dû à la mutarotation des sucres dans les différents solvants. Les différents pics visibles, correspondent donc aux anoméries  $\alpha$  et  $\beta$  et aux différentes formes cycliques (furanose ou pyranose). Comme cet équilibre est constant, même si la résolution d'un chromatogramme est incomplète, c'est à dire que des pics se recouvrent, il est toujours possible de connaître la somme des aires des pics d'un sucre et ainsi de déterminer sa quantité. Pour cela, il faut qu'au moins un pic correspondant à un des isomères de ce monosaccharide soit parfaitement résolu. En outre, cette multiplicité de pic pour un même sucre peut devenir un avantage quand on s'intéresse à la composition de polysaccharides complexes tels que les glycoprotéines, car la reconnaissance des divers pics correspondants à un monosaccharide augmente le degré de confiance en sa présence dans l'échantillon. Par contre, cela peut avoir quelques inconvénients pour l'analyse quantitative. En effet, la sensibilité se trouve quelque peu réduite car la quantité minimum de produit nécessaire pour donner une réponse détectable devient plus importante en raison de la formation de plusieurs pics par composés. La multiplicité des pics augmente aussi la possibilité de leur chevauchement par entassement surtout avec des mélanges complexes.

Enfin, bien que les proportions des différents isomères d'un monosaccharide soient connues pour être constantes, de façons parfois inexplicables, des imprécisions peuvent résulter de l'apparition de variations dans ces proportions au cours de séries d'analyses.

Pour éviter la multiplicité des pics et donc de réduire l'incidence de ces productions multiples, en plus des méthylations, acylations et triméthyl-silylations, des techniques de dérivations supplémentaires ont été décrites. Ces procédés additionnels sont: la formation d'alditols, d'oximes, de méthyloximes, de benzyloximes et d'aldonitriles. Toutefois, l'augmentation du nombre des réactions ne va pas dans le sens d'un protocole simple et dénué d'artéfacts de manipulation.

Il est à noter que l'apparition de la spectrométrie de masse en impact électronique, utilisée comme détecteur en sortie du chromatographe, a permis d'amoindrir fortement les inconvénients précités, et notamment pour le problème de chevauchement de pics. Même dans ce cas, les différents constituants d'un échantillon peuvent être parfaitement discriminés les uns des autres grâce à l'analyse de leurs spectres de masse puisque ceux-ci constituent en quelque sorte leurs cartes d'identités.

Dans ce chapitre nous tenterons de faire la liste de chacune de ces méthodes et de voir leurs avantages et inconvénients. Pour certaines d'entre elles, nous verrons les mécanismes de fragmentations qui régissent l'obtention des spectres de masse et donc l'attribution avec certitude des pics chromatographiques.

## **II. Libération des monosaccharides**

Quelle que soit la méthode de dérivaison choisie, elle est précédée par la libération des monosaccharides reliés les un aux autres par des liaisons osidiques. Pour cela, des techniques enzymatiques impliquant des glycosidases ont été utilisées, surtout pour leur spécificité d'action, ce qui peut apporter des informations sur la séquence des polysaccharides.

La technique qui fut la plus communément utilisée est l'hydrolyse par des acides permettant l'obtention de monosaccharides sous leur forme réductrice. Parmi ces méthodes, on trouve des acides organiques volatils ce qui permet de s'en débarrasser aisément après l'hydrolyse. C'est le cas des techniques suivantes: TFA 2 N, 1 h à 121°C (Albersheim P. et coll., 1967) ou 3 N, 4 h à 105°C (Schwarzmann G. O. H. et coll., 1974), ou encore en mélange en utilisant de l'acide formique à 88%, de l'acide trifluoroacétique et de l'eau (10/1/2 v/v/v) pendant 16 h à 100°C ou (3/1/2 v/v/v) durant 6 h à 100°C (Anumula K. R., 1992). Selon d'autres auteurs, et malgré l'avantage de la volatilité du TFA, cet acide ne permet pas

l'hydrolyse complète de tous les sucres. Ils lui préfèrent des acides minéraux tel que l'acide chlorhydrique 3 N, 3 h à 100°C (Griggs et coll., 1971), ou l'acide sulfurique 0,5 N, 9 h à 100°C (Laine R. A. et coll., 1973) ou 2 N, 3 h à 100°C (Takahashi T. et coll., 1967). Certains les trouvent trop destructeurs et leurs préfèrent l'utilisation de Dowex 50X2 sous sa forme protonée dans de l'acide chlorhydrique 0,02 N pendant 40 h (Lehnhardt W. F. et coll., 1968). Toutefois, la stabilité de certaines liaisons glycosidiques requiert pour leur hydrolyse totale des conditions drastiques (notamment en ce qui concerne la force de l'acide), ce qui amène à la destruction de certains sucres. Des protocoles, développés pour éviter cette destruction, vont jusqu'à recourir à quatre hydrolyses différentes successives (pour libérer séparément les sucres neutres, les hexosamines, les acides hexuroniques et les acides sialiques) entrecoupées par des étapes longues et fastidieuses de neutralisation et de séparation des sucres libérés. Ainsi, l'on comprend que dans de telles conditions, il soit difficile de contrôler avec certitude toutes les étapes.

Actuellement, une méthode alternative de libération des sucres est préférée à l'hydrolyse: la méthanolyse. Elle permet la formation de méthyl-glycosides par la fixation d'un groupement méthoxy sur le carbone 1 (ou 2 pour l'acide sialique), grâce à l'utilisation de méthanol-HCl anhydre (de 1 à 2 N) sur une durée comprise entre 3 et 24 h à une température de 80 à 100°C (Chambers R. E. et coll., 1971). D'autres méthodes utilisent des normalités moins élevées en allongeant le temps de réaction: 0,5 N pendant 20 h à 80°C (Zanetta et coll., 1972), ou 0,625 N pendant 16 h à 70°C (Chaplin M. F., 1982).

La méthanolyse présente de nombreux avantages par rapport à l'hydrolyse. Elle semble aussi efficace en ce qui concerne le taux de libération des monosaccharides sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des produits très acides, car une normalité de 0,5 à 2 N est tout à fait suffisante pour libérer en une seule étape la totalité des monosaccharides. Ainsi un test effectué sur du N-acétylchitobiose (GlcNAc  $\beta$ (1-4) GlcNAc), connu pour contenir une des liaisons osidiques les plus résistantes, s'est montré fort concluant. En outre, il est toujours possible de faire des doubles étapes de méthanolyse entrecoupées par une étape de dérivation dans le cas de liaisons particulièrement solides, sans que cela n'implique une dégradation des glycosides libérés lors de la première méthanolyse (Chaplin M. F., 1982). En effet, la méthanolyse cause beaucoup moins de dégradations des sucres que l'hydrolyse acide. Toutefois, on observe une légère dégradation des acides hexuroniques (0% de perte avec une acidité de 1 N à 85°C, 3% de perte pour 2 N à 85°C, et 9% pour 1 N à 100°C). Les dérivés O-méthyl-glycosides sont aussi beaucoup plus stables dans le temps que leurs homologues réducteurs, même lorsqu'on les laisse dans le mélange de méthanolyse pendant 24 h. De plus,

les O-méthyl-glycosides sont mieux séparés que leurs homologues réducteurs, notamment pour certains pics de Man et de Gal. Les O-méthyl-glycosides ne réagissent pas avec les acides aminés qui peuvent être présents dans le milieu (réaction de Maillard). Enfin, les acides sialiques sont plus stables sous cette forme qu'après hydrolyse (Clamp J. R. et coll., 1967).

Malgré tous ces avantages, il semble que le fait d'évaporer le mélange de méthanolyse à l'évaporateur rotatif, avant d'engager la dérivation, engendre une perte importante des monosaccharides (jusqu'à 47% des acides sialiques, 26% du fucose, 20% du galactose et 8% du mannose). La présence d'eau est le coeur de ce problème car en présence d'HCl elle hydrolyse les sucres. Jusqu'à 2%, elle n'entraîne pas ou peu de perte de sucre (Chambers R. E. et coll., 1971), mais son augmentation à 40% implique la disparition totale des acides sialiques, à 70% des acétamidohexoses et à 90% de tous les autres. En fait, cette disparition est accompagnée de l'apparition d'autres pics qui correspondent aux sucres réducteurs comme s'ils avaient subi une hydrolyse et non une méthanolyse. Pour éviter cela, il est possible d'utiliser du carbonate d'argent ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ) afin de neutraliser le mélange de méthanolyse (Clamp J. R. et coll., 1967; Chambers R. E. et coll., 1971). Cela implique une étape supplémentaire de centrifugation de façon à se débarrasser du précipité argentique en récupérant le surnageant mais cette étape nécessite des rinçages successifs du précipité ainsi qu'un transvasement des surnageants dans un autre tube ce qui augmente les chances d'erreurs de quantification. D'autres équipes utilisent le carbonate de baryum ou de calcium ou bien encore de l'ammoniac, mais seul ce dernier est susceptible de donner des réponses molaires semblables au carbonate d'argent (Aluyi H. A. S. et coll., 1979). Un autre auteur (Chaplin M. F., 1982) pense que le carbonate d'argent n'est pas adapté à l'analyse de petites quantités d'échantillons (inférieur à  $1\mu\text{g}$  de sucre) en raison de la baisse de rendement due à l'absorption par le précipité. Plutôt que de neutraliser le milieu, il propose une autre méthode qui à l'avantage d'être rapide et de ne se dérouler que dans un seul et même tube sans extraction ni transvasement. Son mélange de méthanolyse (méthanol-HCl 0,625 N + acétate de méthyle (4/1 v/v)) est ajouté à l'échantillon séché puis chauffé 16 h à  $70^\circ\text{C}$ . L'acétate de méthyle jouant ici le rôle de capteur d'eau en se transformant en méthanol et en acide acétique à son contact. Puis, il y ajoute un volume d'alcool t-butylrique, avant d'évaporer le tout sous azote, pour faire ensuite une N-ré-acétylation de l'échantillon en seulement 15 min, directement sur le produit séché.

En effet, il est bien connu que la méthanolyse a comme inconvénient de dé-acétyler les groupements N-acétyles des acétamidohexoses et acides sialiques (Karkkainen J. et coll., 1969 ; Zanetta J. P. et coll., 1972), ce qui dans certains cas nécessite cette étape de ré-



acétylation avant de dériver les sucres (Clamp J. R. et coll., 1967). D'autres auteurs pensent que cette ré-acétylation est longue (6 h minimum en ce qui concerne la méthode de J. R. Clamp) et que le rendement de la réaction est particulièrement difficile à contrôler ce qui implique la fluctuation des réponses molaires d'une expérience à l'autre. De plus, des O-acétylations parasites supplémentaires ont été montrées pour les acides sialiques puisque l'acide 5-N-acétyl-neuraminique après N-ré-acétylation donne 4% d'acide 9-O-acétyl-5-N-acétyl-neuraminique (Kamerling J. P. et coll., 1975b).

Un dernier problème a été rapporté au sujet de la méthanolyse en ce qui concerne les N-glycannes. En effet, alors que le corps de ces derniers contient 2 GlcNAc, une seule était retrouvée après traitement. Il fut conclut que la liaison N-glycosidique n'était pas ou peu coupée par la méthanolyse. Certains auteurs montrèrent que l'augmentation de la concentration en HCl du mélange de méthanolyse améliorait la coupure des liaisons N-glycosidiques (Clamp J. R. et coll., 1967; Baenziger J. et Kornfeld S., 1974) et une rupture maximale de 50% de la liaison entre le résidu de GlcNAc et l'asparagine fut également rapporté (Mega T. et coll., 1982). Depuis, notre équipe a démontré que les conditions classiques de méthanolyse sont bien suffisantes pour couper complètement les liaisons N-glycosidiques et que la première GlcNAc impliquée dans la liaison donne des pics particuliers qui permettent de la quantifier parfaitement (Maes E. et coll., 1999).

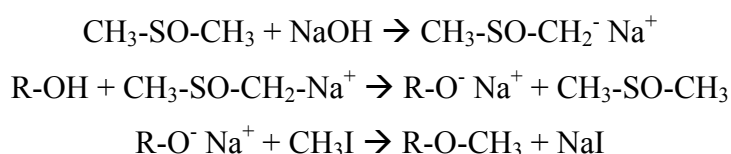
### **III. Les différents types de dérivés**

#### **A. Les dérivés gardant les sucres sous leur forme cyclique**

##### **1) Les per-méthyl-glycosides**

Cette méthode fut la première à avoir été envisagée car elle existait déjà avant l'utilisation de la chromatographie de phase gazeuse. Il n'est donc pas surprenant que la première analyse de sucre (D-Xyl, L-Ara, D-Glc, D-Man et D-Gal) par GC ait utilisé les dérivés méthylés (McInnes A. G. et coll., 1958). Cette méthode montra que ces dérivés étaient suffisamment volatils pour permettre leur analyse en GC (Kircher H. W., 1960). Plus tard la méthode fut étendue aux disaccharides (Bishop C. T., 1962 et 1964) et aux polyols (Ovodov Y. S. et coll., 1967). Dans les cas où la dérivation était menée avec succès, cette méthode offrait une bonne reconnaissance des monosaccharides. Les dérivés ne sont pas sensibles à la présence d'eau, ce qui permet de stoker les échantillons dérivés pour une utilisation ultérieure. En revanche, cette technique de dérivation était inconfortable et nécessitait un travail minutieux qui pouvait être

rebutant et rendait les résultats aléatoires. Ceci est sans doute à l'origine de la faible utilisation de cette technique comparée à celle des dérivés per-acétylés, bien que les dérivés per-méthylglycosides soient plus volatils que ces derniers. Quelques temps plus tard, une variante faisant appel à l'utilisation d'iodure de méthyle, de soude et de diméthylsulfoxyde fut mise au point (Hakomori S., 1964). Cette méthode a l'avantage d'être beaucoup plus rapide et facile d'utilisation en offrant de bons rendements, surtout pour l'analyse de petites quantités d'échantillon. Elle permet de méthyler les radicaux hydroxyles libres des O-méthylglycosides en suivant le schémas réactionnel suivant:



En outre, la méthylation permet de dériver les fonctions amines primaires, mais aussi secondaires, ce qui entraîne la dérivation des fonctions acétamido des N-acétyl-hexosamines (Stellner K. et coll., 1973).



Il est à remarquer, qu'en ce qui concerne les molécules glucidiques, cette technique n'est plus tellement utilisée. On lui préfère souvent une méthode peu différente dans le principe, mais qui est encore plus simple d'utilisation (Ciucanu et coll., 1984). Elle met aussi en jeu, comme base, l'hydroxyde de sodium mais sous forme d'une fine poudre dans le diméthyl-sulfoxyde en présence d'iodure de méthyle. Par contre, cette méthode est destructrice pour les acides uroniques qui subissent une  $\beta$ -élimination importante sous l'effet de la soude. Dans ce cas, on préférera la technique d'Hakomori. Il en est de même pour l'analyse des sucres sulfatés et phosphatés. Il y a peu de temps, une nouvelle méthode de méthylation est apparue (Anumula K. R. et coll., 1992) pour remplacer celle de Ciucanu. Les auteurs pensent que le fait de devoir écraser des boulettes de NaOH en milieu anhydre pour former une fine poudre est une technique difficile et hasardeuse. Ils remplacent donc la poudre d'hydroxyde de sodium par une solution de soude à 50%, car ils pensent que la présence d'eau n'empêche pas la méthylation.

La per-méthylation n'est à l'heure actuelle plus très utilisée pour la simple GC, en raison d'une moins bonne séparation chromatographique et d'une moins bonne sensibilité par rapport à d'autres techniques plus récentes.

C'est le couplage de la GC à la spectrométrie de masse qui lui a donné un regain d'intérêt. En effet, cette méthode, qui fut largement utilisée depuis sa mise au point, est actuellement une des mieux connue en ce qui concerne les mécanismes de fragmentation des différents dérivés en mode EI-MS (Kochetkov N. K. et coll., 1966 et Heyns K. et coll., 1967) (figure 1).

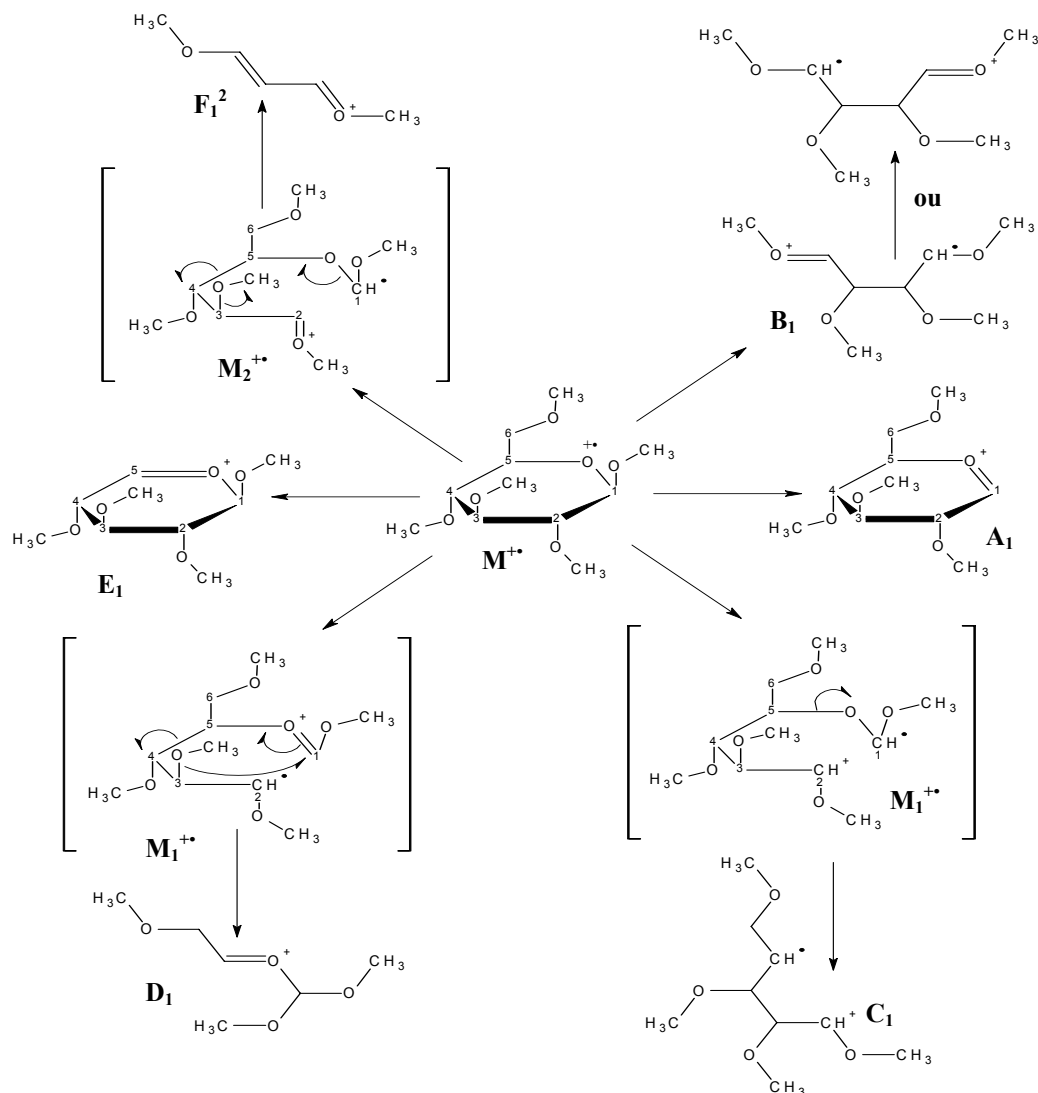
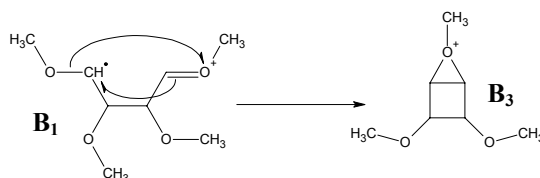


Figure 1: schéma des fragmentations principales des per-méthyl-O-méthyl-glycosides

Ce schéma de fragmentation a été minutieusement étudié par des techniques de marquage au deutérium et la nomenclature de fragmentation utilisée par Kochetkov et Chizhov est restée la base de toutes les autres méthodes qui suivirent. C'est pourquoi nous allons nous attarder sur la description des différents fragments des per-méthyl-hexoses.

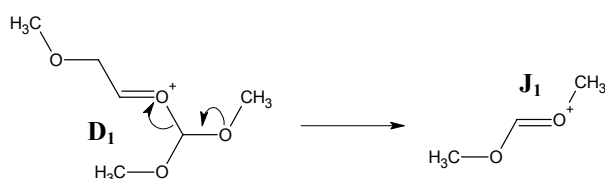
- Tout d'abord, on observe l'ion moléculaire pour tous les monosaccharides, ce qui n'est pas forcément le cas pour des di- et tri-saccharides. En outre, on observe les ions  $[M-1]^+$  dû à la perte d'un hydrogène,  $[M-15]^+$  provenant de la perte d'un méthyle, et  $[M-32]^+$  résultant de la perte d'une molécule de méthanol.

- La voie de fragmentation de type A provient de la perte du radical méthanolate du carbone 1. Des fragments fils ( $A_2$  et  $A_3$ ) apparaissent par départs successifs de méthanol autour du cycle.
- La voie de fragmentation de type B, par coupure du cycle en deux points, donne l'ion  $B_1$  qui peut à son tour donner un ion  $B_2$  par perte d'un radical méthoxy-méthyle, ou bien un autre ion appelé  $B_3$  par perte d'un radical méthoxy et cyclisation (figure 2).



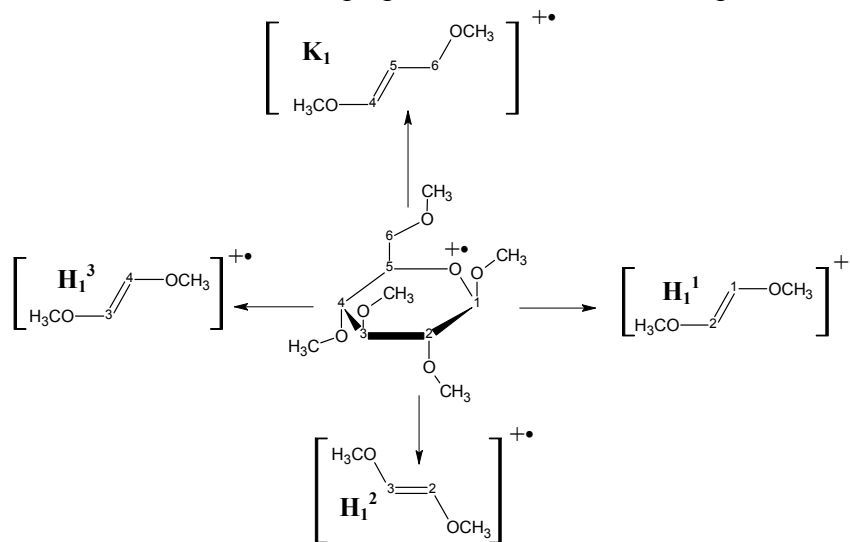
**Figure 2: Formation de l'ion  $B_3$**

- La voie de fragmentation de type C fait intervenir une étape intermédiaire qui consiste en la formation d'un ion  $M_1^{++}$  par une coupure de la liaison entre les carbones 1 et 2. cet ion étant instable, Il y a une seconde rupture du cycle entre le carbone 5 et l'oxygène pour former l'ion  $C_1$ , lui même instable (il n'est pas visible sur les spectres). Cet ion  $C_1$  est décrit comme présentant une charge se situant sur un carbone et non pas sur un atome d'oxygène (Kochetkov N. K. et coll., 1966 et Heyns K. et coll., 1967). Ors, selon les règles classiques des mécanismes de fragmentation ce type d'ion a bien peu de chance d'exister dans cet état et serait de toute façon de nature instable. Ainsi, bien que nous croyions peu à son existence, nous le présentons puisqu'il a été décrit dans la littérature. Par contre, les ions fils décrits comme étant obtenus à partir de  $C_1$  sont plausibles puisqu'ils peuvent également être obtenus à partir d'autres ions dont la formation respecte les règles des mécanismes de fragmentation. Cet ion  $C_1$  ou un équivalent plus acceptable subissent donc une autre fragmentation par perte d'un radical méthoxy formant ainsi un mélange d'isomères d'ions  $C_2$ , puis par une nouvelle perte,  $C_3$ .
- La voie de fragmentation de type D commence aussi par la formation de l'ion  $M_1^{++}$  qui, par des ruptures de liaisons en chaîne le long du cycle, donne l'ion  $D_1$ . Ce dernier par une dégradation supplémentaire donne l'ion  $J_1$  (figure 3).



**Figure 3: formation de l'ion  $J_1$**

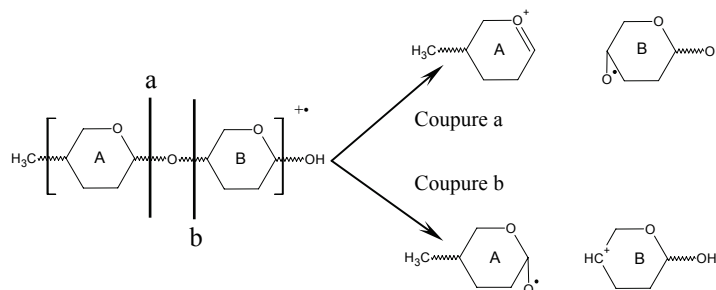
- La voie de fragmentation de type E est due à la rupture de la liaison entre les carbones 5 et 6 pour donner  $E_1$ . Puis, par pertes consécutives de méthanol autour du cycle, on obtient les ions  $E_2$  et  $E_3$ . C'est  $E_1$  qui permet de déterminer si on a affaire à une forme furanique ou pyranique.
- La voie de fragmentation de type F provient, quant à elle, de la formation d'un ion instable appelé  $M_2^{+\bullet}$ . Ce dernier, par des cassures en série du cycle donne l'ion  $F_1$ . Nous ferons remarquer que d'autres types d'ions  $F_1$  existent et qu'ils proviennent de la fragmentation supplémentaire d'une autre famille de fragment ( $B_1$ ).
- Il existe enfin les deux voies H et K qui proviennent de doubles ruptures du cycle (figure 4).



**Figure 4: formation des ions de types H et K**

Ces règles de fragmentation sont à peu près valables pour tous les glycosides, même pour les acides uroniques (Kovacik V. et coll., 1968) et les formes furaniques, qui donnent toutefois des pics particuliers, ce qui permet de les discriminer. En revanche, l'introduction du groupe désoxy (Fuc) ou de la fonction acétamido (HexNAc) fait varier l'importance relative des différents ions.

En ce qui concerne les polysaccharides, il est assez aisé de déterminer l'enchaînement et l'emplacement des liaisons jusqu'aux trisaccharides (figure 5).



**Figure 5: fragmentations particulières aux polysaccharides**

La liaison inter-glycosidique peut, en principe, suivre deux voies de fragmentation dénommées a et b. La voie a, qui donne le fragment contenant le monosaccharide du coté non réducteur, est favorisé car ce dernier est stabilisé par résonance.

Ainsi, tous les oligosaccharides per-méthylés des aldohexosyl-aldohexoses donnent un cation monosaccharidique à  $m/z$  219, alors que les trisaccharides montrent un cation disaccharidique à  $m/z$  423. De plus, chacun de ces ions est accompagné par d'autres ions correspondant à la perte d'une ou deux molécules de méthanol (Moor J. et coll., 1975). De ce fait, l'enchaînement des monosaccharides peut-être déterminé. Nous ne développerons pas ici les fragmentations spécifiques qui permettent de déterminer l'emplacement des liaisons. Par contre, nous citerons comme référence Moor et col. (Moor J. et coll., 1975) qui trouvent la technique de per-méthylation plus efficace que celle faisant intervenir la dérivation aux triméthyl-silyles pour ce genre d'analyse. Selon eux, les dérivés silylés sont difficiles à préparer et sont relativement instables. En outre, ils présentent une faible amplitude des ions moléculaires, surtout pour l'analyse de polysaccharides.

## **2) Les glycosides partiellement méthylés**

L'analyse de glycosides partiellement méthylés fut également envisagée (Bishop C. T., 1962 et 1964; Heyns K. et coll., 1969). Elle consiste en une méthylation des polysaccharides suivie par la libération des monosaccharides méthylés (le plus souvent par méthanolyse). Cela n'a pas réellement été approfondi par la suite à cause d'un trop grand nombre d'inconvénients. En effet, la méthylation partielle laissant des hydroxyles libres, le nombre de dérivés différents devient trop important dans un mélange de glycosides surtout lors d'une analyse d'un mélange complexe de sucre. En outre, les dérivés ayant de nombreux hydroxyles libres voient leur temps de rétention ainsi que la largeur de la base de leur pic augmenter. Enfin, les dérivés faiblement méthylés restent sensibles à la chaleur.

Par contre, les spectres de masses sont aisément analysables car les règles de fragmentations suivent celles des glycosides per-méthylés, notamment pour les hexoses (Heyns K. et coll., 1969) et N-acétyl-hexosamines (Heyns K. et coll., 1967).

Cette méthode devient beaucoup plus intéressante dans le cas de doubles dérivation, sachant que les fonctions méthoxy des glycanes partiellement méthylés résistent très bien aux processus de libération des monosaccharides par méthanolyse acide. Il est possible après leur libération de faire subir une deuxième dérivation aux monosaccharides partiellement méthylés. Cela permet de dériver les groupements hydroxyles qui interviennent dans les

liaisons inter-glycosidiques par des groupements de type acétates (Heyns K. et coll., 1967), trifluoroacétates ou triméthyl-silyles (Rivière M. et coll., 1988). Il devient donc possible de déterminer les points de branchements des glycosides.

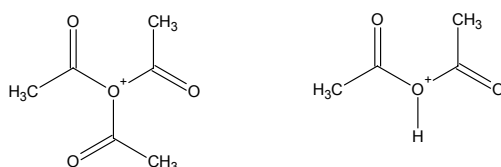
### 3) Les dérivés acylés

#### a) Les per-acétyl-glycosides

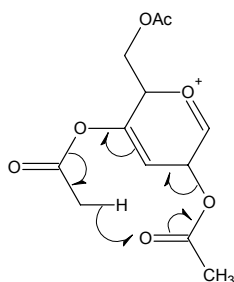
Cette technique appliquée à la chromatographie de phase gazeuse, tout comme la per-méthylation, permet de séparer les épimères glucidiques en donnant, pour chacun d'entre eux, plusieurs pics en fonction de l'anomérisation et du type de cycle. La formation des dérivés est très simple, elle consiste à placer l'échantillon sec en présence d'un mélange (50/50, v/v) d'anhydride acétique et de pyridine. Certains auteurs trouvent que cette méthode entraîne la formation de pics chromatographiques parasites et préfèrent utiliser de la 4-diméthylaminopyridine comme catalyseur avec de la pyridine et de l'anhydride acétique dans de l'acétonitrile (Anumula K. R. et coll., 1992).

Les résultats obtenus sont comparables à ceux donnés par la per-méthylation en terme de sensibilité et de résolution et les dérivés sont très stables dans l'eau. En revanche, les dérivés per-acétylés sont un peu moins volatils que les dérivés per-méthylés.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse par impact électronique, on retrouve les séries d'ions de fragmentation observées pour la per-méthylation, avec toutefois, quelques particularités dues à la présence des radicaux acétoxyles. Leurs voies de dégradation sont quelque peu plus complexes, car il peut y avoir formation de groupes partants de quatre types différents ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\cdot$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}\cdot$  et  $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ ). En outre, on observe la formation d'ions tri-acétoxoniums et di-acétoxoniums.



Enfin, deux groupes acétoxyles peuvent être éliminés simultanément.



Tout comme la per-méthylation, la per-acétylation des O-méthyl-glycosides est maintenant assez peu utilisée. En revanche, ces deux méthodes ont été couplées pour donner les dérivés O-méthyl-glycosides partiellement méthylés et acétylés qui restent toujours d'actualité pour déterminer les atomes d'oxygènes impliqués dans les liaisons inter-glycosidiques (Heyns K. et coll., 1967).

## **b) Les dérivés trifluoroacétylés**

Les dérivés trifluoroacétylés des sucres furent décrits pour la première fois par Bourne et coll. (1950), puis ils servirent à d'autres auteurs pour l'analyse de mono-, di- et tri-saccharides. Ces dérivés sont plus volatils que les dérivés triméthyl-silylés et acétylés correspondants (Zanetta J. P. et coll., 1972 et Pritchard D. G. et coll., 1978), autorisant des analyses plus rapides.

Différents procédés de dérivation ont été décrits. Selon une publication (Pritchard D. G. et coll., 1978), Vilkas et coll. utilisèrent de l'anhydride trifluoroacétique et du trifluoroacétate de sodium dans l'acétonitrile. D'autres équipes préférèrent comme solvant de la pyridine, du tetrahydrofurane ou du dichlorométhane (Zanetta J. P. et al., 1972). Deux autres études affirmaient que la meilleure technique de dérivation est obtenue avec du N-méthyl-bis(trifluoroacétamide) en volume égal avec de la pyridine comme solvant (Sullivan J. E. et coll., 1977 et Pritchard D. G. et coll., 1978).

Ce type de dérivation, appliquée aux O-méthyl-glycosides libérés par méthanolyse acide directement sur des glycoprotéines et des glycolipides (Zanetta J. P. et coll., 1972), a permis de montrer que ces composés donnaient des chromatogrammes facilement exploitables, malgré quelques chevauchements entre des pics d'anomères appartenant à des épimères différents ( $\alpha$ -Glc avec  $\beta$ -Man et  $\beta$ -Glc Avec  $\alpha$ -Gal). Toutefois, les auteurs font remarquer que l'on peut quantifier ces composés en prenant comme base de calcul les proportions relatives, connues à l'équilibre dans le mélange méthanol/HCl, des différents isomères de chaque glycoside. Le pouvoir résolutif de cette technique permet de séparer en une seule analyse: pentoses, hexoses, hexosamines, acides sialiques (neuraminique et KDN) et acides hexuroniques. C'est-à-dire, l'ensemble des sucres qui sont généralement présents sur les glycoprotéines et glycolipides. Les réponses relatives molaires sont très bonnes, excepté pour les hexosamines, dont les RMR sont plus faibles, tout comme pour les dérivés TMS (Clamp J. R. et coll., 1967 ; Bhatti T. et coll., 1970 et Chambers R. E. et coll., 1971). La sensibilité de cette technique est de loin la meilleure, puisque 100 ng de glycoprotéines suffisent à déterminer la composition en sucre (Pritchard D. G. et coll., 1978), contrairement à d'autres

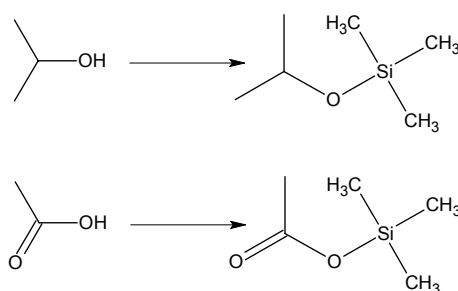


méthodes qui nécessitent jusqu'à 200µg de glycoprotéines. Il semble donc que cette méthode soit une des plus efficaces (avec la dérivation aux TMS), voire, la meilleure pour analyser des échantillons très complexes (Andrews M. A., 1989). Par contre, dans l'étude précitée, les dérivés n'étaient pas sous la forme de O-méthyl-glycosides, mais sous celle de O-benzyloximes linéaires, de façon à n'avoir qu'un seul pic chromatographique par épimère glucidique (voir plus loin). Enfin, il est à noter que la présence du fluor sur les composés augmente considérablement la sensibilité des appareils de GC surtout s'ils possèdent un détecteur à capture d'électron (Pritchard D. G. et coll., 1978). En revanche, le plus gros problème rencontré par les différents auteurs qui ont utilisé cette méthode provient du fait que les dérivés trifluoroacétylés sont très volatils. Il est donc impossible d'évaporer le réactif d'acylation sans perdre les dérivés les plus légers et il faut injecter directement les dérivés dans leur milieu réactionnel. Ce point n'est pas gênant pour les colonnes remplies, mais est catastrophique pour les colonnes capillaires plus modernes (Zanetta J. P. et coll., 1999a). En ce qui concerne la spectrométrie de masse, les dérivés trifluoroacétylés donnent des spectres caractéristiques et faciles à analyser. Ils suivent les règles de fragmentation des dérivés méthylés pour les oses neutres et les acides hexuroniques.

#### **4) Les dérivés triméthyl-silylés**

##### **a) Formation des dérivés, avantages et inconvénients**

Cette méthode est de très loin la plus utilisée depuis sa mise au point (Sweeley C. C. et coll., 1963), elle consiste à dériver les hydroxyles libres par des groupements triméthyl-silylés (figure 6).



**Figure 6: dérivation des hydroxyles par les TMS**

A l'origine, la dérivation se faisait par l'utilisation d'hexaméthyl-disilazane (HMDS), de triméthyl-chlorosilane (TMCS) et de pyridine anhydre. La réaction était rapide et présentait un bon rendement. Cependant, elle était très sensible à la présence de traces d'eau qui provoquait l'hydrolyse des éthers de triméthyl-silyle. En outre, elle s'accompagnait de la formation d'un précipité de chlorure d'ammonium qui détériorait invariablement les colonnes

chromatographiques par son accumulation à proximité du site d'injection. Bien que ce problème fût réglé par extraction des produits de dérivation à l'hexane avant l'injection (De Neef J., 1969), les dérivés restaient relativement instables. Au chapitre des inconvénients majeurs, ce type de triméthyl-silylation ne permet pas de dériver les groupements amines présents sur les acides sialiques (Zanetta J. P. et coll., 1972). Il est donc impossible de les séparer, quel que soit le type de colonne utilisée. Le problème est le même pour les hexosamines qui, même si elles sont détectables dans cet état sur des colonnes apolaire (Karkkainen J. et coll., 1965), ne peuvent pas être correctement quantifiées en raison de leur tendance à traîner. Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre sur la méthanolyse, les N-acétyl-hexosamines qui ont subi une hydrolyse ou une méthanolyse acide sont transformées en hexosamines (Karkkainen J. et coll., 1969 ; Zanetta J. P. et coll., 1972). Une solution à la non dérivation des fonctions amines par un groupement triméthyl-silyle (Elwood P. C. et coll., 1988), consiste à ajouter une dérivation supplémentaire en ré-acétylant les fonctions amines avant la formation des dérivés TMS (Clamp J. R. et coll., 1967).

Ces différents problèmes furent partiellement réglés par l'utilisation de donneurs de groupements silyles plus puissants que le HMDS tels que: le N,O-bis(triméthyl)acétamide (BSA), le N,O-bis(triméthyl-silyl)trifluoroacétamide (BSTFA), le N-triméthyl-silyl-imidazole (TMSI) ou le N-méthyl-N-triméthyl-silyl-trifluoroacétamide (MSTFA). Le procédé utilisant le BSA avec le TMCS comme catalyseur et la pyridine comme solvant (Laker M. F., 1979 et 1980), permet l'obtention d'un réactif sans précipité et des dérivés stables durant plusieurs jours. De plus, l'ajout de BSA au mélange HMDS, TMCS et pyridine permet la dérivation des fonctions amines (Karkkainen J. et coll., 1969) et donc, autorise l'analyse qualitative des composés aminés (hexosamines, et acides sialiques) sans dérivation supplémentaire de type ré-acétylation. Toutefois, les liaisons Si-N sont connues pour être très labiles comparées aux liaisons Si-O. C'est pourquoi, les résultats quantitatifs obtenus avec cette méthode sont parfois aléatoires.

Quand à l'utilisation de la BSTFA, en théorie, elle devrait être un donneur de groupements silyles autocatalytique. Mais il a été constaté (Laker M. F., 1979 et 1980) que l'adjonction de TMCS était nécessaire au bon rendement de la réaction. Il est à noter que certains auteurs lui préfèrent tout de même la méthode originelle de Sweeley (Chambers R. E. et coll., 1971), car ils trouvent que la BSTFA donne de plus petits pics pour les sucres neutres, sans doute à cause de leur insolubilité dans ce réactif. Ceci peut-être contourné par l'adjonction de pyridine, mais dans ce cas, apparaissent des petits pics parasites pour les hexosamines.

L'utilisation du TMSI, bien connue pour dériver les stéroïdes, marche bien pour les sucres neutres et les hexosamines. Selon certains (Chambers R. E. et coll., 1971), aucun pic n'est visible lors d'analyse d'acides sialiques, ce qui est contredit par des conclusions d'études plus récentes (Casals-Stenzel J. et coll., 1975).

En ce qui concerne les solvants, la pyridine est utilisée dans la majorité des études impliquant la silylation, bien que d'autres, tels que la diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde, soient utilisés (Radhakrishnamurthy B. et coll., 1966; Reid P. E. et coll., 1970 ; Phillips D. V. et coll., 1973). Parmi les avantages de la diméthylformamide, comparée à la pyridine, on trouve l'absence d'odeur et le fait qu'étant plus volatile, elle cause moins de traînées au niveau du pic de solvant. Surtout, elle permet d'éviter les fortes variations des rapports molaires des N-acétyl-hexosamines observées dans la pyridine (Reid P. E. et coll., 1970). L'utilisation d'un solvant plutôt qu'un autre, agit aussi sur l'équilibre des différents pics correspondants aux anomères d'un sucre. En effet, la plupart des procédés de fabrication des dérivés TMS des monosaccharides (non des O-méthyl-glycosides) impliquent une mutarotation dans l'eau ce qui nécessite de se débarrasser de l'eau avant la réaction de triméthyl-silylation. Des travaux ont montrés que l'équilibre pouvait se faire en deux heures dans la pyridine contenant du perchlorate de lithium à 0,2% à 40°C, permettant ainsi d'éviter la présence de l'eau pour la suite de la dérivation. Certains préfèrent atteindre l'équilibre dans la diméthylformamide ou la pyridine (16 h à 40°C) en présence d'un catalyseur bifonctionnel, la 2-hydroxypyridine (Reid P. E. et coll., 1970), car ce dernier, une fois dérivé, est volatil et n'interfère pas avec les dérivés TMS des sucres.

Différents contaminants peuvent avoir un effet sur la dérivation des triméthyl-silyles (Chambers R. E. et coll., 1971.; M. F. Chaplin, 1982). Bien qu'aucun contaminant organique présent dans les tampons ne puisse interférer lors de la dérivation proprement dite, ils peuvent produire des pics dans des zones importantes du chromatogramme. En règle générale la quantité de Triton-X-100, Tris, EDTA et sels inorganiques en solution ne doit pas dépasser 10 fois la quantité de sucres à analyser. Après méthanolyse et triméthyl-silylation, le Tris donne deux pics qui chevauchent les pics des dérivés TMS des O-méthyl-fucosides. Par contre, le citrate ne gêne pas malgré le fait qu'il donne deux pics. Dans le cas de la dérivation des sucres réducteurs (après hydrolyse acide), le Tris n'est pas un inconvénient car il ne donne qu'un pic noyé dans le pic de solvant, mais, pour le citrate, son seul pic chevauche le premier du mannose. Triton-X-100 et EDTA donnent aussi des pics et l'extraction du triton-X-100 à l'éther anhydre génère une perte de 5 à 25% des glycoprotéines à analyser et une perte inférieure à 20% de la quantité de monosaccharides (Elwood P. C. et coll., 1988).

Avec l'apparition de différentes techniques d'isolement des sucres, sont apparues d'autres contaminations notamment celle du glucose qui peut provenir de gel de Sephadex, de la cellulose ou de gels échangeurs d'ions. Le xylose, quand à lui, peut être retrouvé après séparation sur papier.

Les lipides présents dans de nombreux échantillons biologiques apparaissent sur les chromatogrammes après méthanolyse sous la forme de méthyl-ester d'acides gras (FAMES). Certains d'entre eux sortent au niveau des hexoses et acétamidohexoses. Ils peuvent, s'ils sont trop gênants, être extraits avant dérivation par l'utilisation de chloroforme sur une solution aqueuse des produits ré-acétylés.

En ce qui concerne les sels, bien qu'ils n'interfèrent pas lors de la méthanolyse en raison de leur manque de solubilité dans le réactif, ils peuvent interférer durant la triméthyl-silylation, car ils sont assez solubles dans l'anhydride acétique ajouté pour la N-ré-acétylation. Ils sont acceptables jusqu'à une certaine quantité, pour laquelle, ils ne changent pas le coefficient de réponse moléculaire. Au delà, ils affectent les chromatogrammes en faisant apparaître des pics supplémentaires, notamment en ce qui concerne les hexosamines, en empêchant la complète triméthyl-silylation des sucres. Ce problème peut facilement être évité en ajoutant l'agent de triméthyl-silylation en excès. En outre, les sels empêchent la bonne évaporation des échantillons entre chaque étape des protocoles de méthanolyse et de triméthyl-silylation et ils peuvent monopoliser par absorption les sucres dérivés.

Comme nous l'avons déjà dit, la présence d'eau est extrêmement dommageable à la réaction de triméthyl-silylation, amenant à la formation de produits partiellement dérivés, voire pas du tout. En dessous de 0,2% sa présence engendre une perte déjà très importante pour tous les monosaccharides; à 2% il y a perte totale des HexNAc et des acides sialiques; à 5% plus un sucre n'apparaît. De plus, sa présence dans les échantillons déjà complètement dérivés, amène également à la disparition des composés à cause d'une hydrolyse rapide des monosaccharides dérivés. Ainsi, l'addition de 2% d'eau à un échantillon engendre la disparition totale des acides sialiques en 1h30, des acétamidohexoses en 4 h et des sucres neutres en 6 h. Ce dernier chiffre descendant à 4 h à 3% d'eau, alors qu'en condition anhydre tous les dérivés restent stables durant 24 h.

De nos jours, avec l'utilisation des colonnes capillaires, les dérivés de O-méthyl-glycosides triméthyl-silylés peuvent être détectés pour des quantités injectées de l'ordre de 100 pmol (Chaplin M. F., 1982), voire beaucoup moins avec les nouveaux types de colonnes capillaires qui permettent l'analyse de 1 à 3 pmol de glycosides injectés. Cela équivaut, pour l'analyse

de la composition de glycoprotéines à une quantité d'environ 1 à 5  $\mu\text{g}$  (12,5 à 60 pmol) de glycoprotéines à préparer, soit 80 ng (1 pmol) à injecter (Elwood P. C. et coll., 1988).

## **b) La spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse par impact électronique des dérivés triméthyl-silyl-glycosides a été très méticuleusement analysée sur les dérivés simples (Chizhof O. S. et coll., 1967; Karkkainen J. et coll., 1969; Coduti P. L. et coll., 1977), mais également par l'utilisation de marquage au deutérium. Elle permet de déterminer si le cycle est en configuration pyranose ou furanose et, pour les polysaccharides, de définir la position des liaisons osidiques (Coduti P. L. et coll., 1977). Comme toutes les autres méthodes de dérivation, elle ne permet pas de déterminer l'anométrie par la spectrométrie de masse. Toutefois, ce problème peut-être résolu par l'analyse des temps de rétention en GC. Encore une fois, nous retrouvons le schéma de fragmentation caractéristique des glycosides qui avait été déterminé pour les dérivés perméthylés avec, bien sûr, quelques petites particularités dues à ce type de dérivés. Nous ne parlerons ici que des cas des O-méthyl-hexoses et O-méthyl-N-acétyl-hexosamines obtenus après méthanolyse et ré-acétylation.

### **(1) Pour les dérivés TMS des O-méthyl-hexoses**

Bien souvent, l'ion moléculaire est inexistant ( $m/z$  482). Cependant, nous retrouvons comme premiers ions: les fragments  $[M-15]^+$  dus à la perte d'un méthyle par un des groupements TMS; puis  $[M-31]^+$  provenant de la perte du méthanolate du carbone 1; on peut également trouver  $[M-90]^+$  résultant de la perte d'un groupement TMS. A partir de ces trois ions fragments, il peut y avoir des fragmentations supplémentaires amenant à l'ion  $[M-47]^+$  correspondant à  $M-(\text{CH}_3+\text{CH}_3\text{OH})$ ,  $[M-105]^+$  correspondant à  $M-(\text{CH}_3+\text{Me}_3\text{SiOH})$  et  $[M-121]^+$  correspondant à  $M-(\text{CH}_3\text{O}+\text{Me}_3\text{SiOH})$ .

Quant à l'ion le plus intense du spectre (à  $m/z$  204) il correspond à l'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{OSiMe}_3]^+$  contenant les atomes provenant du cycle en  $\text{C}_2-\text{C}_3$  et  $\text{C}_3-\text{C}_4$ . Il est identique à l'ion  $m/z$  88 ( $\text{H}_1$ ) des spectres de masse des per-méthyl-glycosides. Un autre ion, un peu moins intense à  $m/z$  217, concorde avec le fragment  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{O}-\text{SiMe}_3]^+$ , il est l'analogue du fragment  $m/z$  101 ( $\text{F}_1$ ) des per-méthyl-glycosides. C'est le ratio de ces deux ions qui permet de déterminer si l'on a affaire à une forme pyranique ou furanique. Dans le cas des pyranoses, l'ion à  $m/z$  204 est plus grand que  $m/z$  217; alors que dans le cas des furanoses, l'ion à  $m/z$  217 est bien plus grand que  $m/z$  204. En outre, la forme furanique est

accompagnée de la présence d'un ion intense à  $m/z$  205  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}-\text{SiMe}_3]^+$  (Kamerling J. P. et coll., 1975b).

Un pic à  $m/z$  133, caractéristique des O-méthyl-glycosides triméthyl-silylés, correspond à l'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{O}-\text{Me}]^+$  qui provient d'un réarrangement comparable à celui fournissant l'ion  $J_1$  (à  $m/z$  75 pour les per-méthyl-glycosides).

Le fragment (de masse  $m/z$  305), qui apparaît dans les spectres des hexoses et des pentoses, correspond à l'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{C}(\text{OSiMe}_3)-\text{CH}=\text{O}-\text{SiMe}_3]^+$ , analogue de l'ion  $B_2$  ( $m/z$  131) des spectres des per-méthyl-glycosides.

On retrouve encore des ions relativement intenses très caractéristiques. Il s'agit de  $[\text{Me}_3\text{SiO}=\text{SiMe}_2]^+$  (à  $m/z$  147), de  $[\text{CH}_2=\text{O}-\text{SiMe}_3]^+$  (à  $m/z$  103) et de  $[\text{Me}_3\text{Si}]^+$  (à  $m/z$  73) que l'on observe pour tous les sucres dérivés par les TMS.

## **(2) Pour les dérivés TMS des O-méthyl-glycosides des N-acétyl-hexosamines**

L'ion moléculaire est très faible, voire inexistant (à  $m/z$  451). Toutefois, nous retrouvons les fragments M-15, M-31, M-47, M-90, M-105 et M-121 déjà définis pour les O-méthyl-hexoses.

L'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{OSiMe}_3]^{+*}$  à  $m/z$  204 existe également, mais il est moins abondant que dans le cas des O-méthyl-hexoses, car il ne provient que du fragment contenant les carbones  $C_3-C_4$ . En effet, le Fragment  $C_2-C_3$  contient une fonction acétamide. Il donne donc l'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{NHCOCH}_3]^{+*}$  de masse  $m/z$  173 qui est l'ion le plus intense des spectres des formes pyranoses (Kamerling J. P. et coll., 1975b et Coduti P. L. et coll., 1977). En outre, par un réarrangement métastable, cet ion donne l'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}_2]^+$  à  $m/z$  131 (Coduti P. L. et coll., 1977).

L'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CHNHCOCH}_3]^{+*}$  à  $m/z$  247, contenant les atomes  $C_2-C_1-O-C_5-C_6$ , provient de la double rupture du cycle de forme pyranique (Coduti P. L. et coll., 1977).

On retrouve toujours des ions relativement intenses très caractéristiques des sucres dérivés par les TMS. Il s'agit de  $[\text{Me}_3\text{SiO}-(\text{CH}_2)\text{C}-\text{CH}-\text{OSiMe}_3]^+$  à  $m/z$  217, de  $[\text{Me}_3\text{Si}-\text{O}=\text{SiMe}_2]^+$  à  $m/z$  147, de  $[\text{CH}_2=\text{O}-\text{SiMe}_3]^+$  à  $m/z$  103 et de  $[\text{Me}_3\text{Si}]^+$  à  $m/z$  73. On retrouve aussi l'ion à  $m/z$  133, caractéristique des O-méthyl-glycosides triméthyl-silylés, mais il est moins intense que dans le cas des hexoses (Coduti P. L. et coll., 1977).

Pour les formes furanoses, contrairement aux formes pyranoses, l'ion le plus intense apparaît à  $m/z$  186 (au lieu de 173). Il correspond à l'ion  $[\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{HC}-\text{NHCOCH}_3]^+$  contenant

les carbones C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> (Kamerling J. P. et coll., 1975b et Coduti P. L. et coll., 1977). Enfin, on retrouve l'ion à m/z 205.

## **B. Les dérivés linéaires**

Pour éviter la multiplicité des pics chromatographiques, due au phénomène de mutarotation des sucres, il est possible d'ouvrir le cycle des glycosides par réduction. Pour cela, de nombreuses méthodes furent développées, parmi lesquelles, on trouve la formation: d'alditols, d'oximes (méthyl-oximes et benzyl-oximes) et d'aldonitriles. Nous ne parlerons ici que des méthodes les plus utilisées, c'est-à-dire, la formation: d'alditols, de méthyl-oximes et d'aldonitriles.

### **1) Cas des alditols**

La formation d'alditols à partir des sucres libérés par hydrolyse permet d'éviter l'apparition d'un mélange d'anomères à l'équilibre et donc de diminuer le nombre des pics chromatographiques. Pour cela, les glycosides doivent être réduits par du borohydrure de sodium ce qui a pour effet d'ouvrir le cycle pour former des polyols linéaires qui peuvent ensuite être dérivés différemment en vue de leur analyse.

Un problème provient des propriétés de symétrie des alditols. Il peut être évité par l'utilisation du borodeutériure de sodium qui permet de marquer le carbone C<sub>1</sub> par du deutérium et donc de différencier (en ce qui concerne les hexoses) les fragments contenant le côté C<sub>1</sub>, des autres contenant le carbone C<sub>6</sub>.

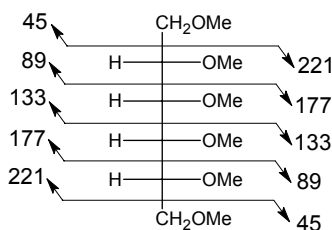
Certains composés fournissent le même alditol, puisque huit hexoses et quatre pentoses donnent seulement six et trois dérivés (Reid P. E. et coll., 1970). En outre, les cétooses donnent deux pics après réduction, ce qui n'est pas tout à fait en adéquation avec le but recherché de n'avoir qu'un seul pic par composé.

#### **a) Les méthyl-éthers d'alditols**

Le protocole suit toujours les trois étapes successives que sont: hydrolyse, réduction et perméthylation.

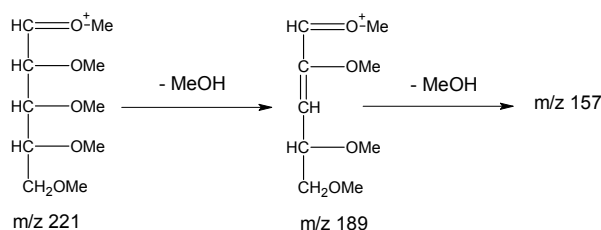
L'étude de la fragmentation a été faite grâce au remplacement des groupes méthoxyles par des trideutério-méthoxyles en des positions spécifiques. Les spectres de masse des stéréoisomères sont théoriquement identiques et l'ion moléculaire n'est pas visible sur les spectres.

Le premier fragment visible est formé, soit par coupure en  $\alpha$  de la chaîne d'alditol, soit par élimination de méthanol à partir de l'ion moléculaire (figure 7).



**Figure 7: fragmentations primaires des méthyl-éthers d'alditols d'hexoses**

Pour un hexitol, le premier fragment (à  $m/z$  221) apparaît, soit par coupure entre  $C_1$  et  $C_2$ , soit entre  $C_5$  et  $C_6$ . Il est d'ailleurs de faible abondance, car assez instable. Ainsi, il se dégrade par la perte d'une ou de deux molécules de méthanol pour donner les fragments secondaires à  $m/z$  189 et 157 (figure 8).



**Figure 8: fragmentations secondaires des méthyl-éthers d'alditols d'hexoses**

De la même façon, les fragments primaires à  $m/z$  177 et 133 donnent respectivement les fragments secondaires à  $m/z$  145 et 101.

Bien qu'il existe d'autres types de fragmentation, nous n'irons pas plus loin dans la description, car le mécanisme est comparable à celui des alditols acétates partiellement méthylés dont nous développerons plus précisément les mécanismes de fragmentation.

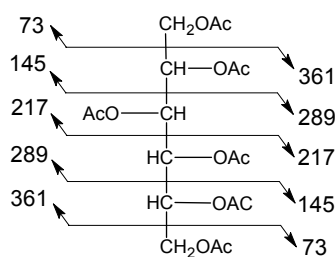
## **b) Les alditol-acétates**

Le protocole consiste en une hydrolyse pour libérer les glycosides, suivie par la réduction de ces composés au borohydrure de sodium, puis par une per-acétylation. Au début, en accord avec les travaux de Sawardeker (1965), le protocole était très complexe et nécessitait l'analyse séparée des glycosides neutres et aminés avec de nombreuses phases de filtration, d'extraction et de purification par l'utilisation de colonnes échangeuses d'ions (Kim J. H. et coll., 1967; Oades J. M., 1967; Lehnhardt W. F. et coll., 1968 et Shaw D., et coll., 1969). Plus tard, ce problème a été résolu et les sucres neutres et aminés furent analysés en une seule



étape avec la même colonne chromatographique. Toutefois, des équipes ont rapporté une dégradation des hexosaminitols en oxazolines dans l'injecteur à haute température (Griggs L. J. et coll., 1971 et Niedermeier W., 1971).

Le mode de fragmentation par impact électronique est assez simple, les spectres de masse des stéréo-isomères sont identiques, ainsi, le spectre de masse du D-glucitol-hexa-acétate est représentatif de tous les hexitols. Il n'y a pas d'ion moléculaire visible. Le fragment primaire de plus haute masse est l'ion  $[M-CH_3CO_2]^+$  (à  $m/z$  375) et cinq autres fragments primaires sont formés par coupure en  $\alpha$  le long de la chaîne d'alditols (figure 9).



**Figure 9: fragmentations primaires des alditol-acétates d'hexoses**

Bien souvent, ces fragments primaires subissent des dégradations secondaires par perte d'acide acétique (60 u), de cétène (42 u) ou d'anhydride acétique (102 u). On voit également des coupures secondaires par réarrangement d'hydrogène.

Les alditols acétates donnent de bons résultats en ce qui concerne l'analyse des tétroses, pentoses, hexoses et heptoses, qui donnent des spectres caractéristiques faciles à interpréter. La présence et la position de groupes désoxy et acétamido sont caractérisables. En outre, les acides uroniques peuvent être analysés qualitativement et quantitativement par une méthode un peu compliquée, ce qui fait qu'elle est peu utilisée. Cette technique repose sur la transformation des acides uroniques en leurs équivalents hexoses deutérés en  $C_6$ . Ainsi le rapport entre les hexoses deutérés et normaux permet de quantifier les acides uroniques par rapport aux hexoses.

### c) Trifluoroacétates d'alditols

Les spectres de masses donnent des schémas de fragmentation simples avec l'ion moléculaire généralement présent. Les règles de fragmentation suivent celles des acétates et les ions secondaires sont formés par perte d'acide trifluoroacétique ou d'anhydride trifluoroacétique.

### d) Alditols triméthyl-silylés

Cette technique n'a pas beaucoup été utilisée par rapport aux alditols méthylés et/ou acétylés, peut-être par ce que l'analyse des sucres aminés est problématique en raison du fait que leur libération par hydrolyse entraîne la N-désacétylation des N-acétyl-hexosamines. Après la réduction et la dérivation des glycosides en éthers d'alditols triméthyl-silylés, la fonction amine se trouve silylée. Or la liaison N-TMS est relativement fragile ce qui fait que l'on perd une bonne partie des N-acétyl-hexosamines lors de leur analyse (Karkkainen J. et coll., 1969). La fragmentation suit exactement celle des per-méthyl-éthers d'acétates (Karkkainen J. et coll., 1969). L'ion le plus intense est à  $m/z$  73. Les fragments primaires sont formés par coupure en  $\alpha$  de la chaîne d'alditol et les fragments secondaires sont produits par éliminations successives de triméthylsilanols. Le nombre de carbones présents dans la chaîne peut être déterminé par les ions  $[M-CH_3]^+$  et  $[M-Me_3SiOH]^+$ . De petites variations d'intensité d'ions existent entre les stéréo-isomères, mais elles ne sont pas suffisantes pour permettre leur identification avec certitude.

### e) Alditol-acétates partiellement méthylés

#### **(1) Formation et utilisation de ces dérivés**

Cette technique est très utilisée en raison du grand nombre d'indications que l'on peut obtenir par l'analyse des fragments primaires de la chaîne alditol par impact électronique. Toutefois, il semble que cette méthode ne soit pas recommandée pour l'analyse quantitative des hexosamines. En effet, elles sont, soit absorbées, soit dégradées durant leur passage dans la colonne de chromatographie, et cela quel que soit le type de colonne utilisé (Funakoshi I. et coll., 1980). Lors d'études récentes, ces problèmes ont été partiellement résolus par l'utilisation de colonnes capillaires (Anumula K. R. et coll., 1992).

Quelles que soient les méthodes utilisées, le protocole se fait en quatre étapes. Cela commence par une per-méthylation des groupements hydroxyles libres du glycanne, puis les glycosides partiellement méthyl-éthérifiés sont libérés par hydrolyse, faisant apparaître de nouveaux hydroxyles libres au niveau des points de liaisons de chaque glycoside. Les glycosides sont alors réduits par le borohydrure de sodium pour former des polyols partiellement méthylés. Enfin, ces derniers sont acétylés pour protéger les hydroxyles libres au niveau des points de liaisons.

Il est à noter que la libération des N-acétyl-hexosamines partiellement méthylées conduit à la N-désacétylation de la fonction amide. Ceci n'est pas un inconvénient puisque il y aura ré-

acétylation de la fonction amine lors de la deuxième dérivation. Ce type de technique a permis de déterminer les liaisons qui existent entre des oses aminés (Stellner K. et coll., 1973).

## (2) La spectrométrie de masse

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, la plupart des études ont été faites par des expériences de deutération (Bjorndal H. et coll., 1970). Des petites différences d'intensité d'ions sont visibles sur les spectres de stéréo-isomères, mais elles sont peu significatives. Aucun ion moléculaire n'est visible sur ce type de spectre. Les fragments primaires sont formés par coupure en  $\alpha$  entre deux carbones, ce que nous avons déjà décrit pour les alditols acétates. L'intensité de ces fragments primaires décroît avec l'augmentation de la masse moléculaire. Tout l'intérêt de cette méthode provient d'un comportement de rupture variable en fonction des groupements présents sur les carbones de la chaîne centrale. En effet, la rupture est possible entre un groupement acétyle et un groupement méthoxy, entre deux groupements acétyles et entre deux groupements méthoxys. En revanche, la charge sera majoritairement portée par le fragment comportant un groupement méthoxy. Ainsi, on peut définir quatre types de fissions : a, b, c et d (figure 10).

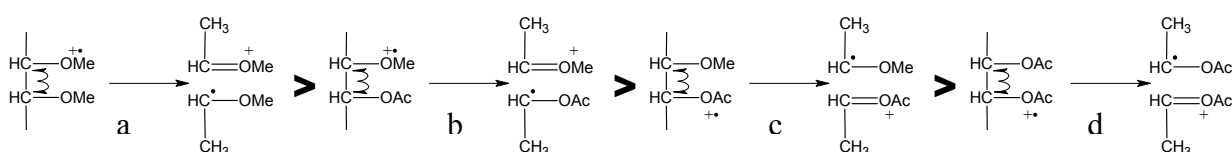


Figure 10: différentes fragmentations en  $\alpha$  envisageables pour les alditol-acétates partiellement méthylés

Les ruptures de types a et b sont largement prépondérantes sur les c et d. La rupture de type a étant plus facile que celle de type b, avec comme seule exception, le cas des 1,2-di-O-méthyl-alditol-acétates, pour lesquels, le fragment à  $m/z$  89 prédomine sur celui à  $m/z$  45 grâce à sa stabilisation par résonance (figure 11).

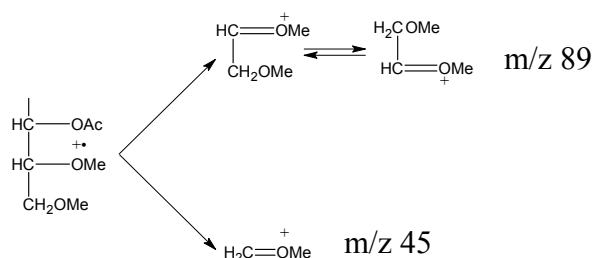


Figure 11: prédominance de l'ion b sur le a dans le cas des 1,2-di-O-méthyl-alditol-acétates

L'ion méthoxylate formé en b est beaucoup plus stable que l'acétyle formé en c, ce qui fait qu'il est très favorisé. Quant à l'ion d, il est inexistant.

Dans le cas des déoxy-aditols, une rupture significative a lieu entre le méthylène et le carbone portant la fonction méthoxy.

En ce qui concerne les hexosamines, les groupements acétamido et N-méthyl-acétamido provoquent la rupture de la liaison entre le carbone les supportant et un autre portant un groupement méthoxy ou acétyle. Cela donne, pour les dérivés N-méthyl-acétamido, des ions caractéristiques de cette famille (à m/z 158, 116, 98 et 74), ce qui permet de les discriminer très facilement d'un mélange de sucres (Stellner K. et coll., 1973; Schwarzmann G. O. H. et coll., 1974; Tai T. et coll., 1975).

Les fragments secondaires se forment à partir des fragments primaires par éliminations successives de formaldéhyde (30 u), de méthanol (32 u), de cétène (42 u), d'acide acétique (60 u), d'acétate de méthyle (m/z 74), d'acétate de méthoxy-méthyle (104 u) ou d'acétate d'acéto-méthyle (132 u).

## **2) Les autres formes de dérivés de sucres réduits**

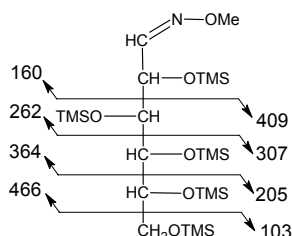
Certains auteurs pensent que l'utilisation des polyols est intéressante pour diminuer le nombre de pics sur les chromatogrammes. En effet, ce type de dérivés étant linéaire, cela permet de s'affranchir du problème de l'anométrie des sucres. Par contre, ils posent un problème en raison de la symétrie des dérivés qui ne permet pas de déterminer si un ion provient de la partie comportant le carbone C<sub>1</sub> ou C<sub>6</sub> (pour les hexoses). Bien sur, l'utilisation du borodeutérure de sodium, permet de réduire le groupement aldéhyde afin de distinguer le C<sub>1</sub>, grâce au marquage au deutérium. Mais cette technique est parfois contraignante et ajoute des étapes supplémentaires au protocole de dérivation. C'est pourquoi, d'autres méthodes de dérivation des sucres sous forme linéaire ont été développées en remplaçant l'étape de réduction.

### **a) Les O-méthyl-oximes**

Ce type de dérivés augmente la volatilité des sucres analysés par rapport aux alditols et leur dérivation sous forme d'éther de TMS les rend parfaitement adaptés à l'analyse par GC (Laine R. A. et coll., 1971). La formation des dérivés se fait sur les glycosides en y ajoutant 1 mg de méthoxylamine-HCl solide par mg de glycoside dans 50 µl de pyridine anhydre pendant 2 h à 80°C. Ce type de dérivés donne deux pics chromatographiques par sucre en raison des deux formes *syn* et *anti*, un majoritaire et un minoritaire qui peuvent être bien différenciés, légèrement entrelacés, ou ne donner qu'un seul pic.

Les spectres de masse sont facilement analysables et, encore une fois, la fragmentation de ce type de dérivés est caractéristique des chaînes de polyols. On retrouve donc le type de fragmentation des méthyl-éthers d'alditols (figure 12).

L'ion moléculaire est parfois visible bien que souvent, on ne voit que l'ion  $[M-15]^+$  qui produit un ion secondaire  $[M-105]^+$  par perte d'un triméthyl-silanol.



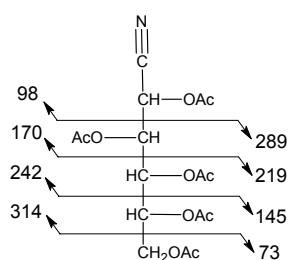
**Figure 12: fragmentations primaires des dérivés O-méthyl-oximes des hexoses**

Ces mêmes dérivés peuvent être utilisés pour l'analyse des points de branchement des sucres par une double dérivation identique, dans le principe, à celle des alditol-acétates partiellement méthylés. Il faut pour cela faire une per-méthylation du glycane, puis, une hydrolyse pour libérer des glycosides partiellement méthylés, avant d'ouvrir le cycle et former des méthyl-oximes de glycosides partiellement méthylés. Enfin, il faut faire une triméthyl-silylation des hydroxyles correspondant aux points de branchement (Laine R. A. et coll., 1973).

Nous ferons remarquer que d'autres formes d'oximes ont été développées, notamment les O-benzyl-oximes. Celles-ci sont très proches des O-méthyl-oximes et donnent de bons résultats lorsqu'elles sont, soit triméthyl-silylées, soit trifluoro-acétylées (Andrew M. A., 1989). Dans sa revue, Andrew considère ces dérivés comme les meilleurs outils utilisables en GC-MS pour l'analyse de l'ensemble des composés glycaniques.

## **b) Les aldonitriles acétates**

Ce type de dérivés est intéressant pour l'analyse par GC (Varma R. et coll., 1973). Encore une fois, les spectres de masse sont caractéristiques et faciles à interpréter (Dmitriev B. A. et coll., 1971). L'ion moléculaire n'est pas visible, par contre, les fragments primaires suivent la chaîne centrale (figure 13).



**Figure 13: fragmentations primaires des dérivés aldonitriles acétates des hexoses**

Les ions secondaires sont formés par éliminations successives d'acide acétique ( $m/z$  60) ou de cétène ( $m/z$  42).

Il est à noter qu'une équipe (Dmitriev B. A. et coll., 1971) a développé des aldonitriles acétates partiellement méthylés et que leur comportement en ce qui concerne la spectrométrie de masse est tout à fait comparable à celui des alditol-acétates partiellement méthylés.

# GC-MS DES ACIDES SIALIQUES

## **I. Introduction**

Les rôles des acides sialiques à la surface des membranes biologiques ont fait l'objet de nombreuses études (Traving C. et Schauer R., 1998; Schauer R. et coll., 2001; Malykh Y. N. et coll., 2001; Angata T. et coll., 2002). Ceci a nécessité le développement de différentes techniques analytiques les concernant. Parmi elles, on retrouve jusqu'en 1972 des techniques de chromatographie sur papier, de chromatographie en couche mince et d'électrophorèse sur papier. Pour accompagner ces techniques, de nombreuses méthodes colorimétriques furent développées (Schauer R., 1978). La détection des acides sialiques par un réactif à l'orcinol et  $\text{Fe}^{3+}$  (réactif de Bial) ou au résorcinol et  $\text{Cu}^{2+}$  dissout dans de l'acide chlorhydrique concentré donne une coloration violette. Cette coloration est efficace et reproductible avec les acides sialiques libres, les dérivés  $\beta$ -O-méthyl-glycosides d'acides sialiques et ceux liés à une chaîne glycanique. La sensibilité de cette technique permet de déterminer une quantité de 2 à 3  $\mu\text{g}$  d'acides sialiques. Toutefois, la spécificité n'est pas absolue car d'autres monosaccharides peuvent interférer avec le test, notamment certains pentoses, hexoses et acides uroniques. Une autre coloration du même type fait intervenir du résorcinol dans de l'acide chlorhydrique en présence de  $\text{CaSO}_4$  (Svennerholm L., 1957). Selon la revue de Schauer (1978), pour obtenir une meilleure sensibilité (0,5  $\mu\text{g}$ ), la technique de Warren L. (1959) utilise l'acide périodique et l'acide thiobarbiturique. Il s'agit d'une méthode spécifique et sensible de détermination des acides sialiques libérés par hydrolyse acide douce ou par l'utilisation de neuraminidases. Elle ne fonctionne pas avec les O-méthyl-glycosides d'acides sialiques ni avec les acides 2-désoxy-2,3-dehydro-N-acétyl-neuraminiques. Cette technique transforme les acides sialiques en un chromophore de couleur rouge ayant une absorbance maximale à 549 nm.

D'autres méthodes plus récentes comme la résonance magnétique nucléaire ont été utilisées. Une autre technique, actuellement très utilisée (Hara S. et coll., 1989), implique la dérivation des acides sialiques par le 1,2-diamino-4,5-méthylène-dioxy-benzène (DMB) formant des quinoxalines avant leur analyse par HPLC en phase inverse et détection par fluorescence. Dernièrement, le couplage à la spectrométrie de masse de type FAB a permis d'améliorer très fortement la sensibilité ainsi que l'identification de ces dérivés (Klein et coll., 1997).

Toutefois, c'est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse qui est devenue l'outil principal de la détermination de la structure des acides sialiques. Pourtant, les acides sialiques sont sans aucun doute les sucres les plus compliqués à analyser, car d'un point de vue chimique, se sont des monosaccharides à neuf carbones comportant plusieurs groupes fonctionnels de natures différentes. Chacun de ces groupes doit être pris en compte lors de la mise au point d'une technique de dérivation afin que les dérivés soient suffisamment volatils et thermostables pour l'analyse en GC. Il faut discerner la fonction acide carboxylique comportant le carbone 1, la fonction amine libre sur le carbone 5 qui peut-être acétylée, glycolylée ou remplacée par un hydroxyle (KDN). Enfin, il y a des groupes hydroxyles aux niveaux de réactivité différents. En outre, un ou plusieurs de ces hydroxyles peuvent être acylés, lactylés, méthylés, phosphatés ou sulfatés. Ces particularités font que cette famille de composés est actuellement connue pour contenir plus d'une soixantaine de membre (Traving C. et Schauer R., 1998; Schauer R. et coll., 2001; Malykh Y. N. et coll., 2001; Angata T. et coll., 2002). Le plus souvent, les dérivations utilisées pour protéger ces différents groupes sont une méthyl-estérification de la fonction acide, une éthérification des hydroxyles libres par un groupement triméthyl-silyle ou méthyle ou bien une estérification par un groupement acétyle.

Il existe deux formes anomériques pour chaque acide sialique libre, bien que dans l'eau ils existent de façon prédominante sous la forme  $\beta$ . Il en est de même pour les méthyl-glycosides de méthyl-ester d'acides sialiques obtenus après méthanolyse acide. Par contre, dans les glycoconjugués, les acides sialiques, qui occupent en général la position terminale de la chaîne glucidique, sont couplés par une liaison glycosidique de type  $\alpha$ .

Comme pour toutes les autres familles de sucres, c'est la dérivation par les TMS qui a été largement la plus utilisée. Plusieurs variantes ont été décrites: (1) la triméthyl-silylation de méthyl-ester d'acides sialiques (Sweeley C. C. et coll., 1963; Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a; Schauer R. et coll., 1976) et (2) la triméthyl-silylation de méthyl-ester de méthyl-glycosides d'acides sialiques (Sweeley C. C. et coll., 1964; Clamp J. R. et coll., 1967; Yu R. K. et coll., 1970; Chambers R. E. et coll., 1971; Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975b; Casals-Stenzel J. et coll., 1975; Mononen I. et coll., 1975). Deux autres méthodes que nous ne développerons pas dans ce travail, sont: (3) la per-triméthyl-silylation d'acides sialiques (Craven D. A. et coll., 1968; Casals-Stenzel J. et coll., 1975; Robotz J. et coll., 1978) et (4) la triméthyl-silylation de méthyl-ester de méthyl-glycosides d'acides sialiques désaminés (Mononen I., 1981).



Bien sur, d'autres types de dérivés ont également été utilisés. Ce sont les trifluoroacétates de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques (Zanetta J. P. et coll., 1972; Pritchard D. G. et coll., 1978); les per-méthyl-glycosides de méthyl-ester d'acides sialiques (Bhattacharjee A. K. et coll., 1976; Rauvala H. et coll., 1977; Van Halbeek H. et coll., 1978; Inoue S. et coll., 1979; Bruvier C. et coll., 1981); les per-acétates de méthyl-ester de méthyl-glycosides d'acides sialiques (Kochetkov N. K. et coll., 1973); ou bien encore, des dérivés produits à partir de méthodes hybrides faisant intervenir deux types de dérivations. La première consiste en une méthylation avant libération des acides sialiques suivie par une seconde dérivatisation de type acétylation ou triméthyl-silylation. Ceci permettant de déterminer l'emplacement des liaisons reliant l'acide sialique à une chaîne polysaccharidique (Haverkamp J. et coll., 1977; Brunier C. et coll., 1981) mais surtout les différents types de radicaux présents sur les acides sialiques.

## **II. Libération des acides sialiques**

Comme tous les autres sucres, les acides sialiques peuvent être libérés des chaînes glycaniques par méthanolyse, par hydrolyse ou par coupure enzymatique. Dans les deux premiers cas, cela doit se faire dans des conditions beaucoup plus douces que pour les autres glycosides.

### **A. La méthanolyse acide**

Pour la méthanolyse acide, le méthanol-HCl anhydre utilisé pour la libération des O-méthyl-glycosides d'acides sialiques a, en général, une normalité comprise entre 0,5 et 1 N. La réaction a lieu pendant 16 à 24 h à une température de 80 ou 85°C (Chambers R. E. et coll., 1971; Zanetta J. P. et coll., 1972; Kamerling J. P. et Coll. 1975b).

Comme nous l'avons déjà signifié dans le chapitre sur l'analyse des sucres neutres et aminés, cette méthode a l'avantage d'avoir un bon rendement de coupure, quelle que soit la liaison en question (à part quelques exceptions) et surtout, de ne pas détruire les méthyl-glycosides ainsi libérés si le milieu est bien anhydre. Un autre avantage pour l'analyse des acides sialiques consiste en une méthyl-estérification de la fonction acide du carbone 1, ce qui protège ce radical. De plus, la méthanolyse des acides sialiques donne presque exclusivement des dérivés  $\beta$ -O-méthyl-glycosides d'acides sialiques et seul un très faible pourcentage de forme  $\alpha$  est obtenu. Cela a pour effet de ne donner qu'un seul pic chromatographique par acide sialique. En revanche, un inconvénient majeur est que la méthanolyse engendre une quasi complète dé-N,O-acylation des composés à analyser. Ainsi, tous les composés de la famille des acides 5-

N-acétyl-neuraminiques se trouvent transformés en acide neuraminique, car la méthanolyse détruit toutes sortes de radicaux présents sur les fonctions hydroxyles des carbones 4, 7, 8 et 9 ou amine du carbone 5. Cela est vrai pour les radicaux acétyles, lactyles et sulfate. Curieusement, la dé-N-acylation n'existerait pas dans le cas des acides 5-N-glycolyl-neuraminiques en position terminale d'une chaîne glycanique, alors qu'une large proportion de ces composés, placée en position intermédiaire, subie une dé-N-glycolylation (Inoue S. et coll., 1979). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le groupe hydroxyle libre en position C<sub>8</sub>, apparu au cours de la méthanolyse, est responsable de la dégradation du groupement glycolyle. En effet, sur un plan spatial, l'atome d'oxygène du C<sub>8</sub> se trouve très proche de la fonction amide et pourrait se comporter comme un agent nucléophile en attaquant cette dernière. Cela formerait un cycle dont la rupture, sous l'action de la méthanolyse, donnerait une fonction amine primaire au niveau du C<sub>5</sub>.

Ces raisons font qu'un très grand nombre d'acides sialiques différents ne sortent, en chromatographie de phase gazeuse après méthanolyse, que sous la forme de cinq pics. Un pic regroupant l'ensemble des composés de la famille de l'acide neuraminique et de l'acide 5-N-acétyl-neuraminique, un autre, regroupant l'ensemble des composés de la famille de l'acide 5-N-glycolyl-neuraminique, un, rassemblant tous les KDN, un pour les 8-méthyl et enfin, un dernier pour les KDO. Bien sûr, ceci n'est pas suffisant pour une analyse fine de la structure des acides sialiques. Cette méthode de libération des acides sialiques doit donc être réservée à la détermination quantitative du pool total d'acides sialiques d'un milieu (Schauer R., 1978).

Pour contrecarrer la dé-acétylation de la fonction amine, de nombreux auteurs préconisent une étape de ré-N-acétylation des méthyl-ester de méthyl-glycosides avant d'entamer le processus de dérivation (Chambers R. E. et coll., 1971; Kamerling J. P. et Coll. 1975b). Cette ré-acétylation est précédée par la neutralisation du milieu par le carbonate d'argent, dont il faut se débarrasser par des étapes successives de centrifugation et d'extraction, qui compliquent le protocole et favorisent les erreurs analytiques. Par ailleurs, dans le cas de la présence d'acide neuraminique, cette ré-acétylation transforme ce composé en acide 5-N-acétyl-neuraminique, le rendant ainsi invisible à l'analyse. Un autre inconvénient provient du fait de l'utilisation de l'anhydride acétique qui est employé pour ré-acétyler la fonction amine du carbone 5. Si une trop grande quantité est utilisée, des O-acétylations parasites supplémentaires sont possibles, notamment sur l'hydroxyle porté par le carbone 9 (Kamerling J. P. et coll., 1975b).

En raison de ces dé-acylations, une attention toute particulière a été portée à la protection des groupements N- et O-acyles, par certains auteurs (Yu R. K. et coll., 1970). Ils proposent une méthanolyse acide encore plus douce que les auteurs déjà précités, par l'utilisation de

méthanol-HCl anhydre à 0,05 N durant 1 h à 80°C. Cela est supposé ne conduire qu'à un faible degré de N-dé-acétylation. En revanche, dans le cas des O-acylations, il semblerait que même une normalité de 0,02 N suffise à les couper (Casals-Stenzel J. et coll., 1975). Cette technique a donc été peu utilisée, d'autant plus qu'à cette normalité, la libération des méthylglycosides de méthyl-ester d'acides sialiques N-acétylés n'est absolument pas complète (Rauvala H. et Coll. 1977).

## **B.L'hydrolyse ménagée**

En ce qui concerne l'analyse des acides sialiques placés en position terminale des chaînes oligosaccharidiques, et comme nous en reparlerons de façon plus précise lors de la partie réservée aux résultats, le salut provient de l'utilisation d'hydrolyses douces qui libèrent ces composés avec un bon rendement. Selon les auteurs, ces hydrolyses font intervenir différents types d'acides:

(1) De l'acide chlorhydrique à 0,1 N (50 min à 80°C), sachant que la durée de réaction doit être poussée à 1 h pour l'analyse de gangliosides. Cependant, il semble qu'environ 20% des acides sialiques soient décomposés en utilisant cette technique et que des groupements O-acyles soient décrochés (Schauer R., 1978). Pour éviter cela, on peut baisser la normalité de l'acide à 0,05 N, 1 h 30 à 80°C (Craven D. A. et coll., 1968), voire à 0,01 N, 1 h à 70°C (Buscher H. P. et coll., 1974; Schauer R., 1978), mais cela entraîne une diminution du rendement de l'hydrolyse.

(2) Il est aussi possible de remplacer l'acide chlorhydrique par de l'acide sulfurique mais les résultats obtenus sont tout à fait comparables.

(3) D'autres techniques font intervenir de l'acide formique (pH = 2-2,5; 1 h à 70°C) (Schauer R. et coll., 1976) ou de l'acide acétique dans des conditions proches. Il est maintenant reconnu qu'aucun de ces deux acides n'entraîne de dé-N-acétylation. Cependant, selon certains, ils ne permettraient qu'une libération incomplète des acides sialiques avoisinant un taux de 70 à 80% (Schauer R., 1978). Il faut aussi noter qu'une étude a révélée un taux d'au moins 50% de dé-O-acylation (Buscher H. P. et coll., 1974). Les résultats de ce travail ont été cités dans des revues (Schauer R., 1978 et Kamerling J. P. et coll., 1982), selon lesquelles, ces chiffres sont acceptables pour des analyses qualitatives à partir de matériel biologique, mais ils sont limités pour des analyses quantitatives. Toutefois, nous ferons remarquer que de tels résultats n'ont pas à nouveau été confirmés par d'autres études. C'est pourquoi, l'hydrolyse douce reste actuellement une des méthodes les plus utilisées pour la libération des acides sialiques.

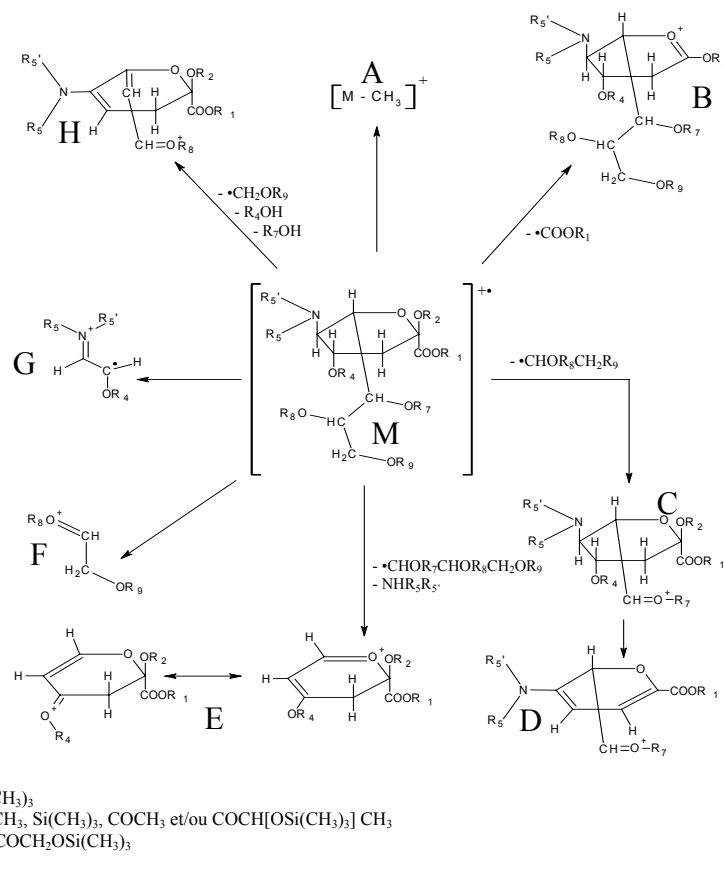
Un autre inconvénient de l'hydrolyse douce est que cette technique ne permet pas la méthylation de la fonction acide du carbone 1. Pour obtenir cette dérivation, la méthode la plus couramment utilisée consiste à solubiliser les acides sialiques libérés dans du méthanol anhydre, avant d'y ajouter un même volume de diazométhane solubilisé dans l'éther, jusqu'à obtention d'une légère coloration jaune du liquide réactionnel (Kamerling J. P. et coll., 1975a).

### **C. Les neuraminidases**

L'hydrolyse enzymatique peut aussi être envisagée, les deux neuraminidases les plus utilisées provenant de *Vibrio cholerae* et *Clostridium perfringens*. Les digestions enzymatiques se font dans des tampons acétates avec 5 à 10 mU de neuraminidases pour 1 à 10 mg de sialoglycoconjugués à une température de 37°C et pendant une durée de 30 min à 24 h. Ces deux neuraminidases ont l'avantage d'avoir une spécificité d'action très large et permettent l'analyse de glycoconjugués hydrophiles (glycoprotéines) et amphiphiles (gangliosides). Par contre, elles sont inefficaces pour l'hydrolyse de l'acide 4-O-acétyl-N-acétyl-neuraminique et les autres types d'acides sialiques comportant des O-acétylations sont libérés avec un rendement réduit (Schauer R., 1978). D'autres neuraminidases provenant de virus ou d'autres bactéries ont aussi été utilisées, ainsi que des enzymes provenant de tissus cérébraux pour l'analyse spécifique d'acides sialiques de gangliosides (Schauer R., 1978). Si l'hydrolyse enzymatique est très efficace, cette méthode a l'inconvénient de nécessiter une étape de purification des acides sialiques libérés pour se débarrasser des enzymes présentes dans le milieu qui pourraient gêner l'analyse (Casals-Stenzel J. et coll., 1975).

### **III. La spectrométrie de masse**

Pour l'analyse structurale des acides sialiques, le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse est quasiment indispensable. Par des études poussées des spectres de masse de dérivés triméthyl-silyles de Neu5Ac et Neu5Gc, un schéma de fragmentation a été déterminé (Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a) (figure 14). Malgré quelques variantes, ce schéma reste valable quelle que soit la méthode de dérivation utilisée (TMS, acétylation ou méthylation). Huit types de fragmentations ont été définis, amenant à la formation d'ions désignés de A à H selon le type de dérivation. Ils sont plus ou moins prédominants dans les spectres et fournissent des informations nécessaires à une résolution complète de la structure des acides sialiques.



**Figure 14: schéma de fragmentation des dérivés triméthyl-silylés d'acides sialiques**

La nomenclature utilisée par Kamerling, bien qu'elle utilise les mêmes lettres pour dénommer les ions, est différente de celle définie par Kochetkov et Chizhov pour l'analyse des O-méthylglycosides per-méthylés.

En règle générale, les fragments A et B donnent des indications sur la masse moléculaire de l'acide sialique et donc sur le nombre et le type de substituants. Les fragments de C à H contiennent des informations concernant la position des différents substituants.

Bien sûr, d'autres mécanismes supplémentaires de fragmentation sont observables mais ils n'ont pas un intérêt considérable pour la détermination de la structure de l'acide sialique.

## **IV. Les différents types de dérivés analysables en GC-MS**

### **A. Les dérivés triméthyl-silylés**

Comme nous l'avons déjà suggéré au début de ce chapitre, différents protocoles utilisant la dérivation par les groupements triméthyl-silyles ont été développés. Ils diffèrent essentiellement par la méthode utilisée pour la libération des acides sialiques de leur substrat

naturel. Ces différences font que la fonction acide carboxylique du carbone 1 sera, ou non, méthyl-estérifiée et que l'hydroxyle fixé sur le carbone 2 sera, ou non, dérivé.

De nombreux produits silylants ont été utilisés pour dériver les acides sialiques: le triméthyl-chlorosilane (TMCS), l'hexaméthyl-disilazane (HMDS), le N-O-bis-triméthyl-silyl-acétamide (BSA), le bis-triméthyl-silyl-trifluoroacétamide (BSTFA), le N-triméthyl-silyl-diéthylamine (TMSDEA) et le N-triméthyl-silylimidazole (TMSI). Mais il semble que deux techniques ressortent des nombreuses études sur le sujet. Il s'agit de l'utilisation du HMDS avec le TMCS dans de la pyridine (Kamerling J. P. et coll., 1975a; Mononen I. et coll., 1975; Casals-Stenzel J. et coll., 1975) et du TMSI (Casals-Stenzel J. et coll., 1975).

### **1) Les dérivés triméthyl-silylés de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques**

Cette méthode n'est en fait pas particulièrement adaptée aux acides sialiques. Il s'agit de la technique déjà décrite dans le chapitre dévolu aux sucres neutres (Chambers R. E. et coll., 1971), appliquée à l'analyse des acides sialiques (Sweeley C. C. et coll., 1964; Clamp J. R. et coll., 1967; Yu R. K. et coll., 1970; Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975b; Mononen I. et coll., 1975; Casals-Stenzel J. et coll., 1975). Elle consiste en une méthanolyse acide, à une normalité, une température et en des temps variables selon les auteurs. Les acides sialiques sont dé-N- et dé-O-acétylés, après neutralisation, centrifugation et rinçage des composés, il y a donc nécessité de ré-N-acétyler la fonction amine du carbone 5, avant de faire la dérivation aux TMS. Cette technique a donc tous les inconvénients précités pour l'analyse qualitative des acides sialiques. Par contre, elle est parfaitement adaptée à une analyse quantitative globale des acides sialiques par rapport aux autres sucres, puisqu'elle permet d'obtenir un chromatogramme contenant tous les sucres.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, la fragmentation suit le schéma caractéristique des acides sialiques (Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a):

- La perte d'un groupement méthyle donnant le fragment A provient de façon prédominante d'un substituant triméthyl-silyle, mais aussi, de la fonction amine du carbone 5 (Van Halbeek et coll., 1978).
- Le fragment B est dû à la perte de la fonction méthyl-ester du carbone 1.
- Le fragment C, portant la charge au niveau du groupement attaché au carbone 7, résulte de l'élimination d'une partie de l'acide sialique contenant les carbones 8 et 9.

- Le fragment D, quant à lui, se forme à partir du fragment C par l'élimination consécutive des groupements  $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$  provenant du carbone 4 et  $\text{CH}_3\text{OH}$  provenant du carbone 2.
- Le fragment E provient de l'élimination de toute la chaîne comportant les carbones 7, 8 et 9 ainsi que du groupement présent sur le carbone 5 après réarrangement d'un hydrogène.
- Le fragment F contient les carbones 8 et 9, il provient du même mécanisme de coupure donnant le fragment C, la différence étant due à la localisation de la charge.
- Le fragment G provient de double rupture du cycle libérant une partie contenant les carbones 4 et 5. Cet ion est primordial pour déterminer si l'on a affaire un acide sialique de la famille des 5-N-acétyles ou des 5-N-glycolyles.
- Enfin, le fragment H est formé par l'élimination du carbone 9 et du groupement qui y est fixé, accompagné de la perte des groupements  $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$  qui étaient fixés sur les carbones 4 et 7.

## **2) Dérivés triméthyl-silylés de méthyl-ester d'acides sialiques**

Dans ce cas, les acides sialiques sont libérés par une hydrolyse douce ou par l'utilisation de neuraminidases. La fonction acide carboxylique n'est donc pas méthyl-estérifiée, et il n'y a pas (ou peu) de dé-N- et dé-O-acétylation (Sweeley C. C. et coll., 1963; Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a; Schauer R. et coll., 1976). Il est donc nécessaire de méthyl-estérifier la fonction carboxylique par le diazométhane, alors que la fonction amine du carbone 5 se trouvera silylée après la dérivation aux TMS. Ainsi, cette technique est beaucoup plus respectueuse de la structure des acides sialiques et permet une analyse qualitative de ces derniers.

Cette technique a confirmé l'existence de nombreux nouveaux acides sialiques pendant la fin des années 70, tel que l'acide 2-désoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminique (Kamerling J. P. et coll., 1975c) et l'acide 5-N-acétyl-9-O-lactylneuraminique (Schauer R R. Et coll., 1976).

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, par rapport à la méthode précédente, il est évident que le remplacement d'un groupement O-triméthyl-silyle par un O-acétyle entraîne une décroissance de la masse moléculaire des ions de 30 u. Pour deux groupes O-acétyles, la diminution est de 60 u, etc. D'un même point de vue, la présence d'un groupement O-lactyle triméthyl-silylé sur le carbone 9 à la place d'un groupement O-triméthyl-silyle augmente la masse des ions de 72 u et le remplacement d'un groupement N-acétyle par un groupement N-glycolyle triméthyl-silylé montre une augmentation de la masse de 88 u. Enfin, la présence

d'un groupement méthoxy diminue la masse moléculaire de 58 u. Ainsi, il est très aisé de déterminer à quelle famille d'acide sialique appartient le composé étudié.

Pour les huit séries d'ions:

- La perte d'un groupement méthyle donnant le fragment A provient principalement d'un substituant triméthyl-silyle plutôt que d'un groupement acétyle.
- Le fragment B est dû à la perte de la fonction méthyl-ester contenant le carbone 1.
- Le fragment C résulte de l'élimination d'une partie de l'acide sialique contenant les carbones 8 et 9. Ce mécanisme entraîne l'apparition d'une charge au niveau du groupement attaché au carbone 7. L'ion ainsi formé est très important pour la détermination de la position des groupements acétyles qui peuvent être présents sur les carbones 7, 8 et 9. Comme il a déjà été montré avec les dérivés partiellement méthylés d'alditols acétates, la charge est préférentiellement localisée sur l'oxygène d'un éther plutôt que sur celui d'un ester. C'est pourquoi, la coupure a lieu entre deux atomes de carbone portant des groupements triméthyl-silyles ou méthoxy ou entre deux atomes de carbone portant, l'un, un groupement acétyle et l'autre, un groupement triméthyl-silyle ou méthoxy avec la charge localisée du côté du carbone portant le groupement éther (triméthyl-silyle ou méthoxy). En revanche, il est très rare qu'une coupure ait lieu entre deux atomes de carbone acétylés. De cette façon, le fragment C n'aura une abondance significative que si le carbone 7 porte un groupement triméthyl-silyle ou méthoxy. Dans le cas où le carbone 7 porte un groupement ester (7-O-acétyle), l'ion C est absent ou très difficilement observable.
- Le fragment D se forme à partir du fragment C par l'élimination consécutive des groupements  $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$  provenant du carbone 2 et  $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$  ou  $\text{HOCOCH}_3$  provenant du carbone 4, selon le fait qu'il était acétylé ou non. Il est évident que l'existence de ce fragment dépend de la présence du fragment C.
- Le fragment E provient de l'élimination de toute la chaîne comportant les carbones 7, 8 et 9 ainsi que du groupement présent sur le carbone 5. Ce fragment n'est pas observé lorsqu'un groupement O-acétyle est présent sur le carbone 4, car le réarrangement d'un hydrogène, amenant à la formation de cet ion, n'est pas favorisé lorsque le substituant du carbone 4 est un ester plutôt qu'un éther.
- Le fragment F contient les carbones 8 et 9, il provient du même mécanisme de coupure donnant le fragment C, la différence étant due à la localisation de la charge. Cet ion n'existe donc pas si le carbone 8 est dérivé par un groupement ester.



- Le fragment G provient d'une double rupture du cycle libérant une partie contenant les carbones 4 et 5. Cet ion est primordial pour déterminer si l'on a à faire à un acide sialique de la famille des 5-N-acétyles ou des 5-N-glycolyles. En outre, l'existence d'un groupement O-acétyle plutôt qu'un groupement O-triméthyl-silyle au niveau du carbone 4 (Neu4,5Ac2, Neu4,5, 9Ac3, etc.) donne un ion G avec une masse moléculaire plus faible de 30 u.
- Enfin, le fragment H est formé par l'élimination du carbone 9 et du groupement qui y est fixé, accompagné par la perte consécutive des groupements HOSI(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ou HOCOCH<sub>3</sub> provenant des carbones 4 et 7. C'est ce fragment qui permet de déterminer si les carbones 8 et 9 sont acétylés (voir, méthylé ou sulfaté pour le carbone 8 et lactylé ou phosphaté pour le carbone 9).

## **B.Dérivés acétylés de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques**

Dans ce cas, les acides sialiques doivent être libérés par méthanolyse afin de former des méthyl-ester de méthyl-glycosides. Puis, la per-acétylation est obtenue par chauffage dans un milieu réactionnel composé de pyridine et d'anhydride acétique (1/1 v/v). Encore une fois, on retrouve les inconvénients de la méthanolyse pour l'analyse des acides sialiques, c'est à dire la perte de tous les radicaux acyles, dont la N-acétylation. Certains auteurs (Kochetkov N. K. et coll. 1973) préfèrent les dérivés acétylés aux TMS, car ils sont plus simples à produire, sont plus stables et la ré-N-acétylation se fait en même temps que la dérivation.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse:

- La perte d'un groupement méthyle donnant le fragment A provient de la fonction amine du carbone 5.
- Le fragment B est dû à la perte de la fonction méthyl-ester de masse m/z 59 du carbone 1. Il peut aussi provenir de la perte d'un groupement OCOCH<sub>3</sub> provenant de n'importe quel hydroxyle dérivé ou de la perte d'un groupement NH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub> du carbone 5. Cette multiplicité de possibilités explique que les dérivés per-acétylés ont un ion B plus abondant que les autres.
- Le fragment C résulte de l'élimination d'une partie de l'acide sialique contenant les carbones 8 et 9. Ce mécanisme entraîne l'apparition d'une charge au niveau du groupement attaché au carbone 7. L'ion ainsi formé est très important pour la détermination de la position d'un groupement méthyle qui peut-être présent sur le carbone 8. Comme il a déjà été montré avec les dérivés partiellement méthylés d'alditols acétates, la charge est préférentiellement localisée sur l'oxygène d'un éther, plutôt que sur celui d'un ester. C'est pourquoi, la coupure à

lieu entre deux atomes de carbone portant, l'un, un groupement acétyle et l'autre, un groupement méthoxy avec la charge localisée du côté du carbone portant le groupement méthoxy. Il est par contre très rare qu'une coupure ait lieu entre deux atomes de carbone acétylés. De cette façon, le fragment C n'est quasiment pas visible car le carbone 7 porte un groupement acétyle. Par contre, la présence possible d'un groupement méthoxy sur le carbone 8 favorisera la formation d'un ion de type F.

- Le fragment D, quant à lui, se forme à partir du fragment C par l'élimination consécutive des groupements HOCH<sub>3</sub> provenant du carbone 2 et HOCOCH<sub>3</sub> provenant du carbone 4. Il est évident que l'existence de ce fragment dépend de la présence du fragment C.

- Le fragment E provient de l'élimination de toute la chaîne comportant les carbones 7, 8 et 9 ainsi que du groupement présent sur le carbone 5. Cet ion est donc rare, puisque ce type de fragmentation n'est pas observé lorsqu'un groupement O-acétyle est présent sur le carbone 4. En effet, le réarrangement d'un hydrogène, amenant à la formation de cet ion, n'est pas favorisé lorsque le substituant du carbone 4 est un ester plutôt qu'un éther.

- Le fragment F contient les carbones 8 et 9, il provient du même mécanisme de coupure donnant le fragment C, la différence étant due à la localisation de la charge. Cet ion n'existe donc pas si le carbone 8 est dérivé par un groupement ester, il n'est donc visible que si le carbone 8 est O-méthylé.

- Le fragment G provient de la double rupture du cycle libérant un fragment contenant les carbones 4 et 5. Cet ion est primordial pour déterminer s'il appartenait à un acide sialique de la famille des 5-N-acétyles ou des 5-N-glycolyles.

- Enfin, le fragment H est formé par l'élimination du carbone 9 et du groupement qui y est fixé, accompagné de la perte des groupements HOCOCH<sub>3</sub> provenant des carbones 4 et 7. Ce fragment permet de déterminer si le carbone 9 est acétylé ou phosphaté (Dans la mesure où le groupement phosphate aurait résisté à la méthanolyse) et si le carbone 8 est acétylé ou méthylé.

### **C. Dérivés méthylés de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides sialiques**

La préparation de per-méthyl-glycosides d'acides sialiques implique la libération de ces composés. Pour cela, il y a la méthanolyse acide avec tous les inconvénients déjà précités, bien que cette méthode ait l'avantage d'engendrer la méthyl-estérification de la fonction acide.

Il est aussi possible d'utiliser l'hydrolyse douce ou des neuraminidases beaucoup moins destructrices, mais ces techniques ne permettent pas d'obtenir des méthyl-esters. Il faut donc, dans le cas où l'on désire cette dérivation, utiliser un mélange de méthanol anhydre avec du diazométhane solubilisé dans l'éther. Toutefois, l'obtention de méthyl-glycosides n'est pas absolument nécessaire, puisque la protection de l'hydroxyle porté par le carbone 2 sera obtenue par méthylation lors de l'étape suivante.

Pour la méthylation, il est possible d'utiliser l'une ou l'autre des techniques de Hakomori ou Ciucanu déjà discutées dans le chapitre de la méthylation des monosaccharides neutres et aminés. Ces méthodes ont la particularité de méthyler, non seulement les hydroxyles libres, mais aussi les fonctions amines (Bhattacharjee A. K. et coll., 1976; Rauvala H. et coll., 1977; Van Halbeek H. et coll., 1978). Ainsi, la fonction amine secondaire des composés de la famille des acides 5-N-acétyl-neuraminique et 5-N-glycolyl-neuraminique se trouve méthylée. Il en est de même pour la fonction amine primaire de l'acide neuraminique. En outre, pour certains polymères d'acides sialiques que l'on retrouve, par exemple, dans des gangliosides, les acides sialiques placés en position interne de la chaîne glycanique connaissent parfois des phénomènes de sous-méthylation (Haverkamp J. et coll., 1977).

Il est à noter que dans de nombreuses études, au lieu de former des acides sialiques perméthylés, les auteurs préfèrent utiliser les dérivés partiellement O-méthylés. L'étape de méthylation précède la libération des acides sialiques, car les éthers méthyliques résistent très bien à l'hydrolyse ou à la méthanolyse acide. Dans le cas où la libération des acides sialiques méthylés est faite par une hydrolyse douce, il est possible de déterminer le nombre, le type et la position des groupes O-acyles naturellement présents chez certains acides sialiques. Ce type de méthode permet de discriminer un très grand nombre d'acides sialiques de structures différentes, surtout si la chromatographie de phase gazeuse est secondée par la spectrométrie de masse en impact électronique.

Ainsi, une seconde dérivation de type acétylation ou triméthyl-silylation peut-être appliquée aux dérivés méthyl-éthers d'acides sialiques, ce qui permet de déterminer avec certitude les atomes d'oxygène impliqués dans une liaison glycosidique (Haverkamp J. et coll., 1977; Bruvier C. et coll., 1981). Certains auteurs (Van Halbeek H. et al., 1978) pensent même qu'il est préférable d'utiliser les deux dérivations que sont l'acétylation et la triméthyl-silylation, sur deux pools séparés d'un échantillon de façon à cumuler les informations complémentaires obtenues avec ces deux techniques. Dans le cas des dérivés triméthyl-silylés de méthyl-éthers d'acides sialiques méthyl-estérifiés, en raison de l'unique présence de substituants éthers, les spectres de masse contiennent les différentes séries de fragment de A à H déterminées par

Kamerling pour l'étude des dérivés TMS. La masse moléculaire et le nombre de groupes triméthyl-silyles peuvent être déduits des fragments A et B, alors que les séries de fragments de C à H procurent des informations sur la position des groupements triméthyl-silyles ou acétyles. Dans le cas des dérivés acétylés, ils donnent des spectres de masse dans lesquels certains fragments peuvent être absents. Cela donne des informations structurales car les mécanismes de fragmentations dépendent de la présence, ou non, de groupements acétyles au niveau des carbones 4, 7 ou 8. Encore une fois, la masse moléculaire et le nombre de groupements acétyles, sont donnés par les fragments A et B, alors que la position de ses groupements est obtenue par l'analyse des fragments de C à G.

Cette technique, tout comme celle des dérivés triméthyl-silyles de méthyl-ester d'acides sialiques, a permis de mettre en évidence un très grand nombre de nouveaux acides sialiques à la fin des années 70.

#### **D. Les dérivés trifluoroacétylés d'acides sialiques**

Assez peu d'études ont été menées avec ce type de dérivés. En fait, cette technique de dérivation n'a jamais été développée pour l'analyse particulière des acides sialiques. Elle a plutôt été utilisée pour l'analyse de la composition de l'ensemble des monosaccharides qui peuvent être présents sur une glycoprotéine ou un glycolipide. Le plus souvent, cette technique de dérivation a été utilisée après une méthanolyse (Zanetta J. P. et coll., 1972; Pritchard D. G. et coll., 1978). Comme nous en avons déjà discuté lors de la description de la technique des dérivés triméthyl-silyles de méthyl-ester de méthyl-glycosides d'acides sialiques, il est évident que cette technique ne peut être utilisée que pour une analyse quantitative de la composition globale de l'ensemble des acides sialiques et non pas pour une analyse qualitative des différents types d'acides sialiques présents dans un échantillon.

Les premières techniques décrites pour la formation de ces dérivés utilisaient, comme réactif de dérivation, l'anhydride trifluoroacétique ou le trifluoroacétyl-imidazole. Différents types de solvant ont aussi été utilisés, comme l'acétonitrile, le tétrahydrofurane, la pyridine ou le dichlorométhane (Zanetta J. P. et coll., 1972). Mais, d'autres équipes (Sullivan J. E. et coll., 1977; Pritchard D. G. et coll., 1978), lors d'études plus récentes, ont préféré l'utilisation de N-méthyl-bis-(trifluoroacétamide) (MBTFA) qui selon eux, donne des résultats plus reproductibles. Selon ces mêmes auteurs, cette technique serait plus facile d'utilisation que celle de la dérivation aux TMS. Surtout qu'elle autorise, de par la très grande volatilité de ces dérivés, de raccourcir les temps de rétention des composés et permet donc des analyses plus

rapides. Par contre, cette technique présente l'inconvénient de détruire les colonnes capillaires en raison de la présence d'un excès de réactif de dérivation lors de l'injection. En effet, les dérivés trifluoroacétyles sont trop volatils pour que l'on puisse se débarrasser de cet excès par évaporation avant injection dans l'appareil de chromatographie (Zanetta et coll., 1972 et 1999a).

Enfin, aucune étude de dérivation de ce type après libération des acides sialiques par hydrolyse douce n'a été rapportée. Cela aurait pourtant permis, non seulement une analyse quantitative, mais aussi qualitative des acides sialiques, avec une plus grande sensibilité que la méthode de dérivation aux TMS, car la présence des atomes de fluor augmente la sensibilité de la spectrométrie de masse en mode impact électronique.



# GC-MS DES ACIDES GRAS

## I. Introduction

Le monde vivant contient un nombre considérable d'acides gras de structures différentes. Cette famille regroupe l'ensemble des acides carboxyliques (R-COOH) dont le radical (R) est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe. Cette chaîne peut être saturée ou insaturée avec un nombre de doubles liaisons maximal de 6. La configuration des doubles liaisons est le plus souvent de type *cis*, bien que l'on trouve aussi des configurations de type *trans*. Elles ne sont, dans la grande majorité des cas, pas conjuguées, mais séparées par un groupe méthylène. En outre, des acides gras comportant des triples liaisons ont été décrits. Il existe aussi, le long de la chaîne aliphatique, différents types de substitutions. La chaîne peut comporter des groupements carboxy- (C=O), hydroxy- (-OH) et méthoxy- (-O-CH<sub>3</sub>). Elle peut-être ramifiée (le plus souvent par méthylation) ou contenir des cycles (de type cyclopropane, cyclopentane et cyclohexane) avec parfois des insaturations intra-cycliques.

Cette importante hétérogénéité de structures entraîne bien évidemment des difficultés lors de la détermination de la structure des acides gras. Il existe différentes techniques d'analyses chromatographiques de ces composés, et quelle que soit la technique utilisée, un chromatogramme contenant l'ensemble des acides gras constitutifs d'un tissu peut montrer plusieurs centaines de composés. Pour cette raison, il est très difficile de discriminer l'ensemble des pics par la seule comparaison des temps de rétention des composés d'un échantillon avec ceux obtenus par l'analyse de standards purifiés. Dans ces conditions, seule la spectrométrie de masse permet de discriminer un maximum de pics, et puisque les acides gras sont relativement volatils, la GC-MS apparaît comme l'outil de choix pour l'analyse de ces composés. Une fois encore, la dérivation de ces molécules permet de les rendre encore plus volatiles, mais aussi plus stables à l'augmentation de température. C'est pourquoi, depuis quarante ans, de très nombreuses techniques de dérivation des acides gras ont été développées de façon à pouvoir déterminer les différentes insaturations et anomalies présentes le long de la chaîne aliphatique. Dans ce chapitre, nous décrirons les principales techniques de dérivation, c'est-à-dire, les plus utilisées ou celles qui présentent un intérêt fondamental sur le plan analytique.

## **II. Libération des acides gras**

Avant d'analyser la composition des acides gras libres d'un tissu, il faut libérer ceux qui sont impliqués dans la formation de lipides plus complexes (céramides, phospholipides, triglycérides, glycosphingolipides, glycosyl-phosphatidylinositol, etc.). Pour cela, il existe de nombreuses méthodes qui permettent la production, soit d'acides gras libres, soit de méthyl-ester d'acides gras. L'ensemble de ces techniques a été résumé dans une revue relativement récente (Eder K., 1995).

### **A. La saponification**

La libération d'acides gras libres peut-être faite par saponification grâce à l'utilisation de NaOH ou KOH. Cette méthode, quoique efficace, est longue et la réaction étant en équilibre, elle n'est jamais totale. En outre, la plupart des études de la structure des d'acides gras faisant appel à l'analyse des FAMES (méthyl-esters d'acides gras), il faut après saponification, estérifier les acides gras libres, ce qui allonge les temps d'analyses. Nous développerons ces techniques dans le paragraphe réservé à l'analyse des FAMES.

### **B. La trans-estérification**

Il s'agit d'une technique bien plus rapide qui ne nécessite qu'une seule étape chimique pour former les FAMES. Elle consiste en une méthanolyse catalysée par des acides ou des bases.

#### **1) Trans-estérification catalysée par des acides**

La méthyl-estérification est faite par l'utilisation de méthanol en présence d'un catalyseur acide qui peut être, soit de l'acide chlorhydrique, soit de l'acide sulfurique. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un acide classique, on classe aussi dans cette catégorie, le trifluorure de bore, car son principe de fonctionnement est identique à celui des deux catalyseurs précédents. Ces trois techniques ont l'avantage d'être efficaces, aussi bien sur les esters d'acides, que sur les acides gras libres.

Cependant, elles nécessitent quelques précautions pour éviter: (1) Une conversion incomplète des lipides en FAMES; (2) des changements dans la composition originale des acides gras durant la trans-estérification, notamment en ce qui concerne les acides gras poly-insaturés qui peuvent subir une oxydation; (3) la dégradation de la colonne chromatographique en raison de



la présence de traces d'agents estérifiants; (4) la perte des FAMES les plus courts, hautement volatils.

Le réactif trifluorure de bore méthanolique (12-14%) est très utilisé pour son large spectre d'activité d'estérification de l'ensemble des lipides (Shantha N. C. et coll., 1992). Selon les auteurs, le réactif est utilisé à des températures comprises entre 90°C et 100°C pendant des durées allant de 1 h 30 à 2 h. Certains y ajoutent du BHT (2,6-di-t-butyl-hydroxytoluène), pour ses propriétés anti-oxydantes, afin de protéger les acides gras poly-insaturés. Toutefois, il faut remarquer que cette méthode comporte quelques inconvénients: (1) le réactif doit être réfrigéré car il est assez fragile; (2) s'il est un peu trop vieux ou utilisé en concentration trop élevée, il peut induire la formation d'artefacts ou la perte des acides gras poly-insaturés; (3) si l'échantillon contient des plasmalogènes, les aldéhydes sont convertis en di-méthyl-acétals, dont les pics ont tendance à chevaucher ceux des FAMES.

Tout comme le trifluorure de bore méthanolique, le méthanol-HCl anhydre et l'acide sulfurique méthanolique sont tout aussi efficaces et très utilisés. Toutefois, le méthanol-HCl ne montre aucun problème avec les acides gras poly-insaturés et il ne nécessite aucune phase d'extraction. Les catalyseurs acides ont été utilisés à des concentrations, des températures et des temps de réaction variables. Par exemple, la trans-estérification est complète pour le méthanol-HCl anhydre (5%) en seulement 1 h 30 à 2 h après chauffage ou en 12 h à température ambiante. Ce type de trans-estérification semble être un peu plus efficace pour l'analyse des sphingolipides que l'utilisation du trifluorure de bore méthanolique. Cependant, tout comme ce dernier, cette technique convertit les aldéhydes en di-méthyl-acétals.

## **2) Trans-estérification catalysée par des bases**

Cela peut être fait par l'utilisation de méthylate de sodium ou de KOH/méthanol, avec l'avantage de se produire à température ambiante et donc de limiter la décomposition des acides gras poly-insaturés. Ainsi, la trans-estérification ne nécessite pas l'utilisation d'anti-oxydant comme le BHT qui donne en chromatographie de phase gazeuse un pic qui peut chevaucher ceux de certains FAMES. Un autre avantage est la rapidité de la réaction qui est de l'ordre de quelques minutes. Enfin, le méthanolate de sodium ne convertit pas les aldéhydes en di-méthyl-acétals, ce qui fait que cette technique est souvent utilisée lors de l'analyse d'échantillons riches en plasmalogènes. Au chapitre des inconvénients, il y a le fait que les catalyseurs basiques ne permettent pas l'estérification des acides gras libres ni la trans-

estérification des sphingolipides. En outre, l'utilisation du réactif KOH/méthanol implique un risque potentiel de saponification des FAMES formés lors de la phase d'extraction (hexane).

### **III. Les différents types de dérivés analysables en GC-MS**

#### **A. Les acides gras méthyl-estérifiés (FAMES)**

##### **1) Introduction**

Bien qu'il soit possible d'analyser des acides gras natifs directement en GC-MS, leurs dérivés méthyl-esters sont plus volatils et plus stables, ce qui permet d'analyser les plus grands d'entre eux sans qu'ils subissent une dégradation thermique. Les premières études de différents FAMES en GC-MS datent du début des années 60 (Ryhage R et coll., 1960). Elles démontrent que l'utilisation de ce type de dérivés permet de déterminer sans hésitation le nombre de carbones et d'insaturations, ainsi que le nombre, le type et parfois l'emplacement de dérivations présentes le long de la chaîne aliphatique.

##### **2) Formation des dérivés**

La méthyl-estérification est produite, dans la grande majorité des cas, par l'utilisation des techniques de trans-estérification que nous avons évoquées précédemment. Parfois, il peut être intéressant de n'étudier que la composition d'un échantillon en acides gras libres, et non, celle des constituants de lipides complexes. Pour cela, les acides gras libres peuvent être dérivés par différentes méthodes (Eder K., 1995): (1) à l'aide d'une estérification conduite par l'utilisation de diazométhane solubilisé dans l'éther, bien qu'il ait été rapporté des artefacts par réactions avec les doubles liaisons ou les groupes carbonyles (Shantha N. C. et coll., 1992). En outre, ce réactif nécessite une attention toute particulière à son utilisation en raison de sa toxicité et de son potentiel explosif; (2) les acides gras non méthyl-estérifiés sont aussi complètement méthylés dans un réactif de méthanol/chlorure d'acétyle en condition très douce. Cela à l'avantage de ne pas produire de trans-estérification des acides gras non libres si les conditions expérimentales sont scrupuleusement respectées, et donc, évite l'extraction préalable des acides gras libres; (3) une technique utilisant le trifluorure de bore méthanolique a montré la suppression du mécanisme de trans-estérification en présence de méthylurée, permettant la méthylation sélective des acides gras libres.

##### **3) Analyse des FAMES en chromatographie de phase gazeuse**



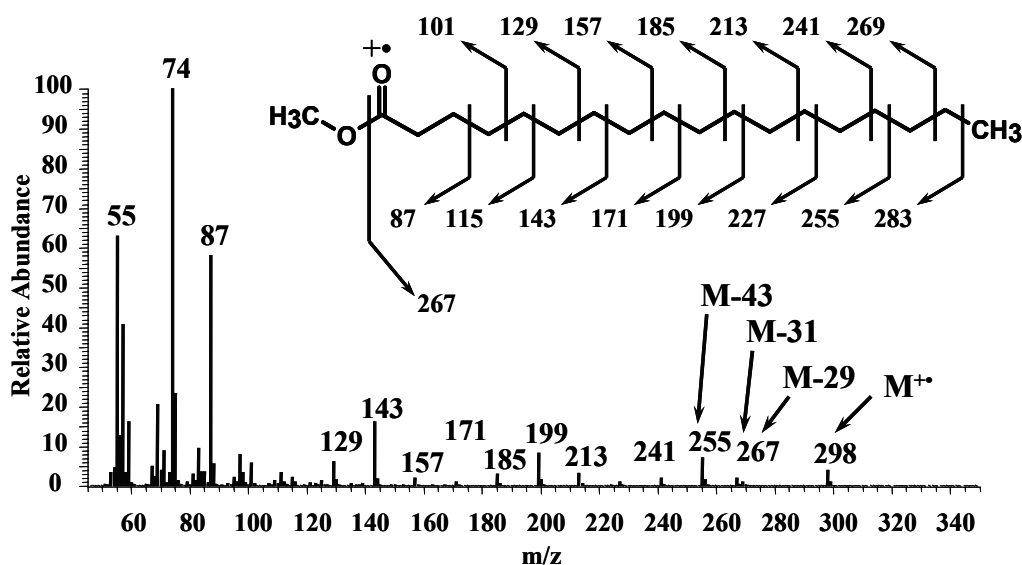


Figure 15: spectre de masse du méthyl-octadecanoate (C18:0)

L'ion moléculaire ( $M^{+}$ ) est visible et augmente en taille, par rapport au pic de base, avec l'accroissement de la longueur de la chaîne. Le pic de base ( $m/z$  74) est caractéristique des FAMES non dérivés en position 2, sa taille importante étant due, entre autres, à sa stabilisation par résonance. Il provient de la coupure de la chaîne entre les carbones 2 et 3, accompagnée par une migration simultanée d'un proton provenant du carbone 4. Ce mécanisme est couramment désigné sous le nom de réarrangement de McLafferty (figure 16).

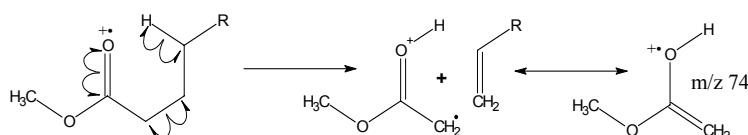


Figure 16: formation de l'ion à  $m/z$  74 u par le réarrangement de McLafferty

Les ions  $[M-29]^+$  et  $[M-43]^+$  sont riches d'information, ils proviennent en grande partie de la perte des fragments  $CH_3-CH_2^\bullet$  et  $CH_3-CH_2-CH_2^\bullet$  contenant les carbones 2, 3 et 4.

Enfin un ion  $[M-31]^+$  provient de la perte d'un groupement méthanolate par la fonction ester.

### a) Positionnement de branchements

En ce qui concerne les ramifications qui peuvent exister le long de la chaîne, les temps de rétention des composés ramifiés varient par rapport à ceux des composés linéaires. Néanmoins, cette seule caractéristique est insuffisante pour déterminer avec précision l'emplacement des ramifications. La spectrométrie de masse des FAMES peut apporter de plus amples informations, mais seules les ramifications des positions 2, 3, *antéiso-* et *iso-* sont aisément identifiables. Ainsi, pour les méthyl-2-FAMES, le réarrangement de McLafferty

fournit l'ion de base  $m/z$  88 au lieu de 74. En outre, les ions  $[M-29]^+$  et  $[M-43]^+$  deviennent respectivement  $[M-43]^+$  et  $[M-57]^+$  (Ryhage R. et coll., 1960). Un groupement méthyle en position 3 donne également l'ion  $m/z$  74, mais  $m/z$  87 n'existe pas et est remplacé par  $m/z$  101. Enfin, tout comme pour le méthyle en 2,  $[M-29]^+$  et  $[M-43]^+$  sont remplacés par  $[M-43]^+$  et  $[M-57]^+$  (McCloskey J. A., 1969). Les méthyles en position antéiso-, donnent une augmentation de la taille des ions  $[M-29]^+$  (plus grand que  $[M-31]^+$ ) et  $[M-57]^+$ , accompagnée par l'apparition d'un ion  $[M-29-32]^+$ . Quant aux FAMES méthylés en position iso-, ils donnent des spectres très proches des FAMES linéaires, avec toutefois l'apparition d'un petit pic à  $[M-65]^+$  (Ryhage R. et coll., 1960). Tout autre positionnement d'un groupement méthyle, bien qu'il ne soit pas impossible, reste difficile à déterminer avec certitude. A ce sujet, une équipe (Apon J. M. B. et coll., 1975) a rapporté une étude montrant que cela est possible par une analyse très fine des spectres de masse, en tenant compte de l'importance relative des ions de la série  $\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_n^+$ . L'un d'entre eux, appelé (a), provient de la rupture en  $\alpha$  de la liaison  $\text{C}_{n-1}-\text{C}_n$  juste devant le carbone portant le méthyle ( $\text{C}_n$ ). Cet ion a tendance à augmenter en taille tout comme un autre appelé (b) provenant de la rupture en  $\alpha$  de la liaison  $\text{C}_n-\text{C}_{n+1}$  juste derrière le carbone portant le méthyle ( $\text{C}_n$ ). Enfin, un ion (c) provenant de (b) par la perte d' $\text{H}_2\text{O}$ , voit aussi sa taille augmenter. Toutefois, ces augmentations de taille des pics (a), (b) et (c) sont tellement ténues que l'analyse semble difficile sur un composé inconnu. Dans ce cas, il faudra utiliser d'autres méthodes analytiques dont nous parlerons plus tard.

### **b) Positionnement d'un groupement comportant un atome d'oxygène**

Les dérivations de type carbonyle- ( $-\text{CO}-$ ), hydroxyle- ( $-\text{OH}$ ) et méthoxy- ( $-\text{OCH}_3$ ) sont assez facilement identifiables, car elles donnent des ions caractéristiques, en raison de la formation de fragments spécifiques par coupure en  $\alpha$  de ces groupements, ainsi que par des réarrangements d'hydrogène. (Ryhage R. et coll., 1960 et McCloskey J. A., 1969).

### **c) Positionnement des insaturations**

Pour l'analyse des FAMES insaturés, l'ion moléculaire ( $\text{M}^+$ ) permet de déterminer le degré d'insaturation et la longueur de la chaîne aliphatique. Cependant, le positionnement avec certitude des doubles liaisons le long de la chaîne est impossible (sauf pour les positions  $\alpha$  et  $\beta$ ) (Ryhage R. et coll., 1960), en dépit de la règle de la coupure en  $\beta$  des doubles liaisons généralement observée dans les cas de molécules comportant des insaturations. En effet, il

semble que juste après la formation de l'ion moléculaire, un déplacement des hydrogènes ait lieu le long de la chaîne, entraînant la migration des doubles liaisons juste avant que se produisent les mécanismes de fragmentations radicalaires (McCloskey J. A., 1969). Pour déterminer à coup sûr ces emplacements, il faut donc utiliser d'autres techniques de dérivations qui permettent de fixer les doubles liaisons.

#### **d) Positionnement de cycles**

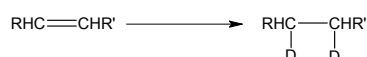
Pour ce qui est de l'analyse des FAMES comportant un cycle le long de la chaîne aliphatique (de type cyclopropane, cyclopentane ou cyclohexane et leurs analogues insaturés), les spectres de masse ne permettent pas leur positionnement.

### **5) Utilisation de dérivations supplémentaires sur les FAMES**

Nous venons de voir que la simple utilisation des dérivés FAMES n'est pas suffisante pour déterminer l'emplacement d'insaturations. En ajoutant des groupements à la place des doubles liaisons, il devient possible de localiser les carbones qui sont impliqués dans une insaturation. En outre, il est possible de dériver les hydroxyles libres le long de la chaîne afin d'améliorer la détermination de leur positionnement.

#### **a) Détermination de la position des doubles liaisons par réduction**

Les doubles liaisons peuvent être réduites par du deutérium.

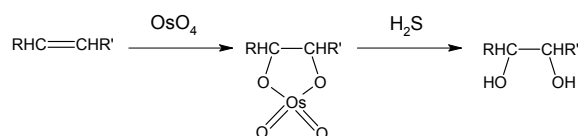


Bien qu'il existe plusieurs méthodes, l'une des plus utilisées ces dernières années est celle du catalyseur de Wilkinson en présence de deutérium gazeux (Joh Y. -G. et coll., 1997). Cette technique a l'avantage de donner des spectres de masse facilement analysables car la position de l'insaturation est donnée par l'analyse de la série  $\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_n^+$ . En revanche, des phénomènes de migrations d'hydrogènes et de deutériums ont été rapportés, amenant à un brouillage des informations par isomérisation des doubles liaisons (McCloskey J. A., 1969 et Christie W. W., 1998).

#### **b) Détermination de la position des doubles liaisons par oxydation**

##### **(1) *L'oxydation***

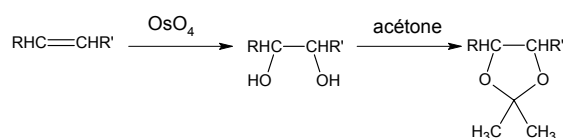
Pour éviter la migration des doubles liaisons lors de l'analyse en spectrométrie de masse des FAMES insaturés, une solution consiste en une oxydation des doubles liaisons afin de former un dialcool en lieu et place de l'insaturation. Pour cela, la technique la plus couramment utilisée est la procédure de McCloskey et McClelland (1965) (McCloskey J. A., 1969). Cette technique consiste en une oxydation par le tétraoxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), très toxique et coûteux, suivie d'une réduction de l'osmate par du  $\text{NaSO}_3$  (Capella P. et coll., 1968 et Jansen G. et coll., 1978), ou mieux, par de l'hydrogène sulfuré ( $\text{H}_2\text{S}$ ) car il donne moins de sels et permet une meilleure solubilisation des osmates, dans le cas de l'analyse des FAMES poly-insaturés (Dommes V. et coll., 1976 et Jansen G. et coll., 1978).



A ce stade, il ne reste plus qu'à dériver les hydroxyles libres afin d'améliorer la détermination de leur positionnement. Dans ce but, il existe de nombreuses méthodes dont nous allons décrire les plus courantes et efficaces.

## (2) Formation de dérivés O-isopropylidènes

L'utilisation d'acétone permet la condensation du diol pour former le dérivé O-isopropylidène, gardant ainsi la stéréospécificité de la double liaison. De cette façon, les caractéristiques géométriques des doubles liaisons sont bloquées par le cycle selon la relation *cis*  $\rightarrow$  *érythro* et *trans*  $\rightarrow$  *thréo*.

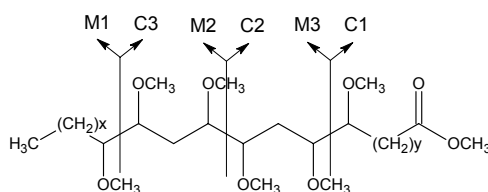


En spectrométrie de masse, la coupure en  $\alpha$  du cycle amène à la formation de 2 ions:  $x$  (contenant le groupement ester) et  $y$  (contenant l'extrémité de la chaîne aliphatique) qui permettent de positionner avec exactitude l'emplacement de la double liaison. En ce qui concerne la stéréospécificité, c'est l'intensité d'un pic dénommé  $c$  (M-89) qui permet la détermination des formes *érythro* (forte intensité) et *thréo* (faible intensité) (McCloskey J. A., 1969). Toutefois, dans le cas de l'interprétation de spectres de masse provenant de mélanges complexes, les 2 ions  $x$  et  $y$  étant de faible intensité, il est parfois difficile de les discerner. En outre, si cette technique est efficace lors de la détermination de l'emplacement d'une double liaison sur un FAME mono-insaturé, il n'en est pas de même dans le cas de l'analyse des

FAMEs poly-insaturés (Dommes V. et coll., 1976). C'est pourquoi, d'autres types de dérivation lui sont préférés. Elles permettent une analyse plus aisée des spectres de masse sur lesquels les ions diagnostics sont de plus grande taille. Elles facilitent également l'analyse des composés poly-insaturés, même si certaines de ces méthodes n'autorisent pas la détermination de la stéréospécificité des doubles liaisons.

### **(3) Formation de dérivés méthoxyles**

A partir des dérivés polyols obtenus après oxydation, il est possible de former des méthyl-éthers par la méthode d'Hakomori déjà discutée dans le chapitre réservé à la GC-MS des sucres (Hakomori S., 1964). En 1968, Niehaus W. G. utilise avec succès cette technique pour l'analyse des FAMEs poly-insaturés. Mais quelques temps plus tard, une autre équipe, reprenant cette méthode, montre que la formation de méthyl-éther à partir de FAMEs présente un faible rendement ne permettant pas une étude quantitative (Dommes V. et coll., 1976). Cependant, le mécanisme de fragmentation de ce type de dérivés permet de placer sans hésitation les insaturations le long de la chaîne des acides gras. En effet, ce type de composés montre des coupures prédominantes en  $\alpha$  des groupements méthoxy, amenant la formation d'ions M1, M2, M3,... et C1, C2, C3, etc. (figure 17).



**Figure 17: principales fragmentations des O-méthyl-éthers de FAMEs**

Puis, à partir de ces fragments primaires, apparaissent des ions secondaires par perte de méthanol. Ainsi, le nombre théorique de fragment possible atteint  $2n^2 + 3n$ , où  $n$  représente le nombre de doubles liaisons. De ce fait, les spectres de masse présentent un très grand nombre de pics ce qui rend leur analyse assez compliquée pour les composés contenant de nombreuses insaturations. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, la plupart des études utilisent la technique suivante de formation de dérivés triméthyl-silyles.

### **(4) Formation de dérivés triméthyl-silyles**

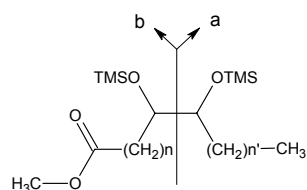
Depuis les travaux de Sweeley sur les dérivés triméthyl-silylés des sucres (Sweeley C. C. et coll., 1963), ce type de dérivation est devenue, de très loin, la plus utilisée pour la protection des groupements hydroxyles lors de l'analyse en GC-MS des molécules d'origine biologique.



(a) Positionnement d'insaturations par ce type de dérivés

Les diols obtenus après oxydation des doubles liaisons des FAMES insaturés ne dérogent pas à la règle et, en 1968, une technique utilisant ces dérivés voit le jour pour l'analyse des FAMES mono-insaturés (Capella P. et coll., 1968). Les polyols y sont dérivés par une méthode adaptée de celle de Sweeley grâce à l'utilisation d'un réactif pyridine/hexaméthyl-diméthylsilane (HMDS)/triméthyl-chlorosilane (TMCS) (10/2/1 v/v/v) pendant 5 min (Capella P. et coll., 1968), 15 min (Dommes V. et coll., 1976) ou 30 min (Janssen G et coll., 1978), à température ambiante. Depuis, ce type de dérivés a été appliqué à l'analyse des FAMES poly-insaturés (Dommes V. et coll., 1976 et Janssen G et coll., 1978) et de nombreux autres agents silylants ont été développés et utilisés, telle que la N,O-bis-triméthyl-silyl-trifluoroacétamide (BSTFA) dans le DMSO pendant une nuit à 60°C (Rontani J. -F., 1998), dans la pyridine 30 min à température ambiante (Steffenrud S. et coll., 1987) ou 15 min à 80°C (Alugupalli S. et coll., 1994).

Ce type de dérivés montre des spectres de masse très clairs, ne présentant pas l'ion moléculaire, mais les ions  $[M-15]^+$  et  $[M-31]^+$  qui permettent de déterminer la taille du composé ainsi que le nombre d'insaturation. En outre, les spectres comportent deux pics très intenses dénommés *a* et *b* (ce dernier, contenant la partie ester), provenant de la rupture de la liaison C-C entre les groupements TMS. Il est à noter que d'autres personnes ont nommé ces ions de manière différente, respectivement *M* et *C* (Dommes V. et coll., 1976). Ce sont ces ions qui permettent de déterminer sans ambiguïté la position de la double liaison (figure 18).



**Figure 18: fragmentations spécifiques des dérivés TMS des FAMES**

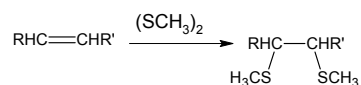
(b) Détermination de la position d'hydroxyles par ce type de dérivés

Nous venons de voir que le positionnement de doubles liaisons le long de la chaîne pouvait se faire par formation d'un diol en oxydant l'insaturation et en dérivant les fonctions alcools par un groupement triméthyl-silyle. Bien sûr, la même technique peut être appliquée aux acides gras naturellement hydroxylés. C'est pourquoi, de nombreuses études sur cette famille d'acides gras font intervenir cette méthode. En 1980, Boeynaems a dérivé des acides gras

hydroxylés saturés et insaturés en différentes positions avec de bons résultats. Lorsque l'on observe les spectres de masse obtenus par cette méthode, il est clair que la coupure favorisée en  $\alpha$  du carbone portant le groupement TMS amène à la formation d'ions de forte intensité. Cela permet une analyse facile de ce type de spectres, même lors de la présence de nombreuses insaturations le long de la chaîne aliphatique des FAMEs analysés (Boeynaems J. M. et coll., 1980). Quelques années plus tard, Steffenrud a utilisé d'autres types de silylations et a trouvé que les dérivés silylés les plus intéressants sont les triméthyl-silyles et les butyl-diméthyl-silyles (Steffenrud S. et coll., 1987). Enfin, Alugupalli s'intéresse avec succès à l'analyse, par cette méthode, des acides gras hydroxylés sur le carbone 3 (Alugupalli S. et coll., 1994).

### c) Formation de dérivés Thio-méthylés.

Toutes les méthodes précédemment citées nécessitent avant dérivation une étape d'oxydation par le tétr oxyde d'osmium. Or, il est préférable d'éviter la multiplicité des réactions nécessaires à la dérivation et donc, la perte de rendement et de temps. C'est pourquoi, la formation de dérivés Thio-méthylés a le gros avantage, en une seule étape et à l'aide d'un seul réactif, de permettre la dérivation des carbones impliqués dans une double liaison. Pour cela, les FAMEs sont dissous dans du diméthyl-bisulfure en présence d'une trace d'iode (Francis G. W., 1981). Cette réaction est entièrement stéréospécifique selon la relation *cis*  $\rightarrow$  *thréo* et *trans*  $\rightarrow$  *érythro*. En chromatographie de phase gazeuse, ces deux stéréo-isomères sont parfaitement séparés (la forme *thréo* étant éluée en premier). Cependant, leurs spectres de masse ne sont pas distinctifs.



Ce type de dérivés est particulièrement efficace pour l'analyse des FAMEs mono-insaturés (Leonhardt B. A. et coll., 1985). Pour les poly-insaturés, des problèmes peuvent se poser, car certaines complications apparaissent lors de la réaction avec le diméthyl-bisulfure (Vincenti M. et coll., 1987 et Carballeira N. M. et coll., 1994). En fait, il n'y a pas de problème quand les doubles liaisons sont séparées de plus de quatre carbones. Mais dans le cas de doubles liaisons plus proches l'une de l'autre, des cyclisations apparaissent le long de la chaîne. Ainsi, dans le cas d'un FAME 5,9-diène, il y a formation d'un cycle thiolanne (figure 19). Toutefois,

ce type de composé donne des spectres caractéristiques qui permettent de localiser l'emplacement des doubles liaisons.

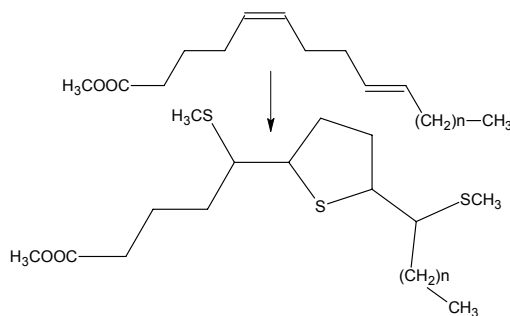


Figure 19: formation d'un cycle thiolane sur les FAMES 5,9-diène

Seul les FAMES contenant des doubles liaisons conjuguées ne peuvent pas être analysés par cette méthode.

## **B. Formation de dérivés comportant une fonction amine**

Le phénomène de réarrangement de protons le long de la chaîne aliphatique est à l'origine de la migration des doubles liaisons lors de la fragmentation des FAMES par impact électronique. Une solution à ce problème, comme nous l'avons déjà vu, est de réduire ou d'oxyder les insaturations avant de les dériver afin de marquer leur emplacement. Mais ce type de méthode, quoique efficace dans certains cas, souffre parfois de lacunes. Une autre possibilité pour limiter ce réarrangement consiste à favoriser uniquement la formation d'un certain type d'ions qui ne subit pas ou peu la migration des doubles liaisons. Dans ce but, il est possible de dériver les acides gras au niveau de la fonction acide par des radicaux dit "à charge piégée". Ce radical doit contenir un atome d'azote, ce qui favorise quasi exclusivement l'ionisation de la molécule au niveau du groupement polaire. Ainsi, les doubles liaisons ne peuvent plus être chargées et donc subir le phénomène de migration par réarrangement de protons.

### **1) Formation d'amides tertiaires par la pyrrolidine: les dérivés N-acyl-pyrrolidines**

#### **a) Formation, intérêts et inconvénients**

Afin de piéger la charge du côté du groupe carboxyle des acides gras (coté polaire), des tentatives ont été effectuées avec différents types d'amides. Rapidement les amides tertiaires et surtout les N-acyl-pyrrolidines sont apparues comme les meilleurs dérivés, facilitant l'analyse des spectres de masse (Andersson B. A. et coll., 1974b et 1978). C'est dans les

années 70 que se développèrent ces dérivés. Leur préparation est extrêmement simple et rapide, avec un excellent rendement. Elle se fait directement en une seule étape à partir des FAMES. Ils sont solubilisés dans un mélange pyrrolidine/acide acétique (10/1 v/v) et chauffés à 100°C pendant 30 min (Andersson B. A. et coll., 1974a). Après une extraction de phase, les dérivés N-acyl-pyrrolidines peuvent être analysés en GC-MS.

Bien qu'ils soient suffisamment volatils, ces dérivés ont un temps de rétention un peu plus long que celui des FAMES quel que soit le type de colonnes chromatographiques utilisé. Ceci allonge un peu les temps d'analyses (Andersson B. A. et coll., 1974b et 1978). En revanche, les différents isomères de positions de branchements ou d'insaturations sont bien séparés. Enfin, pour les composés qui sont analysables par les deux méthodes, ces dérivés donnent des spectres de masse plus simples que les FAMES, facilitant ainsi leur analyse. De ce fait, les N-acyl-pyrrolidines permettent de déterminer avec certitude les emplacements des groupements méthyles, des insaturations et des cycles, le long de la chaîne.

## b) Analyse des spectres de masse

Bien que les spectres de masse des méthyl-esters et des N-acyl-pyrrolidines d'acides gras saturés montrent des mécanismes de fragmentation similaires, dans la région des hautes masses moléculaires, avec l'apparition d'incrément de masse de 14 u, le fait que la charge soit piégée sur la fonction carboxyle (pour les N-acyl-pyrrolidines), limite certains types de fragmentations visibles chez les FAMES. Cela produit des spectres moins fournis en ions qui sont plus prononcés et donc plus simples à analyser. L'ion moléculaire a une intensité plus importante que dans les spectres des FAMES et la grande majorité des fragments provient de la dégradation de l'ion moléculaire par la rupture des liaisons C-C le long de la chaîne aliphatique donnant des ions du type  $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{N-CO}^+\text{H-(CH}_2)_n\text{-CH=CH}_2$  contenant le groupement pyrrolidines (figure 20).

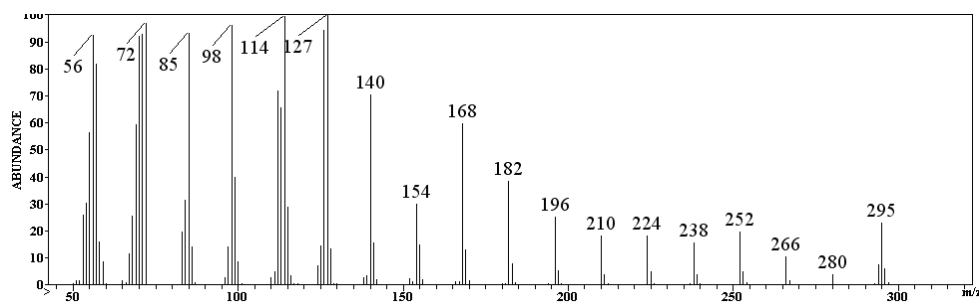


Figure 20: spectre de masse du N-pentadecanoyl-pyrrolidine (C15:0)

Comme très souvent dans les spectres de masse d'acides gras, l'ion majeur ( $m/z$  113) provient de la rupture de la liaison  $C_2-C_3$  par un mécanisme de McLafferty.

### (1) Positionnement des insaturations

Alors qu'il est très difficile de distinguer les spectres de masse des isomères de position des FAMES insaturés de même longueur, dans le cas des N-acyl-pyrrolidines, les spectres de masse sont suffisamment différents pour permettre le positionnement des insaturations. Ainsi, une règle a été définie: *Alors que pour les acides gras saturés, on observe uniquement des incréments de masse de 14 u. Dans le cas des acides gras insaturés, si un intervalle de 12 u est observé entre les deux pics les plus intenses de massifs de fragments voisins contenant  $n$  et  $n-1$  atomes de carbone, une double liaison est placée entre les carbones  $n$  et  $n+1$  le long de la chaîne aliphatique* (figure 21) (Andersson B. A. et coll., 1974a et 1978). En plus de cette règle, il faut noter une augmentation de l'intensité de l'ion provenant de la rupture au niveau du carbone  $n+2$ . Dans le cas de doubles liaisons conjuguées, le positionnement de la première insaturation (par rapport au groupe carboxyle) est indiqué par un intervalle de 12 u. La seconde double liaison est aussi indiquée par un deuxième intervalle de 12 u, visible juste après le premier.

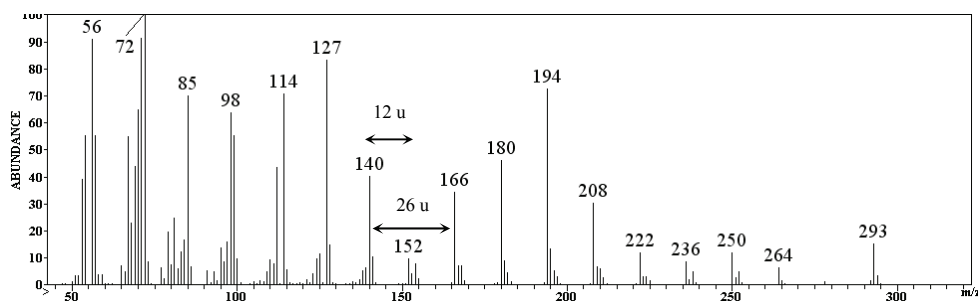


Figure 21: spectre de masse du N-pentadec-5-enoyle-pyrrolidine (C15:1Δ5)

Une autre règle a été définie pour la détermination de l'emplacement d'une triple liaison le long de la chaîne aliphatique: *Si une triple liaison se trouve entre les atomes  $n$  et  $n+1$ , un incrément de masse de 10 u est visible entre les plus grands pics des massifs correspondant aux fragments  $n-1$  et  $n-2$ . A ce phénomène s'ajoute une augmentation de la taille des pics correspondant aux fragments  $n-2$  et  $n+2$*  (Andersson B. A. et coll., 1978).

Cependant, cette règle ne s'applique pas à la détermination de l'insaturation des carbones 3 et 4, ainsi qu'aux antépénultième et avant-dernier carbones, mais cela n'empêche pas de déterminer une insaturation au niveau de ces carbones en raison de la spécificité de

fragmentation qui apparaît dans ces cas. En fait, seuls les acides gras insaturés en  $\alpha$  ne peuvent pas être caractérisés car ils sont peu sujets à la dérivation par cette méthode. Enfin, il faut remarquer que ce type de dérivés ne permet pas de déterminer la stéréospécificité des doubles liaisons.

### (2) Positionnement des branchements

Lors du paragraphe réservé à l'analyse des FAMES, nous avons expliqué qu'à part les positions 2, antéiso- et iso-, il est difficile, voire impossible, de déterminer l'emplacement de branchements méthyles. Par contre, l'utilisation de dérivés N-acyl-pyrrolidines semble être un outil de choix pour cela (Andersson B. A. et coll., 1975 et 1978). En effet, bien que la présence d'un méthyle branché le long de la chaîne n'affecte pas l'incrément de masse de 14 u, elle affecte l'intensité des pics. Ainsi, le positionnement d'un groupement méthyle en position  $n$  est facilement déterminé par une augmentation de l'intensité des deux pics correspondants aux ions  $n-1$  et  $n+1$  provenant de la rupture en  $\alpha$  de la chaîne devant et derrière le carbone portant le groupement méthyle. Inversement, on observe une diminution de l'intensité de l'ion  $n$  (figure 22). En fait, le seul problème provient de l'impossibilité de déterminer l'emplacement d'un méthyle en  $\alpha$  du carbonyle, car il semble qu'il soit impossible de dériver les FAMES méthylés en position 2 pour former une amide.

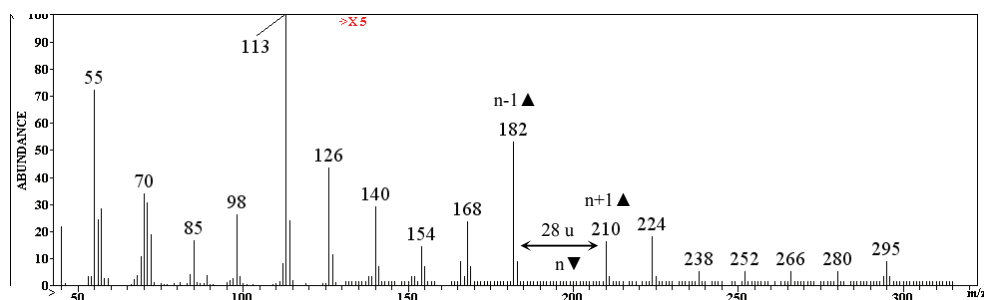


Figure 22: spectre de masse du 8-méthyl-N-tetradecanoyl-pyrrolidine (8Me-C14:0)

### (3) Positionnement de cycles

Le positionnement de cyclopropane le long de la chaîne est assez facile, bien que les spectres de masse de ce type de composés ressemblent beaucoup à ceux des composés mono-insaturés. Seules quelques petites variations permettent de les différencier. Encore une fois, il existe une règle: Si on observe un incrément de masse de 12 u entre les pics  $n-1$  et  $n$ , il existe un cyclopropane au niveau des carbones  $n$  et  $n+1$ . S'ajoute à cela, une coupure favorisée en  $\beta$  du

*cyclopropane produisant une augmentation de l'intensité du pic en  $n+3$  (Andersson B. A. et coll., 1978).*

#### **(4) *Positionnement des dérivés contenant un atome d'oxygène***

Dans le chapitre concernant les FAMES, nous avons brièvement mentionné le fait qu'il n'y avait pas de problème pour le positionnement de groupements carboxy- (C=O), hydroxyle (-OH) et méthoxy- (-O-CH<sub>3</sub>) le long de la chaîne aliphatique, en raison de la formation de fragments spécifiques à ces composés par coupure en  $\alpha$  de ces groupements, ainsi que par des réarrangements de McLafferty. Dans le cas des dérivés N-acyl-pyrrolidines, les mécanismes de fragmentation sont très comparables et donnent également des pics très caractéristiques qui permettent un positionnement sans ambiguïté de ce type de groupements (Andersson B. A. et coll., 1978).

#### **c) Conclusion**

Pour toutes ces raisons, il semble que l'utilisation des dérivés N-acyl-pyrrolidines soit une bonne solution, car ces dérivés permettent d'analyser tous les types d'acides gras connus à l'heure actuelle. D'autant plus que l'introduction d'atomes de fluor sur le cycle pyrrolidine est en mesure d'augmenter la volatilité des dérivés (Andersson B. A. et coll., 1974b), mais aussi la sensibilité de détection, dans le cas d'utilisation de détecteur à capture d'électron pour des analyses en GC seule ou en mode CI pour la GC-MS. En fait, la seule limitation à cette technique provient de la difficulté de préparer les dérivés provenant des acides gras insaturés et méthylés en  $\alpha$ .

## **2) Formation d'esters picoliniques**

### **a) Formation, intérêts et inconvénients**

Ces vingt dernières années, de nombreuses études ont favorisé ce type de dérivés au détriment des dérivés N-acyl-pyrrolidines (Harvey D. J., 1982). En effet, bien que l'utilisation de ces derniers soient efficaces pour déterminer les emplacements d'insaturations et de branchements méthyles, Harvey a déclaré que leurs spectres de masse présentent des ions diagnostics trop faibles (environ 1% d'intensité relative). Il a donc développé une autre méthode "à charge piégée" par formation d'esters picoliniques. Les dérivés sont obtenus en chauffant les acides gras avec du chlorure de thionyle pendant 10 min à 100°C afin de produire des halogénures

d'acides. Après évaporation, on ajoute une solution à 20% de 3-hydroxyméthyl-pyridine dans l'acétonitrile et le mélange est chauffé pendant 1 min à 100°C (Harvey D. J., 1982). Toutefois, d'autres auteurs ont trouvé que cette technique semblait produire des artefacts sur les chromatogrammes. Ils développèrent donc une variante qui consiste à utiliser de l'anhydride trifluoroacétique 1 h à 50°C, puis de la 3-hydroxyméthyl-pyridine à 10% dans le tétrahydrofurane à 50°C pendant 1 h (Christie W. W. et coll., 1986).

Bien que Harvey et Christie préfèrent l'utilisation des esters picoliniques, les dérivés N-acyl-pyrrolidines ont un meilleur comportement chromatographique (Christie W. W. et coll., 1986). Surtout, ils sont préparés directement à partir des FAMES et donc, après méthanolyse qui est à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour libérer les acides gras à partir de lipides complexes. Quant aux esters picoliniques, ils ne peuvent être préparés qu'à partir d'acides gras non méthyl-estérifiés. Dans le cas de l'utilisation de la méthanolyse comme méthode d'extraction, il faudra rajouter une étape supplémentaire d'hydrolyse afin d'obtenir des acides gras. Cela augmente le nombre d'étapes au cours du protocole de dérivation, ce qui n'est jamais souhaitable.

Enfin, Christie associe souvent, à la formation d'esters picoliniques, la méthode de dérivation à la 4,4-diméthyl-oxazoline. En fait, il trouve ces deux méthodes complémentaires (Christie W. W., 1998). Nous ferons donc allusion à cette technique dans le chapitre suivant.

## **b) Analyse des spectres de masse**

Les esters picoliniques donnent des spectres de masse dont les pics sont bien individualisés et l'ion moléculaire est bien visible. Encore une fois, on retrouve une incrémentation de masse de 14 u entre chaque ion représentant les coupures radicalaires des liaisons C-C le long de la chaîne aliphatique après la migration d'un proton sur la fonction amine (a) (Harvey D. J., 1982). Ce même phénomène de migration précède la formation de l'ion de base à  $m/z$  108 (lorsque le potentiel d'ionisation est de 25 eV) qui provient de la rupture entre les carbones  $C_1$  et  $C_2$  des dérivés (b) (Harvey D. J., 1982 et Hamilton J. T. G. et coll., 2000). Il est à remarquer, qu'à un potentiel d'ionisation de 70 eV, l'ion de base est plutôt à  $m/z$  92 (parfois  $m/z$  93), et correspond au fragment méthylène-pyridinium (Christie W. W. et coll., 1987). Un autre ion abondant apparaît à  $m/z$  151. Selon Harvey, cet ion proviendrait du réarrangement d'un proton du carbone 4 vers le groupement carboxy selon le mécanisme de McLafferty (c) (Harvey D. J., 1982). Ce point étant contesté par Christie qui ne pense pas que le proton



proviennent classiquement du C<sub>4</sub>, bien qu'il ne remette pas en cause l'existence de cet ion (Hamilton J. T. G. et coll., 2000) (figure 23).

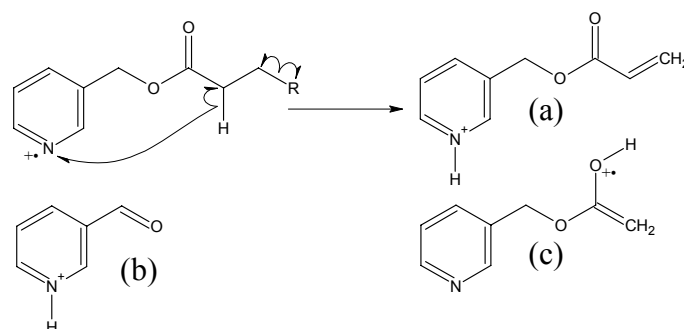


Figure 23: ions les plus abondants des esters picoliniques d'acides gras

### (1) Positionnement des insaturations

Dans les spectres de masse des composés insaturés, l'ion moléculaire est plus abondant que dans ceux des analogues saturés. De plus, le phénomène de ré-appropriation des protons en position  $\alpha$  de la double liaison vers la fonction amine avant rupture de la chaîne, va faire apparaître un incrément de masse de 26 u au niveau d'une insaturation, au lieu de 28 u comme dans le cas d'une chaîne saturée. Ainsi, une règle peut être définie: *Si la double liaison se trouve sur le carbone n, un incrément de masse de seulement 26 u est visible entre les pics les plus abondants des massifs correspondant aux ions n-1 et n+1*. On peut également remarquer une augmentation de l'intensité des pics placés en position n-2, n+2 et n+3. Ce type de comportement est aussi valable pour les composés poly-insaturés (Christie W. W. et coll., 1987 et Joh Y.-G. et coll., 1997). Toutefois, cette règle ne s'applique pas au positionnement des doubles liaisons aux emplacements 2, 3 et 4 bien qu'il soit possible de déterminer ce type d'insaturations (Christie W. W. et coll., 1987). Pour les triples liaisons, la règle est la même avec un incrément de masse de 24 u et une augmentation de l'intensité des pics en n+2 et n+3. Enfin, ce type de dérivés ne permet pas de déterminer la stéréospécificité des doubles liaisons (Harvey D. J., 1982).

### (2) Positionnement des groupements méthyles

La présence d'un groupement méthyle sur un carbone de la chaîne aliphatique fait décroître considérablement l'ion qui correspond à son emplacement, tout en augmentant les ions qui correspondent aux carbones vicinaux, car la coupure en  $\alpha$  des carbones branchés est favorisée

par rapport aux autres coupures C-C le long de la chaîne (Harvey D. J., 1982). Ainsi, à l'emplacement du groupement méthyle, apparaît un incrément de masse de 28 u.

### **(3) Positionnement de cycles**

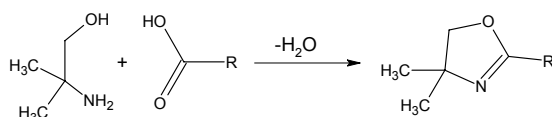
Il est très facile de positionner un cyclopropane le long de la chaîne. Ce type de groupement fait apparaître un incrément de masse de 26 u entre les ions de masse paire  $n-1$  et  $n+1$ , alors qu'un ion intense de masse impaire apparaît en  $n$  à 13 u entre  $n-1$  et  $n+1$  (Harvey D. J., 1984 et Christie W. W., 1998).

Il est aussi possible de positionner des cyclopentanes et cyclohexanes le long de la chaîne. Par contre, il est impossible de positionner des insaturations intra-cycliques car elles ont tendance à changer de place lors de la fragmentation à cause des mécanismes radicalaires qui engendrent la migration des doubles liaisons (Christie W. W., 1998).

## **3) Formation de dérivés à la 4,4-diméthyl-oxazoline (DMOX)**

### **a) Formation, intérêts et inconvénients**

Selon la revue de Spitzer (Spitzer V., 1997), les dérivés d'esters picoliniques et N-acyl-pyrrolidines, bien qu'efficaces pour la détermination de la structure des acides gras en spectrométrie de masse par impact électronique, ont tout de même une volatilité et une résolution relativement faible par rapport aux FAMES. C'est pourquoi, en 1988, Zhang et col. mettent au point les dérivés 2-alkényl-4,4-diméthyl-oxazolines. Ils sont facilement préparés avec un bon rendement, mais surtout, leurs propriétés chromatographiques sont comparables à celles des FAMES, et leurs spectres de masse sont beaucoup plus informatifs que ceux de ces derniers. Il y a deux façons de préparer ces dérivés. La première consiste à mélanger une part d'acides gras libres avec cinq parts de 2-amino-2-méthyl-propanol à 170-180°C pendant 30 min à 1 h. Cela donne la réaction suivante avec un rendement supérieur à 95% (Zhang et coll., 1988) (figure 24).



**Figure 24: formation des dérivés à la 4,4-diméthyl-oxazoline**

Spitzer rapporte que selon Liebich H. M. et col. (1994), l'augmentation du temps (2 h) et de la température de réaction (210°C) augmente encore le rendement de cette réaction. La deuxième technique fait intervenir un mélange équimolaire d'acides gras libres, de

dicyclohexyl-carbodiimide et de 2-amino-2-méthyl-propanol à température ambiante pour une durée de 1 à 4 h, suivi par un traitement au chlorure de thionyle pendant 30 min à 1 h. Dans ce cas, le rendement de réaction est identique à celui de la technique précédente (Yu Q. T. et coll., 1989). Enfin, Spitzer a rapporté dans sa revue deux autres techniques, l'une, permettant la formation des dérivés à partir des FAMES, l'autre, directement à partir de lipides totaux.

## b) Analyse des spectres de masse

Les spectres de masse des dérivés DMOX sont relativement faciles à analyser grâce la présence de pics diagnostics caractéristiques des différentes familles d'acides gras. Sur les spectres de masse des dérivés saturés, le pic de base est à  $m/z$  113. Il provient du réarrangement d'un hydrogène (a). Un autre ion d'intensité moins importante, apparaissant à  $m/z$  126, est décrit comme provenant de la cyclisation entre la fonction amine et le carbone 3 de la chaîne aliphatique (b) (Spitzer V., 1997). Toutefois, Christie n'est pas d'accord avec cette interprétation et propose la formation d'un ion non cyclique (Hamilton J. T. G. et coll., 2000). C'est deux ions sont suivis par toute une série d'ions pairs de masse  $m/z$  ( $126 + 14n$ ) qui proviennent de la coupure radicalaire des liaisons C-C le long de la chaîne après migration d'un proton sur le site chargé (c) (Spitzer V., 1997) (figure 25).

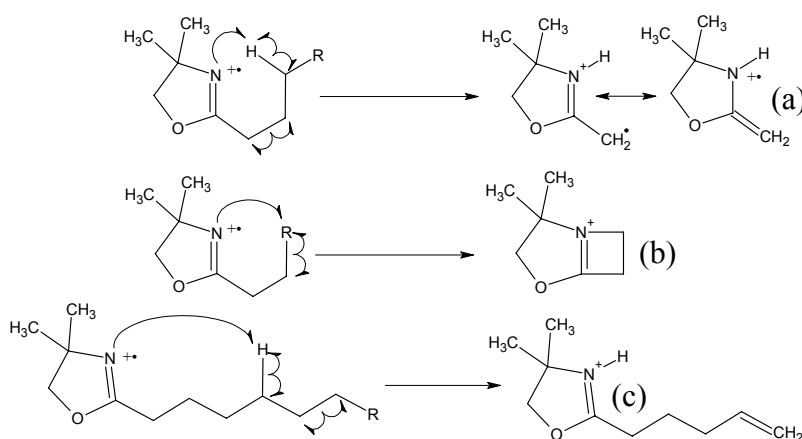


Figure 25: formation des ions les plus abondants des dérivés à la 4,4-diméthyl-oxazoline

### (1) *Positionnement des groupements méthyles*

Spitzer annonce que l'existence d'un groupement méthyle le long de la chaîne à une position  $x$  implique une diminution d'intensité caractéristique de l'ion  $m/z$  ( $126 + 14n$ ), qui correspond à cette position, par rapport à celui d'un acide gras linéaire. Cette diminution est accompagnée par une augmentation des deux ions vicinaux en  $x-1$  et  $x+1$ , en raison des ruptures favorisées

en  $\alpha$ . Il faut aussi noter que l'existence d'un groupement méthyle en position 2 fait diminuer considérablement l'intensité du pic de base ( $a$ ). Ce dernier est déplacé pour donner l'ion de masse  $m/z$  127 (Spitzer V., 1997). Toutefois, d'autres équipes pensent que les différences visibles sur les spectres des acides gras linéaires et branchés sont généralement trop faibles pour déterminer, dans la plupart des cas, l'emplacement des groupements méthyles. C'est pourquoi, elles préfèrent l'utilisation des dérivés d'esters picoliniques (Christie W. W., 1998).

### **(2) Positionnement des insaturations**

A partir de la position  $C_7$ , le positionnement d'une double liaison est obtenu par la règle: *Si un intervalle de masse de 12 u apparaît entre les pics  $n-1$  et  $n$ , une double liaison se trouve entre les atomes  $n$  et  $n+1$  de la chaîne. De plus, une augmentation de l'intensité des ions  $n-2$ ,  $n+2$  et  $n+3$  est en général bien visible* (Spitzer V., 1997 et Christie W. W., 1998). Cependant, cette règle ne s'applique pas bien au positionnement de doubles liaisons au niveau des carbones de  $C_2$  à  $C_6$ . Toutefois, des particularités, sur chacun des spectres correspondant à ces insaturations, permettent de déterminer ces emplacements (Spitzer V., 1997). Tout ceci, est également valable pour le positionnement des insaturations d'acides gras poly-insaturés. En ce qui concerne le positionnement de triples liaisons, la règle reste la même, toutefois, l'incrément de masse entre les pics  $n-1$  et  $n$  n'est plus de 12 u mais de 10 u.

Selon certains, cette méthode est la meilleure pour positionner les insaturations à partir de spectres de masse d'acides gras inconnus (Christie W. W., 1998).

### **(3) Positionnement des cycles**

Le positionnement d'un cyclopropane entre les carbones  $n$  et  $n+1$  de la chaîne suit la règle suivante: *Si un intervalle de masse de 12 u apparaît entre les pics  $n-1$  et  $n$ , un cyclopropane se trouve entre les atomes  $n$  et  $n+1$  de la chaîne. Ce phénomène est accompagné d'une augmentation, bien visible, de l'intensité de l'ion  $n+3$* . Christie trouve que cette technique est moins distinctive que celle des esters picoliniques, car cette règle est proche de celle du positionnement des insaturations (Christie W. W., 1998). Cependant, la différence entre les spectres de masse des acides gras insaturés et contenant un cyclopropane est bien marquée (Spitzer V., 1997). Ainsi, l'augmentation de l'intensité de l'ion  $n+3$  provenant d'une rupture en  $\beta$  est plus importante que dans le cas d'une insaturation, alors que les ions  $n-2$  et  $n+2$  ne sont pas aussi intenses. Il faut aussi ajouter que cette technique permet de déterminer

l'emplacement de cyclopentanes et de cyclohexanes, qui peuvent aussi être mono- et di-insaturés. Par contre, le positionnement des insaturations intra-cycliques reste difficile.

#### ***(4) Positionnement de groupements comportant un atome d'oxygène***

Comme pour toutes les autres méthodes de dérivation, ce type de groupements entraîne des ruptures en  $\alpha$  du carbone sur lequel ils sont fixés, formant ainsi des ions, d'intensité souvent importante, caractéristiques du type et de l'emplacement du groupement. Ceci est aussi valable lorsque la chaîne aliphatique contient en plus des insaturations.



# GC-MS DES BASES SPHINGOÏDES

## **I. Introduction**

Les bases sphingoïdes ont toutes en commun le fait qu'elles sont des 2-amino-1,3-diols à longues chaînes carbonées. Classiquement, on définit trois grandes familles de bases sphingoïdes à partir du modèle des composés à 18 carbones. Lorsque la chaîne carbonée est saturée, il s'agit de la famille de la sphinganine dont l'ancienne dénomination est dihydrosphingosine. Si une insaturation prend place entre les carbones 4 et 5, il s'agit de la famille de la sphingosine, aussi référencée sous le nom impropre de sphing-4-énine, son nom systématique étant 1,3-di-hydroxy-2-amino-octadec-4-ène. Une fonction alcool supplémentaire sur le carbone C<sub>4</sub>, sans insaturation, définit la famille de la phytosphingosine, aussi dénommée par son nom trivial (mais incorrect) 4-hydroxy-sphinganine. Toutefois, cette dénomination est à oublier selon les recommandations de L'IUPAC qui préfère le terme de 1,3,4-tri-hydroxy-2-amino-octadecane. Ces quarante dernières années, de nouveaux types de composés ont été trouvés, ce qui complique la dénomination. En effet, un très grand nombre de composés, à longueur variable de chaîne pour chaque famille, a été décrit. D'autres doubles liaisons, des groupements alcools, carbonyles (C=O) et méthyles peuvent se trouver le long de la chaîne aliphatique (Karlsson K.A., 1970). Ainsi une base sphingoïdes à 20 carbones, insaturée en 4 et 14 et hydroxylée en 6, sera trivialement dénommée 6-hydroxy-eicosasphinga-4,14-diénine ou par son nom systématique 1,3,6-tri-hydroxy-2-amino-eicosa-4,14-diène (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature., 1997).

Bien que les bases sphingoïdes soient connues depuis les travaux de Thudichum en 1882, cette famille de molécules est restée relativement peu étudiée jusqu'aux années 60, durant lesquelles, le développement de techniques d'HPLC, ainsi que l'introduction de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse, ont permis de mieux connaître les différentes structures de ces composés. La GC est devenue, pour ce type de composés, le choix logique parmi les méthodes de micro-détermination. Parce que les bases sphingoïdes sont des composés polaires et non volatils, il est nécessaire de les convertir chimiquement en composés volatils sans changer leurs caractéristiques structurales. Nous allons donc décrire les différentes techniques proposées dans la littérature à ce jour.

## II. Libération des bases sphingoïdes

Bien qu'elles existent sous la forme libre dans les membranes, les bases sphingoïdes se trouvent le plus souvent impliquées dans la formation: des céramides (acylées par un acide gras), des glycosphingolipides (liées en plus par une liaison glycosidique sur leur C<sub>1</sub>, comme dans le cas des galactosyl-céramides et gangliosides au sens large), des ancras glycosyl-phosphatidylinositol-céramide (liées par une liaison phospho-di-ester à un inositol sur le C<sub>1</sub>), des sphingomyélines, etc. Dans ces cas, afin de pouvoir les analyser séparément, il faut hydrolyser la liaison amide qui relie la base à l'acide et les autres liaisons. A ce sujet, nous avons déjà énuméré différentes méthodes, telles que la saponification et la trans-estérification en milieu acide et basique, lors du chapitre dévolu à l'analyse des acides gras. Evidemment, ces méthodes permettent de libérer les bases sphingoïdes, mais certaines d'entre elles présentent des inconvénients. C'est pourquoi, nous allons énumérer les techniques spécifiques de la libération des bases sphingoïdes répertoriées dans la littérature en décrivant les avantages et inconvénients qu'elles présentent.

L'équipe de Sweeley a utilisé une méthanolyse acide (2 N) en milieu aqueux. Pour cela, le milieu de méthanolyse est constitué de 80 ml de méthanol et de 16 ml d'acide chlorhydrique concentré. Ce mélange est ajouté en quantité adéquate aux lipides séchés pendant 5 à 6 h en chauffant à 70°C. Après refroidissement, quelques gouttes d'acide sulfurique sont ajoutées, puis les acides gras sont extraits à l'éther. Ce traitement n'étant pas suffisant, il faut encore extraire les bases sphingoïdes libérées par de l'éther, après avoir réajusté le pH à 12 ou 13 à l'aide d'une solution concentrée de KOH (Sweeley C. C. et coll., 1959). Cette technique sera reprise avec quelques petites variations (MeOH/HCl 2 N, 3 h à 100°C) (White D. C. et coll., 1969).

En 1965, la même équipe teste différents mélanges aqueux ou anhydres de méthanolyse et modifie quelque peu les conditions de méthanolyse précitées. Elle conclue que les mélanges aqueux sont préférables aux mélanges anhydres, en raison de la formation de quantités importantes, en milieux anhydre, de nombreux produits de dégradation de la sphingosine (surtout la 3-O-méthyl sphingosine), alors que le milieu aqueux diminue fortement cette formation. Le nouveau mélange de méthanolyse est produit par dilution de 8,6 ml d'une solution concentrée d'HCl dans 9,4 ml d'eau, le tout étant ramené à 100 ml par du méthanol (normalité finale de 1 N). La température de réaction est toujours de 70°C mais le temps est poussé à 18 h (Gaver R. C. et coll., 1965). Cette nouvelle technique sera reprise pour de



nombreuses études (Polito A. J. et coll., 1968; Yasugi E. et coll., 1987; Irie A. et coll., 1990 et Olsson N. U. et coll., 1997).

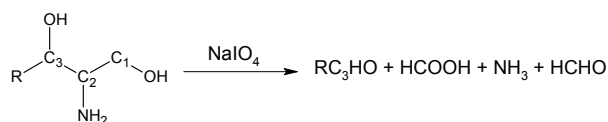
Selon Kadowaki et coll. aucune des méthodes de méthanolyse précédemment citées ne sont souhaitables, en raison de la formation de composés parasites que sont les 3-O-méthyl-éther et 5-O-méthyl-éther. Ils rapportent aussi la formation de produits du type 5-hydroxy insaturés entre les carbones C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> par réarrangement des sphingosines, ainsi que la formation de produits de déshydratation (mono-hydroxy-diènes de bases sphingoïdes). Toujours selon eux, la méthode de l'équipe de Sweeley, bien qu'elle fournisse un rendement d'hydrolyse de 95% à partir de globosides, ne fournit plus qu'un rendement de 20% à partir de gangliosides et la solution qui consiste à augmenter la normalité de l'acide est accompagnée d'une augmentation du nombre des composés parasites. C'est pourquoi, ils développèrent une technique d'hydrolyse en milieu dépourvu de méthanol (acétonitrile/HCl 0,5 N, 2 h à 75°C) sensée minimiser la formation des composés indésirables que sont les O-méthyl-éthers. Toutefois, cette technique n'empêche pas la formation de quelques produits secondaires de déshydratation que sont les mono-hydroxy-diènes de bases sphingoïdes (Kadowaki H. et coll., 1983).

Il est aussi possible de faire une méthanolyse en milieu basique. Pour les céramides, ils sont repris par un mélange méthanol/KOH 1 N pendant 18 h à 70°C. Puis les bases sphingoïdes sont extraites dans la phase étherée par un mélange éther/eau (2/1 v/v) (Morrison W. R., 1969). Une autre équipe utilise aussi un mélange méthanol/KOH 1 N, mais seulement pendant 30 min à température ambiante (Hayashi A. et coll., 1971). Pour les glycosyl-céramides, les conditions que nous venons de décrire ne sont pas suffisantes. Il faut donc augmenter la force de la base (2 N) et faire la réaction pendant 18 h à 110°C. Toutefois, ce traitement à un faible rendement car il produit des quantités substantielles de bases glycosylées (Morrison W. R. et coll., 1970). Dans ce cas, les auteurs préconisent une méthode d'hydrolyse avec du dihydroxyle de baryum (Ba(OH)<sub>2</sub>/dioxane (1/1 v/v) à 10% pendant 24 h à 110°C). Enfin, une étude récente faisait intervenir une hydrolyse alcaline de lipides par une solution de KOH 4 N à 100°C pendant 2 h (Nichols F. C., 1998).

### **III. Les différents dérivés utilisés pour l'analyse des bases sphingoïdes.**

#### **A. Formation d'aldéhydes par oxydation periodique**

En 1959, afin de rendre les bases sphingoïdes volatiles, sans perdre les informations structurales qu'elles comportent, Sweeley C. C. et coll. proposent de les transformer en leur équivalent aldéhydes gras. Pour cela, ils solubilisent les bases sphingoïdes dans du méthanol avant d'y ajouter une solution de periodate de sodium aqueuse 0,2 M et de laisser la réaction se faire dans le noir à température ambiante pendant 60 min (figure 26).



**Figure 26: formation d'aldéhydes par oxydation periodique**

Après extraction des aldéhydes gras, ceux-ci sont immédiatement injectés en GC, car ces composés ne sont pas très stables. Il est toutefois possible de les stocker une nuit à -20°C dans du chloroforme. Cette technique a permis de séparer chaque famille des bases sphingoïdes en fonction de la longueur des chaînes carbonées et d'analyser la composition en bases d'échantillons provenant de différentes espèces (bovine, humaine, levure et soja). Ainsi, grâce à cette méthode quantitative, les auteurs montrèrent les disparités de composition en fonction des espèces (Sweeley C. C. et coll., 1959). Bien d'autres équipes ont repris cette technique:

(1) En 1969, Morrison montre qu'il est possible de positionner des groupements méthyles en position *iso*- et *antéiso*- des chaînes aliphatiques des composés des familles de la sphinganine et sphingosine, grâce aux temps de rétention un peu plus élevés pour ces composés que pour les formes linéaires (Morrison W. R., 1969 et 1970).

(2) Hayashi et coll. ont analysé ces composés par spectrométrie de masse. Ils ont montré que les aldéhydes, formés à partir de la famille des sphingosines, comportent une double liaison entre les carbones C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>. Cette présence empêcherait la coupure classique en β des aldéhydes pour former l'ion m/z 44. Selon eux, il est donc un ion diagnostique des formes sphinganines et son absence caractérise les formes sphingosines (Hayashi A. et coll., 1971).

(3) En 1988, Yasugi et coll. ont utilisé cette méthode pour l'analyse de bases sphingoïdes présentant un groupement méthyle le long de la chaîne aliphatique sur les carbones 8, 9 et 10. Pour ces auteurs, seule la position *antéiso*- peut-être déterminée par les spectres de masse des aldéhydes. Pour plus d'informations, ils convertissent les aldéhydes en FAMES qui donnent de meilleurs résultats en spectrométrie de masse lorsque l'on veut positionner des branchements. Dans ce but, ils reprennent les aldéhydes dans du *tert*-butanol et les traitent avec un mélange de KMnO<sub>4</sub> 2,5 mM/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 mM pendant 1 h à température ambiante. Les acides gras sont ensuite méthyl-estérifiés par le diazométhane avant leur analyse en GC-MS (Yasugi E. et coll., 1988). La même technique a été reprise deux ans plus tard et a permis à une autre équipe

de déterminer l'emplacement d'insaturations le long de la chaîne de bases sphingoïdes mono-, di- et tri-insaturées et notamment, de montrer l'existence d'une 9-méthyl-sphinga-4,8,10-triénine (Irie A. et coll., 1990).

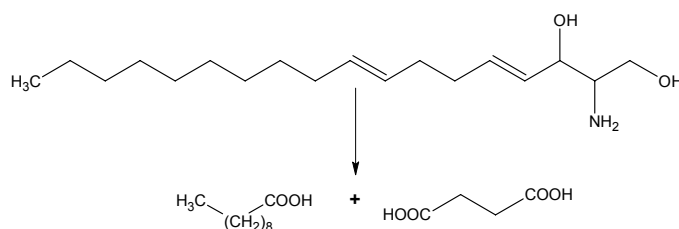
Il convient de mentionner que la formation d'aldéhydes n'est plus tellement utilisée car différents types de bases sphingoïdes peuvent donner le même aldéhyde, ce qui amène des difficultés d'interprétation. C'est le cas, par exemple, de la sphinganine (18C) et de la 4-hydroxy-nonadecasphinganine (19C) qui donnent toutes deux l'hexadecanal. Par ailleurs, il semble plus logique d'analyser les bases sphingoïdes intactes, plutôt que des produits dégradés dont la formation n'a pas un rendement de 100%. En effet, la multiplication des réactions afin de former un dérivé, ne favorise jamais, une bonne analyse quantitative.

## **B. Formation d'acide gras par oxydation par le periodate-permanganate**

Cette technique a comme particularité de couper les doubles liaisons par oxydation en formant une fonction acide sur chacun des carbones impliqués dans l'insaturation. Ainsi, les composés de la famille de la sphingosine donneront les acides gras dont la chaîne contient quatre atomes de carbone de moins que la base sphingoïde à l'origine de sa formation. Cette particularité est la preuve, dans ce cas, d'une insaturation en C<sub>4</sub> (Morrison W. R., 1969).

Pour cela, les bases sphingoïdes (1 mg) sont reprises dans un mélange de 0,4 ml de *tert*-butanol, 1,2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,02 N et 0,54 ml de solution oxydante contenant 10 mg de NaIO<sub>4</sub> et 0,8 mg de KMnO<sub>4</sub>. Le tout est mélangé pendant 3 h à température ambiante. L'excès de réactif est détruit par du NaHSO<sub>3</sub> et la solution est acidifiée avant d'extraire les acides gras formés, afin de les méthyl-estérifier (Hayashi A. et coll., 1971).

Grâce à cette méthode, Hayashi montre l'existence d'un composé di-insaturés, la sphinga-4,8-diénine par la mise en évidence de la formation d'acide dodécanoïque et d'acide succinique (figure 27).



**Figure 27: détermination de l'emplacement de doubles liaisons sur les bases sphingoïdes**

Toutefois, bien que cette technique soit efficace avec des composés isolés, elle ne peut pas être appliquée à des mélanges complexes de bases sphingoïdes poly-insaturées, mono-

insaturées et saturées. En effet, dans ces conditions, il devient impossible d'attribuer les fragments d'acides aux bases de départ. Enfin, comme pour la méthode précédente, cette technique dégrade les composés à analyser après plusieurs réactions et extractions, ce qui n'est pas souhaitable pour une bonne analyse quantitative.

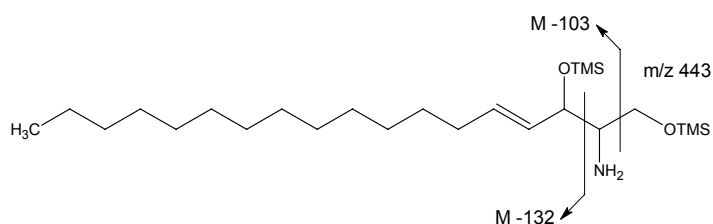
## C. Formation de dérivés silylés

### 1) Les dérivés O-triméthyl-silylés

En 1965, Gaver et Sweeley (Gaver R. C. et coll., 1965) développent l'analyse des bases sphingoïdes en chromatographie de phase gazeuse par l'utilisation des dérivés O-triméthyl-silylés. Pour cela, ils utilisent l'agent de silylation déjà développé pour l'analyse des sucres (Sweeley C. C. et coll., 1963). Grâce à ces travaux, ils montrent que cette technique permet d'analyser les différentes familles de bases sphingoïdes que sont les sphingosines et sphinganines. Deux ans plus tard, la même équipe développe un nouveau réactif de silylation qui permet une analyse quantitative de ces dérivés (Carter H. E. et coll., 1967). Il est composé d'hexaméthyl-disilazane (HMDS), de pyridine et de triméthyl-chlorosilane (TMCS), après centrifugation, il est ajouté directement sur les bases sphingoïdes séchées. Ce réactif a l'avantage sur le précédent d'être utilisable durant plusieurs semaines et de ne pas former le précipité blanc (chlorure d'ammonium) que nous avons mentionné dans le chapitre réservé à l'analyse des sucres. D'autres équipes ont utilisé ce type de réactif avec des proportions, des temps et des températures de réaction qui peuvent être variables (Hayashi A. et coll., 1971). Evidemment, d'autres agents silylants peuvent être utilisés, tels que le TMSI dans la pyridine à 60°C pendant 5 min (Olsson N. U. et coll., 1997), ou la BSTFA une nuit à température ambiante (Nichols F. C., 1998).

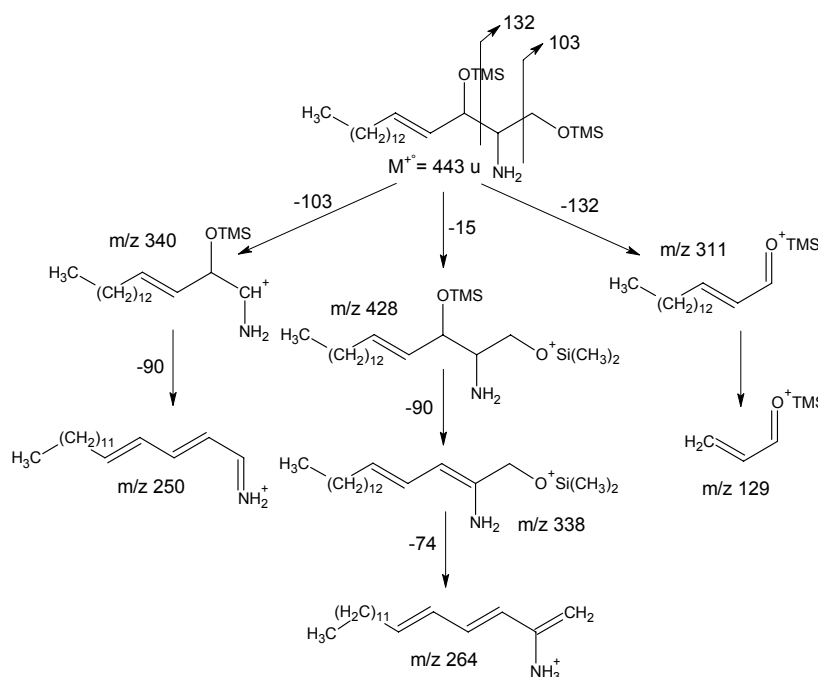
Cette technique permet d'analyser quantitativement les bases sphingoïdes du type: sphingosine, sphinganine et 4-hydroxy-sphinganine (phytosphingosine). Par contre, il est impossible de différencier les formes *erythro*- et *threo*- sur les chromatogrammes, car elles ne sortent que sous la forme d'un seul pic (Carter H. E. et coll., 1967).

En spectrométrie de masse, les ions  $[M-15]^+$ ,  $[M-103]^+$  et  $[M-132]^+$  permettent de déterminer la longueur de la chaîne ainsi que le nombre d'insaturations (figure 28). Il est toutefois impossible de positionner les insaturations en raison du manque d'ions diagnostics (Hayashi A. et coll., 1971).



**Figure 28: ions permettant de déterminer la longueur de la chaîne et le nombre d'insaturations à partir des dérivés triméthyl-silylés des bases**

En 1991, Matsubara et Coll. étudient le principe de fragmentation de la sphingosine et décrivent les 3 voies de fragmentation principales suivantes (Matsubara T. et coll., 1991) (figure 29):



**Figure 29: principales voies de fragmentation des dérivés triméthyl-silylés des bases sphingoides**

Ce type de dérivés a été repris par une autre équipe (Morrison W. R., 1969) qui trouve cette méthode inefficace pour obtenir des résultats quantitatifs détaillés, en raison du chevauchement de pics correspondants à différents composés. Cependant, nous pouvons remarquer qu'à cette époque, les colonnes chromatographiques étaient beaucoup moins résolutive que les colonnes capillaires modernes. Ainsi, cette constatation n'est plus forcément d'actualité.

En 1987, cette technique a permis à l'équipe de Yasugi et coll. de montrer que 70% des sphinganines présentes dans les cébrosides de hamster étaient de type branchées. Mais les spectres de masse n'ont pas permis de positionner ces branchements (Yasugi E. et coll., 1987 et 1988). En 1990, une autre équipe a déterminé le nombre d'insaturations le long de la chaîne

carbonée des bases sphingoïdes, sans pour autant déterminer leur emplacement (Irie A. et coll., 1990).

## **2) Utilisation des dérivés N-acétyl-O-triméthyl-silylés**

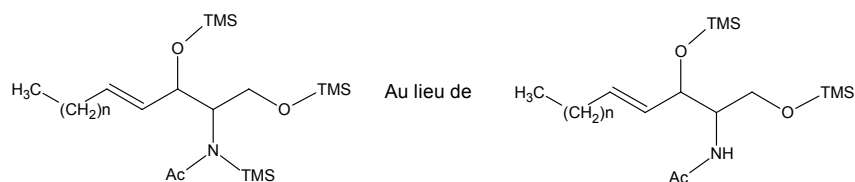
En 1967, Carter et Gaver, dans leur publication sur un nouveau réactif de silylation (Carter H. E. et coll., 1967), font allusion à la formation de dérivés N-acétyl-O-triméthyl-silyles par l'utilisation d'un mélange méthanol/anhydride acétique (4/1 v/v) une nuit à température ambiante, pour former les dérivés N-acétylés des bases sphingoïdes avant de les triméthyl-silyler (voir précédemment). Des variantes à ce protocole existent: (1) le même traitement durant seulement 20 min (Olsson N. U. et coll., 1997); (2) Pyridine/anhydride acétique (1/1 v/v) pendant 18 h à température ambiante, mais cela nécessite ensuite d'hydrolyser les groupements O-acétyles (Hayashi A. et coll., 1971).

Selon Carter et Gaver, ces dérivés, tout comme les O-triméthyl-silyles, sont efficaces pour l'analyse des bases sphingoïdes et ils permettent, en plus, de différencier les formes *erythro*- et *threo*-. Bien qu'ils aient un temps de rétention un peu plus élevé que les O-triméthyl-silyles, leur comportement chromatographique est supérieur en raison du blocage de la fonction amine (Olsson N. U. et coll., 1997). Cette technique sera reprise avec succès par d'autres équipes pour démontrer l'existence de bases sphingoïdes poly-insaturées (Polito A. J. et coll., 1968 et Hayashi A. et coll., 1971). Ces auteurs montrèrent que cette méthode comporte quelques inconvénients. Avec les colonnes chromatographiques utilisées à cette époque, la séparation des sphingamines, sphingosines, sphinga-4,8-dièlines et sphinga-4,14-dièlines n'est pas toujours très efficace et montre parfois des chevauchements de pics entre des formes *erythro*- et *threo*- de différents composés, quelle que soit la polarité des colonnes utilisées. En outre, bien que ces auteurs n'aient pu le démontrer, ils pensent qu'il est impossible de différencier les stéréo-isomères *cis* et *trans* des doubles liaisons. Il faut toutefois noter que ce problème de chevauchement de certains pics n'a plus lieu de nos jours grâce à l'utilisation des colonnes capillaires (Olsson N. U. et coll., 1997).

De toute façon, l'utilisation de la spectrométrie de masse permet de déterminer si un pic chromatographique correspond à un seul composé ou à un mélange car elle fournit avec certitude certaines informations structurales (Polito A. J. et coll., 1968; White D. C. et coll., 1969; Hayashi A. et coll., 1971; Krisnangkura K. et coll., 1974 et Olsson N. U. et coll., 1997). Comme très souvent dans le cas des dérivés TMS, l'ion moléculaire n'est pas visible, mais la masse moléculaire est facilement déterminée par l'ion  $[M-15]^+$  qui est accompagné par toute

une suite d'ions primaires ( $[M-59]^+$ ,  $[M-90]^{++}$ ,  $[M-103]^+$ ,  $[M-105]^+$ ,  $[M-174]^+$ ), permettant de déterminer la longueur de la chaîne carbonée ainsi que le nombre d'insaturations présentes sur cette chaîne. Notons que l'ion particulier  $[C_2^+H(NHCOCH_3)C_1H_2OTMS]$  à  $m/z$  174 (comparable à  $[M-132]^+$  des dérivés O-triméthyl-silylés) est présent sur l'ensemble des spectres. Il montre une forte intensité pour la famille de la sphingosine (40 à 50%), alors qu'il est réduit dans le cas des composés de la famille de la sphinganine (7 à 20%). L'intensité de cet ion est donc un test diagnostique de la présence d'une double liaison entre les carbones  $C_4$  et  $C_5$ . Par contre, le positionnement d'autres doubles liaisons le long de la chaîne est impossible avec ce type de dérivés. Dans ce cas, il faut faire appel à des dérivations supplémentaires (oxydation par le tétr oxyde d'osmium ou conversion des bases sphingoïdes en leurs équivalents FAMES ou aldéhydes).

L'analyse des spectres de masse a montré une particularité lorsque les dérivés sont formés à partir d'agents triméthyl-silylants puissants, tel que le TMSI. Dans ces conditions, les dérivés présentent un groupement TMS supplémentaire, greffé sur la fonction amine entraînant l'apparition d'un ion moléculaire 73 u au-dessus de ce que l'on obtiendrait avec l'agent silylant de Sweeley (pyridine/HMDS/TMCS). Ce phénomène n'est valable que pour les dérivés N-acétylés, car il n'apparaît pas avec les composés qui ont été uniquement dérivés en O-triméthyl-silyle (Olsson N. U. et coll., 1997) (figure 30).



**Figure 30: cas particulier de l'utilisation du TMSI pour silyler les bases sphingoïdes N-acétylées**

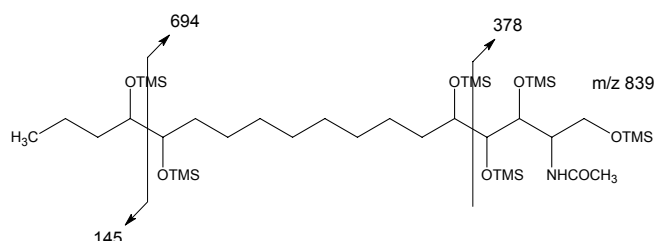
En ce qui concerne le positionnement de groupements méthyles le long de la chaîne, il semble que cela soit impossible et que les spectres de masse des bases sphingoïdes branchées soient identiques à celui de l'équivalent linéaire (White D. C. et coll., 1969).

### **3) Utilisation de dérivations supplémentaires sur les dérivés triméthyl-silyles**

Afin de déterminer l'emplacement de doubles liaisons le long de la chaîne carbonée des bases sphingoïdes, une équipe (Polito A. J. et coll., 1968) a utilisé les dérivés N-acétyl-O-triméthyl-silyles de l'équipe de Sweeley (Carter H. E. et coll., 1967), en y adjoignant la méthode de McCloskey et McClelland (1965) (McCloskey J. A., 1969) que nous avons déjà évoqué dans

le chapitre réservé à l'analyse des acides gras. Cette technique fait appel à l'utilisation du tétr oxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), de façon à oxyder les doubles liaisons pour former un diol en lieu et place des insaturations avant de silyler les hydroxyles formés.

Avec ce type de dérivation, le couplage à la spectrométrie de masse par impact électronique permet, sans ambiguïté, de déterminer l'emplacement de toutes les doubles liaisons. En effet, on observe un mécanisme de coupure favorisé en  $\alpha$  des carbones portant les groupements -OTMS. Ainsi, lors de l'analyse du composé sphinga-4,14-diène (Polito A. J. et coll., 1968), on obtient les ions caractéristiques suivants (figure 31):



**Figure 31: ions caractéristiques permettant de déterminer l'emplacement des doubles liaisons de la sphinga-4,14-diène après oxydation et silylation**

On trouve l'ion  $[M-15]^+$  à  $m/z$  824 qui est tout à fait compatible avec l'ajout de quatre groupes TMS ( $4 \times 89$  u) par rapport au dérivé N-acétyl-di-O-TMS-sphingadiène, ainsi que l'ion  $[M-145]^+$  à  $m/z$  694 et son compagnon à  $m/z$  145, qui sont tous deux caractéristiques d'une double liaison entre les carbones  $C_{14}$  et  $C_{15}$ . Enfin, un ion à  $m/z$  378 est caractéristique d'une double liaison entre les carbones  $C_4$  et  $C_5$ .

Par la suite, d'autres équipes ont utilisé cette méthode pour montrer l'existence de composés poly-insaturés comme la sphinga-4,8-diène (Hayashi A. et coll., 1971) ou la sphinga-4,8,10-triène (Hayashi A. et coll., 1990).

Toutefois, ces différentes études ont montré que malgré le nombre d'informations que l'on peut obtenir par cette méthode, il est impossible de déterminer la stéréochimie des doubles liaisons.

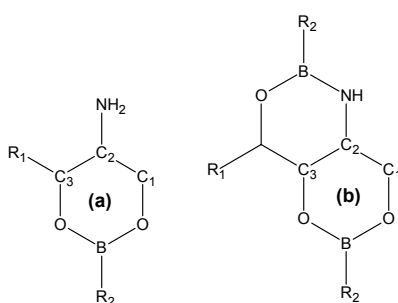
#### **D. Formation de dérivés cycliques par des acides boroniques (Gaskell S. J. et coll., 1976)**

Alors que les dérivés triméthyl-silyles ne permettent pas (ou très rarement) l'obtention d'un ion moléculaire en impact électronique, les boronates ont été utilisés, car ils bénéficient de bonnes propriétés chromatographiques et de spectres de masse contenant un ion moléculaire



bien défini. La formation de ces dérivés est extrêmement simple et rapide avec un bon rendement et les dérivés restent stables dans l'acétate d'éthyle durant plusieurs semaines.

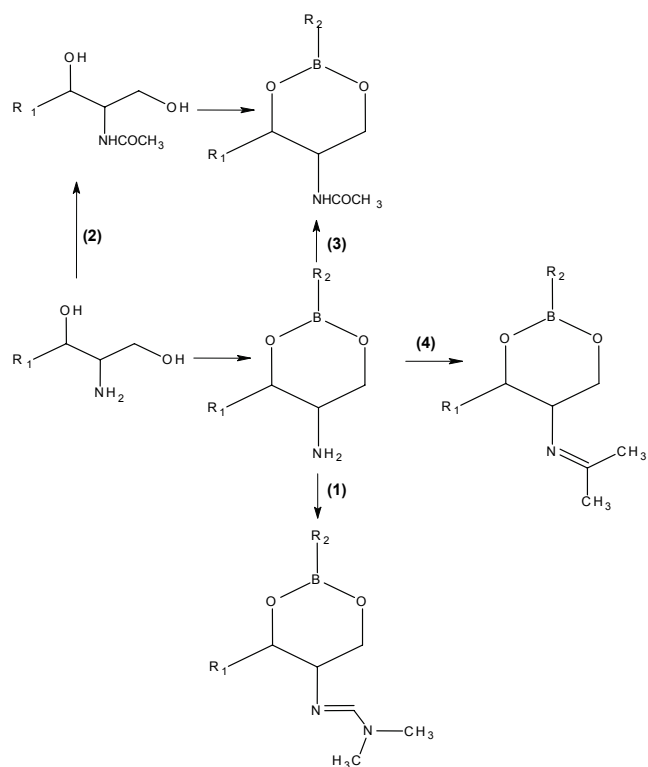
Différents types de dérivés boronates peuvent être utilisés, il s'agit des: méthyl-boronates, butyl-boronates ou benzyl-boronates, les premiers ayant un temps de rétention notablement plus court que les deux autres. Leur formation est obtenue en 10 min à température ambiante par l'addition aux bases sphingoïdes de pyridine et d'un équivalent molaire de l'acide boronique approprié. A la fin de la réaction, la pyridine est évaporée sous azote et les dérivés sont repris dans de l'acétate d'éthyle. Dans ces conditions, les bases sphingoïdes de la famille des sphinganines et sphingosines donnent des dérivés monocycliques (a), alors que celles de la famille des 4-hydroxy-sphinganines (phytosphinganines) forment des composés bicycliques (figure 32).



**Figure 32: les dérivés Boronates des (a) sphinganines et sphingosines ou (b) phytosphinganines**

Les dérivés monocycliques (a), par chromatographie en phase gazeuse, fournissent des pics qui ont une légère tendance à traîner à cause de la fonction amines libre, alors que ce n'est pas le cas des composés bicycliques. Pour éviter ce phénomène, il est possible de dériver la fonction amines, soit avant, soit après la formation du boronate cyclique. Dans ce but, il est possible d'utiliser plusieurs types de dérivations (figure 33):

- Formation de dérivés N,N-diméthyl-amino-méthylènes (DMAM) (1), accomplie par addition de N,N-diméthyl-formamide diméthyl-acétale dans la pyridine pendant quelques minutes à température ambiante.
- Formation de dérivés N-acétylés, soit par N-acétylation sélective (grâce à l'utilisation d'un mélange méthanol/anhydride acétique une nuit à température ambiante), (2) avant la formation du boronate cyclique ; (3) soit après, par un mélange pyridine/anhydride acétique (20/1 v/v) une nuit à température ambiante.
- Formation d'une base de Schiff (4) par dissolution du dérivé monocyclique dans l'acétone chauffée à 60°C durant 10 min.



**Figure 33: formation des différents types de dérivés de boronates cycliques à partir des bases sphingoides**

La protection de la fonction amine améliore le comportement chromatographique des dérivés boronates des composés de la famille des sphinganine et des sphingosine. Par contre, la préparation des dérivés N-acétylés ou DMAM augmente de façon substantielle les temps de rétention par rapport à la forme amine libre, alors que, la préparation de la base de Schiff par l'acétone ne change les temps de rétention que modestement.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, ce type de dérivés fournit des spectres de masse clairs montrant relativement peu de fragmentations. Ce sont les dérivés méthyl-boronates qui donnent les ions moléculaires les plus abondants, notamment pour les sphinganine dont les ions moléculaires sont les ions de base. En revanche, pour les familles des sphingosine et 4-hydroxy-sphinganine, l'ion moléculaire décroît, bien qu'il soit toujours bien visible. Pour les dérivés à fonction amine protégée, l'intensité de l'ion moléculaire décroît par rapport à celle des dérivés à fonction amine libre.

# GC-MS DES ACIDES AMINES

## **I. Introduction**

En dépit de sa banalité, le dosage des acides aminés constitutifs des protéines ou libres a toujours été un problème. Ces composés sont présents en très grand nombre dans les échantillons et montrent une très grande hétérogénéité physico-chimique, tout en possédant certaines propriétés générales communes. Depuis les années 50 des équipes ont développé un procédé de séparation chromatographique sur colonnes de résines échangeuses d'ions et de dosage après coloration de l'éluat par la ninhydrine. Cette technique, devenue entièrement automatique, est restée très longtemps la méthode la plus employée pour le dosage des acides aminés. Toutefois, elle présente certains inconvénients, tels qu'un manque de sensibilité (10 nmol par acides aminés) et un défaut de reproductibilité en raison de l'oxydation du réactif à la ninhydrine.

C'est pourquoi dans les années 60, la chromatographie de phase gazeuse est apparue comme étant une alternative intéressante pour la quantification des acides aminés. En effet, cette technique avait déjà montré certains avantages dans d'autres domaines de la biochimie. Parmi eux, il y a: la rapidité des analyses, l'efficacité de séparation et la sensibilité de détection. Mais rapidement, des problèmes de dérivations, liés à la complexité des acides aminés, ont été dévoilés. En effet, les acides aminés possèdent des fonctions très diverses (amine, acide carboxylique, alcool, phénol, thiol, indol, imidazole et guanidine) fortement polaires, qui doivent être, soit éliminées, soit dérivées par une ou plusieurs réactions chimiques. D'un côté, les dérivés choisis se doivent d'être suffisamment volatils pour permettre une élution des produits à des temps et à des températures adaptés à la chromatographie. D'un autre côté, les dérivés ne doivent pas être trop volatils de façon à pouvoir évaporer le réactif de dérivatisation sans perdre les acides aminés les plus légers. Par ailleurs, il est préférable d'utiliser des produits qui permettent des réactions rapides en un nombre d'étapes limitées. Enfin, il est très important que les dérivés, ainsi obtenus, soient stables dans le temps.

Les premières études ont été faites en 1956 par Hunter et coll.. Ils utilisèrent l'oxydation par la ninhydrine pour préparer des aldéhydes volatils. Ce procédé fut repris par une autre équipe (Zlatkis et coll., 1960) qui en fit une technique entièrement automatique pour l'analyse de 7 acides aminés. Très rapidement, d'autres approches ont été envisagées utilisant des techniques

très variables telles que: la décarboxylation et l'analyse des amines volatiles ainsi formées, la conversion des acides aminés en leurs esters méthyliques  $\alpha$ -chlorés, et la dérivation en chlorhydrates d'esters méthyliques de 14 acides aminés (Saroff H. A. et coll., 1962). Toutes ces études préliminaires n'ont abouti qu'à des résultats partiels et tout à fait inutilisables pour un dosage de tous les acides aminés constitutifs des protéines.

En fait, seules deux méthodes de dérivations ont donné des résultats probants, en permettant l'analyse des 20 acides aminés constituant les protéines (et d'autres que l'on ne retrouve pas dans les protéines). Il s'agit de la silylation d'acides aminés et de la N(O,S)-acylation d'acides aminés alkyl-estérifiés. Ce sont ces méthodes que nous allons décrire au cours de ce chapitre.

## **II. Hydrolyse totale des peptides et protéines**

Avant même de pouvoir analyser la composition en acides aminés d'une protéine, il faut une méthode de coupure des liaisons peptidiques. En raison des différences de stabilité des groupes fonctionnels variés des acides aminés, chacun d'entre eux est libéré sans dégradation et de façon optimale par des conditions expérimentales différentes. Il est pourtant nécessaire d'opter pour une méthode unique et globale permettant la libération de l'ensemble des acides aminés avec un minimum de dégradation. Pour cela, il faut une technique qui soit un compromis entre les différentes conditions expérimentales. Une discussion à ce sujet se trouve dans une revue très complète (Husek P. et coll., 1975).

L'inconvénient majeur de l'hydrolyse acide provient du fait que le Trp est presque complètement détruit dans les conditions optimales à la libération des autres acides aminés. Pour éviter cela, des alternatives ont été envisagées, incluant d'autres techniques d'hydrolyses acides en combinaison avec des réactifs protecteurs, ainsi que des hydrolyses alcalines ou enzymatiques. L'hydrolyse alcaline des protéines permet, en effet, une destruction moindre du Trp. Toutefois, elle n'est pas recommandée pour des analyses de routine, en raison de la destruction d'autres acides aminés (Cys, Ser, Thr et Arg).

L'hydrolyse acide la plus largement utilisée consiste en l'utilisation d'HCl 6 N à 110°C pendant 20 à 24 h. En général, elle permet de récupérer environ 95% des acides aminés d'une protéine. Les 5% restants correspondent au Trp, car celui-ci est dégradé en divers composés dont la  $\beta$ -3-oxindolyl-alanine (Nakai T et coll., 1976 et Ohta T. et coll., 1978), mais aussi, aux résidus Ser et Thr qui sont partiellement détruits (5 et 15% respectivement). Pour éviter ces phénomènes, quelques modifications ont été suggérées, notamment le fait de raccourcir le temps de réaction en seulement 4 h à 145°C, ce qui permet une décomposition minimale de

ces acides aminés (Roach D. et coll., 1970). Toutefois, de telles températures augmentent la sensibilité d'autres acides aminés. De ce fait, l'Arg est partiellement dérivée en Orn et d'autres peuvent être légèrement dégradés (Pro, Thr, Ser, Met et Hypro). Par contre, quelle que soit la température, les groupements amides sont complètement hydrolysés. Ainsi Asn et Gln sont transformés respectivement en Asp et Glu. Il faut prêter une attention toute particulière à la présence d'oxygène lors de l'hydrolyse acide, car sa présence induit la perte de certains acides aminés. La Cys est partiellement oxydée en CysSO<sub>3</sub>H et la Met est convertie en partie en Met-sulfone et Met-sulfoxyde. C'est pourquoi, on recommande d'effectuer l'hydrolyse dans des ampoules de verre, scellées sous atmosphère d'azote ou de vide. Un autre problème provient du traitement des protéines au DMSO durant leur phase d'extraction, car ce composé agit comme un oxydant et entraîne la perte de Met, Cys et Tyr par la production de Met-sulfoxyde, CysSO<sub>3</sub>H et Chloro-Tyr.

### **III. Les différents dérivés utilisés pour l'analyse des acides aminés.**

#### **A. La silylation des acides aminés**

##### **1) La triméthyl-silylation des acides aminés**

Selon une revue (Husek P. et coll., 1975), des études préliminaires de Ruhlmann et coll. (1959 et 1961) se sont intéressés à la séparation des dérivés triméthyl-silylés. Rapidement, ils ont trouvé que ce type de dérivés est trop instable pour permettre des analyses quantitatives satisfaisantes. En outre, ils se heurtèrent au problème de l'inefficacité de dérivation de certains produits silylants, notamment, en ce qui concerne la fonction amine.

Pourtant, en 1965, une autre équipe (Smith E. D. et coll., 1965) reprend ces travaux et montre que l'utilisation de cette technique peut-être envisagée. Pour cela, Les auteurs mettent au point une méthode faisant intervenir le triméthyl-silyl-diéthylamine (TMSDA) comme agent silylant, qu'ils présentent comme ayant un très bon rendement de dérivation (89 à 99%) pour former les dérivés N(O,S)-TMS TMS-estérifiés en une seule étape. Par contre, cette étude a été menée sur un très petit nombre d'acides aminés et non sur l'ensemble des 20 constituants des protéines.

Pour une étude exhaustive de l'ensemble des acides aminés présents dans les protéines, l'équipe de Gehrke (Stalling D. L. et coll., 1968) développe un autre produit silylant, le N,O-bis(triméthyl-silyl)-trifluoroacétamide (BSTFA). Ce produit permet l'obtention d'un seul pic

chromatographique pour 18 des 20 acides aminés analysés quand la silylation est faite à 125°C pendant 15 min. La cystine, Asp et Asn, nécessitent une dérivation à 150°C pendant 30 min, alors que pour Glu et Gln, il faut 70°C pendant 30 min. Toutefois, aucun pic chromatographique n'est obtenu à partir de l'arginine. Par la suite, cette même équipe (Gehrke C. W. et coll., 1969) a proposé un protocole comportant une double injection des échantillons entrecoupée par une re-silylation pour analyser l'ensemble des 20 acides aminés. Pour cela, 14 d'entre eux, incluant Phe et Tyr, subissent la silylation à 135°C pendant 15 min et les 6 autres à 135°C pendant 4 h. Bien que cette méthode permette l'analyse de l'ensemble des acides aminés, certains d'entre eux apparaissent sous la forme de plusieurs pics. Il s'agit de Arg et Lys qui peuvent être plus ou moins silylés au niveau de la fonction amine de leur radical. De même, His et Trp peuvent être ou non silylés sur l'atome d'azote hétérocyclique. Par ailleurs, Glu donne, par cyclisation, de l'acide 2-pyrilidone-5-carboxylique et Gly peut-être mono-ou di-silylé au niveau de sa fonction amine. En fait, toutes ces silylations supplémentaires dépendent du temps et de la température de la réaction de dérivation. Selon les auteurs, ce type de dérivés est stable durant une semaine sauf dans le cas de Gly qui ne reste stable que durant 3 h. Deux ans plus tard Gehrke et coll. reprennent cette technique de façon à ne faire qu'une seule injection au lieu de deux (après 15 min et 4 h de silylation). Ils proposent une solution intermédiaire en effectuant, pour tous les acides aminés, la silylation à 150°C pendant 2 h 30 (Gehrke et coll., 1971a).

Dans leur revue très complète, Husek et Macek (Husek et coll., 1975) font état d'études faisant intervenir la silylation uniquement comme estérification. Ils y expliquent que Ruhlmann et son équipe, lors de l'analyse de dérivés N(O,S)-TMS TMS-estérifiés, ont montré l'apparition d'artéfacts sous la forme d'acides aminés n'étant que TMS-estérifiés. Cette équipe a donc développé une silylation douce en utilisant l'hexaméthyl-disilazane (HMDS) dans du toluène. Elle a montré que la libération de NH<sub>3</sub> lors de la réaction empêchait la dérivation de la fonction amine, ainsi que celle des groupements thiols de Cys. Cependant, les groupes hydroxyles de Ser, Thr et Tyr sont dérivés. Ce type de dérivés a un très bon comportement chromatographique avec des pics bien symétriques et des temps de rétention assez faibles, tout comme les dérivés per-silylés. Toutefois, ce type de dérivés n'est pas satisfaisant pour l'analyse des acides aminés basiques qui ne donnent pas de pics.

D'autres types de composés que les dérivés N(O,S)-TMS TMS-esterifiés ont été développés. Selon (Gehrke C. W. et coll., 1969), il s'agit des dérivés N(O,S)-TMS-N-méthyl-acétamides ou N(O,S)-TMS-N-méthyl-formamides, ou bien encore, des dérivés N(O,S)-TMS-éthyl et -méthyl-esterifiés, N(O,S)-acétyl TMS-esterifiés et N(O,S)-TFA TMS-esterifiés qui ont été

développés par Ruhlmann. Toutefois, toutes ces méthodes nécessitent de nombreuses étapes de dérivation et n'ont pas été utilisées par la suite.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse des dérivés N(O,S)-TMS TMS-esterifiés, l'équipe de Cohen et coll. (Vandenneuvel W. J. A. et coll., 1970a et 1970b) a analysé des dérivés enrichis au carbone C<sub>13</sub> et deutérés. L'ion M<sup>+</sup> n'est pas toujours présent. Par contre, on retrouve toujours (sauf pour Lys) le fragment [M-15]<sup>+</sup> (- Me). D'autres ions sont visibles, tels que: [M-43]<sup>+</sup> (-Me, -CO), [M-73]<sup>+</sup> (-Si(Me)<sub>3</sub>), [M-117]<sup>+</sup> (-COOSi(Me)<sub>3</sub>). Tous sont caractéristiques des dérivés TMS esterifiés. On trouve aussi l'ion [M-147]<sup>+</sup> (- (Me)<sub>3</sub>SiO<sup>+</sup>Si(Me)<sub>2</sub>). Un autre ion à m/z 218 est commun à tous les acides aminés, excepté à la proline, en raison de sa forme cyclique (figure 34).

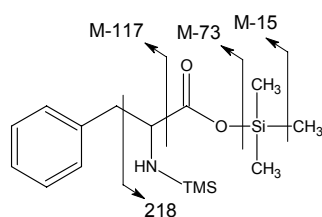


Figure 34: principaux ions obtenus à partir des dérivés N(O,S)-TMS TMS-esterifiés des acides aminés.

## 2) La tert-butyl-diméthyl-silylation des acides aminés

En 1986, une équipe (Biermann C. J. et coll., 1986) insatisfaite de l'instabilité des dérivés TMS, développe une méthode de silylation des acides aminés pour former les dérivés *tert*-butyl-diméthyl-silyles (TBDMS) qui sont réputés pour être 10 000 fois plus stables que les dérivés triméthyl-silyles. Cette technique permet l'analyse des 20 acides aminés communément présents dans les protéines, ainsi que celle de plusieurs sulfures d'acides aminés. Pour cela, les aminoacides sont repris dans une solution de N-méthyl-N-*tert*-butyl-diméthyl-silyl-trifluoroacétamide (MTBSTFA) comme produit silylant, avec 1% de *tert*-butyl-diméthyl-chlorosilane (TBDMCS) comme catalyseur. On y ajoute de l'acétonitrile comme solvant, que les auteurs trouvent supérieur aux autres possibilités, qui consistent à n'utiliser aucun solvant ou du tétrahydrofurane. Le tout est chauffé à 95°C pendant 1 h, ce qui permet une réaction quantitative pour la plupart des acides aminés. Ainsi dérivés, ils donnent un seul pic chromatographique bien défini, excepté pour Glu et Arg, car le second donne deux pics dont un est co-élué avec celui du premier. En revanche, l'utilisation d'une colonne capillaire semble améliorer la séparation de ces deux dérivés. S'ajoute à ce problème, le fait

qu'il semble que Gln et Asn subissent une légère dégradation lors du processus de dérivation. Toutefois et selon les auteurs, cette technique est très intéressante, car les dérivés sont formés en une seule étape et sont beaucoup plus stables que les dérivés TMS.

La même année, une autre équipe (Mawhinney T. P. et coll., 1986) utilise les mêmes dérivés. Leur protocole est légèrement différent, car les auteurs utilisent comme solvant du diméthyl-formamide qu'ils préfèrent à l'acétonitrile. Par ailleurs, ils n'utilisent pas de TBDMCS comme catalyseur, car ils trouvent que son utilisation entraîne une baisse de la réponse molaire des acides aminés basiques, même si celle-ci raccourcit le temps de réaction. Cette dernière est faite à 70°C pendant 25 min (nécessaire à la dérivation de His), puis elle est laissée à température ambiante pendant 1 h 35 (nécessaire à la dérivation de Thr). Tout comme leurs concurrents, les auteurs décrivent la formation d'un seul pic chromatographique par dérivé sauf pour Arg qui en fournit deux.

Un an plus tard, une équipe reprend ces travaux (Early R. J. et coll., 1987) et change légèrement le protocole de formation des dérivés TBDMS par chauffage à 50°C pendant 1 h. Les auteurs préfèrent aussi l'utilisation du diméthyl-formamide comme solvant. Leurs résultats confirment le grand intérêt de cette méthode pour l'analyse des acides aminés.

En spectrométrie de masse, les spectres des dérivés *tert*-butyl-diméthyl-silyles sont extrêmement simples et montrent un ion prédominant à  $[M-57]^+$  qui provient de la perte d'un groupement *tert*-butyle ( $M-C(CH_3)_3$ ). Certains dérivés fournissent l'ion  $[M-R]^+$  à  $m/z$  302, mais surtout les ions  $[M-302]^+$  et  $[M-159]^+$  caractéristiques de chaque acide aminé (Mawhinney T. P. et coll., 1986).

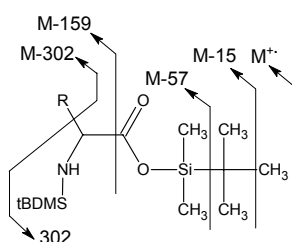


Figure 35: principaux ions des dérivés *tert*-butyl-diméthyl-silyles d'acides aminés

## **B. La N(O,S)-acylation d'acides aminés alkyl-estérifiés**

### **1) Estérification de la fonction acide carboxylique**

Pour l'ensemble des dérivés discutés dans cette section, la fonction acide carboxylique est estérifiée par des groupements pouvant aller du méthyle à l'isoamyle. Pour cela, dans la



grande majorité des cas, on utilise un alcool anhydre (méthanol à alcool isoamylique) acidifié en y faisant "buller" du chlorure d'hydrogène gazeux. L'estérification est faite, le plus souvent, lors d'une réaction précédant la dérivation du groupe  $\alpha$ -amino, accompagnée par celle d'autres groupes réactifs. C'est pourquoi, cela nécessite l'évaporation des acides aminés estérifiés avant de conduire la deuxième réaction. Dans la littérature, la concentration de l'acide peut varier de 0,2 N jusqu'à la saturation. En règle générale, on constate que plus la masse moléculaire de l'alcool à brancher est importante, plus la concentration de l'acide et le temps de réaction nécessaires à cela doivent être élevés. Toutefois, l'augmentation de la concentration en acides engendre la dégradation des acides aminés les plus fragiles (Trp). Par ailleurs, l'utilisation des alcools de plus haute masse pose des problèmes de solubilité de certains acides aminés (Cys, Lys, Arg et His). Pour éviter cela, une première méthyl-estérification est appliquée aux acides aminés par l'utilisation de méthanol/HCl anhydre ou de diazométhane. Puis, après évaporation, une seconde estérification (trans-estérification) avec un alcool "plus lourd" peut-être envisagée (Stalling D. L. et coll., 1967). En effet, les méthyl-esters d'acides aminés sont plus solubles que leurs équivalents acides dans les alcools de masse molaire plus élevée. Cette trans-estérification implique une réaction supplémentaire, mais il semble que son rendement soit très élevé. Si la réaction est faite dans des conditions de température et de temps adéquates, cela n'entraîne pas de perte des produits à analyser. Pour éviter cette double réaction, des essais d'estérification en une seule étape par des alcools "lourds", comme le n-butanol, ont été tentés (Roach D. et coll., 1969b). Les auteurs trouvaient de bons rendements, sauf pour Ile qui nécessite un temps d'estérification plus long entraînant la destruction du Trp. Par la suite, cette technique reprise par d'autres équipes, montra des inconvénients, notamment un très faible rendement d'estérification (Canalon P. et coll., 1974).

## **2) Les différentes possibilités d'acylation des acides aminés alkyl-estérifiés**

De nombreuses formes d'acylation ont été développées depuis le début des années 60. On trouve la formation de dérivés dinitrophényles, formyles, propionyles, carbobenzyl-oxydes, benzoyles et pentafluoropropionyles, mais seuls les dérivés acétylés, trifluoroacétylés et heptafluorobutyrylés ont montré suffisamment d'intérêt pour être largement utilisés. C'est pourquoi, nous ne nous intéresserons qu'à ces trois derniers types de dérivés.

En général, la réaction d'acylation est obtenue par l'utilisation d'anhydrides d'acides, bien que dans de très rares cas, on puisse utiliser d'autres types de composés chimiques, comme pour la formation de dérivés N(O,S)-TFA-méthyl-estérifiés par du trifluoroacétate de méthyle et de la

triméthylamine (Ikekawa N., 1963). Par contre, cette méthode ne permet pas la dérivation de Arg, Cys et His qui ne sont pas visibles sur les chromatogrammes. Enfin, d'autres auteurs rapportent une sous-acylation des groupements –OH et –NH<sub>2</sub> des branches radicalaires. C'est pourquoi au regard de l'ensemble des techniques déjà publiées, il est recommandé de n'utiliser comme agent d'acylation que les anhydrides (Husek P. et coll., 1975).

### **a) Les dérivés acétylés**

L'anhydride acétique a été largement utilisée pour la synthèse des dérivés N(O,S)-acétylés d'esters différents: esters de méthyles (Darbre A. et coll., 1965b), de propyles (Adams R. F., 1974), de butyles (isobutyles) (Yongs C. G., 1959; Johnson D. E. et coll., 1961) et d'amyles (isoamyles) (Johnson D. E. et coll., 1961).

En 1959, Youngs avait obtenu des pics correspondants aux esters n-butyliques N(O,S)-acétylés pour 6 acides aminés simples à chaîne latérale ramifiée. Plus tard, une autre équipe (Johnson D. E. et coll., 1961) a comparé différents types d'esters (butyle, isobutyle, amyle et isoamyle) de 36 acides aminés acétylés, dont 18 existants dans les protéines. Cette étude montra que His et Arg sont faiblement estérifiés et que Trp et Cys ne sont pas élués. En 1965, seuls Arg, Cystine et His posent des problèmes (Lamkin W. M. et coll., 1965). En 1974, une équipe (Adams R. F., 1974), sachant que le groupement guanidine de Arg n'est pas dérivé par l'utilisation de l'anhydride acétique, développe un agent acylant fortement basique (acetone/triéthyl-amine/anhydride acétique, 5/2/1 v/v/v) qui permet la dérivation des groupes protonés en 30 s à 60°C. Toutefois, ce réactif n'est pas totalement efficace sur les groupements guanidines, car il ne permet que 78% de conversion (90 à 99% pour les autres acides aminés). Lors de cette étude, l'estérification choisie utilisait du propanol/HCl 8 N en 15 min à 100°C. Ainsi, la dérivation complète des acides aminés ne prenait pas plus de 25 min et donnait des résultats satisfaisants, en termes de résolution et de coût. Par ailleurs, les dérivés N(O,S)-acétylés sont relativement stables dans le temps. Toutefois, cela n'a pas empêché qu'ils aient été rapidement supplantés par les dérivés TFA et HFB, essentiellement pour raison de trop grande volatilité.

### **b) Les dérivés trifluoroacétylés**

L'anhydride trifluoroacétique est un agent acylant très puissant, largement utilisé pour la dérivation de tous les groupes protonés, exceptés les groupes carboxyles.

Les premières tentatives d'analyse d'acides aminés méthyl-estérifiés N(O,S)-trifluoroacétylés ont montré de nombreux problèmes associés à la technique de dérivation, à la stabilité des dérivés et à la décomposition de plusieurs d'entre eux dans certains types de colonnes (Saroff H. A. et coll., 1960; Ikekawa N., 1963). Ce sont surtout les travaux de l'équipe de Darbre et Blau qui ont permis d'expliquer le comportement des dérivés TFA, qui peut être résumé ainsi:

(1) La méthylation par le diazométhane doit être évitée, en raison de la perte importante des méthyl-esters d'Ala, Val, Gly et Leu lors de l'évaporation du solvant (éther) (Blau K. et coll., 1965; Darbre A. et coll., 1965a).

(2) Aucun traitement des dérivés TFA ne doit être fait avec un alcool, afin d'éviter la dégradation des groupements O- et S-TFA (Darbre A. et coll., 1965b). En effet, les dérivés bis-TFA des acides aminés Tyr, Ser, Thr, Hypro et Cys sont décomposés en mono-TFA (avec les groupements -OH et -SH libres). Cela ne les empêche pas d'être volatils, mais, en raison de leur fragilité, ils ne peuvent plus être quantifiés correctement, d'autant plus que ce phénomène induit l'apparition de nouveaux pics.

(3) Cette même fragilité est à l'origine d'une dégradation additionnelle des groupements O- et S-TFA, rapportée sur certains types de colonnes et injecteurs (Darbre A. et coll., 1966). En effet, des problèmes de décomposition des dérivés apparaissent avec l'utilisation d'injecteurs et de colonnes métalliques. Plus tard, ces inconvénients seront partiellement résolus par l'utilisation de techniques d'injections directes sur des colonnes de verre.

Il est à noter que, tout comme d'autres avant eux (Johnson D. E. et coll., 1961), l'équipe de Darbre et Blau préférait l'utilisation des dérivés N(O,S)-TFA amylo-estérifiés (Darbre A. et coll., 1965a et 1967 et Blau K. et coll., 1965 et 1967). En effet, ces composés sont moins volatils que les méthyl-esters et subissent moins de pertes. Les membres de cette équipe s'essayèrent tout de même aux dérivés N(O,S)-TFA méthyl-estérifiés, pour lesquels, ils proposèrent une méthylation par du méthanol/HCl et une acylation à l'anhydride trifluoroacétique à 20°C pendant 30 min, sauf pour Arg qui nécessite 140°C pendant 10 min. Mais dans ces conditions, His n'a qu'un très faible rendement de dérivation (environ 5%) (Darbre et coll., 1968 et Islam A. et coll., 1969). Par ailleurs, il faut éviter la perte des dérivés méthyl-esters N(O,S)-trifluoroacétylés lors du séchage par évaporation. Pour cela, il est possible d'évaporer précautionneusement l'agent acylant à 0°C (Darbre A. et coll., 1968 et Islam A. et coll., 1969).

Dans la même période l'équipe de Gehrke ( Gehrke C. W. et coll., 1965,1966, 1968, 1971b et 1973; Lamkin W. M. et coll., 1965; Stalling D. L. et coll., 1966; Roach D. et coll., 1969a,b et c et Kaiser F. E. et coll., 1974), tout comme d'autres (Zomzely C. et coll., 1962 et Lachovitzki

N. et coll., 1970) préféraient la formation de dérivés N(O,S)-TFA butyl-estérifiés. Ce type de dérivés a, à peu de chose près, le même comportement que les dérivés utilisés par l'équipe de Darbre, mais il semble être moins sujet à des pertes, lors de l'évaporation des différents solvants durant les phases successives de dérivations. Au début, l'acylation est obtenue par l'utilisation de TFAA à température ambiante pendant 120 min (Gehrke C. W. et coll., 1965), plus tard, pendant 30 min. Toutefois, les deux techniques ne permettent pas une dérivation correcte de Arg qui ne donne pas de pic, et du Trp qui en donne deux. Pour éviter cela, l'acylation peut-être faite par un mélange TFAA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/4, v/v) à 150°C pendant 5 min ou 2 h, à température ambiante dans un tube fermé par un bouchon de téflon (Stalling D. L. et coll., 1966). Quant à l'estérification, elle peut-être obtenue directement par du n-butanol/HCl 3 N à 110°C pendant 15 min (Roach D. et coll., 1969b). Dans ce cas, le problème de solubilité de la cystine et des acides aminés basiques est résolu par ultra-sonication pendant 15 s, bien qu'une autre équipe n'ait pas trouvé ceci satisfaisant pour des petites quantités de l'ordre de la nanomole (Cancalon P. et coll., 1974). C'est pourquoi elle proposa que la butyl-estérification soit faite dans un mélange HCl 3,5 N n-butanol/dichloro-méthane (9/1, v/v) avec ultra-sonication. Il est aussi possible de faire une trans-estérification à 90°C, mais, le rendement de cette réaction sur la Thr et la cystine est légèrement inférieur à 95%. Pour éviter cela il faut faire la trans-estérification à 100°C (Gehrke C. W. et coll., 1965 et Stalling D. L. et coll., 1967). Il est à noter que les dérivés N(O,S)-TFA butyl-estérifiés sont des composés assez stables en condition relativement anhydride. Toutefois, ils sont sujets à une décomposition dans certains types d'injecteurs et colonnes. Plus tard, Gehrke proposa sur la base de ces travaux, une méthode aboutie d'analyse quantitative des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse. Celle-ci s'applique aussi bien au dosage des acides aminés constitutifs des protéines, qu'à ceux contenus dans les liquides biologiques. Cette technique nécessite l'utilisation d'un système d'analyse à deux colonnes, une contenant une phase de type polyester pour la séparation de 17 acides aminés, l'autre de type silicone pour la quantification de His, Arg et Cys (Gehrke C. W. et coll., 1968, 1971b et Kaiser F. E. et coll., 1974). Enfin, un condensé de cette méthode, permet à Gehrke de proposer une analyse à l'aide d'une seule colonne (Gehrke C. W. et coll., 1973).

Plusieurs autres types d'estérifications ont été rapportés dans la littérature comme l'éthyl-, la propyl- et l'isopropyl-estérification, mais en raison de leur très faible utilisation, nous ne développeront pas ici ces méthodes.

Il est à noter que l'utilisation de dérivés fluorés présente un gros avantage lorsque la détection des composés est faite par l'intermédiaire d'un détecteur à capture d'électron. Cela permet

d'augmenter fortement la sensibilité des appareils de chromatographie en phase gazeuse notamment par rapport à un détecteur par ionisation de flamme (Zumwalt R. W. Et coll., 1971). Ainsi une quantité de 1 à 50 pg d'acides aminés peut-être clairement détectée.

### **c) Le cas particulier des dérivés heptafluorobutyrylés**

#### **(1) *Introduction***

Le problème de la perte des dérivés N(O,S)-trifluoroacétylés et -acétylés les plus volatils (Gly, Ala, Val, Ser, Thr, Ile, Leu, Pro et Cys) lors des phases de séchage, a amené certaines équipes à rechercher un autre agent acylant. Les meilleurs résultats furent obtenus avec l'anhydride heptafluorobutyrique. Tout comme le TFAA et l'anhydride acétique, il s'agit d'un agent acylant très puissant qui permet la formation de dérivés encore plus stables, notamment en présence d'eau. Les dérivés N(O,S)-HFB sont moins volatils que les N(O,S)-TFA correspondants. Ils peuvent donc théoriquement subir une évaporation avant leur injection, afin de se débarrasser de l'agent acylant en excès et de concentrer les dérivés pour l'analyse de petites quantités. De nombreux types de dérivation ont été développés en faisant varier l'estérification. Il s'agit de la méthyl-, propyl- (Moss C. W. et coll., 1971 et 1974; Jonsson J. et coll., 1973 et March J. F., 1975), butyl- (Pollock G. E., 1967 et Zumwalt R. W. et coll., 1971), isobutyl- (MacKenzie S. L. et coll., 1974, 1975, 1977, 1979a et b, 1984 et 1987 et Pearce R. J., 1977, Chauhan J. et coll., 1982) ou isoamyl-estérification (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973 et Felker P. et coll., 1975). En ce qui concerne les acides aminés les plus légers, Zanetta et Vincendon préfèrent l'isoamyl-estérification à celle des dérivés propylés, car ils les trouvent trop volatils pour être évaporés sans perte. De plus, ils remarquent que la séparation globale d'un mélange de tous les dérivés d'acides aminés est meilleure sur les colonnes remplies dont ils disposent à l'époque.

#### **(2) *Les différentes estérifications rencontrées dans la littérature pour ce type de dérivés.***

En ce qui concerne l'estérification, de nombreuses équipes préfèrent une réaction unique pour éviter la multiplication des manipulations, ainsi que la perte de rendement. La propylation utilisée par Moss et Jonsson, reprend la méthode de Coulter (Coulter L. R. et coll., 1968). C'est une estérification directe des acides aminés par du propanol/HCl 8 N à 100 ou 110°C pendant 10 min. Quelques années plus tard, March, reprend ces travaux et change quelques détails dans le protocole, tels que la force des acides, les temps et les températures de réactions. Il préfère utiliser du propanol/HCl 6 N (plus facile à fabriquer) à 150°C pendant 3

min 30. Pour la butylation, Zumwalt emploi du n-butanol/HCl 3 N à 100° pendant 30 min. Pour l'isobutylation, MacKenzie utilise d'abord de l'alcool isobutylique/HCl 3 N à 110°C pendant 1 h (MacKenzie S. L. et coll., 1974), puis, à 120°C pendant 20 min (MacKenzie S. L. et coll., 1975). Et enfin, après une étude très poussée, à 120°C pendant 30 min (MacKenzie S. L. et coll., 1979a, 1984 et 1987). Toutes ces méthodes de dérivation se font en une seule étape, mais si l'on se réfère aux travaux de l'équipe de Gehrke, la trans-estérification semble meilleure sur le plan de la solubilité des acides aminés dans les alcools "lourds" (Stalling D. L. et coll., 1967). C'est pourquoi, l'isoamyl-estérification de Zanetta et Vincendon suit ce principe en produisant d'abord des méthyl-esters avec du méthanol/HCl 1,25 N à température ambiante pendant 30 min, avant de les trans-estérifier par de l'alcool isoamylique/HCl 1,25 N à 110°C pendant 1 h 45 (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Dernièrement, nous (Pons A. et coll., 2003) avons apporté quelques changements à ce protocole, parce que le but consistait, non seulement en une trans-estérification des acides aminés, mais aussi en une transformation des O-méthyl-glycosides des hexosamines en O-isoamyl-glycosides. Nous développerons ces modifications dans la partie Résultat de ce travail. Quant à Felker et son équipe, ils utilisent un mélange méthanol/chlorure d'acétyle à 20%, pendant 30 min à 70°C, puis ils trans-estérifient les méthyl-esters par un mélange alcool isoamylique/chlorure d'acétyle à 20%, 2 h 30 à 100°C.

### ***(3) Les différentes méthodes d'acylation par des groupements HFB***

Pour l'acylation, l'HFBA a été utilisé seul (Jonsson J. et coll., 1973 et MacKenzie et coll., 1979b, 1984 et 1987), en solution avec de l'acétate d'éthyle (Moss C. W. et coll., 1971 et 1974; MacKenzie et coll., 1974 et Felker P. et coll., 1975), ou avec de l'acétonitrile (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Quelle que soit la méthode utilisée, l'acylation est conduite à 150°C pendant 5 à 10 min. Dans certaines de ces études, il est mentionné que l'évaporation de l'HFBA, en excès à la fin de la dérivation, induit une dégradation du dérivé His di-HFB sous sa forme mono-HFB. Ainsi, en accord avec une étude précédente (Roach C. W. et coll., 1969c), il est possible d'injecter les dérivés HFB en co-injectant du HFBA ou de l'anhydride acétique, afin de faire subir à l'His une re-conversion à l'intérieur même de la colonne. Dans le premier cas, il y a conversion de la forme mono- à la forme di-HFB (Jonsson J. et coll., 1973), dans le deuxième cas, de la forme mono-HFB à la forme mono-HFB-mono-acétyle (Moss C. W. et coll., 1971). Zanetta et Vincendon (1973) qui n'utilisent pas cette technique, obtiennent l'His sous les deux formes, mono-HFB et di-HFB en deux pics bien résolus, les proportions de

ces deux formes variant en fonction des conditions de l'injection. Il est à noter que la co-injection, si elle n'est pas préjudiciable pour certaines colonnes remplies utilisées auparavant, est catastrophique pour les colonnes capillaires modernes. Il n'est donc plus envisageable d'appliquer cette technique de co-injection.

#### ***(4)Caractéristiques de cette technique***

L'utilisation des dérivés N(O,S)-HFB estérifiés, bien qu'un peu plus chère que celle des dérivés TFA, semble plus aisée car elle ne nécessite pas autant de précautions, notamment en ce qui concerne le séchage des dérivés pour leur concentration ou l'évaporation des excès de réactif. Par ailleurs, ces dérivés ont l'avantage d'être plus stables et ont un temps de rétention plus court, ce qui permet de raccourcir le temps nécessaire à une analyse. Mais surtout, ces dérivés ne requièrent l'utilisation que d'une seule colonne chromatographique pour la séparation efficace de l'ensemble des 20 acides aminés constituant les protéines. Enfin, une quantité de 0,1 à 100 nmole de chaque acide aminé suffit à former les dérivés. En outre, environ 0,1 ng de chacun d'entre eux est détectable sur un chromatographe à détection par ionisation de flamme. Ainsi, la quantité de 1 à 25 µg d'une protéine suffit pour l'analyse de sa composition globale en acides aminés, (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Dans le cas de l'emploi d'un détecteur à capture d'électron, encore plus que pour les dérivés N(O,S)-TFA (3 à 10 fois plus), cela permet d'augmenter la sensibilité des appareils chromatographiques puisque 1 à 2 pg d'acides aminés dérivés sont détectables (Zumwalt R. W. et coll., 1971).

Une équipe (March J. F., 1975) utilise un agent antioxydant, le 2,6-di-t-butyl-hydroxytoluène (BHT), durant la phase d'acylation pour la formation de dérivés N(O,S)-HFB propyl-estérifiés. Cela évite la variabilité de réponse de Met et His. Cet agent semble efficace, sans affecter la réponse des autres acides aminés. Cette technique sera reprise avec succès par d'autres équipes pour la formation de dérivés N(O,S)-HFB isobutyl-estérifiés d'His et de Trp (Pearce R. J., 1977). Par contre, d'autres auteurs qui ont testé le même produit ainsi que le t-butyl-hydroxyanisole (BHA), ne trouvent aucun effet bénéfique sur His, Met et Trp (MacKensie S. L. et coll., 1979b et 1987). Ils pensent que l'oxydation provient de l'utilisation d'HFBA contaminé et que l'emploi d'un agent acylant très pur (>99%) évite cette déconvenue et donne de bons résultats pour ces trois acides aminés sans utilisation d'antioxydant.

#### ***(5)La spectrométrie de masse***

En 1975, une étude (Felker P. et coll., 1975) reprend les travaux de Zanetta et Vincendon, sur les dérivés N(O,S)-HFB isoamyl-estérifiés, avec l'aide de la spectrométrie de masse. Cette étude montre que peu d'acides aminés permettent d'obtenir l'ion moléculaire ( $M^{+}$ ) et seulement en très faible proportion. Certains dérivés montrent les ions  $[M-CH_3]^+$  et  $[M-(CH_3)_2-CH]^+$  (M-43), mais, tous présentent les ions  $[M-(CH_3)_2-CH(CH_2)_2]^+$  (M-71) et  $[M-(CH_3)_2-CH(CH_2)_2OCO]^+$  (M-115). Ceux-ci permettent de déterminer la masse moléculaire et donc le type d'acide aminé en cas d'absence de  $M^{+}$ , sauf dans le cas des aminoacides de mêmes masse (Leu, Ile et Nle par exemple). Toutefois, ces acides aminés peuvent tout de même être discriminés les uns des autres, grâce à des variations de l'intensité de certains ions sur les différents spectres correspondants à ces isomères. Souvent, le fragment prédominant correspond à l'ion de masse  $m/z$  71 provenant du groupement isoamyle. Les aminoacides aromatiques sont caractérisés par des ions spécifiques de la partie aromatique, ce qui facilite leur reconnaissance. Les acides aminés soufrés (Cys, Cystine et SCCys) et basiques ont aussi des ions spécifiques. Plus d'informations à ce sujet seront données dans la partie réservée aux résultats (Pons A. et coll., 2003).

Felker et coll. concluent que les dérivés His, Cys, cystine et Trp ne peuvent pas être correctement analysés par la formation de dérivés N(O,S)-HFB isoamyl-estérifiés, en raison de la fragilité des groupements acyles de l'His et de la destruction, en condition acide, des cystine, Cys et Trp. Pour ces auteurs, il en est de même pour toutes les autres méthodes, aussi, ils préconisent le développement de conditions spéciales pour l'analyse de ces acides aminés. Toutefois, ils soulignent les intérêts des dérivés N(O,S)-HFB isoamyl-estérifiés qui sont: le coût, la rapidité, la sensibilité et l'exactitude des données obtenues pour la plupart des acides aminés.

En 1977, c'est au tour de MacKenzie et coll. de s'intéresser à la spectrométrie de masse par impact électronique des dérivés d'acides aminés N(O,S)-HFB isobutyl-estérifiés. Leurs résultats s'apparentent à ceux de Felker (MacKenzie S. L. et coll., 1977), c'est pourquoi, nous ne les développerons pas.



## **STRATEGIE D'ANALYSE QUALITATIVE UTILISEE DANS LE DOMAINE DES CONSTITUANTS DES GLYCOCONJUGUES.**

Dans la partie introductive que nous venons de présenter, nous avons résumé les principales approches utilisées par de très nombreuses équipes pour l'analyse des constituants des glycoconjugués. C'est-à-dire, non seulement des monosaccharides (y compris l'étude spécifique de la diversité des acides sialiques), mais également des acides gras et bases sphingoïdes des glycolipides et des acides aminés des glycoprotéines. Il convient de noter que si certaines d'entre elles sont très efficaces sur des composés purifiés et accessibles en grande quantité, elles ne le sont pas forcément quand on ne dispose que de très faibles quantités de matériel qui peut souvent être complexe (homogénat total de cellules) ou contaminé par des artefacts induits par les étapes de purification. En outre, ces études, d'intérêt essentiellement historique (bien que certaines soient encore tout à fait d'actualité), n'utilisaient pas la GC/MS, mais pour l'essentiel, la GC seule sur des colonnes remplies. Or, ces dernières (colonnes métalliques, ou plus rarement, colonnes de verre avec un injecteur métallique) présentent au moins 1000 fois moins de plateaux théoriques pour les séparation des composés que les colonnes capillaires modernes. Mon directeur de Thèse a lui même, il y a plus de 30 ans, effectué des essais comparatifs qui montraient l'énorme influence des propriétés de l'appareil de GC sur les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus à cette époque. Il m'a longuement expliqué que bien des tentatives étaient vouées à l'échec par l'utilisation de colonnes métalliques avec des injecteurs métalliques où l'échantillon était injecté à 260°C directement sur le métal, puisque dans ces cas, il existait une dégradation intense des dérivés quelle que fût leur nature.

C'est pourquoi, cette revue doit être réexaminée en fonction des possibilités offertes par les nouveaux concepts des appareils (colonnes capillaires, injecteur de Ross, couplage aisé à la spectrométrie de masse et interprétation informatique des résultats). Le fait que nous fassions appels à des techniques développées initialement, dans leur formes primitives il y a plus de trente ans, ne doit pas être considéré comme une mise à jour, mais comme un moyen d'atteindre, aujourd'hui, une efficacité méthodologique dans l'analyse des glycoconjugués qui puisse répondre à la majorités des problèmes structuraux posés dans cette problématique.

En fait, l'objectif de nos mises au point méthodologiques était de proposer des méthodes extrêmement sensibles, quantitatives, reproductibles, simples et nécessitant le moins de manipulations possibles de l'échantillon qui permettraient d'obtenir le maximum d'informations sur tous les constituants de tous les types de glycoconjugués. En d'autres termes, était-il possible, disposant d'un échantillon mis dans un tube de réaction convenable, d'en analyser quantitativement tous les constituants sans que cet échantillon ne sorte du tube initial, c'est-à-dire, sans pertes possibles (lors d'extraction, de centrifugation, de purification sur colonne, etc.) de l'un ou l'autre des constituants initialement présents.

La réponse à cette question, que nous apportons dans cette thèse, est clairement oui! Oui, à la condition de faire les bons choix dès le départ. Etant donné la complexité des systèmes biologiques et le nombre de composés inconnus présents dans un échantillon, il était évident que ces analyses ne pouvaient être conduites qu'en spectrométrie de masse et en routine dans le mode d'ionisation de l'impact électronique qui seul peut fournir une carte d'identité de chacun des constituants. Encore fallait-il trouver les méthodologies de coupures permettant de libérer les constituants des glycoconjugués sans qu'il soit nécessaire de purifier ou de simplifier le mélange. En outre, il faut choisir des protocoles corrects de volatilisation des constituants permettant de produire des dérivés très stables et relativement peu volatils (élimination des réactifs et produits sous courant d'azote à température ambiante et sans pertes). Il faut également une séparation optimale des différents constituants sans interférence notable avec les contaminants classiques des manipulations biochimiques (sels, détergents, phtalates, milieux de culture, acrylamide, Tris, Gly, etc). De plus, il apparaissait important de simplifier au maximum le choix des réactifs, le système chromatographique, les programmes de température et le système d'analyse, de façon à ce que l'appareil sur lequel nous effectuons ces analyses soit compatible avec toutes les autres analyses effectuées dans le Laboratoire sur la structure des glycoconjugués. La même colonne chromatographique, mais des programmes différents de température et de recouvrement des ions (calibrés en fonction de la nature des composés analysés), permet de passer du programme "HFB" au programme "dérivés méthylés", en moins d'une minute (programmes pré-enregistrés).

Pour ce qui concerne les glycoconjugués (mais pas seulement ceux-ci), la méthanolyse acide en milieu anhydride était évidemment la méthode de choix, car aux exceptions près discutées spécifiquement dans notre mémoire, elle donne un bon rendement de coupure en donnant de façon reproductible des dérivés stables. En outre, le réactif de la réaction peut être éliminé sans problème sous courant d'azote à température ambiante. Inversement, les hydrolyses (ou méthanolyse alcalines) susceptibles de libérer les constituants des céramides ne sont

d'aucune utilité en glycobiologie puisque la liaison O-glycosidique des gangliosides n'est coupée qu'à des taux extrêmement faibles. Ainsi, les composés libérés par méthanolyse acide (O-méthyl-glycosides, méthyl-esters, voire dérivés O-méthyl de certaines bases sphingoïdes) ne possédaient que des fonctions amines, alcools ou phénols (ou fonctions plus complexes) qui toutes pouvaient être bloquées par un agent acylant puissant en une seule étape. Le choix s'est porté sur les dérivés HFB, puisqu'ils étaient les seuls permettant l'évaporation complète de l'excès de réactif (HFBA) et de son produit après réaction (HFBA) sous courant d'azote sans perte aucune des différents constituants (à l'exception des FAMES à très courtes chaînes). Ce choix s'est avéré d'autant plus judicieux que ces dérivés HFB n'interagissent que très peu avec les phases stationnaires les plus communes utilisées en GC (méthyl-siloxanes) ce qui permet une séparation aisée entre les dérivés des sucres et ceux ayant de longues chaînes aliphatiques (très fortement retenus). En outre, le fluor et donc les ions produits en EI par fragmentation des dérivés HFB ne sont pas communs dans la nature, tant et si bien qu'il est très aisé d'identifier les composés portant un ou plusieurs de ces groupes dans un chromatogramme extrêmement complexe, sans interférence significative avec les ions inévitables relargués par la phase stationnaire. Des études non publiées concernant l'utilisation conjointe de la méthylation et des HFB pour l'analyse d'oligomannosides ont en effet montré qu'un groupement HFB donnait une réponse environ 4 fois plus grande qu'un O-méthyl-glycoside per-méthylé. En fait, cette réponse reste globalement proportionnelle au nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule analysée.

Ces dérivés, aisément identifiés par reconstitution de chromatogramme avec les ions spécifiques des HFB ( $m/z$  169), permettent de les discriminer du bruit de fond inévitable (produits de dégradation des phases, phtalates). A tel point qu'une analyse globale des acides sialiques constitutifs d'un glycoconjugué peut être réalisée non seulement sur le plan qualitatif mais aussi quantitatif sur le chromatogramme reconstitué. Pour ce qui concerne les glycosphingolipides, une simple méthanolyse suivie d'une dérivation par l'HFBA permet d'identifier tous les constituants de ces composés: non seulement les O-méthyl-glycosides; mais également les acides gras (sous forme de FAMES), avec un avantage considérable pour ceux qui sont hydroxylés en diverses positions (identifiés par leur ion à  $m/z$  169 et leur temps de rétention); et les bases sphingoïdes (toutes identifiées par reconstitution de chromatogramme à l'aide de l'ion à  $m/z$  238 spécifique des  $\alpha$ -aminoalcools). Certes, reste le problème des artéfacts induits par la méthanolyse anhydre (O-méthylation en 3 et en 5 des sphingénines). Mais ceci n'est plus un désavantage en GC/MS puisque le composé est identifié par trois pics caractéristiques, en proportions reproductibles et donc parfaitement

quantifiable. Le problème soulevé initialement par le fait que les phytosphingosines donnent deux pics (en proportions reproductibles), dont l'un correspond à une forme furane (déhydratation 1-4), n'est également plus un inconvénient mais un avantage. En effet, cette forme furane montre trois ions caractéristiques d'intensités voisines (à  $m/z$  252, 256 et 494) permettant de s'assurer de sa présence et de vérifier cette présence par la nature de l'autre pic correspondant à la forme non modifiée. Le même problème concerne la famille des 6-hydroxy-sphingénines pour lesquelles 5 pics sont obtenus après méthanolyse, dont les 4 majeurs, dotés d'ions extrêmement spécifiques, permettent d'assurer la présence de ce type de composé dans les échantillons biologiques. Certains autres composés peuvent être modifiés, mais l'analyse théorique (basée sur les données de la littérature et de la GC/MS) permet de les identifier sans aucune ambiguïté.

La GC/MS, souvent utilisée en parallèle avec la RMN a permis de résoudre plusieurs problèmes comme celui de la coupure de la liaison N-glycosidique, contestée dans la majorité des publications même relativement récentes. En effet, cette liaison est entièrement coupée par méthanolyse et le produit résultant n'est pas le O-méthyl-glucoside de la GlcN mais la GLcN. Ce composé est parfaitement quantifiable dans notre système (plus difficile à doser mais observable avec les dérivés TMS). En fait, sur le plan chimique, la GlcNAc impliquée dans la liaison N-glycosidique ne se comporte pas chimiquement comme une GlcNAc O-liée, mais comme une 1-glycosylamine de la GlcNAc. Ainsi, le produit majeur observé de la coupure par méthanolyse correspond au produit d'hydrolyse, probablement tardive de cette 1-glycosylamine.

Au fur et à mesure que des problèmes d'analyse de composés divers se sont posés, nous avons essayé de les résoudre en suivant l'attitude de J. P. Zanetta pour les protéoglycannes sulfatés. Il est notoire que la liaison GlcA-HexNAc (GlcA-Hex et deoxy-Hex, également) est relativement stable durant la méthanolyse. La conclusion logique de ces constatations était de savoir si l'on pouvait retrouver les di-saccharides correspondants. Les résultats obtenus avant notre arrivée montrent que c'est effectivement le cas et que l'analyse par GC/MS permet d'apporter des informations qualitatives et quantitatives essentielles sur la structure des GAG constitutifs d'un protéoglycannes (certaines études ont permis de déterminer la position de la liaison).

Les connaissances obtenues dans ce domaine nous ont permis de résoudre un problème assez important dans le domaine des ancrés glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). En effet, la glucosamine n'est pas une GlcNAc (toujours  $\beta$ ) mais une GlcN ( $\alpha$ ) liée à un inositol (Ins). Toutes les données de la littérature montrent que cette liaison n'est pas coupée (par l'effet

protecteur du groupement  $\text{NH}_3^+$  de la GlcN en milieu acide). Mais si l'on bloque cette fonction amine par un groupe HFB avant la méthanolyse, cette liaison devient parfaitement sécable. En fait (et ceci sera explicité par la suite), un protocole faisant intervenir une méthanolyse/acylation suivie d'un autre cycle méthanolyse/acylation permet d'obtenir une composition molaire d'un composé GPI.

Certes, il n'est pas toujours possible de résoudre tous les problèmes d'analyse fine de la structure des bases sphingoides ou des acides gras (positions des ramifications, des désaturations, des cyclopropanes), mais ces "détails" peuvent globalement être mis en évidence par les différences de temps de rétention et les modifications des spectres de fragmentation. Nous avons également testé l'hypothèse de coupler cette méthode des HFB et celle des pyrrolidones sur des échantillons témoins mais complexes (peau humaine). Ces études suggèrent une parfaite adaptation entre les deux méthodes. La conclusion reste dans le flou car il aurait fallu utiliser des composés standard de structures parfaitement connues. Néanmoins, un très grand nombre de problèmes analytiques peuvent être résolus, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, aussi bien sur des échantillons purifiés que sur des mélanges aussi complexes que des extraits lipidiques totaux de cellules ou de tissus.

Pour ce qui concerne les glycoprotéines, les méthodes que nous avons mises au point permettent l'analyse de tous les constituants des glycoprotéines en trois étapes successives de GC/MS, l'échantillon restant dans le même tube de réaction: une première étape d'hydrolyse douce qui permet d'analyser la diversité des acides sialiques, une deuxième étape de méthanolyse qui permet d'analyser les monosaccharides (di- ou tri-saccharides) et, éventuellement les acides gras, et une troisième étape d'hydrolyse des protéines qui permet l'analyse des acides aminés. Lors de cette étape, grâce à la modification de His et Trp, ces composés deviennent parfaitement dosables, de même que les C-mannosides. Ces approches permettent donc d'avoir des informations qualitatives et quantitatives sur tous les constituants des glycoprotéines qu'elles soient purifiées ou non.



# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**





# ANALYSE DES DERIVES HFB DES O-METHYL-GLYCOSIDES

## I. Introduction

Dans la partie "généralités" de ce travail, nous avons mentionné que dans bien des cas une des phases de l'analyse de la composition en monosaccharide des glycoprotéines et glycolipides fait intervenir la libération des monosaccharides par méthanolyse acide anhydre. Une telle méthode permet une libération quasi quantitative de dérivés stables sous la forme O-méthyl-glycosides. Cette étape de libération est suivie par la formation de dérivés qui permettent de rendre volatils les O-méthyl-glycosides en les protégeant du problème de dégradation thermique. Depuis les travaux de Sweeley en 1963, c'est la formation de dérivés TMS qui est devenue la méthode la plus communément utilisée. Toutefois, l'utilisation des dérivés triméthyl-silylés des O-méthyl-glycosides présente quelques inconvénients: (1) ces dérivés sont instables dans le temps et sont très sensibles à la présence de traces d'eau qui induit leur hydrolyse; (2) lors de l'analyse d'échantillons comportant des hexosamines et des acides sialiques, une étape intermédiaire de ré-acétylation de ces composés était nécessaire avant la formation des dérivés TMS, car les agents silylants de l'époque n'étaient pas assez puissants pour dériver les fonctions amines. Non seulement cette ré-acétylation était consommatrice de temps mais encore, le rendement de la réaction était difficile à contrôler. Ainsi, le rapport molaire des hexosamines et des acides sialiques était susceptible de fluctuer d'une expérience à l'autre. Actuellement, avec l'utilisation de produits triméthyl-silylants plus puissants, la ré-acétylation n'est plus nécessaire, car les fonctions amines sont dérivées par un groupement triméthyl-silyl. Toutefois, les liaisons de type N-Si sont instables, ce qui entraîne leur dégradation, notamment à haute température lors de l'injection. C'est pourquoi, les résultats quantitatifs obtenus avec cette méthode sont parfois aléatoires.

Une voie possible de contournement de ces difficultés, consiste en la formation de dérivés volatils par l'utilisation d'agents acylants puissants, qui permettent, en une seule étape, de bloquer à la fois les fonctions alcools et les fonctions amines. Dans ce but, d'autres équipes ont développé les dérivés trifluoroacétylés (Zanetta et Coll. 1972; Sullivan J. E. et coll., 1977 et Pritchard D. G. et coll., 1978). Cependant, les dérivés TFA sont très volatils. Il est donc impossible d'évaporer le réactif d'acylation sans perdre les dérivés les plus légers. Il faut donc injecter directement les dérivés avec leur milieu réactionnel, ce qui n'est pas gênant pour les

colonnes remplies, mais qui est très dommageable pour les colonnes capillaires. C'est pourquoi, afin de pouvoir utiliser ce type de colonnes, notre équipe a pensé, en 1999, qu'il était possible de résoudre ce problème en formant des dérivés moins volatils, comme les pentafluoro-propionates ou heptafluorobutyrate (HFB) (Zanetta J. P. et coll., 1999a). Au cours de cette étude, seuls les dérivés HFB ont montré qu'il est possible d'évaporer le milieu réactionnel sans perdre aucun dérivé des O-méthyl-glycosides heptafluorobutyrylés et donc d'obtenir les informations quantitatives les plus exactes possibles.

Au cours de ce chapitre sur l'analyse des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, nous présentons, en partie, des résultats obtenus avant que nous ne débutions nos activités de recherches. Il s'agit de ceux présentés dans différentes publications au moment de notre arrivée dans le groupe (Zanetta J. P. et coll., 1999a et 1999b et Maes E. et coll., 1999). Bien que ces résultats ne nous soient pas imputables, nous avons décidé de les présenter ici. En effet, ils sont indispensables à la compréhension des différents phénomènes qui régissent le comportement de nos dérivés. En outre, les discussions sur les avantages et inconvénients de nos méthodes de libération et de dérivation des monosaccharides font appel à des notions développées dans ces travaux. Il nous semblait donc nécessaire de rappeler ces résultats dans ce mémoire.

## **II. Les conditions analytiques**

Dans la partie "généralités" de ce travail, nous avons mentionné les différentes méthodes d'hydrolyse enzymatique, d'hydrolyse acide et de méthanolyse, permettant de morceler les poly-saccharides. Pour les raisons qui y sont discutées, la plupart des études ayant pour but la détermination de la composition en monosaccharides font, actuellement, intervenir la méthode de la méthanolyse. Dans notre équipe, nous utilisons la technique qui suit.

### **A. Protocole de la méthanolyse**

L'échantillon, contenant ou pas un standard interne (0,2 à 2 µg de lysine), est lyophilisé dans un tube en verre fileté pouvant être fermé par un bouchon avec une pastille de teflon. 0,25 à 0,5 ml de réactif de méthanolyse y est ajouté et la réaction est conduite pendant 20 h à 80°C. Le réactif de méthanolyse est obtenu par dissolution d'HCl gazeux à -50°C dans du méthanol anhydre précédemment redistillé pendant 2 h sur tournures de magnésium. Ensuite, la normalité de l'acide est ajustée à 0,5 N. L'HCl gazeux est préparé par addition goutte à goutte

d'acide sulfurique concentré sur du NaCl cristallisé (Zanetta J. P. et coll., 1972 et 1999a). Il faut noter que le mélange méthanol-HCl se dégrade assez rapidement à température ambiante. Il convient donc de le stocker en petites quantités sous atmosphère d'azote dans des récipients hermétiques à -20°C. Pour son utilisation, ce mélange doit être préalablement ramené à température ambiante avant d'ouvrir le tube afin d'éviter toute contamination par l'eau de l'humidité de l'air.

## **B. Acylation à l'anhydride heptafluorobutyrique**

La puissance de cet agent acylant permet de dériver l'ensemble des fonctions hydroxyles et amines présentes sur les O-méthyl-glycosides obtenus après la méthanolyse (figure 36).

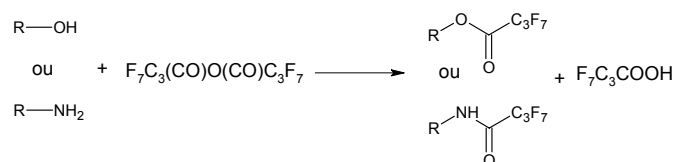


Figure 36: principe de la dérivation par l'anhydride heptafluorobutyrique

### **1) Protocole de dérivation**

Après la méthanolyse, l'échantillon est évaporé sous un courant d'azote. 200 µl d'acétonitrile et 25 µl d'HFBA sont ajoutés au résidu séché. Le tube est refermé hermétiquement et placé dans un bain de sable pendant 30 min à 100°C (Zanetta J. P. et coll., 1999a et Maes E. et coll., 1999) ou mieux 15 min à 150°C (Zanetta J. P. et coll., 1999b). Après refroidissement du tube à température ambiante, l'échantillon est évaporé sous un courant d'azote afin d'éliminer l'excès de réactif ainsi que l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) formé pendant l'acylation. Le résidu est alors repris par un volume d'acétonitrile approprié (50 à 400 µl) avant l'injection en GC-MS. Cet acétonitrile est stocké dans une bouteille fermée en présence de chlorure de calcium calciné de façon à éliminer toute trace d'eau.

### **2) Discussion sur les conditions de l'acylation**

La réaction d'acylation à l'HFBA est conduite dans l'acétonitrile, car ce solvant est capable de solubiliser les O-méthyl-glycosides formés durant la méthanolyse. De plus, il ne donne qu'une seule phase avec l'HFBA, ce qui n'est pas le cas d'autres solvants moins polaires tels que le dichlorométhane, le chloroforme, l'heptane et les acétates de méthyle ou d'éthyle.

Des cinétiques d'acylation des différents O-méthyl-glycosides ont été conduites à différentes températures (température ambiante, 100°C et 150°C) (zanetta J. P. et coll., 1999a). A température ambiante, l'acylation n'est complète qu'après 24 h car cette réaction est très lente pour les monosaccharides possédant une fonction amine (hexosamines et acides sialiques). A 100°C, l'acylation est maximale après 30 min et les réponses relatives molaires ne varient pas pour des temps de chauffage plus importants. A 150°C, la réaction d'acylation est complète après 5 min. Cette température est d'ailleurs recommandée car elle permet un fort reflux des réactifs à l'intérieur du tube, favorisant ainsi l'acylation du matériel sec qui pourrait rester sur les parois du tube. Toutefois, nous préférons pousser ce temps à 15 min, pour avoir la certitude d'une acylation complète.

Il est à noter que, lorsque les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, ainsi formés, sont en présence d'un excès d'HFBA, ils peuvent être conservés pendant plusieurs années, à température ambiante, en tubes hermétiquement fermés.

### **C. La chromatographie de phase gazeuse**

L'appareil de chromatographie de phase gazeuse que nous utilisons est un Shimadzu GC-14A équipé d'un injecteur de Ross et d'une colonne capillaire de 25 m de long avec une phase stationnaire de 0,5 µm d'épaisseur (25QC3/BPI; SGE France). La température de l'injecteur et du détecteur par ionisation de flamme est de 260°C. Le programme de température suit le protocole suivant: 1,2°C/min de 100 à 140°C, suivi de 4°C/min de 140 à 240°C, température qui est maintenue pendant 10 min. Le gaz vecteur (hélium) est à une pression de 0,8 bars.

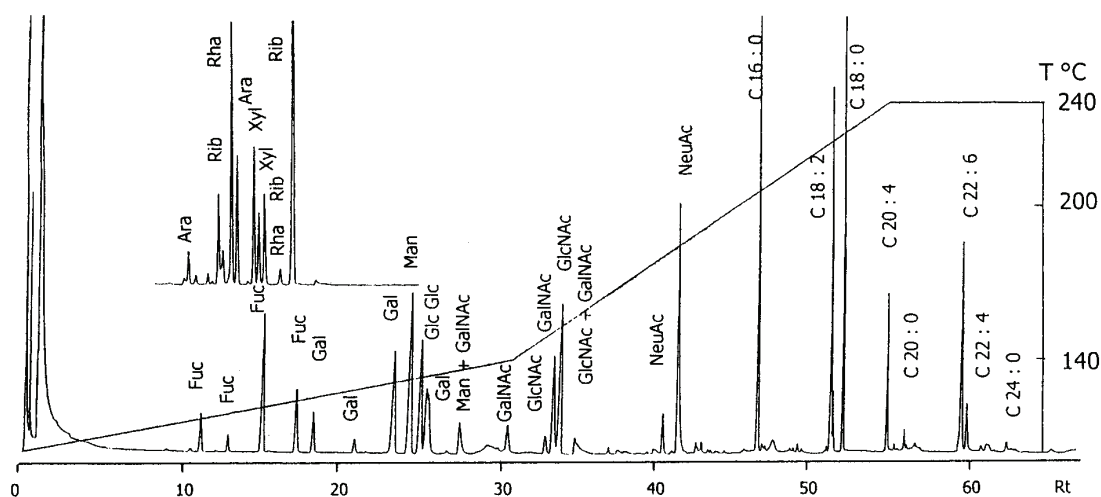
### **D. Cas du couplage à la spectrométrie de masse**

Le chromatographe de phase gazeuse utilisé est un Carlo Erba GC 8000. Il est équipé d'une colonne capillaire de type CP-Sil5 CB Low bleed, de 25 m de long (parfois 30 ou 60 m) et de 0,32 mm de diamètre, dont la phase stationnaire a une épaisseur de 0,25 µm (Crompack France). Cet appareil est muni d'un injecteur de Ross chauffé à 260°C. Les échantillons sont analysés par un programme de température différent de celui de la seule GC. Un palier de 3 min à 90°C est suivie d'une augmentation de la température de 5°C/min jusqu'à 260°C, température qui est maintenue pendant 20 min afin de pouvoir analyser la composition en lipides, notamment pour les acides gras les plus lourds (C28:0). La colonne est couplée à un spectromètre de masse Finnigan Automass II (limite de détection de masse à 1000 u, pour les analyses de routine) ou un Nermag 10-10H (limite de détection de masse à 2000 u, pour

l'analyse poussée des composés de masse supérieure à 1000 u). Les analyses sont faites en mode impact électronique (énergie d'ionisation de 70 eV; température de la source à 150°C) ou en mode d'ionisation chimique en présence d'ammoniac (énergie d'ionisation de 150 eV; température de la source à 100°C). La détection des ions se fait à l'aide d'un détecteur par multiplicateur de photons, qui permet de détecter les ions positifs et négatifs.

## E. Choix du type de colonnes

Pendant les travaux qui ont précédé la mise au point de cette méthode (Zanetta J. P. et coll., 1972 et 1973), il est apparu que les composés fluorés interagissent fortement avec les phases stationnaires de type fluorosilicone, dont ils ne peuvent sortir avant la destruction de la phase à 400°C. Cependant, ils sont faiblement absorbés sur les phases stationnaires de type silicone, contrairement aux composés riches en groupements méthyles qui interagissent fortement sur ce type de colonnes. Ainsi, en dépit de leurs hautes masses, les dérivés HFB des O-méthylglycosides sont élués avant les FAMES et les dérivés des bases sphingoides. Ce phénomène permet donc de visualiser, sur un seul chromatogramme, l'ensemble des constituants des glycolipides, sans qu'il y ait chevauchement entre la zone d'éluion des O-méthylglycosides et celle des constituants lipidiques (figure 37).



**Figure 37: chromatogramme FID des dérivés HFB obtenus après méthanolyse d'un mélange équimolaire de standards de monosaccharides.**

En effet, les plus petits FAMES sont élués avec un temps de rétention supérieur à celui des derniers O-méthylglycosides (Neu). En outre, dans les conditions chromatographiques décrites précédemment et avec ce type de colonnes, la quasi-totalité des isomères de O-méthylglycosides (Xyl, Ara, Rha, Fuc, Gal, Man, Glc, GlcNAc, GalNAc, Neu, Neu-1,7lac,

KDN et KDO) sont séparés les uns des autres, en dehors d'un chevauchement entre un isomère du  $\beta$ -Man et un anomère de la forme furanique de la GalNAc.

On peut noter que la qualité de la séparation reste stable durant au moins six mois d'utilisation intense (environ 600 injections), ce qui indique que ces dérivés n'induisent pas la dégradation de ce type de colonnes.

### **III. Discussion sur la stabilité des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides**

Après acylation, des dérivés HFB de O-méthyl-glycosides, gardés à température ambiante dans le mélange réactionnel (acétonitrile, HFBA) pendant des durées variables, ont été évaporés et analysés. Aucune variation de la quantité des différents dérivés n'a été observée pendant plusieurs années, comme cela avait déjà été démontré avec les dérivés trifluoroacétylés (Zanetta J. P. et coll., 1972). Le même type d'expérimentation a été conduit pour des dérivés stockés, non pas dans le milieu réactionnel, mais dans l'acétonitrile sec après évaporation complète du milieu acylant. Dans ce cas, les dérivés HFB restent stables pendant environ deux jours, excepté pour ceux qui correspondent au résidu GlcNAc impliqué dans la liaison N-glycosidique. En effet, ce dernier composé n'est pas recouvert sous la forme de O-méthyl-glycoside mais sous celle de différents composés plus instables. Enfin, des tests d'ouvertures répétitives des tubes contenant les dérivés O-méthyl-glycosides ont été conduits en injectant plus de dix fois successivement le même échantillon. Cette fois-ci, certains dérivés ont montré une diminution significative de leur RMR. C'est le cas des dérivés correspondants au résidu GlcNAc impliqué dans la liaison N-glycosidique, des formes furaniques de tous les composés (Fuc, Gal, GalNAc, GlcA et GalA), et des dérivés de l'acide sialique et du KDN. Toutefois, les RMR initiales peuvent être restaurées par ajout dans le tube de 25  $\mu$ l d'HFBA et chauffage à 100°C pendant 5 min. Tout cela indique que les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides présentent une forte stabilité dans les milieux neutres et acides (Zanetta J. P. et coll., 1999a). Ainsi, la formation de dérivés HFB semble être une méthode très intéressante pour l'analyse des monosaccharides, notamment par rapport à celle d'autres dérivés. Les dérivés HFB sont au moins aussi stables que les per-méthyl-glycosides et sont beaucoup plus simples à produire. Ils sont également élués à des températures plus basses que les dérivés per-acétylés. Mais surtout, ils deviennent très intéressants comparativement aux dérivés TMS qui restent, de loin, les plus utilisées, bien qu'ils aient une

stabilité maximale de quelques jours pour les plus stables d'entre eux. La différence est surtout importante pour les dérivés aminés de type hexosamines et acides sialiques. En fait, la dérivation de la fonction amine par un résidu HFB reste stable très longtemps car il s'agit d'une liaison amide. Par contre, dans le cas des dérivés TMS, la dérivation de la fonction amine, qui est possible en utilisant des agents silylants puissants (BSA et TMSI), se fait par l'intermédiaire d'une liaison SI-N connue pour être très instable. Ainsi, les résultats quantitatifs obtenus pour les dérivés TMS des O-méthyl-hexosamines restent souvent aléatoires. Ceci est objectivé par le fait que, théoriquement, la RMR d'un composé est proportionnelle à sa masse. Or, les RMR des hexosamines par rapport aux hexoses sont, pour ces dérivés TMS, de l'ordre de 0,5 alors qu'elles devraient être de l'ordre de 1. Ce fait, en plus de certains que nous développerons plus loin, démontre que la dérivation aux HFB est supérieure à celle des TMS.

#### **IV. Détermination des réponses relatives molaires (RMR)**

Les RMR des différents dérivés HFB ont tout d'abord été déterminées avec un mélange équimolaire de différents monosaccharides après qu'ils aient subi une méthanolyse suivie d'une acylation à l'HFBAA. Mais, en raison de la présence d'une quantité non négligeable d'impuretés dans les standards commerciaux, les RMR déterminées n'étaient seulement qu'approximatives. Il a donc fallu comparer ces résultats avec ceux obtenus à partir d'oligosaccharides de compositions connues afin de réajuster les RMR. Les données finales, acquises sur un appareil de GC dont la détection est obtenue par ionisation de flamme (FID), sont présentées dans le tableau 1: (1) elles tiennent compte de tous les isomères des différents monosaccharides (RMR); (2) et seulement de l'isomère majoritaire (RMR<sub>pm</sub>). En effet, il est possible de quantifier les monosaccharides à partir d'un seul des pics correspondants à un de leurs isomères, car les proportions des différents isomères de chaque monosaccharide sont constantes, excepté pour les dérivés du Neu, du Gal dans le cas des O-glycannes et de la première GlcNAc du corps des N-glycannes. Ainsi, la quantification d'un échantillon doit suivre deux étapes: (1) vérification que les proportions des différents isomères sont correctes; (2) calcul de l'aire de chaque monosaccharides basé sur la RMR du pic majeur (RMR<sub>pm</sub>). Dans le cas particulier du Neu, ce composé est élué, selon les échantillons, soit sous la forme d'un seul pic, soit sous celle de deux pics. Dans ce dernier cas, l'anomère majeur représente 88,17% du composé (cette particularité n'a pas encore été expliquée). De même, il faut intégrer et additionner les deux pics correspondants aux produits majeurs (GlcN) issus du

résidu GlcNAc, impliqués dans la liaison N-glycosidique. En effet, leurs proportions varient dans le temps en raison d'un changement très lent des proportions des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  du milieu méthanol/HCl au milieu acétonitrile, puisque ces composés ne sont pas des O-méthyl-glycosides. Une RMR de 0,75 est attribuée à la somme de ces deux composés majeurs.

| Composés                    | RMR/SI<br>(tous les pics sont intégrés) | RMRpm/SI<br>(Seul le pic majeur est intégré) |
|-----------------------------|---|--|
| Meso                        | 1,000                                   | 1,000  |
| GalNAc-OH                   | 0,850                                   | 0,850  |
| GlcNAc-OH                   | 0,850                                   | 0,850  |
| Xyl                         | 0,850                                   | 0,565  |
| Ara                         | 0,750                                   | 0,624  |
| Rha                         | 0,900                                   | 0,850  |
| Fuc                         | 0,896                                   | 0,495  |
| Gal                         | 0,755 <sup>c</sup>                      | 0,559 <sup>e</sup>                           |
| Man                         | 0,930                                   | 0,865  |
| Glc                         | 0,930                                   | 0,628  |
| GlcNAc                      | 0,872                                   | 0,731  |
| GalNAc                      | 0,751                                   | 0,395  |
| Neu                         | 1,000                                   | 0,882 <sup>b</sup>                           |
| KDN                         | 1,000                                   | 0,722 <sup>a</sup>                           |
| GlcA <sup>d</sup>           | 0,950                                   | 0,504  |
| GalA <sup>d</sup>           | 0,930                                   | 0,388  |
| GICN <sup>c</sup>           | 0,750                                   |  |
| Asn                         | 0,500                                   | 0,500  |
| 2Lys (SI: standard interne) | 1,000                                   | 1,000  |

**Tableau 1: réponses relatives molaires (RMR) des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides et réponses relatives molaire de l'isomère majoritaire de chaque composé (RMRpm). L'ensemble de ces résultats à été déterminé en GC par détection FID.** Les RMR ( $\pm 0,2\%$  de la valeur indiquée) sont moyennées sur une trentaine de déterminations différentes sur des standards de monosaccharides, glycoprotéines, glycolipides, oligosaccharides et glycoasparagines de compositions connues. <sup>a</sup> Valeur théorique, déduite à partir de la RMR des dérivés du Neu5Ac. <sup>b</sup> Pour certains glycoconjugués et standards de Neu5Ac, deux pics sont observables; la RMRpm = 0,882 correspond au pic majeur de Neu. Dans le cas d'analyses pour lesquelles Neu5Ac ne donne qu'un seul pic, la RMR = 1,000 est appliquée. <sup>c</sup> En raison de la variation des proportions relatives des deux pics, la RMR correspond à celle de la somme de l'aire des deux pics. <sup>d</sup> Les acides hexuroniques ne sont pas libérés de façon significative à partir des glycosaminoglycannes pendant la méthanolyse (1 à 15% selon les composés), mais ils peuvent être partiellement libérés d'oligosaccharides branchés. Pour simplifier le calcul des sucres contenus dans les glycoprotéines et glycolipides, l'addition de 2  $\mu\text{g}$  de Lys comme standard est considérée comme 1  $\mu\text{g}$  de standard interne (SI), car la réponse relative molaire de la Lys est seulement de la moitié de la plus part des O-méthyl-glycosides. <sup>e</sup> Quand des O-glycannes sont présents dans l'échantillon étudié, les surfaces de tous les pics de Gal doivent être additionnées, car la proportion du premier isomère ( $R_t = 20,04$  min) se trouve fortement augmentée. Dans ce cas, la RMRmp permet d'obtenir un calcul rapide mais inexact du ratio du Gal.

Pour l'analyse de la composition d'un N-glycane, le ratio des différents monosaccharides pourra être calculé par rapport à la somme de ces deux constituants représentatifs du résidu GlcNAc impliqué dans la liaison N-glycosidique. Dans le cas des O-glycannes (réduits ou non), contenant un résidu de Gal lié à un résidu GalNAc (ou GalNAc-OH), une faible réponse



du Gal est parfois observée quand les données sont calculées uniquement sur le pic majoritaire (RMRpm). Ce défaut de quantification est beaucoup moins important quand le calcul est effectué avec l'ensemble des pics du Gal (avec les coefficients de RMR/SI du tableau 1). Ce phénomène est dû à l'augmentation anormale, pour les O-glycannes, du premier pic du Gal ( $R_t = 20,04$  min) par rapport aux autres.

## V. Discussion sur les intérêts et les inconvénients de la méthode de la méthanolyse pour la libération des monosaccharides avant leur dérivation en HFB

### A. Normalité et présence de traces d'eau

La méthanolyse présente de nombreux avantages comparativement à l'hydrolyse acide. Bien que la normalité de l'acide soit bien inférieure dans notre méthode, l'efficacité de la libération des monosaccharides est aussi élevée tout en n'engendrant quasiment aucune dégradation des sucres les plus fragiles (acides sialiques et fucose). La réaction libère des O-méthyl-glycosides selon le mécanisme de la figure 38.

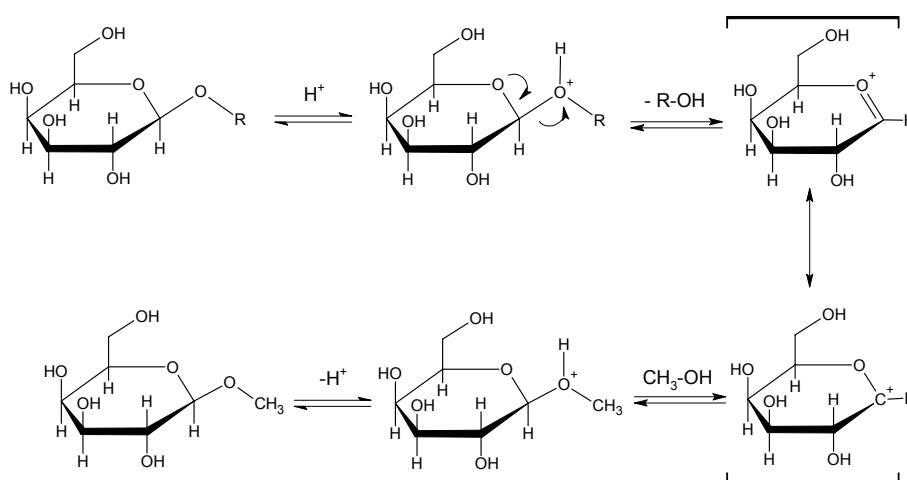


Figure 38: formation des O-méthyl-glycosides par le processus de méthanolyse acide anhydre

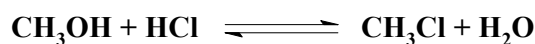
Notre protocole n'implique, dans la grande majorité des cas, qu'une seule étape d'hydrolyse pour libérer l'ensemble des monosaccharides alors que certaines techniques d'hydrolyses acides, parmi les moins destructrices, nécessitent jusqu'à quatre hydrolyses successives différentes (dont la normalité et le temps de réaction sont adaptés aux différentes familles de sucre: acides sialiques, désoxy-hexoses, acides hexuroniques, hexoses et hexosamines), entrecoupées par des étapes longues et fastidieuses de neutralisation et d'isolement des sucres réducteurs libérés. Une des raisons à ce phénomène est que les O-méthyl-glycosides obtenus

après la méthanolyse sont extrêmement stables dans le milieu réactionnel. Ils peuvent d'ailleurs subir la réaction pendant 24 h, avec une exception pour les acides sialiques qui présentent une dégradation très limitée. Cette stabilité des composés durant la méthanolyse n'est pas le cas de leurs homologues réducteurs obtenus après hydrolyse acide. En effet, ces derniers ont été décrits comme subissant des réactions d'isomérisation d'un monosaccharide en un autre, ainsi que des réactions parasites (réaction de Maillard) entre hexoses et acides aminés éventuellement présents dans le milieu analysé.

En revanche, le temps de réaction de la méthanolyse (20 h) peut paraître long comparé à celui de la plupart des hydrolyses acides. En fait, on constate que la formation des O-méthyl-glycosides à partir de monosaccharides libres est extrêmement rapide, puisqu'en seulement 1 h, toutes les familles de monosaccharides sont dérivées. Toutefois, la réaction complète devient beaucoup plus longue quand il s'agit de glycanes, notamment si ils contiennent des enchaînements de monosaccharides dont les liaisons osidiques sont plus résistantes, c'est pourquoi il est nécessaire de pousser la réaction à 20 h.

Depuis déjà une trentaine d'années, il est recommandé de n'utiliser des mélanges réactionnels de méthanolyse ne présentant que des normalités pas trop élevées (1 à 2 N) pour éviter la dégradation des divers monosaccharides. En fait, ce n'est pas uniquement la force de l'acide qui va engendrer ces dégradations mais aussi la présence d'eau dans le milieu réactionnel en même temps que celle de l'acide. La présence concomitante de ces deux composés engendre des phénomènes parasites d'hydrolyse acide, menant à la formation de monosaccharides réducteurs au lieu de dérivés O-méthyl-glycosides, et ce, de façon d'autant plus dramatique que la normalité de l'acide et la présence de l'eau sont importantes. Des solutions à ce problème ont été proposées par ajout soit de carbonate d'argent (Clamp J. R. et coll., 1967 et Chambers R. E. et coll., 1971), soit d'acétate de méthyle (Chaplin M. F., 1982). Nous préférons, au sein de notre équipe, utiliser un milieu réactionnel qui soit à la fois de normalité en HCl la plus faible, mais aussi le plus anhydre possible. En fait, dans une telle réaction, la présence de l'HCl n'est pas requise pour ses propriétés acides mais pour sa capacité à catalyser la réaction. Ainsi, il n'est pas besoin que l'acide soit utilisé en grande quantité et une normalité de 0,25 N suffit pour préparer les dérivés O-méthyl-glycosides à partir de standards de monosaccharides. Toutefois, dans le cas de l'analyse de glycoprotéines, La neutralisation par l'acide Chlorhydrique, des nombreuses fonctions amines d'acides aminés, peut amener la baisse de la concentration en acide. Il en est de même pour la présence possible, dans les échantillons analysés, de nombreux contaminants (Tris, etc...) susceptibles de neutraliser l'acide. C'est pourquoi, une normalité de 0,5 N est un compromis, tenant compte de ces

possibilités. Elle semble être tout à fait suffisante pour une méthanolyse quasi complète sans qu'il y ait dégradation des méthyl-glycosides libérés. D'ailleurs, l'analyse de mélanges de monosaccharides standards ou de glycoprotéines de composition connue, ayant subi notre méthode de méthanolyse et une acylation à l'anhydride heptafluorobutyrique, montrent des résultats quantitatifs en accord avec les compositions théoriques à 1% près (Zanetta J. P. et coll., 1999a). Ces résultats montrent la parfaite libération des monosaccharides et l'innocuité de notre méthode sur la dégradation des méthyl-glycosides obtenus. Chambers et coll. abondent dans ce sens, puisqu'ils rapportent une dégradation croissante des méthyl-glycosides pour des normalités comprises entre 1 et 6 N (Chambers R. E. et coll., 1971). De même, Chapelin utilise une normalité comparable à la notre (0,625 N) pour son protocole de méthanolyse (Chapelin M. F., 1982). Enfin, nous pensons qu'une faible acidité a l'avantage de minimiser la formation parasite d'eau, au cours de la réaction suivante:



## **B. Problème de la dé-acétylation**

Un des inconvénients reconnus de la méthanolyse est la dé-acétylation des groupements N-acétyles que l'on trouve sur les N-acétyl-hexosamines et certains acides sialiques (karkkainen J. et coll., 1969 et Zanetta J. P. et coll., 1972). Ainsi, certains auteurs, après la méthanolyse, ajoutent une étape de ré-acétylation avant de dériver les O-méthyl-glycosides (Clamp J. R. et coll., 1967). D'autres pensent que cette ré-acétylation est longue (6 heures minimum en ce qui concerne la méthode de J. R. Clamp) et que le rendement de la réaction est particulièrement difficile à contrôler, ce qui implique la fluctuation des réponses molaires d'une expérience à l'autre. De plus, des O-acétylations parasites supplémentaires ont été montrées pour les acides sialiques, puisque l'acide 5-N-acétyl-neuraminique, après N-ré-acétylation, donne 4% d'acide 9-O-acétyl-5-N-acétyl-neuraminique (Kamerling J. P. et coll., 1975b). Il faut toutefois noter que cette ré-acétylation était rendue nécessaire, car ces équipes dérivait les O-méthyl-glycosides par des groupements triméthyl-silyles (TMS). Pour ces raisons, nous pensons qu'il est préférable d'utiliser les dérivés HFB. En effet, l'HFBAA a la particularité de très bien dériver, en une seule étape, les fonctions amines en même temps que les fonctions hydroxyles, pour donner des dérivés N- et O-HFB des O-méthyl-glycosides. Ainsi, nous pouvons analyser des sucres N-acétylés malgré leur N-dé-acétylation par la méthanolyse puisque la fonction

amine primaire apparue après ce traitement se trouvera protégée par un groupement HFB après acylation.

En outre, la méthanolyse a la particularité de conduire à la méthyl-estérification des fonctions acides des O-méthyl-glycosides des acides uroniques et sialiques. Cela permet de protéger ces groupements en même temps que les fonctions amines et hydroxyles. Or, aucune dé-méthyl-estérification notable de ces esters méthyliques n'a été observée après acylation de ce type de composés par l'HFBA.

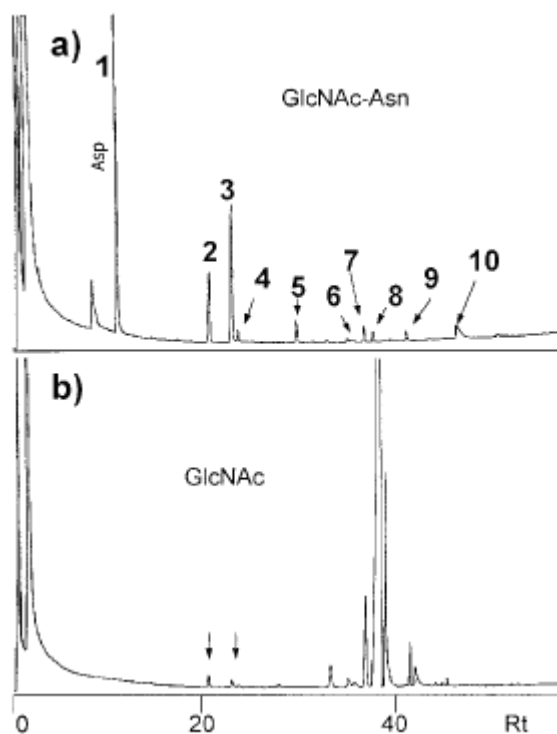
### **C. Coupage de la liaison N-glycosidique**

Un autre problème, souvent disputé au sujet de la méthanolyse, concerne les N-glycannes. Pendant de nombreuses années, alors que le corps des N-glycannes contient 2 GlcNAc, une seule était retrouvée après méthanolyse. Il fut conclut que la liaison N-glycosidique n'était pas ou peu coupée par ce traitement. Certains auteurs montrèrent que l'augmentation de la concentration en HCl du mélange de méthanolyse améliorait la coupure des liaisons N-glycosidiques (Clamp J. R. et coll., 1967; Baenziger J. et Kornfeld S., 1974) et une rupture maximale de 50% de la liaison entre le résidu de GlcNAc et l'asparagine fut rapporté (Mega T. et coll., 1982). Depuis, notre équipe a démontré que les conditions classiques de méthanolyse sont bien suffisantes pour couper quasi complètement (96%) les liaisons N-glycosidiques et que la première GlcNAc impliquée dans la liaison donne des pics particuliers qui permettent de la quantifier (Maes E. et coll., 1999).

En effet, durant le développement de la méthode d'analyse des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, deux pics supplémentaires, relativement importants, apparaissaient (pics 2 et 3 de la figure 39a et du tableau 2 à  $R_t = 19,56$  et  $21,69$  min), lors de l'analyse de la composition monosaccharidique de glycoprotéines comportant des N-glycannes (Zanetta J. P. et coll., 1999a).

Ces mêmes pics apparaissent durant l'analyse de différentes glycoasparagines et glycoprotéines de compositions monosaccharidiques connues. Ils coïncident sur les chromatogrammes avec les dérivés obtenus après méthanolyse de la glucosamine (GlcN), et ils sont les pics majeurs lorsque la GlcN est directement acylée par l'HFBA. Ces pics correspondent à des composés de masse de 963 u, ce qui indique qu'ils sont les deux anomères de la forme libre de la GlcN (composés VI de la figure 40), et non, ceux de ses O-méthyl-glycosides. Durant ces études, il fut aussi remarqué que les proportions, dans l'acétonitrile, de ces deux isomères changent au cours du temps (les proportions de ces

isomères sont différentes dans le méthanol et l'acétonitrile et l'équilibre, dans ce dernier milieu, semble long à atteindre). C'est pourquoi, il est nécessaire d'ajouter systématiquement les aires des deux anomères lors de la quantification de ce composé. En outre, ces deux pics sont obtenus sous forme de trace (0,2%) lors de l'analyse de standard de GlcNAc après méthanolyse (figure 39b). Cela indique que ces traces de matériels ne sont pas formées durant la phase de méthanolyse mais qu'elles sont déjà présentes dans le standard (Maes E. et coll., 1999).



**Figure 39:** séparation en GC sur colonne capillaire (a) des produits de la GlcNAc-Asn après méthanolyse et acylation par l' HFBA. Les pics sont numérotés comme dans le tableau 2. (b) analyse d'un standard de GlcNAc.

Dans le cas des glycoasparagines comme la GlcNAc-Asn, un troisième pic (1 de la figure 39a et du tableau 2) est détecté à 10,67 min, il correspond au dérivé N-heptafluorobutyrate du diméthyl-ester d'acide aspartique (EI-MS:  $M^{++} = 357$  u et CI-MS:  $[M+NH_4]^+ = 375$  u) (Zanetta J. P. et coll., 1999a et Maes E. et coll., 1999). Parce que ce composé est un peu trop volatil, il ne peut pas être quantifié avec exactitude, en raison de l'évaporation nécessaire à l'analyse en colonnes capillaires (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Toutefois, un test a été fait sans évaporation, et en tenant compte d'une RMR de 0,5, sa quantification a montré que ce dérivé correspond à un résidu d'Asp par mole de glycoasparagine. Cela indique que la liaison N-glycosidique est coupée de façon quasi-quantitative. Par contre, lors de cette expérience, les deux pics correspondant aux anomères de la forme libre de la GlcN (2 et 3 de la figure 39a et du tableau 2) ne représentaient que 74% du dérivé de l'acide aspartique. Ainsi,

d'autres composés minoritaires sont formés lors de la rupture de la liaison N-glycosidique (26%). Afin de les caractériser, Maes E. et coll. ont étudié leur formation par TLC, GC-MS et RMN à partir de GlcNAc-Asn après méthanolyse (Maes E. et coll., 1999).

| Numéro du pic dans la figure 39a | Rt (min) | EI-MS [M] <sup>+</sup> | CI-MS <sup>+</sup> [M+18] <sup>+</sup> | CI-MS- [M] <sup>-</sup> et [M-HF] <sup>-</sup> | Numéro du composé dans la figure 40 |
|----------------------------------|----------|------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 1                                | 10,67    | 357                    | 375                                    | 357-337  | Asp (di-Me)                         |
| 2                                | 19,56    | 703-518-476            | 981                                    | 963-943  | GlcN (VI)                           |
| 3                                | 21,69    | 703-518-476            | 981                                    | 963-943  | GlcN (VI)                           |
| 4                                | 22,31    | 751-518                | 981                                    | 963-943  | AmaGlcN (V)                         |
| 5                                | 27,92    | 751-518                | 981                                    | 963-943  | AmaGlcN (V)                         |
| 6                                | 32,93    | 551-490                | 980                                    | 962  | GlcNN (IV)                          |
| 7                                | 34,45    | 551-490                | 995                                    | 977-957  | OMe-GlcN (II)                       |
| 8                                | 35,3     | 551-490                | 995                                    | 977-957  | OMe-GlcN (II)                       |
| 9                                | 38,47    | 518-505                | 995                                    | 977-957  | inconnu                             |
| 10                               | 43,26    | 551-490                | 980                                    | 962  | GlcNN (IV)                          |

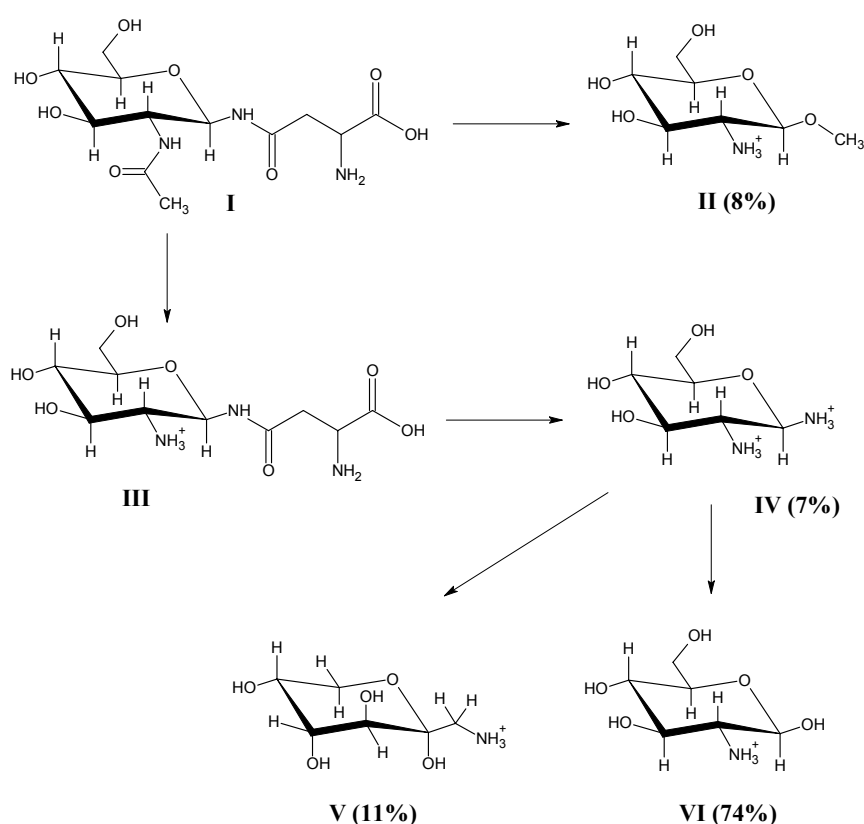
**Tableau 2: caractéristiques des produits par la méthanolyse sur la GlcNAc-Asn analysés sous la forme de dérivés HFB.**

En GC-MS, deux autres pics apparaissent (4 et 5 de la figure 39a et du tableau 2 à Rt = 22,31 et 27,92 min). Les auteurs suggèrent que les composés qu'ils représentent sont probablement dérivés de la glycosylamine de la GlcNAc. Or, ce type de composé est connu pour être sensible au réarrangement d'Amadori. Tout comme les composés VI (figure 40), ils ont une masse de 963 u. C'est pourquoi, les auteurs ont proposés qu'il s'agissait des composés V (figure 40). Ils représentent systématiquement 11,36% des dérivés monosaccharidiques résultants de la coupure de la GlcNAc-Asn par la méthanolyse. Par contre, ils ne sont pas observables durant les expériences de méthanolyse de la GlcN ni de la GlcNAc, ce qui appuie les conclusions des auteurs (Maes E. et coll., 1999).

Deux autres pics (6 et 10 de la figure 39a et du tableau 2 à Rt = 32,93 et 43,26 min), qui représentent 6,9% des dérivés monosaccharidiques libérés, correspondent à des composés d'une masse moléculaire de 962 u. Ils sont aussi observés après méthanolyse de la glycosylamine de la GlcNAc, mais pas après celle des GlcN et GlcNAc. Selon les auteurs, il s'agit des deux anomères de glycosylamine de la GlcN (composés IV de la figure 40) (Maes E. et coll., 1999).

D'autres pics (7 à 9 de la figure 39a et du tableau 2) correspondent à des composés d'une masse moléculaire de 977 u qui coïncide classiquement à la masse des O-méthyl-glycosides d'hexosamines. Les pics 7 et 8 ont les mêmes temps de rétention que les isomères  $\alpha$  et  $\beta$  des dérivés des O-méthyl-glycosides de la GlcN (composés II de la figure 40). Toutefois, les proportions de ces deux isomères sont différentes de celles obtenues après méthanolyse de la

GlcNAc ou de glycannes contenant des GlcNAc O-liées. De plus, ces composés ont des temps de rétention différents de ceux obtenus après méthanolyse de la ManNAc, éliminant la possibilité que ces composés soient dus à une épimérisation de la GlcNAc en ManNAc. Il faut aussi noter que les spectres de masse de ces composés sont en tous points identiques à ceux des anomères des O-méthyl-glycosides de la GlcN. Ces deux pics représentent 8,02% du total des monosaccharides libérés. Quant au pic 9 (figure 39a et tableau 2), aucune suggestion n'a été fournie par les auteurs en ce qui concerne sa caractérisation (Maes E. et coll., 1999). Toutefois, nous pensons qu'il provient d'une impureté du standard de GlcNAc-Asn. L'ensemble de ces informations a permis de déterminer les différentes étapes de la formation des produits de la méthanolyse sur la GlcNAc-Asn (Figure 40).



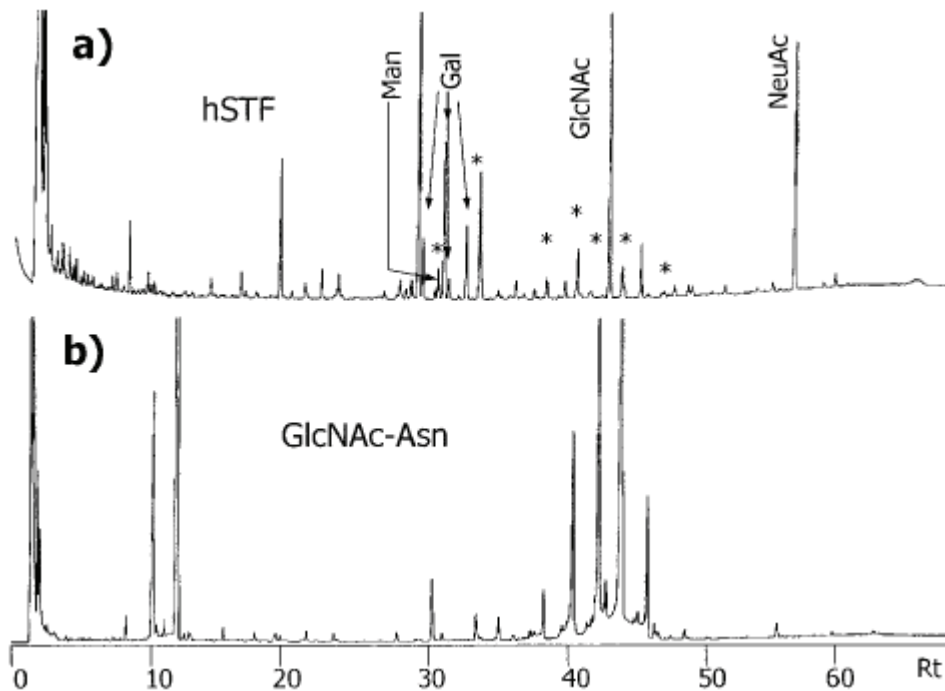
**Figure 40: mécanisme proposé pour la production des produits de la réaction de coupure de la liaison N-glycosidique par la méthanolyse.** Composé I, GlcNAc-Asn; composé II, O-méthyl-glycoside de la GlcN; composé III, GlcN-Asn, le supposé composé intermédiaire majeur de la coupure de la liaison N-glycosidique; composé IV, glycosylamine de la GlcN, provenant de la coupure de la liaison entre la GlcN et l'Asn; composé V, produit du réarrangement d'Amadori; composé VI, GlcN, monosaccharide majeur produit par la rupture de la liaison N-glycosidique.

Le fait que ce soit la GlcN réductrice, et non son dérivé O-méthyl-glycoside, qui soit le produit majoritairement formé pendant la méthanolyse, suggère que la première étape de ce mécanisme est une dé-acétylation rapide de la fonction acétamide portée par le carbone 2 (composé III de la figure 40). La forte sensibilité du groupement N-acétyle à la méthanolyse

peut-être induite par la présence du groupement amine sur le carbone 1. Cette dé-acétylation peut expliquer pourquoi les dérivés O-méthyl-glycosides ne sont pas formés. En effet, avant même la rupture de la liaison N-glycosidique, le groupement  $\text{NH}_3^+$  porté par le carbone 2 de la glucosamine a un effet protecteur envers la formation d'un O-méthyl-glycoside sur le carbone 1 voisin. Bien sur, ceci n'est pas le cas des liaisons O-glycosidiques, car elles ne comportent pas ce groupement amine inducteur sur le carbone 2. Ainsi, la dé-acétylation du résidu de GlcNAc d'une liaison O-glycosidique doit avoir lieu sur les dérivés O-méthyl-glycosides seulement après la rupture de la liaison. La dé-acétylation n'est donc pas impliquée dans le mécanisme de la rupture. C'est pourquoi la liaison O-glycosidique n'est pas sensible à des coupures différentes de celle de la formation d'un O-méthyl-glycoside, ce qui explique, dans ce cas, qu'il n'y ait la formation que d'un seul type de composé. Par contre, pour la GlcNAc-Asn, le résidu GlcNAc n'est pas lié à l'Asn par une liaison O-glycosidique mais par une liaison pseudo-amide. Cette liaison particulière n'est coupée que lors d'une seconde étape, formant la glycosylamine de la GlcN (composé IV de la figure 40), qui n'est pas retrouvé en grande quantité (6,9%), puisque ce composé intermédiaire donne ensuite deux autres composés. L'un par réarrangement d'Amadori (composé V de la figure 40), l'autre par hydrolyse classique (composé VI de la figure 40) sans doute due à la petite quantité d'eau présente dans le mélange réactionnel (les glycosylamines sont connues pour être extrêmement sensibles à la présence d'eau) (Maes E. et coll., 1999).

Puisque cette méthode de dérivation par les HFB permet d'expliquer la formation des différents produits de la méthanolyse des liaisons N-glycosidiques, nous nous sommes demandés pourquoi, apparemment, aucune détection systématique de ces produits n'avait été obtenue lors de l'analyse de glycoprotéines ou de glycoasparagines par l'utilisation des dérivés TMS? C'est pourquoi, nous avons ré-acétylé le produit de la méthanolyse de la GlcNAc-Asn, avant de le dériver par l'utilisation de BSTFA afin de former des dérivés TMS (Maes E. et coll., 1999). Comme nous le voyons (figure 41), un très grand nombre de pics de proportions relatives différentes (environ une vingtaine) sont observables. Les proportions des pics sont variables dans le temps et elles changent d'une injection à l'autre. Les pics les plus importants ont un temps de rétention de  $R_t = 44,25$  et  $44,36$  min. Ils sont localisés entre les pics majeurs des dérivés TMS des O-méthyl-glycosides de la GlcNAc et du méso-inositol, ce dernier étant généralement utilisé comme standard interne. Ils ont été identifiés par GC-MS comme les dérivés TMS des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la GlcNAc (au cours de cette procédure, la GlcN, libérée par la méthanolyse, est artificiellement ré-acétylée) mais pas comme ceux des O-méthyl-glycosides de la GlcNAc.





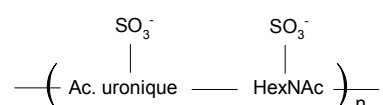
**Figure 41:** comparaison des profils GC des monosaccharides libérés de la sérotransférase humaine (hSTF) (a) et de la GlcNAc-Asn (b), après méthanolyse puis ré-acétylation des produits avant formation de leur dérivés TMS. \* montre les produits caractéristiques provenant de la GlcNAc-Asn qui sont détectés dans le chromatogramme de la sérotransférase. La nature de ces composés a été vérifiée par GC-MS en mode EI-MS et CI<sup>+</sup>-MS.

Leur quantification est, de loin, plus faible que celle obtenue avec les dérivés HFB, probablement, parce que le groupement TMS placé au niveau de la fonction semi-acétalique est instable et qu'il subit une pyrolyse au contact de l'injecteur du chromatographe. En effet, en mode d'analyse CI<sup>+</sup>, les dérivés TMS des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la GlcNAc ( $M = 509$  u) donnent deux ions quasi-moléculaires  $[M+1]^+$ . L'un à 510 u qui correspond à ce qui est attendu et l'autre à 420 u qui correspond à la perte d'un groupement triméthyl-silanol ( $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3 = 90$  u). De façon non reproductible, les deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la GlcNAc fournissent deux autres composés aux temps de rétention plus faibles ( $R_t = 38,63$  et  $40,71$  min). En mode d'analyse CI<sup>+</sup>, ces composés ont un ion quasi-moléculaire unique  $[M+1]^+ = 420$  u ( $450$  u si la GlcN n'a pas été ré-acétylée). Ils correspondent aux produits précités de la pyrolyse. Le pic majeur ( $R_t = 38,63$  min) est, de plus, co-élué avec le dérivé TMS de l' $\alpha$ -O-méthyl-Glc, ce qui explique le fait que l'anomère  $\alpha$  du glucose est fréquemment sur-représenté dans les analyses des dérivés TMS des glycoprotéines contenant des N-glycannes. Ainsi, bien qu'il soit possible de détecter systématiquement, après méthanolyse, les composés correspondant au résidu GlcNAc lié à l'Asn sous la forme de dérivés TMS, l'instabilité de ces dérivés et le chevauchement de certains pics rendent leur quantification problématique. Il est donc largement préférable d'utiliser la technique de dérivation par les HFB qui est beaucoup plus simple d'utilisation et efficace en terme de quantification. L'utilisation de cette méthode

nécessite toutefois quelques précautions. Les dérivés HFB de la GlcN sont des composés relativement instables s'ils sont stockés en absence d'HFBA. La quantité de ces composés diminue de 50% après deux jours dans l'acétonitrile sec à température ambiante en absence d'HFBA. La perte atteint 100% après un mois, mais la quantité initiale peut-être entièrement restaurée par un cycle d'acylation rapide (5 min à 100°C). Cependant, nous préconisons, afin d'obtenir une quantification optimale du résidu de GlcNAc impliqué dans la liaison N-glycosidique, d'évaporer l'excès d'HFBA juste avant l'injection dans l'appareil de chromatographie surtout si la quantification de ce résidu doit servir de base à la composition relative molaire des autres constituants monosaccharidiques des N-glycannes (Maes E. et coll., 1999).

#### **D. Cas de la détermination de la composition des protéoglycannes sulfatés**

Les protéoglycannes constituent une famille de polysaccharides complexes, plus ou moins sulfatés, enrichis dans les matrices extracellulaires (os, cartilages, lames basales). Ils ont en commun de longues chaînes glycaniques présentant presque toujours le motif suivant:



Excepté dans le cas du Kératane sulfate où l'acide uronique est remplacé par un résidu de Gal sulfaté. Par ailleurs, ils sont tous (sauf le kératane sulfate) fixés à une protéine par le noyau suivant:



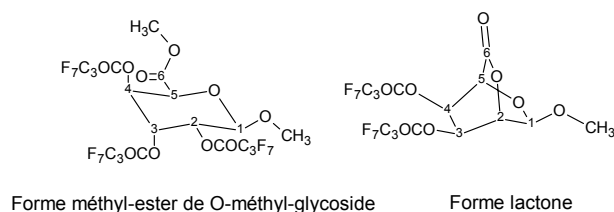
L'analyse de la composition monosaccharidique des protéoglycannes peut fournir des informations essentielles sur la nature de ces chaînes oligosaccharidiques. Toutefois, leur étude reste difficile en raison de la stabilité des liaisons glycosidiques des glycosaminoglycannes (GAGs). Cette stabilité est essentiellement due à l'effet stabilisant du groupement carboxyle en position 6 des acides uroniques, mais aussi, dans les conditions acides, à l'effet protecteur du groupement amine libre protoné des hexosamines. Pour ces raisons, la méthode classique de la méthanolyse en milieu acide anhydre (Chambers R. E. et coll., 1971; Zanetta J. P. et coll., 1972 et Yokota M. et Mori T., 1977) est reconnue pour être faiblement efficace lors de la coupure des GAGs contenant des acides uroniques (héparine,

héparane sulfate, chondroïtine sulfate A et C). En effet, lors de tests sur la rupture des liaisons glycosidiques des GAGs utilisant les conditions classiques de la méthanolyse, les coupures se sont montrées largement incomplètes (de 1 à 50% en fonction des composés étudiés), excepté pour le kératane sulfate (100%) et la chondroïtine sulfate de type B (dermatane sulfate) (80%) (Zanetta J. P. et coll., 1999b). De ce fait, l'utilisation d'un mélange de méthanol/HCl de concentration en acide plus élevée (plus de 4 M) a été suggérée pour améliorer le rendement de la rupture des liaisons (Whitfield D. M. et coll., 1991). Mais encore une fois, l'augmentation de la force de l'acide dans les réactifs de méthanolyse ou d'hydrolyse, entraîne des dégradations importantes des dérivés des acides uroniques, pentoses, désoxyhexoses, galactose et acides sialiques à des degrés variables (Zanetta J. P. et coll., 1999b). Ainsi, pour la plus part des GAGs, il devient impossible de déterminer avec exactitude le rapport molaire des monosaccharides. Dans la littérature, d'autres méthodes d'hydrolyse sont préférées afin de mieux couper les liaisons glycosidiques résistantes, sans toutefois trop endommager les résidus libérés. Parmi ces techniques on trouve l'hydrolyse par l'acide sulfurique à 100°C pendant 2 h, l'hydrolyse par Dowex 50H<sup>+</sup> à 100°C pendant 24 h (Jeffrey P. L. et Rienits K. G., 1967), l'hydrolyse par l'acide formique à 90% à 100°C pendant des périodes variables (Radhakrishnamurthy B. et coll., 1968), et l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1 M à 100°C pendant 4 h (Whitfield D. M. et coll., 1991).

Toutefois, pendant la mise au point de notre méthode de détermination de la composition glycanique des glycoprotéines par méthanolyse, suivie de la dérivation des O-méthylglycosides par l'HFBA (Zanetta J. P. et coll., 1999a), l'analyse de standards d'acides glucuronique et galacturonique libres a montré quatre pics chromatographiques bien distincts pour chacun d'entre eux, permettant de les analyser quantitativement. Ces pics correspondent tous à des composés d'une masse de 810 u (en Cl<sup>+</sup>: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 828 u; en Cl<sup>-</sup>: [M]<sup>-</sup> = 810 u et [M-HF]<sup>-</sup> = 790 u). C'est à dire, à des dérivés HFB de méthyl-ester de O-méthyl-glycosides d'acides hexuroniques et non à leurs formes lactones. De plus, l'analyse en mode EI<sup>+</sup> des quatre pics de chaque acide hexuronique, fournit des ions caractéristiques des formes pyraniques (pour deux d'entre eux) et furaniques (pour les deux autres) (voir la discussion dans la partie réservée à l'analyse des mécanismes de fragmentation et l'annexe). Comme ces standards ne sont pas dégradés dans nos conditions de méthanolyse, il a été fait l'hypothèse que la dégradation des acides uroniques et du galactose, observée pour les protéoglycannes sulfatés, pourrait être due, en partie, à la formation d'acide sulfurique à partir des groupements sulfates des GAGs. Afin de prévenir cette formation, il a été décidé de réaliser l'étape de méthanolyse en présence de sels de baryum, connus pour provoquer une

précipitation quantitative des sulfates par formation de sulfate de baryum (Zanetta J. P. et Coll. 1999b).

Afin de tester cette hypothèse, deux mélanges équimolaires de Gal, GlcA et GlcNAc supplémentés ou non en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été préparés. Après méthanolyse et dérivation en HFB, les analyses en GC montrèrent que les taux de Gal et de GlcA, par rapport à celui de GlcNAc, étaient réduits de l'ordre de 50% dans le mélange contenant du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, alors que celui de l'hexosamine était inchangé. Cela montrait un important effet destructeur de l'acide sulfurique, en dépit de sa faible concentration dans le mélange de méthanolyse (de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-3</sup> M dans ces tests). Le Gal est détruit à 53% (surtout sa forme pyranique) et 3% est retrouvé sous la forme de Gal libre (non O-méthylé), ce qui suggère également, que la présence de l'acide sulfurique gêne la formation des dérivés O-méthyl-glycosides. GlcA est détruit à un niveau comparable à celui du Gal: il est retrouvé sous la forme de six pics, quatre étant des méthyl-ester de O-méthyl-glycosides et deux étant des formes lactones (M = 582 u) (Voir l'annexe et la discussion sur les mécanismes de fragmentation). Dans ce cas, la quantité de cette forme lactone est équivalente à celle de la forme méthyl-ester de O-méthyl-glycosides.



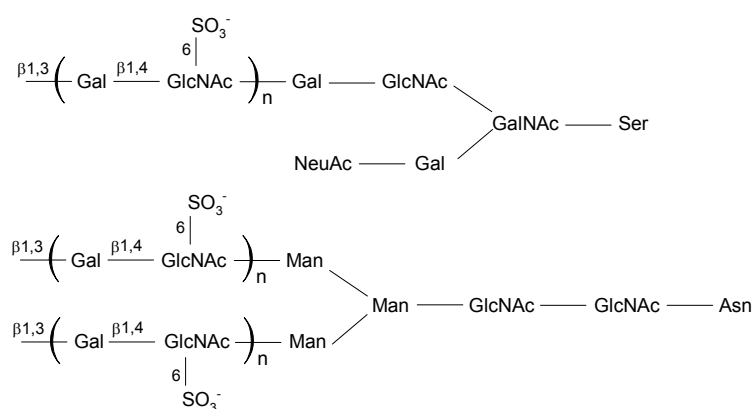
Ces expériences montrent clairement que la petite quantité d'acide sulfurique libérée par la méthanolyse à partir des sulfates présents sur les GAGs est responsable de l'importante dégradation des monosaccharides les plus fragiles (Gal et acides uroniques) (Zanetta J. P. et Coll. 1999b).

Pour empêcher l'accumulation de l'acide sulfurique lors de la réaction de méthanolyse, il est possible d'utiliser de l'acétate de baryum pour précipiter l'ensemble de l'acide formé sous la forme de sel de baryum. L'acétate de baryum est préféré au chlorure de baryum, en raison de sa meilleure solubilité dans le réactif de méthanolyse. Sa concentration dans le réactif (13,5 mM) a été déterminée de façon à avoir au moins 3 fois plus de baryum par rapport au nombre de sulfates présents sur le type de GAG le plus sulfaté (héparine). Il faut noter que grâce à ce nouveau réactif de méthanolyse, le mélange de standard de Gal, GlcA et GlcNAc supplémenté en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> donne des résultats quantitatifs identiques à ceux du milieu sans Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'adjonction de baryum semble donc être très efficace, d'autant plus que sa présence ou son absence ne change pas les résultats obtenus dans le cas des standards analysés sans Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ceci indique que le baryum ne change en rien le rendement de la réaction de la méthanolyse

quand il n'est pas requis, car dans ce cas, il n'intervient pas dans la réaction de la rupture des liaisons glycosidiques. Cette technique a donc été appliquée à l'analyse de différents GAGs (Zanetta J. P. et coll., 1999b).

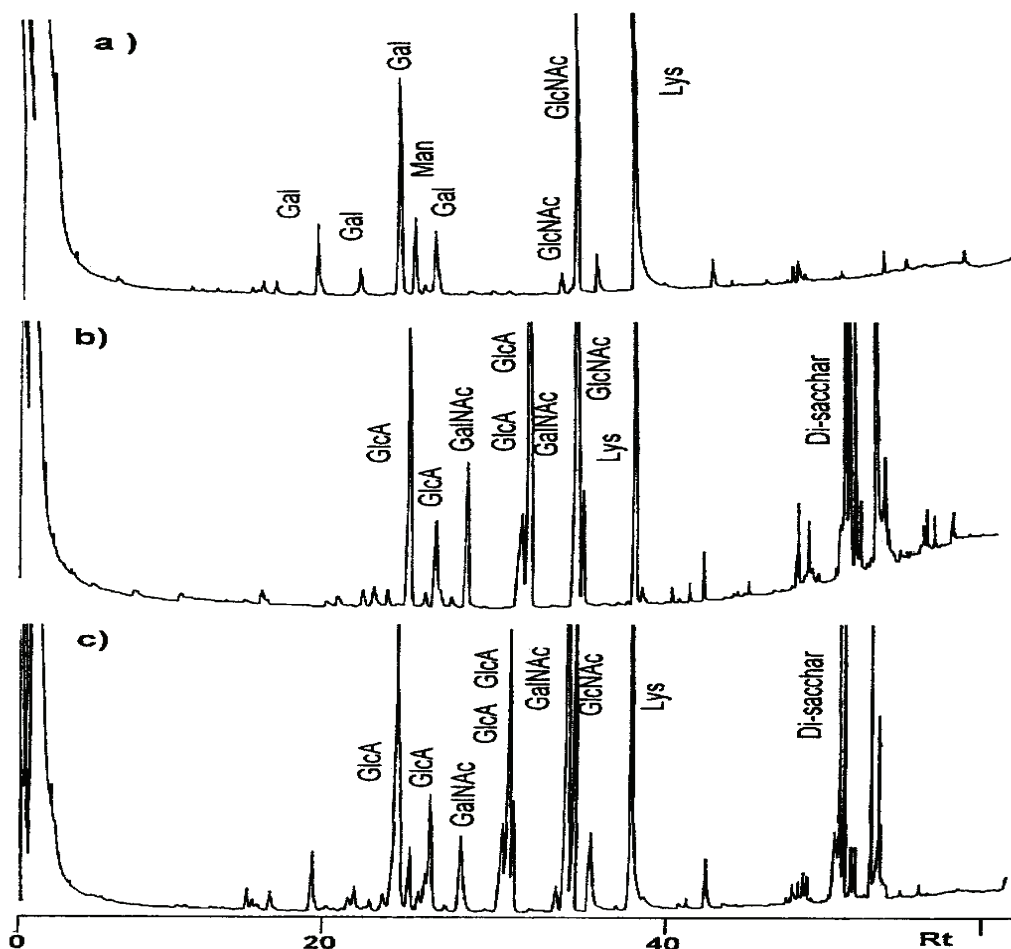
## 1) Composition du kératane sulfate (KS)

Contrairement aux autres protéoglycannes, le kératane sulfate n'est pas fixé aux protéines par le noyau classique des GAGs. Ce composé est constitué d'une succession du motif N-acétyl-lactosamine (Gal-GlcNAc) sulfaté, fixé sur des O- ou N-glycannes (figure 42).



**Figure 42: structures particulières au kératane sulfate**

Les produits de la méthanolyse du kératane sulfate (figure 43a) montrent des pics prédominants, qui correspondent à des isomères de O-méthyl-glycosides de Gal et GlcN (sachant que la GlcN provient de la dégradation de la GlcNAc). Aucun des pics de GlcN ne correspond à une forme furanique (possédant un ion  $E_1^+ = 524$  u). Il faut également remarquer qu'un dérivé GlcN libre (non O-méthyl-glycoside) est visible. Il montre un ion spécifique à 476 u, et fait quantitativement moins de 4% par rapport au dérivé O-méthyl-glycoside de la GlcN. Cela indique que, pour la grande majorité des résidus GlcNAc, les liaisons glycosidiques sont coupées avant qu'il y ait eu N-dé-acétylation, et donc, que peu de résidus GlcNAc (sur le total) sont impliqués dans une liaison N-glycosidique. On peut aussi remarquer une petite quantité de Man, ce qui, en plus de la petite quantité de GlcN libre, démontre l'existence de chaînes glycaniques de type N-glycannes. En outre, l'absence de résidus GalNAc exclut la possibilité que ce KS soit un O-glycanne. Le calcul de la quantité des composés libérés, par rapport à celle du standard interne (Lys), indique que les liaisons glycosidiques de ce type de GAG sont totalement coupées. Ce point est d'ailleurs confirmé par le fait qu'il n'y ait pas sur le chromatogramme de composés de haute masse (disaccharides).

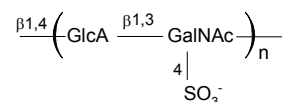


**Figure 43: chromatogrammes FID des dérivés HFB des produits de la méthanolyse sur des GAGs. a)** Profil obtenu pour un échantillon de kératane sulfate. **b)** Profil obtenu pour un échantillon de chondroïtine sulfate A. **c)** Profil obtenu pour un échantillon de chondroïtine sulfate C.

Ainsi, le degré de polymérisation du kératane sulfate, basé sur l'hypothèse de N-glycannes bi-antennés (3 Man et 2 GlcNAc formant le corps des N-glycannes), donne entre 13 et 14 dimères de type N-acétyl-lactosamine (d'une masse de 3100 à 3300 u) pour chaque chaîne sulfatée. En effet, les résidus GlcNAc impliqués dans une liaison N-glycosidique ne représentent que 4% de l'ensemble des résidus GlcNAc. Il n'y a donc, dans ce glycanne bi-antenné qu'un résidu de GlcNAc de la liaison N-glycosidique pour 28 à 30 GlcNAc O-liées. En outre, l'existence de ces longues chaînes poly-N-acétyl-lactosamines, connues pour être facilement hydrolysées lors de la méthanolyse, explique le fait que le kératane sulfate soit fortement coupé par la méthanolyse. Par ailleurs, ce type de composé ne contient pas d'acides uroniques qui empêchent la coupure des liaisons glycosidiques. On remarquera également, que contrairement aux analyses de ce même composé après méthanolyse sans la présence d'acétate de baryum, la quantité de Gal montre un rapport de 1,0008/1,0000 comparativement à la GlcN, ce qui démontre l'effet protecteur de l'acétate de baryum sur la dégradation des monosaccharides les plus fragiles.

## 2) Composition des chondroïtines sulfates de type A (CSA = chondroïtine 4-sulfate)

Sur le plan structural, le CSA est un enchaînement de dimères de GlcA lié en  $\beta$ 1-3 à de la GalNAc sulfatée en 4, le tout étant branché sur le noyau classique des GAGs:



Comme on peut le constater (figure 43b), le CSA produit des pics majeurs, qui correspondent aux 4 dérivés HFB des méthyl-esters de O-méthyl-glycosides d'acide glucuronique. Deux d'entre eux correspondent à la forme pyranique, deux autres à la forme furanique (voir l'annexe et la discussion à ce sujet dans le chapitre sur les mécanismes de fragmentation). On peut aussi remarquer qu'il n'y a pas de pic correspondant à la forme lactone du dérivé de l'acide glucuronique, comme le confirme la recherche spécifique par GC/MS de l'ion caractéristique de cette forme ( $[M-115-214]^+ = 253$  u). On trouve aussi en grande quantité des dérivés O-méthyl-glycosides de la galactosamine, et un peu de O-méthyl-glycosides de GlcN (7% par rapport à la GalN, ce qui suggère une contamination de l'échantillon par de l'héparane sulfate). On observe également, grâce à la recherche d'ions spécifiques aux acides hexuroniques ( $C_2^+ = 537$  u), la présence d'IdoA, ainsi que celle de sa forme lactone ( $[A_1-73]^+ = 478$  u).

Au niveau des temps de rétention élevés du chromatogramme, on remarque deux pics qui, en EI, montrent en même temps des ions caractéristiques de GlcA et des hexosamines. Ils correspondent aux deux anomères d'un disaccharide (GlcA-GalNAc). La présence des ions  $A_1^+ = 779$  u du résidu de GlcA et  $X_1^+ = 764$  u du résidu de GalNAc (figure 44), indique que le résidu GlcA se trouve en position non réductrice et par conséquent, la GalNAc en position réductrice (voir annexe et le chapitre dévolu aux mécanismes de fragmentation).

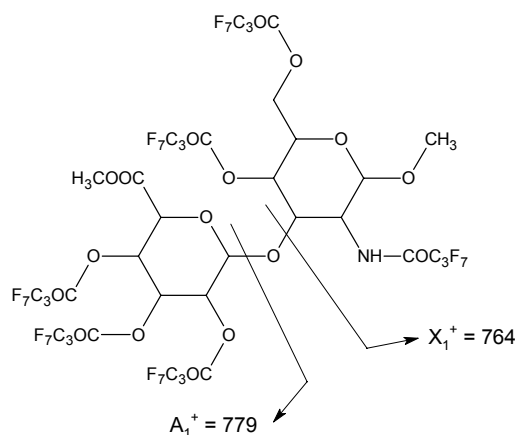
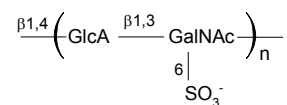


Figure 44: ions spécifiques de l'enchaînement des monosaccharides du disaccharide GlcA-GalNAc

Sur le plan quantitatif, le CSA est coupée en monosaccharides avec un rendement de 53,32%, le matériel restant étant récupéré quantitativement sous la forme de disaccharides. Le rapport de GlcA par rapport à la GalN est de 0,946, ce qui démontre que GlcA n'est pas dégradé de façon significative durant la méthanolyse.

### **3) Composition des chondroïtines sulfates de type C (CSC = chondroïtine 6-sulfate)**

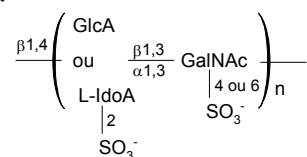
Sur le plan structural, le CSC est un enchaînement de dimères de GlcA liés en  $\beta$ 1-3 à de la GalNAc sulfatée en 6, le tout étant branché sur le noyau classique des GAGs:



Le CSC montre un chromatogramme complexe (figure 43c) présentant majoritairement les dérivés O-méthyl-glycosides de GlcA et de la GalN. Le rapport entre ces deux espèces est de 1,0006 pour 1,0000, ce qui démontre, encore une fois, que GlcA n'est pas dégradé de façon significative durant la méthanolyse grâce à l'addition d'acétate de baryum. En plus de ces deux composés, on observe une quantité étonnement élevée de O-méthyl-glycosides de GlcN (15,30% par rapport à la GalN), ce qui confirme une contamination de l'échantillon par de l'héparane sulfate. Tout comme pour le CSA, les ions caractéristiques des produits de IdoA permettent d'identifier ce composé sur le chromatogramme. Enfin, un disaccharide composé de GlcA et de GlcN est observable dans la région des temps de rétention élevés du chromatogramme. C'est encore la GlcN qui est en position réductrice de ce disaccharide. En fait, le CSC donne le même dimère que le CSA après O-dé-sulfatation par la méthanolyse. Toutefois, les proportions des dimères par rapport aux monosaccharides sont plus faibles que pour le CSA, ce qui indique un taux de rupture des liaisons glycaniques plus élevé pour le CSC que pour le CSA (80,92% au lieu de 53,32%).

### **4) Composition des chondroïtines sulfates de type B (CSB = dermatane sulfate)**

Lors de sa synthèse, le dermatane sulfate est formé d'une répétition d'un disaccharide de GlcA( $\beta$ 1-4)GalNAc. Puis, une 5-épimérase transforme certains des résidus GlcA en IdoA, permettant la formation du dimère suivant:





Des groupements sulfates peuvent se trouver sur l'IdoA et la GalNAc.

Le chromatogramme des produits de la méthanolyse du CSB (figure45) montre une quasi-absence des pics représentatifs des disaccharides. En revanche, la quantité des monosaccharides est plus importante que pour les autres chondroïtines sulfates et l'analyse de ce type de GAG présente des difficultés en raison de l'instabilité des dérivés de l'acide iduronique (IdoA), qui génère la formation d'une multitude de pics.

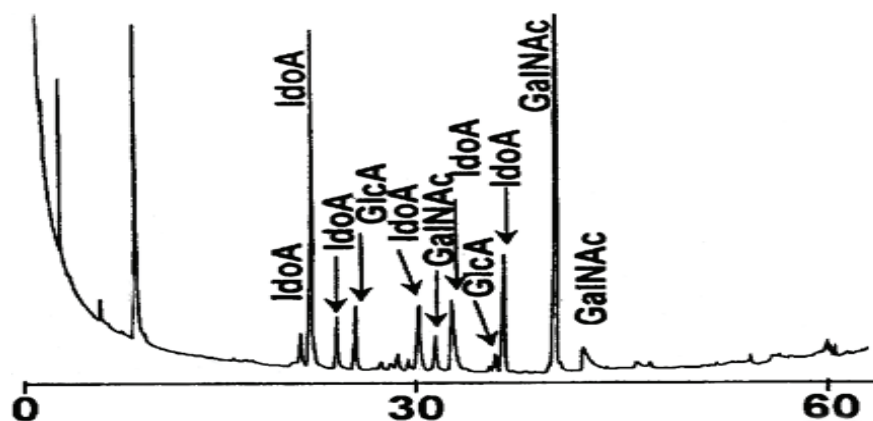


Figure 42: chromatogramme FID des dérivés HFB des produits de la méthanolyse du CSB

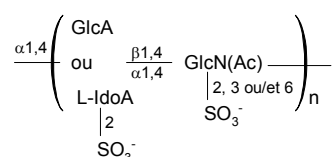
Cette complexité est encore accrue par la présence des pics caractéristiques de GlcA. En fait, bien que l'IdoA soit partiellement dégradé pendant la méthanolyse, l'utilisation des dérivés HFB permet d'identifier ces produits de dégradation grâce à la reconstitution du chromatogramme par l'utilisation d'ions caractéristiques qui permettent de discriminer une espèce ionique. Ainsi, les composés produits pendant la méthanolyse du CSB montrent deux pics correspondant aux formes lactones de l'IdoA. Ils donnent respectivement, en mode de détection de  $Cl^+$  et  $Cl^-$ , des ions quasi-moléculaires et moléculaires qui permettent de déterminer une masse de  $M = 582$  u pour ce produit. En EI, un ion moléculaire très faible ( $M^{++} = 582$  u) est accompagné d'un ion caractéristique intense ( $[A_1-73]^+ = 478$  u). C'est lui qui permet de discriminer la forme lactone sur un chromatogramme reconstitué (pour plus d'explications, voir le cas du GlcA-2,6 lactone dans le chapitre sur les mécanismes de fragmentation). Quatre autres pics correspondent aux O-méthyl-glycosides de méthyl-ester de l'IdoA. Au total, ce composé donne 6 pics, chacun d'entre eux ayant l'avantage de se différencier de ceux du GlcA.

Sur le plan quantitatif, le CSB contient seulement 16,92% de GlcA qui, contrairement aux CSA et CSC, est complètement libérée par la méthanolyse. En tenant compte de la somme des pics représentant les acides uroniques, le rapport de 1/1, comparativement à la quantité de GalNAc, ne peut être atteint que si on affecte un coefficient de réponse molaire (RMR) de

0,711 à la somme des 6 pics de IdoA. Comme les RMR de GalA et GlcA soumis à la méthanolyse sont, respectivement, de 0,93 et 0,95, il a été suggéré qu'une partie de IdoA (24 à 25%) est perdue durant la méthanolyse. Néanmoins, en affectant cette RMR de 0,711 à la somme des pics de IdoA, un rapport molaire correct entre la somme des pics de GlcA et de IdoA est obtenu par rapport à la quantité de GalNAc.

## 5) Composition de l'héparine

L'héparine est constituée d'une succession de disaccharides formée d'IdoA (ou GlcA) et de GlcN. Cette dernière peut-être acétylée ou sulfatée en 2. Des groupements sulfates peuvent aussi se trouver en 3 et en 6 de l'hexosamine.



Les produits de méthanolyse de l'héparine (figure 46) montrent une complexité importante. Les pics des anomères de la GlcN libres (représentés, en mode EI-MS, par un ion spécifique à 476 u) sont détectables en très petite quantité, alors que ceux de la forme O-méthyl-glycoside (ions à 276 et 490 u) sont fortement majoritaires. Cela indique qu'une proportion significative des substituants de la fonction amine des résidus de GlcN est perdue avant la coupure des liaisons glycosidiques. En effet, il est quasiment impossible de produire des dérivés O-méthyl-glycosides de GlcN à partir de GlcN dont le groupement amines se trouve sous sa forme protonée. Cela indique que les dérivés HFB de la GlcN libre proviennent de la libération de GlcN sulfatée en 2, alors que les dérivés O-méthyl-glycosides de la GlcN proviennent de celle qui est acétylée. Les pics caractéristiques du GlcA et de l'IdoA sont aussi détectés. Le Gal et le Xyl sont aussi présents selon le rapport molaire de 2,013/1,000.

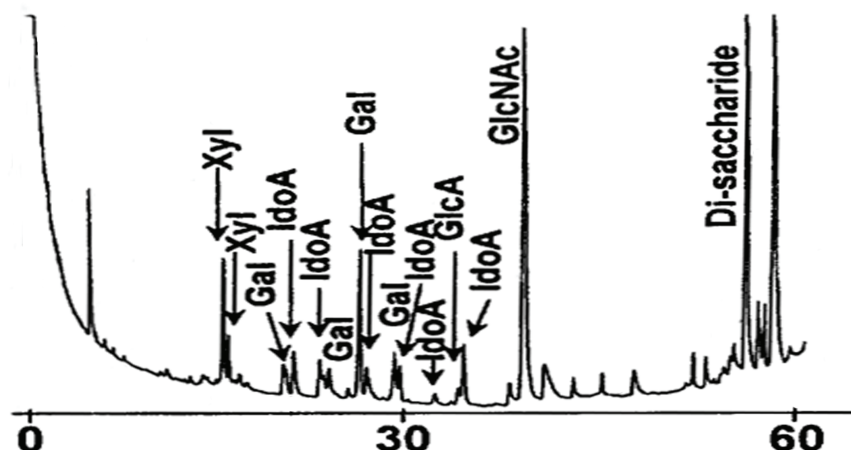
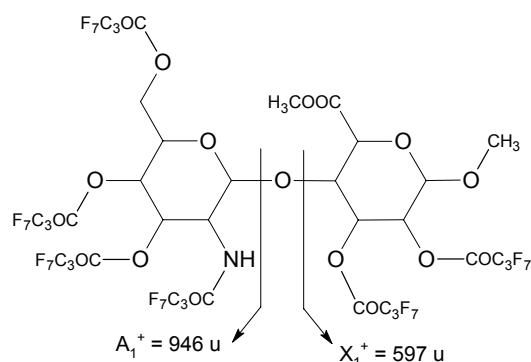


Figure 46: chromatogramme FID des dérivés HFB des produits de la méthanolyse de l'héparine

On observe également la présence de disaccharides composés d'IdoA et de GlcN. Mais contrairement aux dimères présents dans les chromatogrammes des chondroïtines A et C, la présence caractéristique des ions,  $A_1^+ = 946$  u de la GlcN, et  $X_1^+ = 597$  u de l'IdoA, indique que l'hexosamine est en position non réductrice (GlcN-IdoA) (figure 47, annexe et chapitre dévolu aux mécanismes de fragmentation).



**Figure 47: ions spécifiques de l'enchaînement des sucres du disaccharide GlcN-IdoA**

L'existence de ces disaccharides supporte l'hypothèse que les groupements sulfates des GlcN N-sulfatés sont rapidement coupés par la méthanolyse et, qu'en raison de l'effet protecteur sur la coupure de la liaison O-glycosidique de la fonction amine protonée ( $NH_3^+$ ), cette liaison ne peut être coupée que très difficilement. Ceci expliquerait le fait que l'on ne retrouve qu'une petite quantité de monosaccharides sous la forme de GlcN libres. Par contre, lorsque des GlcNAc sont présentes dans la chaîne glycanique à la place de GlcN N-sulfatées, la liaison O-glycosidique de la GlcNAc peut être coupée avant la dé-acétylation, formant ainsi des O-méthyl-glycosides de GlcN uniquement sous forme de monosaccharides. Cela suggère qu'une approximation du niveau de N-sulfatation des GlcN, peut être déduite de la proportion des disaccharides comportant des GlcN en position non réductrice par rapport à la quantité de dérivés O-méthyl-glycosides de GlcN.

Remarquons qu'une petite quantité (3%) de trisaccharides est observable à des temps de rétention élevée, le principal de ces composés présentant un ion relativement intense à 779 u, qui suggère qu'un acide hexuronique se trouve en position non réductrice finale.

Sur le plan quantitatif, l'héparine donne 48% de monomères. En affectant une RMR de 0,75 à l'IdoA, un rapport de 1/1 est assigné à GlcA et IdoA par comparaison à la GlcN. Ainsi, en supposant que trois groupements sulfates sont présents par unité disaccharidique, la masse moléculaire de cette héparine serait de 12800 u.

Enfin, l'étude de ce composé montre que des substances de type héparine sont présentes dans les échantillons analysés de CSA et CSC en raison d'une légère présence de GlcN N-acétylée et non sulfatée et d'IdoA dans ces échantillons.

## **6) Conclusions**

L'utilisation de la méthanolyse acide en présence d'un petit excès d'acétate de baryum par rapport à la quantité de sulfate présente dans les GAGs permet deux améliorations majeures à la méthanolyse classique. (1) La précipitation de l'acide sulfurique libéré des GAGs par la méthanolyse sous la forme d'un sel insoluble de sulfate de baryum, permet d'éviter la dégradation des composés les moins stables (acides uroniques, mais aussi hexoses, pentoses et désoxy-hexoses, quand ils sont présents). Dans ces conditions, GlcA est beaucoup plus stable, par contre, IdoA reste instable puisqu'il n'est retrouvé qu'avec un taux d'environ 75%. (2) Le baryum semble également modifier l'environnement électronique des groupements carboxyliques des acides uroniques, ce qui facilite la coupure de leurs liaisons glycosidiques.

Bien que la libération des monosaccharides constituant les CSA, CSC et héparine ne soit pas complète, l'obtention de disaccharides (tri- et tetra-saccharides sont parfois détectés en petites quantités) permet d'obtenir des informations essentielles sur la structure des GAGs par l'analyse d'ions caractéristiques en EI-GC-MS. En effet, l'héparine présente un ion  $A_1^+$  à 946 u, caractéristique d'un résidu GlcN en position non réductrice, qui est absent des spectres de masse des dimères des CSA et CSC. Par contre, ces derniers présentent un ion  $X_1^+$  à 764 u, caractéristique de la position réductrice de la GlcN.

Enfin, l'utilisation de cette technique permet de déterminer et quantifier les constituants de la région de liaison des GAGs O-liés (Xyl-Gal-Gal) et ainsi en déduire la longueur des chaînes glycaniques en faisant la somme des autres monosaccharides et disaccharides par rapport à un résidu de Xyl et deux de Gal.

## **VI. Application de la méthode à l'analyse des glycoprotéines**

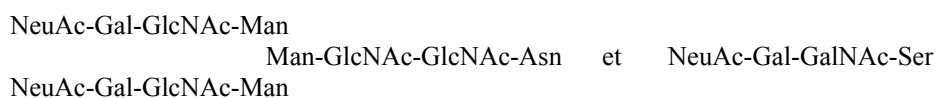
### **A. Analyse de N-glycannes**

Nous avons déjà expliqué que la GlcNAc impliquée dans la liaison N-glycosidique donne principalement, après méthanolyse, deux composés (74%) qui peuvent être parfaitement quantifiés. Ainsi, la quantification de cette première GlcNAc du corps des N-glycannes peut servir de base au calcul de la composition relative molaire de l'ensemble des monosaccharides constituant les N-glycannes. En effet, ce résidu n'étant présent qu'en un seul exemplaire par N-glycane, la quantité des autres sucres peut être comparée et ramenée à celle de ce composé, ce qui permet de déterminer la composition molaire d'une chaîne N-glycanique.

Ainsi, des séries de glycoasparagines isolées de fractions microsomales de cerveaux de rats adultes ont été analysées en partant d'une quantité de 1 µg de chaque glycanne (tableau 3).

| N-glycannes                | Fuc  | Gal         | Man  | Glc    | GlcNAc | GalNAc | Neu       | GN1  |
|----------------------------|------|-------------|------|--------|--------|--------|-----------|------|
| Man5GlcNAc                 | 0,00 | 0,00        | 4,98 | 0,00   | 1,00   | 0,00   | 0,00      | 0,00 |
| Man5GlcNAc2Asn             | 0,00 | 0,00        | 5,02 | 0,00   | 1,01   | 0,00   | 0,00      | 1,00 |
| Man6GlcNAc2Asn             | 0,00 | 0,00        | 6,03 | 0,00   | 1,01   | 0,00   | 0,00      | 1,00 |
| Man7GlcNAc2Asn             | 0,00 | 0,00        | 7,03 | 0,00   | 1,01   | 0,00   | 0,00      | 1,00 |
| Man8GlcNAc2Asn             | 0,00 | 0,00        | 8,03 | 0,00   | 1,01   | 0,00   | 0,00      | 1,00 |
| Man6GlcNAc3Asn             | 0,00 | 0,00        | 6,02 | 0,00   | 2,02   | 0,00   | 0,00      | 1,00 |
| Fuc-bi-antenné             | 1,00 | 2,01        | 3,00 | 0,00   | 3,02   | 0,00   | 2,02      | 1,00 |
| Fuc-tri-antenné            | 1,00 | 3,00        | 3,01 | 0,00   | 4,02   | 0,00   | 3,01      | 1,00 |
| Glycoprotéine <sup>a</sup> | 0,00 | 2,97 (2,74) | 3,00 | 0,000  | 2,97   | 0,99   | 3,00      | 1,00 |
| O-glycannes réduits        | Fuc  | Gal         | Man  | GlcNAc | GalNAc | Neu    | GalNAc-OH |      |
| Rp N-4*                    | 1,00 | 1,99 (1,73) | 0,00 | 0,10   | 1,00   | 0,00   | 1,00      |      |
| Rp N-8**                   | 0,00 | 2,99 (2,74) | 0,02 | 0,05   | 0,12   | 2,01   | 1,00      |      |

**Tableau 3: composition de glycoasparagines standards et d'oligosaccharides réduits.** La détermination a été conduite à partir de 1µg de chaque composé soumis à la méthanolyse puis à une acylation par l'HFBA. Les O-glycannes sont extraits de mucines d'œufs de *Rana palustris*. Pour les composés \* et \*\* : une faible réponse du Gal est observée quand les données sont calculées uniquement sur le pic majoritaire (RMRpm, données entre parenthèses). Ce défaut de quantification est beaucoup moins important quand la calcul est obtenu pour l'ensemble des pics du Gal (avec les coefficients de RMR : voir tableau 1). Ce phénomène est dû à l'augmentation anormale, pour les O-glycannes, du premier pic du Gal (Rt = 20,04 min) par rapport aux autres. <sup>a</sup> cette glycoprotéine contient les glycannes suivants:



En ramenant la quantité de chaque monosaccharide à celle de la GlcNAc de la liaison N-glycosidique, il devient possible d'obtenir sans ambiguïté la composition des différents oligomannosides avec une précision de l'ordre de 1% d'erreur par rapport à la composition théorique. Toutefois, en raison de la relative instabilité des dérivés de la première GlcNAc, l'échantillon doit être analysé immédiatement après évaporation du mélange acylant. En outre, comme nous l'avons déjà mentionné, le pic correspondant au dérivé diméthyl-ester d'HFB de l'acide aspartique, provenant de l'Asn impliquée dans la liaison N-glycosidique, ne peut pas être quantifié. En effet, ce composé est partiellement perdu durant la phase d'évaporation du mélange acylant et pendant le séchage de l'échantillon dans l'injecteur de Ross. Néanmoins, la présence de ce pic indique que le composé initial est bien une glycoasparagine et non pas un N-glycanne attaché sur un peptide.

## **B. Analyse des O-glycannes**

De façon surprenante, pour les analyses de O-glycannes (réduits ou non) contenant un résidu de Gal lié à un résidu GalNAc (ou GalNAc-OH), le premier isomère furanique du Gal (Rt =

20,04 min) montre une augmentation relative comparée aux autres isomères. La surface de ce pic est approximativement le double de celle obtenue pour du galactose standard ou présent dans un N-glycane. Cela suggère que, durant la coupure de cette liaison glycosidique particulière, la formation du dérivé O-méthyl-glycoside de cette forme furanique du Gal est favorisée, cette particularité restant à expliquer.

Cette technique, appliquée à des séries d'oligosaccharides réduits libérés par  $\beta$ -élimination réductive, montre que les rapports molaires approchent les valeurs théoriques avec une marge d'erreur de 1% et parfois de moins de 0,1% (tableau 3) (Zanetta J. P. et coll., 1999a).

### **C. Qu'en est-il de la présence des contaminants ?**

Dans bien des cas, les méthodes de purification des glycoprotéines peuvent introduire de nombreux contaminants (désoxycholate, sodium dodécyl-sulfate, Triton X-100, glycine, et Tris). Chacun d'entre eux a subi la procédure de méthanolyse/HFBAA et a été analysé séparément. Le désoxycholate fournit un seul pic, élué à la fin du gradient de température. Les pics correspondant au Tris et à la Glycine sont élués près du pic d'injection. En outre, ils sont perdus, pour une large part, lors de l'évaporation du mélange acylant en raison de leur volatilité. Le Triton X-100, qui n'est pas dégradé de façon significative dans les conditions de méthanolyse, donne trois petits pics qui n'interfèrent pas avec les dérivés monosaccharidiques. En revanche, le SDS donne des pics correspondant à des composés à 10, 12, 14 et 16 atomes de carbone. Le pic majeur (12 carbones) chevauche l'isomère  $\beta$  du mannose, mais dans ce cas, cela n'empêche pas de quantifier le mannose par l'intermédiaire de son isomère  $\alpha$  (93,05%).

Parce que l'analyse de la composition en sucre peut être obtenue pour des glycoprotéines préparées à partir d'extraits tissulaires, il était important d'examiner de possibles contaminations par des monosaccharides. Ainsi, de l'ARN, de l'ADN et un extrait complet de protéoglycannes isolé à partir de cerveaux de rats adultes, ont été soumis à ce protocole analytique. Seuls les isomères du ribose ont montré une possible interférence avec la détermination du fucose. Pour l'ADN, aucun pic n'empêche la détermination des monosaccharides classiques des glycoprotéines. Quant aux acides uroniques libérés des protéoglycannes au cours de la méthanolyse, ils n'interfèrent aucunement avec d'autres constituants (Zanetta et coll., 1999a).

## **D. Sensibilité de la technique et nano-analyses**

Cette méthode permet la détermination quantitative de la composition en monosaccharides des glycoprotéines et glycolipides avec un niveau de sensibilité classique de la détection FID; soit, pour une quantification optimale, environ 25 à 50 pmol de chaque monosaccharide injecté sur la colonne. Une telle sensibilité permet d'analyser la composition glycannique de 1 µg d'une glycoprotéine purifiée par électrophorèse puis transfert sur membrane de PVDF.

## **E. Analyse directe sur gel de polyacrylamide et membrane de PVDF**

Parce que la plupart des composés utilisés pour la purification des glycoprotéines n'interfèrent pas de façon significative avec les analyses et que la sensibilité de cette méthode permet l'analyse de très petites quantités de glycoprotéines, l'idée d'étudier des glycoprotéines directement après isolation par électrophorèse a germé. C'est pourquoi il était intéressant de déterminer si la polyacrylamide pouvait interférer avec la détermination des monosaccharides. Pour cela, une petite pièce de gel de polyacrylamide (en tampon Tris-glycine contenant 0,1% de SDS) a subi le protocole expérimental (méthanolyse/acylation) et a été analysée. Le résultat ne faisait apparaître que les pics correspondant au SDS. Afin de tester la possibilité de déterminer la composition en sucre d'une glycoprotéine directement sur gel de polyacrylamide, deux glycoprotéines (Thy-1 et CD24 isolées du cerveau de jeunes rats) ont été isolées par SDS-PAGE. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie, les bandes ont été découpées au scalpel, puis ont été transférées dans des tubes avant d'être déshydratées par lavages successifs au méthanol distillé (6x). Les morceaux de gel ont alors subi la méthanolyse, puis ont été retirés des tubes. Après évaporation et acylation, les échantillons ont été analysés. Bien que le rapport molaire des différents monosaccharides ait été identique aux valeurs obtenues à partir des mêmes glycoprotéines extraites du gel par électro-élution, la quantité de sucres libérés était dix fois moins importante. Ce phénomène est, en fait, imputable à la faible pénétration du réactif de méthanolyse dans le gel de polyacrylamide.

Toutefois, ce problème peut être réglé par transfert des glycoprotéines du gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF. Une fois ce transfert effectué et après un rinçage poussé de la membrane par l'eau, elle est colorée au rouge Ponceau, puis encore lavée à l'eau. Les bandes colorées sont alors découpées et rincées par du méthanol anhydre. Elles subissent un cycle de méthanolyse, puis sont enlevées du tube (après rinçage par du méthanol) avant d'évaporer le milieu de méthanolyse. Le résidu est alors acylé par l'HFBAA pour être analysé

en GC-MS. Dans ces conditions, la procédure de méthanolyse permet une libération quantitative des O-méthyl-glycosides. Aucune interférence n'apparaît si la membrane de PVDF a été correctement rincée par le méthanol et les résultats sont parfaitement quantitatifs. En effet, le matériel adsorbé sur les membranes de PVDF est beaucoup plus accessible au réactif de méthanolyse que sur les gels de polyacrylamide. (Zanetta et coll., 1999a).

## **VII. Couplage à la spectrométrie de masse**

Bien que la reproductibilité des séparations en chromatographie de phase gazeuse permette de déterminer la nature des composés en fonction du temps de rétention de leurs isomères\*, l'identification certaine de chaque composé d'un échantillon de composition inconnue nécessite l'aide de la spectrométrie de masse.

### **A. Analyse par ionisation chimique (CI-MS)**

Les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides de monosaccharides présentent des masses moléculaires relativement élevées (978 pour les hexoses, 977 pour les hexosamines et 1275 pour les dérivés des acides sialiques).

L'analyse par ionisation chimique (gaz vecteur: NH<sub>3</sub>) fournit, en mode de détection positive, les ions quasi-moléculaires [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> et [M+H]<sup>+</sup> qui permettent une identification sûre de la famille des composés, à condition que la limite de masse de l'appareil soit de 2000 u (tableau 4 page 148). Malheureusement, la plupart des appareils de GC\MS de routine présentent une limite de masse inférieure (1000 u).

En raison de la présence d'un grand nombre d'atomes de fluor sur les dérivés, il est intéressant d'utiliser l'ionisation chimique en mode négatif. En effet, dans la chambre d'ionisation de l'appareil, les plasmas d'ionisation chimique contiennent des électrons de faible énergie. Ces électrons proviennent, soit directement du filament émetteur et sont souvent désactivés par collision, soit et surtout des réactions d'ionisations primaires d'impact électronique. En effet, ces dernières produisent systématiquement deux électrons de faible énergie par réaction d'ionisation. Ces deux électrons peuvent ainsi être capturés par les molécules présentes dans le milieu. Le processus sera généralement dissociatif, sauf pour des molécules comportant plusieurs atomes électronégatifs. Ce type d'atomes peut, en effet, induire des processus de

---

\* Tous les isomères de Ara, Rha, Rib, Xyl, Fuc, Gal, Man, Glc, GlcNAc, GalNAc, KDO, KDN, Neu et Neu1,7lactone sont séparés et décalés de ceux de glucitol, mannitol, inositol, N-acétyl-glucosaminitol, N-acétyl-galactosaminitol, acides uroniques, FAMES plus lourds que le C14:0, bases sphingoides et contaminants majeurs.



stabilisation par résonance des ions formés. Dans ce cas, la sensibilité à la détection est meilleure qu'en ions positifs (jusqu'à vingt fois plus sensible). Ainsi, dans le cas des dérivés HFB, les différents composés peuvent être détectés par la formation d'ions intenses correspondant aux formes  $[M]^-$  et/ou  $[M-HF]^-$ .

## **B. Analyse par impact électronique (EI-MS)**

### **1) Identification des monosaccharides par des ions spécifiques**

Avec ce type d'ionisation, les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides fournissent des spectres de masse qui permettent d'obtenir des informations sûres, même avec un appareil de routine limité en masse à 1000 u, notamment pour l'identification de fragments spécifiques de chaque famille de composés (voir annexe). En effet, chaque composé présente, indépendamment de la quantité de matériel, des fragments qui sont spécifiques de la famille à laquelle il appartient (tableau 4).

| dérivés             | EI-MS           |                  | CI-MS positif                |               | CI-MS négatif   |               |
|---------------------|-----------------|------------------|------------------------------|---------------|-----------------|---------------|
|                     | Masse théorique | ions spécifiques | Masse théorique $(M+NH_4)^+$ | ions observés | Masse théorique | ions observés |
| groupement HFB      | 213             | 169-119-69       |                              |               |                 |               |
| Pentoses            | 752             | 479-325-265      | 770                          | 770           | 752             | 752           |
| Désoxy-hexoses      | 766             | 492-279          | 784                          | 784           | 766             | 766           |
| Hexoses             | 978             | 704-551-519-277  | 996                          | 996           | 978             | 978-958       |
| Hexosamines         | 977             | 703-490-472-276  | 995                          | 995           | 977             | 977           |
| KDN                 | 1276            | 575-515-355      | 1294                         | 1294          | 1276            | n.d.          |
| KDO                 | 1050            | 777-563          | 1068                         | 1068          | 1050            | n.d.          |
| Acide neuraminique  | 1275            | 788-602-542      | 1293                         | 1293          | 1275            | n.d.          |
| Neu1,7L             | 1047            | 833-794          | 1065                         | 1065          | 1047            | n.d.          |
| Acides hexuroniques | 810             | 597-537-323      | 828                          | 828           | 810             | 810-790       |
| Meso-inositol       | 1356            | 715              | 1374                         | 1192          | 1356            | n.d.          |
| Mannitol            | 1358            | 503-453          | 1376                         | 1376          | 1358            | n.d.          |
| GlcNAc-OH           | 1357            | 488              | 1375                         | 1375          | 1357            | n.d.          |
| GalNAc-OH           | 1357            | 488              | 1375                         | 1375          | 1357            | n.d.          |
| GlcN*               | 963             | 476-348-293      | 981                          | 981-963       | 963             | 963-943       |
| Asp                 | 357             | 357-299-236      | 375                          | 375           | 357             | 357           |
| Lys                 | 552             | 520-280          | 570                          | 570           | 552             | 552           |

**Tableau 4: ions observables lors de l'analyse des dérivés HFB de monosaccharides en mode EI-MS et CI-MS**

Ainsi, la présence de groupements HFB sur les groupements hydroxyles ou amines de n'importe quel composé est très facilement révélée par l'existence d'ions caractéristiques ( $m/z$  69  $[CF_3]^+$ , 119  $[C_2F_5]^+$  et 169  $[C_3F_7]^+$ ). De plus, il existe des ions spécifiques de chaque famille de monosaccharide:

- Les pentoses sont révélés par les ions de masse  $m/z$  478 (parfois par  $C_2 = 479$  u).
- Les désoxy-hexoses par l'ion  $[C_1 - F_7C_3COOH]^{**} = 492$  u.
- Les hexoses par l'ion  $A_3^+ = 519$  u.
- Les hexosamines par les ions  $[C_1 - F_7C_3COOH]^{**} = 703$  u et  $C_3^+ = 490$  u.
- Les acides uroniques par les ions  $C_2^+$  et  $E_2^+ = 537$  u.
- L'acide neuraminique par l'ion  $M = 602$  u.
- Le KDN par l'ion  $M = 355$  u, etc.

Cette particularité permet de discriminer très rapidement et facilement chaque famille de monosaccharide dans un mélange, grâce à la reconstitution, par traitement informatique, du chromatogramme à partir d'une recherche sélective d'ions caractéristiques (figure 48).

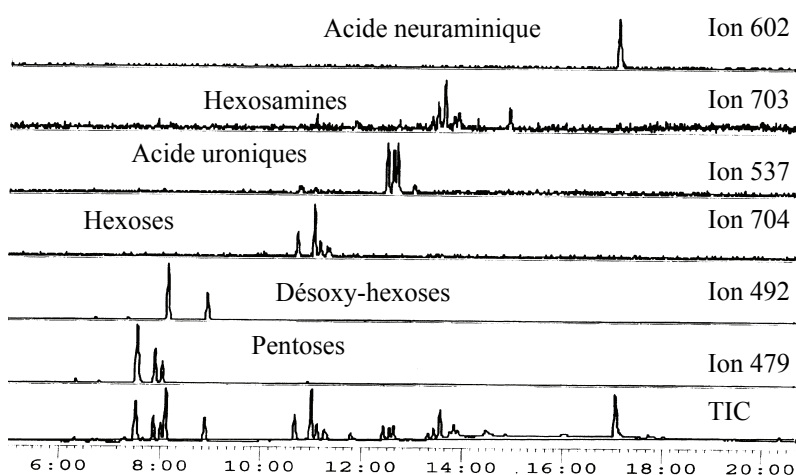


Figure 48: recherche, sur un mélange de pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, acides uroniques, N-acétyl-hexosamines et acides sialiques, après méthanolyse et dérivation à l'HFBA, des différentes familles de monosaccharides par reconstitution de chromatogrammes en utilisant un ion spécifique de chaque famille

## 2) Schémas probables des mécanismes de fragmentation des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides par analyse en mode EI-MS

Au cours du chapitre traitant de l'analyse des dérivés per-méthyl-glycosides (p. 15), nous avons mentionné que la nomenclature de fragmentation utilisée par Kochetkov et Chizhov est restée la base de l'analyse de toutes les autres méthodes de dérivation des O-méthyl-


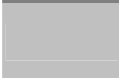



glycosides (dérivés per-acétylés, partiellement méthylés, trifluoroacétylés, etc.). En effet, quelle que soit la technique de dérivation des fonctions hydroxyles et amines libres utilisée, il y a peu de variations des comportements de fragmentation des différentes sortes de dérivés (surtout pour les dérivations par des groupements acyles). Les dérivés HFB ne dérogent pas à cette constatation et l'étude des spectres de masse de l'ensemble des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides que nous avons obtenu, nous a permis de considérer un schéma de fragmentation pour chacun d'entre eux. Après avoir constaté que chaque sucre subit, à peu de chose près, la même fragmentation, nous avons déterminé un schéma général de fragmentation, en nous basant sur la nomenclature de Kochetkov et Chizhov.

Contrairement à ces auteurs, nous n'avons pas poussé ce type d'étude jusqu'à l'analyse de composés deutérés, c'est pourquoi, nous qualifions nos mécanismes de fragmentation de "probables". Toutefois, en regard de nos résultats, nous nous permettons d'avancer que les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides suivent exactement le schéma de fragmentation que Kochetkov et Chizhov avaient déterminé. Ainsi, nous retrouvons les différentes séries de fragmentations A, B, C, D, E, F, H et K, auxquelles s'ajoutent deux séries spécifiques aux dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, que nous avons nommé X et Z.

**a) Schémas probables des mécanismes de fragmentation pour les pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, hexosamines et acides hexuroniques**

Tout le long de ce chapitre de nombreuses figures sont utilisées afin d'illustrer la formation des différents ions fragments. Seul le cas des hexoses y est développé, toutefois, ces schémas s'appliquent aussi aux autres dérivés que sont les pentoses, désoxy-hexoses, hexosamines et acides hexuroniques. En outre, l'ensemble de ce travail présente une légende particulière qui est la suivante:

## Légende

|   |  |
|---|--|
|  | = ion théorique non observable   |
|  | = ion faiblement observable  |
| Normal  | = ion observable   |
| <b>Gras</b>   | = ion prédominant  |
|  | = ion peu plausible (pour les hexosamines*)  |
| <b>En rouge</b>   | = cas particulier pour les acides hexuroniques                                       |
| ---   | = ion impossible pour ce type de composé   |
|  | = "demi flèche" exprime le déplacement d'un seul électron:<br>coupure homolytique    |
|  | = "flèche pleine" exprime le déplacement de deux électrons:<br>coupure hétérolytique |

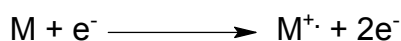
\*Remarque: dans le cas des ions peu plausibles des hexosamines.

Ils le sont parce qu'ils impliquent la perte, non pas d'un acide heptafluorobutyrique, mais de son équivalent amide. Or, cela donnerait des masses qui se situeraient une unité de masse au dessus de ce qui est observable sur les spectres des hexosamines.

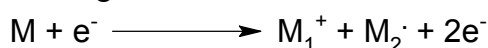
### (1) *L'ion moléculaire $M^{+}$*

Pour la plus part des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, l'ion moléculaire de type radicalcation  $M^{+•}$  est difficilement observable sur les spectres de masse obtenus par un appareil de routine limité à  $m/z$  1000. En effet, il est courant d'observer que l'intensité des ions diminue sur un spectre quand on approche des limites de détection de masse de l'appareil (ici, entre 800 et 1000). Cela explique que cet ion n'est bien visible que sur les spectres des monosaccharides dérivés les plus légers (pentoses et désoxy-hexoses). Toutefois, en augmentant la quantité de produit injecté (quantité proche de la saturation) ou en utilisant un appareil capable de détecter des  $m/z$  plus importants (1500 ou 2000), l'ion moléculaire devient détectable bien qu'il soit très faible en raison de son instabilité. En revanche, d'autres ions fils, permettant de déterminer la masse du produit, sont observables sur les spectres; il s'agit des ions  $[M-F]^+$ ,  $[M-OCH_3]^+$  appelé  $A_1^+$ ,  $[A_1-HF]^+$  et  $[M-C_3F_7COO]^+$ .

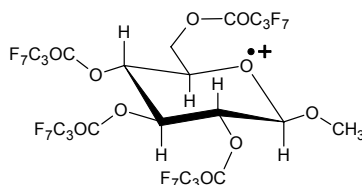
L'ion moléculaire provient de l'arrachement d'un électron de la molécule sous l'effet du bombardement électronique dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse. Ce mécanisme se produit selon la relation suivante:



Il faut noter que cet électron arraché à la molécule ne peut provenir que d'un doublet libre (électron de type n) ou d'une double liaison (électron de type  $\pi$ ). En effet, s'il provenait d'une liaison simple (électron  $\sigma$ ), il y aurait rupture de cette liaison, conduisant à la formation d'un ion primaire et d'un radical non chargé.

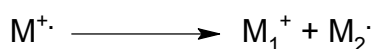


En fait, ce type de réaction nécessite une énergie plus importante que la réaction précédente: à 70 eV, la première réaction est donc très largement favorisée. Ainsi, dans le cas des dérivés acylés de O-méthyl-glycosides, l'électron provient le plus souvent, bien que cela ne soit pas obligatoire, du doublet libre d'un oxygène, notamment de celui de la fonction semi-acétalique impliquée dans la formation du cycle, formant (pour les hexoses) l'ion  $M^{+\cdot}$  suivant:

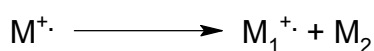


Comme nous l'avons déjà dit, cet ion est instable. Il va donc donner des ions fils plus stables, selon les mécanismes de ruptures homo- et hétéro-lytique de la chimie radicalaire. Ce sont ces dégradations qui sont à l'origine des différentes séries de fragmentation.

Il peut y avoir la formation, soit d'un cation et d'un radical: par rupture d'une liaison ou par des réarrangements suivis d'une rupture:

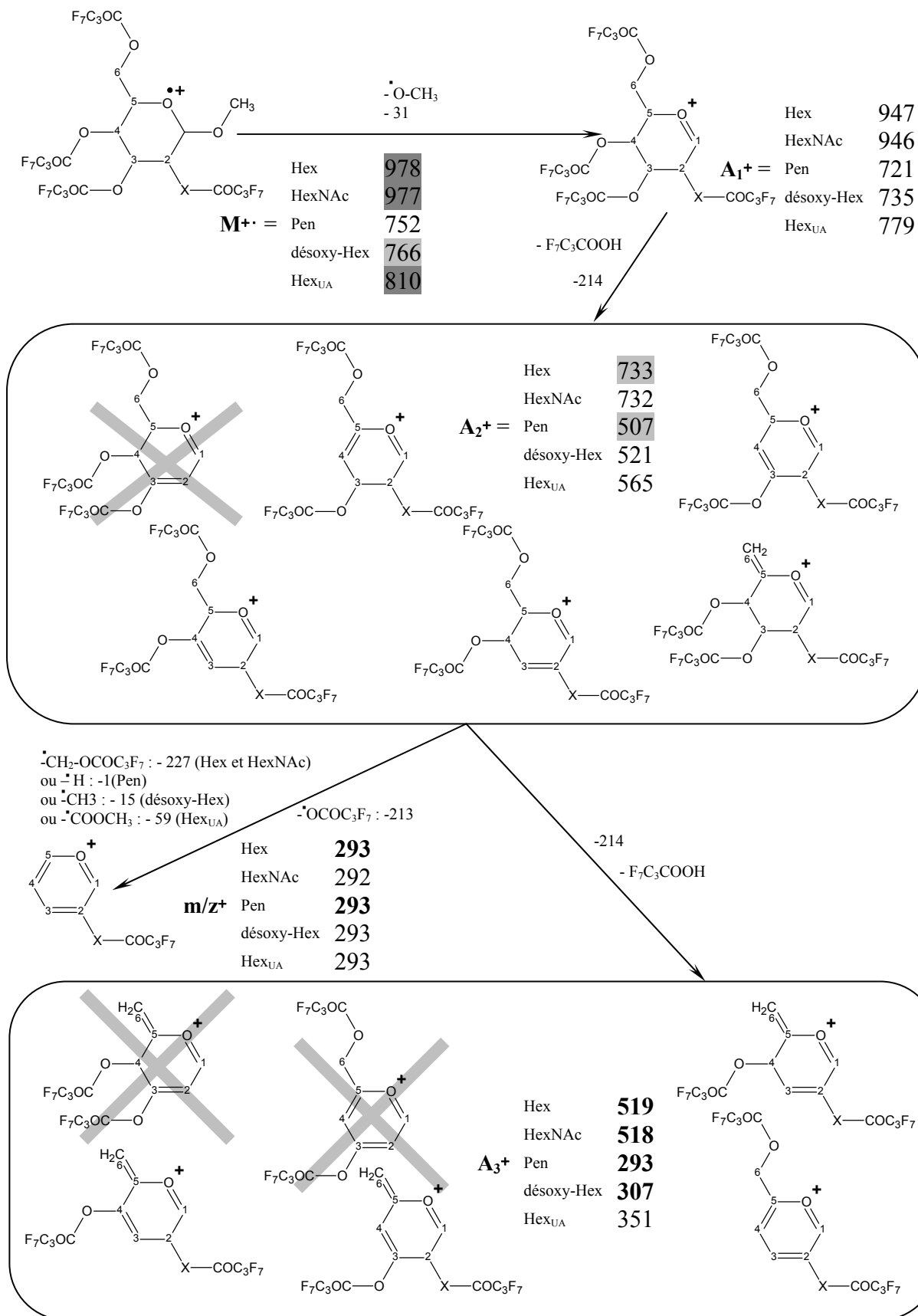


soit d'un radical-cation et d'une molécule par réarrangement (rupture de plusieurs liaisons):



## **(2) Fragmentations suivant la série A.**

Cette série provient de la perte, par l'ion moléculaire  $M^{+\cdot}$ , d'un radical méthanolate au niveau du carbone 1 pour former l'ion  $A_1^+$ . Cet ion fils est en effet plus stable que son père, car il peut se stabiliser par résonance. Cet ion primaire peut donner, à son tour et après réarrangement, différents ions secondaires  $A_2^+$  en fonction de l'emplacement du groupe partant (figure 49).



**Figure 49: fragmentations suivant la série A**

Puis  $A_2^+$  donne l'ion  $A_3^+$  par perte supplémentaire d'un acide heptafluorobutyrique ( $F_7C_3COOH$ ).

L'ion  $A_2^+$  peut également donner un ion de masse  $m/z$  293 (ou 292 pour les hexosamines), par perte consécutive du radical fixé sur le carbone 5 (variable selon la famille) et d'un radical heptafluorobutyrate  $[F_7C_3COO]^•$ . On peut remarquer que ce sont surtout l'ion à  $m/z$  293 et l'ion  $A_3^+$  qui prédominent dans les spectres de masse. En effet, ils sont stabilisés par la possibilité de délocalisation de la charge par résonance induite par la migration des électrons des doubles liaisons conjuguées et des doublets libres (figure 50).

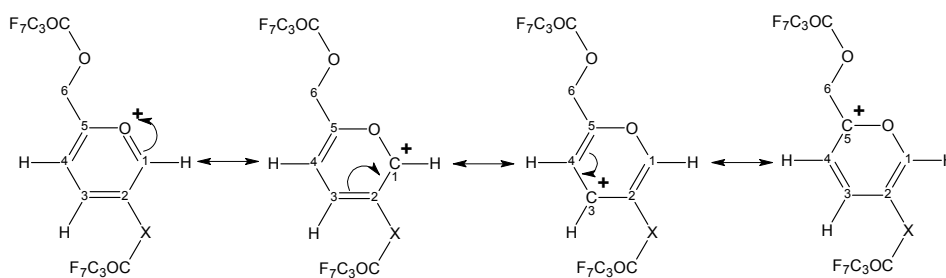


Figure 50: phénomène de stabilisation de l'ion  $A_3^+$  par délocalisation de la charge

### (3) Fragmentations suivant la série B.

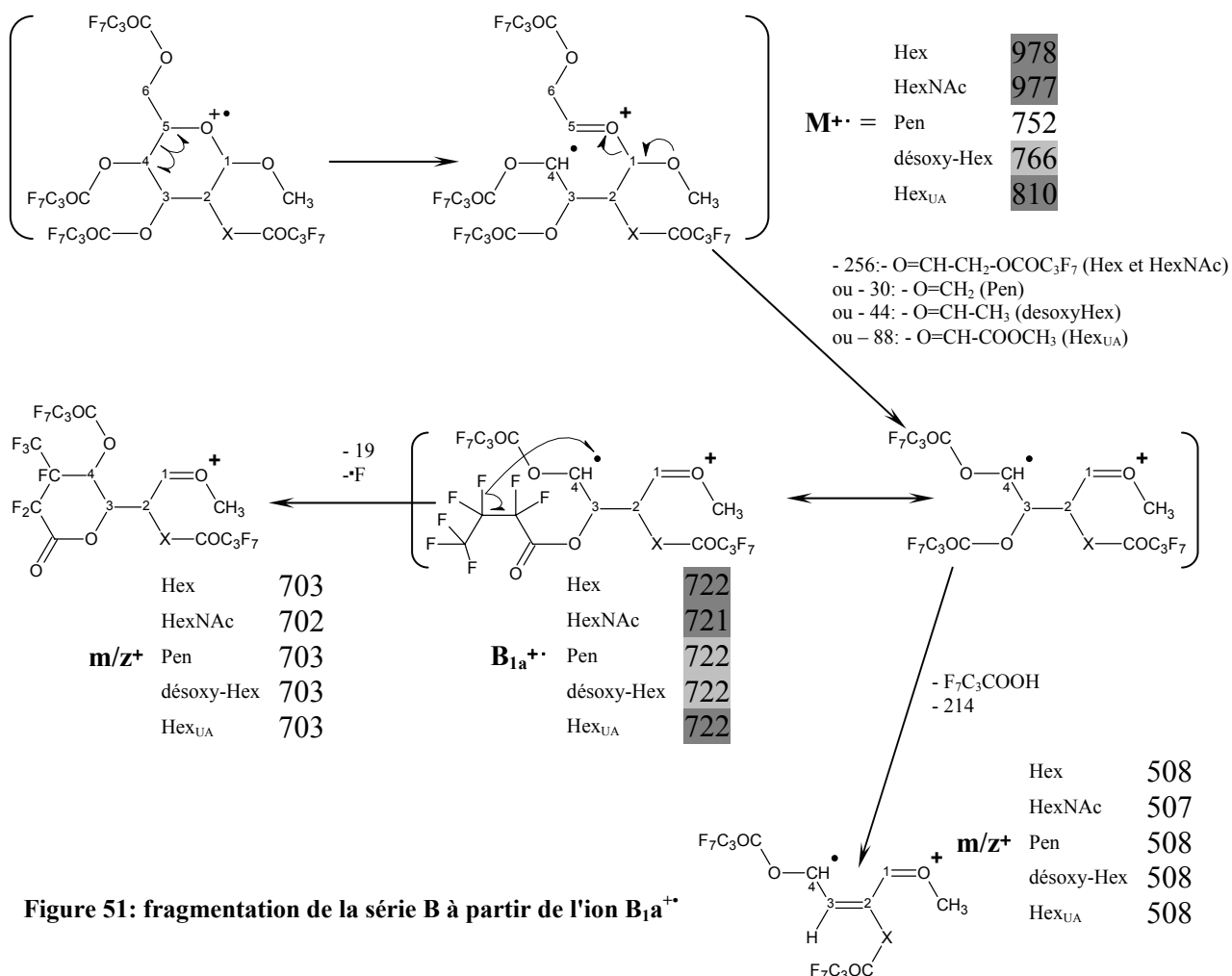


Figure 51: fragmentation de la série B à partir de l'ion  $B_{1a}^{+•}$

L'ion  $M^{++}$  peut donner deux types d'ions  $B_1^{+}$  (le  $B_{1a}^{++}$  et le  $B_{1b}^{++}$ ) par un mécanisme de double fragmentation des liaisons  $C_4-C_5$  et  $O-C_1$ . Ces deux ions comportent les carbones 1, 2, 3 et 4, mais ils diffèrent par l'emplacement de leur charge (figures 51 et 52). Il faut noter que ces ions n'apparaissent pas dans la plus part des spectres des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, excepté pour les dérivés des pentoses et des désoxy-hexoses pour lesquels ils sont faiblement présents. Encore une fois, cela est sans doute dû à l'instabilité de ces ions qui en donnent d'autres, plus petits, par dégradation. Parmi ces ions secondaires, on trouve les ions  $[B_1-F]^+$  à  $m/z$  703 (702 pour les hexosamines) et  $[B_1-F7C3COOH]^+$  à  $m/z$  508 (507 pour les hexosamines).

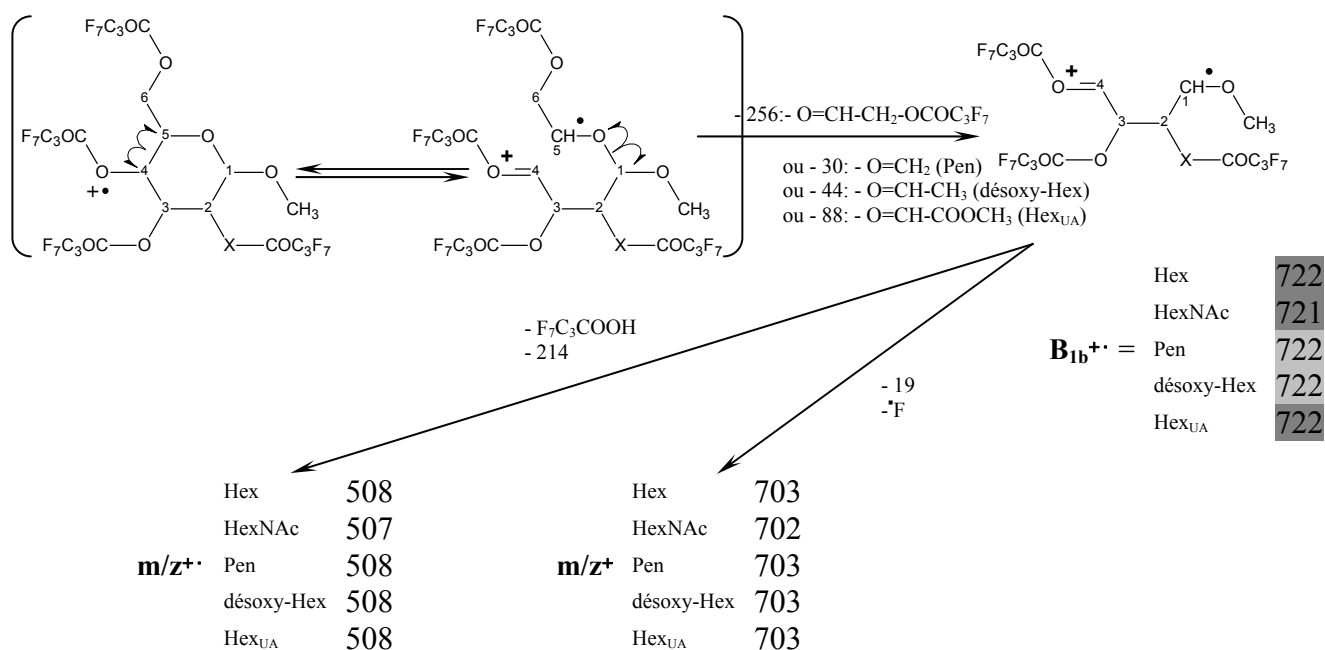


Figure 52: fragmentation de la série B à partir de l'ion  $B_{1b}^{++}$

L'ion primaire  $B_{1a}^{++}$ , après réarrangement d'un hydrogène, donne l'ion  $B_2^+$  par la perte du carbone  $C_4$  et du groupe heptafluorobutyrate qu'il porte (figure 53).

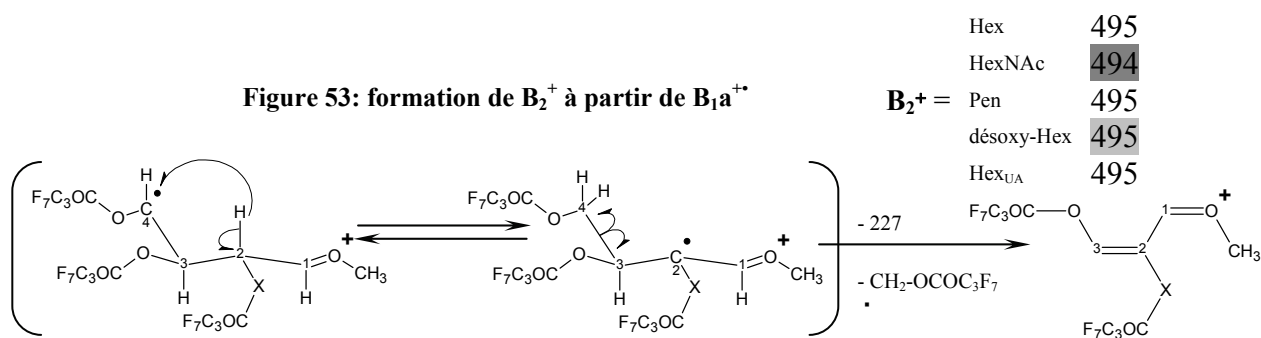


Figure 53: formation de  $B_2^+$  à partir de  $B_{1a}^{++}$



Il peut aussi donner l'ion  $F_1^+$ , toujours par la perte du carbone  $C_4$  et de son groupement heptafluorobutyrate, mais cette fois-ci après réarrangement du groupement présent sur le carbone  $C_2$  (figure 54).

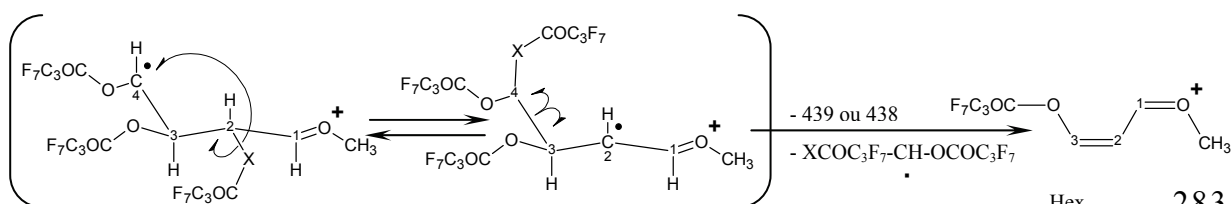


Figure 54: formation de l'ion  $F_1^+$  à partir de  $B_{1a}^{+}$

|           |                   |     |
|-----------|-------------------|-----|
| $F_1^+ =$ | Hex               | 283 |
|           | HexNAc            | 283 |
|           | Pen               | 283 |
|           | désoxy-Hex        | 283 |
|           | Hex <sub>UA</sub> | 283 |

$B_{1a}^{+}$  peut donner l'ion  $J_1^+$ , après réarrangement de l'heptafluorobutyrate présent sur le carbone  $C_3$  et rupture de la liaison  $C_2-C_1$  (figure 55).

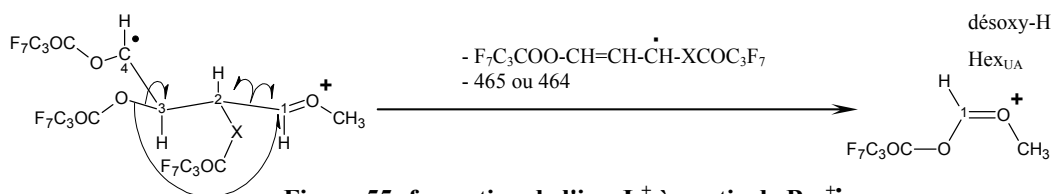
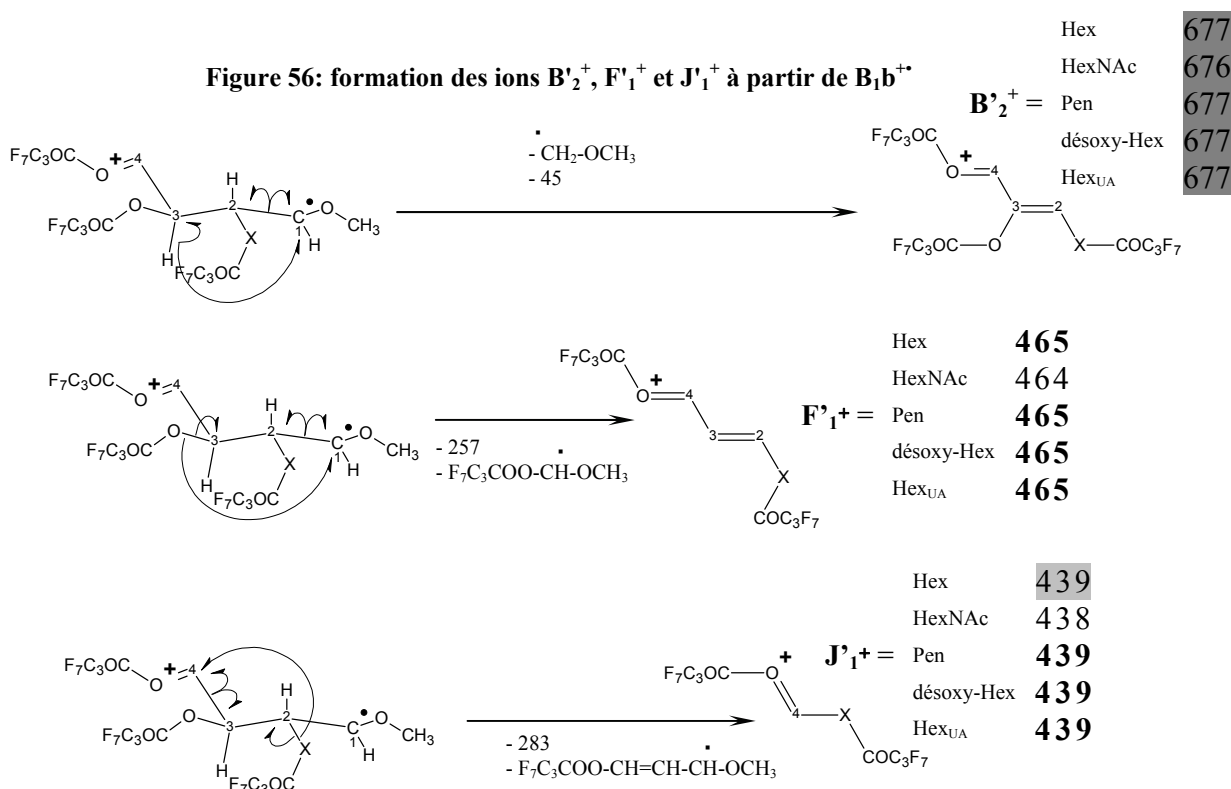


Figure 55: formation de l'ion  $J_1^+$  à partir de  $B_{1a}^{+}$

|           |                   |     |
|-----------|-------------------|-----|
| $J_1^+ =$ | Hex               | 257 |
|           | HexNAc            | 257 |
|           | Pen               | 257 |
|           | désoxy-Hex        | 257 |
|           | Hex <sub>UA</sub> | 257 |

Quant à l'ion  $B_{1b}^{+}$ , il fournit les ions  $B_2^+$ ,  $F_1^+$  et  $J_1^+$  par des mécanismes assez comparables.



Les masses de ces ions sont différentes de celles de leurs homologues provenant de l'ion primaire  $B_{1a}^{+\bullet}$ , car la charge ne se trouve pas au même endroit sur les deux ions primaires, ce qui induit des ruptures différentes (figure 56).

Mais surtout, les deux ions  $B_{1a}^{+\bullet}$  et  $B_{1b}^{+\bullet}$  partagent la capacité de fournir un ion capital pour l'analyse des spectres de masse. Il s'agit de l'ion  $B_3^+$  (figure 57) qui provient d'une cyclisation de l'ion primaire  $B_{1(a\text{ ou }b)}^{+\bullet}$ , suivie de la perte d'un groupement heptafluorobutyrate. Bien que dans les deux cas les mécanismes qui permettent sa formation soient différents, les deux ions primaires  $B_{1(a\text{ ou }b)}^{+\bullet}$  donnent exactement le même ion  $B_3^+$ .

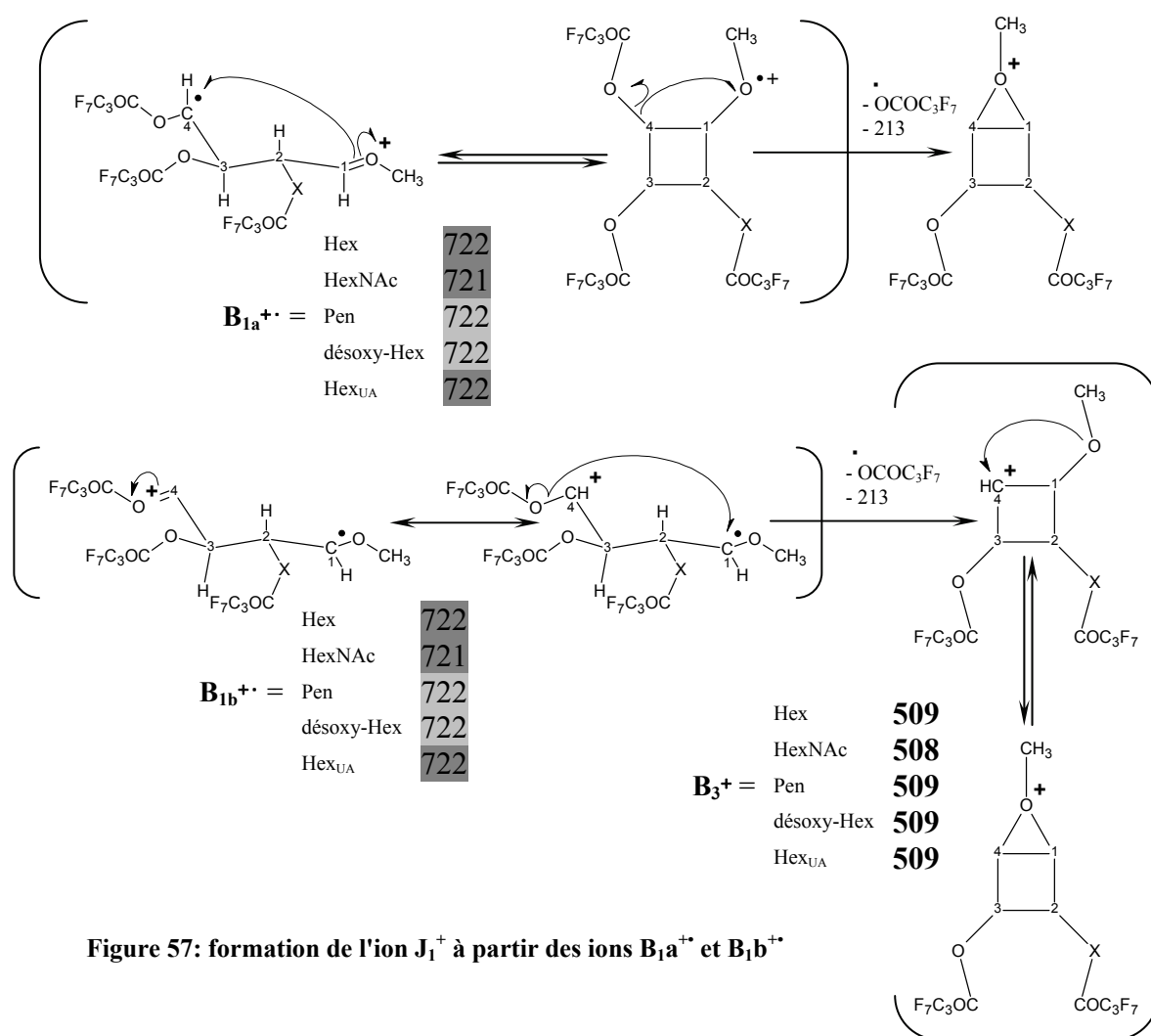
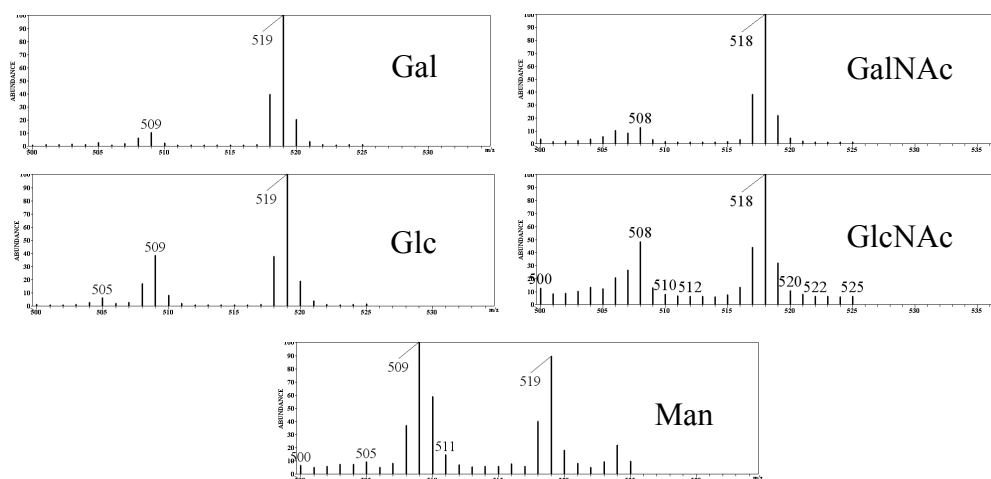


Figure 57: formation de l'ion  $J_1^+$  à partir des ions  $B_{1a}^{+\bullet}$  et  $B_{1b}^{+\bullet}$

Cet ion permet sans ambiguïté, dans le cas des hexoses et hexosamines, de déterminer à quel épimère correspond le spectre de masse étudié. Ainsi, lors de l'analyse des spectres de masse des hexoses, cet ion ( $m/z$  509) est plus abondant dans les spectres des dérivés HFB des O-méthyl-mannosides que dans ceux des glucosides, et surtout, plus abondant que dans ceux des galactosides. Son intensité est calculée par rapport à celle de l'ion  $A_3^+$  ( $m/z$  519). Si le rapport

509/519 est environ de 1, il s'agit d'un spectre de masse d'un des pics représentant le mannose. Si le rapport est d'environ 1/2, il s'agit du glucose. Enfin, si le rapport est de 2/10 ou moins, il s'agit du galactose.

Il en est de même pour les dérivés HFB des O-méthyl-hexosamines, pour lesquels l'ion ( $M = 508$  u) est plus abondant dans les spectres des dérivés de la glucosamine ( $508/518 = 1/2$ ) que dans ceux de la galactosamine ( $508/518 = 1/10$ ) (figure 58 et spectres en annexe).



**Figure 58: zoom sur la zone des spectres de masse EI des dérivés HFB O-méthyl-glycosides des Gal, Man, Glc, GalNAc et GlcNAc, permettant de visualiser les rapports 509/519 (hexoses) et 508/518**

#### **(4) Fragmentations suivant la série C**

Si l'on se réfère aux règles définies par les précurseurs de l'analyse des mécanismes de fragmentation (Kochetkov N. K. et coll., 1966 et Heyns K. et coll., 1967) (voir page 28). A partir de l'ion moléculaire cyclique instable  $M^{+\bullet}$ , il peut y avoir formation par résonance d'un isomère non cyclique  $M_1^{+\bullet}$ . Cet ion, lui-même très instable, va former l'ion  $C_1^{+\bullet}$  par perte d'un groupement associant l'oxygène du cycle au carbone 1, flanqué de son groupement méthoxy (figure 59).

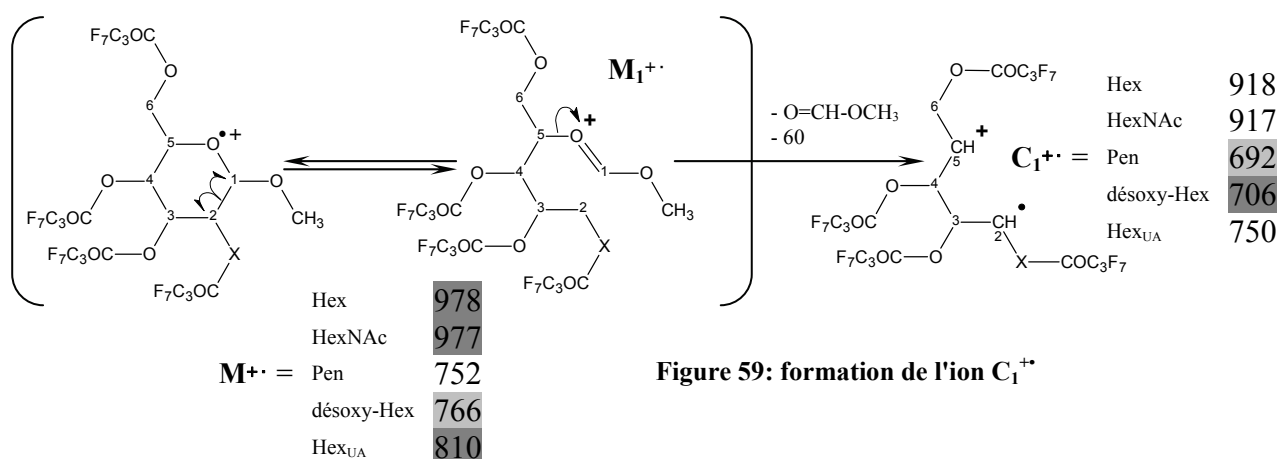


Figure 59: formation de l'ion  $C_1^{+\bullet}$

Remarquons que cet ion  $C_1^{+\bullet}$  présente une charge sur un carbone et non sur un hétéroatome (O ou N). En outre, un ion susceptible d'y correspondre (en masse) est parfois présent dans certains des spectres des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides. Toutefois, ce type de forme ionique (charge sur un carbone plutôt que sur un oxygène) n'est actuellement considéré que comme peu probable. Les mécanismes de fragmentation décrits dans la littérature doivent donc être pris avec prudence. Nous pensons donc qu'il est préférable d'envisager un ion qui respecte les règles de fragmentation et qui provient de l'ion  $M_2^{+\bullet}$  (figure 60):

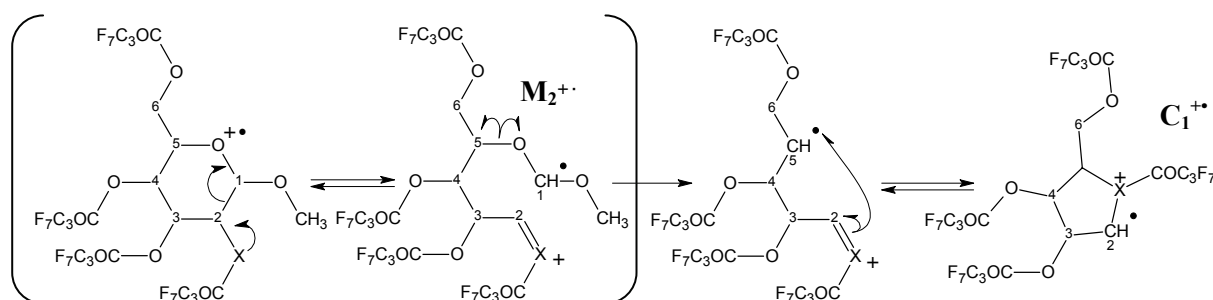


Figure 60: formation de  $C_1^{+\bullet}$  à partir de l'ion  $M_2^{+\bullet}$

De toute façon, qu'il existe sous une forme ou sous une autre, cet ion est instable, il subit donc différentes voies de dégradation qui amènent à des ions fils qui correspondent à des masses visibles, souvent de façon importante, sur les spectres de masse. Ces derniers peuvent donc être envisagés car ils peuvent également être formés à partir de cette forme ionique plus plausible.

- S'il perd un acide heptafluorobutyrique, après réarrangement d'un hydrogène, il y a formation de plusieurs isomères possibles d'un ion abondant stabilisé par résonance. Nous l'avons appelé  $[C_1-F_7C_3COOH]^{+\bullet}$  ou  $[C_1-214]^{+\bullet}$ . Il donne à son tour un ion abondant  $C_3^+$ , par perte d'un radical heptafluorobutyrate (figure 61).

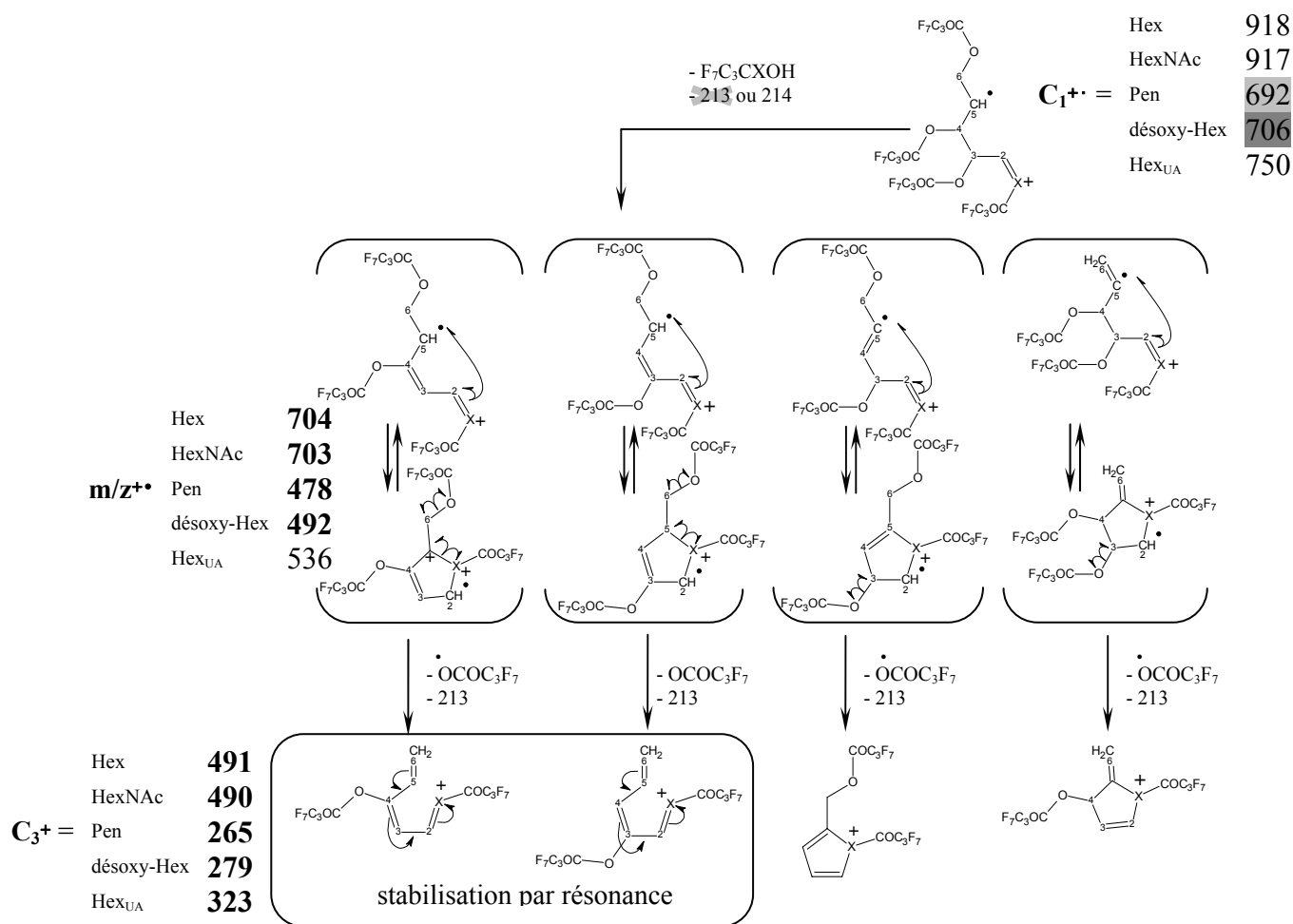


Figure 61: formation des ions [C<sub>1</sub>-214]<sup>+</sup> et C<sub>3</sub><sup>+</sup> à partir de C<sub>1</sub><sup>+</sup>

- Si l'ion C<sub>1</sub><sup>+</sup> perd un radical heptafluorobutyrate (F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>COO<sup>•</sup>) et en fonction de l'emplacement de ce groupe partant, il y a 3 voies possibles de dégradation:

- La perte du groupement fixé sur le carbone 4 (voie C<sup>1</sup>) amène à la formation d'un ion C<sub>2</sub><sup>+</sup> puis C<sub>3</sub><sup>+</sup> par la perte d'un acide heptafluorobutyrique (figure 62).

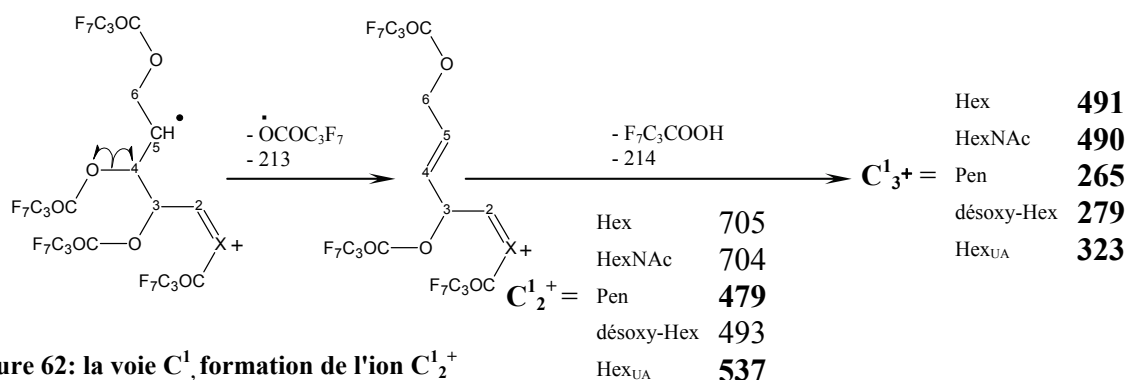


Figure 62: la voie C<sup>1</sup>, formation de l'ion C<sub>2</sub><sup>+</sup>

2. Si le radical heptafluorobutyrate ( $F_7C_3COO^\bullet$ ) partant est sur le carbone 3 (voie  $C^2$ ), il y a formation d'un ion  $C^2_{2^+}$  constitué d'un cycle incluant les carbones 2, 3, 4 et 5, ainsi que l'oxygène (ou l'azote, pour les hexosamines) du groupement HFB porté par le carbone 2. Cet ion  $C^2_{2^+}$  peut ensuite donner  $C^2_{3^+}$  par perte d'un acide heptafluorobutyrique (figure 63).

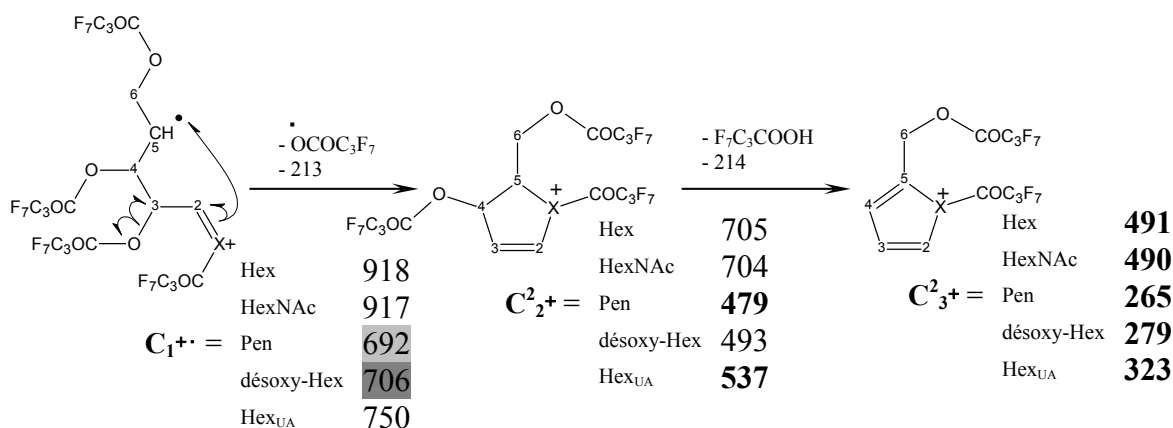


Figure 63: la voie  $C^2$

3. S'il y a perte du groupement fixé sur le carbone 6 (voie  $C^3$ , impossible pour les pentoses, car ils ne contiennent pas de carbone 6). Il y a formation d'un ion  $C^3_{2^+}$ ; celui-ci donnant à son tour les ions  $C^3_{3^+}$  isomères des ions  $C^3_{3^+}$ , puis  $C^3_{4^+}$  (figure 64). Il faut noter que les désoxy-hexoses ne semblent pas suivre cette voie  $C^3$ , car leurs spectres de masse ne montrent aucun de ces ions. (voir annexe).

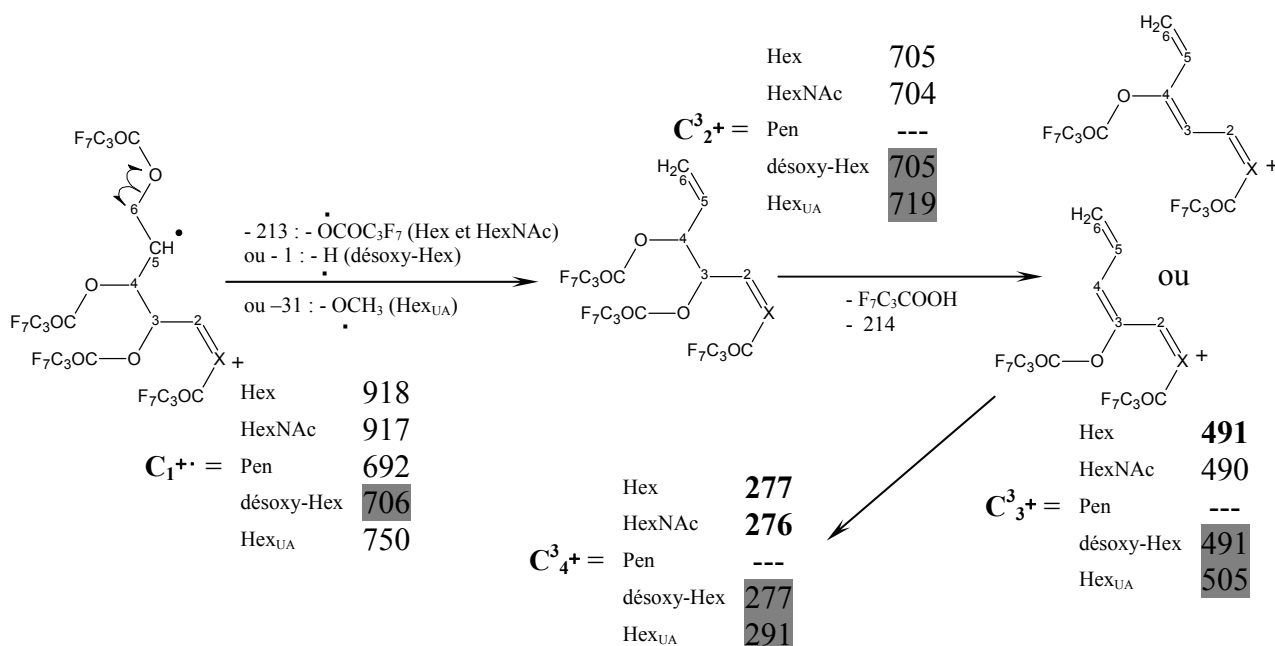


Figure 64: la voie  $C^3$

### (5) Fragmentations suivant la série D

Cette série nécessite la formation de l'ion intermédiaire non cyclique et instable  $M_1^{+\cdot}$ . Cet ion subit d'abord un réarrangement du groupement heptafluorobutyrate fixé sur le carbone 3 vers le carbone 1, puis la rupture de la liaison C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> permet la formation de l'ion  $D_1^+$ . Cet ion est sans doute très instable, car il est invisible sur l'ensemble des spectres des différentes familles de monosaccharides. En revanche, la rupture de la liaison O-C<sub>1</sub> de cet ion, pourrait permettre la formation d'un ion  $J_1^+$  abondant pour la plupart des familles des dérivés HFB des O-méthylglycosides (figure 65). Toutefois, nous ferons remarquer que cet ion  $J_1^+$  peut aussi être obtenu, comme nous l'avons déjà mentionné, à partir de la série B. Or, le fait que l'ion  $D_1^+$  soit invisible, nous fait penser que la série D pourrait ne pas s'appliquer à nos dérivés et que l'ion  $J_1^+$  proviendrait uniquement de la série B.

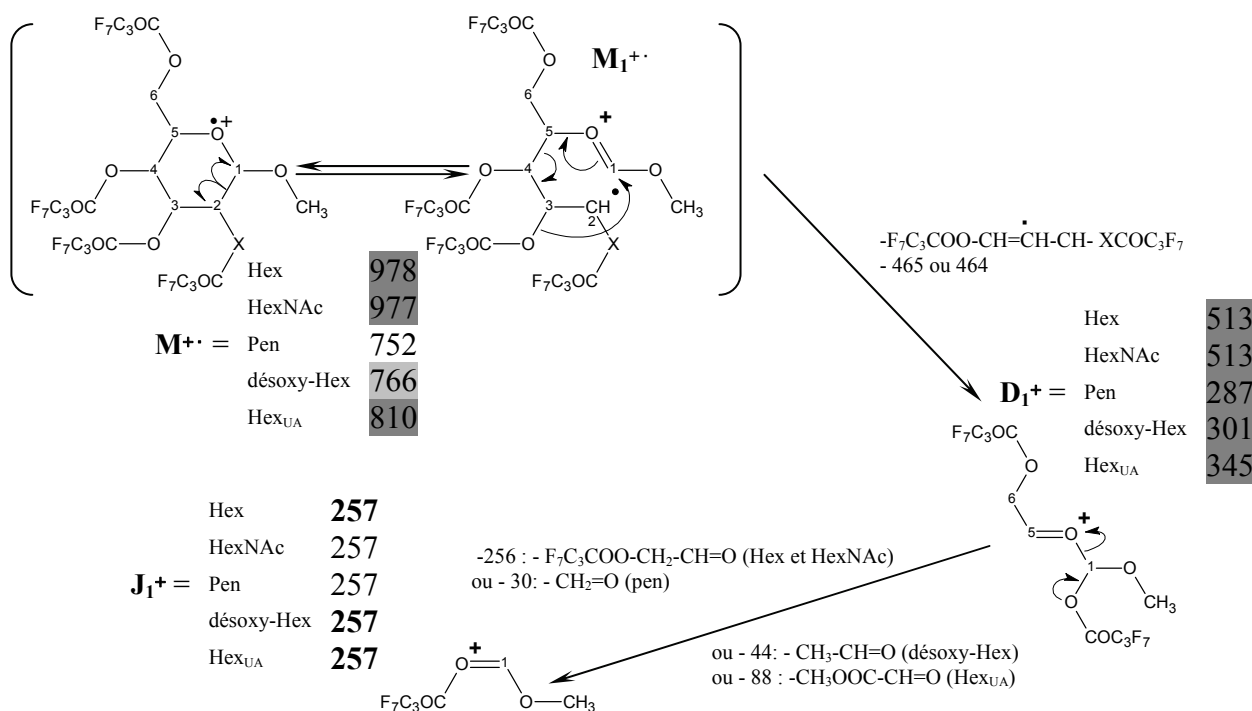


Figure 65: formation des ions  $D_1^+$  et  $J_1^+$  de la série D

### (6) Fragmentations suivant la série E

La perte du groupement fixé sur le carbone 5 de l'ion moléculaire  $M^{+\cdot}$  fournit un ion  $E_1^+$  d'une masse de m/z 751 (750 pour les hexosamines). Cet ion donne à son tour l'ion  $E_2^+$ , par la perte d'un acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène. Puis  $E_2^+$  peut produire

l'ion  $[E_2-32]^+$  par la perte d'un méthanol ou l'ion  $E_3^+$  par la perte d'un autre acide heptafluorobutyrique (figure 66).

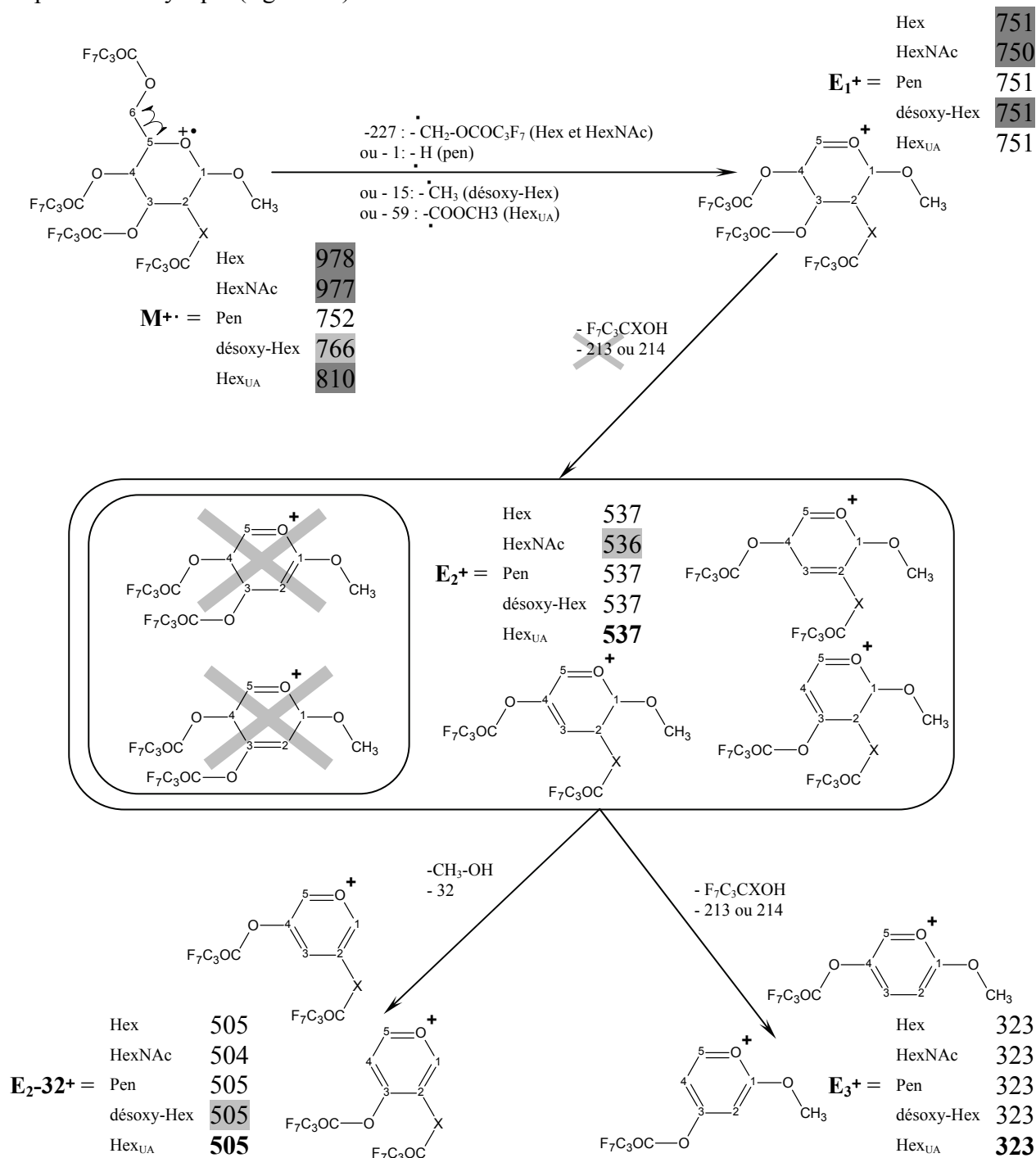


Figure 66: fragmentations suivant la série E

Dans le cas des acides hexuroniques, cette série donne des ions de même masse que leurs équivalents de la série C, il est donc impossible de déterminer si les deux séries coexistent, ou si une seule a réellement lieu. Toutefois, comme ces deux séries existent pour les autres familles de composés, nous penchons plutôt pour la solution de la coexistence.



En outre, cette série E revêt une forme particulière et abondante dans les spectres de masse des formes furaniques de l'ensemble des monosaccharides. Pour ces espèces, l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  perd le groupement fixé sur le carbone 4 (et non 5 comme pour les formes pyraniques). Cela amène à la formation d'un ion  $E_1^+$  de masse  $m/z$  525 (524 pour les hexosamines) relativement abondant, qui est l'ion diagnostique des formes furaniques (voir la flèche, en gras, sur les spectres de l'annexe). Cet ion, par la perte d'un groupement acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène, donne l'ion  $E_2^+$ , lui aussi assez abondant et caractéristique des furanoses (figure 67).

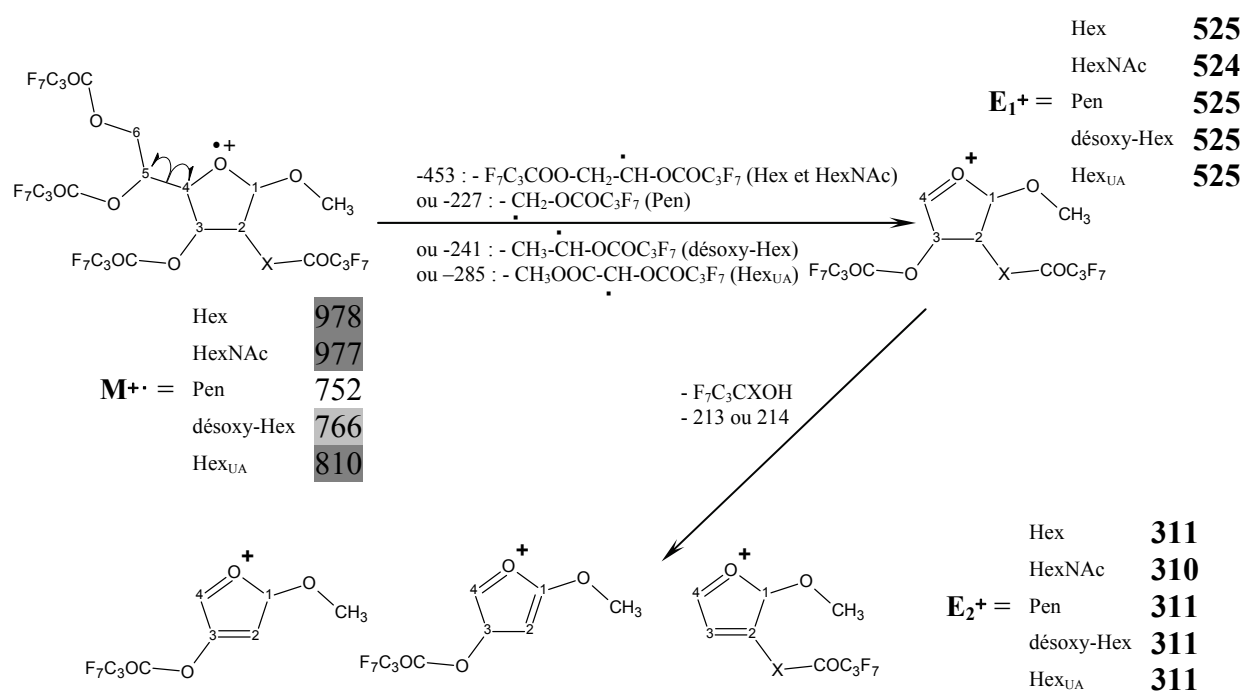
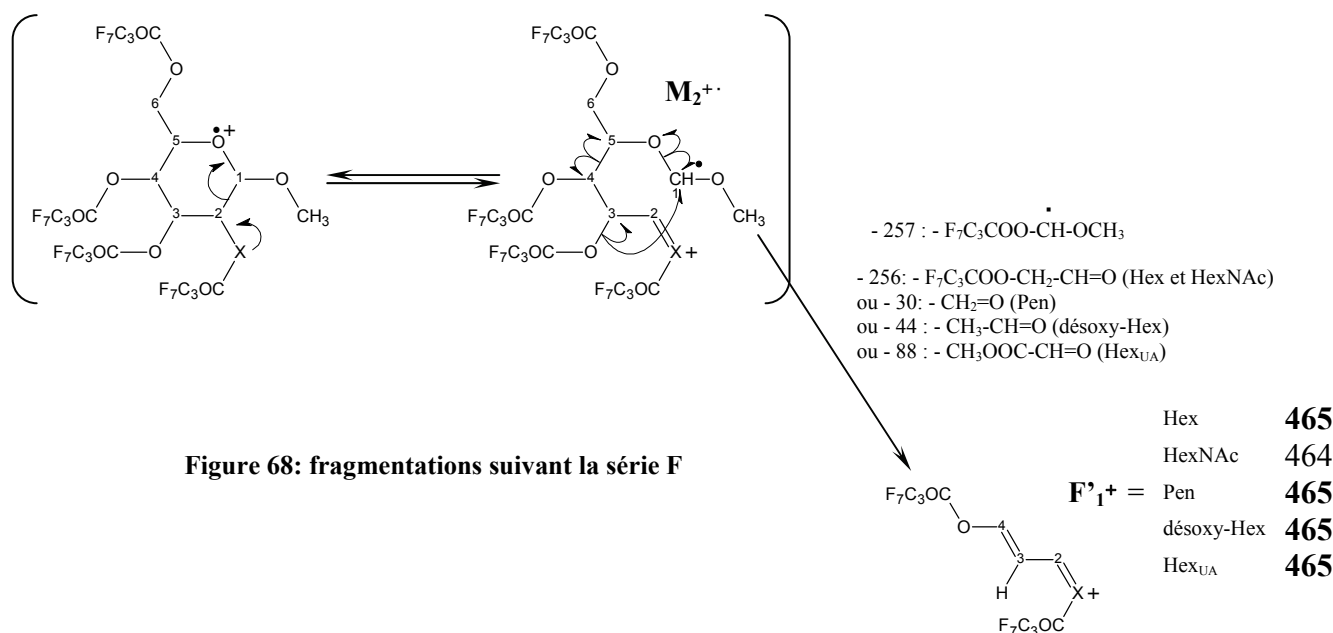


Figure 67: série E particulière aux formes furaniques

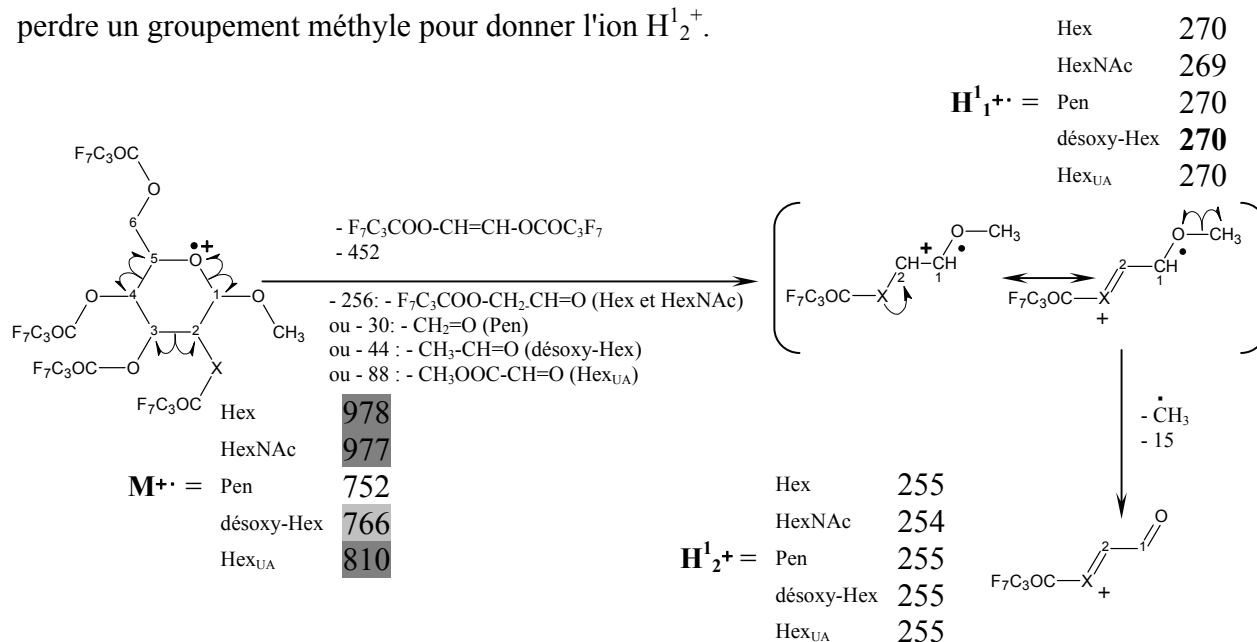
### (7) Fragmentations suivant la série F

Nous avons déjà décrit les ions  $F_1^+$  et  $F_1'^+$  lors de la série B. Cependant,  $F_1'^+$  peut également être obtenu par une autre voie de fragmentation faisant intervenir la formation d'un intermédiaire acyclique  $M_2^{+\bullet}$ . Cet ion est formé par la rupture de la liaison  $C_1-C_2$  de l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$ . La formation de l'ion  $F_1'^+$  provenant d'un réarrangement d'un radical heptafluorobutyrate du carbone 3 vers le carbone 1 et ruptures concomitantes des liaisons  $C_4-C_5$  et  $O-C_1$  (figure 68). Cet ion est abondant pour presque toutes les familles de monosaccharides (excepté pour les hexosamines).



### (8) Fragmentations suivant la série H

Il existe trois voies de fragmentation de type H ( $H^1$ ,  $H^2$  et  $H^3$ ), qui correspondent à des mécanismes de rupture du cycle des monosaccharides en trois points de façon à ne fournir que des ions qui contiennent deux des carbones vicinaux qui constituent le cycle. Notons que la nomenclature du chiffre en exposant du H indique quels carbones du cycle composent l'ion. Ce chiffre nomme, parmi les deux atomes de carbone vicinaux qui constituent le cycle, celui qui porte le chiffre le plus petit des deux. Ainsi, la voie  $H^1$  (figure 69) consiste en la formation de l'ion  $H^1_{1+}$  qui contient les carbones 1 et 2 du cycle. Il est stabilisé par résonance et peut perdre un groupement méthyle pour donner l'ion  $H^2_{2+}$ .



**Figure 69: la voie H<sup>1</sup>**

La voie H<sup>2</sup> commence par la formation d'un ion H<sup>2</sup><sub>1</sub><sup>+</sup> contenant les carbones 2 et 3 du cycle.  
La dégradation de cet ion, par la perte du radical [F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>CO]<sup>•</sup>, donne l'ion H<sup>2</sup><sub>2</sub><sup>+</sup> (figure 70).

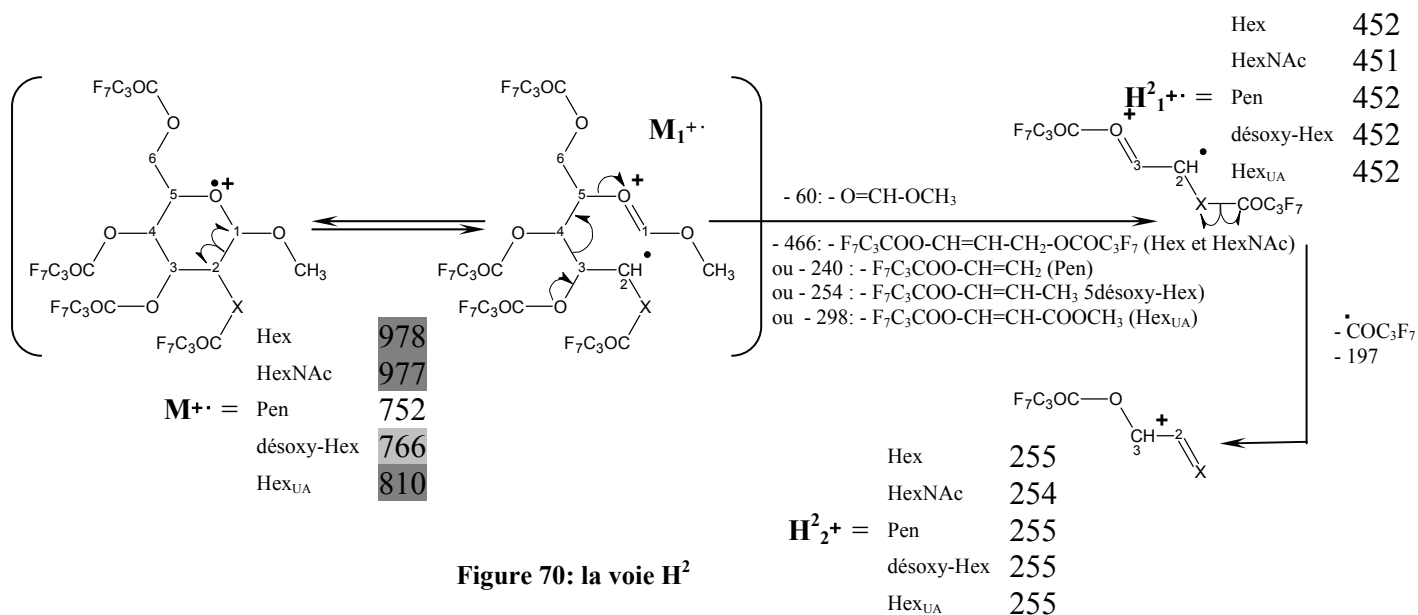


Figure 70: la voie H<sup>2</sup>

Enfin, la voie de fragmentation de type H<sup>3</sup> (figure 71), correspond à la formation de l'ion H<sup>3</sup><sub>1</sub><sup>+</sup> contenant les carbones 3 et 4 du cycle. Encore une fois, la perte du radical [F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>CO]<sup>•</sup> permet la formation de l'ion H<sup>3</sup><sub>2</sub><sup>+</sup>.

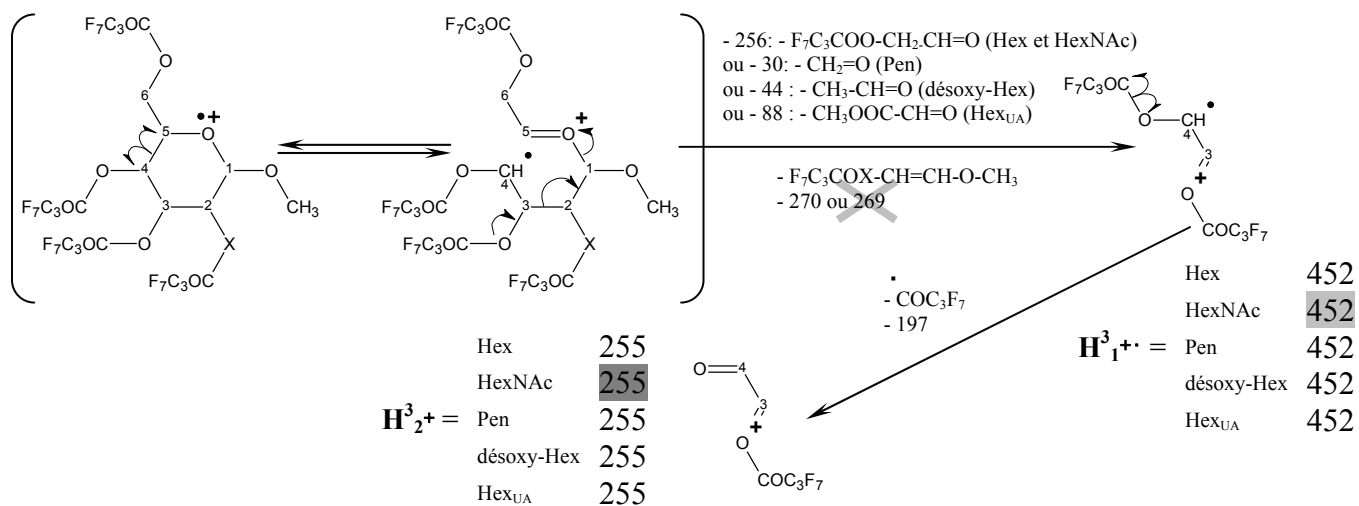


Figure 71: la voie H<sup>3</sup>

Quel que soit le type de monosaccharide étudié, aucune de ces voies de fragmentation ne donne des ions particulièrement abondants; cependant, tous ces ions sont décelables sur les spectres lors d'une analyse fine. Avec notre protocole, ils ne fournissent pas d'information capitale sur la structure des dérivés étudiés. En revanche, ce type d'ion devient primordial lors

de l'analyse de dérivés partiellement méthylés et acétylés (voir le chapitre des généralités sur les glycosides partiellement méthylés p. 30), car avec ce type de dérivés, ces ions permettent de déterminer l'enchaînement et les points de branchements des monosaccharides dans les glycannes. Jusqu'à maintenant, après la première dérivation des hydroxyles libres des glycannes par méthylation suivie d'une méthanolyse, la deuxième dérivation faisait intervenir l'acétylation, la trifluoroacétylation ou la triméthyl-silylation. Or, tout comme les deux premières techniques que nous venons de citer, la dérivation par des groupements HFB correspond bien à une acylation. Ainsi, rien n'empêche d'adapter cette technique de double dérivation à la formation de dérivés partiellement méthylés, puis dérivés par les HFB. De cette manière, l'analyse des ions de type H rendrait possible la détermination des points de branchements des monosaccharides les un sur les autres et donc, leur enchaînement dans les glycannes. Nous avons déjà fait quelques expérimentations dans ce sens. Les résultats obtenus étaient encourageants, mais ne semblaient pas amener d'informations supplémentaires par rapport aux méthodes précédentes. Toutefois, des études plus poussées restent à envisager, car nous avons déjà montré les avantages de la dérivation par les HFB par rapport à celles obtenues par les trifluoroacétates et TMS.

### (9) Fragmentations suivant la série K

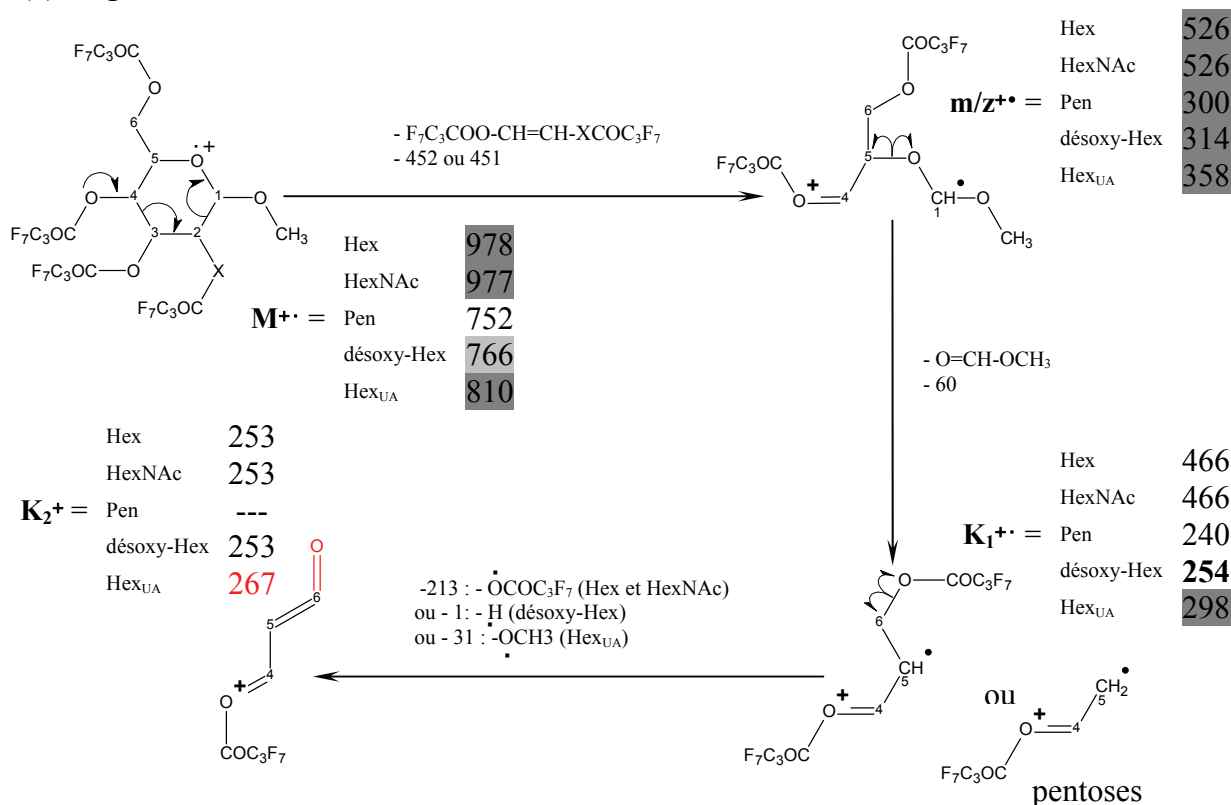


Figure 72: fragmentations suivant la série K

Cette série décrite par Kochetkov et Chizhov fournit l'ion  $K_1^{+\bullet}$  qui contient les carbones 4, 5 (pour les pentoses) et 6 (pour les autres).  $K_1^{+\bullet}$  peut, à son tour, fournir un ion fils  $K_2^+$  (sauf pour les pentoses) par perte du groupement fixé sur le carbone 6 (figure 72). Tout comme ceux de la série H, ces deux ions n'ont pas d'intérêt pour l'analyse des spectres dans nos conditions expérimentales, mais ils pourraient fournir des informations importantes sur les liaisons inter-glycosidiques liées en 4 avec des dérivés partiellement méthylés, puis dérivés par les HFB.

### (10) Les deux séries X et Z particulières aux dérivés HFB

Quel que soit le type de molécule analysé, une des particularités des dérivés HFB est que les voies principales de fragmentation naissent de la perte des groupements HFB. Pour cela il y a deux voies possibles. La première (série X) provient de la perte d'un groupement heptafluorobutyrate  $[F_7C_3COO]^{\bullet}$  par une rupture homolytique de la liaison qui lie ce groupement à la molécule. Ce mécanisme n'est possible, en cas de chargement du monosaccharide sur l'oxygène semi-acétalique, que s'il y a ouverture du cycle. En outre, il est probable que des phénomènes de résonance viennent stabiliser ces ions ce qui expliquerait la forte intensité des ions ainsi formés (figure 73).

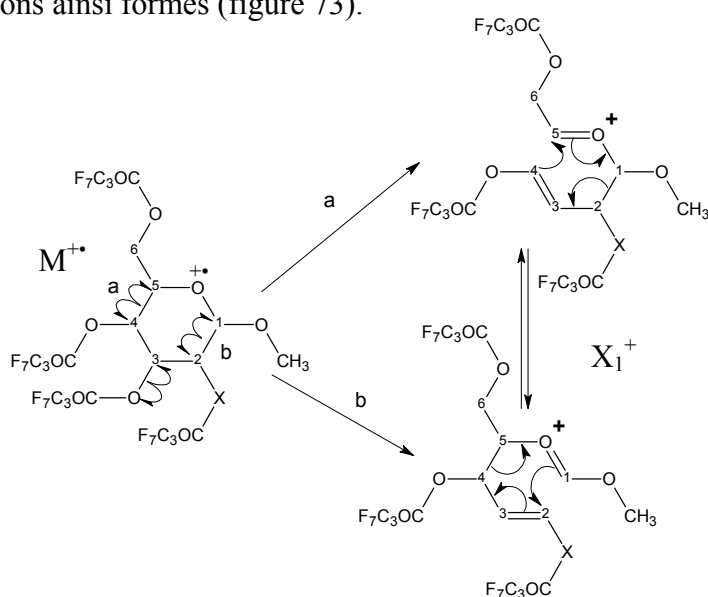


Figure73: formation directe de  $X_1^+$  sans passer par une forme cyclique

La deuxième voie de fragmentation (Série Z) provient de la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique ( $F_7C_3COOH$ ), ou pour les hexosamines, de son équivalent amide ( $F_7C_3CONH_2 =$  heptafluorobutyramide). Ceci n'est possible que par un mécanisme de réarrangement d'un hydrogène de la molécule (figure 74).

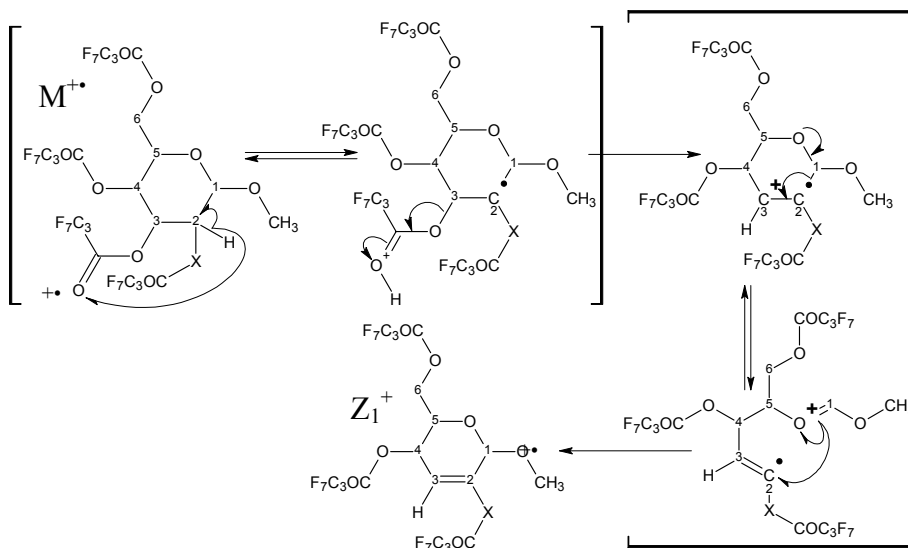


Figure 74: réarrangement d'un hydrogène à l'origine de la série Z

Théoriquement, ce processus nécessite pour fonctionner, que la charge se trouve sur l'oxygène d'un carbonyle (ou sur l'azote dans le cas de la fonction amide d'une hexosamine) du groupe partant et non sur celui de la fonction semi-acétalique. Mais comme nous l'avons déjà mentionné, l'ion  $M^{+\bullet}$  peut être chargé par l'arrachement d'un électron provenant de n'importe quel atome comportant un doublet libre (oxygène ou azote pour les hexosamines).

Ces deux voies (X et Z) assez semblables fournissent des ions dont les masses diffèrent seulement d'une unité de masse. La coexistence de ces deux voies explique que les ions apparaissent sur les spectres de masse comme un amas de pics de forme pseudo-gaussienne contenant plusieurs espèces ioniques (figure 75), et non pas sous celle d'un pic bien défini qui correspond à un seul ion, puisque dans ce cas, le pic le plus grand est suivi uniquement de petits pics correspondant au même ion, mais contenant un ou plusieurs isotopes plus lourds.

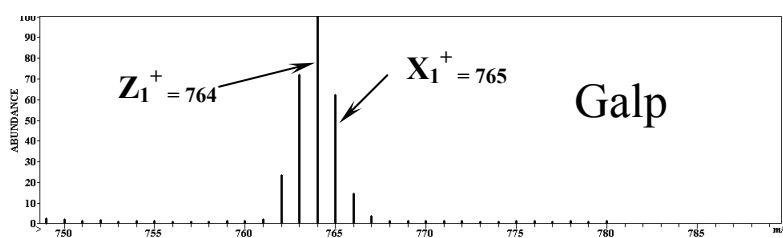


Figure 75: forme spécifique de l'amas de pics contenant les ions X et Z

(a) Fragmentations suivant la série X

L'ion  $M^{+\bullet}$  fournit les ions  $X_1^+$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate. Nous n'avons pas décrit toutes les possibilités de résonances de ces derniers car elles sont trop nombreuses pour que nous les décrivions toutes (figure 76).

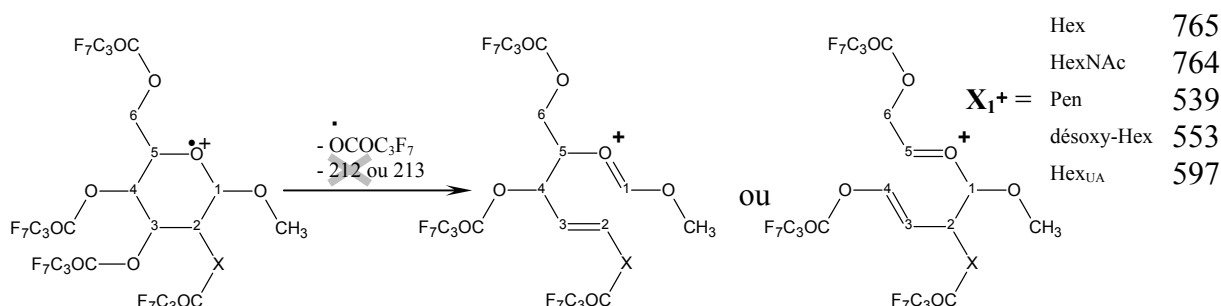


Figure 76: la série X, formation des ions de type  $X_1^+$

Remarquons que dans le cas des hexosamines, nous avons supprimé la possibilité d'une  $F_7C_3CONH_2$  (heptafluorobutyramide) partant du carbone 2, car cela donnerait naissance à un ion  $X_1^+ = 765$  (et non 764). Or, dans cette région, les spectres de masse des hexosamines montrent un amas de pics présentant un ion prédominant à 763 u. Les ions 763 et 764 sont donc respectivement  $Z_1^{+\bullet}$  et  $X_1^+$  et l'ion à 765 correspond à la somme des différentes formes isotopiques des ions  $Z_1^{+\bullet}$  et  $X_1^+$  (figure 77).

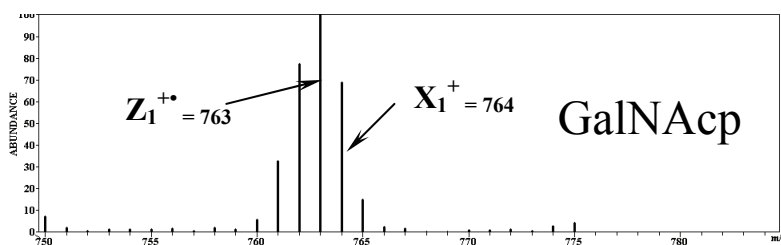


Figure 77: zoom de la zone du spectre de la GalNAc présentant l'ion  $X_1^+$

De toutes façons, même si la perte d'une molécule d'heptafluorobutyramide reste théoriquement envisageable, l'intensité du pic à 765 u indique que ce phénomène, s'il existe, est minoritaire. En revanche, la forme ionique provenant de la perte d'un acide heptafluorobutyrique du carbone 2 reste envisageable pour toutes les autres familles de monosaccharides.

L'ion  $X_1^+$  donne à son tour l'ion  $X_2^+$  par perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique ( $F_7C_3COOH$ ). Notons que cet ion peut également provenir de  $Z_1^{+\bullet}$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate [ $F_7C_3COO$ ] $^{\bullet}$  (figure 78). Remarquons que nous n'avons pas inclus dans

cette figure toutes les formes isomériques résonnantes et notamment les formes cycliques, sans doute très stables en raison de la présence des doubles liaisons conjuguées.

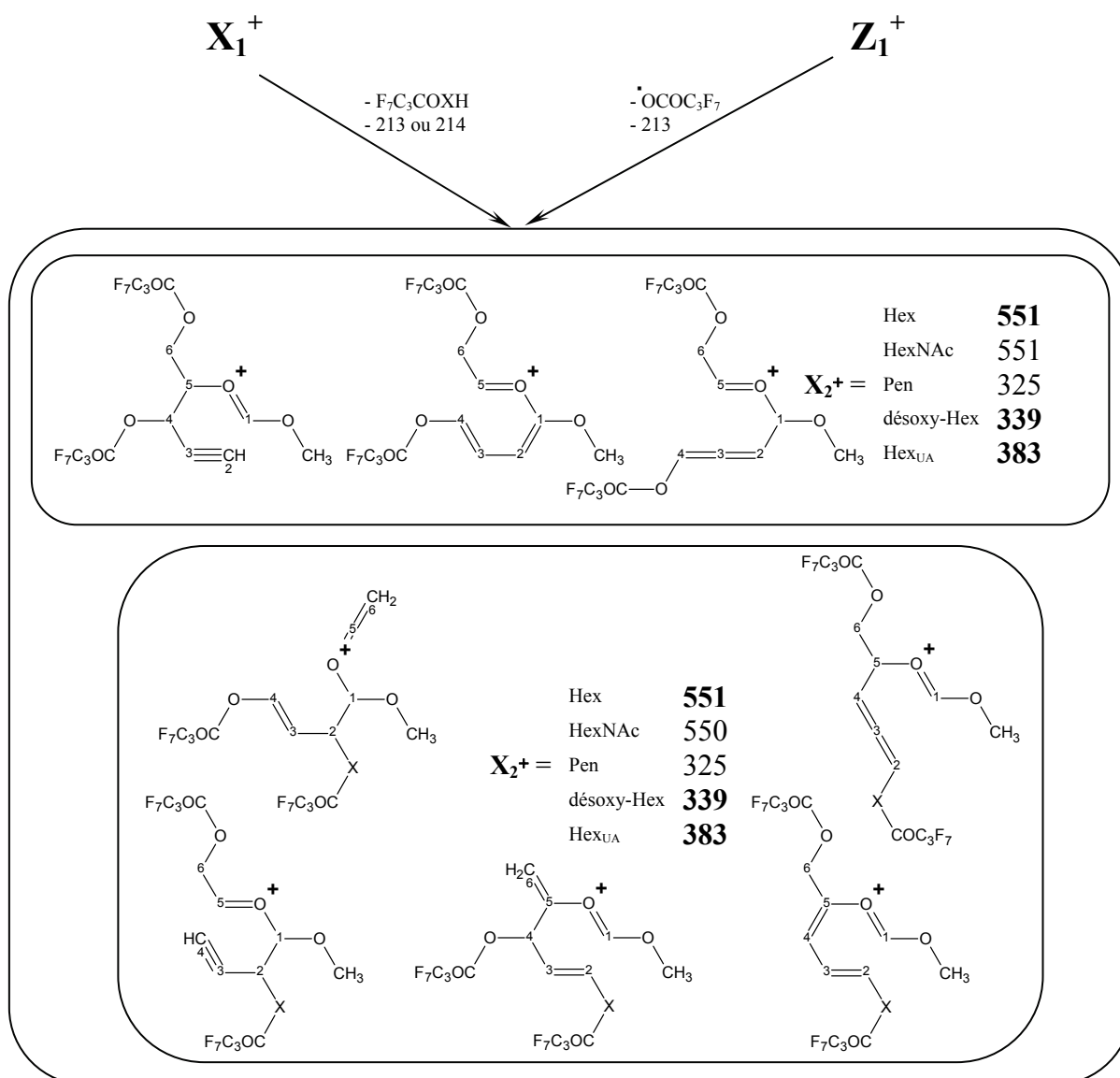


Figure 78: la série X, formation des ions de type  $X_2^+$

Ici, nous n'avons pas éliminé la possibilité d'un départ d'une molécule d'heptafluorobutyramide ( $F_7C_3CONH_2$ ) du carbone 2 des hexosamines, car le dérivé HFB du O-méthyl-glycoside de la GlcNAc fournit un ion prédominant à  $m/z$  551 qui n'est possible que dans ces conditions.

Toutefois le dérivé HFB du O-méthyl-glycoside de la GalNAc donne un ion prédominant à  $m/z$  550, qui correspond à la série X, et donc au départ d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique. Comme nous le verrons plus tard, une masse de 550 u peut aussi correspondre à un ion  $Z_2^{++}$ . Ce pic à 550 u pourrait donc être, dans le cas des hexosamines, la



somme des ions  $Z_2^+$  (n'ayant plus de groupement heptafluorobutyrylé sur le carbone 2) et des ions  $X_2^+$  (ayant toujours ce groupement sur le carbone 2). De cette façon, l'ion à 551 u correspond aux ions  $X_2^+$  (n'ayant plus de groupement heptafluorobutyrylé sur le carbone 2).

Bien que nous n'ayons pas d'explication certaine à ce phénomène, nous pensons que les différences de configuration spatiale des groupements HFB, sur les différents épimères de O-méthyl-glycosides (GlcN et GalN) favorisent, soit la formation d'ion  $X_2^+$  à 550 u, soit celle d'ion  $X_2^+$  à 551 u. Notons que cette particularité permet de déterminer facilement (tout comme le rapport 508/518 décrit dans la série B) si un spectre correspond (pour les formes pyraniques) à une glucosamine (ion 550 < 551) ou à une galactosamine (ion 550 > 551) (figure 79).

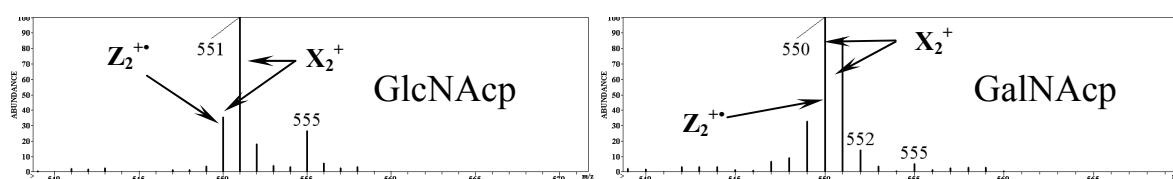


Figure 79: différenciation de GlcNAc (ion 551 majoritaire) et de GalNAc (ion 550 majoritaire)

L'ion  $X_2^+$  peut ensuite donner l'ion  $X_3^+$  à 337 u, s'il ne porte pas un groupement heptafluorobutyrylé sur le carbone 2, ou à 336 u s'il y en a un. Notons que dans ce cas,  $X_3^+$  a la même masse que  $Z_3^{++}$  (figure 80). Encore une fois, nous n'avons pas inclus dans cette figure toutes les formes isomériques résonnantes.

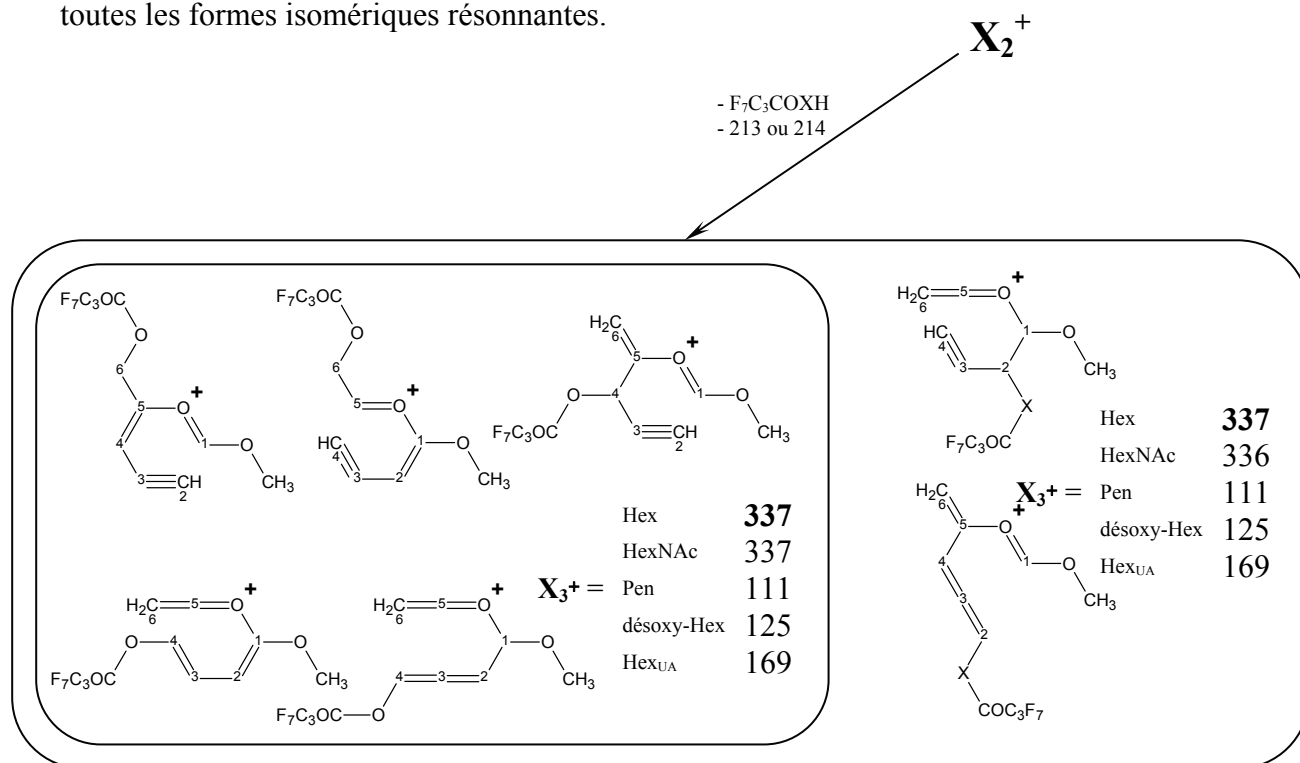


Figure 80: la série X, formation des ions de type  $X_3^+$

## Fragmentations suivant la série Z

C'est par la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique que l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  donne l'ion  $Z_1^{+\bullet}$ . En ce qui concerne les hexosamines, nous pensons que la perte, par le carbone 2, d'une molécule d'heptafluorobutyramide ( $F_7C_3CONH_2$ ) n'est pas favorisée, car cela donnerait des ions  $Z_1^{+\bullet}$  d'une masse de 764 u et par conséquent un ion  $X_1^+$  à 765 u. Or, sur les spectres de masse des hexosamines, on observe un amas de pics présentant un ion prédominant à 763 u. Les ions à 763 u et 764 u sont donc respectivement  $Z_1^{+\bullet}$  et  $X_1^+$  (voir la série X p. 169). Notons que les ions  $Z_1^{+\bullet}$  peuvent donner les ions  $X_2^+$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate  $[F_7C_3COO]^\bullet$ , mais également qu'une partie d'entre eux peut donner  $E_2^+$  par perte du radical fixé sur le carbone 5 (figure 81).

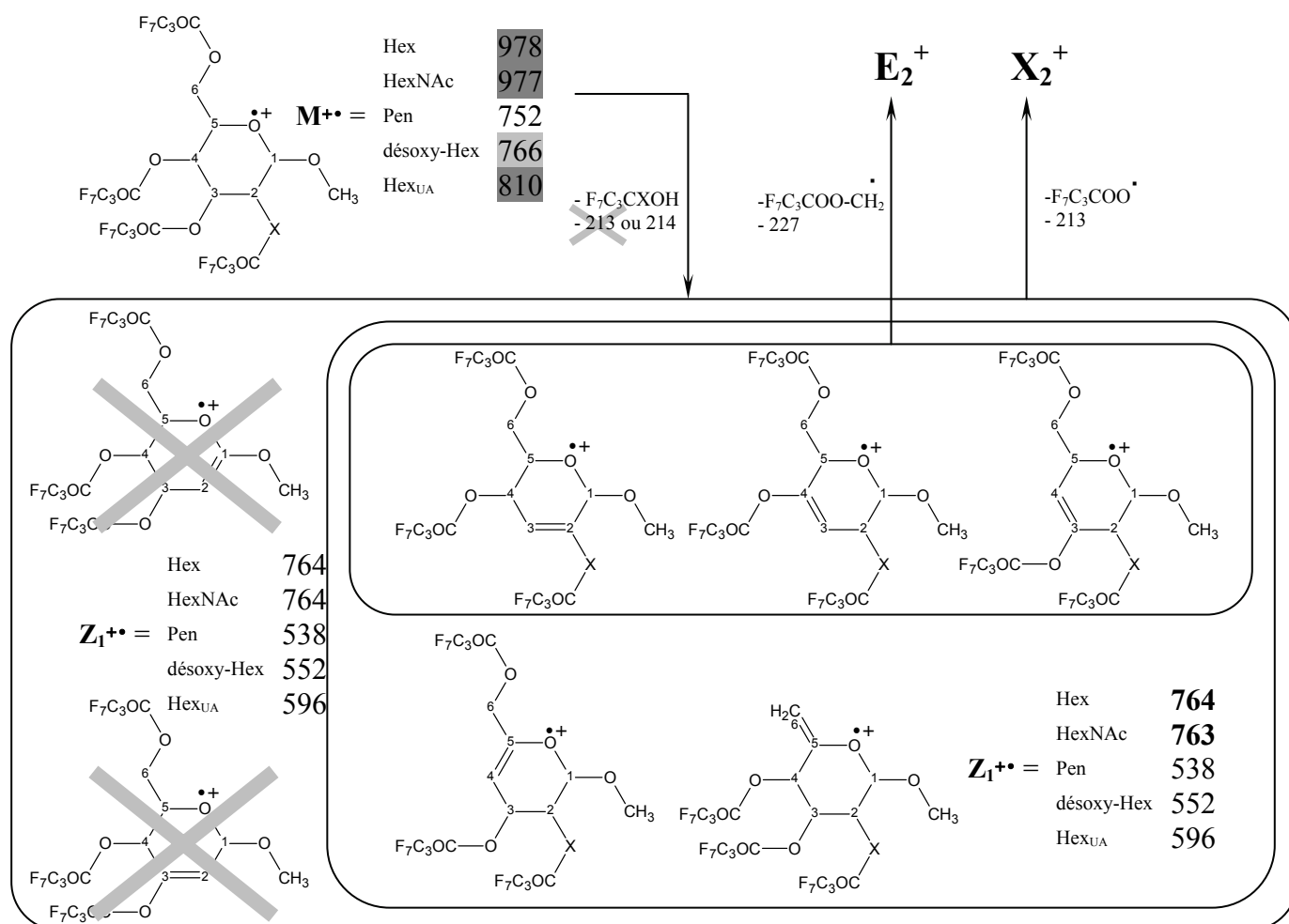


Figure 81: la série Z, formation des ions de type  $Z_1^{+\bullet}$

$Z_1^{+\bullet}$  donne un ion  $Z_2^{+\bullet}$  d'une masse de 550 u par la perte d'une autre molécule d'acide heptafluorobutyrique ( $F_7C_3COOH$ ). Pour les hexosamines, la perte d'une molécule d'heptafluorobutyramide ( $F_7C_3CONH_2$ ) semble fortement favorisée par rapport à celle d'une

molécule d'acide heptafluorobutyrique ( $F_7C_3COOH$ ), car cela donne un ion  $Z_2^{++}$  de 550 u qui est beaucoup plus fort que celui de 549 u sur les spectres de masse de cette famille de composés.

Enfin, toujours après réarrangement d'un hydrogène, les ions  $Z_2^{++}$  donnent les ions  $Z_3^{++}$  à m/z 336 par perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique uniquement pour les hexoses et hexosamines. Notons que  $Z_3^{++}$  a la même masse que certains ions  $X_3^+$  (figure 82).

(11)

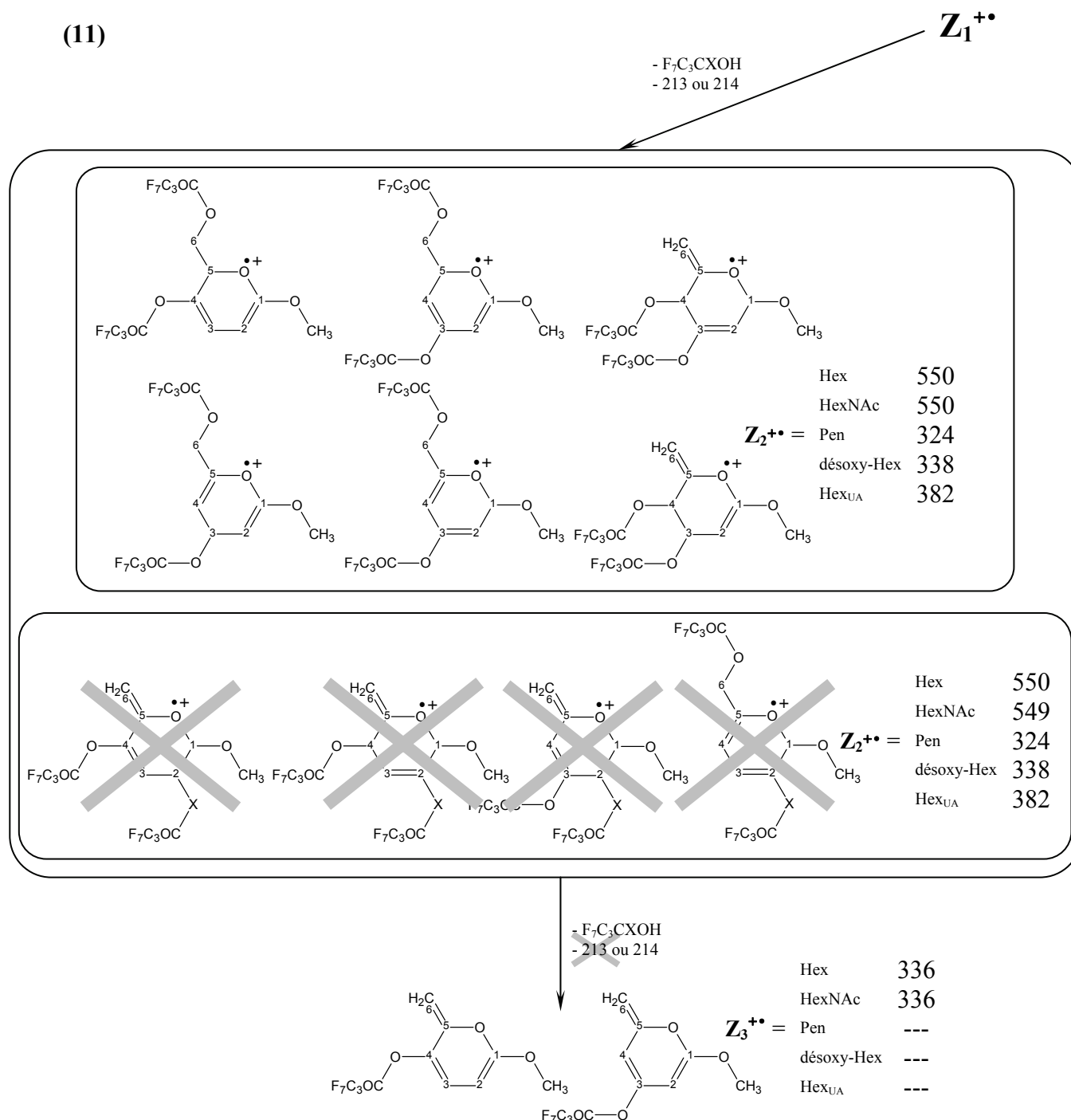


Figure 82: la série Z, formation des ions de type  $Z_2^{++}$  et  $Z_3^{++}$

## Cas particuliers

### (a) Cas des acides hexuroniques

#### i) L'ion $[M-HF-88]^{++}$ des formes pyraniques

Tous les spectres de masse des dérivés des acides hexuroniques présentent un ion à  $m/z$  790. Il s'agit de l'ion  $[M-HF]^{++}$ , obtenu par la perte d'une molécule d'HF. Cependant, uniquement dans les spectres des formes pyraniques, cet ion semble pouvoir poursuivre sa fragmentation en donnant un ion fils  $[M-HF-88]^{++}$  par perte d'une molécule d'oxoacétate de méthyle ( $OCHCOOCH_3$ ) (figure 83).

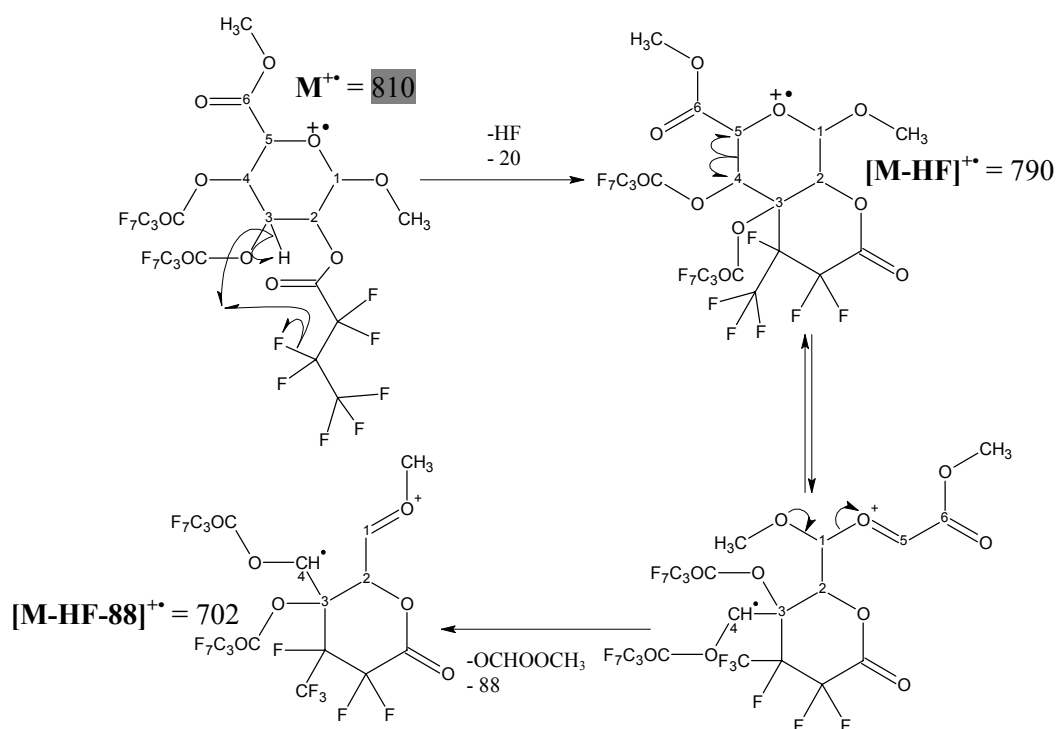


Figure 83: formation de L'ion  $[M-HF-88]^{++}$  des formes pyraniques des acides hexuroniques

#### ii) Les formes lactones

Dans la partie de ce chapitre réservée à l'analyse des protéoglycannes, nous avons parlé d'acide hexuroniques sous forme 2,6-lactone. Il s'agit des acides glucuroniques et L-iduroniques. Ces deux composés, après méthanolyse et dérivation par l'HFBA, donnent des dérivés d'une masse de 582 u.

Comme il s'agit toujours de dérivés O-méthyl-glycosides, nous retrouvons quelques voies de fragmentations générales, telles que les voies A et X. Toutefois, la forme particulière de ces

composés est à l'origine de voies de fragmentations spécifiques. C'est pourquoi, nous allons nous attacher à les définir, en prenant l'exemple d'un dérivé de la GlcA-2,6lactone.

- La voie (A-73)

En partant de l'ion  $A_1^+$  (M-31), un mécanisme de rupture des deux cycles permettrait d'obtenir un ion qui contient un résidu de 73 u. De part les tensions qu'impliquent les radicaux, portés par les carbones 2, 3 et 4, cet ion est sans doute rendu instable, car le cycle à quatre atomes ne doit pas être plan. Ainsi, la formation de l'ion  $[A_1-73]^{+\bullet}$  obtenue par la perte du radical porté par le carbone 2, permet peut-être de stabiliser cet ion en améliorant la planéité du cycle. Ce phénomène pourrait expliquer l'abondance de l'ion à 478 u (figure 84).

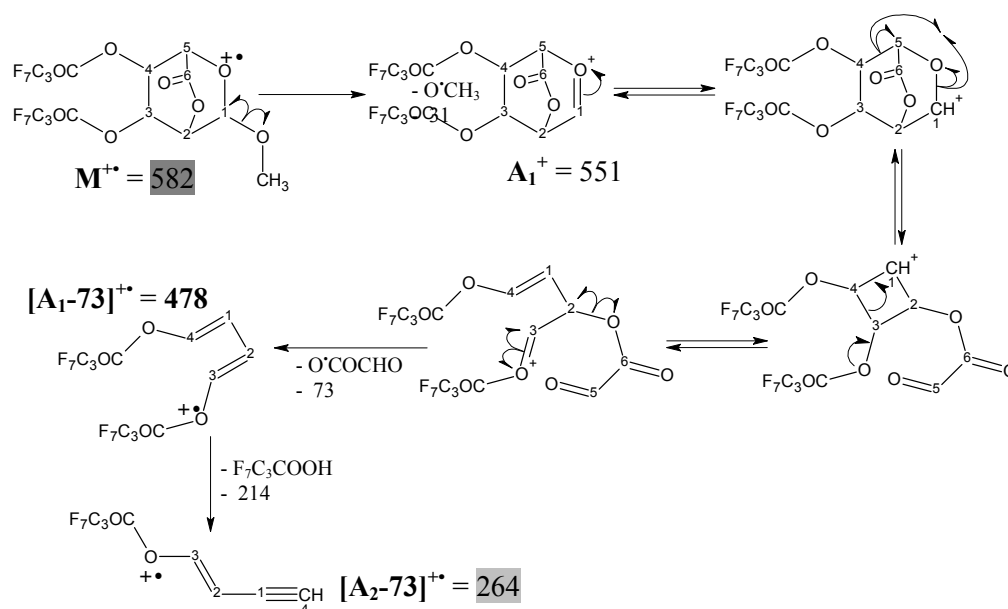


Figure 84: formation de l'ion abondant  $[A_1-73]^{+\bullet}$  des formes lactones d'acides hexuroniques

Cet ion, bien que très stable, semble pouvoir donner un ion très faible à  $m/z$  264 qui correspond à l'ion  $[A_2-73]^{+\bullet}$ .

- Les voies partant de l'ion  $X_1^+$

Parce que deux groupements heptafluorobutyrate différents peuvent être arrachés à la molécule, il doit exister quatre types différents d'ions  $X_1^+$  ( $m/z$  369). Cependant, comme ces quatre ions sont isomères deux à deux, on peut considérer qu'il n'existe que deux ions  $X_1^+$ . Chacun d'entre eux pourrait subir une fragmentation supplémentaire. L'un donnerait  $[X_1-60]^+$

( $m/z$  309) et  $[X_1-70]^+$  ( $m/z$  299), l'autre  $[X_1-86]^+$  ( $m/z$  283) (figure 85). Toutefois, il faut noter que les deux dernières masses peuvent aussi correspondre respectivement aux ions  $J_1^+$  et  $F_1^+$  de la voie B.

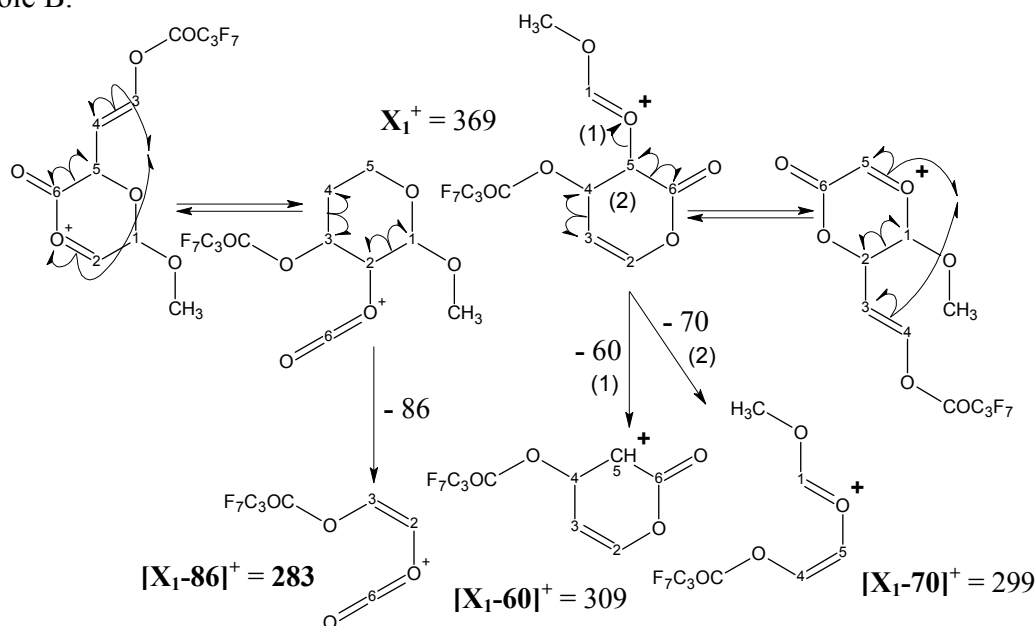
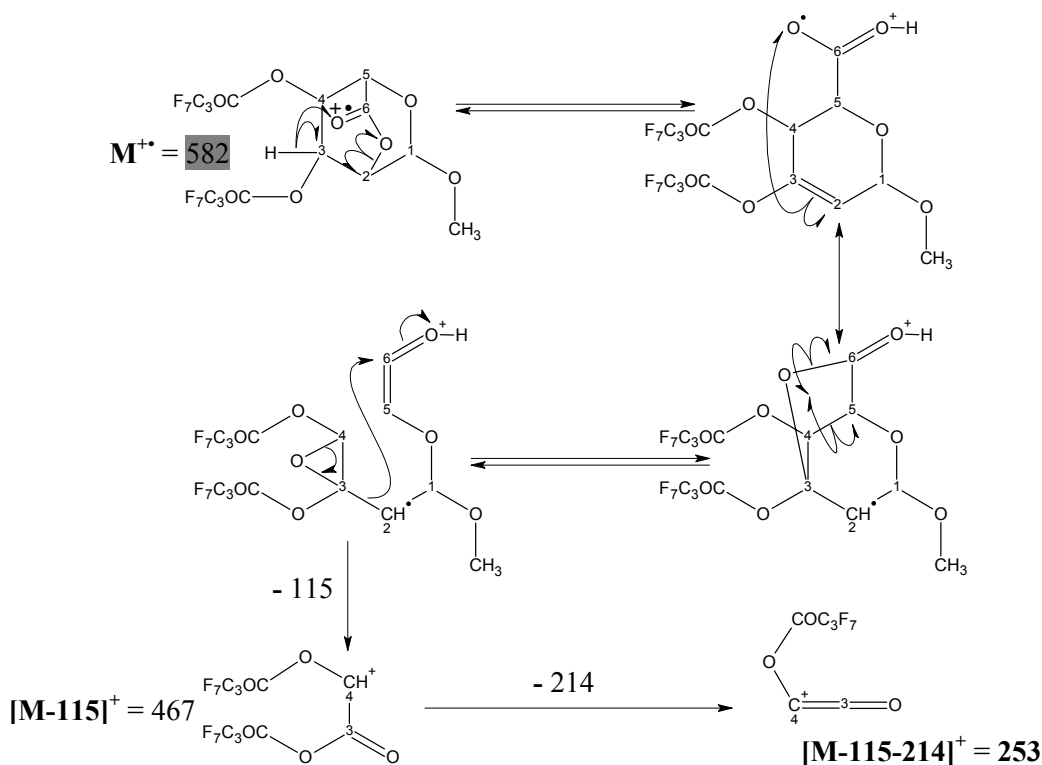


Figure 85: les voies partant de l'ion  $X_1^+$  caractéristiques des formes lactones d'acides hexuroniques

- Formation de l'ion très abondant à  $m/z$  253

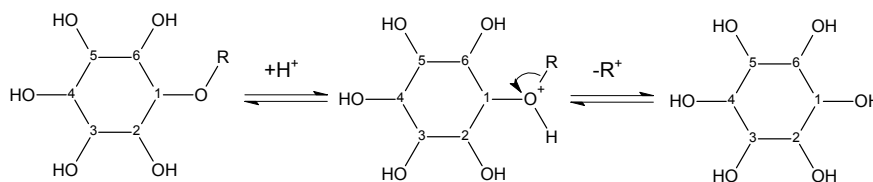
A partir de l'ion  $M^{+\bullet}$ , un réarrangement de l'hydrogène porté par le carbone 3 vers un oxygène de la fonction lactone, permet l'obtention d'un ion de même masse que  $M^{+\bullet}$ . Cependant, cet ion doit être instable car il n'est pas observable. Nous pensons que l'oxygène portant le radical pourrait former une liaison avec le carbone 3 en formant un cycle à 5 cotés, puis par réarrangement, un cycle à trois cotés. L'ion ainsi formé, toujours instable, pourrait perdre un radical d'une masse de 115 u pour former l'ion  $[M-115]^+$  ( $m/z$  467) stabilisé par résonance. Ensuite, cet ion donnerait l'ion  $[M-115-214]^+$  ( $m/z$  253) par perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène (figure 86).



**Figure 86: formation hypothétique de l'ion très abondant  $[M-115-214]^+$  à  $m/z$  253 u caractéristique des formes lactones d'acides hexuroniques**

(b) *Cas des polyalcools (myo-inositol)*

Certains glycolipides comme les encrages GPI contiennent des polyalcools cycliques. Il ne s'agit pas véritablement d'oses mais de molécules présentant une forme réduite, en alcool, de la fonction aldéhyde ou cétone des oses correspondants. Le plus abondant d'entre eux est l'inositol. Pour ce qui est de la méthanolyse, cette molécule, n'ayant pas un cycle semi-acétalique, ne peut pas donner un dérivé O-méthylé, car la délocalisation de la charge sur l'oxygène semi-acétalique ne peut pas avoir lieu (voir la figure 38 p. 123). Dans ce cas la réaction consiste simplement en une hydrolyse (figure 87).



**Figure 87: effet particulé de la méthanolyse sur l'inositol**

En outre, une fois dérivé par l'HFBAA, cette molécule donne un dérivé d'une masse de 1356 u qui correspond au dérivé per-heptafluorobutyrate. Cette masse étant bien supérieure aux capacités de détection d'un appareil de routine limité en masse à 1000 u, il nous est impossible

d'obtenir un spectre de masse comportant l'ion moléculaire et les ions primaires (voir annexe). Nous sommes donc obligé de faire des suppositions quand à la formation de certains ions. En outre, comme ce dérivé n'est pas un O-méthyl-glycoside, les règles de fragmentation sont différentes de celles de ces derniers.

i) La série X

Lors de l'analyse de ce dérivé avec un appareil limité en masse à  $m/z$  2000, nous avons observé que la série X est prédominante dans tout le spectre. Aussi, même lorsque l'on n'a à sa disposition qu'un appareil limité à 1000 u, le premier amas d'ions visible sur le spectre présente des masses de 929/930 u. Elles correspondent aux ions  $[M-213]^{+}$  et  $[M-213-213]^{+}$ , que nous appelons respectivement  $X_2^{+}$  et  $[X_1-213]^{+}$  (figure 88).

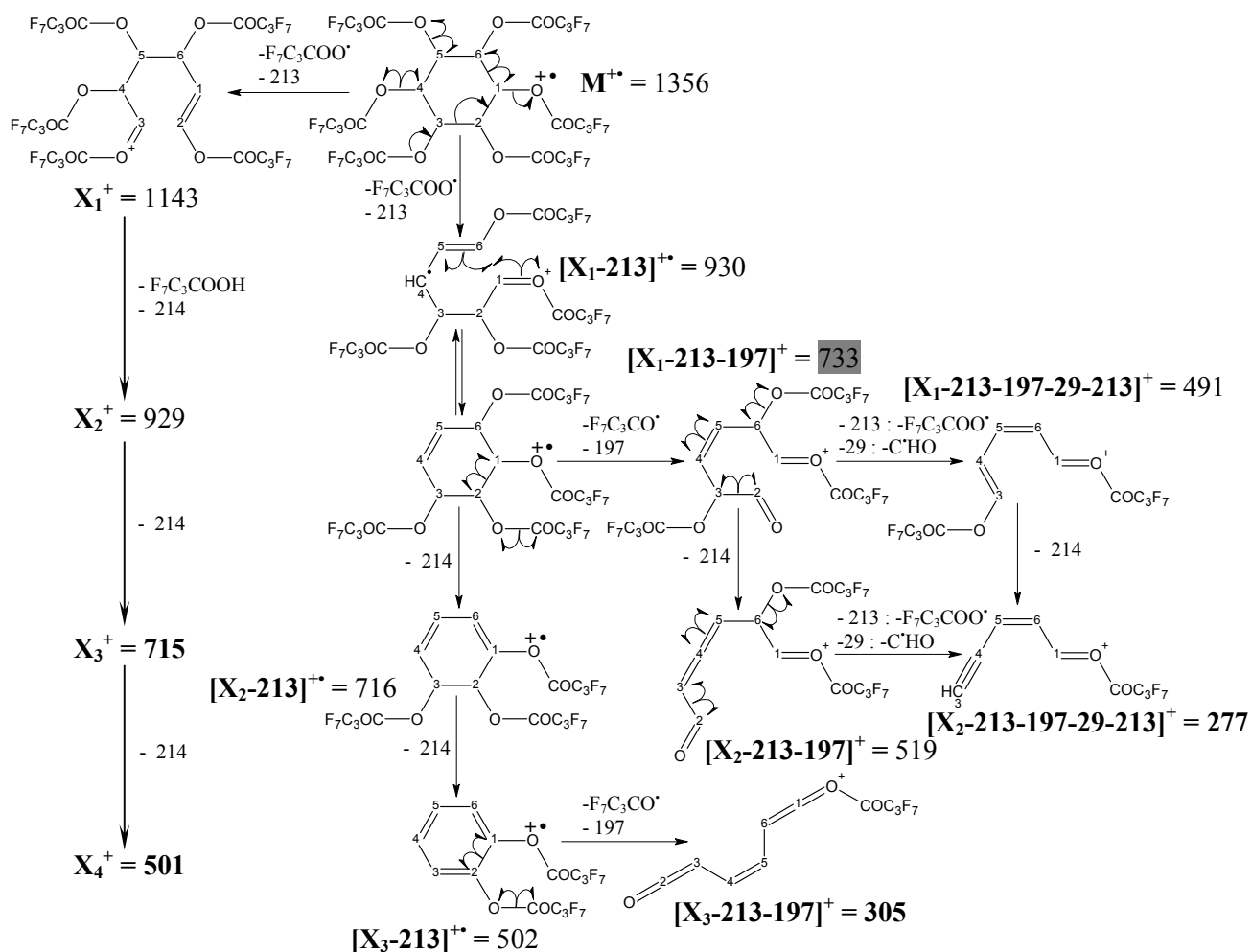


Figure 88: la série X spécifique de l'inositol



L'ion  $X_1^+$  est à l'origine de presque tous les autres ions du spectre, notamment de la série  $[X-213]^{++}$ , par perte d'un second radical heptafluorobutyrate. Les ions de cette série semblent subir la perte supplémentaire d'un radical  $[COC_3F_7]^*$  d'une masse de 197 u pour former les ions  $[X-213-197]^+$ . Enfin, ces ions peuvent encore perdre deux radicaux, que sont  $[OCOC_3F_7]^*$  d'une masse de 213 u et  $[CHO]^*$  d'une masse de 29 u, pour former les ions abondants de la série  $[X-213-197-29-213]^+$  (figure 88).

### ii) Formation d'un ion à m/z 465

L'ion présent à 465 u pourrait également provenir de l'ion  $X_1^+$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate et d'un autre de 465 u (figure 89).

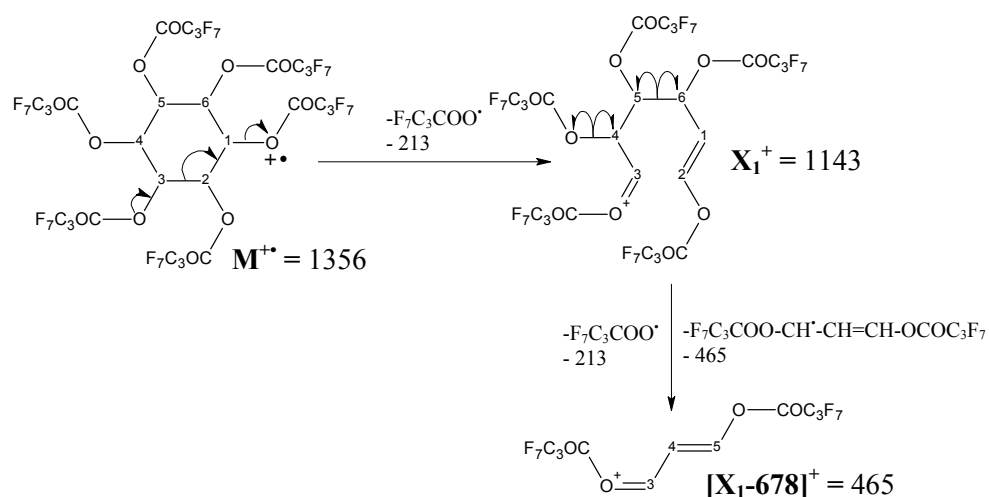
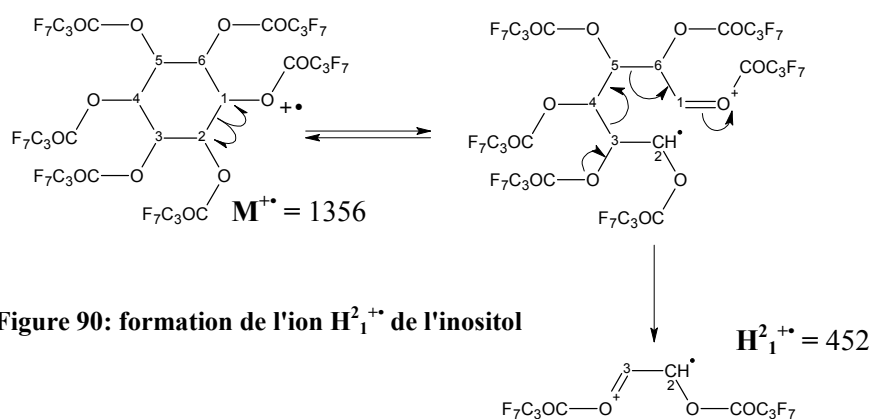


Figure 89: formation de l'ion à m/z 465 u de l'inositol

Il est évident que cet ion ne comporte pas obligatoirement les carbones 3, 4 et 5, mais qu'il peut en fait contenir n'importe quels carbones du cycle par groupes de trois (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, etc).

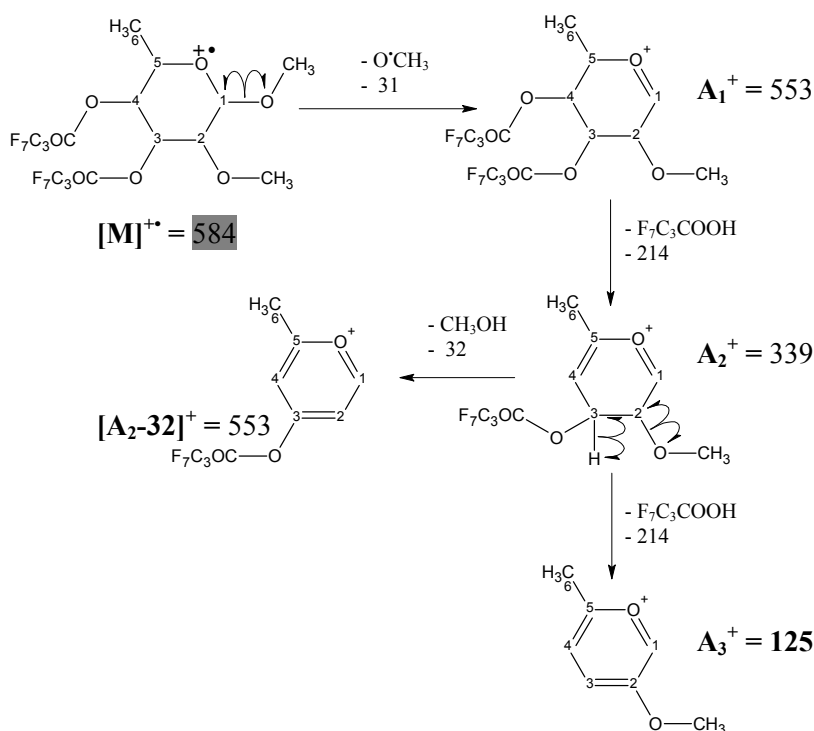
### iii) Formation des ions de la série H

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, des ruptures en chaînes du cycle fournissent les différents ions de type H. nous ne représentons ici que l'ion H<sub>1</sub><sup>2++</sup>, mais les autres (contenant les carbones C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> et C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) sont tout aussi envisageables (figure 90).



(c) Cas du 2-O-méthyl-Fucose

Bien que l'on retrouve des séries de fragmentation classiques dans le spectre de masse de ce composé (A, H et K), la présence d'un groupement méthoxy supplémentaire par rapport aux autres O-méthyl-glycosides, fait apparaître un ion de fragmentation complémentaire  $[A_2-32]^+$  (figure 91).

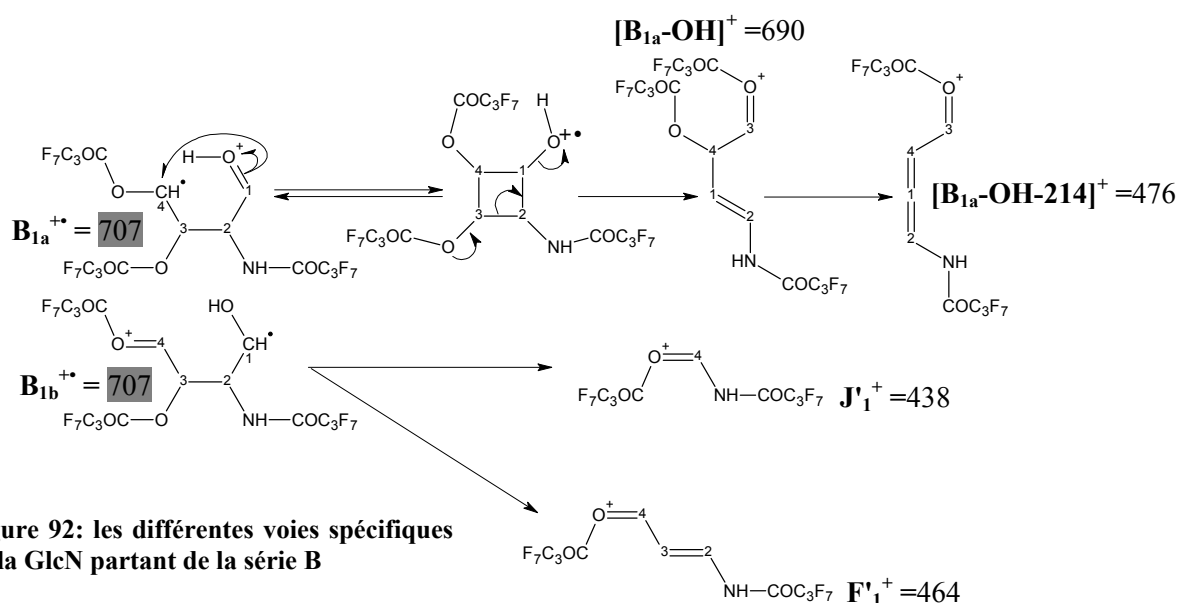


Cet ion n'est en fait pas très différent d'un ion  $A_3^+$  puisque sa formation implique l'apparition d'une double liaison entre deux carbone vicinaux qui ont perdu, l'un, un radical méthanolate, l'autre, un hydrogène radicalaire.

(d) Cas du dérivé de la GlcN libre qui apparaît lors de la méthanolyse des N-glycannes

Dans le chapitre réservé à la discussion sur les intérêts et les inconvénients de la méthode de la méthanolyse pour la libération des monosaccharides, nous avons décrit deux pics importants (pics 2 et 3 de la figure 39 p. 127), qui apparaissent lors de l'analyse de la composition monosaccharidique de glycoprotéines comportant des N-glycannes (Zanetta J. P. et coll., 1999a). Ces mêmes pics apparaissent durant l'analyse de différentes glycoasparagines. Ils coïncident sur les chromatogrammes avec les dérivés obtenus après méthanolyse de la glucosamine (GlcN), et ils sont les pics majeurs lorsque la GlcN libre est directement acylée par l'HFBA. Ces pics correspondent à des composés de masse de 963 u, ce qui indique qu'ils sont les deux anomères des dérivés HFB de la forme libre de la GlcN (composés VI de la figure 40 p.131), et non, ceux de O-méthyl-glycosides. Ces composés connaissent donc un mécanisme de fragmentation légèrement différent des O-méthyl-glycosides. Les caractéristiques observables sur les spectres de masse montrent que les dérivés ne sont pas acylés au niveau du carbone 1, ce qui correspond bien aux masses observées. En outre, certaines voies de fragmentations consistent en la perte d'un radical hydroxyle ou d'une molécule d'eau, ce qui serait impossible avec des dérivés entièrement acylés par des groupements heptafluorobutyrate. Il semble donc, que durant la réaction d'acylation par l'HFBA, il n'y ait pas de dérivation de l'oxygène porté par le carbone 1. Nous pensons que la présence de l'oxygène de la fonction semi-acétalique voisine empêche la dérivation en changeant les propriétés chimiques de l'hydroxyle. En effet, un tel hydroxyle, ne se comporte pas comme un alcool mais plutôt comme un acide faible et n'est donc pas dérivé comme toute autre fonction acide.

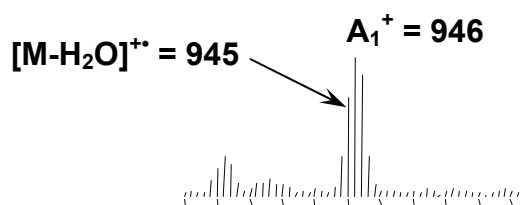
Sur les spectres, on retrouve les ions de la série A. Toutefois, l'ion  $A_1^+$  n'est pas obtenu par la perte d'un radical méthoxy mais par celle de l'hydroxyle porté par le carbone 1.



La série B ne semble pas fournir la plupart des ions habituels, bien que les ions  $F'_1^+$  et  $J'_1^+$  soient observables. Il semble en fait que cette série soit différente des O-méthyl-glycosides. En effet, à partir de  $B_{1a}^{++}$ , on peut obtenir les ions  $[B_{1a}-OH]^+$  (690 u) et  $[B_{1a}-OH-214]^+$  (476 u, ion spécifique). C'est sans doute la labilité de l'hydroxyle, plus importante que celle d'un groupement méthoxy, qui est à l'origine de cette voie particulière de fragmentation (figure 92).

La série C donne des ions intenses. Il y a quelques ions de la série H (notamment de la voie  $H^2$ ). Il n'y a pas d'ions des séries D, E et K.

Cependant, une série bien particulière à la famille des glycosides libres est observable, il s'agit de la voie de déshydratation dont le premier ion  $[M-H_2O]^{++}$  apparaît après la perte d'une molécule d'eau. Cette série donne des ions une unité de masse en dessous de ceux de la série A. Ainsi, les spectres montrent certains amas ioniques de forme pseudo-gaussienne du fait de la présence concomitante de ces deux formes ioniques (voir annexe et figure 93).



**Figure 93: amas ionique spécifique des glycosides libres par la présence des deux voies de fragmentation A et  $[M-H_2O]$  voisine de une unité de masse**

En outre, cet ion  $[M-H_2O]^{++}$ , par perte d'une molécule de HF, fournit l'ion  $[M-H_2O-HF]^{++}$ , qui à son tour peut donner l'ion  $[M-H_2O-HF-213]^+$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate. Bien sûr, chacun de ces ions, est le point de départ d'une série, car il peut donner des ions fils par perte d'acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène (figure 94).

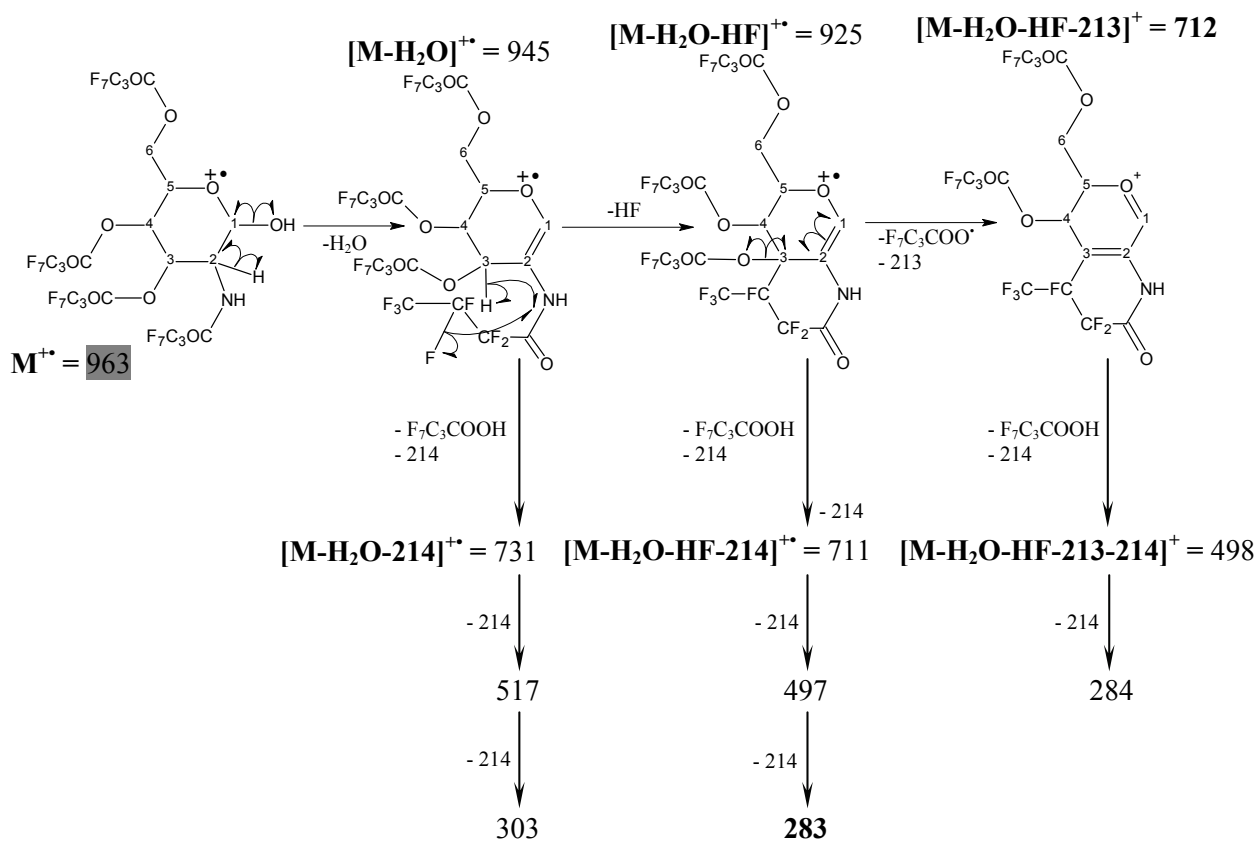
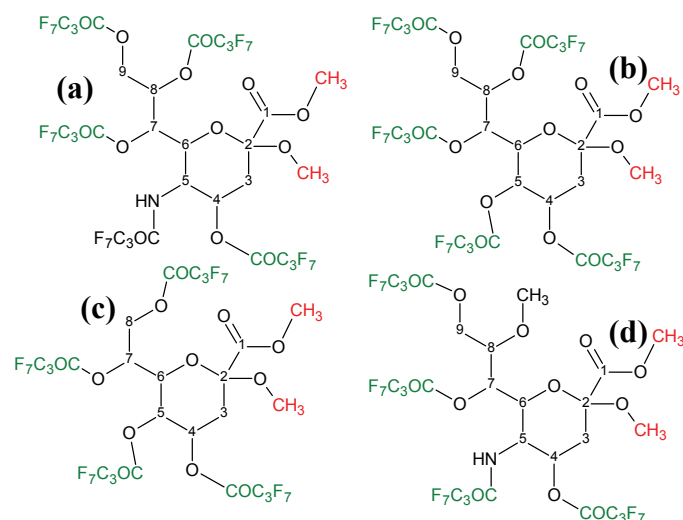


Figure 94: la série  $[M-H_2O]^{+\bullet}$  spécifique à la famille des glycosides libres

## b) Schémas probables des mécanismes de fragmentation des dérivés de la famille des acides sialiques

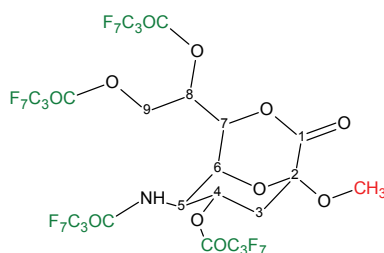
### (1) Remarque sur le comportement des acides sialiques lors de la méthanolyse

Depuis le début de ce mémoire de thèse, nous avons, à plusieurs reprises, décrit un inconvénient majeur de la méthanolyse acide en milieu anhydre qui est de détruire certaines fonctions des acides sialiques, en particulier les groupements N-acétyles, O-acétyles, O-lactyles, O-sulfates et N-glycolyles, et dans une moindre mesure, les groupements O-phosphates, alors qu'elle n'altère pas les groupements O-méthyles. Ainsi, parmi le grand nombre potentiel d'acides sialiques naturels existant (parmi eux, plus de 60 ont été décrit par Angara et Varki) (Angara T. et coll., 2002), et dans nos conditions de méthanolyse (HCl 0,5 N, 20 h), tous les acides sialiques des familles des Neu5Ac et Neu5Gc sont dégradés en acide neuraminique (Neu), tous les dérivés du KDO sont dégradés en KDO et tous ceux du KDN donnent le KDN. Par conséquent, après méthanolyse et dérivation à l'HFBA, seul 4 composés devraient théoriquement être observables (figure 95).



**Figure 95: dérivés des acides sialiques théoriquement obtenus après méthanolyse et dérivation à l'HFBA:** (a) dérivé de Neu, (b) Dérivé du KDN, (c) Dérivé du KDO et (d) Dérivé du 8-O-méthyl-Neu.

En outre, nous avons obtenu des spectres qui semblaient correspondre à des acides sialiques sans toutefois convenir à un des 4 composés de la figure 95. Après analyse, ces spectres ont été attribués au dérivé de l'acide neuraminique contenant une lactone interne entre les carbones 1 et 7 (figure 96). Selon les modifications habituellement occasionnées par la méthanolyse, ce dérivé pourrait provenir de lactones 1-7 des composés des familles des Neu, Neu5Ac et/ou Neu5Gc. Bien que nous n'en ayons pas observé durant nos analyses après méthanolyse, l'existence de composés du même type, appartenant à la famille des KDO et KDN, reste envisageable.


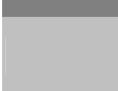




**Figure 96: dérivé HFB de la Neu-1,7lactone obtenu après méthanolyse et dérivation à l'HFBA.**

## (2) Les schémas de fragmentation

S'agissant de O-méthyl-glycosides, ces dérivés semblent suivre les différentes séries de fragmentation décrites par Kochetkov et Chizhov. Donc, nous reprendrons la nomenclature qu'ils avaient décrite. Toutefois, les acides sialiques sont des molécules un peu plus complexes que les monosaccharides à six atomes, c'est pourquoi, d'autres voies de dégradations, peuvent être observées. Dans les schémas suivants, nous utiliserons cette légende:

## Légende

|   |   |
|---|---|
|  | = ion théorique non observable  |
|  | = ion faiblement observable   |
| Normal  | = ion observable  |
| <b>Gras</b>   | = ion prédominant   |
| <b>En rouge</b>   | = ion théorique dont la masse est supérieure à la limite de détection de l'appareil.  |
| ---   | = ion impossible pour ce type de composé  |
|  | = "demie flèche" exprime le déplacement d'un seul électron :<br>coupure homolytique   |
|  | = "flèche pleine" exprime le déplacement de deux électrons :<br>coupure hétérolytique |

Bien que nous présentions uniquement les mécanismes de fragmentation pour le dérivé de l'acide neuraminique, ces schémas théoriques de fragmentation restent valables pour les dérivés du KDN, du KDO et pour le dérivé du 8-O-méthyl-Neu. Durant nos travaux, nous avons obtenu les spectres de masse de tous les dérivés (Neu, KDO, KDN et Neu-1,7lactone) avec l'appareil de routine, limité en masse à 1000 u, dont la limitation de masse a été un problème pour déterminer l'ion moléculaire et la formation des ions primaires. En effet, ces dérivés ont une masse importante, bien supérieure à cette limite (Neu = 1275, KDO = 1050, KDN = 1276 et Neu-1,7lactone = 1047). Nous avons donc tenté d'obtenir les spectres avec l'appareil limité en masse à 2000 u. Cependant, cet appareil plus ancien a une sensibilité inférieure au premier, nous n'avons donc obtenu des spectres que pour le dérivé de l'acide neuraminique qui est largement le plus abondant dans les échantillons d'origine biologique. C'est ce qui explique que nous nous sommes basés sur ce dérivé pour déterminer le schéma probable de fragmentation de tous les dérivés d'acides sialiques, d'autant plus que les spectres limités à 1000 u des autres dérivés montrent des fragments qui correspondent aux règles que nous avons définies pour le dérivé de l'acide neuraminique.

### (a) Cas de l'acide neuraminique, du KDN et du KDO

#### i) L'ion moléculaire $M^{+\bullet}$

Avec l'appareil limité en masse à 2000 u, En mode  $EI^+$ , l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  est généralement invisible. Par contre, l'analyse en mode  $CI^+$  avec de l'ammoniac comme gaz

ionisant, donne deux ions, un très abondant à 1293 u, et un autre à 1276 u. Ils correspondent respectivement aux ions  $[M+NH_4]^+$  et  $[M+H]^+$ . Ainsi la masse du composé est de 1275 u. Le premier ion observable en mode  $EI^+$  a une masse de 1256 u. Il s'agit donc de l'ion  $[M-F]^+$ , classique pour les dérivés HFB.

ii) La série de type A.

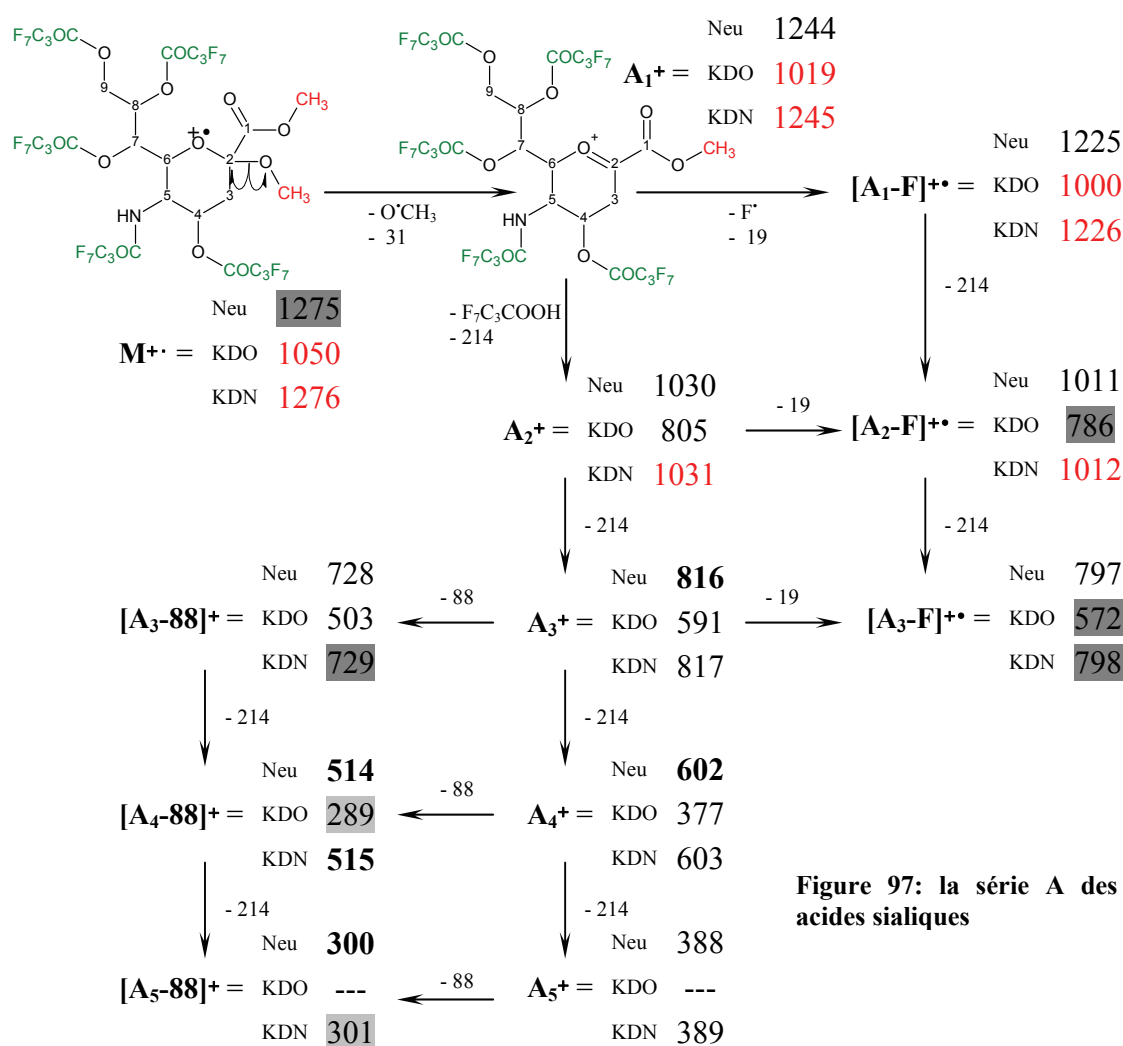


Figure 97: la série A des acides sialiques

Cette série qui consiste en la perte du radical  $[CH_3O]^\bullet$  donne des ions bien visibles quelque soit le dérivé analysé. Il faut noter que nous présentons la perte du radical placé sur le carbone 2, mais il est envisageable qu'il provienne du carbone 1 de la fonction méthyl-ester.

Les ions  $A^+$  de plus hautes masses moléculaires semblent pouvoir perdre un radical  $F^\bullet$  pour donner les ions  $[A-F]^{+\bullet}$ , alors que ceux de masses inférieures semblent plutôt donner les ions  $[A-88]^+$  par perte, après réarrangement d'un hydrogène, d'une molécule de 2-hydroxy-2-éthoxy-éthylène (C(OH)COOCH<sub>3</sub>) (figures 97 et 98).



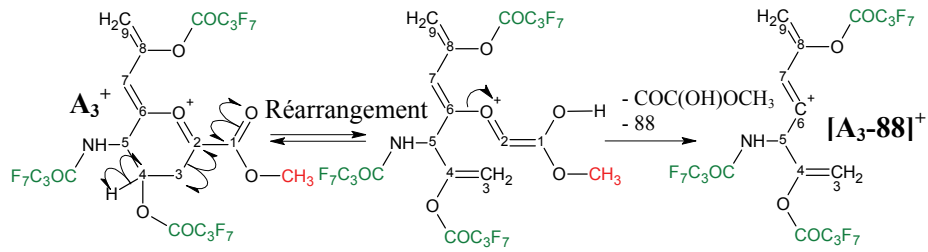


Figure 98: formation des ions du type  $[A-88]^+$

iii) La série de type *b* (B selon Kamerling)

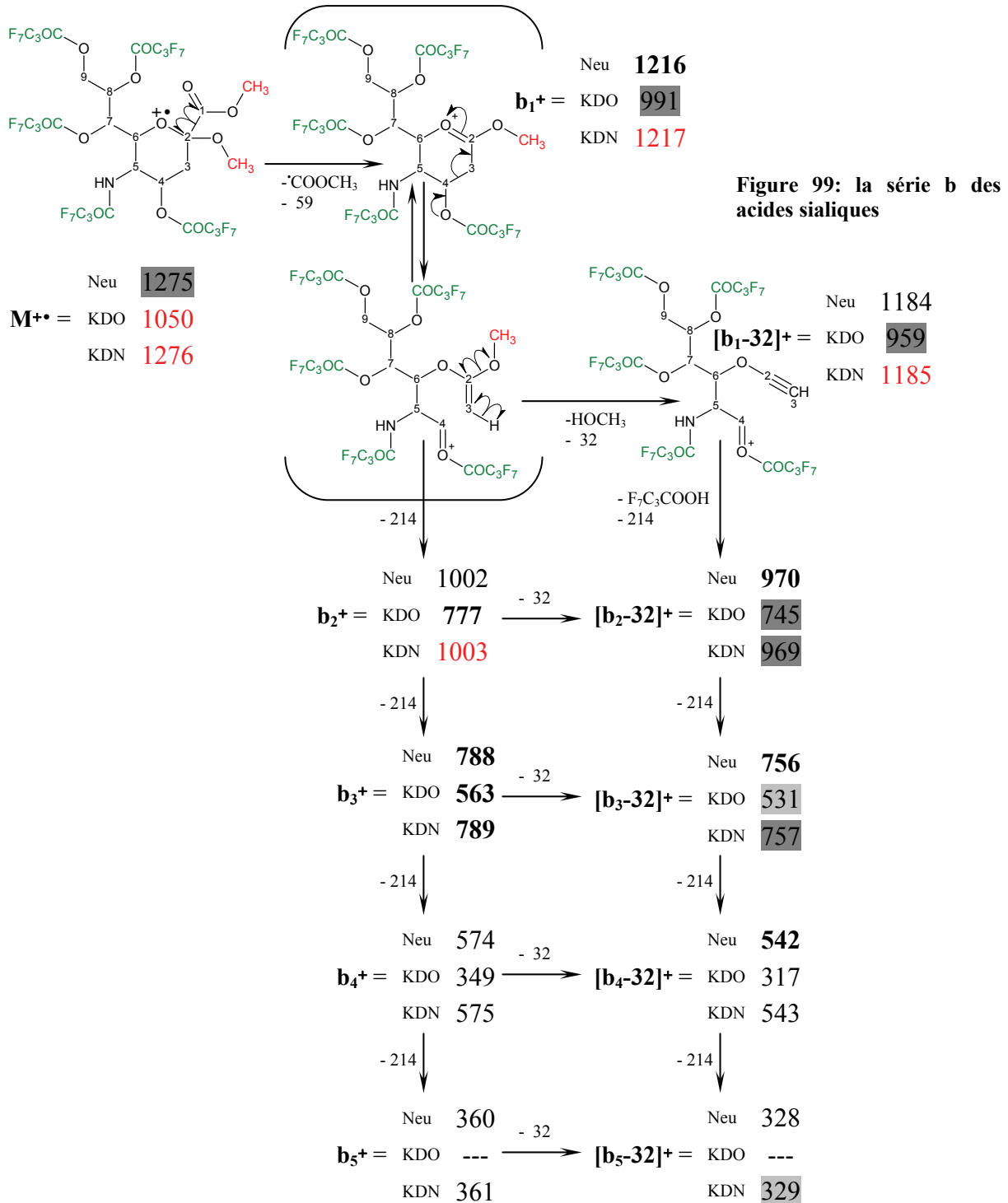


Figure 99: la série *b* des acides sialiques

La présence d'une fonction méthyl-ester en plus du groupement méthoxy sur le carbone 2 fournit une voie de dégradation supplémentaire. Cette voie de dégradation a été décrite et dénommée voie B par Kamerling pendant l'étude des dérivés triméthyl-silylés des acides sialiques (Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a). Or, dans la nomenclature de Kochetkov et Chizhov cette lettre désigne déjà une autre voie. Afin de différencier ces deux voies, nous avons donc décidé de nommer cette voie par la lettre minuscule b.

La formation de l'ion  $b_1^+$  provient de la perte d'un radical  $[\text{COOCH}_3]^\bullet$ . Comme pour les autres séries, la formation des ions fils se fait par des pertes successives d'acides heptafluorobutyriques après réarrangement d'un hydrogène.

Les ions  $b^+$  peuvent aussi subir la perte d'une molécule de méthanol pour donner les ions souvent abondants  $[\text{b-CH}_3\text{OH}]^+$  (ou  $[\text{b-32}]^+$ ) (figure 99).

#### iv) La série B.

L'ion  $M^{+\bullet}$  peut donner deux types d'ions  $B_1^{+\bullet}$  (le  $B_{1a}^{+\bullet}$  et le  $B_{1b}^{+\bullet}$ ) par un mécanisme de double fragmentation des liaisons  $C_5-C_6$  et  $O-C_2$ . Ces deux ions comportent les carbones 2, 3, 4 et 5, mais ils diffèrent par l'emplacement de leur charge. Ces ions sont présents dans les spectres de tous les acides sialiques, bien qu'ils soient parfois peu abondants. En outre, ils sont à l'origine de quelques autres, et parmi ces ions secondaires, on trouve les ions  $[\text{B}_1\text{-F}]^+$  et  $[\text{B}_1\text{-F}_7\text{C}_3\text{COOH}]^+$  (figures 100 et 101).

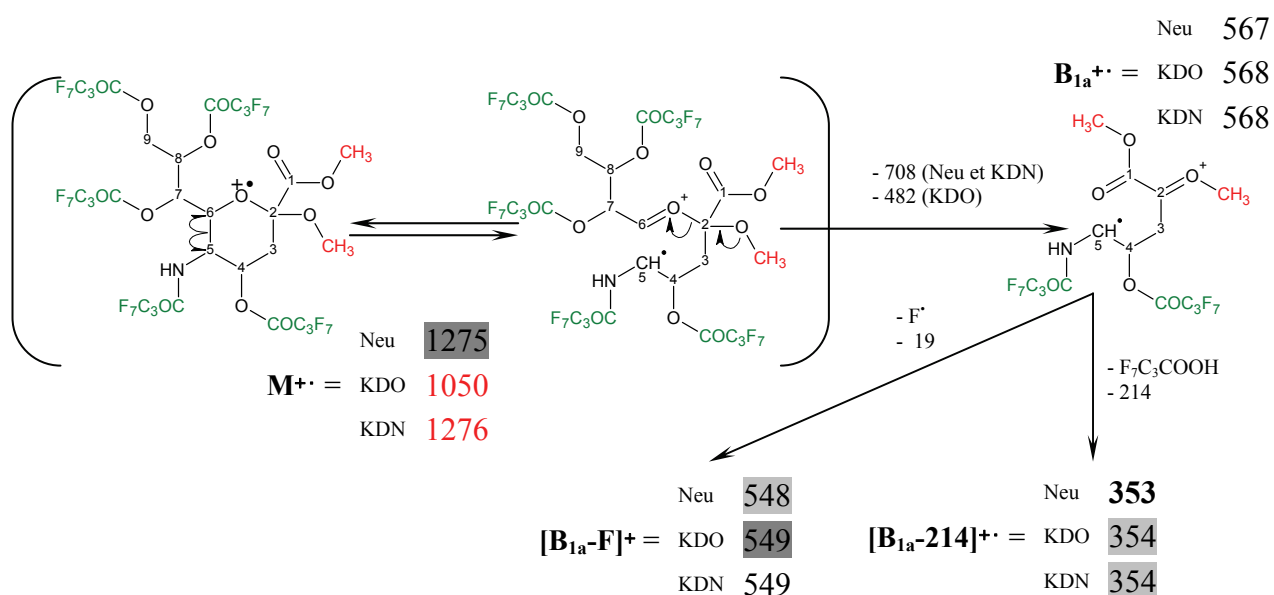


Figure 100: formation de l'ion  $B_{1a}^{+\bullet}$  et de ces ions fils

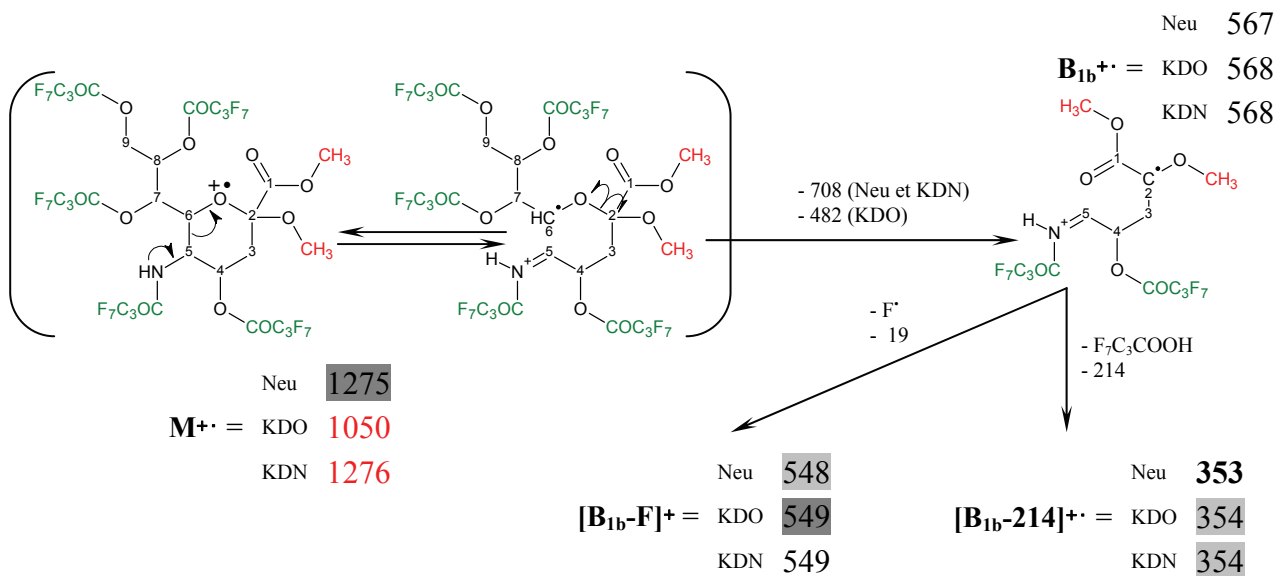


Figure 101: formation de l'ion B<sub>1b</sub><sup>+</sup> et de ces ions fils

L'ion primaire B<sub>1a</sub><sup>++</sup>, après réarrangement d'un hydrogène, donne l'ion B<sub>2</sub><sup>+</sup> par la perte du carbone C<sub>5</sub> et du groupement heptafluorobutyrate qu'il porte (KDO et KDN) ou de son équivalent amide (Neu). B<sub>1a</sub><sup>++</sup> devrait également donner l'ion F<sub>1</sub><sup>+</sup>, qui apparaît dans les spectres des dérivés O-méthyl-glycosides des hexoses. Cet ion provient, normalement du réarrangement du résidu porté par le même carbone d'où vient l'hydrogène partant de la voie B<sub>2</sub><sup>+</sup>. Dans le cas des acides sialiques, le carbone 3 porte deux hydrogènes, les voies F<sub>1</sub><sup>+</sup> et B<sub>2</sub><sup>+</sup> sont donc identiques (figure 102).

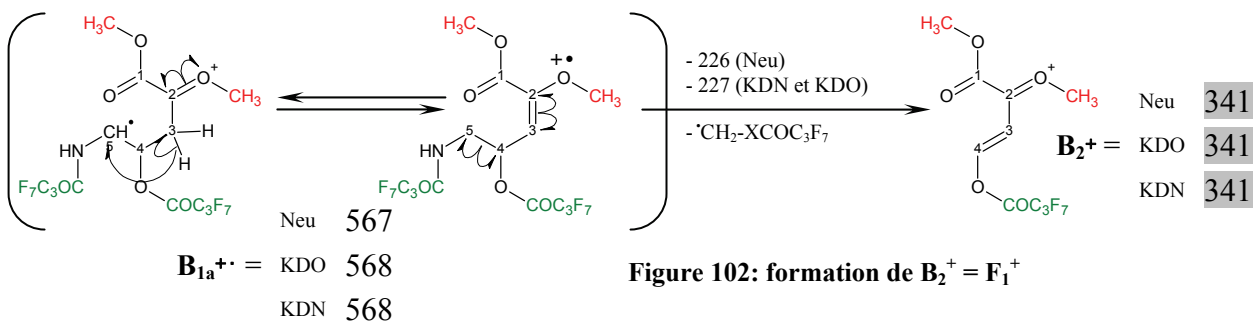


Figure 102: formation de B<sub>2</sub><sup>+</sup> = F<sub>1</sub><sup>+</sup>

B<sub>1a</sub><sup>++</sup> peut enfin donner l'ion J<sub>1</sub><sup>+</sup>, après réarrangement de l'heptafluorobutyrate présent sur le carbone C<sub>4</sub> et rupture de la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> (figure 103).

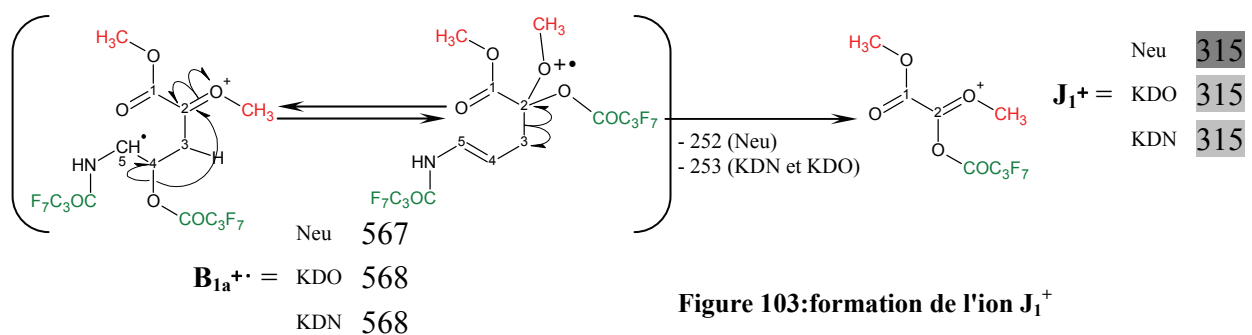


Figure 103: formation de l'ion J<sub>1</sub><sup>+</sup>

Quant à l'ion  $B_{1b}^{++}$ , par des mécanismes assez comparables, il fournit les ions  $B_2^+$ ,  $F_1^+$  et  $J_1^+$ . Leurs masses sont différentes de celles de leurs homologues provenant de l'ion primaire  $B_{1a}^+$  car la charge ne se trouve pas au même endroit sur les deux ions primaires ce qui induit des ruptures différentes (figure 104).

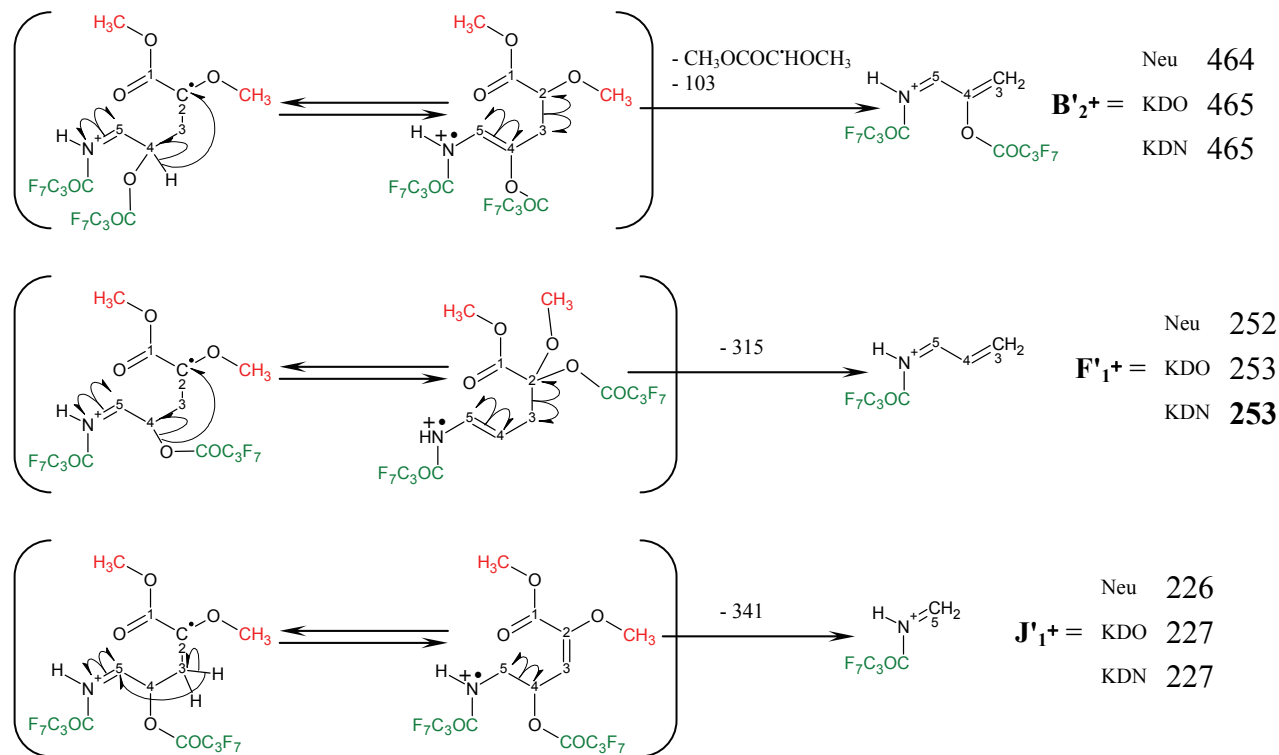


Figure 104: formation de  $B_2^+$ ,  $F_1^+$  et  $J_1^+$

Enfin, les deux ions  $B_{1a}^{++}$  et  $B_{1b}^{++}$  fournissent un ion commun. Il s'agit de l'ion  $B_3^+$  qui provient d'une cyclisation de l'ion primaire  $B_{1(a\text{ ou }b)}^{++}$  et de la perte du groupement fixé sur le carbone 5. Bien que dans les deux cas les mécanismes qui permettent sa formation soient différents, les deux ions primaires  $B_{1(a\text{ ou }b)}^{++}$  donnent exactement le même ion  $B_3^+$  (figure 105).

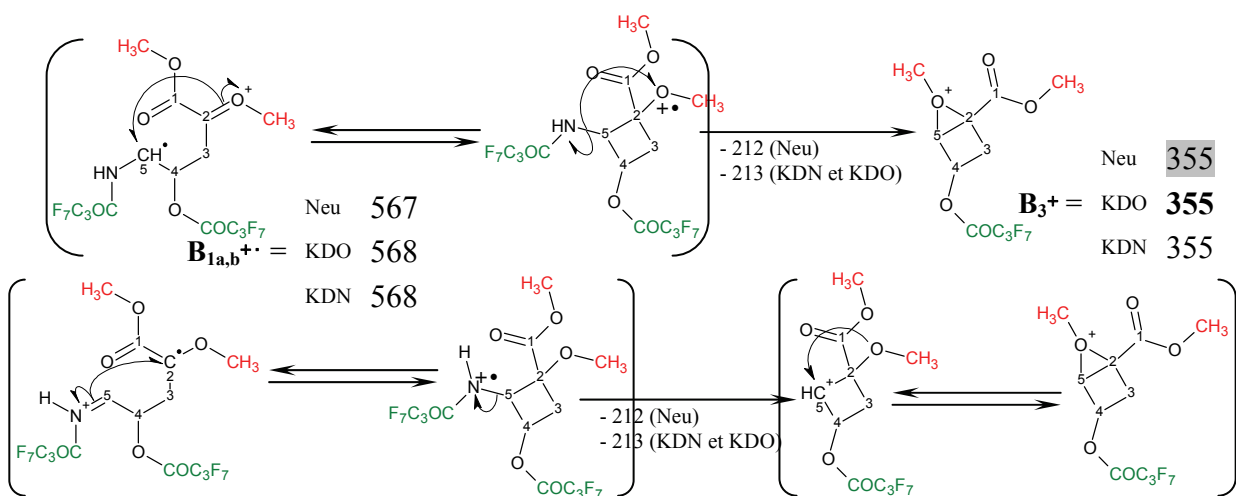
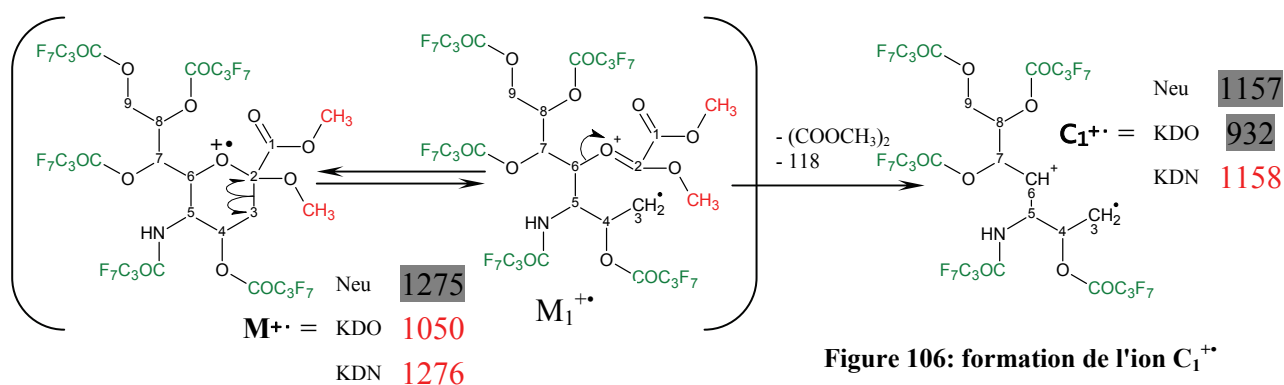


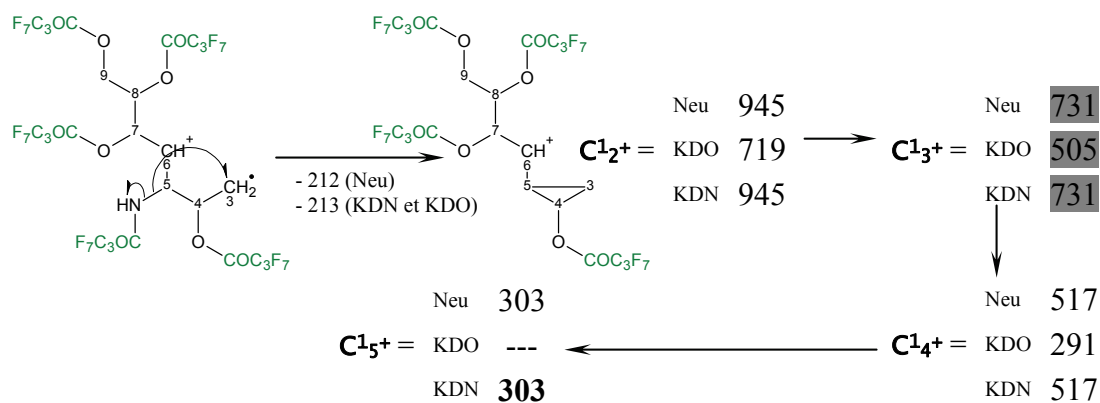
Figure 105: formation de l'ion  $B_3^+$

v) Fragmentations suivant la série C

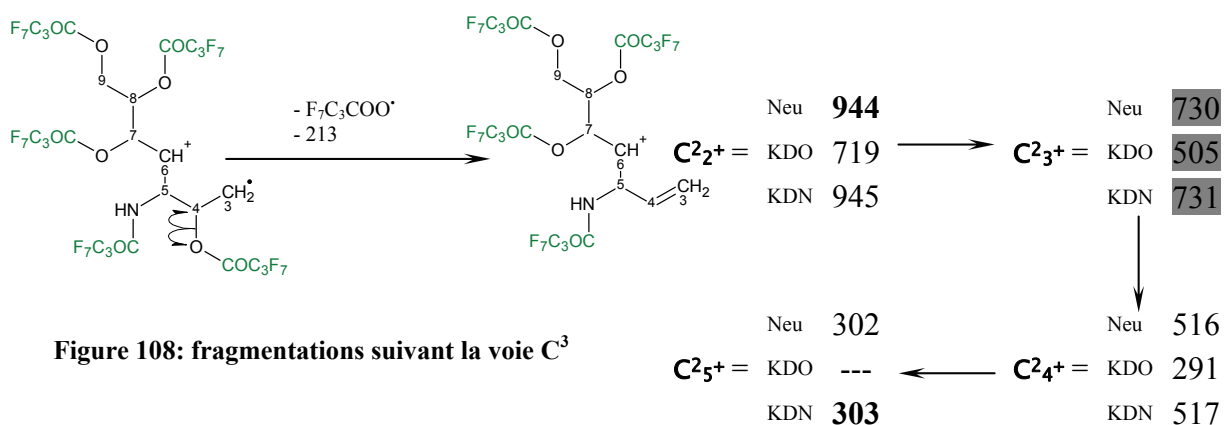
Dans le cas des acides sialiques, il n'y a pas de dérivé HFB au niveau du carbone 3. Le mécanisme de délocalisation de la charge aboutissant à la formation de l'ion  $M_2^{+}$  définit dans le cas des hexoses ne peut donc pas avoir lieu (voir la figure 60 p 160). Il faut donc envisager le mécanisme définit dans la littérature même s'il nous semble moins exacte (figure 59 p 160). A partir de l'ion moléculaire cyclique instable  $M^{+}$ , il peut y avoir formation par résonance d'un isomère non cyclique  $M_1^{+}$ . Cet ion, lui-même très instable, va former l'ion  $C_1^{+}$  par perte d'un groupement associant l'oxygène du cycle au carbone 2, flanqué des groupements méthoxy et méthyl-ester. Notons que cet ion théorique est absent des spectres de Neu et KDO (figure 106). En outre, le fait que la charge soit portée par un carbone et non par un hétéroatome nous fait penser que cette voie C n'est en fait pas possible pour les dérivés HFB des acides sialiques.



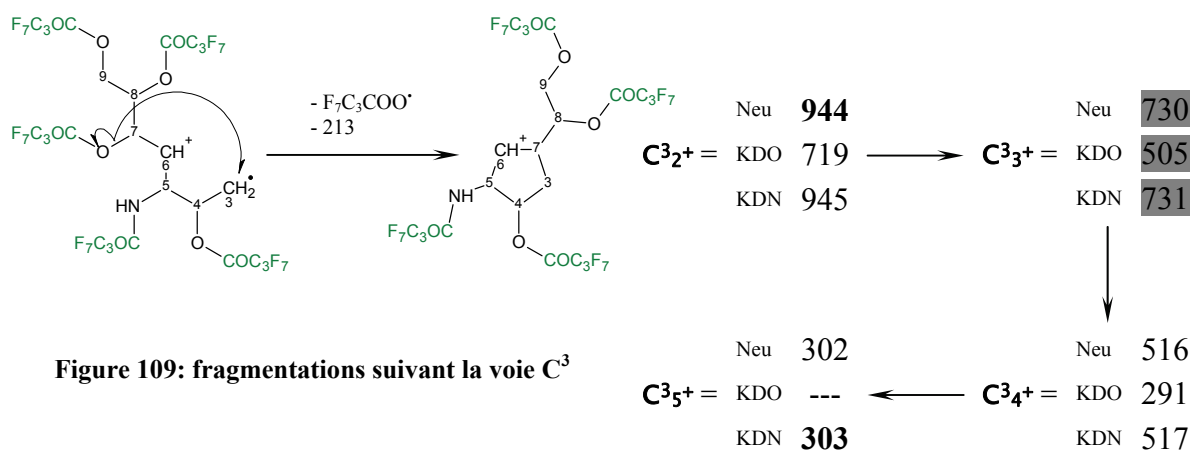
En fonction de l'emplacement d'où part un radical heptafluorobutyrate ( $F_7C_3COO^{\bullet}$ ) de l'ion  $C_1^{+}$ , il va y avoir 3 voies possibles de dégradation. La perte du groupement fixé sur le carbone 5 (voie  $C^1$ ) amène à la formation d'un ion  $C_2^{+}$  constitué d'un cycle à 3 carbones, puis la perte successive de molécules d'acide heptafluorobutyrique, après réarrangement d'hydrogène, va fournir les ions  $C_3^{+}$ ,  $C_4^{+}$  et  $C_5^{+}$  (figure 107).



Si le radical heptafluorobutyrate ( $F_7C_3COO^\bullet$ ) partant est sur le carbone 4 (voie  $C^2$ ), il y a formation d'un ion  $C^2_{2^+}$ . Il peut ensuite donner  $C^2_{3^+}$ ,  $C^2_{4^+}$  et  $C^2_{5^+}$  par pertes successives de molécules d'acide heptafluorobutyrique (figure 108).



Enfin, la perte du groupement fixé sur le carbone 7 (voie  $C^3$ ) amène à la formation d'un ion  $C^3_{2^+}$  constitué d'un cycle à 5 carbones. Celui-ci donnant à son tour les ions  $C^3_{3^+}$ ,  $C^3_{4^+}$  et  $C^3_{5^+}$  par perte d'acide heptafluorobutyrique (figure 109).



#### vi) Fragmentations suivant la série D

Tout comme pour la série C, cette série nécessite la formation de l'ion intermédiaire non cyclique et instable  $M_1^+$ . Cet ion subit d'abord un réarrangement du groupement heptafluorobutyrate fixé sur le carbone 4 vers le carbone 2, puis la rupture de la liaison  $C_5-C_6$  permet la formation de l'ion  $D_1^+$ . Cet ion est sans doute très instable, car il est invisible sur l'ensemble des spectres des différentes familles d'acides sialiques. La rupture de la liaison  $O-C_2$  de cet ion pourrait permettre la formation d'un ion  $J_1^+$ . Toutefois, nous ferons remarquer que cet ion  $J_1^+$  peut aussi être obtenu, comme nous l'avons déjà mentionné, à partir de la série B. De toutes évidence cet ion  $J_1^+$  est tout aussi absent des spectres, c'est pourquoi, nous avons tendance à penser que cette série D ne fait également pas partie des mécanismes de fragmentations des dérivés des O-méthyl-glycosides des acides sialiques (figure 110).

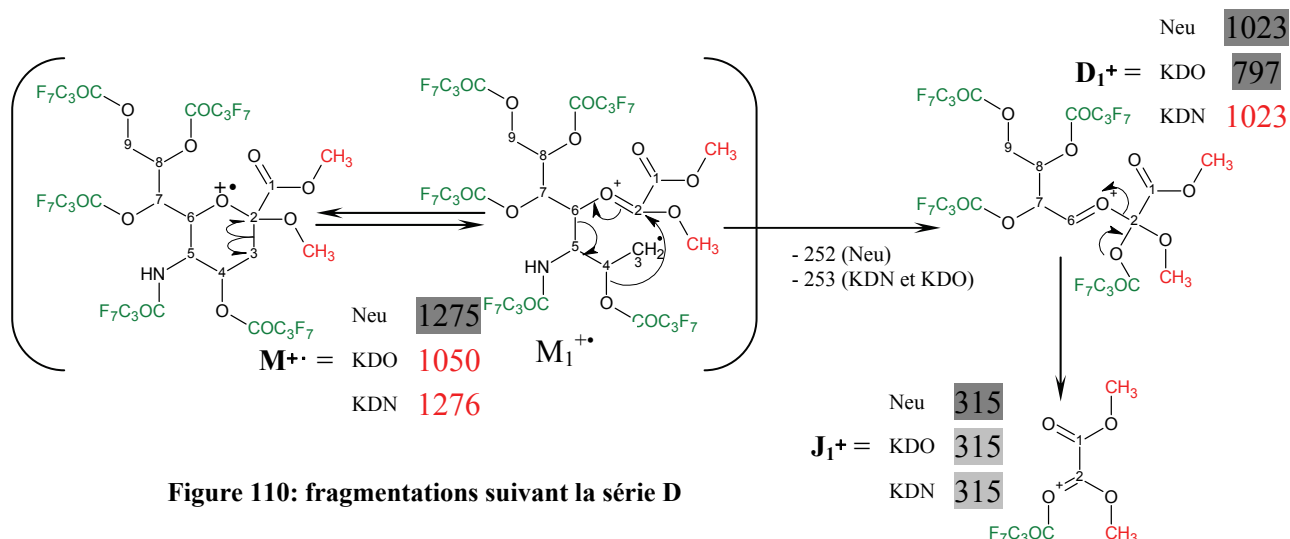


Figure 110: fragmentations suivant la série D

vii) *Fragmentations suivant la série E.*

Théoriquement, la perte du groupement fixé sur le carbone 6 de l'ion moléculaire  $M^{+•}$ , fournit un ion  $E_1^+$  d'une masse de  $m/z$  596 (Neu) ou 597 (KDN et KDO). Toutefois, cet ion n'existe dans aucun spectre des dérivés d'acides sialiques. Par contre, on observe son ion fils  $E_2^+$ , obtenu par la perte d'acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène. Ce dernier peut donner l'ion  $[E_2-32]^+$  par la perte d'un méthanol, ou l'ion  $[E_2-60]^+$  par la perte d'un formate de méthyle ( $CH_3OCHO$ ). Le fait que l'on observe aucun ion  $E_1^+$  (ni ses ions fils que sont  $[E_1-32]^+$  et  $[E_1-60]^+$ ), alors que tous existent sous la forme  $E_2$ , nous suggère que l'ion  $E_2^+$  provient plus probablement de l'ion  $Z_1^{+•}$  (figure 111).

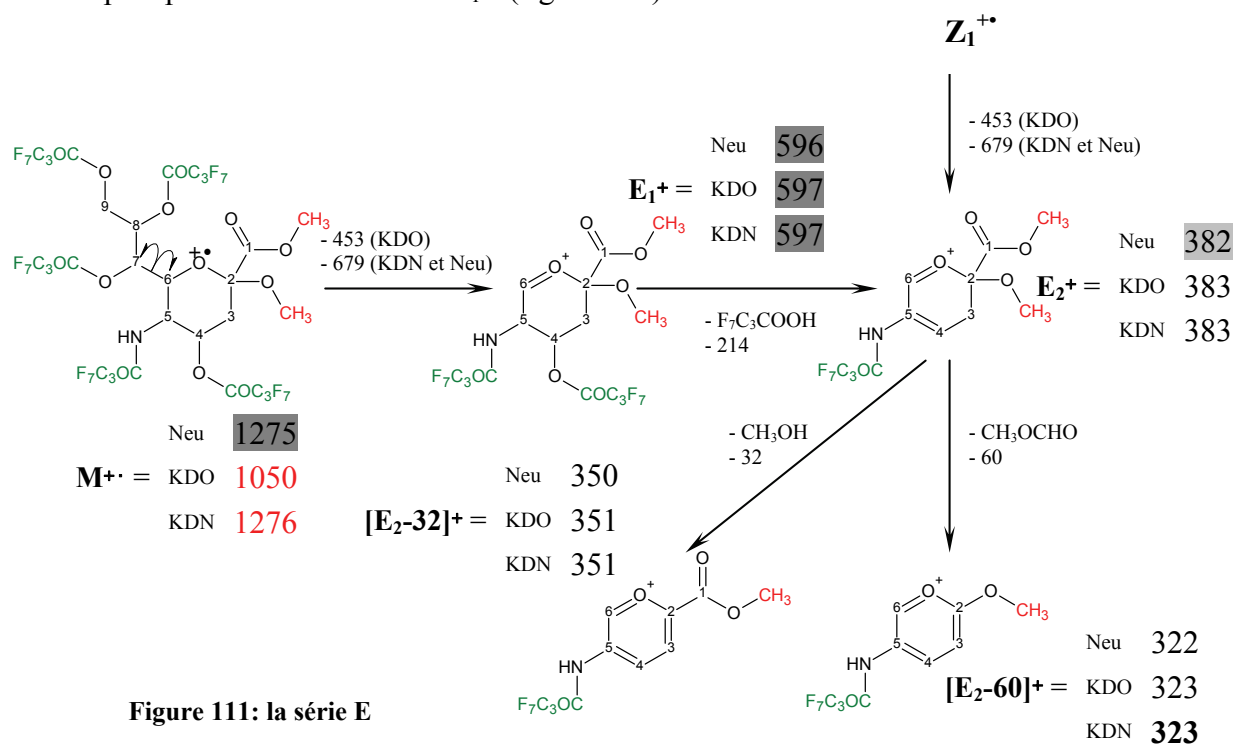


Figure 111: la série E

viii) *Fragmentations suivant la série F*

Dans la partie réservée à la fragmentation des dérivés O-méthyl-glycosides des pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, hexosamines et acides hexuroniques, nous avons décrit la formation de l'ion  $F_1^{+}$  par une voie de fragmentation faisant intervenir un intermédiaire acyclique  $M_2^{+}$ . Lors de la formation de ce dernier, il y a une délocalisation de la charge sur un résidu porté par le carbone 2 des hexoses (qui correspond à un résidu porté par le carbone 3 des acides sialiques). Or, il n'y a pas de résidu sur le carbone 3 des acides sialiques, la formation de  $M_2^{+}$  est donc impossible. Cette voie de fragmentation ne peut donc pas avoir lieu pour cette famille de composés.

ix) *Fragmentations suivant la série H*

Dans le chapitre sur la fragmentation des dérivés O-méthyl-glycosides des pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, hexosamines et acides hexuroniques, il existe trois voies de fragmentation de type H ( $H^1$ ,  $H^2$  et  $H^3$ ), qui correspondent à des mécanismes de rupture du cycle des monosaccharides en trois points de façon à ne fournir que des ions qui contiennent deux des carbones vicinaux du cycle.

La voie  $H^1$  fournit l'ion  $H_1^{+}$  qui contient les carbones 1 et 2 du cycle. Le 1 en exposant indique que l'ion contient le carbone 1 et son voisin ( $C_2$ ). Dans le cas des acides sialiques, le carbone 1 du cycle des hexoses est remplacé par le carbone 2. Le même mécanisme donne donc un ion qui contient les carbones 2 et 3 du cycle. Il semble donc plus logique de nommer cette voie  $H^2$  (figure 112).

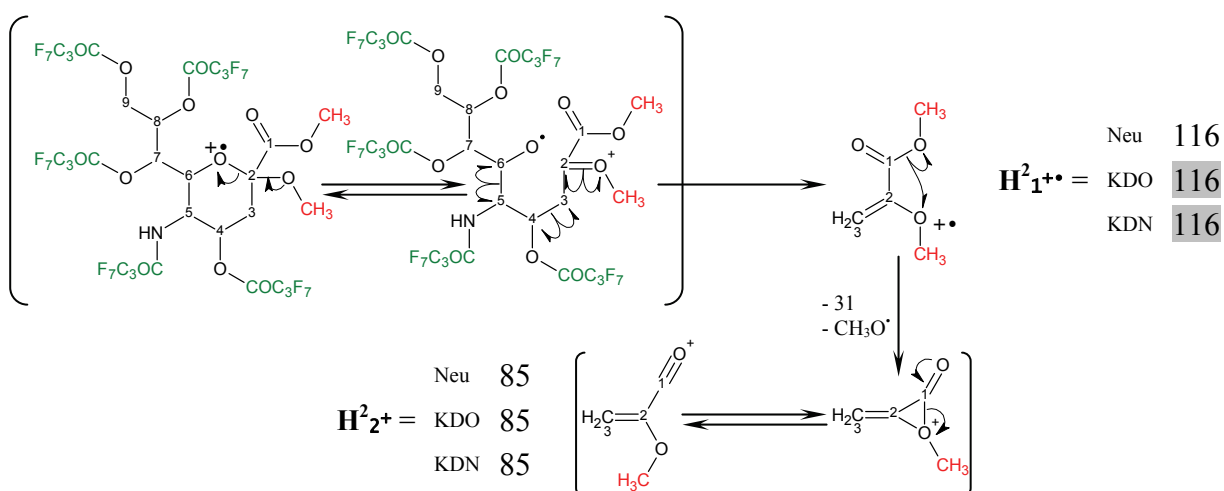
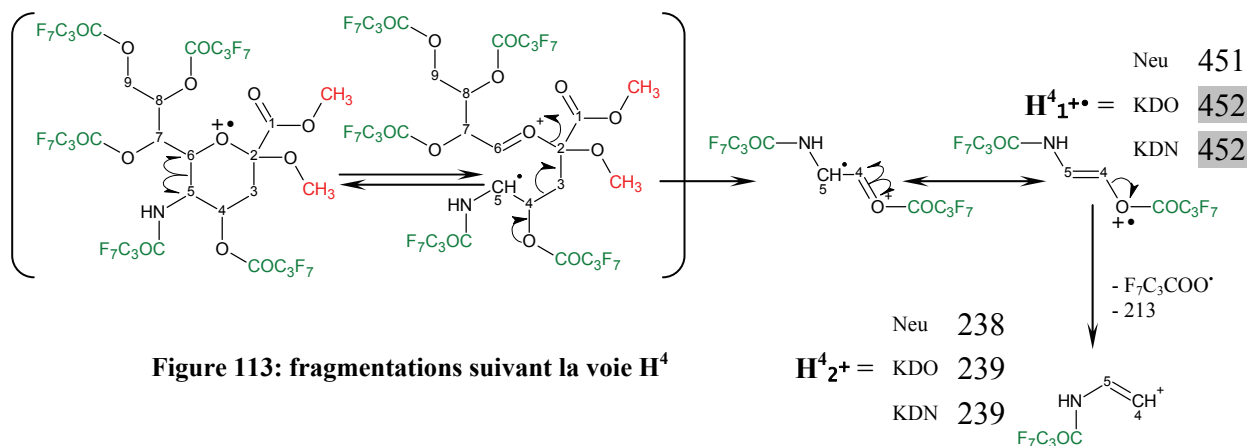


Figure 112: fragmentations suivant la voie  $H^2$



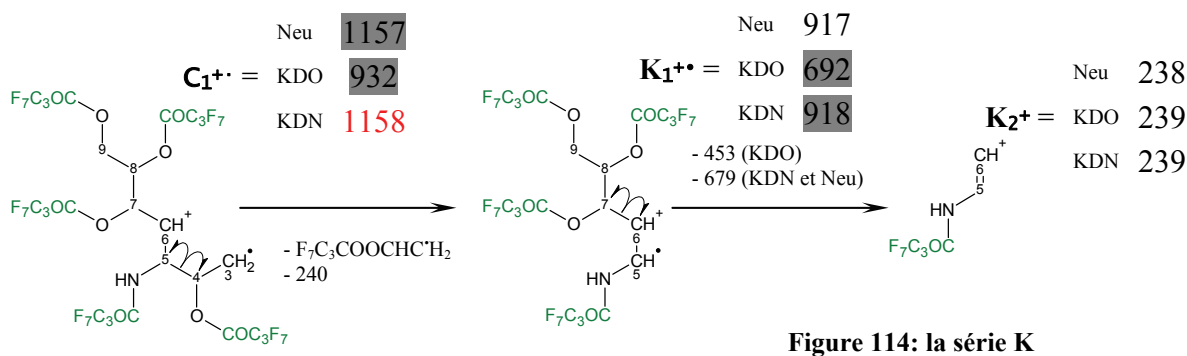
La voie  $H^4$  commence par la formation d'un ion  $H^4_{1^{+}}$  contenant les carbones 4 et 5 du cycle. La dégradation de cet ion par la perte du radical  $[F_7C_3COO]^{\bullet}$  donne l'ion  $H^2_{2^{+}}$  (figure 113).



Remarquons que la voie  $H^3$ , théoriquement possible, ne donne aucun ion visible sur les chromatogrammes. En outre, la voie  $H^5$  existe, mais elle est dénommée K par Kochetkov et Chizhov.

#### x) Fragmentations suivant la série K

Cette série fournit l'ion  $K_1^{+}$  qui contient les carbones 5,6, 7, 8 (pour le dérivé du KDO) et 9 (pour les autres). Il peut être obtenu à partir de l'ion  $C_1^{+}$  par la perte du fragment contenant les ions  $C_3-C_4$ .  $K_1^{+}$  peut, à son tour, fournir un ion fils  $K_2^{+}$  par perte du groupement fixé sur le carbone 6. Notons que cet ion a la même masse que  $H^4_2$  (figure 114). Remarquons que cette série nous semble peu vraisemblable en raison des charges sur des carbones. Notons toutefois que l'ion  $K_2^{+}$  doit pouvoir être obtenu par de nombreuses autres voies.



#### xi) Fragmentations suivant la série X

L'ion  $M^{+\bullet}$  fournit l'ion  $X_1^+$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate. Comme il existe plusieurs possibilités de groupes partants, un grand nombre d'ion  $X_1^+$  sont envisageables. La suite des ions fils est due à la perte successive d'acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène (figure 115).

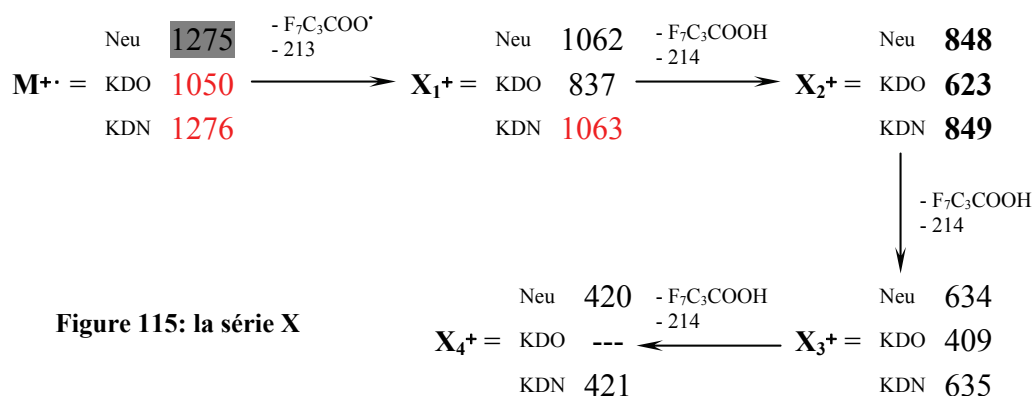


Figure 115: la série X

Comme dans bien des cas de dérivés HFB, ces ions sont abondants et se présentent dans les spectres comme un amas de pics de forme pseudo-gaussienne, car ils se trouvent une unité de masse au dessus des ions  $Z$  voisins (pour plus de détails sur leur formation et caractéristiques, voir le chapitre sur la fragmentation des pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, hexosamines et acides hexuroniques).

### xii) Fragmentations suivant la série Z

Cette voie de fragmentation provient de la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique ( $F_7C_3COOH$ ) à partir de l'ion  $M^{+\bullet}$  pour donner l'ion  $Z_1^{+\bullet}$ , ce qui n'est possible que par le réarrangement d'un hydrogène de la molécule. La suite des fragmentations suit le même processus pour donner les ions fils  $Z_2^{+\bullet}$ ,  $Z_3^{+\bullet}$  et  $Z_4^{+\bullet}$ , très abondants et caractéristiques des dérivés HFB (figure 116).

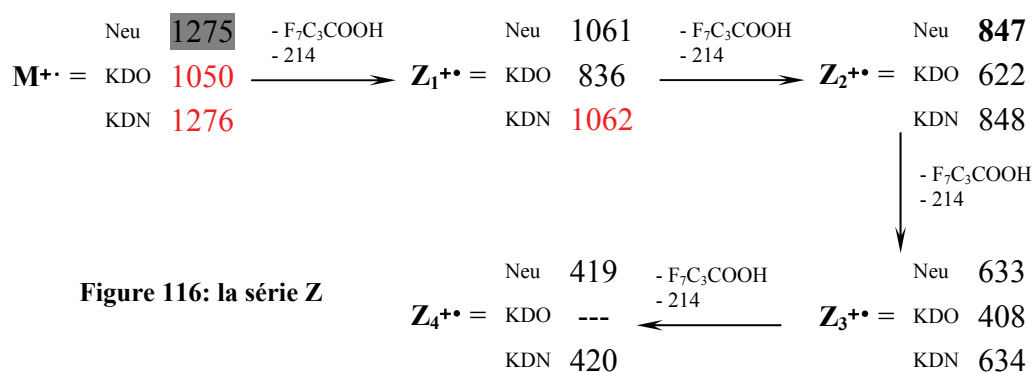


Figure 116: la série Z

### (b) Cas du Neu-1,7lactone

Un dérivé pouvant correspondre à un acide sialique, sans toutefois être un des 4 composés de la figure 95 (p. 184), apparaît dans certains chromatogrammes d'échantillons contenant des acides sialiques. Après étude du spectre limité à 1000 u (voir annexe), et bien que nous n'ayons pas l'ion moléculaire, nous avons déterminé une masse moléculaire de ce dérivé à 1047 u. Cette masse moléculaire, ainsi que les ions présents dans le spectre, ont fait que ce dernier a été attribué à un dérivé de l'acide neuraminique contenant une lactone interne entre les atomes de carbone 1 et 7 (figure 96 p.184). Bien que la masse moléculaire de ce produit soit inférieure à celle du dérivé de Neu, le pic qui y correspond a un temps de rétention supérieur à celui du dérivé de l'acide neuraminique. Ce phénomène s'explique par le fait que ce dérivé comporte moins de résidus HFB, qui ont la particularité de raccourcir les temps de rétention.

#### i) Discussion sur l'existence de la forme 1,7-lactone des acides sialiques

Etant donné que le spectre de masse correspond très certainement à un tel composé (voir l'annexe et l'analyse du spectre de masse), son existence pose certaines questions. En effet, les acides sialiques sont connus pour former des lactones avec des sucres voisins, soit avec d'autres acides sialiques, comme dans le cas des acides oligosaccharidiques et acides polysaccharidiques (OSA/PSA) (McGuire E. J. and Binkley S. B., 1964; Lively M. R. et coll., 1981 et 1984; Zhang Y. et coll., 1999 et Kakehi K et coll., 2001), soit avec d'autres sucres comme le Gal dans le cas de gangliosides. Il a été montré que ces lactones intermoléculaires peuvent être formées *in vivo* dans des conditions acides. Toutefois, la possibilité de former des lactones intramoléculaires a été très peu étudiée et reste de l'ordre de l'hypothèse. En 1969, une équipe (Yu R. K. et coll., 1969), afin d'étudier l'anométrie *in vivo* des acides sialiques, a synthétisé des lactones-1,7 et -1,4 intramoléculaires à partir de Neu5Ac dont les carbones 8 et 9 ont été coupés pour éviter la formation d'une lactone-1,9. Ces travaux démontrent que la formation d'une lactone interne ne peut-être obtenue qu'à partir de neu5Ac d'anométrie  $\beta$ . Ainsi l'acide sialique lactonisé en -1,7 ne peut exister que sous la forme  $\beta$ . Or, *in vivo*, les acides sialiques ne sont fixés aux autres sucres que par des liaisons  $\alpha$ . Cette particularité pose donc un problème puisque, si la forme lactone-1,7 existe *in vivo*, elle ne peut pas provenir d'un acide sialique  $\alpha$ . On pourrait donc penser que cette forme lactone est un artéfact dû aux traitements des échantillons et qu'elle est formée lors de la méthanolyse. Nous décrirons plus loin, le fait que l'on retrouve aussi la forme lactone des acides sialique après

hydrolyse douce à l'acide acétique 2 M (voir la partie réservée à ce sujet). Il se pourrait donc, que ce soit le traitement acide qui forme cette lactone, comme c'est le cas pour la formation des lactones intermoléculaires des OSA/PSA (Zhang Y. et coll., 1999 et Kakehi K et coll., 2001). Toutefois, si cela était exact, le rendement des réactions de méthanolyse ou d'hydrolyse douce serait toujours le même, quel que soit l'échantillon analysé, et on retrouverait systématiquement le même rapport entre la quantité de Neu et Neu-1,7Lac (pour la méthanolyse) ou entre celle de Neu5Ac et Neu5Ac-1,7Lac (pour l'hydrolyse douce). Or, ceci n'est jamais le cas puisque ces rapports sont très variables d'un échantillon à l'autre. En outre, l'analyse d'échantillons très purs de Neu5Ac ne montre jamais le pic correspondant à cette forme lactone qui n'apparaît que lors d'analyse d'échantillons d'origine biologique. Nous sommes donc persuadés que ni la méthanolyse, ni l'hydrolyse douce, ne sont à l'origine de la formation de cette lactone. Partant du principe que cette forme lactone existe donc *in vivo*, il nous reste à déterminer comment elle peut-être formée à partir d'acides sialiques d'anométrie  $\alpha$ . A ce sujet, une discussion plus approfondie sera développée dans le chapitre réservé à l'analyse des dérivés HFB des acides sialiques libérés par hydrolyse douce.

ii) *Les fragmentations qui découlent de l'analyse du spectre de masse en mode EI.*

Sur le plan de la spectrométrie de masse en impact électronique, le fait que la fonction acide soit impliquée dans une lactone empêche la formation des ions de la série b. Le cycle supplémentaire empêche la formation de l'ion  $D_1^+$  et donc la série qui en découle. Cependant, certaines séries semblent avoir lieu.

• Fragmentations suivant la série A

Le dérivé HFB du Neu-1,7lac ayant un groupement méthoxy sur le carbone 2, il n'est pas étonnant de retrouver cette série, même si les ions qu'elle fournit sont de faible intensité. De façon tout à fait classique, elle commence par la perte d'un radical méthanolate pour donner l'ion  $A_1^+$ . Celui-ci donne ensuite ses ions fils  $A_2^+$ ,  $A_3^+$  et  $A_4^+$  par la perte successive d'acide heptafluorobutyrique (figure 117).

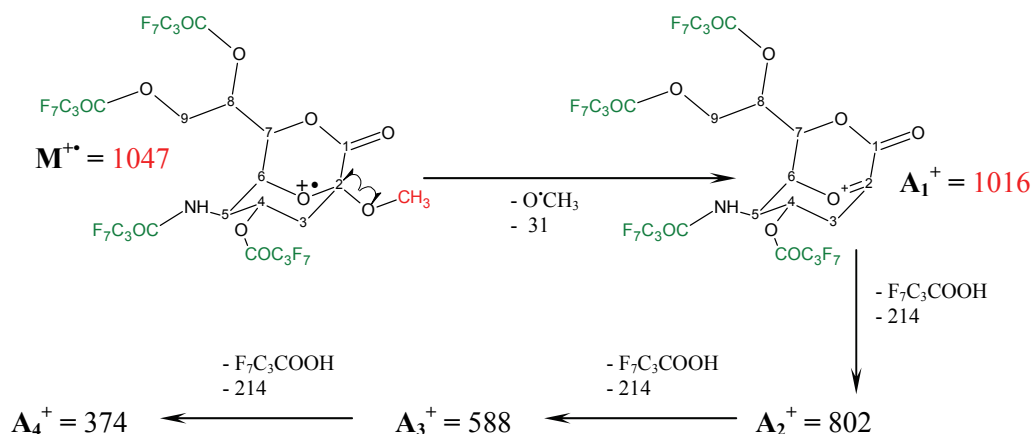


Figure 117: fragmentations suivant la série A

### • Fragmentations suivant la série B

Comme pour les autres acides sialiques, l'ion  $M^{+\bullet}$  doit pouvoir donner deux types d'ions  $B_1^{+\bullet}$  ( $B_{1a}^{+\bullet}$  et  $B_{1b}^{+\bullet}$ ) par un mécanisme de double fragmentation des liaisons  $C_5-C_6$  et  $O-C_2$ . Toutefois, en raison de la présence du cycle supplémentaire, les ions  $B_{1a}^{+\bullet}$  et  $B_{1b}^{+\bullet}$  ont la même masse que l'ion  $M^{+\bullet}$ , car il n'y a pas de perte d'une partie de la molécule. Il n'est donc pas possible de les observer sur un spectre de masse limité à 1000 u.

S'ils existent, ils diffèrent par l'emplacement de leur charge. Ces deux ions sont à l'origine de quelques autres. Parmi ces ions secondaires, on trouve les ions  $[B_1-F]^+$  et  $[B_1-F_7C_3COOH]^+$  (figures 118 et 119). Notons que ce dernier est un isomère de  $Z_1^{+\bullet}$ . D'ailleurs, le fait que différentes séries donnent des ions de même masse explique la très forte prédominance des ions à 833 u. En outre, l'ion  $B_{1a}^{+\bullet}$  peut également donner les ions  $B_2^+$ ,  $F_1^+$ ,  $J_1^+$  et  $B_3^+$ , alors que  $B_{1b}^{+\bullet}$  peut donner  $B_2^+$ ,  $F_1^+$ ,  $J_1^+$  et  $B_3^+$ .

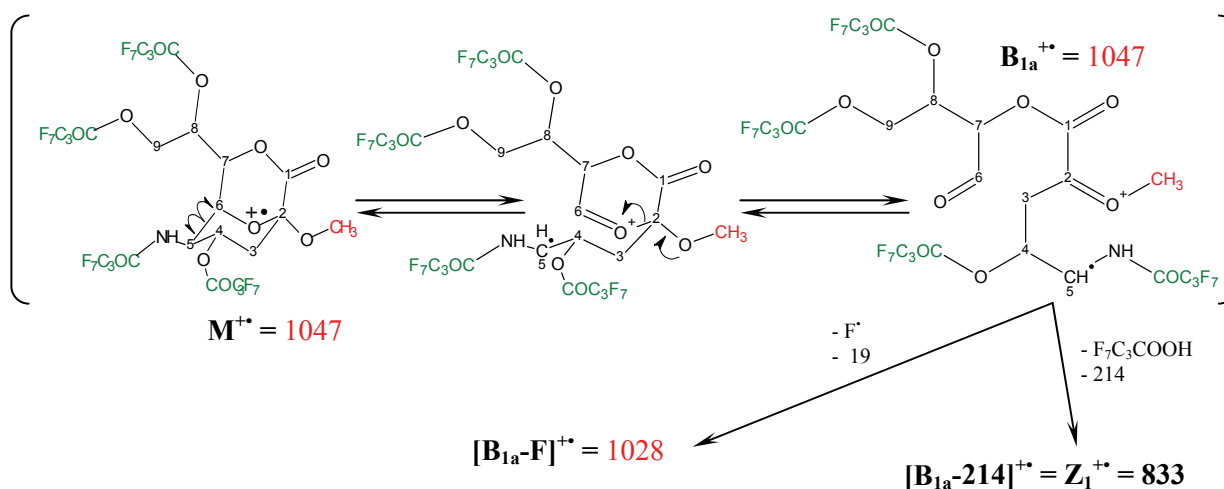
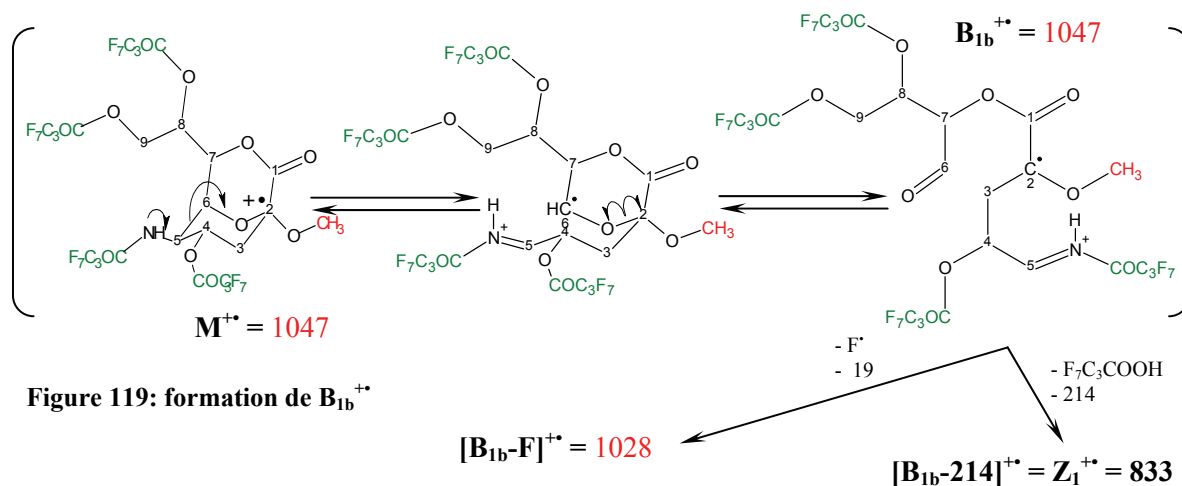


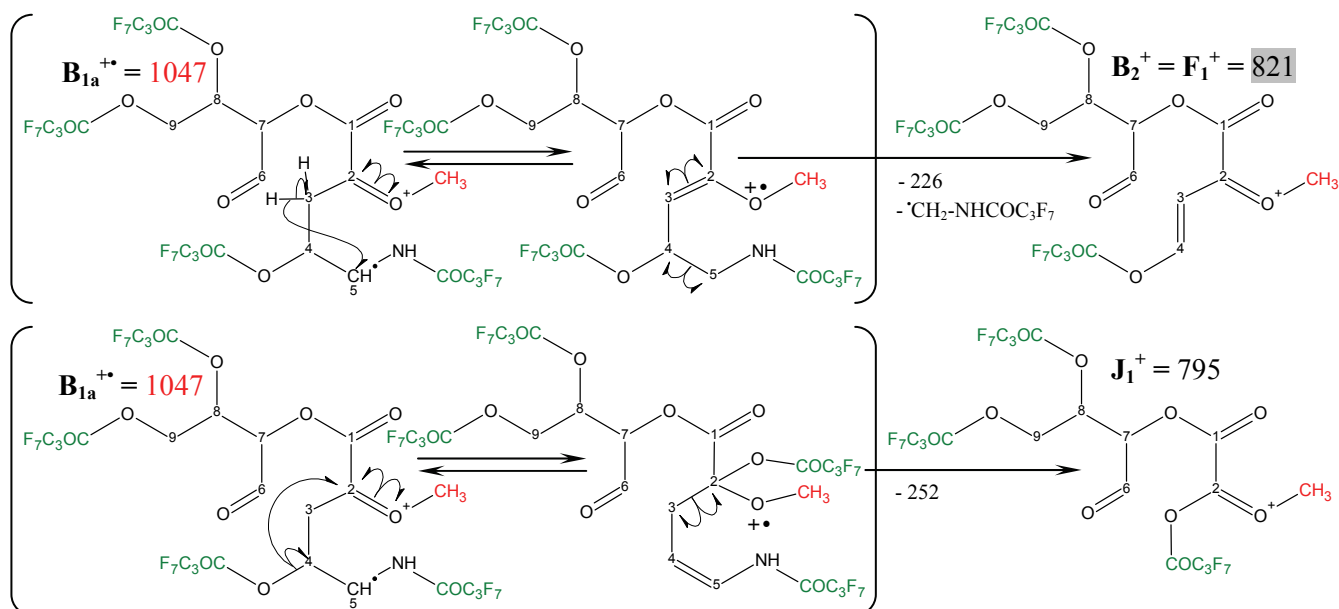
Figure 118: formation de  $B_{1a}^{+\bullet}$



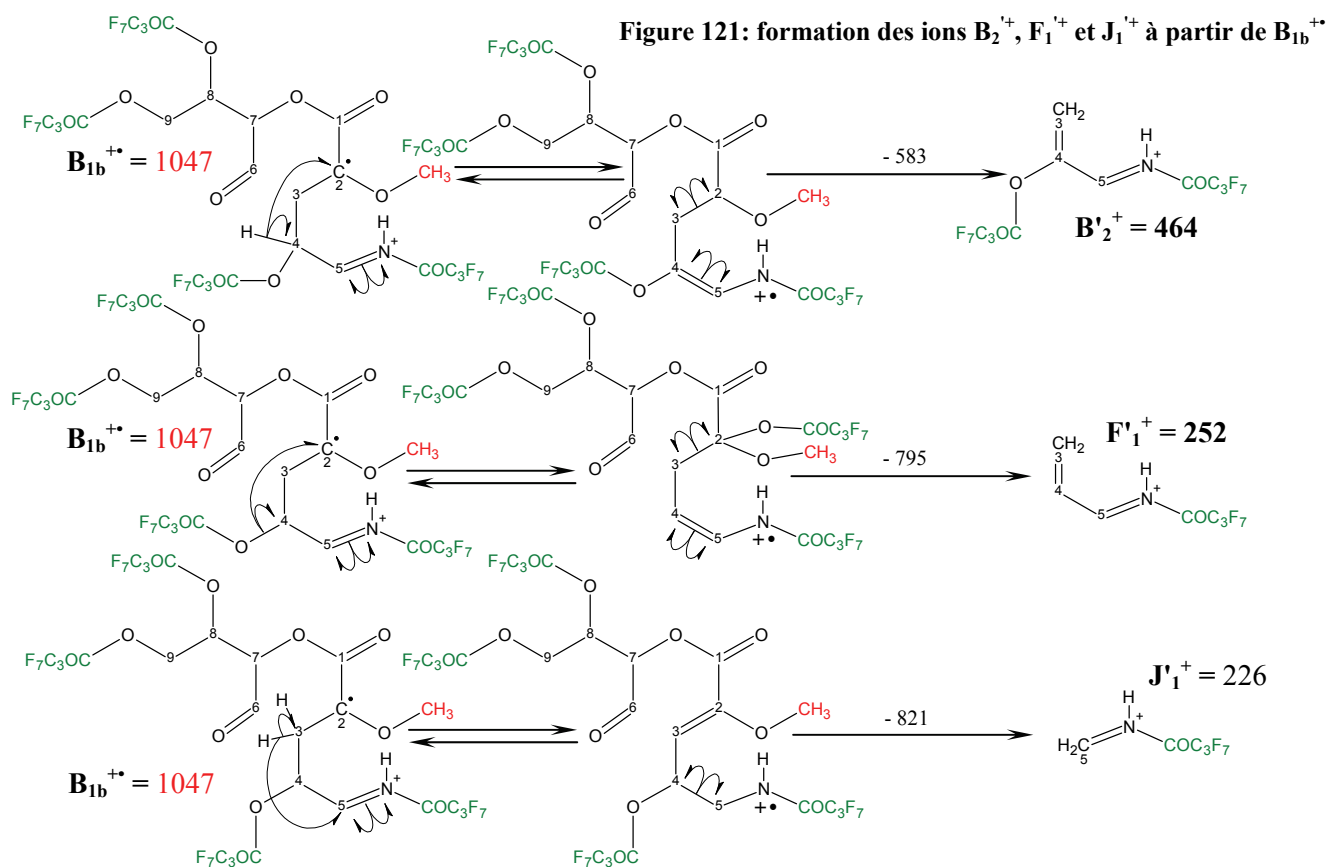
L'ion primaire  $B_{1a}^{++}$ , après réarrangement d'un hydrogène porté par  $C_3$ , donne l'ion  $B_2^+$  par la perte du carbone  $C_5$  et du groupement heptafluorobutyramide qu'il porte.

$B_{1a}^{++}$  devrait aussi donner l'ion  $F_1^+$ , mais dans le cas des acides sialiques, le carbone 3 porte deux hydrogènes, les voies  $F_1^+$  et  $B_2^+$  sont donc identiques. Ces deux ions sont extrêmement faibles (figure 121).

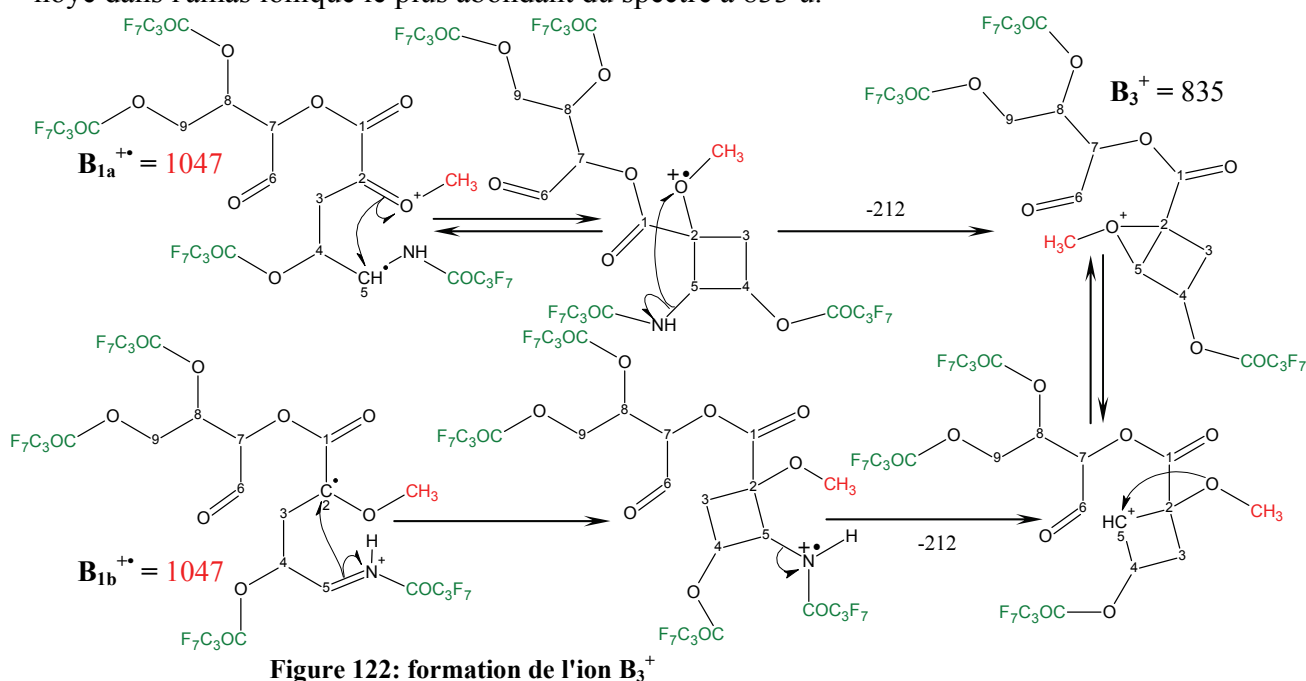
$B_{1a}^{++}$  peut aussi donner l'ion  $J_1^+$ , après réarrangement de l'heptafluorobutyrate présent sur le carbone  $C_4$  et rupture de la liaison  $C_2-C_3$ . Il est difficile de déterminer si cet ion est ou non présent, car s'il existe, il se trouve noyé dans un amas ionique du spectre à 794 u (figure 120).



Quant à l'ion  $B_{1b}^{++}$ , par des mécanismes assez comparables, il fournit les ions  $B_2^+$ ,  $F_1^+$  et  $J_1^+$ . Leurs masses sont différentes de celles de leurs homologues provenant de l'ion primaire  $B_{1a}^{++}$  car la charge ne se trouve pas au même endroit sur les deux ions primaires ce qui induit des ruptures différentes (figure 121).



Enfin, les deux ions  $B_{1a}^{+*}$  et  $B_{1b}^{+*}$  fournissent un ion en commun. Il s'agit de l'ion  $B_3^+$ , qui provient d'une cyclisation de l'ion primaire  $B_{1(a \text{ ou } b)}^{+*}$  et de la perte du groupement fixé sur le carbone 5. Bien que dans les deux cas les mécanismes qui permettent sa formation soient différents, les deux ions primaires  $B_{1(a \text{ ou } b)}^{+*}$  donnent exactement le même ion  $B_3^+$  (figure 122). Encore une fois, il est difficile de dire si cet ion existe, puisqu'en cas de présence, il est noyé dans l'amas ionique le plus abondant du spectre à 833 u.



• fragmentations suivant la série C

Comme il a été montré dans la littérature (voir les généralités), à partir de l'ion moléculaire bicyclique  $M^{+}$ , il peut y avoir formation par résonance d'un isomère monocyclique  $M_1^{+}$ . Cet ion donne l'ion  $C_1^{+}$  par rupture de la liaison O-C<sub>2</sub>. Notons qu'en raison de la présence d'un cycle supplémentaire, cet ion est un isomère de  $M^{+}$  (figure 123). Encore une fois, la présence de la charge localisée sur un carbone plutôt que sur un hétéroatome, nous fait penser que cette série n'existe pas sous cette forme. Toutefois les ions fils ( $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$ ) peuvent également être obtenus par d'autres voies comme X ou Z.

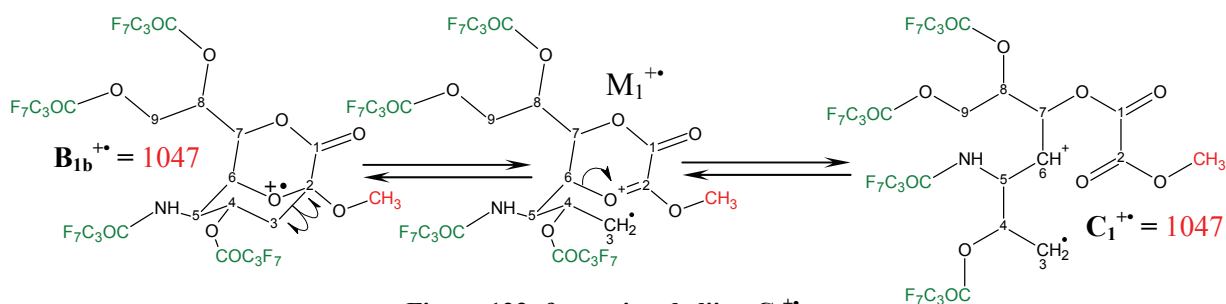


Figure 123: formation de l'ion  $C_1^{+}$

En fonction de l'emplacement d'où part un radical heptafluorobutyrate ( $F_7C_3COO^{\bullet}$ ) de l'ion  $C_1^{+}$ , il va y avoir 3 voies possibles de dégradation:

La perte du groupement fixé sur le carbone 5 (voie  $C^1$ ) amène à la formation d'un ion  $C_2^{1+}$  constitué d'un cycle à 3 carbones, puis la perte successive de molécules d'acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène, va fournir les ions  $C_3^{1+}$  et  $C_4^{1+}$  (figure 124). Cette voie semble peu favorisée, car si ces ions existent, on les trouve une unité de masse au dessus des ions X et, étant de faible intensité, ils sont donc noyés dans les amas ioniques des formes X et Z.

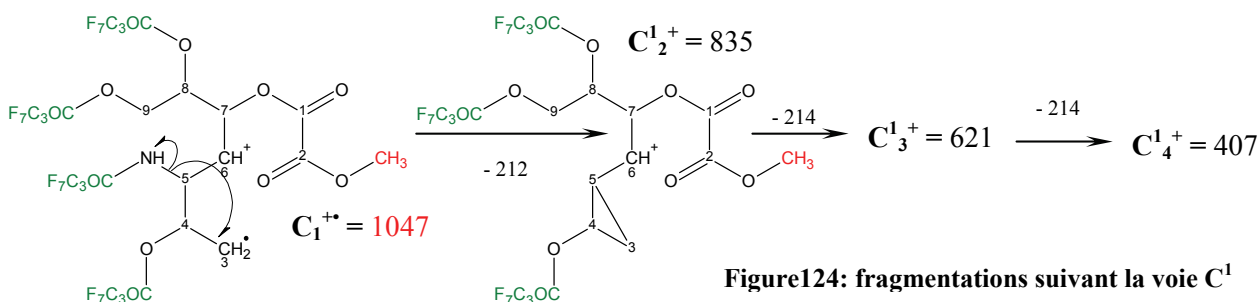
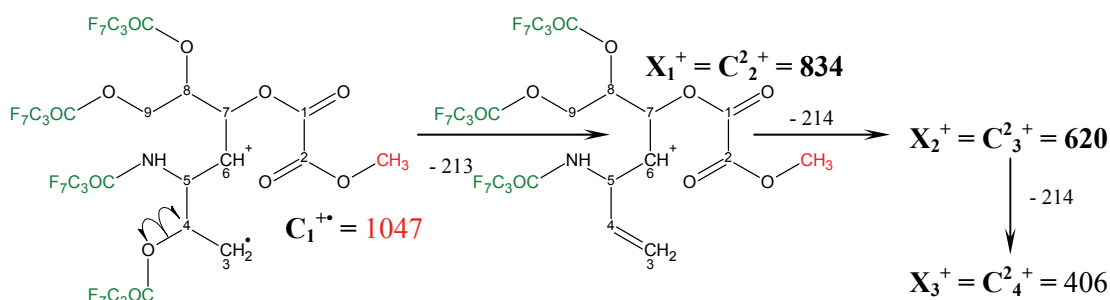


Figure 124: fragmentations suivant la voie  $C^1$

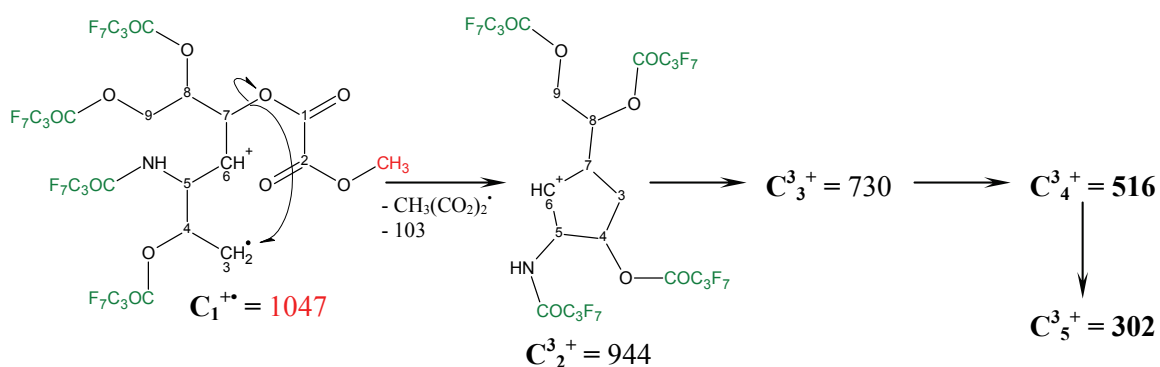
Si le radical heptafluorobutyrate ( $F_7C_3COO^{\bullet}$ ) partant est sur le carbone 4 (voie  $C^2$ ), il y a formation d'un ion  $C_2^{2+}$ . Il peut ensuite donner  $C_3^{2+}$  et  $C_4^{2+}$  par pertes successives de molécules d'acides heptafluorobutyriques. Nous pouvons remarquer que ces ions sont en fait des isomères des ions X (figure 125).





**Figure 125: fragmentations suivant la voie  $C^2 = X$**

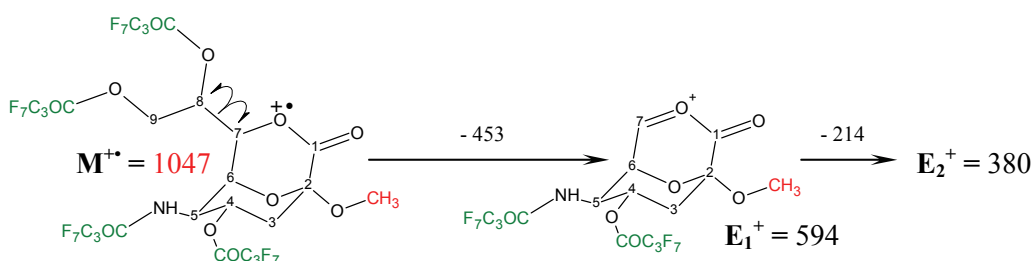
Enfin, la perte du groupement fixé sur le carbone 7 (voie  $C^3$ ) amène à la formation d'un ion  $C_2^+$  constitué d'un cycle à 5 carbones. Celui-ci donnant à son tour les ions  $C_3^+$ ,  $C_4^+$  et  $C_5^+$  par perte d'acide heptafluorobutyrique (figure 126). Cette série semble bien réelle, car elle donne des ions bien visibles sur le spectre.



**Figure 126: fragmentations suivant la voie  $C^3$**

• fragmentations suivant la série E

La série E est traditionnellement définie par la perte de la chaîne latérale au cycle. Dans ce cas, elle consiste en la perte des carbones 8 et 9 et des résidus qui y sont fixés. L'ion  $E_1^+$  ainsi formé, peut à son tour donner  $E_2^+$  par perte d'acide heptafluorobutyrique (figure 127).



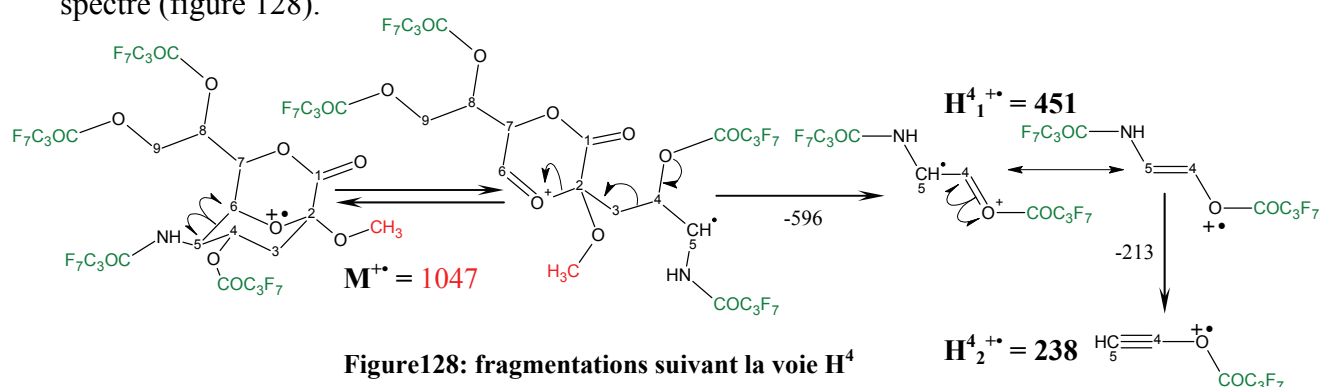
**Figure 127: fragmentations suivant la série E**

• fragmentations suivant la série F

La série F, telle qu'elle est définie par Kochetkov et Chizhov est impossible, en raison du cycle supplémentaire, toutefois, nous rappellerons que les ions  $F_1^+ = B_2^+$  et  $F'_1^+$  peuvent être obtenus par les mécanismes de fragmentation de la série B.

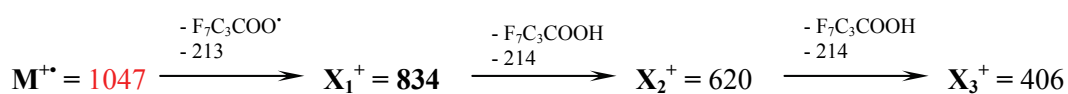
### • fragmentations suivant les séries H et K

La structure en double cycle du dérivé HFB de la Neu-1,7Lac va quelque peu changer les particularités de ces séries par rapport à ce qui se passe pour le dérivé de Neu. La nomenclature particulière aux acides sialiques reste la même, mais, en raison de la présence du cycle supplémentaire, toutes les voies qui donnent un ion contenant les carbones 2 et 6 ne sont plus possibles. Ainsi, les voies  $H^2$  et  $H^5 = K$  n'existent pas, et seules les voies  $H^3$  et  $H^4$  sont susceptibles de donner des ions. Toutefois, comme dans le cas des autres acides sialiques, les ions de la voie  $H^3$  sont invisibles sur le spectre, ce qui nous fait penser que cette voie est impossible pour cette famille de composés. Ainsi, pour les dérivés HFB de la Neu-1,7Lac, seule la voie  $H^4$  donne des ions, qui de surcroît, sont parmi les plus abondant du spectre (figure 128).



### • fragmentations suivant la série X

L'ion  $M^+$  fournit l'ion  $X_1^+$  par perte d'un radical heptafluorobutyrate. Comme il existe plusieurs possibilités de groupes partants, un grand nombre d'ions  $X_1^+$  sont envisageables. La génération des ions fils est due à la perte successive d'acide heptafluorobutyrique après réarrangement d'un hydrogène (figure 129).



**Figure 129: fragmentations suivant la série X**

Comme dans bien des cas de dérivés HFB, ces ions sont abondants et se présentent dans les spectres comme des amas de pics de forme pseudo-gaussienne, car ils sont une unité de masse au dessus des ions Z voisins (pour plus de détails sur leur formation et caractéristiques, voir le chapitre sur la fragmentation des pentoses, désoxy-hexoses, hexoses, hexosamines et acides hexuroniques). Nous rappellerons aussi, que dans le cas du dérivé HFB de la Neu-1,7Lac, ils correspondent également à la voie C<sup>2</sup>.

• fragmentations suivant la série Z

Cette voie de fragmentation provient de la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique (F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>COOH) à partir de l'ion M<sup>+</sup> pour donner, après réarrangement d'un hydrogène, l'ion Z<sub>1</sub><sup>+</sup> qui est l'ion le plus abondant du spectre. La suite des fragmentations suit le même processus pour donner les ions fils Z<sub>2</sub><sup>+</sup> et Z<sub>3</sub><sup>+</sup> (figure 130).

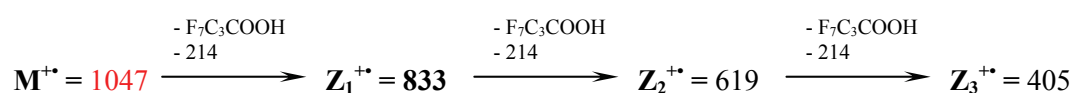


Figure 130: fragmentations suivant la série Z

## VIII. Conclusion

Parmi les nombreuses technologies utilisées pour la détermination de la composition d'un mélange en monosaccharide, la GC-MS est devenue une technique de choix. D'ailleurs, nous avons pu nous en apercevoir dans la partie "généralités" de ce document où les différents procédés de dérivation les plus utilisées sont résumés. Qu'il s'agisse des dérivés méthylés, acétylés ou triméthyl-silylés (les plus utilisés), tous sont efficaces et permettent, dans la plupart des cas, d'arriver à ses fins. Cependant chacune de ces méthodes présente de petits inconvénients. La dérivation par les HFB que nous utilisons n'est pas bien différente, dans le principe, des autres formes d'acylation comme les dérivés acétylés ou trifluoroacétylés. Toutefois, le grand nombre d'analyses que nous avons effectuées par ce procédé nous a permis de dégager quelques avantages à son utilisation.

Tout d'abord, les dérivés HFB sont certainement parmi les plus stables dans le temps, notamment comparativement aux dérivés TMS qui doivent être analysés très rapidement après leur formation. En outre, ils sont beaucoup moins sensibles à la présence d'eau. Nous avons également insisté sur le problème majeur des dérivés TMS qui est celui de l'analyse des produits aminés tels que les hexosamines ou acides sialiques, problème qui n'est pas rencontré

avec les dérivés acylés dont font partie les HFB. Par ailleurs, comparativement aux autres dérivés acylés, les HFB présentent quelques avantages. Étant plus lourds, ils sont moins volatils que leurs homologues TFA. De ce fait, ils peuvent être évaporés sous un courant d'azote sans risquer de perdre les dérivés les plus volatils, notamment les dérivés des pentoses ou désoxy-hexoses, améliorant ainsi la quantification de ces composés. Les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides montrent de bonnes caractéristiques chromatographiques avec des pics bien séparés et fins. Malgré leur masse importante, ils sortent plus tôt que leurs équivalents per-acétylés, car ils n'interagissent pas du tout avec la phase stationnaire des colonnes capillaires. Ainsi, ils sont parfaitement séparés des autres familles de composés qui peuvent constituer un échantillon (contaminants, lipides, etc...). Ce type de dérivé permet également de discriminer par l'analyse de l'ion  $B_3$  l'énantiométrie d'un monosaccharide. En effet, comme nous l'avons démontré, il est très aisé de différencier un dérivé de Gal, Man ou Glc et de GlcNAc ou GalNAc. En outre, l'ion diagnostique  $E_1$  permet, quelque soit le dérivé, de distinguer une forme furanique d'une forme pyranique. Nous avons aussi établi qu'il est possible de caractériser la première GlcNAc de la chaîne des N-glycannes, autorisant ainsi d'établir le type de glycosylation des glycoprotéines. Enfin, la particularité des mécanismes de fragmentation des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides permettent de spécifier la présence de monosaccharides rares, comme c'est le cas de l'exemple du 2-O-méthyl-Fuc discuté dans ce mémoire.

Par contre, les dérivés HFB ont aussi quelques inconvénients, puisque les O-méthyl-glycosides d'acides sialiques, si ils peuvent être analysés quantitativement d'une façon globale, ne peuvent pas donner de résultats qualitatifs précis. Toutefois, ce problème est commun à toutes les autres formes de dérivations qui suivent une libération des monosaccharides par méthanolyse. Ainsi, afin d'analyser plus précisément la composition en acides sialiques d'un échantillon, il est nécessaire d'utiliser un autre protocole et c'est ce que nous allons décrire dans le prochain chapitre.

# **Analyse des dérivés HFB des acides sialiques libérés par hydrolyse douce.**

## **I. Introduction**

Comme précédemment décrit, les travaux de notre équipe publiés en 1999 sur l'analyse des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides libérés après méthanolyse ont démontré que les acides sialiques acylés par des groupements heptafluorobutyrate forment des dérivés bien adaptés à l'analyse en GC-MS (Zanetta J. P. et coll., 1999a). Toutefois, il a été clairement établi, que la libération par méthanolyse de cette famille de composés provoque la dégradation des différents groupements acyles qui peuvent classiquement exister sur de telles molécules. Ainsi, il est évident que cette technique de libération ne peut pas être utilisée pour l'obtention de résultats qualitatifs. Concernant la détermination de la nature des acides sialiques, dans la partie "généralité" de ce travail, nous avons évoqué des travaux antérieurs ayant permis des études qualitatives de composition en acides sialiques, notamment par l'utilisation de dérivés triméthyl-silyle de méthyl-ester d'acides sialiques (Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a et Schauer R. et coll., 1976). Ces travaux avaient la particularité de ne pas faire intervenir la technique de méthanolyse pour la libération des acides sialiques, mais des hydrolyses douces ou des neuraminidases, qui sont connues pour respecter les acylations présentes sur ces composés (voir les "généralités"). Cependant, bien que les dérivés TMS aient fait leurs preuves, tout comme pour les dérivés des O-méthyl-glycosides, ils présentent certains inconvénients: 1) un faible rendement de dérivation avec des échantillons d'origine biologique, en raison de la présence de nombreuses impuretés qui nécessitent, avant dérivation, différentes étapes supplémentaires de purification; 2) une instabilité importante dans le temps qui induit des variations de réponses relatives molaires; 3) une dégradation partielle des composés dans l'injecteur. C'est pourquoi, s'appuyant sur les constatations montrant une plus grande stabilité des dérivés HFB par rapport aux TMS (Zanetta J. P. et coll., 1999a), nous avons tenté d'adapter notre méthode de dérivation par les heptafluorobutyrate à l'analyse qualitative et quantitative des acides sialiques. Ces travaux ont été présentés dans la publication suivante (Zanetta J. P. et coll., 2001).

## **II. La publication**

## Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives

Jean-Pierre Zanetta<sup>1,2</sup>, Alexandre Pons<sup>2</sup>,  
Matthias Iwersen<sup>3</sup>, Christophe Mariller<sup>2</sup>, Yves Leroy<sup>2</sup>,  
Philippe Timmerman<sup>2</sup>, and Roland Schauer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Biologique, CNRS UMR 8576, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex France, and <sup>2</sup>Biochemisches Institut, Universität Kiel, Olshausenstrasse 40, D-24098 Kiel, Germany

Received on January 16, 2001; revised on March 20, 2001; accepted on March 21, 2001

The fine structural motifs of sialic acids, a frequent terminal monosaccharide of glycans, seem to contain essential biological properties. To identify such subtle structural differences, a reliable method was developed for the qualitative and quantitative identification of sialic acids present in different tissues and fluids. This method involved, after liberation of sialic acids by mild acid hydrolysis, their methyl esterification using diazomethane in the presence of methanol and the formation of volatile derivatives using heptafluorobutyric anhydride. The derivatives were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry in the electron impact mode. This technique allowed the separation and identification of a large variety of sialic acids, including different O-acylated forms of N-acetyl and N-glycolyl neuraminic acids and of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Kdn). This method allowed also identifying 8-O-methylated and 8-O-sulfated derivatives, de-N-acetylated neuraminic acid, and 1,7-sialic acid lactones. Compounds present in very complex mixtures could be identified through their fragmentation patterns. Because of the stability of the heptafluorobutyrate derivatives, this method presents important improvements compared to the previous techniques, because it can be frequently applied on very small amounts of crude samples. This methodology will support progress in the field of the biology of sialic acids.

**Key words:** Kdn/lactone/lactyl/methyl/sulfate

### Introduction

In recent years, increasing interest was drawn to the diversity of sialic acids, because these monosaccharides could play important biological functions (for reviews, see Varki, 1992, 1997; Schauer and Kamerling, 1997; Sinha *et al.*, 2000). For example, 9-O-acetyl N-acetyl neuraminic acid (Neu5Ac) is a specific ligand for the agglutinin of influenza virus C (Roy

*et al.*, 1992), whereas 4-O-acetylated Neu5Ac is a specific ligand for the agglutinin of the murine hepatitis virus (Regl *et al.*, 1999). Based on previous work (for review, see Schauer and Kamerling, 1997), sialic acids present an extreme diversity, and more than 40 different compounds were identified differing in the presence or absence of an amino group in position 5 (sialic acids or 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid [Kdn]), different acylations of the NH<sub>2</sub> group at position 5 (acetyl, glycolyl), and various substituents of the different hydroxyl groups (acetyl, lactyl, methyl, sulfate, phosphate, etc.). Different complex monosaccharides presenting similarities with sialic acids were identified in bacteria, which may represent important epitopes (Knirel *et al.*, 1987, 1997).

Several methods were developed for the identification and quantitative determination of these compounds. The use of fluorescent labeling specific for 2-keto carboxylic acid (Hara *et al.*, 1989; Klein *et al.*, 1997; Iwersen *et al.*, 1998) followed by the separation of the compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC) provided a very sensitive method. However, the separation power of HPLC was still insufficient for resolving very complex mixtures, whereas coupling with mass spectrometry (MS) was difficult for routine analyses. Furthermore, this method could not reveal possible lactones of sialic acids, which might play important biological roles. In contrast, gas chromatography (GC)/MS methods using the derivatization of the methyl esters of sialic acids as trimethyl-silyl (TMS) ethers, allowed easy GC/MS analyses (Kamerling *et al.*, 1975; Schauer *et al.*, 1976; Kamerling and Vliegenthart, 1982). However, these methods also suffered from some difficulties. One was that, when applied to biological samples presenting different impurities, the silylation reaction had a poor yield and the derivatives were unstable. The other was that the TMS derivative of the semi-acetalic group was unstable and was partially lost by pyrolysis in the injector of the gas chromatograph in a poorly reproducible way. Consequently, instead of the two peaks of the anomers of each sialic acid, four peaks were produced, as already observed for glucosamine (Maes *et al.*, 1999). One way to circumvent these problems was the use of strong acylating agents, like heptafluorobutyric anhydride (HFBA), resulting in high-mass compounds with a very poor adsorption on classical methyl-siloxane liquid phases (Zanetta *et al.*, 1999) and, consequently, that eluted at relatively low temperature. Furthermore, the derivatives present a very strong stability with time, the reaction can take place quantitatively even in the presence of salts, proteins, or other contaminants and the semi-acetalic group is not derivatized. This article reports the methodology of formation of their volatile derivatives and presents the GC/MS data obtained in the electron

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed

### **III. Discussion sur le choix de la méthode d'hydrolyse douce par l'acide acétique 2M**

Parmi les différentes techniques d'hydrolyses douces des acides sialiques (voir les généralités), il est maintenant reconnu que l'hydrolyse à l'acide acétique 2 M est une des plus respectueuse des groupements présents sur les acides sialiques. Contrairement à la méthanolyse, il a été clairement démontré qu'elle n'entraîne pas de dé-N-acétylation, ce qui permet de différencier les différentes familles d'acides sialiques que sont, les acides neuraminiques (Neu), les acides 5-N-acétyl-neuraminiques (Neu5Ac) et les acides 5-N-glycolyl-neuraminiques (Neu5Gc).

Dans le but de respecter la structure native des acides sialiques, d'autres méthodes d'hydrolyses, comme les neuraminidases, peuvent être utilisées. Cependant, ces enzymes ont une spécificité d'action qui n'est pas assez large pour libérer la totalité des acides sialiques existant dans la nature. Entre autres, les neuraminidases sont connues pour ne pas hydrolyser les acides sialiques contenant un pont lactone, en raison de leur anomérie  $\beta$  (Yu R. K. et coll., 1969). Or, comme nos études le montrent, il est possible que ces composés soient naturels, et non pas dus à un artefact d'isolement des acides sialiques. En outre, l'utilisation de neuraminidases induit obligatoirement des étapes supplémentaires d'isolement et de purification des acides sialiques libérés. Ce type de manipulation est en général consommateur de temps et d'échantillon, amenant à une perte parfois importante de composés. Nous pensons donc qu'il est préférable d'utiliser une hydrolyse chimique dont les capacités de libération sont les plus larges possibles.

Le rendement de l'hydrolyse à l'acide acétique a été décrit comme n'étant que de 70 à 80% (Schauer R., 1978), mais un tel taux d'hydrolyse est tout à fait suffisant pour une analyse quantitative efficace, surtout si ce taux reste constant d'une expérimentation à l'autre.

Une équipe a montré que l'hydrolyse à l'acide formique 2 M (aux capacités identiques à l'hydrolyse par l'acide acétique) révélait un taux d'au moins 50% de dé-O-acylation (Buscher H. P. et coll., 1974). Les résultats de ce travail ont été généralisés à l'hydrolyse par l'acide acétique (Schauer R., 1978 et Kamerling J. P. et coll., 1982). Ces auteurs pensent que ces chiffres sont acceptables pour des analyses qualitatives à partir de matériel biologique, mais ils les trouvent limites pour des analyses quantitatives. Cependant, nous ferons remarquer que ces conclusions n'ont pas été confirmées par d'autres études. Nos propres travaux montrent des résultats en contradiction avec ces publications. En effet, l'analyse de composés O-acétylés standards très purs (Neu4,5Ac<sub>2</sub>, Neu5,9Ac<sub>2</sub> et Neu5,7,9Ac<sub>3</sub>) n'a pas montré de dé-O-

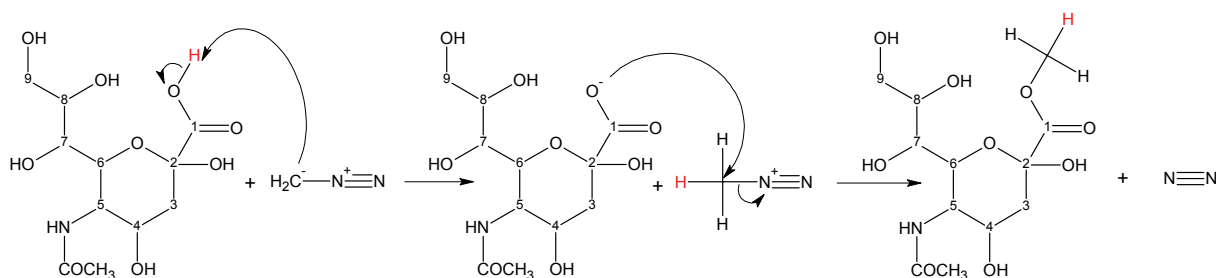
acétylation. Ce fait est bien visible sur la figure 2a de la publication, pour laquelle un mélange de standards de Neu4,5Ac<sub>2</sub> et Neu5,9Ac<sub>2</sub> a subi le protocole complet d'hydrolyse, de méthyl-estérification et de dérivation à l'HFBA avant analyse. Sur le chromatogramme en TIC, on observe uniquement les deux pics correspondant aux dérivés des deux acides sialiques. La présence du dérivé provenant de leur dé-O-acétylation (Neu5Ac) n'est observable que par la reconstitution du chromatogramme à partir d'un ion commun aux trois dérivés (ion spécifique de la famille Neu5Ac à m/z 757). En fait, la quantité représentée par la surface de ce pic correspond à 0,01% du total des deux autres. Cette quantité étant négligeable, on est donc très loin des 50% de dé-O-acétylations annoncés par Buscher. Il reste toutefois envisageable que le processus de dé-O-acétylation soit possible pour d'autres familles d'acides sialiques que nous n'avons pas testées (formes mono- ou poly-O-acétylés de la famille des 5-N-glycolyl, 9-O-lactyl, etc.). Mais dans ce cas, il faut savoir que ce type de composés n'est, en général, présent dans les milieux biologiques qu'en quantité extrêmement restreinte, voire à l'état de trace. Cela est surtout vrai pour les échantillons provenant d'animaux supérieurs comme les mammifères, chez lesquels la famille Neu5Ac représente à elle seule 80 à 95% des acides sialiques. Ainsi en envisageant la dé-O-acétylation de certains composés, même à un taux de 50%, cela ne changerait pas de façon significative la composition globale d'un échantillon. La méthode d'hydrolyse douce par l'acide acétique 2 M nous semble donc la plus adaptée à la libération de la totalité des acides sialiques d'un échantillon biologique, dans le but de conduire une analyse à la fois qualitative et quantitative de ces composés. En effet, l'utilisation d'acide acétique 2 M permet une régulation aisée de la réaction à pH à 2,0 (point très important pour favoriser la coupure des acides sialiques et éviter leur dé-O-acylation). Il est plus volatil que l'eau, ce qui permet de l'éliminer sans concentrer la solution en acide (comme c'est le cas pour l'acide formique et l'acide propionique). En ce qui concerne les rendements de coupure, dans les conditions que nous préciserons (sans purification aucune des acides sialiques avant leur dérivation), nous n'avons pas trouvé de variations significatives entre la quantité globale des différents acides sialiques libérés par hydrolyse douce et celle des acides sialiques libérés par méthanolyse ultérieure du même échantillon par rapport à un standard interne commun. Ces analyses suggèrent que, pour des glycoprotéines riches en acides sialiques divers (mucines) au moins 95% des acides sialiques sont libérés. Bien entendu, ces acides sialiques libérés possèdent une fonction acide carboxylique libre sur le carbone 1. Or, cette dérivation est nécessaire à une bonne séparation de nos dérivés en chromatographie de phase gazeuse afin d'éviter les interactions entre la fonction acide des



dérivés et la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Il nous a donc fallu ajouter dans le protocole une étape de méthyl-estérification.

#### **IV. Discussion sur le choix de la méthyl-estérification par le diazométhane**

Afin de méthyl-estérifier les acides sialiques libérés par hydrolyse douce, nous avons testé deux des méthodes les plus couramment usitées que sont: 1) l'utilisation d'iodure de méthyle dans le DMSO; 2) l'ajout de diazométhane solubilisé dans l'éther (Kamerling J. P. et coll., 1975a). Pour les raisons développées dans la publication, nous avons préféré la seconde, car elle présente un excellent rendement lorsqu'elle est conduite dans du méthanol anhydre. En outre ce mélange d'estérification a la particularité d'être très volatil, ce qui permet de s'en débarrasser, après réaction, par simple évaporation sous un courant d'azote. Dans ces conditions, la réaction de méthyl-estérification suit le schéma suivant (figure 131):



**Figure 131: principe de la méthyl-estérification au diazométhane**

Notons que, tout comme l'hydrolyse douce, ce traitement n'entraîne pas de dé-O-acétylation des acides sialiques (Fig. 2a de la publication).

En fait, cette technique ne présenterait que des avantages si le diazométhane n'était pas un composé extrêmement toxique. En effet, son inhalation est susceptible d'entraîner de graves problèmes pulmonaires comme des embolies et le développement de fortes allergies. Ce produit est également un cancérigène largement reconnu doublé d'un explosif puissant. Il est donc nécessaire de suivre scrupuleusement les règles de protection décrites par les protocoles de préparation et d'utilisation du réactif, et notamment, le port de gants lors des manipulations qui ne doivent être conduites que sous une hotte aspirante. Enfin, non seulement sa préparation doit être faite dans un bain de glace, afin d'éviter tout risque d'explosion, mais le réactif doit être refroidi avant toute utilisation, Ceci, pour éviter la perte du diazométhane au cours des ouvertures successives du tube dans lequel le réactif est stocké. En effet, nous avons remarqué une diminution du rendement de la méthyl-estérification durant les mois d'été,

rendement qui redevient normal lorsque le tube de stockage du réactif est refroidi dans la glace pendant 15 min avant son ouverture pour utilisation.

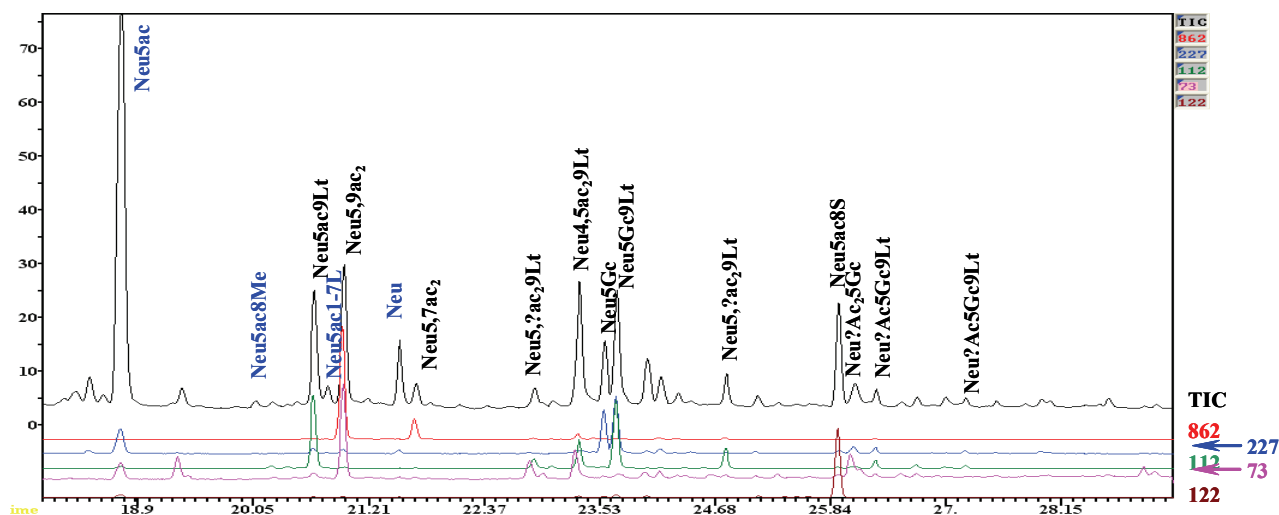
## **V. Discussion sur les résultats obtenus**

### **A. Non dérivation de l'hydroxyle semi-acétalique porté par le carbone 2.**

Contrairement à la méthanolyse qui produit des O-méthyl-glycosides (reconnus pour leur stabilité dans le temps), l'hydrolyse douce ne fournit que des monosaccharides sous leur forme libre. En effet, l'hydroxyle du carbone 2 n'est pas méthylé lors de ce traitement. Il n'est d'ailleurs pas plus dérivé durant l'étape de méthyl-estérification par le diazométhane, sans doute en raison du fait que son caractère acide n'est pas assez marqué. En outre, lors de l'étape suivante d'acylation à l'HFBA, il n'est pas acylé par un groupement heptafluorobutyrate. Ceci étant dû à sa nature semi-acétalique qui lui confère un caractère d'acide faible, clairement différent d'un alcool. Ainsi, le produit final du protocole de dérivation est un acide sialique méthyl-estérifié sur le carbone 1, heptafluorobutyrylé sur tous les hydroxyles libres, excepté sur celui en position 2 (voir la figure 1 de la publication). Le fait que cet hydroxyle reste sous sa forme libre explique que ce type de composés soit moins stable dans le temps, comparé aux O-méthyl-glycosides. Toutefois, les méthyl-esters d'acides sialiques libres restent stables dans le milieu acylant, sans chauffage, pendant une période d'un mois, ce qui, somme toute, n'est pas négligeable.

### **B. Chaque famille d'acides sialiques montre des ions diagnostiques en spectrométrie de masse.**

Un des gros avantages de la GC-MS est qu'elle permet, grâce à l'informatique, de reconstituer des chromatogrammes sur un seul ion au lieu de la totalité (TIC). Ainsi, dans chaque famille de composés comportant des structures communes, les spectres de chacun de ses représentants montrent des ions identiques. Cette particularité est fort appréciable pour l'analyse rapide d'un échantillon contenant un grand nombre de composés. Nous ne rapporterons pas ici l'ensemble de ces ions diagnostiques, car une description très complète se trouve dans la publication. Toutefois, nous illustrons les plus importants par un chromatogramme obtenu à partir d'acides sialiques isolés de mucine sous-maxillaire bovine (BSM) (figure 132).



**Figure 132: Reconstitution d'un chromatogramme par les ions diagnostiques:** ce chromatogramme est obtenu à partir d'un échantillon d'acides sialiques libérés de mucine sous-maxillaire bovine (BSM). **En noir**, acides sialiques déterminés par les ions diagnostiques: 862 = Neu5Ac di-acétylé; 227 = acides sialiques 5-N-glycolyl; 112 = acides sialiques 9-O-lactyl; 73 = acides sialiques 9-O-acétyl; 122 = acides sialiques 8-sulfate. **En bleu**, nous avons noté les acides sialiques présents, non révélés par ces ions diagnostiques.

Les spectres des acides sialiques comportant un groupement 5-N-glycolyl montrent un ion à  $m/z$  227. La présence de groupements variables sur le carbone 9 donne des ions très spécifiques. Un groupement 9-O-lactyle est déterminé par un ion intense à  $m/z$  112, alors qu'un groupement acétyle donne un ion à  $m/z$  73. Un ion à  $m/z$  122 est caractéristique de la présence d'un groupement sulfate sur le carbone 8. Enfin, l'ion à  $m/z$  862 est caractéristique des Neu5Ac mono-O-acétylés.

### C. Existence d'acides sialiques lactonisés.

Au cours du chapitre sur l'analyse des dérivés HFB d'acides sialiques libérés par méthanolyse, nous avons avancé l'idée de l'existence d'une forme 1,7-lactone des acides sialiques. Or, certaines de ces formes ont été retrouvées après hydrolyse douce. Elles concernaient certains des acides sialiques de la famille des Neu5Ac et Neu 5Gc (figure 11 de la publication).

#### 1) Les données de la spectrométrie de masse

Les dérivés HFB de ces composés, obtenus après hydrolyse douce, ayant des masses inférieures à la limite de masse de notre appareil de routine (sauf pour Neu5Gc-1,7Lac), il nous a été possible d'étudier, dans de bonnes conditions, le schéma de fragmentation de chacun d'entre eux. Nous présentons ici, les spectres CI et EI du dérivé HFB du Neu5Ac-1,7Lac ainsi qu'un schéma de fragmentation possible de ce composé en EI.

Habituellement, en mode d'ionisation CI (gaz vecteur: ammoniac), les dérivés HFB de méthyl-ester d'acides sialiques donnent deux ions  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  espacés de 17 u, le premier étant minoritaire et le second très majoritaire. Or, dans ce cas, le spectre CI montre deux pics espacés de 18 u à m/z 862 et 880 et c'est le premier qui est majoritaire (figure 133). Nous pensons donc qu'il ne s'agit pas des ions précités, mais plutôt, des ions  $[M+H]^+$  et  $[M-H_2O+H]^+$ . Ainsi la masse moléculaire de ce dérivé serait de 879 u.

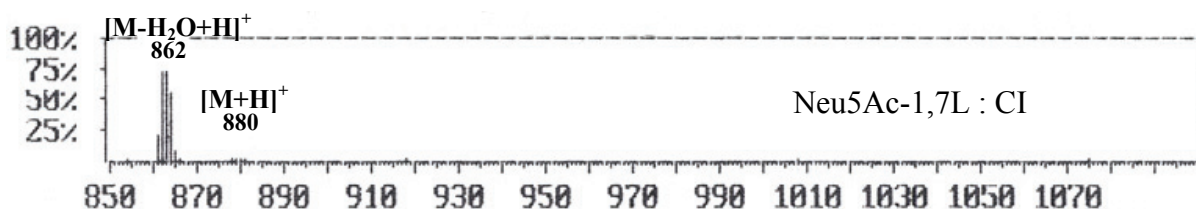


Figure 133: spectre de masse CI (ammoniac) du dérivé HFB supposé du Neu5Ac-1,7Lac.

Cette masse coïncide d'ailleurs parfaitement avec le spectre EI, dont le premier amas d'ions visible est à m/z 859/860/861/862. Ces masses correspondraient respectivement aux ions  $[M-HF]^+$ ,  $[M-F]^+$ ,  $[M-H_2O]^+$  et  $[A_1]^+$  qui sont très classiques pour ce type de dérivés et montrent que le dérivé ne comporte pas de groupement HFB sur l'hydroxyle du carbone 2. Le spectre de masse est le suivant (figure 134):

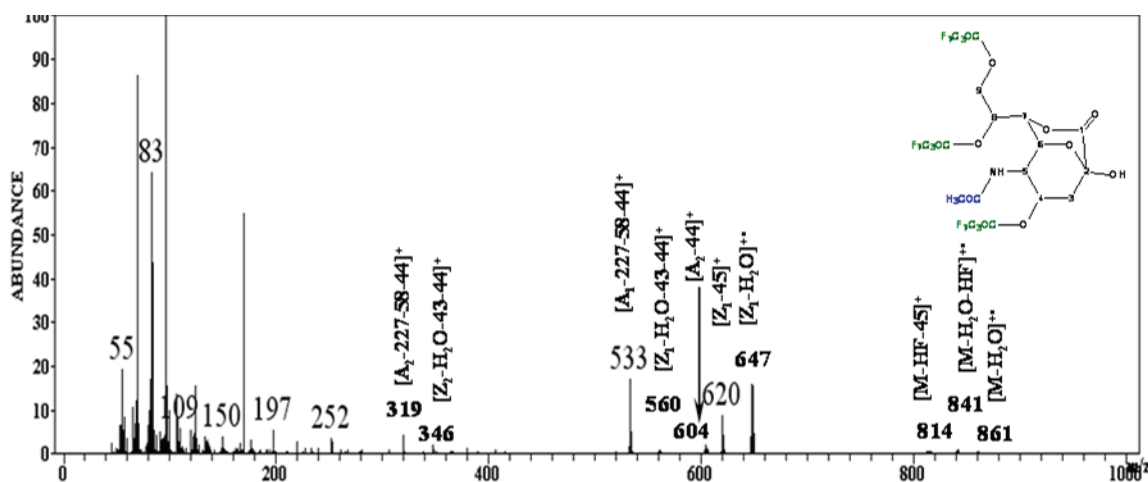


Figure 134: spectre de masse EI du dérivé HFB supposé du Neu5Ac-1,7Lac.

A partir de ces informations, nous avons déterminé un schéma possible de fragmentation en plusieurs séries.

#### a) Fragmentations suivant la série A

La perte d'un radical hydroxyle définit l'ion  $A_1^+$  à  $m/z$  862, qui est contenu dans le premier amas d'ions visible sur le spectre. En plus de la série classique donnant les ions  $A_2^+$  et  $A_3^+$  par perte successive d'acide heptafluorobutyrique, cet ion primaire est à l'origine d'autres ions, parmi les plus abondants du spectre. Il s'agit des ions  $[A_1-227-58-44]^+$  et  $[A_2-227-58-44]^+$  à  $m/z$  533 et 319. Enfin, à partir de  $A_2^+$ , et par perte de  $CO_2$ , apparaît l'ion  $[A_2-44]^+$  (figure 135).

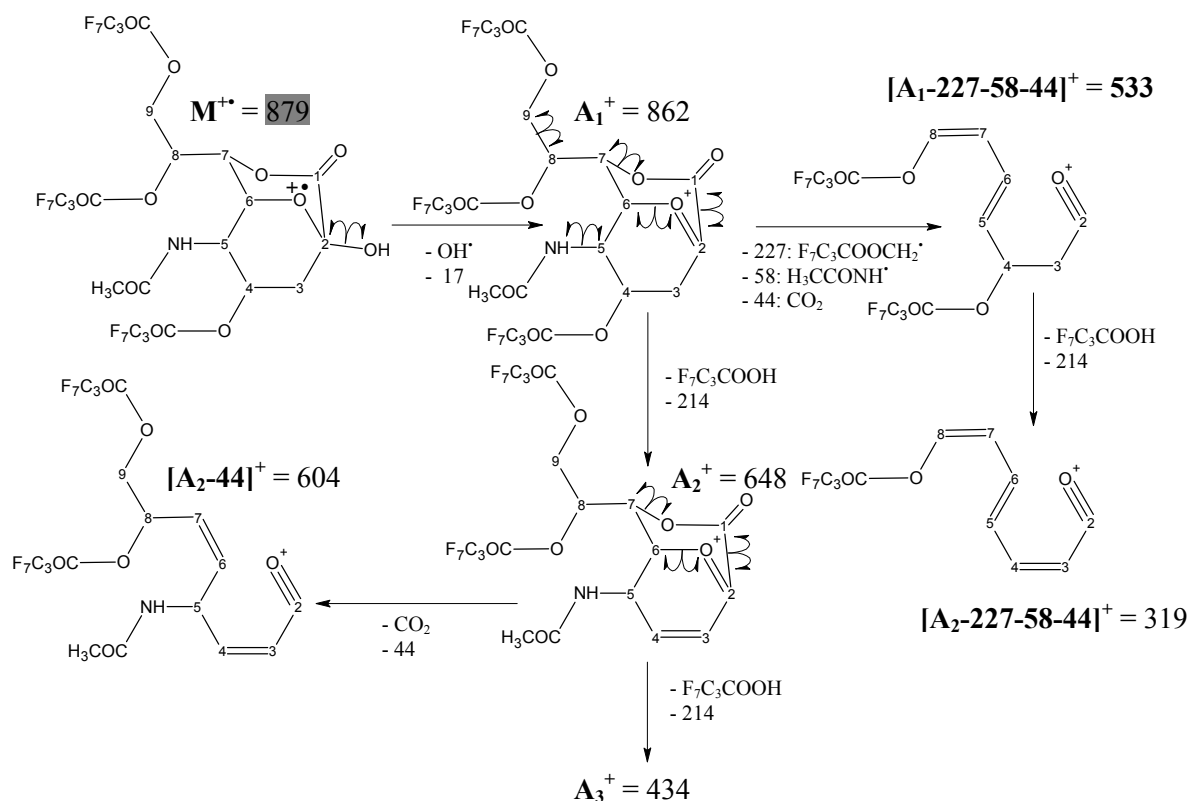


Figure135: fragmentations suivant la série A

## b) Fragmentations provenant d'une déshydratation

L'ion le plus abondant du premier amas ionique est l'ion  $[M-H_2O]^+$  à  $m/z$  861. Par la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique, il est à l'origine d'un ion très abondant, qui est l'ion  $[Z_1-H_2O]^+$  de masse 647 u. Il peut aussi donner un ion faible à  $m/z$  774, par la perte du radical acétyle de la fonction amine, accompagnée par celle de  $CO_2$ . Cet ion  $[M-H_2O-43-44]^+$  peut à son tour se fragmenter pour donner les ions  $[Z_1-H_2O-43-44]^+$  et  $[Z_2-H_2O-43-44]^+$ , ou bien l'ion  $[M-H_2O-43-44-HF]^+$  par la perte d'une molécule de HF (figure 136).

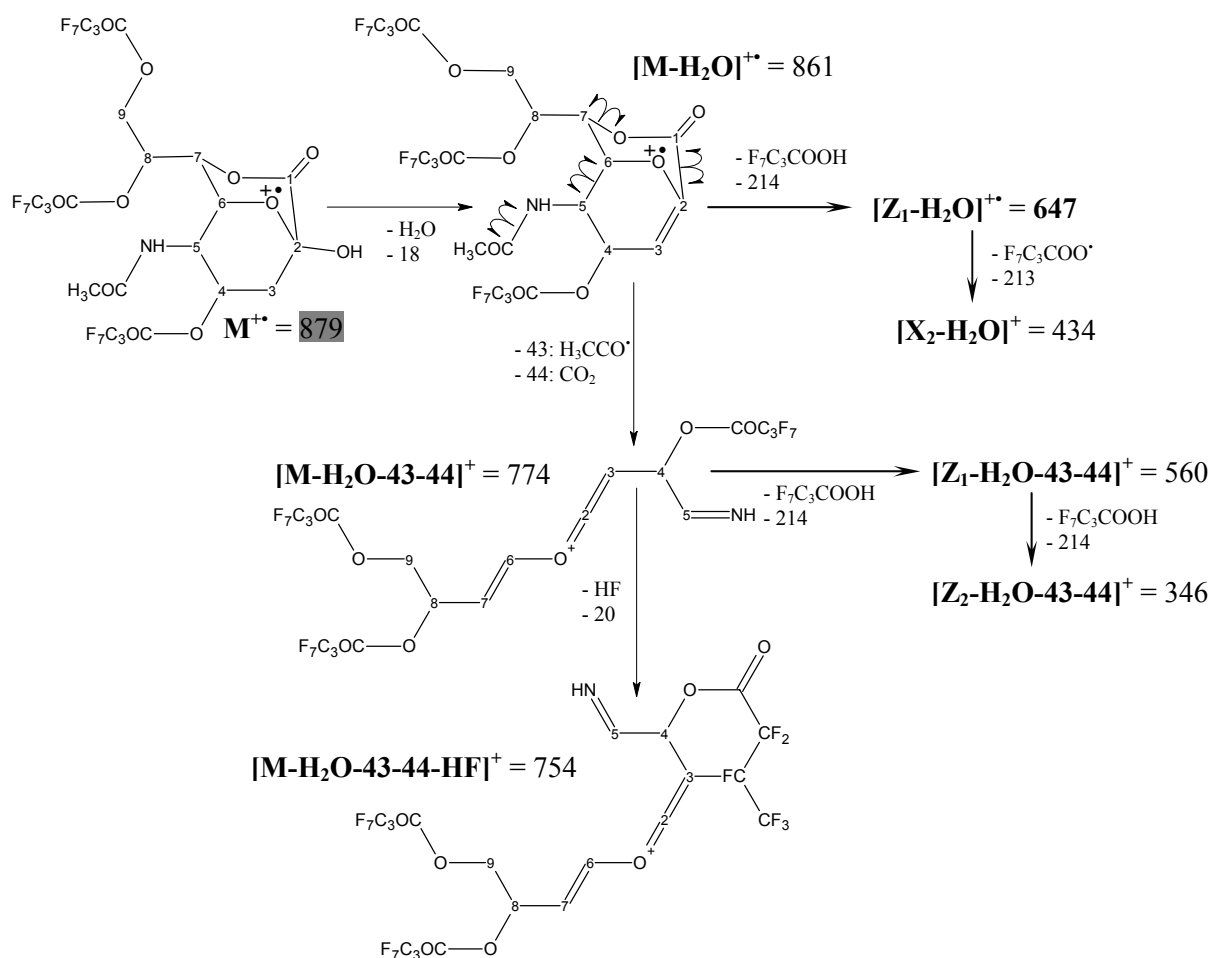


Figure 136: la voie de fragmentation débutant par une déshydratation

### c) Fragmentations par perte d'une molécule de HF

Un ion de masse  $m/z$  859 correspondant à la forme  $[M-HF]^{++}$  peut donner l'ion le plus abondant du second amas visible sur le spectre. Il s'agit de l'ion  $[M-HF-H_2O]^{++}$  à  $m/z$  841 obtenu par la perte d'une molécule d'eau. L'ion  $[M-HF]^{++}$  peut aussi donner l'ion  $[M-HF-45]^+$  à  $m/z$  814, après réarrangement d'un hydrogène et perte du radical  $[COOH]^\bullet$  (figure 137).

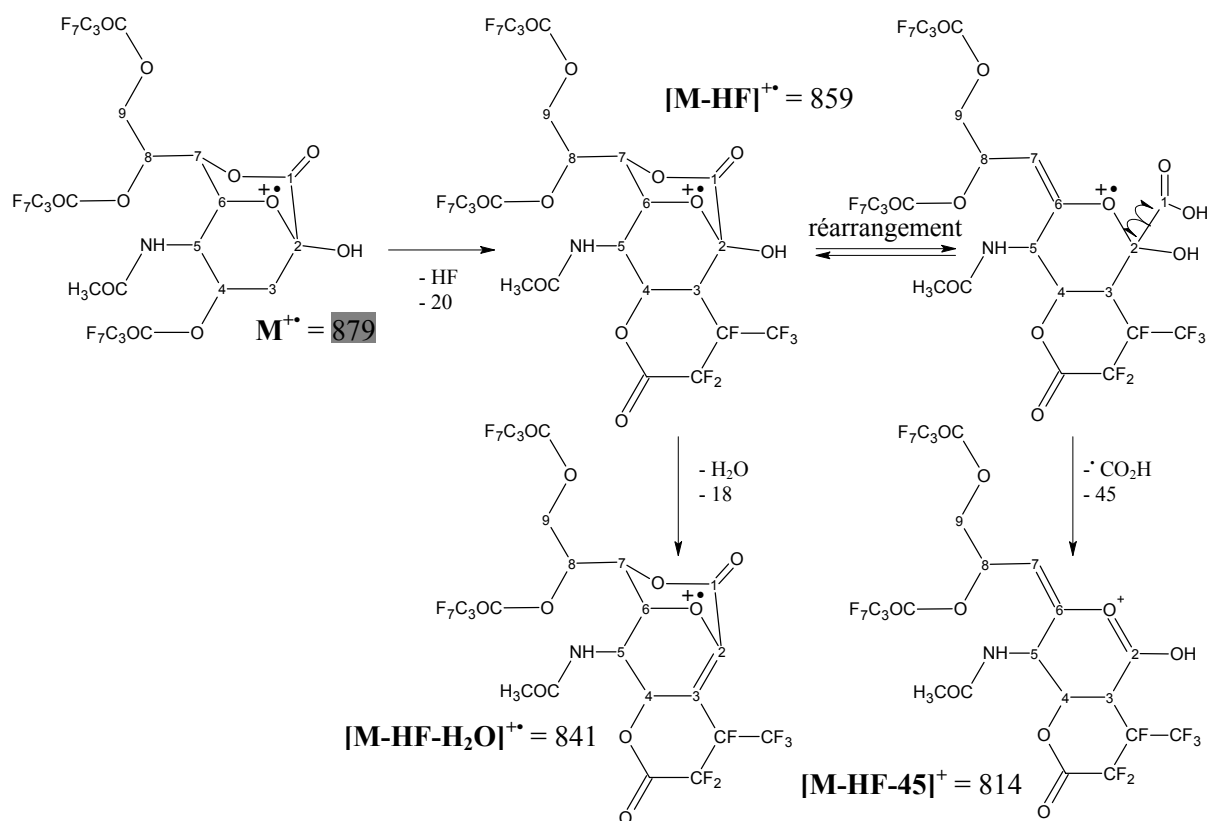


Figure 137: la voie de fragmentation débutant par la perte d'une molécule de HF

#### d) Fragmentations par perte d'un radical $[COOH]^\bullet$

Un réarrangement d'hydrogène permet d'obtenir un intermédiaire de fragmentation contenant un radical  $[COOH]^\bullet$ . Son départ permet la formation de l'ion  $[M-45]^+$  de masse  $m/z$  834. A partir de cet ion très ténu, une série classique de perte de molécules d'acide heptafluorobutyrique va d'abord donner l'ion fils abondant  $[Z_1-45]^+$  à  $m/z$  620, puis  $[Z_2-45]^+$  assez faible à  $m/z$  406 (figure 138).

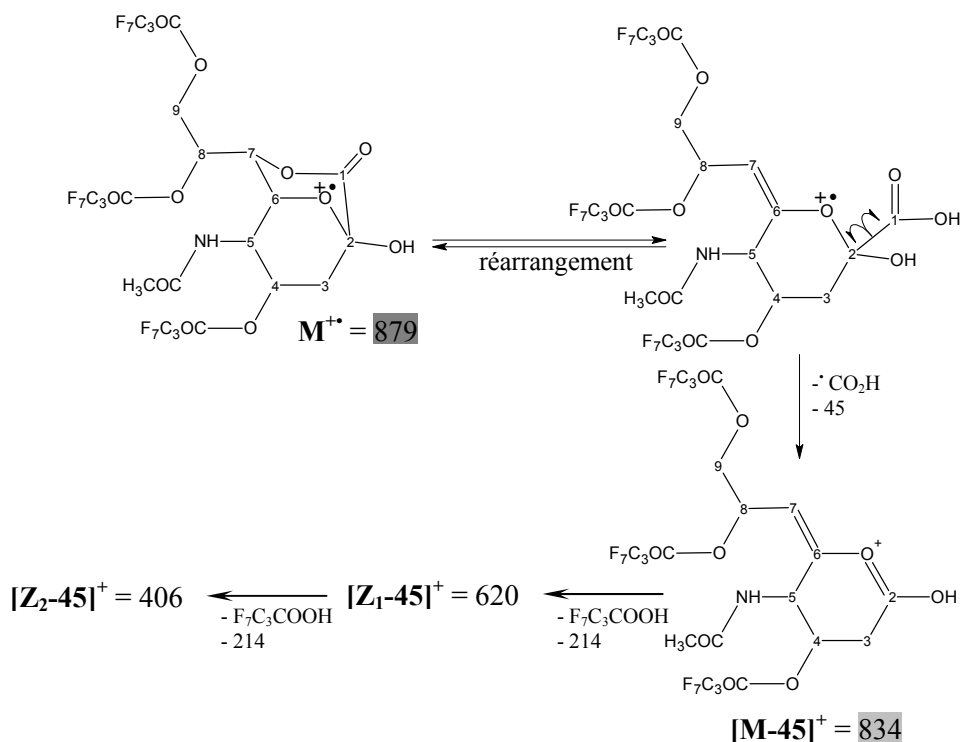
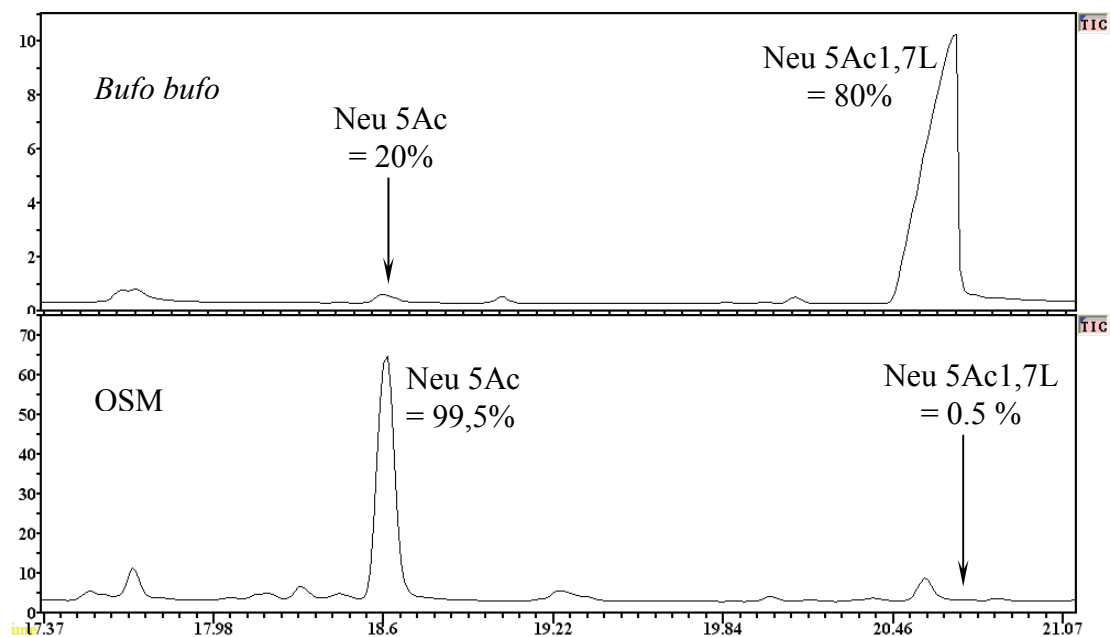


Figure 138: fragmentations par perte d'un radical [COOH]<sup>•</sup>

## 2) Discussion sur l'existence in vivo de ces formes lactones d'acides sialiques

Que ce soit après traitement par méthanolyse ou par hydrolyse douce, l'analyse de standards très purs de dérivés HFB de Neu5Ac ne montre pas l'apparition de cette forme lactone, alors que l'on peut parfois l'observer lors de l'examen d'échantillons d'origine biologique, et cela, dans des proportions très variables mais reproductibles d'un échantillon à l'autre. Or, si l'apparition de la lactone était sous la dépendance du traitement acide, nous retrouverions systématiquement un rapport identique entre les quantités des dérivés HFB de Neu5Ac et de Neu5Ac-1,7Lac. On peut constater que ce n'est pas le cas sur les chromatogrammes comparés des acides sialiques isolés des œufs de *Bufo bufo* et de mucine sous-maxillaire ovine (OSM) (figure 139). Notons que ces deux échantillons ont subi exactement le même protocole de préparation. Ce phénomène implique donc, que la formation de la lactone n'est pas due au traitement d'hydrolyse (en condition acide), mais qu'elle doit avoir lieu *in vivo*. Cette lactone ne pouvant se former qu'à partir du Neu5Ac sous l'anomérie β, deux possibilités existent: (1) le Neu5Ac est sous cette anomérie dans le glycanne d'origine; (2) le Neu5Ac n'est pas un vrai Neu5Ac mais provient d'une N-acétyl-hexosamine épimère de la N-acétyl-mannosamine.





**Figure 139: chromatogrammes comparés des acides sialiques isolés des œufs de *Bufo bufo* et de mucine sous-maxillaire ovine (OSM)**

## **D. Problèmes engendrés par la limite de détection de masse.**

### **1) Difficultés d'analyser des spectres de masse tronqués.**

A l'époque de cette publication, nous ne possédions qu'un appareil de GC-MS limité en masse à 1000 u. Or, les dérivés HFB de méthyl-ester d'acides sialiques ayant pour la plus part une masse supérieure, nous n'avions pas à notre disposition les ions moléculaires ou les ions de fragmentations primaires. Il était donc très difficile de déterminer un schéma de fragmentation pour ces composés et il nous a fallu nous contenter des ions de masses inférieures. Nous venions tout juste de reconditionner un vieil appareil Nermag 10-10H limité en masse à 2000 u pour lequel nous avons quelques problèmes de mise au point. Il ne nous a donc pas été possible d'obtenir des résultats probants avec cet appareil au moment de la publication. Afin de contourner ce problème, nous sommes partis de l'hypothèse qui nous semblait la plus plausible quant à la structure des dérivés obtenus après hydrolyse, méthyl-estérification et acylation. Comme on peut le constater dans la publication, nous pensions que nos dérivés présentaient un hydroxyle libre sur le carbone 2, que la fonction acide était méthyl-estérifiée et que le groupement présent sur la fonction amine restait sous sa forme native. Ceci donne une structure d'une masse de 1107 u pour le Neu5Ac, que l'on appellera structure "de type 1" dans la suite de la discussion (figure 140).

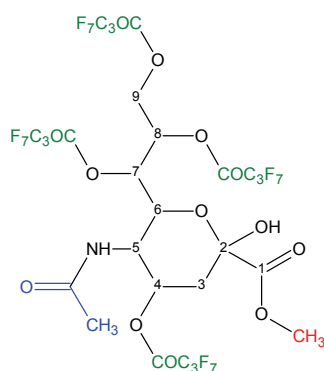


Figure 140: structure présumée du dérivé HFB du Neu5Ac dans la publication: structure "de type 1".

Depuis la publication, nous avons pu analyser certains acides sialiques avec l'appareil Nermag. Cependant, sa faible sensibilité ne nous a permis d'obtenir des spectres en EI et CI que pour des acides sialiques abondants, c'est-à-dire pour ceux que nous avons déterminés comme étant les Neu5Ac, Neu5Ac-1,7Lac et Neu5Ac8Me. Nous n'avons pas encore obtenu de spectre pour le Neu5Gc et le KDN. Ainsi, pour le Neu5Ac, les spectres CI et EI sont les suivants (figure 141a et b):

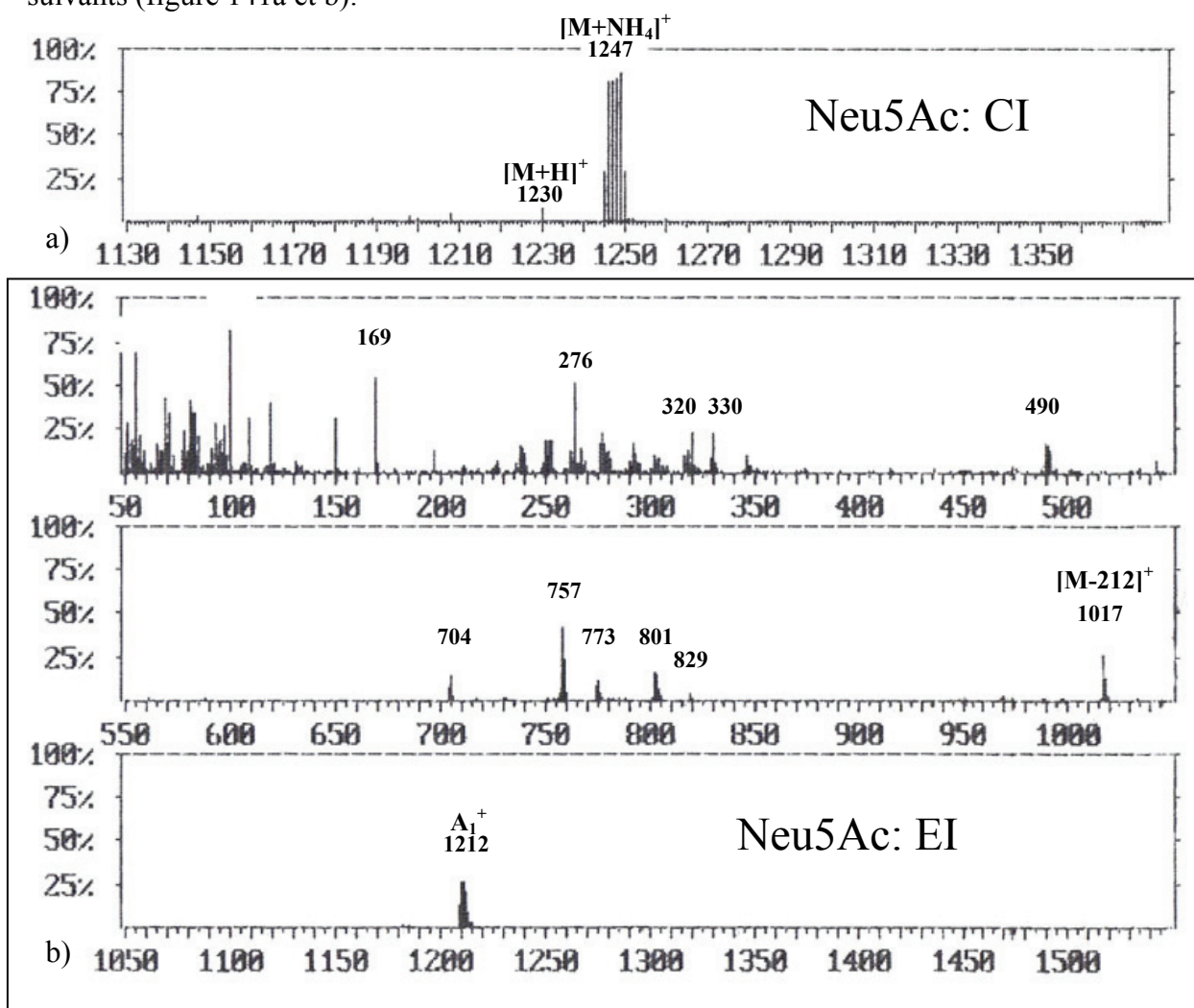
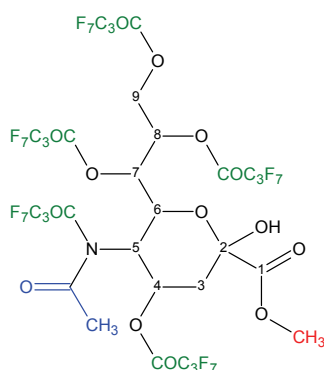


Figure 141: spectres de masse du dérivé HFB du Neu 5Ac obtenu avec l'appareil limité en masse à 2000 u: a) spectre CI; b) spectre EI.

Le spectre de masse CI montre deux ions à  $m/z$  1230 et 1247 qui correspondent classiquement aux ions  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$ . En conséquence, la masse du dérivé devrait être de  $M = 1229$  u. Le spectre de masse EI présente comme premiers ions visibles, un amas aux masses 1210, 1211 et 1212 u. Si l'on se réfère à la masse de 1229 u, ces ions sont  $[M-F]^+$ ,  $[M-H_2O]^+$  et  $[A_1]^+$  (qui correspond à la perte de l'hydroxyle du carbone 2). En effet, nous avons déjà démontré que les dérivés HFB présentent souvent ce type d'ions primaires en impact électronique, ainsi, il est très probable que le dérivé du Neu5Ac ait une masse de 1229 u. Cette masse est supérieure de 122 u à celle que nous avons imaginé pour ce dérivé (1107 u). Il est donc possible que nous nous soyons trompés, lors de la publication, sur les transformations qu'engendre la dérivation de notre protocole.

## **2) Possibilité d'une forme lactame uniquement pour les dérivés de la famille du Neu5Ac**

Une possibilité, pour expliquer cette différence de masse, serait qu'un groupement heptafluorobutyrate supplémentaire se trouve sur nos dérivés. Or, le fait que l'on obtienne les ions  $[M-H_2O]^+$  et  $[A_1]^+$  tend à démontrer que l'hydroxyle du carbone 2 est sous sa forme libre. Il est donc préférable d'imaginer une substitution de la fonction amine secondaire, donnant le dérivé suivant pour le Neu5Ac, que l'on nommera dorénavant structure "de type 2" (figure 142):

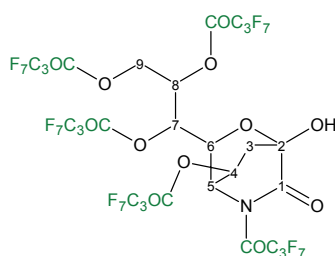


**Figure 142: structure envisageable du dérivé HFB du Neu5Ac pour expliquer une masse plus importante: structure "de type 2".**

Notons que la dérivation d'une amine secondaire acétylée pour donner une amine tertiaire a déjà été observée avec d'autres  $\alpha$  aminoalcools comme les bases sphingolipidiques. Dans ce cas, la dérivation était obtenue par des groupements TMS (Olsson N. U. et coll., 1997) (voir les généralités). La possibilité que l'HFBAA puisse dériver la fonction amine secondaire acétylée est donc tout à fait envisageable, d'autant plus que cet agent acylant est plus puissant que les

agents de triméthyl-silylation. Toutefois, la masse moléculaire de ce dérivé est de 1303 u, soit 74 u au dessus de la masse de 1229 u, déterminée grâce aux spectres de masse CI et EI. Pour expliquer cette différence, nous avons fait plusieurs hypothèses.

La première est que le protocole de dérivation produit bien cette structure d'amine tertiaire (type 2), et qu'il y a une dégradation thermique du composé dans l'injecteur du chromatographe à 260°C. Cette dégradation consisterait en la perte du groupement acétyle de la fonction amine ( $\text{CH}_3\text{CO}^* = 43 \text{ u}$ ) accompagnée par celle du méthanolate du carbone 1 ( $^*\text{OCH}_3 = 31 \text{ u}$ ). Dans ce cas le composé aurait, à son arrivé dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse, la structure de 1,5-lactame suivante, que l'on nommera "de type 3" (figure 143):

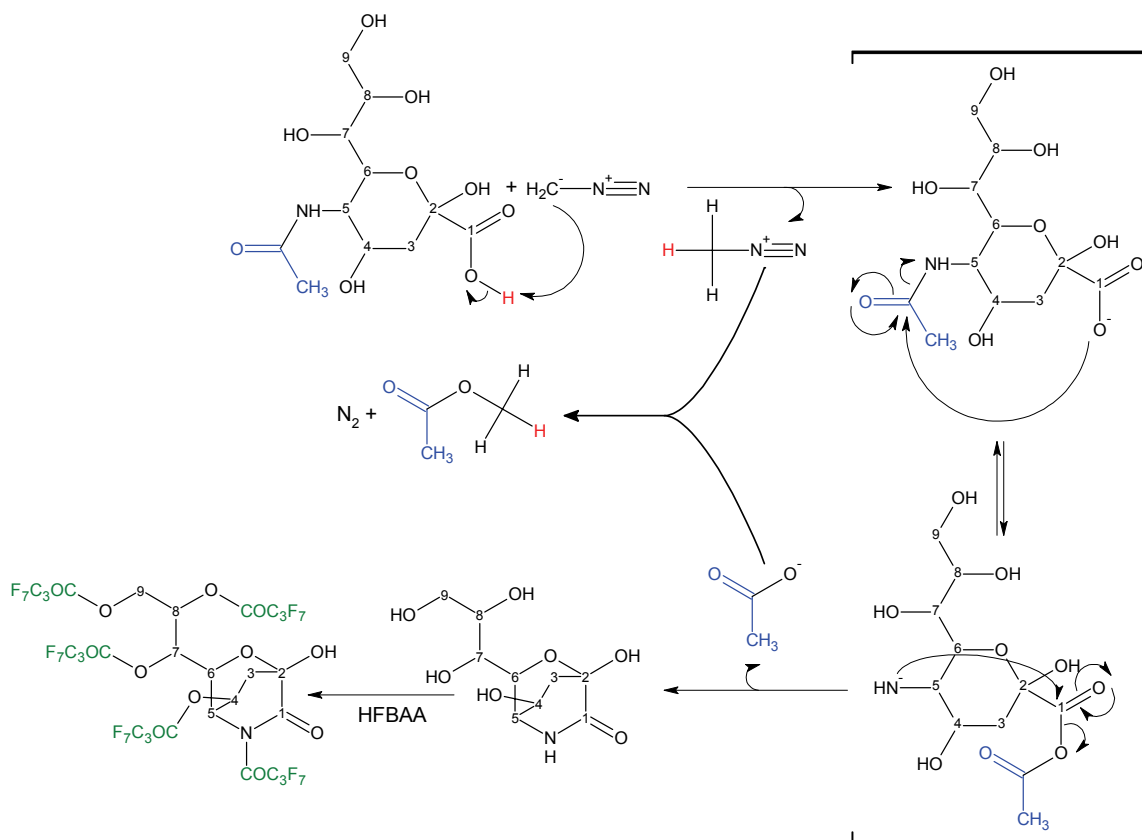


**Figure 143: structure envisageable de lactame du dérivé HFB du Neu5Ac pour expliquer la masse moléculaire de 1229 u: structure "de type 3".**

Notons que cette structure "de type 3" a bien une masse de 1229 u, ce qui correspond parfaitement aux spectres de masse EI et CI présentés ci-dessus. Afin de vérifier cette hypothèse de dégradation de la structure 2 en lactame (structure 3) pendant l'injection, nous avons analysé un standard de Neu5Ac sur l'appareil Nermag en "introduction directe", c'est-à-dire, en plaçant directement l'échantillon au sein de la chambre d'ionisation du spectromètre de masse sans passer par l'appareil de chromatographie de phase gazeuse. Dans ces conditions, le spectre EI obtenu ne montrait pas de différences significatives avec celui présenté ci-dessus en analyse GC-MS. Cela signifierait que la dégradation n'a pas lieu dans le chromatographe. Cependant, le spectre était de mauvaise qualité, car fortement contaminé par d'autres composés, et ne nous permettait pas d'affirmer que l'hypothèse de la dégradation dans l'injecteur n'est pas valable. D'autant plus que le protocole d'introduction directe nécessite de chauffer fortement l'échantillon déposé sur une électrode pour le volatiliser. Ainsi cette hypothèse de dégradation thermique de la structure 2 en lactame dans l'injecteur reste envisageable et doit encore être étudiée.

Une autre hypothèse correspond au fait que la formation de la lactame puisse avoir lieu avant l'injection, et donc, pendant le traitement des échantillons. Une des étapes du traitement des échantillons est la phase de méthyl-estérification. A ce sujet, au début de ce chapitre, nous avons illustré cette réaction par un schéma qui est actuellement bien reconnu (figure 131

P.212). Nous ferons remarquer qu'une étape intermédiaire de cette réaction fait apparaître un ion carboxylate. Or, ce type d'ion est un très bon nucléophile, ainsi nous pouvons imaginer la réaction parasite suivante (figure 144):



**Figure 144: Possibilité de formation de la lactame durant la méthylation au diazométhane**

Toutefois, une telle réaction ne nous semble pas pouvoir montrer un rendement de 100%, car le diazométhane est un agent méthyl-estérifiant extrêmement puissant dont le groupement diazote est un très bon groupe partant. Il est donc peu concevable que cette réaction parasite puisse complètement remplacer la réaction classique de méthylation. Aussi, dans le cas où la réaction parasite aurait lieu, on obtiendrait plutôt un mélange des structures "de type 2" à 1303 u et "de type 3" (lactame) à 1229 u. Cela n'est pas le cas, puisque chaque acide sialique (sauf les KDN) ne donne qu'un seul pic chromatographique. En outre, cette réaction parasite fournit de l'acétate de méthyle comme produit secondaire. Ainsi, sa présence sur les chromatogrammes pourrait être une preuve de la réaction. Malheureusement ce composé est bien trop volatil pour être observable dans nos conditions analytiques. Rappelons également que l'utilisation du diazométhane comme agent méthyl-estérifiant a été très souvent rapporté dans des publications sur l'analyse des acides sialiques, notamment pour des dérivés triméthyl-silylés (Kamerling J. P. et coll., 1974, 1975a; Schauer R. et coll., 1976). Or, aucune

de ces publications n'a fait allusion à la formation de lactames. Dans tous les cas, cette étape de méthyl-estérification semble être absolument nécessaire à la formation d'une lactame. En effet, si on analyse un échantillon riche en acides sialiques variables (comme la BSM) en omettant la phase de méthyl-estérification par le diazométhane, le chromatogramme que l'on obtient ne présente que les pics correspondants aux acides sialiques de forme lactone et aucun correspondant aux acides sialiques des familles de Neu5Ac, Neu5Gc, Neu, KDN et KDO. Cela n'est pas étonnant puisque pour un acide sialique contenant une fonction acide libre, cette dernière n'étant pas bloquée, elle peut interagir avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Ainsi, le dérivé HFB d'acide sialique non méthyl-estérifié n'est pas élué de la colonne. Ce résultat peut sembler étonnant pour le Neu5Ac, car si son dérivé montre, comme nous l'envisageons, une forme lactame, il n'a pas besoin de méthyl-estérification, puisque dans ce cas, la fonction acide est impliquée dans la formation de la lactame avec la fonction amine du carbone 5. Ce phénomène montre donc bien que, dans ce cas particulier, la fonction acide du dérivé HFB du Neu5Ac est libre et ainsi, qu'il n'y a pas de lactamisation possible sans qu'il y ai eu précédemment de méthyl-estérification. Bien que cette constatation ne prouve pas que ce soit cette étape de méthyl-estérification qui soit à l'origine de la lactamisation, elle montre au moins que cette étape est un pré-requis obligatoire à cette formation.

Une autre étape, durant laquelle pourrait se produire la transformation en lactame, est l'étape d'acylation. En effet, cela pourrait tout simplement se produire durant le chauffage à 150°C des échantillons méthyl-estérifiés dans le mélange d'acylation. Ce phénomène pourrait expliquer que lors de l'introduction directe, nous ayons retrouvé un spectre qui semblait identique à celui obtenu dans les conditions analytiques normales en passant par une introduction de l'échantillon dans l'injecteur de l'appareil de chromatographie.

Ainsi, si cette forme lactame existe, il est assez difficile de déterminer à quel moment elle se forme. Actuellement, il nous semble préférable de favoriser l'hypothèse d'une lactamisation sous la dépendance de réactions thermiques des dérivés, soit pendant la phase d'acylation à 150°C, soit durant l'injection dans l'appareil de chromatographie à 260°C, sans toutefois pouvoir exclure l'hypothèse de la phase de méthyl-estérification. En tout état de cause, il semble possible que le dérivé HFB du Neu5Ac détecté par le spectromètre de masse soit sous cette forme 1,5-lactame. D'autant plus que cette structure donne un schéma de fragmentation permettant d'attribuer la totalité des ions visibles dans le spectre de masse (figure 145).

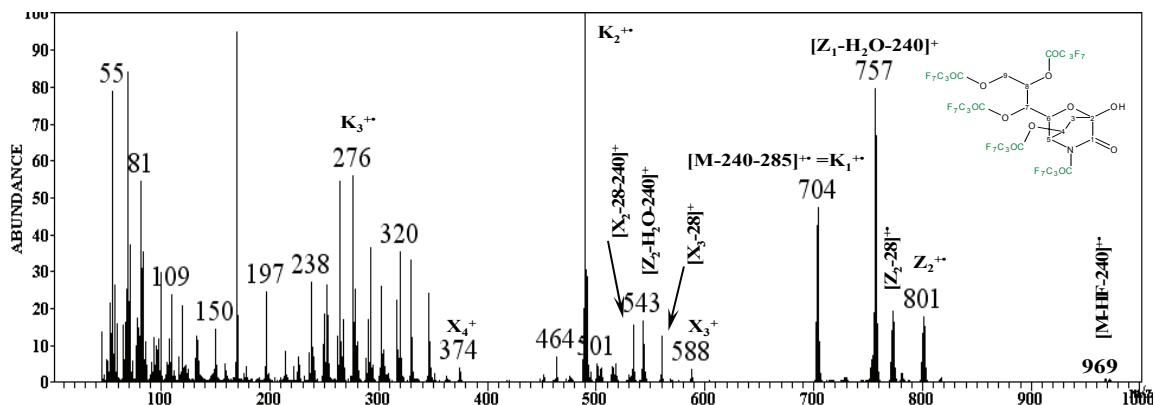


Figure 145: spectre de masse EI du dérivé du Neu5Ac sous la forme 1,5-lactame supposée et attribution des ions aux masses détectées.

Nous avons aussi envisagé la formation d'une lactame pour d'autres acides sialiques que le Neu5Ac. Il s'est avéré que cela est tout à fait compatible avec les spectres de masse (limités à 1000 u) de tous les autres acides sialiques de la famille des Neu5Ac. Cette forme n'est toutefois pas valable pour les acides sialiques de la famille 5-N-glycolyl. En effet, si cette famille de composés subissait la lactamisation, elle donnerait exactement les mêmes dérivés que ses équivalents 5-N-acétyl. Or nous rappellerons que le standard de Neu5Gc ne donne pas du tout le même spectre que celui du Neu5Ac (Figure 3 de la publication). Ce spectre correspondant d'ailleurs bien mieux au schéma de fragmentation de la forme normale qu'à celui de la forme lactame. A ce sujet, nous avons annoncé dans la publication une masse de 1319 u pour ce dérivé, cela correspondait à une structure n'ayant pas de dérivation de la fonction amine secondaire (structure "de type 1"). Cependant, le spectre de masse semble mieux correspondre à une structure ayant une dérivation supplémentaire de la fonction amine (structure "de type 2") (figure 146).

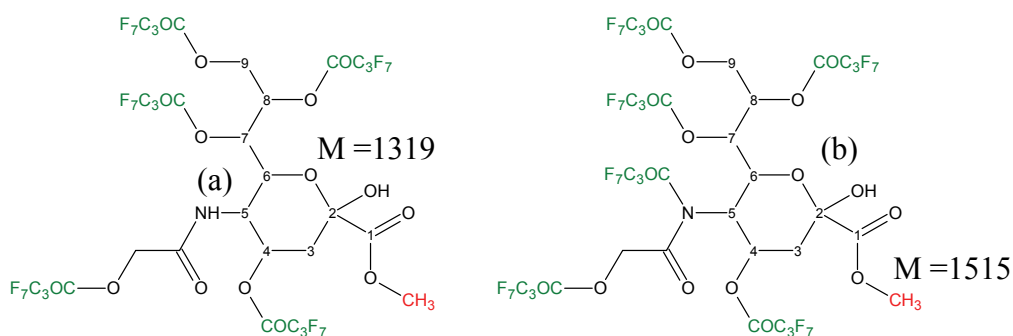


Figure 146: les deux structures envisageables pour le dérivé HFB du Neu 5Gc: a) structure de type 1; b) structure de type 2

Ainsi, pour une structure "de type 2", les ions présents dans le spectre correspondraient à ceci (figure 147):

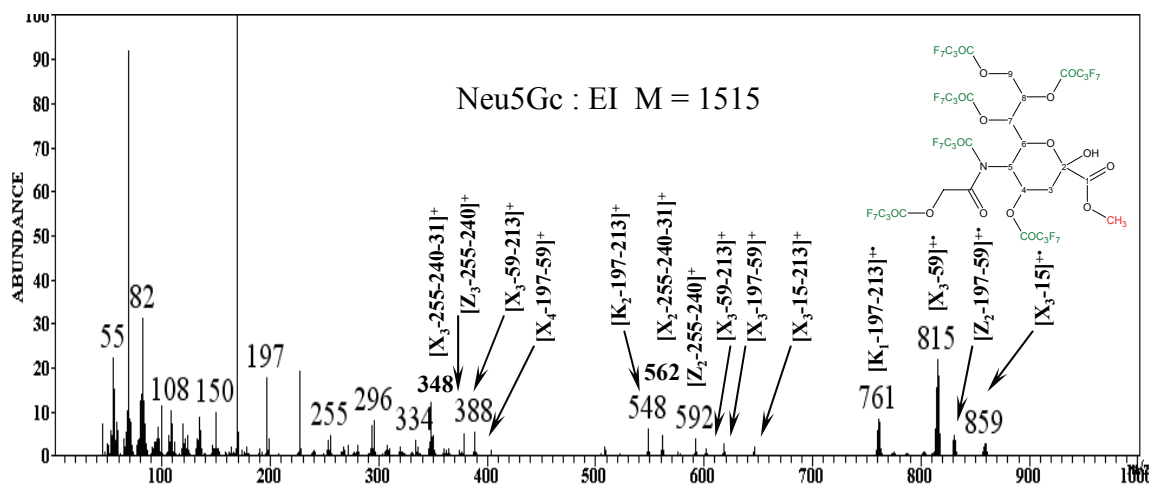


Figure 147: spectre de masse EI du dérivé HFB du Neu5Gc et attribution des ions dans le cas d'une structure "de type 2"

Nous sommes donc maintenant persuadés que les acides sialiques de la famille du Neu5Gc ne présentent pas de forme lactame. Cela pourrait s'expliquer par le fait d'une plus grande stabilité thermique du groupement glycolyle par rapport au groupement acétyle. Cependant nous ne pouvons pas encore statuer avec certitude sur l'une ou l'autre des formes de dérivés (structures de type 1 ou 2), bien que nous penchons plus pour la possibilité d'une dérivation supplémentaire de la fonction amine (structure 2), ce qui reste à déterminer.

Enfin, il est évident que cette forme lactame n'est pas applicable aux acides sialiques des familles du KDN (n'ayant pas de fonction amine), du KDO (idem), et aux formes lactones (le carbone 1 étant déjà pris dans la lactone). Ainsi, seule la famille du Neu5Ac est susceptible de subir cette transformation en 1,5-lactame. Dans ce cas, il est maintenant certain que la formation de la lactame nécessite quelques conditions:

- La fonction amine doit absolument être acylée par un groupement HFB pour donner une amine tertiaire. Cette acylation pouvant aussi se produire si la fonction amine est déjà acylée (famille des Neu5Ac et Neu5Gc), ceci explique que nous préférons les structures de type 2 à celles de type 1 pour la famille Neu5Gc.

- Il faut aussi, que la fonction acide soit méthyl-estérifiée.

Il est donc envisageable que quelque soit le type d'acide sialique, le protocole de dérivation produise des dérivés de la forme 2, et que cette structure soit ensuite dégradée pour former une lactame (structure 3), mais cela, uniquement pour les acides sialiques de la famille du Neu5Ac.



## VI. Conclusion

Nous avons vu que les masses et donc les structures des dérivés HFB de méthyl-esters d'acides sialiques indiqués dans la publication pourraient n'être pas forcément exactes pour certains d'entre eux. En effet, selon certaines constatations plus récentes, seuls les dérivés des familles des KDN, KDO et des formes lactones sont sans ambiguïtés. En ce qui concerne les autres, il est possible que les dérivés de la famille du Neu5Gc contiennent une dérivation supplémentaire sur la fonction amine (structure "de type 2"), ce qui impliquerait que ces dérivés aient une masse supérieure de 196 u à ce que nous pensions. En outre, il semble possible que les acides sialiques de la famille du Neu5Ac se trouvent, soit sous la forme d'une lactame (structure "de type 3"), soit sous la forme "de type 2". Ainsi, malgré leurs lacunes, ces travaux ont clairement démontré que, même lorsque l'on s'intéresse à des mélanges complexes, les dérivés HFB des méthyl-esters d'acides sialiques libérés par hydrolyse douce sont parfaitement adaptés à l'identification et au dosage des acides sialiques par GC-MS.

Nous avons pu déterminer des ions caractéristiques de chaque famille d'acides sialiques. Par exemple: les spectres des acides sialiques comportant un groupement 5-N-glycolyl montrent un ion à  $m/z$  227, un groupement 9-O-lactyle est déterminé par un ion intense à  $m/z$  112, alors qu'un groupement acétyle donne un ion à  $m/z$  73, un ion à  $m/z$  122 est caractéristique de la présence d'un groupement sulfate sur le carbone 8, et Enfin, l'ion à  $m/z$  862 est caractéristique des Neu5Ac mono-O-acétylés. On comprend bien que quelque soit la structure exacte des dérivés finalement analysés en spectrométrie de masse, ces règles restent valables. En effet, bien qu'il soit possible que nous nous soyons trompé dans la détermination des structures de certains dérivés HFB de méthyl-ester d'acides sialiques, ces erreurs ne remettent pas en cause l'attribution des spectres aux molécules de départ (non dérivées).

En outre, pour la plupart des acides sialiques, l'anomérie étant à 96% sous la forme  $\beta$  après hydrolyse, chacun d'entre eux ne donne qu'un seul pic majeur, sauf pour la famille des KDN qui en donne deux par composé.

Chaque dérivé est également parfaitement séparé de ses voisins ce qui donne des chromatogrammes peu chargés et assez faciles à analyser. Un résumé des masses probables est indiqué dans le tableau 5.

| Acide sialique | Natif | Après méthanolyse-HFB | Après hydrolyse douce-HFB              |                             |                      |
|----------------|-------|-----------------------|--|-----------------------------|----------------------|
|                |       |                       | Forme normale                          |                             | 1,5 lactame "type 3" |
|                |       |                       | envisagée dans la publication "type 1" | HFB supplémentaire "type 2" |                      |
| Neu            | 267   | 1275                  | 1261                                   | 1457                        | ---                  |
| Neu5Ac         | 309   | 1275                  | 1107                                   | 1303                        | 1229                 |
| Neu5Ac-1,7L    | 291   | 1047                  | 879                                    | ---                         | ---                  |
| NeuAc2         | 351   | 1275                  | 953                                    | 1149                        | 1075                 |
| NeuAc3         | 393   | 1275                  | 799                                    | 995                         | 921                  |
| NeuAc4         | 435   | 1275                  | 645                                    | 841                         | 767                  |
| NeuAc5         | 477   | 1275                  | 491                                    | 687                         | 613                  |
| NeuAc2-1,7L    | 333   | 1047                  | 725                                    | ---                         | ---                  |
| Neu5Ac8Me      | 323   | 1093                  | 925                                    | 1121                        | 1047                 |
| Neu5Ac9P       | 389   | 1159                  | 991                                    | 1187                        | 1113                 |
| Neu5Ac9Lt      | 381   | 1275                  | 1179                                   | 1375                        | 1301                 |
| Neu5Ac8S       | 389   | 1275                  | 991                                    | 1187                        | 1113                 |
| NeuAc2-8Me     | 365   | 1093                  | 771                                    | 967                         | 893                  |
| NeuAc3-1,7L    | 375   | 1047                  | 571                                    | ---                         | ---                  |
| NeuAc2-9Lt     | 423   | 1275                  | 1025                                   | 1221                        | 1147                 |
| NeuAc2-8S      | 431   | 1275                  | 837                                    | 1033                        | 959                  |
| Neu5Gc         | 325   | 1275                  | 1319                                   | 1515                        | ---                  |
| Neu5Gc-1,7L    | 307   | 1047                  | 1091                                   | ---                         | ---                  |
| Neu5Gc,Ac1     | 367   | 1275                  | 1165                                   | 1361                        | ---                  |
| Neu5Gc,Ac2     | 409   | 1275                  | 1011                                   | 1207                        | ---                  |
| Neu5Gc9Lt      | 397   | 1275                  | 1391                                   | 1587                        | ---                  |
| KDN            | 310   | 1276                  | 1262                                   | ---                         | ---                  |
| KDNAc1         | 352   | 1276                  | 1108                                   | ---                         | ---                  |
| KDNAc2         | 394   | 1276                  | 954                                    | ---                         | ---                  |
| KDO            | 238   | 1050                  | 1036                                   | ---                         | ---                  |

**Tableau 5: masses des différentes formes envisageables de dérivés HFB des méthyl-esters d'acides sialiques**

## **VII. Perspectives**

### **A. Expérimentations envisageables pour confirmer la véracité des formes lactames et lactones.**

#### **1) Estérifications différentes de la méthyl-estérification**

Les hypothèses de l'existence d'une forme lactone et de la transformation en lactame des acides sialiques 5-N-acétylés devant encore être confirmées, nous avons commandé du diazald® (nom commercial du composé permettant de synthétiser le diazométhane) deutéré. Cela nous aurait permis de marquer tous les dérivés subissant une méthyl-estérification. Dans ces conditions, les spectres de masse des composés méthyl-estérifiés devraient montrer une augmentation de 2 u pour l'ensemble des ions contenant la fonction méthyl-ester deutérée. Ainsi, nous pensions obtenir ce marquage uniquement pour les acides sialiques des familles des Neu5Gc, KDN et KDO, mais peut-être pas pour celles du Neu5Ac et de forme lactone,

puisque ces deux familles pourraient voir leur fonction acide impliquée, soit dans la lactame pour les premiers, soit dans la lactone pour les seconds, ce qui empêcherait la possibilité de méthyl-estérification. Toutefois, nous avons dû récemment abandonner cette idée d'expérimentation car le fournisseur de ce produit deutéré nous a signifié que le réactif n'était plus en vente. Nous sommes donc actuellement à la recherche de ce réactif qui demeure introuvable. Dans le même état d'esprit et pour contourner ce problème, il devrait être possible d'utiliser un autre diazoalcane afin d'estérifier les acides sialiques par un autre groupement que le méthyle. Le diazoéthane devrait donner des dérivés dont les propriétés seraient peu différentes de celles des méthyl-esters. La masse des produits dérivés serait alors augmentée de 14 u, ce qui ne devrait pas trop diminuer leur volatilité et donc peu changer leurs propriétés chromatographiques. En outre les produits susceptibles de fournir du diazoéthane sont certainement beaucoup moins coûteux que des produits deutérés. Ainsi, après éthyl-estérification, si les spectres de masse que nous avons identifiés comme étant ceux correspondant aux acides sialiques de la famille du Neu5Ac et ceux qui conviennent aux formes lactones ne montrent aucun changement par rapport à ceux des composés méthyl-estérifiés, cela prouverait que les Neu5Ac donnent des dérivés sous forme lactame et que les formes lactones existent. En tout état de cause, ces deux techniques (deutération ou éthyl-estérification) devraient nous donner, non seulement des informations sur le fait de la présence ou non d'une lactame ou lactone à la place d'une fonction acide libre, mais en plus, nous fournir des informations très importantes sur les mécanismes de fragmentation des dérivés HFB.

## **2) Utilisation de groupements acyles plus légers que les HFB**

Un autre angle d'attaque de ce problème peut être envisagé. Nous pourrions reprendre notre protocole en remplaçant les groupements HFB par des équivalents plus légers comme les pentafluoropropionates (PFP) ou trifluoroacétates (TFA). C'est une solution qui permet de s'affranchir du problème de limitation de masse à 1000 u, et ainsi, d'obtenir des spectres de masses comportant la totalité des ions, notamment les ions moléculaires ou primaires qui nous manquent actuellement. Si l'on reprend les hypothèses décrites précédemment, cela devrait donner des dérivés ayant les masses présentées dans le tableau 6.

Nous pensons que le fait de remplacer les groupements HFB par d'autres groupements acyles du même type, ne change pas les différents mécanismes qui régissent la fragmentation des dérivés. Ainsi, il est possible d'analyser le schéma de fragmentation de chaque dérivé (PFP ou

TFA) en partant d'informations plus sûres, comme les masses moléculaires et les fragments primaires. Il suffit ensuite d'appliquer ces règles de fragmentation aux dérivés HFB et de déterminer si ces règles confirment les structures supposées. En outre, la comparaison des spectres des dérivés HFB avec ceux des PFP et TFA devrait donner de précieux renseignements sur la structure des différents ions fragments, cela permettrait d'affiner nos schémas de fragmentation en les rendant moins hypothétiques.

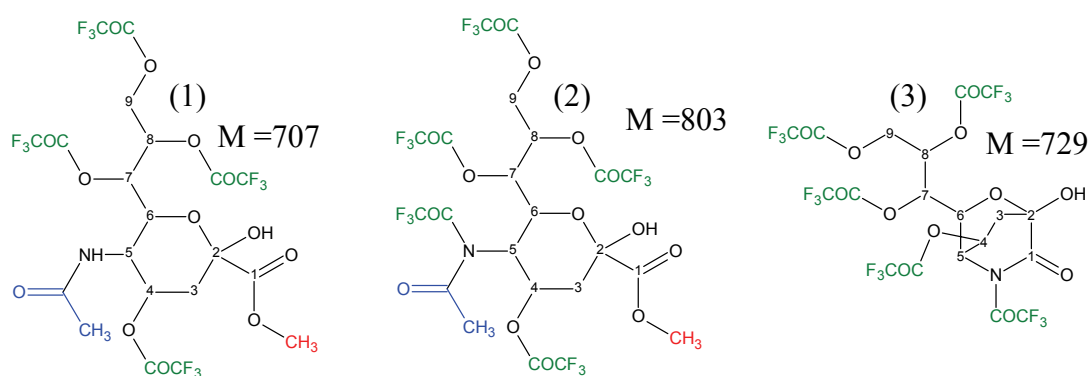
| Acide sialique | HFB                           |                            |            | PFP          | TFA         |
|----------------|-------------------------------|----------------------------|------------|--------------|-------------|
|                | Forme normale                 |                            | 1,5lactame |              |             |
|                | Envisagée dans la publication | Avec un HFB supplémentaire |            |              |             |
| Neu            | 1261                          | 1457                       | ---        | 1011 ou 1157 | 761 ou 857  |
| Neu5Ac         | 1107                          | 1303                       | 1229       | 979          | 729         |
| Neu5Ac-1,7L    | 879                           | ---                        | ---        | 729          | 579         |
| NeuAc2         | 953                           | 1149                       | 1075       | 875          | 675         |
| NeuAc3         | 799                           | 995                        | 921        | 771          | 621         |
| NeuAc4         | 645                           | 841                        | 767        | 667          | 567         |
| NeuAc5         | 491                           | 687                        | 613        | 563          | 513         |
| NeuAc2-1,7L    | 725                           | ---                        | ---        | 625          | 525         |
| Neu5Ac8Me      | 925                           | 1121                       | 1047       | 847          | 647         |
| Neu5Ac9P       | 991                           | 1187                       | 1113       | 913          | 713         |
| Neu5Ac9Lt      | 1179                          | 1375                       | 1301       | 1051         | 801         |
| Neu5Ac8S       | 991                           | 1187                       | 1113       | 913          | 713         |
| NeuAc2-8Me     | 771                           | 967                        | 893        | 743          | 593         |
| NeuAc3-1,7L    | 571                           | ---                        | ---        | 521          | 471         |
| NeuAc2-9Lt     | 1025                          | 1221                       | 1147       | 947          | 747         |
| NeuAc2-8S      | 837                           | 1033                       | 959        | 809          | 659         |
| Neu5Gc         | 1319                          | 1515                       | ---        | 1215         | 819 ou 915  |
| Neu5Gc-1,7L    | 1091                          | ---                        | ---        | 891          | 691         |
| Neu5Gc,Ac1     | 1165                          | 1361                       | ---        | 965 ou 1111  | 765 ou 861  |
| Neu5Gc,Ac2     | 1011                          | 1207                       | ---        | 861 ou 1007  | 711 ou 807  |
| Neu5Gc9Lt      | 1391                          | 1587                       | ---        | 1191 ou 1337 | 991 ou 1087 |
| KDN            | 1262                          | ---                        | ---        | 1012         | 762         |
| KDNAc1         | 1108                          | ---                        | ---        | 908          | 708         |
| KDNAc2         | 954                           | ---                        | ---        | 804          | 654         |
| KDO            | 1036                          | ---                        | ---        | 836          | 636         |

**Tableau 6: masses possibles des dérivés méthyl-esters d'acides sialiques acylés par des groupements HFB, PFP, ou TFA.**

Nous venons de conduire une première expérimentation dans ce sens. Un standard de Neu5Ac a subi une hydrolyse douce, une méthyl-estérification, et une acylation, soit à l'anhydride trifluoroacétique, soit à l'anhydride pentafluoropropionique. Cela a donné les résultats qui suivent.

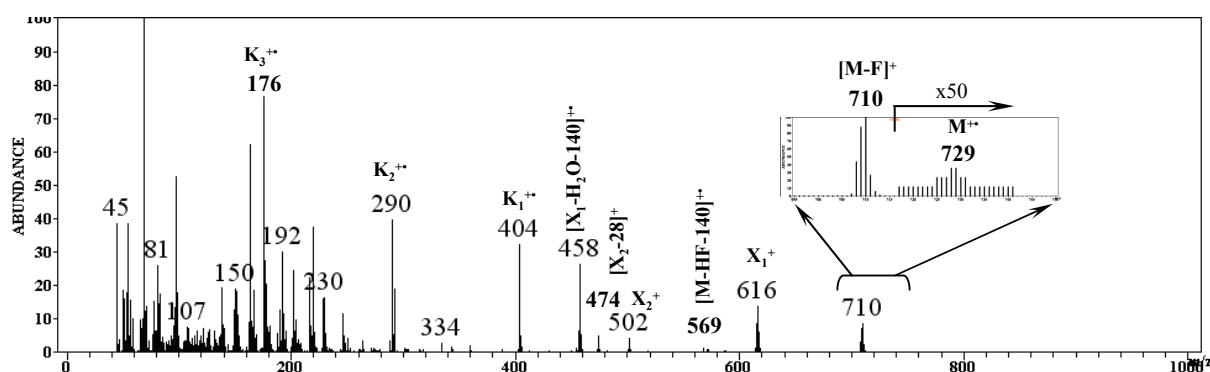
#### **a) Dérivation du méthyl-ester de Neu5Ac par des groupements TFA**

Si l'on se réfère aux explications données dans ce chapitre, il y a trois structures envisageables pour le dérivé TFA du méthyl-ester de Neu5Ac. Si la structure est comparable à celle décrite dans la publication, il n'y a pas d'acylation supplémentaire de la fonction amine qui reste acétylée et la fonction acide est méthyl-estérifiée. Cela donne la structure "de type 1" d'une masse de 707 u. Il est aussi possible, comme nous le supposons maintenant que la fonction amine soit acylée en plus d'être acétylée. Cela donne la structure "de type 2" de masse m/z 803. Enfin, Si ce composé perd le groupement acétyle de la fonction amine ( $\text{CH}_3\text{CO} = 43$  u) et le méthanolate du carbone 1 ( $\text{OCH}_3 = 31$  u), le dérivé a une structure de 1,5-lactame d'une masse de 729 u (structure "de type 3") (figure 148).



**Figure 148: les trois structures envisageables du dérivé TFA du Neu5Ac;**  
 (1) structure "de type 1"; (2) structure "de type 2"; (3) structure "de type 3"

Un standard de Neu5Ac a donc subi une hydrolyse douce, une méthyl-estérification au diazométhane et une acylation à l'anhydride trifluoroacétique selon un protocole absolument identique à celui que nous utilisons habituellement pour les dérivés HFB. Nous avons obtenu un chromatogramme dont le pic majoritaire montre le spectre de masse que voici (figure 149):



**Figure 149: spectre EI du dérivé TFA du Neu5Ac et attribution des ions aux différentes masses**

Le spectre montre clairement un premier amas ionique à m/z 709, 710 et 711. Toutefois, lorsque l'on amplifie la zone du spectre se trouvant au dessus de cet amas, on observe un ion

très faiblement abondant à  $m/z$  729 (voir l'encart figure 149 p. 230). Cette masse correspond exactement à celle de la forme 1,5-lactame (structure "de type 3") ce qui tend à confirmer l'hypothèse que tous les dérivés acylés des acides sialiques de la famille de Neu5Ac se retrouvent sous cette forme lors de leur analyse en GC-MS. A cette condition, le premier amas bien visible sur le spectre correspond aux ions  $[M-HF]^+$ ,  $[M-F]^+$  et  $[M-H_2O]^+$ . Ces ions sont les mêmes que ceux du premier amas ionique visible sur le spectre du dérivé HFB du même composé. Il en est de même pour tous les ions fragments observables sur ce spectre, car ils proviennent de mécanismes de fragmentations identiques à ceux du dérivé HFB sauf qu'ici un groupement trifluoroacétate d'une masse de 113 u remplace un groupement HFB de 213 u (voir la figure 145 p. 224).

### b) Dérivation du méthyl-ester de Neu5Ac par des groupements PFP

Quand le même standard de Neu5Ac est dérivé par l'utilisation d'anhydride pentafluoropropionique, le dérivé PFP du méthyl-ester de Neu5Ac donne le spectre suivant (figure 150):

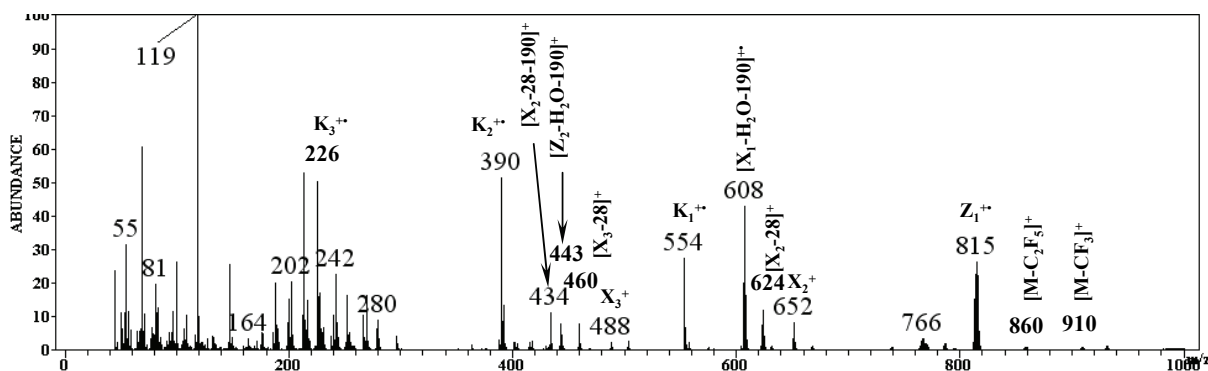


Figure 150: spectre EI du dérivé PFP du Neu5Ac et attribution des ions aux différentes masses

Encore une fois, le spectre de masse du dérivé présente des ions qui proviennent exactement des mêmes processus de fragmentation que pour les dérivés HFB (voir la figure 145 p. 224) et TFA (ci-dessus) mais avec des groupements pentafluoropropionates à  $m/z$  163. Ce spectre semble donc correspondre au dérivé PFP de la forme 1,5-lactame du Neu5Ac présentant une masse de 979 u. Ici, l'amas d'ions  $[M-HF]^+$ ,  $[M-F]^+$  et  $[M-H_2O]^+$  normalement à  $m/z$  959, 960 et 961 u n'est pas visible, car peut-être trop près de la limite de masse de l'appareil. Par contre, tous les autres amas sont formés d'ions identiques à ceux des autres dérivés HFB et TFA.

### **3) Expérimentations qui restent à entreprendre.**

Maintenant que nous estimons possible que les acides sialiques de la famille Neu5Ac soient analysés sous la forme d'une lactame, il nous reste à déterminer à quel moment du protocole analytique ces dérivés peu conventionnels pourraient être formés. Comme nous l'avons déjà expliqué, nous présumons qu'après hydrolyse, méthyl-estérification et acylation (à 150°C), ces dérivés pourraient se trouver sous la forme "de type 2" (non lactame) et que ce n'est que pendant l'injection (injecteur à 260°C) que cette forme donnerait une lactame par perte du groupement acétyle de la fonction amine ( $\text{CH}_3\text{CO} = 43$  u) et du méthanolate du carbone 1 ( $\text{OCH}_3 = 31$  u). Afin de démontrer cette hypothèse, nous comptons analyser en RMN et ESI-MS (appareils dont les analyses ne nécessitent pas de chauffage important) des standards de Neu5Ac auxquels nous ferons subir le protocole normal d'hydrolyse, méthyl-estérification et acylation à 150°C, suivi ou non d'un autre chauffage à 260°C. Nous espérons ainsi prouver l'apparition de la forme lactame à des températures supérieures à 150°C. Dans le cas contraire, cela montrerait que la lactamisation, si elle a lieu, se produirait pendant le protocole de dérivation et il nous resterait à déterminer à quel moment (méthyl-estérification ou acylation). Il nous faudra également déterminer si les dérivés des acides sialiques de la famille du Neu5Gc se trouvent sous la forme des composés de structure de type 1 ou 2. Pour cela, l'analyse d'un dérivé TFA d'un standard de Neu5Gc devrait nous permettre d'obtenir des spectres de masse montrant une masse moléculaire de 819 u (type 1) ou 915 u (type 2).

Il faudra aussi reprendre les analyses des composés comportant des groupements supplémentaires à la place des hydroxyles libres, en les acylant à l'anhydride trifluoroacétique ou pentafluoropropionique, afin d'en déterminer les mécanismes de fragmentations. Ainsi, en comparaison avec les résultats des dérivés HFB, il sera possible de confirmer les règles de fragmentations, déjà énoncées, qui donnent des ions permettant de placer à coup sûr les différentes dérivations naturelles des acides sialiques (groupements acétyles, sulfate, méthyle, lactyle, etc.).

### **B. Approfondissement des recherches sur les formes lactones des acides sialiques**

Nous avons soulevé la possibilité de l'existence d'acides sialiques sous forme lactone. Il nous reste à déterminer si cette famille de composés est formée durant le traitement des échantillons, ou comme nous le pensons, si elle existe *in vivo*. Dans ce cas, son existence pose

de nombreuses questions. En effet, ces formes lactones ne peuvent être obtenues qu'à partir d'acides sialiques d'anométrie  $\beta$ . Or cette forme d'acides sialiques n'existe pas dans la nature. Et donc si les formes lactones d'anométrie  $\beta$  sont produites *in vivo* à partir d'acides sialiques d'anométrie  $\alpha$ , ces derniers doivent obligatoirement subir une modification enzymatique de leur anomérie. Cela pourrait ouvrir de nouveaux débouchés sur l'existence de telles enzymes.





# DETERMINATION DE LA COMPOSITION DE LA PARTIE LIPIDIQUE DES GLYCOLIPIDES

## **I. Introduction**

Il est maintenant bien connu que le protocole de libération des monosaccharides que nous utilisons (méthanolyse acide en milieu anhydre), qui permet la rupture des liaisons esters et amides, favorise également la libération des constituants de la partie aglycone (partie non glycanique) des hétérosides (voir les généralités). C'est pourquoi, lors du développement de la technique de formation des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides, il fut confirmé que de nombreux constituants aglycones, sont non seulement libérés par la méthanolyse, mais aussi que ces constituants forment des dérivés HFB en présence d'HFBA. Ainsi, il devenait possible de les caractériser par GC-MS en même temps que les monosaccharides. Cela avait d'ailleurs déjà été évoqué dans une publication qui faisait allusion à la possibilité de déterminer la composition complète des constituants des gangliosides (Zanetta J. P. et coll., 1999a). Afin d'approfondir ces résultats, nous nous sommes appliqués à déterminer quels composés lipidiques pouvaient être analysés en GC-MS. Dans ce but, nous avons conduit des travaux qui ont abouti à deux publications que nous présentons dans ce mémoire (Pons A. et coll., 2000 et 2002). Dans la première, nous avons reporté des analyses de la partie aglycone de glycolipides et avons démontré que les groupements HFB sont tout à fait recommandés pour dériver les fonctions hydroxyles et amines des lipides libérés par la méthanolyse. Puis, la seconde publication, qui s'appuie sur les résultats de la précédente, nous a permis de démontrer l'intérêt de la dérivation aux HFB pour l'analyse qualitative et quantitative des lipides, surtout en ce qui concerne les bases sphingoïdes. Ce travail a été mené sur des extraits lipidiques de la peau humaine, qui était déjà connue pour contenir de nombreuses espèces lipidiques. A ce propos, nous avons décrit une famille de bases sphingoïdes assez méconnue, celle des 6-hydroxy-sphingosines qui avait déjà été étudiée et caractérisée par GC-MS (sous la forme de dérivés TMS) et par RMN (Robson K. J. et coll., 1994; Stewart M. E. et coll., 1995 et 1999). Depuis ces deux publications, nous avons affiné les schémas de fragmentation qui s'y rapportent. Ces données supplémentaires sont donc insérées dans ce chapitre.

## **II. Les publications**

## Single-Step Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Glycolipid Constituents as Heptafluorobutyrate Derivatives with a Special Reference to the Lipid Portion

Alexandre Pons,\* Juliana Popa,† Jacques Portoukalian,† Jacques Bodennec,†  
Dominique Ardail,‡ Ossarath Kol,\* Maria-Jesus Martin-Martin,§ Pablo Hueso,§  
Philippe Timmerman,\* Yves Leroy,\* and Jean-Pierre Zanetta\*<sup>1</sup>

\*Laboratoire de Chimie Biologique USTL, CNRS UMR 8576, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; †Laboratoire de Glycobiologie, Faculté de Médecine, Université Lyon I, BP 12, 69921 Oullins, France; ‡Faculté de Médecine Lyon-Sud, INSERM U189, Lyon, France; and §Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Departamental (Lab.103), Universidad de Salamanca, Avenida Campo Charro s/n, Salamanca, Spain

Received December 21, 1999

In a previous work (Zanetta *et al.* *Glycobiology* 9, 255–266 (1999)), it was reported that all constituents of gangliosides could be obtained as heptafluorobutyrate derivatives after methanolysis in a single gas chromatography analysis. This report demonstrates that gas chromatography coupled with mass spectrometry in the electron impact mode allows identification and quantification of long-chain bases and fatty acids without interference from monosaccharides. On the basis of ions specific for families and for individual compounds, sphingosines, sphinganines, and phytosphingosines (including ramified, unsaturated, hydroxylated, and etherified compounds) can be identified. Fatty acid methyl esters, including linear, ramified, unsaturated, and hydroxylated species, are identified and quantified in the same way. Possible extensions of this method to the fatty moiety of other lipids (alkylacylglycerol and dimethyl acetal) are discussed. © 2000 Academic Press

**Key Words:** gas chromatography; mass spectrometry; ceramide; ganglioside; dimethyl acetal; long-chain base; sphingoid base; alkylacylglycerol; fatty acid; monosaccharide.

In recent years, mass spectrometry (MS)<sup>2</sup> techniques provided important improvements in the field of the determination of glycolipid structures (1–6). Nevertheless, these techniques were not sufficient for resolving the extreme heterogeneity of these compounds: differences in monosaccharide composition, presence or not of *O*-acyl or *O*-alkyl groups on some monosaccharides (7, 8), and differences in chain length, desaturation, hydroxylation, ramification, etc. of the fatty acids, fatty alcohols, fatty aldehydes, and/or long-chain bases. Consequently, the nature and the respective abundance of all monosaccharides, fatty acids, and long-chain bases are needed to reconstitute the whole molecule from the individual constituents.

In a previous paper (9), we reported that a quantitative analysis of glycoprotein and glycolipid monosaccharide constituents could be performed by gas chromatography (GC) after cleavage of the bonds between

<sup>2</sup> Abbreviations used: Fuc, fucose; Gal, galactose; Man, mannose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GalNAc-OH, reduced GalNAc; GlcA, glucuronic acid; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; Kdn, 3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid; FAME, fatty acid methyl ester; LCB, long-chain base; Sphe, sphingene; Spha, sphinganine; Phyt, phytosphingosine; dma, dimethyl acetal; HFB, heptafluorobutyrate; HFBAA, heptafluorobutyric anhydride; TMS, trimethylsilyl; amu, atomic mass unit; EI, electron impact; CI, chemical ionization; GC, gas chromatography; MS, mass spectrometry; SPM, synaptosomal plasma membrane; TIC, total ion counts; AAG, alkylacylglycerol; GPI, glycosylphosphatidylinositol; Cer, ceramide; Rt, retention time; GD<sub>s</sub>, disialoganglioside GD<sub>s</sub>.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: (33) 03 20 43 65 55. E-mail: Jean-Pierre.Zanetta@univ-lille1.fr.

# Gas-chromatography/mass-spectrometry analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases

Alexandre Pons, Philippe Timmerman, Yves Leroy, and Jean-Pierre Zanetta<sup>1</sup>

CNRS Unité Mixte de Recherche 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Laboratoire de Chimie Biologique Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

**Abstract** The composition of the constituents (monosaccharides, long-chain bases, and fatty acids) found in an ethanol extract of the human skin could be determined, without time-consuming steps of purification, after acid-catalyzed anhydrous methanolysis, followed by the formation of volatile derivatives with heptafluorobutyric anhydride and gas-chromatography/mass-spectrometry analysis. Despite the extreme heterogeneity of such extracts, the electron impact analysis of the constituents allowed qualitative and quantitative determinations of monosaccharides, long-chain bases, fatty acids, and alkyl-glycerols. Throughout the different long-chain bases, sphingenines (Sphes), sphinganines, phytosphingosines, and 6-hydroxy-Sphes (6oh-Sphes) can be identified and quantified. Long-chain bases with a chain-length up to 28 carbon atoms can be identified through specific fragmentation patterns in the electron impact mode. Particular attention was drawn to the behavior of compounds of the family of 6oh-Sphes upon acid-catalyzed methanolysis.—Pons, A., P. Timmerman, Y. Leroy, and J.-P. Zanetta. GC/MS analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases. *J. Lipid Res.* 2002. 43: 794–804.

**Supplementary key words** amino acids • monosaccharides • fatty acid • sphingenine • sphinganine • phytosphingosine • 6-hydroxy-sphingenine

In previous papers (1, 2), we demonstrated that the complete analysis of constituents of purified glycolipids could be performed by gas-chromatography/mass-spectrometry (GC/MS) analysis of heptafluorobutyrate derivatives of the different constituents liberated using acid-catalyzed methanolysis. Indeed, during methanolysis, the cleaved monosaccharides are transformed into their *O*-methyl glycosides and *O*-methyl glycosides of their methyl esters, fatty acids as their methyl esters (FAMES), and long-chain bases (LCBs) as free compounds or perfectly identified degradation products. A high temperature acylation of the mixture with heptafluorobutyric anhydride allows the complete blockage of alcohol and amino groups as heptafluorobutyrate derivatives, a step after which all the constituents become volatile and consequently suitable for a subsequent analysis by GC. Based on the poor van

der Waals interactions of heptafluorobutyrate (HFB) derivatives with the classical methyl-siloxane liquid phase of the capillary columns, the derivatives of monosaccharides are fully separated from FAMES and from the derivatives of LCBs, allowing an easy GC and GC/MS identification of the different compounds. The attribution of correct relative molar responses to the different compounds (1, 2 and here for GC/MS) allowed to obtain reproducible molar compositions of glycosphingolipids, without steps of centrifugation, phase partition, etc., the sample remaining in the same test tube during all the steps of cleavage and derivatisation. The GC/MS analysis in the electron impact (EI) mode appeared especially convenient for the analysis of hydroxylated FAMES and of LCBs, since the search of ions for HFB derivatives, then ions specific for each family of compounds, and finally of each compound allowed easy identification even in very complex mixtures.

This suggested that this method could be applied to very crude samples such as membrane preparations or total homogenates. Because human skin was shown to contain a large variety of long-chain bases [sphingenines (Sphes), sphinganines (Sphas), phytosphingosines (Phyts) and 6-hydroxy-Sphes (6oh-Sphes)] (3–5), we decided to test the capability of this method to provide a complete spectrum of its constituents in routine screening conditions. This manuscript reports that this is actually the case in total ethanol extract of human skin, in which most amino acids, monosaccharides, FAMES, and long-chain bases can be identified and quantified. This manuscript also discusses the nature of the different compounds formed during acid-catalyzed anhydrous methanolysis of 6oh-Sphes.

Abbreviations: CI, chemical ionization; EI, electron impact; FAME, fatty acid methyl ester; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetyl-glucosamine; GalNAc, *N*-acetyl-galactosamine; GC, gas chromatography; HFB, heptafluorobutyrate; HFBAA, heptafluorobutyric anhydride; LCB, long-chain base; Man, mannose; MS, mass spectrometry; Phyt, phytosphingosine; Rt, retention time; Spha, sphinganine; Sphe, sphingenine; TIC, total ion counts.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: jean-pierre.zanetta@univ-lille1.fr

### III. Discussions sur les résultats obtenus au cours de ces travaux.

#### A. Effet de la méthanolyse anhydre en milieu acide sur la partie aglycone des glycolipides

Biologiquement, la partie lipidique des glycolipides permet d'encreur ces derniers dans les membranes cellulaires. Ces lipides peuvent être de familles et de structures différentes. Tous contiennent au moins un acide gras, mais ils diffèrent par le fait qu'ils peuvent aussi contenir une base sphingoïde, un alcool gras, un aldéhyde gras, et du glycérol. On définit habituellement les différents lipides suivants:

##### 1) Les céramides

Ils sont parmi les lipides d'encrage de glycannes les plus communs et sont constitués d'une molécule d'acide gras fixée sur une base sphingoïde par une liaison amide. Dans la plupart des cas, le céramide fixe directement une chaîne glycanique par une liaison osidique, cela définit l'abondante famille des sphingoglycolipides. Lors de la méthanolyse, non seulement la partie glycanique est libérée, mais la liaison amide est coupée pour donner un FAME et une base sphingoïde (figure 151).

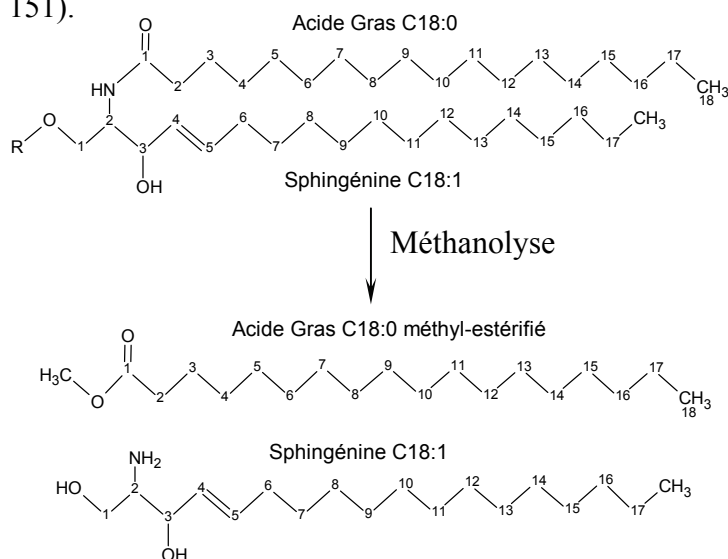
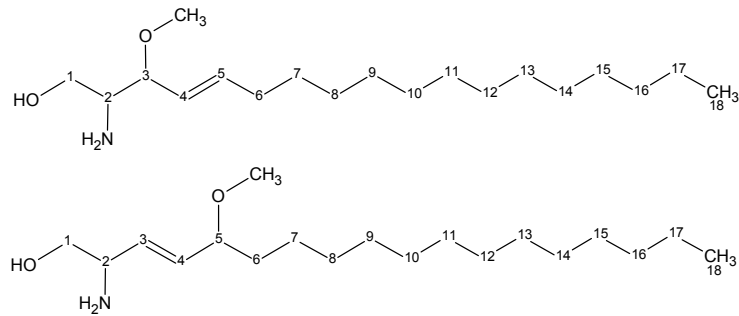


Figure 151: action de la méthanolyse anhydre sur les céramides

Notons, que des travaux décrivent une transformation de certaines bases sphingoïdes (surtout pour les sphingosines = sphingénines) lors de la méthanolyse anhydre, donnant des produits secondaires portant des groupements métoxy en 3 ou en 5 (figure 152), et donc plusieurs pics chromatographiques par composés.



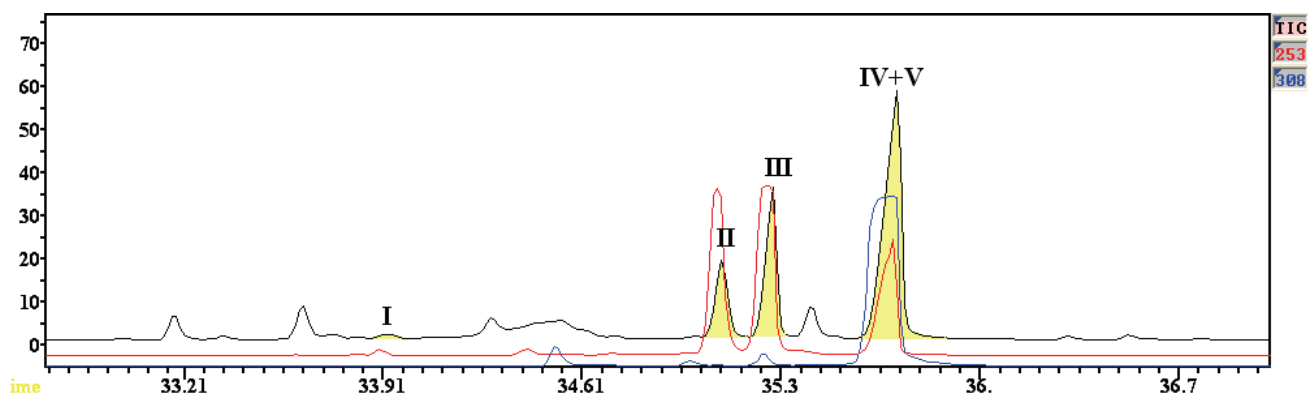
**Figure 152: composés O-méthyl-éthers parasites formés à partir de la sphingosine lors de la méthanolyse anhydre.**

C'est pourquoi les auteurs de ces travaux préfèrent l'utilisation de techniques de méthanolyse aqueuse, qui fournit (apparemment) moins de produits de dégradation (Gaver R. C. et coll., 1965; Polito A. J. et coll., 1968; Yasugi E. et coll., 1987; Irie A. et coll., 1990 et Olsson N. U. et coll., 1997). Toutefois, Kadowaki et coll. ont démontré que la méthanolyse aqueuse n'est pas meilleure, car elle fournit aussi ces composés secondaires, même si c'est en moindre quantité. Mais surtout, selon ces auteurs, elle n'aurait qu'un rendement de coupure de 20% à partir de gangliosides. C'est pourquoi, ils ont développé une technique d'hydrolyse en milieu dépourvu de méthanol (acétonitrile/HCl 0,5 N, 2 h à 75°C) sensée minimiser la formation des composés indésirables que sont les O-méthyl-éthers. Toutefois, cette technique n'empêcherait pas la formation de quelques produits secondaires de déshydratation que sont les mono-hydroxy-diènes de bases sphingoïdes (Kadowaki H. et coll., 1983; voir les généralités). La formation de ces deux composés méthyl-éthers est confirmée par nos études, mais contrairement aux équipes qui ont tenté de minimiser leur formation, nous préférons garder un mélange de méthanolyse qui ait un rendement optimal de libération en même temps des O-méthyl-glycosides et des bases sphingoïdes. En effet, il ne faut pas oublier que le but de nos études est de déterminer la composition complète des glycolipides et non uniquement celle de la partie lipidique. Il nous semble donc préférable de favoriser une bonne libération de l'ensemble des composés, même si cela est accompagné de la formation de quelques produits secondaires, facilement identifiés en GC/MS. Les trois pics correspondants à chaque individu de la famille des sphingénines sont bien individualisés et très faciles à caractériser par l'utilisation d'ions diagnostiques. Ainsi, la quantification peut être acquise, soit en additionnant les trois pics, soit, en se basant sur le pic du dérivé le plus abondant, puisque la proportion de ces trois pics est toujours identique.

Au sujet des transformations des bases sphingoïdes par la méthanolyse anhydre, nous remarquerons aussi l'étrange comportement des 4-hydroxy-sphinganes (phytosphingosines) qui fournissent majoritairement (à 80%) un composé comportant un cycle furanique, quand la méthanolyse est appliquée sur un céramide, alors que ce composé est quasiment absent quand

la méthanolyse est appliquée sur une phytosphingosine libre. Cette particularité intéressante peut donc servir de diagnostique à l'implication, ou non, des phytosphingosines dans un céramide.

Enfin, La famille des 6-hydroxy-4-sphingénines subit aussi des transformations durant la méthanolyse. Nous avons pu déterminer 4 composés supplémentaires (II, III, IV et V) en plus du composé intact (I). Comme pour les autres sphingénines, il s'agit de dérivés O-méthyl-éthers (voir la figure 6 de la deuxième publication: Pons A. et coll., 2002). Là encore, ce phénomène peut sembler embarrassant pour la quantification de ces composés, Toutefois, chacun d'entre eux est facilement identifiable par l'utilisation d'ions spécifiques et la quantification peut être obtenue, soit par addition des 5 pics, soit par intégration d'un d'entre eux, car ils présentent toujours la même proportion les uns par rapport aux autres. Les proportions de chacun des composés de I à V étaient respectivement de 0,8%, 13,93%, 32,31%, 14,32% et 38,53% avec la colonne que nous utilisons à l'époque de la publication. Ces proportions peuvent légèrement changer en fonction de la colonne que l'on utilise, ainsi il peut arriver que des colonnes moins résolutive ne permettent pas de différencier parfaitement certains de ces dérivés. Voici l'exemple d'une colonne avec laquelle se chevauchaient les pics VI et V des dérivés de la 6-OH-Sphe C18:1 d'un échantillon de gangliosides (figure 153).



**Figure 153: chromatogramme des différents composés provenant de la méthanolyse de la 6-OH-Sphe C18:1 après dérivation à l'HFBA.** En rouge: chromatogramme reconstitué à partir de l'ion 253 u. En bleu: chromatogramme reconstitué à partir de l'ion 308 u. Remarquons qu'avec cette colonne, les pics IV et V se chevauchent.

Dans cet exemple, les proportions sont de: I = 0,75%, II = 13,14%, III = 24,47% et IV+V = 61,64%. On remarque que par rapport aux proportions déterminées dans la publication, le pic IV+V est trop important. Toutefois, quand on analyse le spectre correspondant, on peut s'apercevoir qu'il est contaminé par un acide gras C20:0. Il est donc peu recommandé d'utiliser ce pic pour quantifier ce produit. En outre, la proportion du pic III est un peu trop faible. Dans ce cas, nous déterminerions la quantité de la 6-OH-Sphe C18:1 en utilisant le pic II dont la proportion est exacte. Ainsi, on s'aperçoit que le fait d'avoir plusieurs pics par composés, peut

s'avérer être un avantage quand on utilise des colonnes de faible résolution ou bien quand des pics se chevauchent. Cela permet de choisir le pic non contaminé que l'on veut utiliser pour quantifier un composé.

## 2) Les diacylglycérols

Les diacylglycérols résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol par deux acides gras. Leur méthanolyse libère des FAMES et du glycérol par rupture des liaisons esters. Notons que le glycérol, une fois dérivé par l'HFBA, donne un dérivé trop volatil pour être visible sur les chromatogrammes (figure 154).

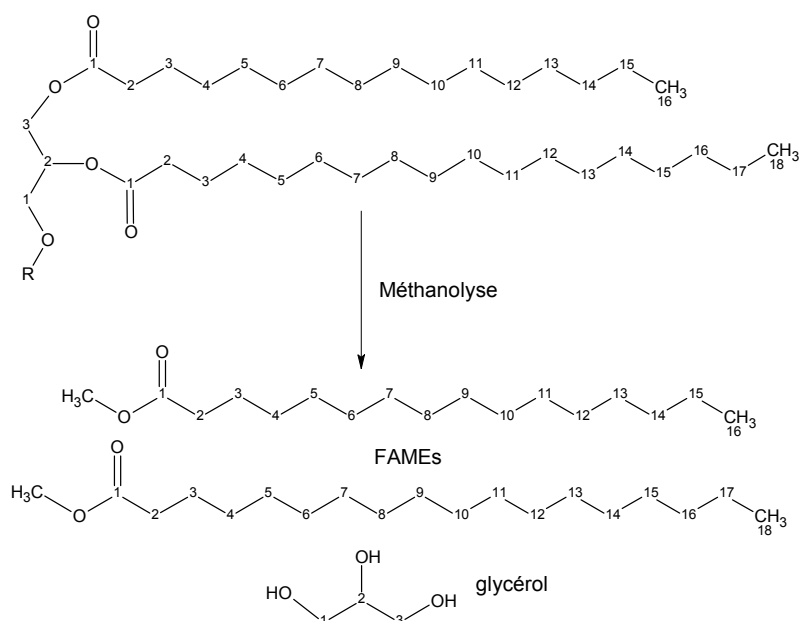


Figure 154: action de la méthanolyse anhydre sur les diacylglycérols

## 3) Les acyl-alkylglycérols (AAG)

Ce sont des lipides proches des précédents, mais l'acide gras en position 3 du glycérol y est remplacé par un alcool gras. Or, cet alcool gras étant fixé par une liaison éther au glycérol, il reste attaché à ce dernier après la méthanolyse pour donner un mono-alkylglycérol qui, une fois dérivé, donne un composé analysable (figure 155).



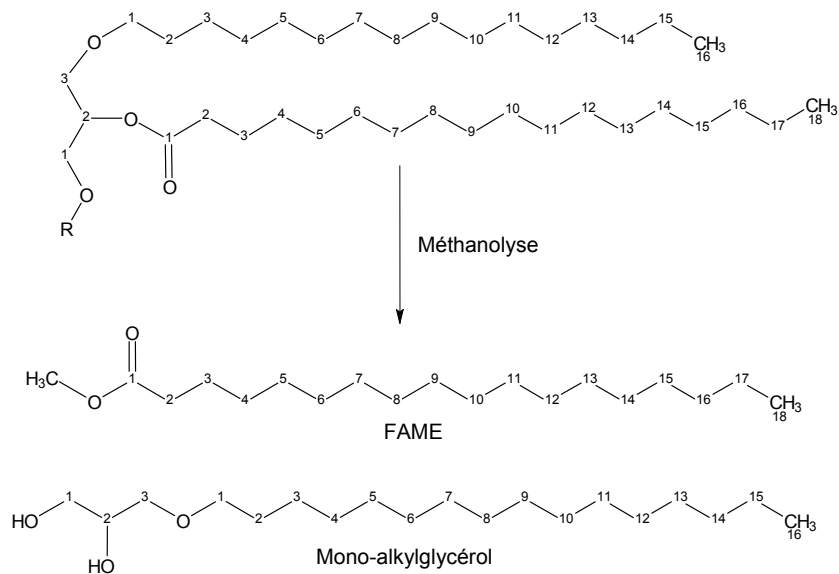


Figure 155: action de la méthanolyse anhydre sur les acyl-alkylglycérols

#### 4) Les plasmalogènes

Dans ce cas, un acide gras est remplacé par un aldéhyde gras. Or, la méthanolyse, lors de la libération de cet aldéhyde, le dégrade en trois composés. Un diméthylacétal et deux formes énols comportant un groupement métoxy (figure 156). Ces trois formes sont visibles sur les chromatogrammes et sont facilement identifiables par des ions spécifiques (voir plus loin).

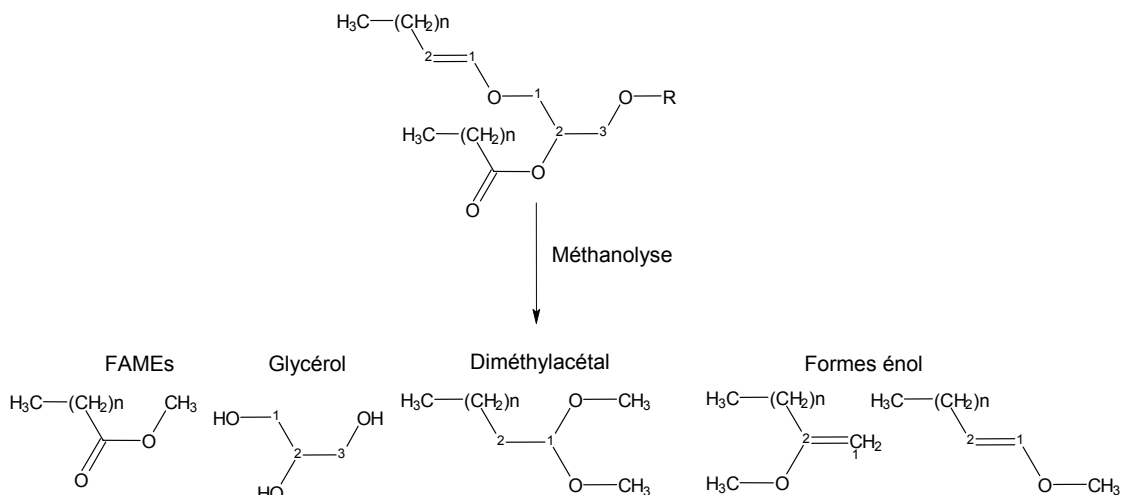


Figure 156: action de la méthanolyse anhydre sur les plasmalogènes

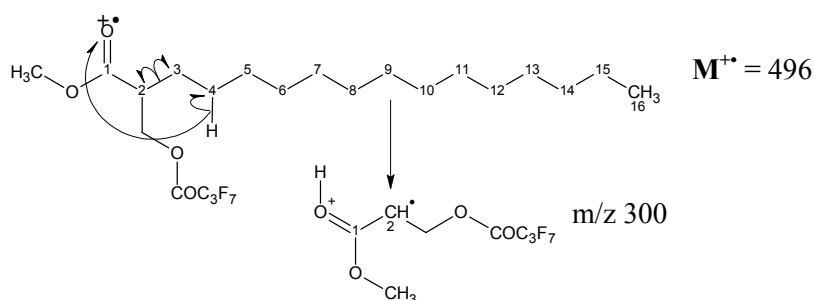
## **B. Caractérisation des différents dérivés des composés lipidiques par la GC-MS après méthanolyse et dérivation par des HFB**

### **1) Les acides gras**

Comme nous avons pu le constater dans les généralités, la méthanolyse libère les acides gras en formant des méthyl-esters (FAMES). Cette particularité est intéressante car ce type de composés est bien adapté à l'analyse en GC-MS. Nous ne développerons pas ici les particularités des spectres de masses des FAMES linéaires ou branchés, qu'ils soient saturés ou non, car leurs caractéristiques sont maintenant bien connues. Toutefois, nous rappellerons que l'analyse de ces spectres permet de déterminer le nombre de carbones de la chaîne aliphatique, la présence ou non d'insaturations, de cycles et de fonctions oxygénées, mais qu'elle ne permet pas de les positionner le long de la chaîne aliphatique (sauf dans quelques cas: voir les généralités).

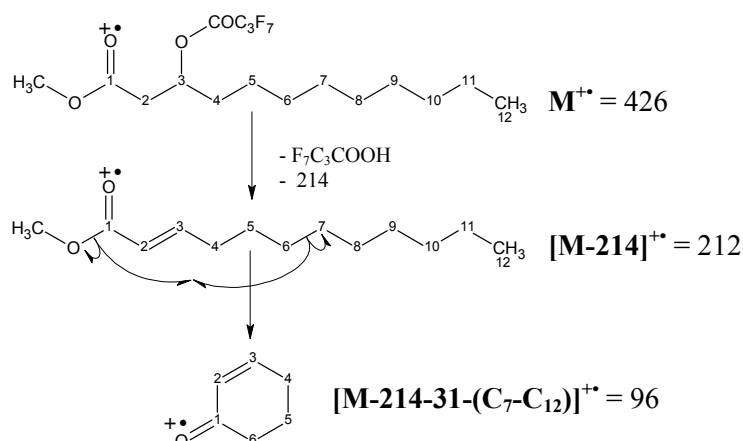
#### **a) Cas des acides gras hydroxylés**

En fait, parmi tous les dérivés méthyl-estérifiés d'acide gras, seuls les composés contenant des fonctions hydroxyles, bien qu'analysables quand ces fonctions sont libres, présentent un comportement chromatographique de moins bonne qualité, en raison des interactions entre l'hydroxyle et la phase stationnaire de la colonne chromatographique. C'est pourquoi, le blocage de ces fonctions améliore leur comportement et fournit des spectres de masses caractéristiques aisément identifiables. Ainsi, en analysant les dérivés HFB de composés standard, nous avons pu identifier les FAMES comportant un groupement hydroxyle aux positions 2 et 3, mais aussi en position  $\omega(n-6)$  de la chaîne aliphatique. Les résultats ont montré des spectres de masse très clairs et facilement identifiables grâce à la présence d'ions caractéristiques de chaque espèce. Les FAMES hydroxylés en position 2 montrent des spectres de masse présentant un ion diagnostique à  $m/z$  286, qui apparaît après le réarrangement d'un hydrogène (voir les figures 1b et 2 de la première publication: Pons A. et coll., 2000). Ce même mécanisme est à l'origine d'un ion à  $m/z$  300 présent dans les spectres de masse de FAMES comportant un groupement méthoxyle en position 2 (voir le spectre de la figure 1d de la première publication: Pons A. et coll., 2000) , composés présents dans un standard commercial, mais jamais identifiés auparavant. Cet ion est obtenu selon le mécanisme suivant (figure 157):



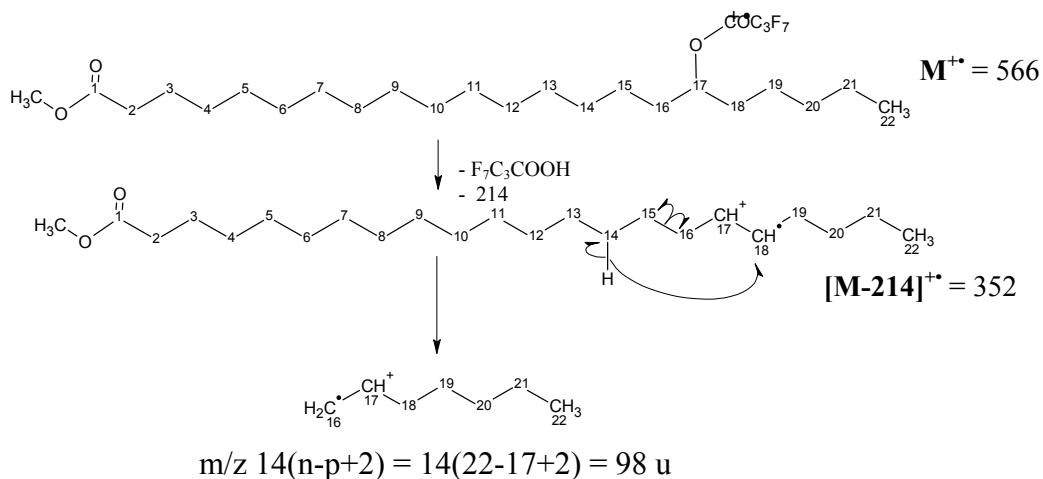
**Figure 157: formation de l'ion à 300 u spécifique d'un groupement méthoxyle en position 2**

Les spectres des FAMES hydroxylés en 3 présentent un ion à  $m/z\ 96$  qui est l'ion  $[M-214-31-(C_7-C_n)]^{+\bullet}$  (voir la figure 1c de la première publication: Pons A. et coll., 2000). Le mécanisme, décrit dans la figure 2c et illustrant la formation de cet ion n'est pas très explicite, C'est pourquoi nous préférons le définir à nouveau (figure 158).



**Figure 158: formation de l'ion à 96 u spécifique d'un groupement hydroxyle en position 3**

Pour les hydroxyles qui prennent place sur les autres carbones (à partir de la position 5) de la chaîne aliphatique, nous avons défini une règle, qui découle de l'observation de FAMES comportant un hydroxyle en position  $\omega(n-6)$ . Elle permettrait de déterminer la masse de l'ion diagnostique qui caractérise la position de l'hydroxyle sur la chaîne aliphatique. Toutefois la formule de la règle définie dans la publication peut être révisée. La bonne formulation étant la suivante: *si un FAME à n carbone comporte un hydroxyle en position p, l'ion diagnostique aura une masse de  $m/z\ 14(n-p+2)$* . La fragmentation de l'exemple proposé dans la publication (17-hydroxycosanoate: 17-OH-C22:0) suit donc le schéma de la figure 159. Toutefois, il faut prendre cette formation ionique avec prudence car l'apparition d'ions comportant la charge sur un carbone au lieu d'un hétéroatome n'est normalement pas favorisée.

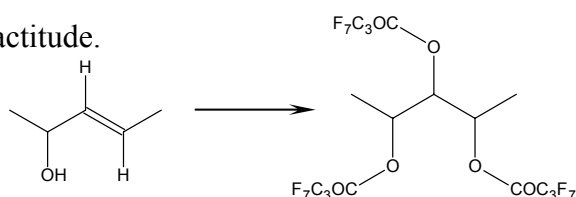


**Figure 159:** détermination de la masse de l'ion diagnostique qui caractérise la position de l'hydroxyle sur la chaîne aliphatique, ici en  $\omega(n-6)$  sur un 17-hydroxycosanoate: 17-OH-C22:0.

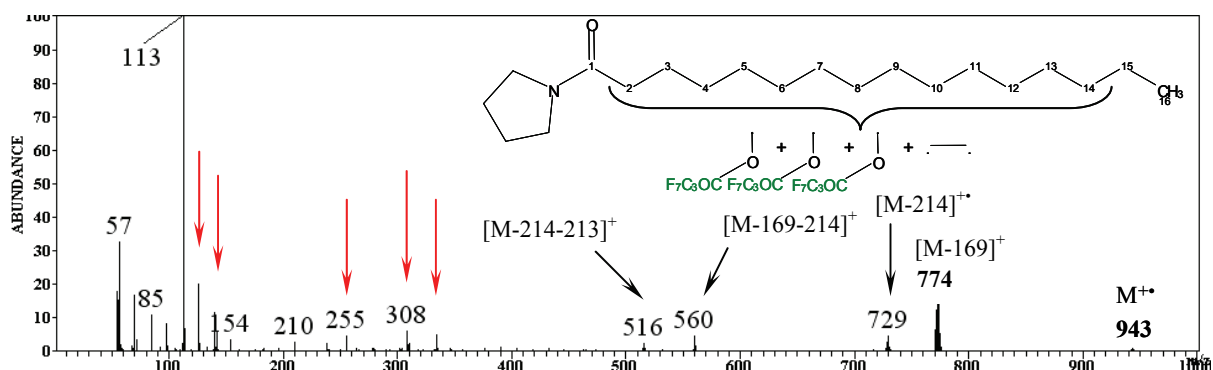
## **b) Conclusion et perspectives**

Les résultats que nous avons obtenus, ont montré que les dérivés HFB étaient au moins aussi efficaces que les dérivés TMS, quant aux informations qu'ils procurent sur l'emplacement de groupements hydroxyles. Cependant, ils ont l'avantage de permettre l'obtention de l'ion moléculaire sur les spectres de masse (sauf dans le cas des 3-hydroxy-FAMES). Nous savons également qu'ils ont une plus grande stabilité dans le temps, et surtout, qu'ils permettent d'analyser des quantités moindres de matériel, car la présence des atomes de fluor favorise une très grande sensibilité des appareils de spectrométrie de masse notamment en mode CI-.

Dans la première publication (Pons A. et coll., 2000), nous avons pu décrire des FAMES hydroxylés qui contiennent une insaturation. Mais, tout comme les dérivés TMS, les HFB ne permettent pas de positionner l'emplacement de doubles liaisons le long de la chaîne carbonée. Il devrait, toutefois, être possible de contourner ce problème en adaptant une des méthodes discutées dans la partie généralités de ce mémoire, notamment, en utilisant la technique d'oxydation des doubles liaisons avant dérivation par des groupements TMS. Cette technique, appliquée à des FAMES hydroxylés et insaturés a déjà permis de définir en même temps l'emplacement d'hydroxyles et d'insaturations (Boeynaems J. M. et coll., 1980). Il devrait être possible d'adapter cette méthode aux dérivés HFB. Toutefois, dans le cas où l'insaturation est vicinale du groupement hydroxyle, il est difficile de les placer l'un par rapport à l'autre avec exactitude.



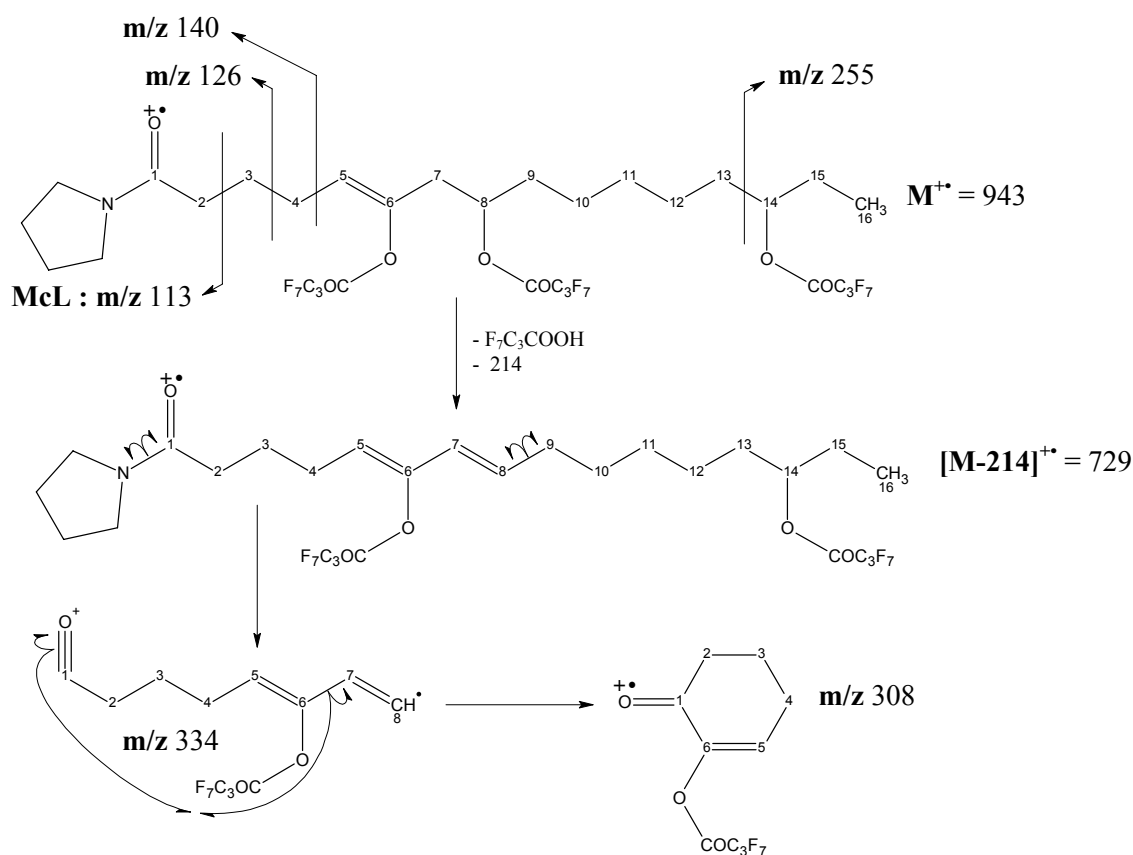
Une autre méthode consisterait à former des dérivés thio-méthylés de FAMES hydroxylés et insaturés (Francis G. W., 1981), avant de dériver les hydroxyles libres par des groupements HFB. Cependant, cette technique devrait présenter les inconvénients, déjà précités dans les généralités, avec certains FAMES poly-insaturés. Nous avons aussi envisagé d'adapter une des techniques de formation de dérivés à "capture de charge". Ainsi, nous avons couplé la dérivation par l'HFBA à la méthode de formation des dérivés N-acyl-pyrrolidines (Andersson B. A. et coll., 1974b et 1978). Les résultats de cette technique, pour les acides gras hydroxylés, sont assez intéressants, car les caractéristiques des spectres permettent de déterminer la présence d'acides gras poly-hydroxylés et insaturés. Toutefois, les groupements HFB ayant aussi le pouvoir de fixer la charge, cela minimise son "piégeage", induit par la fonction amide, sur le groupement carboxyl contenant le carbone 1. Ainsi, on obtient des pics peu informatifs sur l'emplacement des hydroxyles et des doubles liaisons, car le phénomène simple de rupture en  $\alpha$  des groupements n'est pas favorisé. En fait, l'analyse des spectres pour le positionnement des hydroxyles et insaturations semble plus compliquée, comme le montre l'exemple de ce spectre de dérivé HFB de N-acyl-pyrrolidine d'un acide gras tri-hydroxylé et mono-insaturé à 16 carbones obtenu à partir des lipides totaux extraient de la peau humaine (figure 160).



**Figure 160: spectre de masse EI d'un dérivé HFB de N-acyl-pyrrolidine d'acide gras à 16 carbones, tri-hydroxylé et comportant**

On peut remarquer que l'on observe l'ion moléculaire, mais aucun ion évident de dégradation provenant de mécanismes de ruptures en  $\alpha$  des groupements HFB et de la double liaison. Ainsi, il semble impossible de placer ces groupements avec certitude. En effet, la plus part des ions qui apparaissent dans les hautes masses, proviennent de la perte de tout ou partie des groupements HFB. Cette méthode ne semble donc pas, à première vue, apporter d'avantages par rapport à la seule dérivation par les HFB. Toutefois, il nous reste à analyser plus précisément les mécanismes de fragmentation de ces dérivés afin de déterminer si, parmi les ions de faibles masses, il n'y aurait pas d'ions caractéristiques de l'emplacement des

hydroxyles et des doubles liaisons. En fait, quand on analyse ces ions dans l'exemple ci-dessus, ceux caractérisés par les flèches rouges ont des masses qui peuvent correspondre à des ions qui permettraient de déterminer la structure suivante (figure 161):

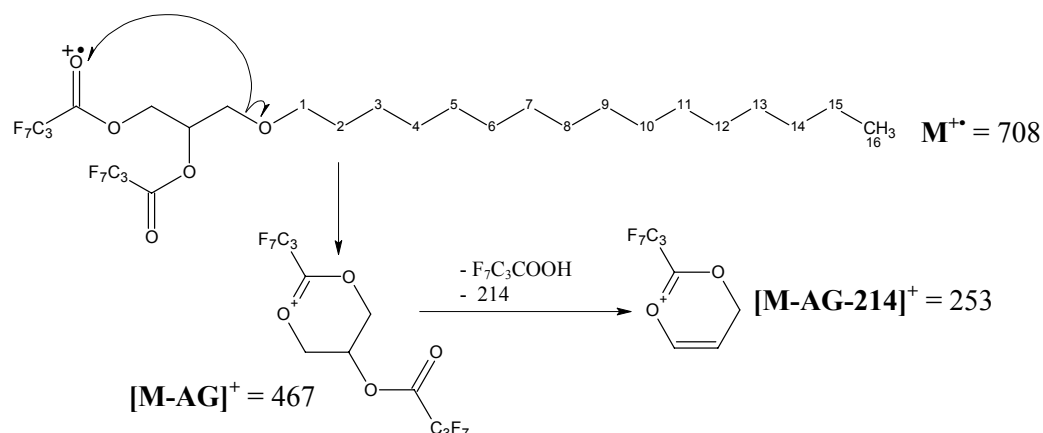


Ainsi en poussant l'analyse, cette méthode des dérivés HFB de N-acyl-pyrrolidine d'acide gras pourrait s'avérer très intéressante pour la détermination de la structure des acides gras polyhydroxylés et insaturés. Pour cela, il faudrait reprendre ces travaux en analysant des composés standard bien caractérisés et non pas un mélange aussi complexe que les lipides totaux de la peau humaine.

## 2) Les monoalkylglycerols

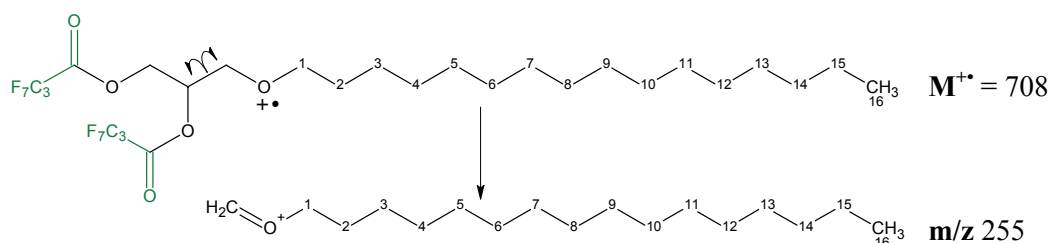
Certains glycolipides dont la partie aglycone est un acyl-alkylglycérols (AAG) donnent, après méthanolyse, un monoalkylglycérol. Cette famille de composés fournit des spectres très clairs et faciles à analyser (voir la figure 3 de la première publication: Pons A. et coll., 2000), d'autant plus que tous les dérivés HFB obtenus à partir des monoalkylglycérols présentent

deux ions diagnostiques à  $m/z$  467 et 253. Ces deux ions spécifiques proviennent, pour le premier, de la perte de l'alcool gras, et pour le second, de celle supplémentaire, d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique (figure 162).



**Figure 162: les deux ions diagnostiques des monoalkylglycérols à  $m/z$  467 et 253**

Quant à la longueur de la chaîne d'alcool gras, bien que l'ion moléculaire soit rarement décelable sans amplification (s'il n'y a pas d'insaturation le long de la chaîne), deux ions de fragmentation permettent de la déterminer. Les mécanismes de fragmentation fournissant ces ions sont les suivants. Pour l'exemple précédant d'un alcool gras à 16 carbones, le premier ion correspond à la chaîne d'alcool gras flanquée du carbone appartenant au glycérol la supportant (figure 163).



**Figure 163: ion à  $m/z$  255 spécifique de la longueur de la chaîne d'alcool gras**

Cet ion étant parfois difficile à observé, nous lui préférons le second, qui provient de la rupture, après réarrangement d'un hydrogène, entre le carbone 1 et l'oxygène de la chaîne d'alcool gras (figure 164). Cet ion est de plus grande intensité et est bien visible sur les spectres. Bien sûr, ces fragmentations sont valables pour tous les autres composés de cette famille (voir les flèches sur les spectres de la figure 3: Pons A. et coll., 2000).

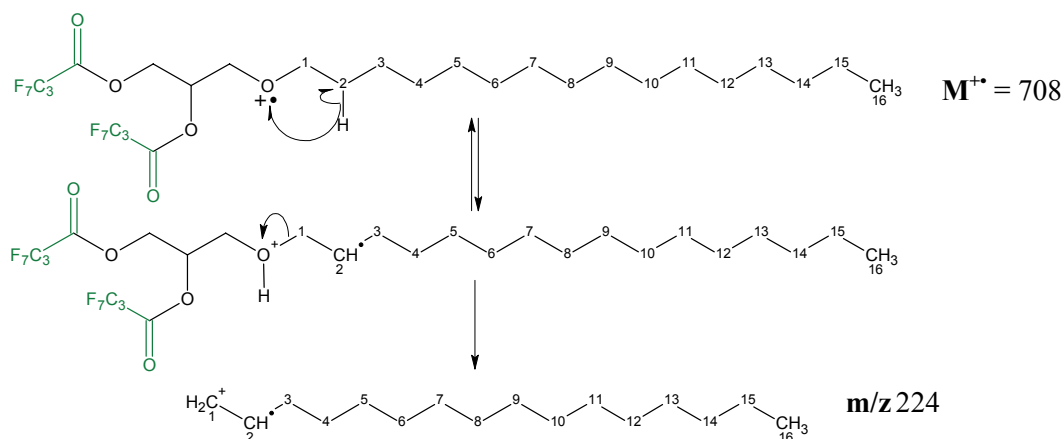


Figure 164: ion à m/z 224 spécifique de la longueur de la chaîne d'alcool gras

### 3) Les plasmalogènes

Lors de la méthanolyse, nous avons vu que ces composés donnent trois composés O-méthylés. Ils sont tous les trois observables en GC-MS et présentent les caractéristiques suivantes: 1) le diméthyl-acétal fournit un ion diagnostique à m/z 75 selon ce mécanisme (figure 165):

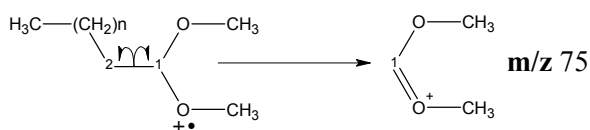


Figure 165: formation de l'ion à m/z 75 de la forme diméthyl-acétal

2) Les deux formes énols donnent des ions diagnostiques à m/z 71 selon le mécanisme suivant (figure 166):

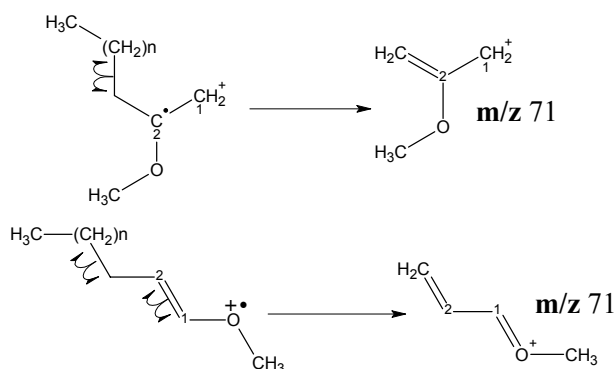


Figure 166: formation de l'ion à m/z 71 des formes énols

Toutefois, il faut noter que ces trois types de composés sont totalement (diméthyl-acétal) ou partiellement (formes énols) détruits au cours de la phase d'acylation par l'HFBA. C'est pourquoi, les échantillons contenant de tels composés devront subir une double injection, avec



et sans acylation, afin de pouvoir quantifier ces dérivés (voir la discussion à ce sujet dans la publication: Pons A. et coll., 2000).

#### **4) Les bases sphingoïdes**

Bien que les TMS aient déjà permis de décrire l'hétérogénéité des différentes familles de glycolipides, ils ont été décrits comme présentant quelques inconvénients pour l'analyse de tels composés. En effet, les dérivés TMS de O-méthyl-glycosides ont des temps de rétention assez similaires à ceux de certains FAMES et dérivés O-triméthyl-silyles de bases sphingoïdes. Cela a pour effet de fournir des chromatogrammes dont certains pics se chevauchent, ce qui ne facilite pas les analyses quantitatives des glycosphingolipides. Ce phénomène n'apparaît pas avec les dérivés HFB, puisque les dérivés des O-méthyl-glycosides sont parfaitement séparés des dérivés lipidiques. En outre, Les dérivés O-triméthyl-silyles de bases sphingoïdes, introduits par Gaver et Sweeley (Gaver R. C. et coll., 1965), ont montré le même problème de chevauchement entre eux. Une alternative à ces dérivés a été de former des dérivés N-acétyl-O-triméthyl-silyles de bases sphingoïdes (Carter H. E. et coll., 1967), qui selon certains (Olsson N. U. et coll., 1997), ne montrent plus ces problèmes de chevauchements et ont un comportement chromatographique supérieur en raison du blocage de la fonction amine. Toutefois, bien que cette méthode soit sans doute efficace, elle nécessite une étape supplémentaire d'acétylation de la fonction amine. Cette étape étant consommatrice de temps, nous lui préférons donc la dérivation par les HFB qui permet de dériver en même temps les fonctions hydroxyles et amines en une seule étape, tout en formant des dérivés plus stables que les TMS.

Ainsi, dans les deux publications (Pons A. et coll., 2000 et 2002), nous avons pu décrire les principes de la fragmentation des spectres des différentes familles de bases sphingoïdes que sont les sphingénines, sphinganines, phytosphingosines et 6-hydroxy-sphingénines.

##### **a) Cas des sphingénines**

###### **(1) *Les spectres de masse***

Comme nous l'avons expliqué, les sphingénines, qui subissent une méthanolyse anhydre, fournissent trois types de composés (Pons A. et coll., 2000). Nous plaçons ici les spectres des trois dérivés obtenus à partir de la sphingosine (Sphe C18:1) (figure 167).

## Dérivé HFB de la 5-O-méthyl-Sphe C18:1

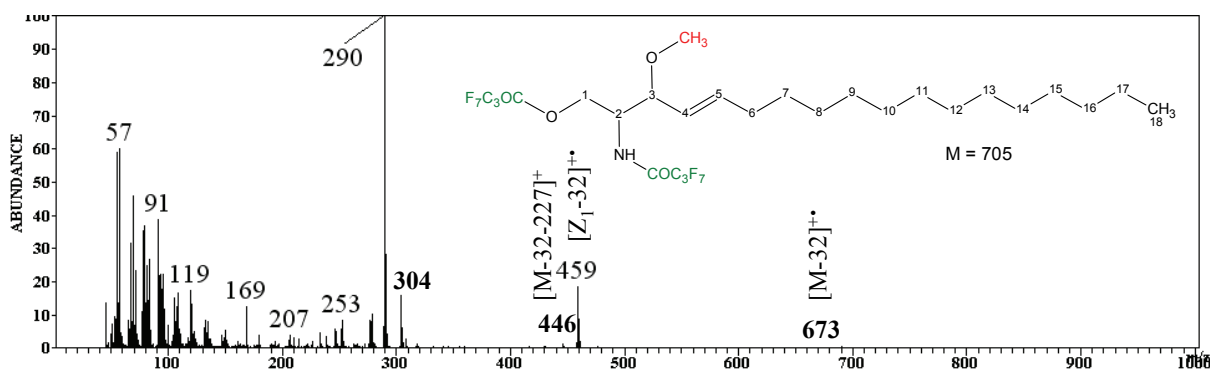
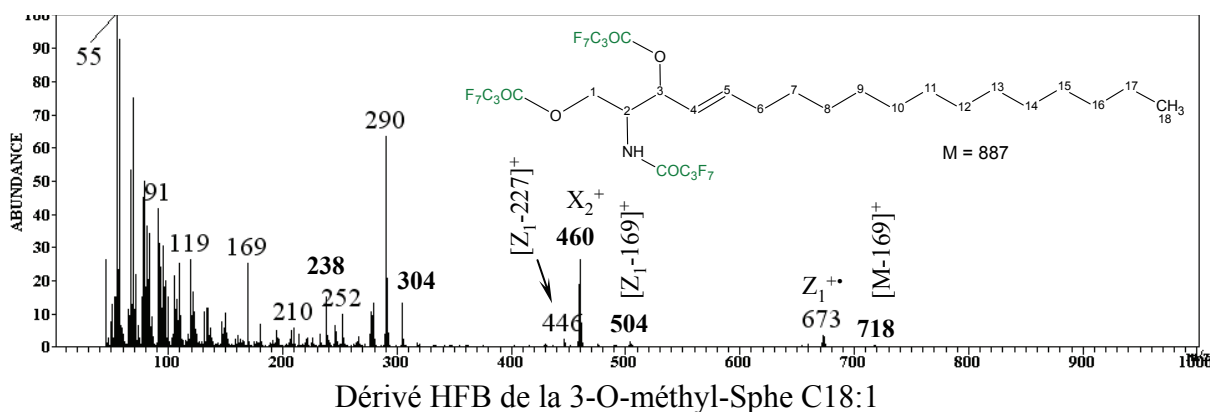
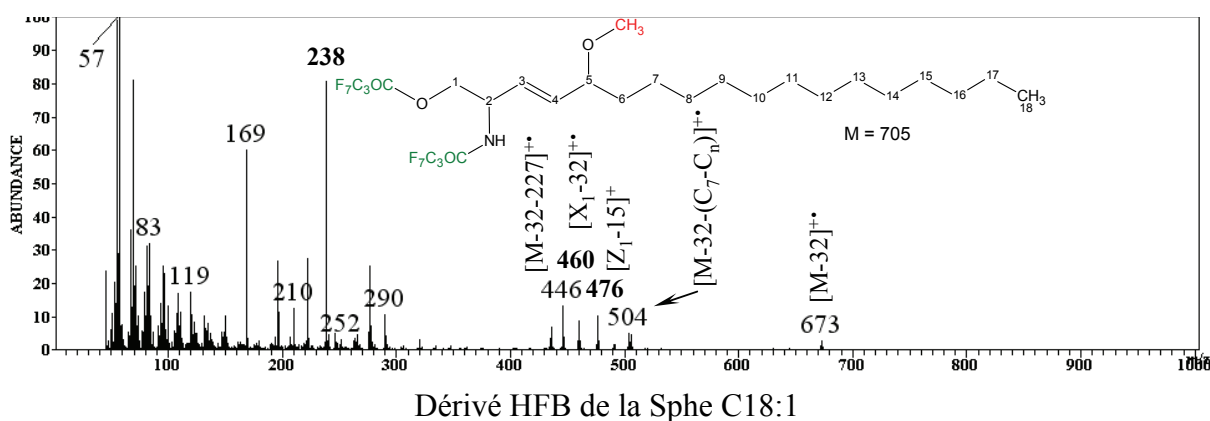


Figure 167: spectres de masse EI des trois dérivés HFB de la sphingosine ayant subi une méthanolyse anhydre.

### (2) Schémas de fragmentations des principaux ions

#### (a) Cas du dérivé HFB de la 5-O-méthyl-Sphe C18:1

Comme pour tous les dérivés HFB, une des voies principales de fragmentation découle de la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique pour donner l'ion que nous appellerons, comme à notre habitude,  $Z_1^{+}$ . Ensuite, à partir de cet ion, la perte d'un groupement méthyle donne l'ion  $[Z_1-15]^+$  par cyclisation. Cet ion est d'ailleurs caractéristique de la position en 5

d'un groupement O-méthyle, puisqu'on ne le retrouve pas dans le spectre du dérivé HFB de la 3-O-méthyl-Sphe C18:1. En effet, dans ce cas, il ne peut pas y avoir l'apparition de cycle stable à 6 atomes (figure 168).

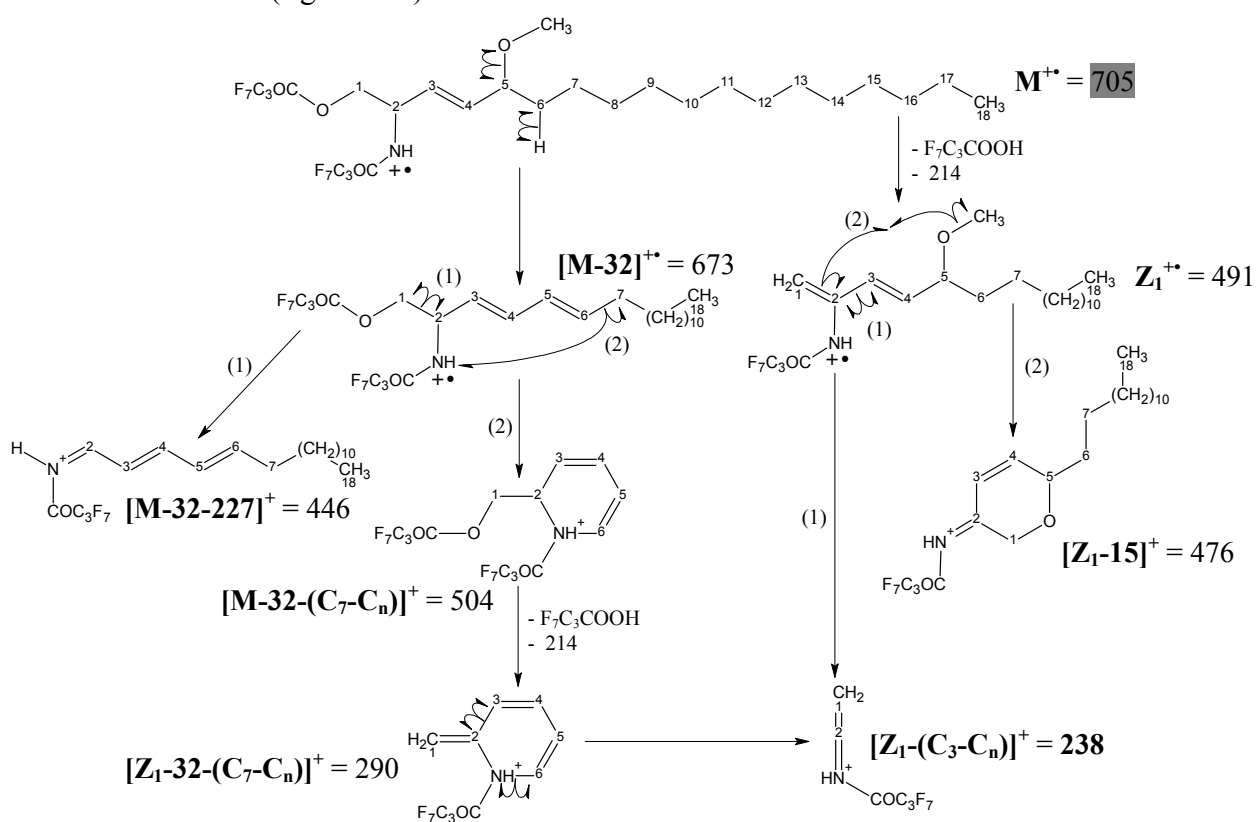


Figure 168: principales voies de fragmentations du dérivé HFB de la 5-O-méthyl-Sphe C18:1

La deuxième voie principale de fragmentation provient de la perte d'une molécule de méthanol qui donne l'ion  $[M-32]^+•$ , ce qui montre la présence d'un groupement O-méthyle sur ce dérivé. Cet ion peut ensuite continuer sa fragmentation en donnant l'ion  $[M-32-(C_7-C_n)]^+$ . La double liaison  $C_5-C_6$  provenant de la perte du méthanol, cet ion, que l'on retrouve pour les autres dérivés HFB 5-O-méthyl-Sphe, est caractéristique de cette famille, mais malheureusement d'une intensité moyenne. On retrouve également cet ion à 504 u, quoique plus faible, dans les spectres d'autres dérivés HFB, notamment ceux des dérivés HFB non O-méthylés de Sphe et de Spha. C'est pourquoi, Il est préférable de se baser sur la présence de l'ion  $[Z_1-(C_3-C_n)]^+$  à  $m/z$  238, particulièrement abondant pour les 5-O-méthyl-Sphe. Enfin, l'ion  $[Z_1-32-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  290, caractéristique de la famille des sphingénines, est beaucoup moins abondant que pour les dérivés HFB des Sphe et 3-O-méthyl-Sphe.

(b) Cas du dérivé HFB de la Sphe C18:1

Ce dérivé correspond au deuxième pic élué sur le chromatogramme. Il montre un spectre qui présente un premier ion à  $m/z$  718 (souvent difficile à observer), masse qui est au dessus de celle de l'ion moléculaire des deux analogues O-méthylés. Il n'y a donc aucun doute sur l'attribution de ce deuxième pic à la forme tri-heptafluorobutyrylée. Cet ion correspond à une masse de (M-169) et dans notre cas du dérivé HFB de la Sphe C18:1, il peut provenir de deux mécanismes différents de fragmentation.

La première voie de fragmentation correspond à perte de la partie (C<sub>7</sub>-C<sub>n</sub>) de la chaîne aliphatique. Elle aboutit donc à la formation de l'ion  $[M-(C_7-C_n)]^+$ , qui peut à son tour donner les ions  $[Z_1-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  504 et  $[Z_2-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  290 par pertes successives d'acide heptafluorobutyrique. Comme ce dernier ion est caractéristique des dérivés HFB (O-méthylés ou non) des sphingénines, c'est lui que nous utilisons pour reconstituer le chromatogramme afin de rechercher ces composés dans un mélange (figure 4a de la première publication : Pons A. et coll., 2000; et 2d de la deuxième : Pons A. et coll., 2002). Ensuite, bien que très stable, l'ion  $[Z_2-(C_7-C_n)]^+$  fournit l'ion diagnostique des  $\alpha$  aminoalcools à  $m/z$  238, par la perte de la chaîne carbonée contenant les carbones 3 à 6 (figure 169).

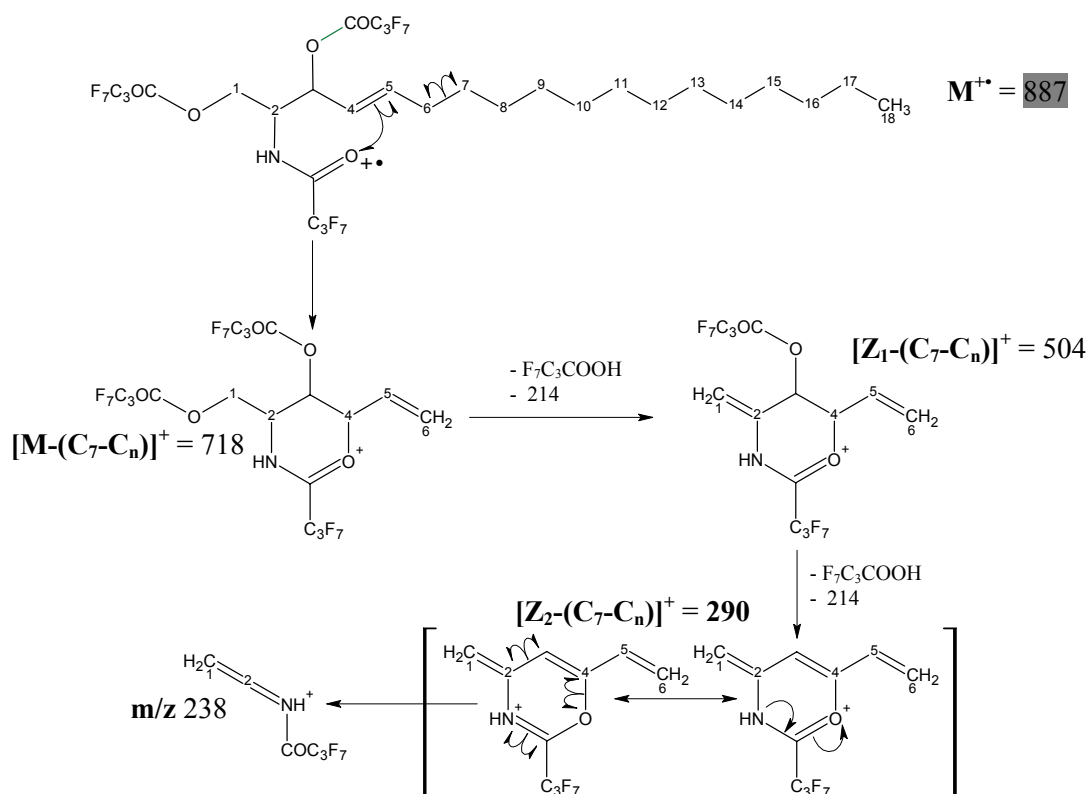


Figure 169: la voie 1 ou série Z du dérivé HFB de la Sphe C18:1

La deuxième voie de fragmentation, provient de la perte du radical  $\cdot C_3F_7$  ( $m/z$  169) d'un groupement HFB, donnant ainsi l'ion  $[M-C_3F_7]^+$  qui a aussi une masse de 718 u. Cette voie de

fragmentation peut continuer par la perte d'acide heptafluorobutyrique pour donner l'ion  $[Z_1-C_3F_7]^+$  de masse  $m/z$  504. Puis la perte de  $CO_2$  fournit l'ion  $X_2^+$  à  $m/z$  460. Evidemment, cet ion peut aussi être formé directement par la voie X classique des dérivés HFB (figure 170).

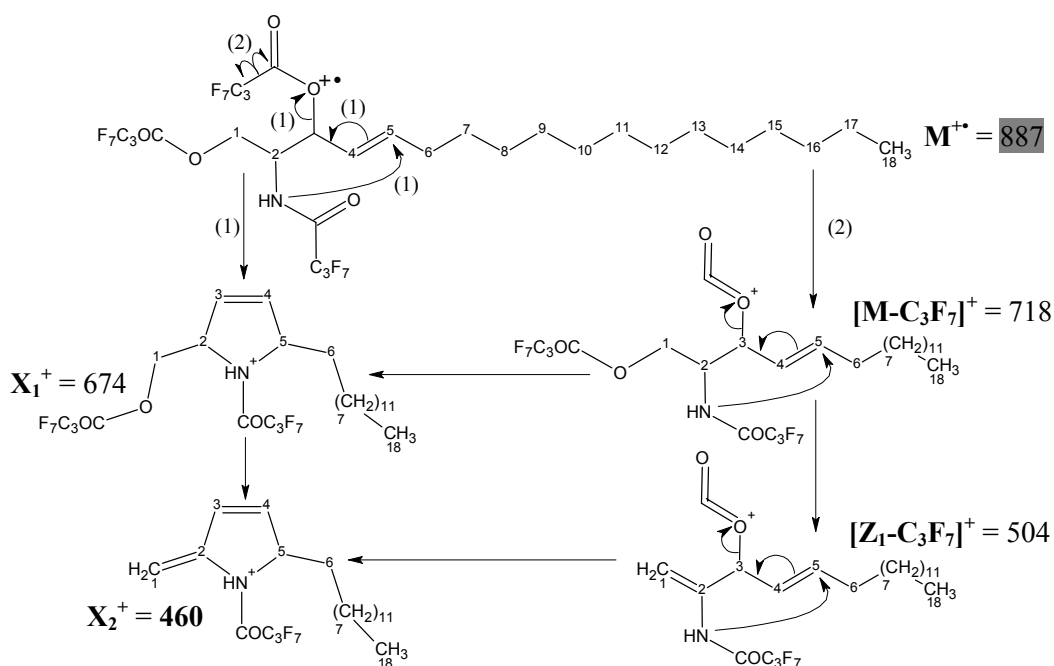


Figure 170: la voie 2 ou série X du dérivé HFB de la Sphe C18:1

Remarquons que ces deux voies (1 et 2) ont en commun des ions de masse 718 et 504 u. Il est donc difficile de déterminer si l'une ou l'autre de ces deux voies est favorisée. Cependant, plusieurs constatations vont dans le sens de l'existence concomitante de ces deux voies. Tout d'abord, on observe la forme pseudo-gaussienne de l'amas ionique à  $m/z$  459/460, qui montre bien la coexistence des deux voies Z et X, appartenant aux voies 1 et 2. Mais surtout, si la voie 1 existe, les ions  $[M-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  718 et  $[Z_1-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  504, indépendants de la longueur de la chaîne, doivent pouvoir se retrouver dans les spectres des autres dérivés tri-HFB de Sphe. Dans ce cas, ces deux ions doivent être accompagnés par les ions de la voie 2 que sont  $[M-C_3F_7]^+$  et  $[Z_1-C_3F_7]^+$ . Toutefois, cette fois ci, ces deux ions ne devraient pas avoir respectivement une masse de 718 et 504 u, mais des masses en relation avec la longueur de la chaîne aliphatique. Ainsi, pour le spectre du dérivés tri-HFB de Sphe C20:1 on devrait retrouver les ions  $[M-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  718,  $[Z_1-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  504,  $[M-C_3F_7]^+ = 746$  u et  $[Z_1-C_3F_7]^+ = 532$  u, ce qui est le cas, bien que  $[M-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  718 soit extrêmement faible. Nous sommes donc persuadé que ces deux voies cohabitent (figure 171).

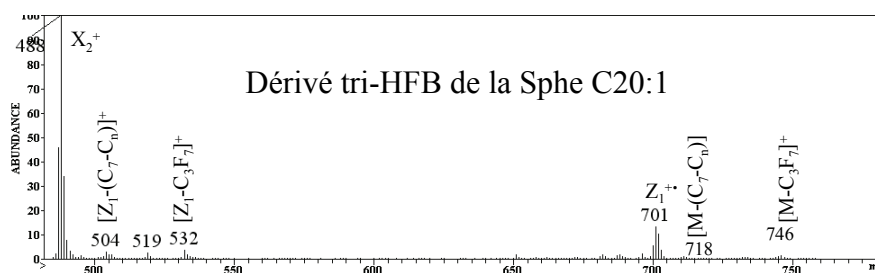


Figure 171: zoom sur une partie du spectre de masse EI du dérivé tri-HFB de la Sphe C20:1, nous remarquons la présence des ions des voies 1 et 2.

Dans le cas du dérivé tri-HFB de la Sphe C18:1, le fait que les ions à  $m/z$  718 et 504 soient produits par deux mécanismes, explique leur intensité relativement importante, alors qu'elle est plus faible dans le cas des autres Sphe.

(c) Cas du dérivé HFB de la 3-O-méthyl-Sphe C18:1

Le schéma de fragmentation de ce dérivé est à peu près identique à celui de la 5-O-méthyl-Sphe C18:1, sauf que les voies particulières de fragmentation dues à la présence du groupement méthoxy en 5 ne peuvent pas avoir lieu. C'est ce qui explique que les ions  $[M-32-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  504 et  $[Z_1-15]^+$  à  $m/z$  476, que l'on trouve dans le spectre du dérivé 5-O-méthyl, soient invisibles pour ce dérivé (figure 172).

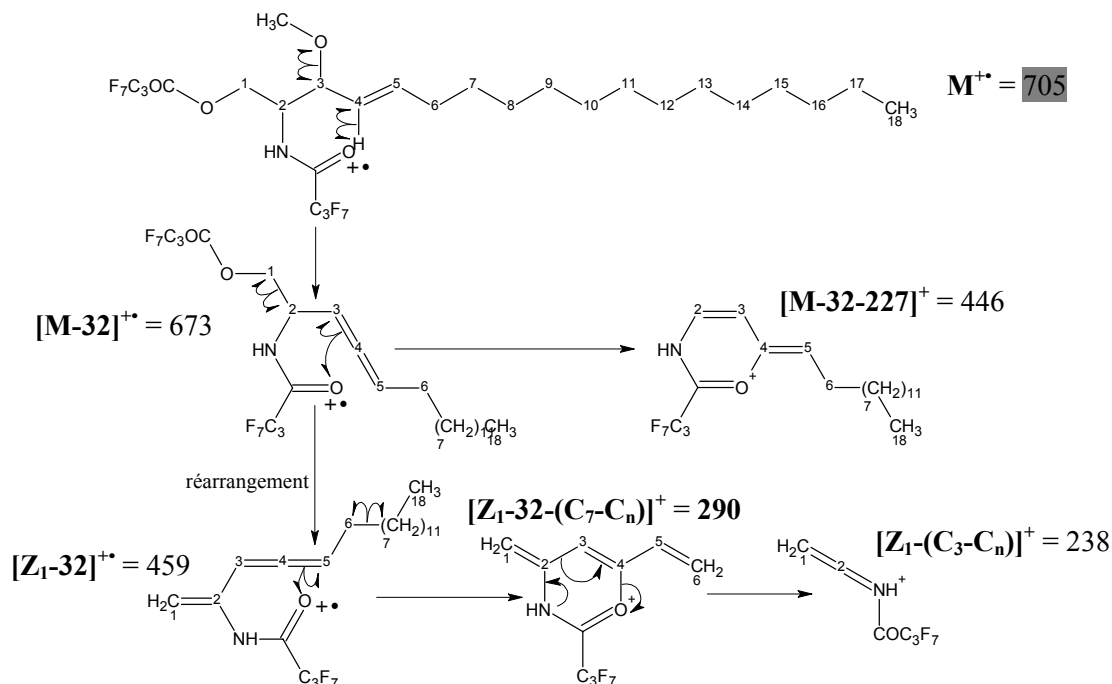


Figure 172: principales voies de fragmentations du dérivé HFB de la 3-O-méthyl-Sphe C18:1

Notons encore une fois que l'ion  $[Z_1-32-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  290 est très abondant et sert d'ion diagnostique (figure 4a de la première publication: Pons A. et coll., 2000; et 2d de la deuxième: Pons A. et coll., 2002). Voici une partie de chromatogramme qui montre un

exemple de ce que peut donner la caractérisation de la sphingosine par reconstitution d'un chromatogramme à l'aide de cet ion diagnostique (figure 173). C'est bien les dérivés 3-O-méthyl-Sphe qui apparaissent de la façon la plus évidente lors d'une telle recherche.

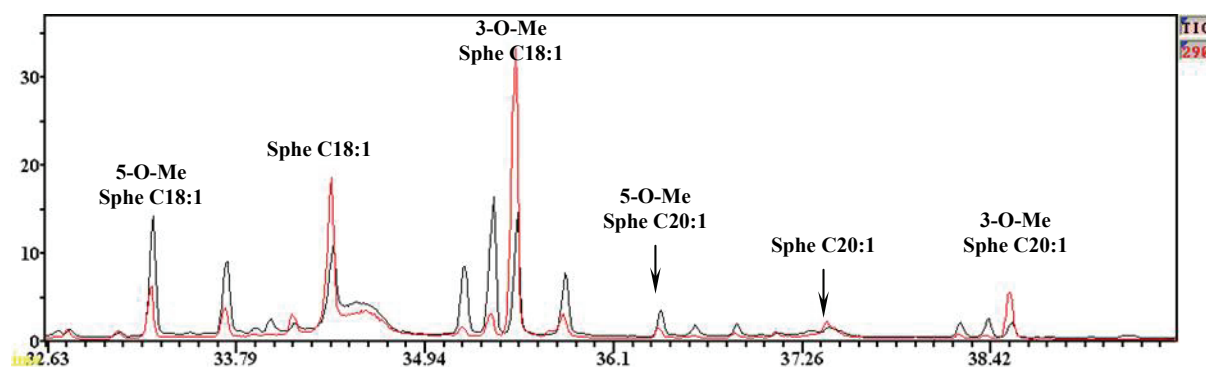


Figure 173: zoom sur une partie de chromatogramme obtenu à partir d'un ganglioside GM1 de SPM. En noir: TIC. En rouge: reconstitution du chromatogramme par l'ion spécifique m/z 290.

## b) Cas des sphinganine

Comme nous l'avons déjà dit, ce type de composés n'ayant pas d'insaturation, il n'y a pas de phénomène de transformation durant la méthanolyse anhydre. Ainsi chaque représentant de la famille des sphinganine, ne donne qu'un seul pic chromatographique après acylation par l'HFBA.

### (1) Les spectres de masse

Afin d'illustrer les caractéristiques des spectres de masse des sphinganine, la figure 5b de la première publication (Pons A. et coll., 2000) montre le spectre de la Spha C18:0. Mais comme seulement trois ions y sont nommés, nous le remplaçons ici pour le compléter (figure 174).

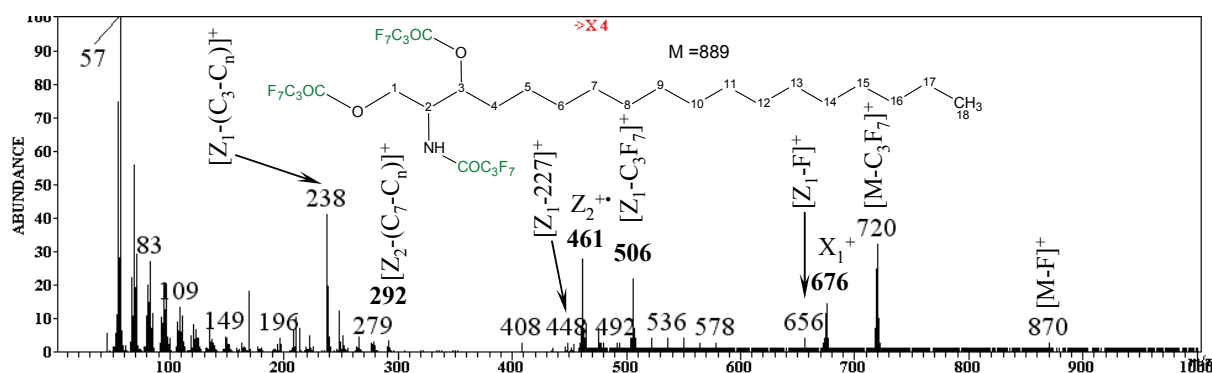


Figure 174: spectre EI du dérivé HFBA de Spha C18:0

On peut observer que les spectres des Spha ont la particularité de présenter un ion à  $m/z$  292 au lieu du  $m/z$  290, décrit pour les sphingénines. Cette différence de masse de 2 u provient du manque d'insaturation sur la chaîne aliphatique. Cet ion, malgré sa relative faiblesse d'intensité, est donc un bon ion diagnostique des sphinganine. Ainsi, son utilisation lors de la reconstitution de chromatogrammes permet très facilement de retrouver tous les composés de cette famille dans un mélange (figure 5a de la première publication: Pons A. et coll., 2000; et 2c de la deuxième: Pons A. et coll., 2002). Toutefois, dans le cas d'une présence importante des représentants de la famille des Sphe, l'ion diagnostique  $m/z$  292 a une tendance à également caractériser ces derniers, car cette masse correspond aussi à un isotope lourd de l'ion  $m/z$  290. C'est ce que l'on peut observer sur le même exemple que la page précédente avec un chromatogramme obtenu à partir d'un ganglioside GM1 de SPM de cerveau de rat (figure 175).

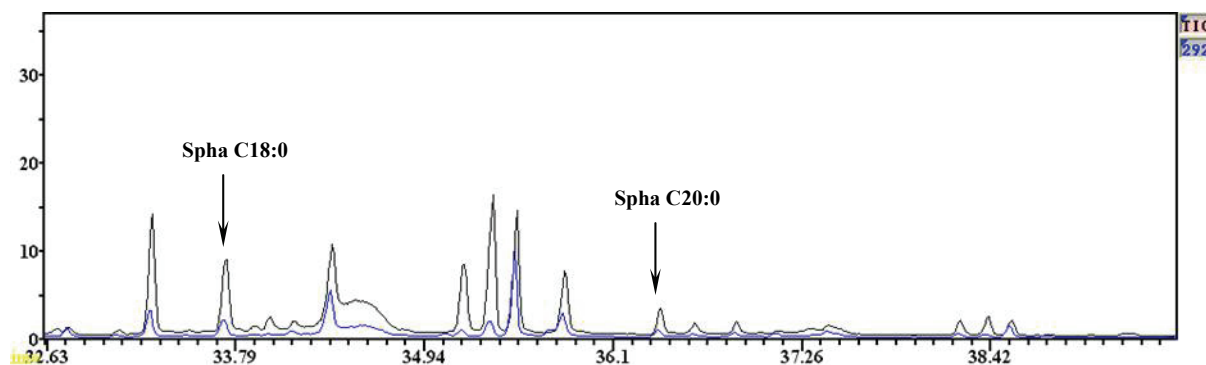


Figure 175: zoom sur une partie de chromatogramme obtenu à partir d'un ganglioside GM1 de SPM. En noir: TIC. En bleu: reconstitution du chromatogramme par l'ion spécifique  $m/z$  292.

## (2) Schémas de fragmentation des principaux ions

### (a) La voie de fragmentation provenant de la perte d'un atome de fluor

Bien que l'ion moléculaire soit observable, il est de très faible intensité et n'est véritablement visible qu'après amplification. Le premier ion que l'on observe est généralement l'ion  $[M-F]^+$ . Remarquons que, bien que ce soit un ion classique des dérivés HFB, il n'est observable que pour les Spha et les Phyt-Spha. Il peut ensuite continuer sa fragmentation par la perte d'acide heptafluorobutyrique pour donner  $[Z_1-F]^+$  (figure 176).



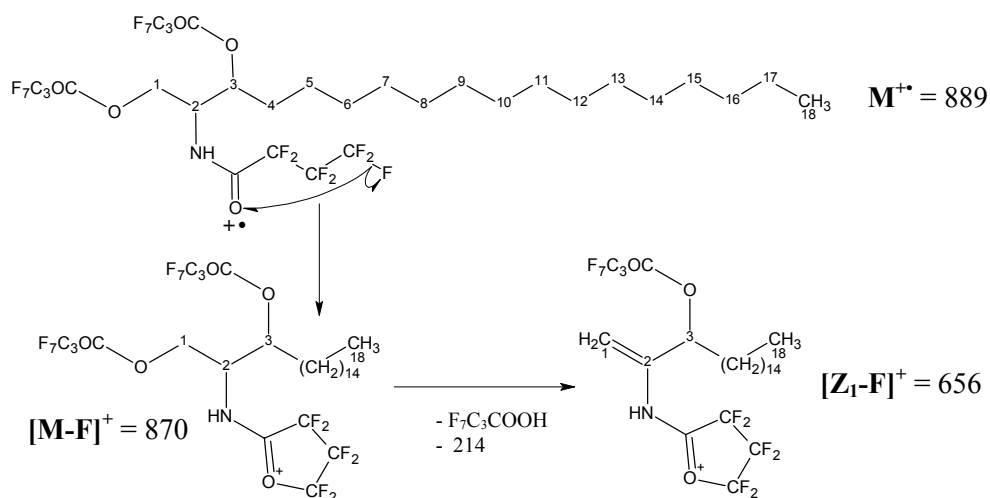


Figure 176: la voie de fragmentation du dérivé HFB de Spha C18:0 provenant de la perte d'un atome de fluor

(b) La voie de fragmentation provenant de la perte du radical  $\cdot\text{C}_3\text{F}_7$

Par la perte d'un radical  $\cdot\text{C}_3\text{F}_7$ , l'ion moléculaire donne un ion  $[\text{M}-\text{C}_3\text{F}_7]^+$  qui peut à son tour donner  $[\text{Z}_1-\text{C}_3\text{F}_7]^+$ , par la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique (figure 177). Nous remarquerons que ces deux ions sont parmi les plus intenses du spectre, sans doute en raison de leur possibilité de résonances. Ce sont d'ailleurs eux qui permettent facilement de déterminer la longueur de la chaîne aliphatique, comme on peut le constater sur la figure 3 de la deuxième publication (Pons A. et coll., 2002).

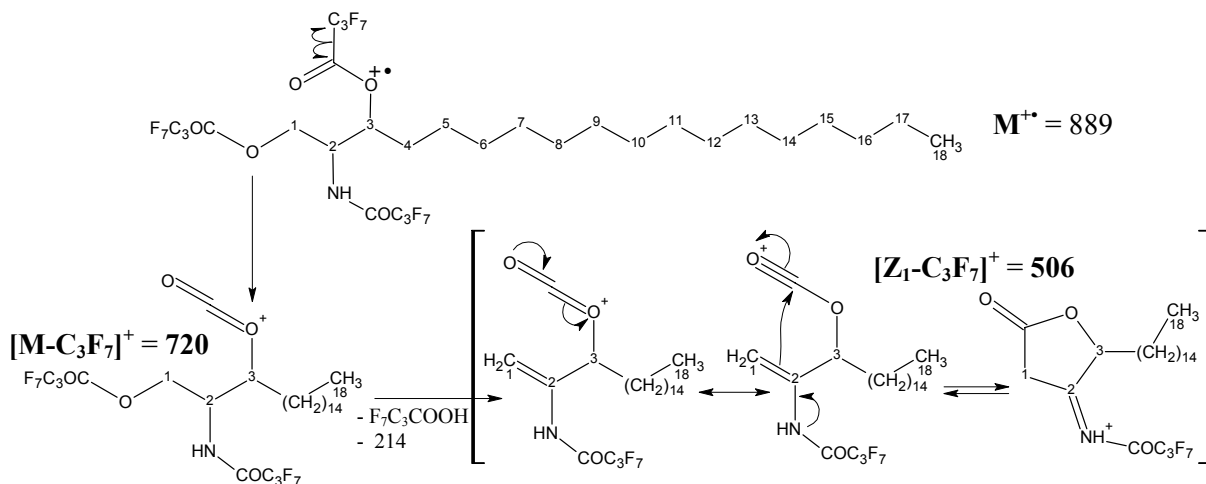


Figure 177: la voie de fragmentation du dérivé HFB de Spha C18:0 provenant de la perte du radical  $\cdot\text{C}_3\text{F}_7$

(c) La voie de fragmentation provenant des séries X et Z

Comme tous les dérivés HFB, ceux des sphinganine peuvent perdre, soit un radical heptafluorobutyrate, soit une molécule d'acide heptafluorobutyrique pour donner

respectivement les ions  $X_1^+$  à  $m/z$  676 et  $Z_1^{+\bullet}$  à  $m/z$  675. L'ion  $X_1^+$  peut donner son ion fils  $X_2^+$  à  $m/z$  462 et  $X_1^+$  est plus intense que  $Z_1^{+\bullet}$ , puisque ce dernier est à l'origine de tous les autres ions du spectre. Nous avons déjà vu la voie découlant de la perte d'un radical fluor, et celle provenant de la perte d'un radical  $\cdot C_3F_7$ . Mais il existe aussi la possibilité, pour  $Z_1^{+\bullet}$ , de perdre le radical  $\cdot CH_2OCOC_3F_7$  d'une masse de 227 u et contenant le carbone 1. Cette perte produit l'ion  $[Z_1-227]^+$  d'une masse de 448 u.  $Z_1^{+\bullet}$  peut, bien sûr, donner un ion fils intense, nommé  $Z_2^{+\bullet}$  à  $m/z$  461, par perte d'acide heptafluorobutyrique. Ce dernier est d'ailleurs à l'origine de l'ion  $[Z_2-(C_7-C_n)]^+$  à  $m/z$  292, caractéristique de la famille des sphinganine. Enfin, nous avons illustré la possibilité de former l'ion  $[Z_1-(C_3-C_n)]^+$  à  $m/z$  238. Comme toujours, il est caractéristique de toutes les bases sphingoïdes, puisque celles-ci sont des  $\alpha$  aminoalcools (il est également retrouvé dans les spectres des acides sialiques et N-acétyl-hexosamines). Nous l'avons présenté ici comme provenant de l'ion  $[Z_2-(C_7-C_n)]^+$ , mais en réalité, il peut provenir de n'importe quel ion le contenant, et notamment de l'ion  $Z_1^{+\bullet}$  découlant de la perte d'HFB du carbone 1 (figure 178).

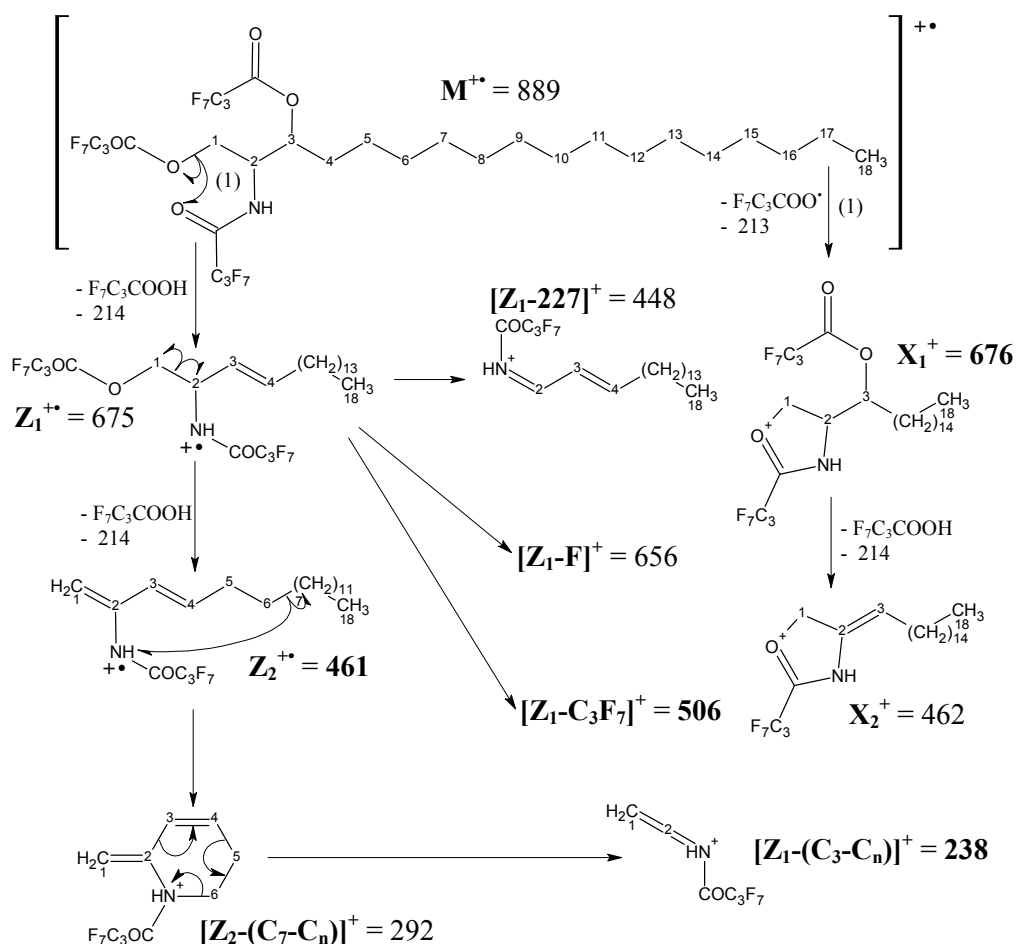


Figure 178: Les séries X et Z du dérivé HFB de la Spha C18:0

### c) Cas des phytosphingosines

Dans la partie traitant des transformations des bases sphingoïdes par la méthanolyse anhydre, nous avons fait remarquer que les 4-hydroxy-sphinganines (phytosphingosines) fournissent un composé majoritaire de déshydratation comportant un cycle furanique. Cela se produisant quand la méthanolyse est appliquée sur un céramide, ce composé est quasiment absent quand la méthanolyse est appliquée sur une phytosphingosine libre, et dans ce cas, le dérivé majoritaire est la forme intacte des 4-hydroxy-sphinganines.

#### (1) *Les spectres de masse.*

La forme furanique de déshydratation donne des spectres de masse illustrés par la figure 6 de la première publication (Pons A. et coll., 2000), ainsi que par la figure 5 de la deuxième (Pons A. et coll., 2002). Ces spectres montrent clairement 3 ions, caractéristiques de ces dérivés, aux masses  $m/z$  494, 256 et 252. Ils sont donc ceux qui nous servent à reconstituer les chromatogrammes afin de retrouver aisément ces dérivés dans un mélange (figure 6a de la première publication: Pons A. et coll., 2000).

La forme intacte fournit les spectres de masses qui sont illustrés par les figure 7a,b et c de la première publication (Pons A. et coll., 2000). Ces spectres ne montrent pas particulièrement d'ions caractéristiques de ces dérivés, toutefois, on retrouve encore l'ion  $[Z_1-(C_3-C_n)]^+$  à  $m/z$  238, déjà discuté et caractéristique de toutes les bases sphingoïdes.

#### (2) *Schémas de fragmentation des principaux ions*

##### (a) *Fragmentations du dérivé de la forme furanique*

Afin, d'illustrer les différents mécanismes de fragmentation, nous utiliserons le cas du dérivé furanique de déshydratation de la Phyt C20:0 dont le spectre (figure 6c, Pons A. et coll., 2000 et 5b, Pons A. et coll., 2002) est représenté ci-dessous (figure 179):

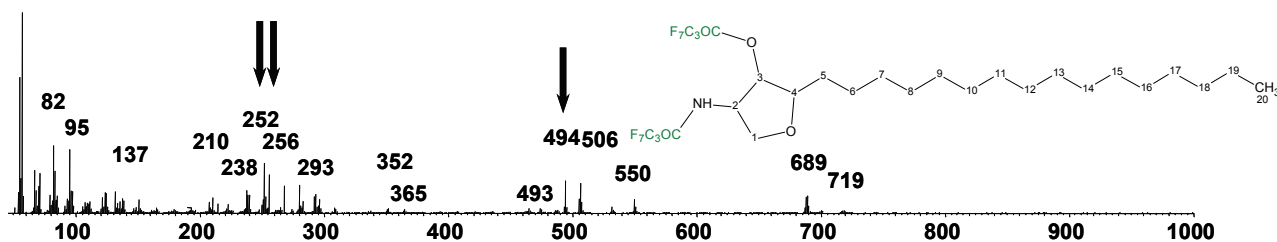
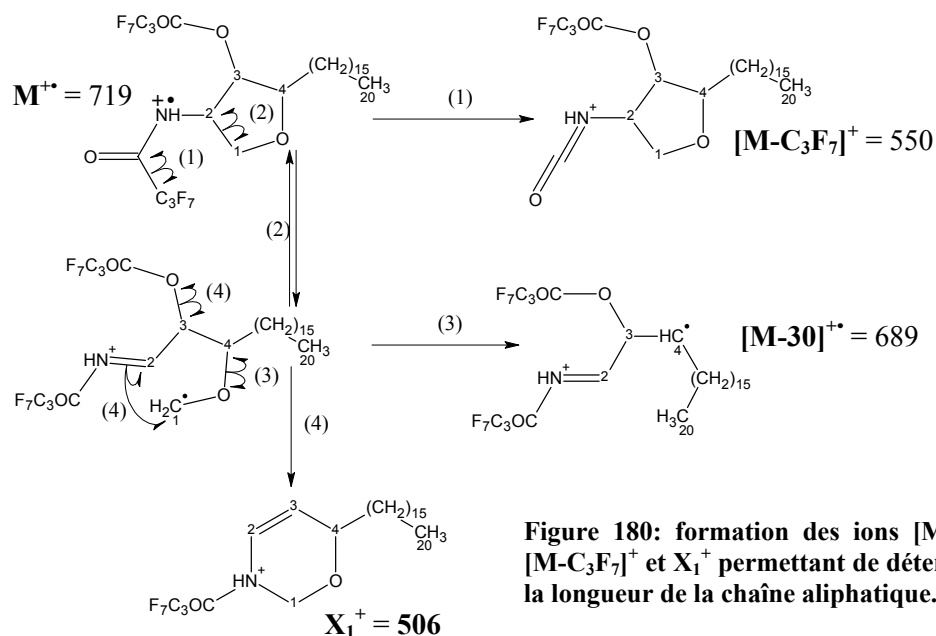
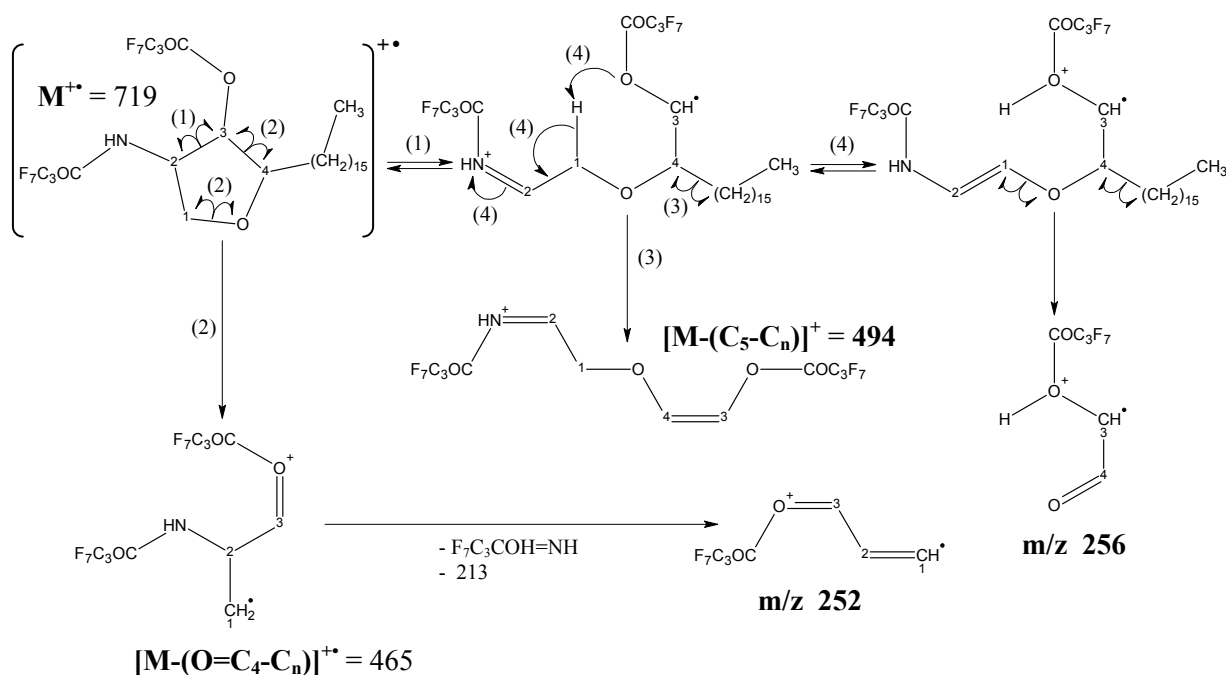


Figure 179: spectre de masse EI du dérivé HFB de la forme furanique de la Phyt C20:0, les flèches indiquent les ions diagnostiques.

Le spectre de masse montre un ion moléculaire  $M^{+\bullet}$ , qui bien que faible, est visible dans la plus part des cas, et donc, permet de déterminer aisément la longueur de la chaîne aliphatique. D'autres ions, plus intenses, permettent également de déterminer cette longueur. Il s'agit des ions  $[M-30]^{+\bullet}$ ,  $[M-C_3F_7]^+$  et  $X_1^+$  respectivement de masse  $m/z$  689, 550 et 506. Leur formation est la suivante (figure 180):



Quant aux ions caractéristiques de la forme furanique que sont  $[M-(C_5-C_n)]^+ = 494$  u,  $m/z$  256 et  $m/z$  252, leur formation suit le schéma suivant (figure 181):



(b) Fragmentations du dérivé de la forme intacte.

Pour illustrer ces différents mécanismes de fragmentation, nous prendrons ici le cas du dérivé tétra-HFB de la Phyt C18:0 dont le spectre de masse se trouve figure 7a et b de la première publication (Pons A. et coll., 2000) (figure 182).

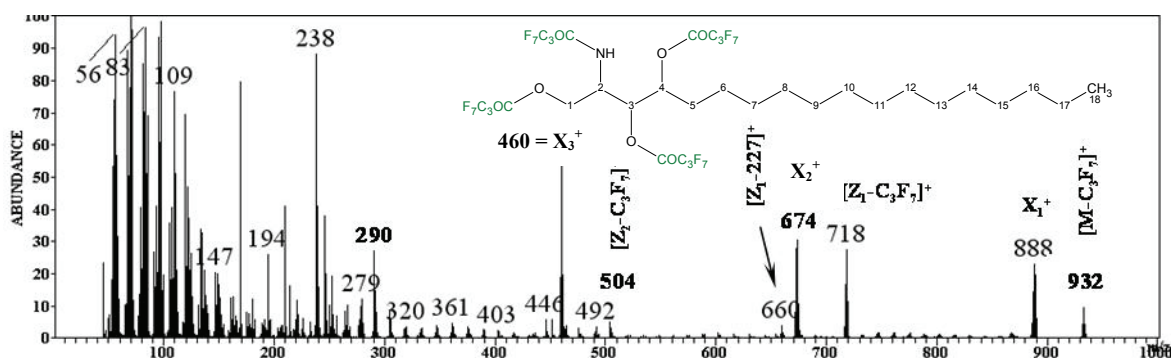


Figure 182: spectre EI du dérivé tétra-HFB de la Phyt C18:0

La masse moléculaire d'un tel dérivé tétra-HFB est de 1101 u. Il est donc impossible de voir l'ion moléculaire sur les spectres obtenus avec l'appareil de routine limité à 1000 u. Toutefois d'autres ions intenses permettent aussi de déterminer la longueur de la chaîne (figure 183).

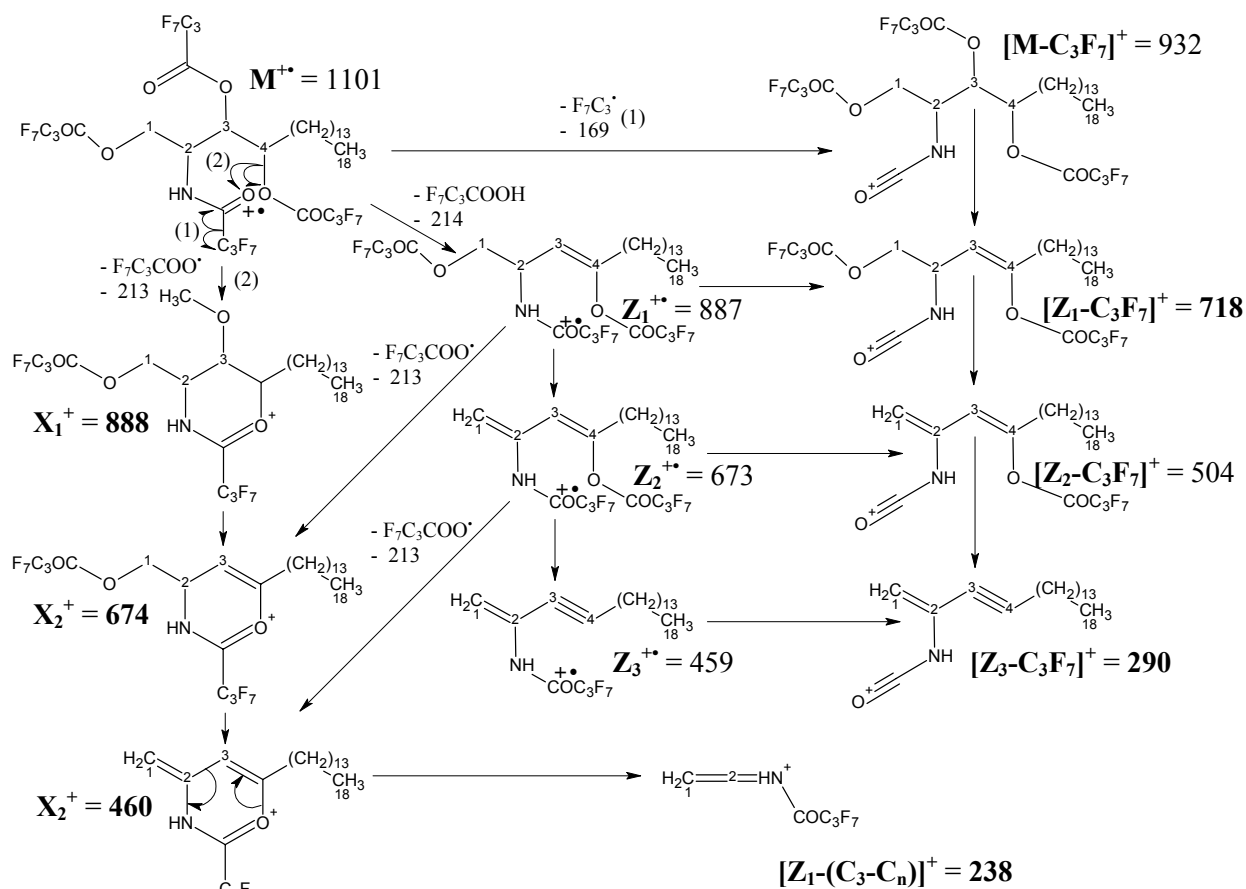


Figure 183: principales voies de fragmentation de la forme tétra-HFB de la Phyt C18:0

Tous ces ions proviennent des voies classiques de fragmentation que sont X, Z, (M-F), (M-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>) et (M-227). Ainsi, le premier que l'on observe à m/z 932 est l'ion [M-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup> et il se décline en ses ions fils [Z<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup> à m/z 718, très intense et [Z<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup> à m/z 504. La deuxième série à apparaître est la série X. Son premier représentant, X<sub>1</sub><sup>+</sup> provient de la perte d'un radical heptafluorobutyrate et peut donner des ions fils X<sub>2</sub><sup>+</sup> et X<sub>3</sub><sup>+</sup>, par la perte successive d'acide heptafluorobutyrique. On retrouve aussi la série, voisine de une unité de masse, qui débute par la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique pour donner Z<sub>1</sub><sup>++</sup>. Cet ion fournit ensuite ses ions fils Z<sub>2</sub><sup>++</sup> et Z<sub>3</sub><sup>++</sup> par le même processus. Remarquons que la série Z est minoritaire par rapport à X, car elle est en concurrence avec la série (Z-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>).

#### **d) Cas des 6-hydroxy-sphingénines**

Une partie importante de la deuxième publication (Pons A. et coll., 2002) est dévolue à la détermination de la famille, alors peu étudiée, des 6-hydroxy-sphingénines. Nous avons déjà mentionné que ces composés subissent de nombreuses transformations durant la méthanolyse anhydre, puisque pas moins de 5 dérivés différents sont formés à partir d'une 6-OH-Sphe. En plus du dérivé tétra-HFB de la forme intacte, les quatre autres formes sont plus ou moins O-méthylées. Ainsi, dans le cas de la 6-OH-Sphe C18:1, qui nous servira de modèle dans ce chapitre, les 5 dérivés obtenus sont illustrés dans la figure 6 (Pons A. et coll., 2002) de la deuxième publication et tous les spectres de masse correspondant à ces formes sont visibles figure 7 (Pons A. et coll., 2002).

##### **(1) *Les spectres de masse***

Nous ne reprendrons pas ici les spectres des 5 différents dérivés, mais seulement ceux des composés II (dérivé tri-HFB de la 4-O-méthyl-sphing-5-énine; figure 184) et V (dérivé di-HFB de la 3,6-O-diméthyl-sphing-4-énine; figure 185). En effet, le composé I (tétra-HFB Sphe C18:1) montre des ions qui sont observables dans les spectres des composés II et V, l'explication de leurs formations n'est donc pas absolument nécessaire. D'autant plus, qu'étant très minoritaire, ce composé ne peut pas servir pour la quantification, et que sa masse moléculaire (m/z 1099) est supérieure à celle qui est analysable avec l'appareil de routine. Nous ne développerons pas non plus les schémas de fragmentation des composés III (dérivé tri-HFB de la 5-O-méthyl-sphing-3-énine) et IV (dérivé tri-HFB de la 3-O-méthyl-sphing-4-énine), puisque les ions qu'ils présentent sont à peu de chose près identiques, respectivement à ceux des composés II et V.

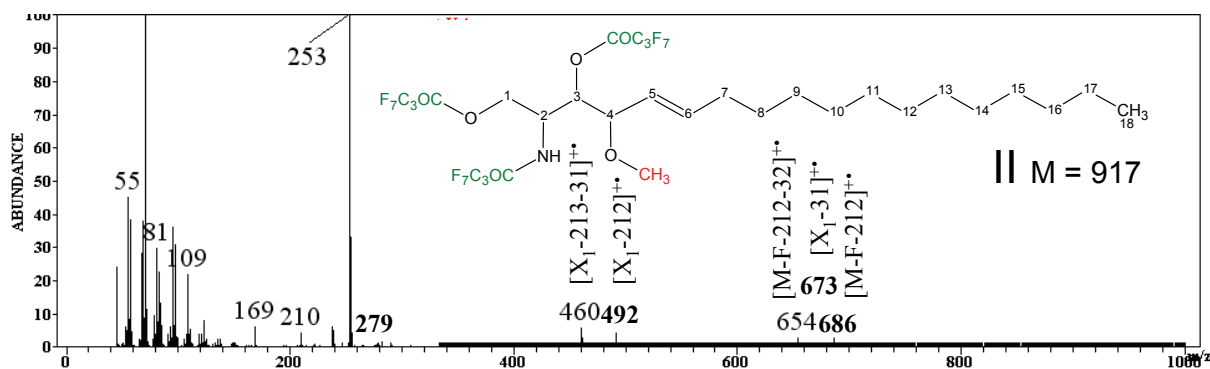


Figure 184: dérivé tri-HFB de la 4-O-méthyl-sphing-5-éne; II

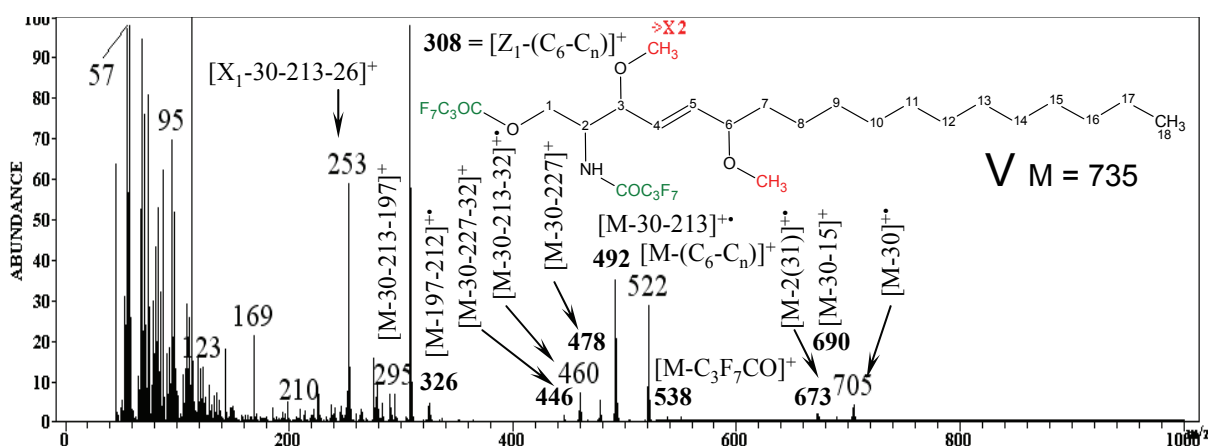


Figure 185: dérivé di-HFB de la 3,6-O-diméthyl-sphing-4-éne; V

## (2) Schémas de fragmentation des principaux ions

### (a) Fragmentations du dérivé de la forme II (dérivé tri-HFB de la 4-O-méthyl-sphing-5-éne)

Deux voies principales de fragmentation permettent de fournir tous les ions les plus abondants du spectre de masse. Curieusement, bien que ce composé ait une masse de 917 u, on ne trouve pas d'ion abondant au niveau des masses les plus élevées.

Le premier ion qui soit visible est l'ion  $[M-F-212]^+•$  à  $m/z$  686. Il peut à son tour perdre une molécule de méthanol pour donner l'ion  $[M-F-212-32]^+•$  à  $m/z$  654. D'ailleurs, cette perte est bien la preuve de l'existence d'un groupement O-méthyl-éther sur le dérivé (figure 186).

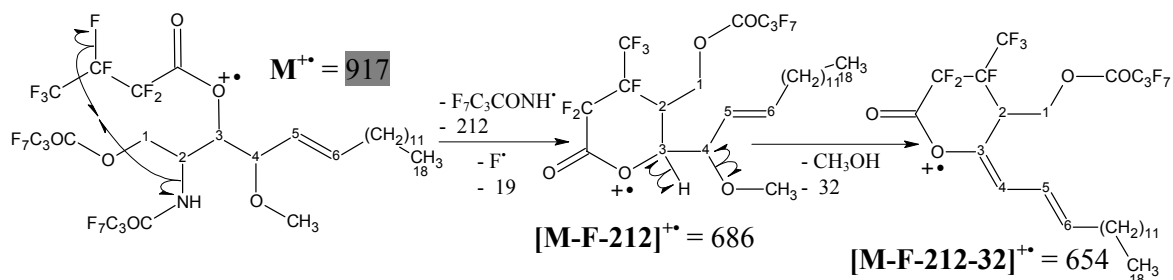


Figure 186: la voie de fragmentation (M-F-212) du dérivé tri-HFB de la 4-O-méthyl-sphing-5-éne; II

La deuxième voie de fragmentation fait appel à des mécanismes variés de doubles fragmentations. Il s'agit de la perte du groupement HFB porté par le carbone 3, accompagnée de celle d'un de ses groupements voisins (en 2 ou en 4), et cela, en formant une double liaison (figure 187).

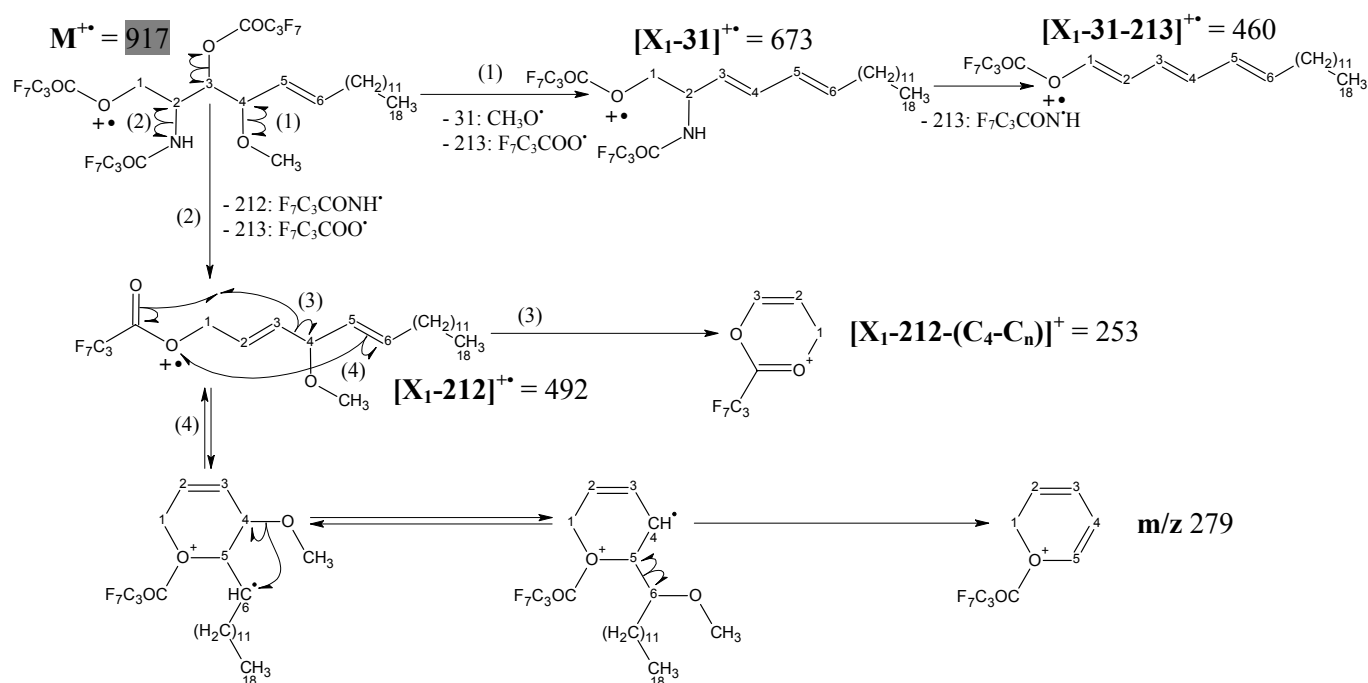


Figure 187: les voies de doubles fragmentations vicinales du dérivé tri-HFB de la 4-O-méthyl-sphing-5-énine

Ces mécanismes plausibles de doubles fragmentations conjuguées pourraient d'ailleurs expliquer le fait qu'il n'y ait pas d'ion à des masses plus proches de celle de l'ion moléculaire. Si c'est le groupement méthoxy en 4 qui accompagne le départ de l'HFB en 3, on obtient l'ion  $[X_1-31]^{+\bullet}$  d'une masse de 673 u. Cet ion peut ensuite poursuivre sa dégradation en donnant l'ion  $[X_1-31-213]^{+\bullet}$  à  $m/z$  460 qui est caractéristique de la longueur de la chaîne carbonée. Si c'est le groupement heptafluorobutyramide du carbone 2 qui part, cela produit l'ion  $[X_1-212]^{+\bullet}$  à  $m/z$  492. Par rupture de la chaîne carbonée entre  $C_3$  et  $C_4$ , il fournit l'ion  $[X_1-212-(C_4-C_n)]^+$  à 253 u, qui est l'ion le plus abondant du spectre. Il peut aussi y avoir réarrangement de l'ion  $[X_1-212]^{+\bullet}$  par cyclisation et migration du groupement méthoxy, suivi de la rupture de la liaison  $C_5-C_6$  pour donner un ion  $m/z$  279.

(b) Fragmentations du dérivé de la forme V (dérivé di-HFB de la 3,6-O-diméthyl-sphing-4-énine)

Le spectre de masse de ce dérivé est plus complexe que ceux des composés II et III, car il présente un nombre d'ion plus important. Cela s'explique par la présence d'une double liaison



entre les carbones 4 et 5, qui favorise certaines fragmentations inobservables pour les composés II et III. Ainsi, on peut considérer qu'il existe quatre voies principales de fragmentation au lieu de deux.

La première voie de fragmentation est à l'origine des ions diagnostiques des composés IV et V. En effet, à partir de l'ion moléculaire, la rupture de la liaison C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> permet la formation de l'ion [M-(C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>)]<sup>+</sup> d'une masse de 522 u. Il peut ensuite fournir l'ion [Z<sub>1</sub>-(C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>)]<sup>+</sup> à m/z 308, par la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique. Ce sont des ions très abondants, dont la masse est indépendante de la longueur de la chaîne aliphatique, ce qui explique qu'on les retrouve dans tous les spectres des composés IV et V (figure 188).

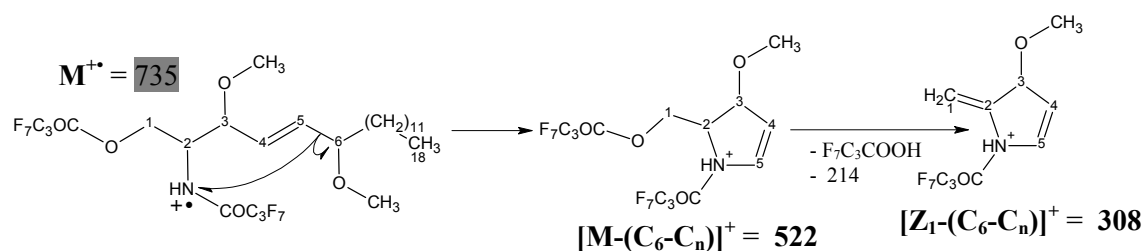


Figure 188: formation des ions diagnostiques des composés IV et V

La deuxième voie de fragmentation fait intervenir la perte, peu classique pour les dérivés de bases sphingoïdes, du radical F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>CO<sup>•</sup>. Cette voie permet donc de produire l'ion [M-F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup>. Elle permet également, après le réarrangement d'un hydrogène suivi de la perte concomitante des deux radicaux F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>CO<sup>•</sup> et <sup>•</sup>CH<sub>3</sub>, de produire l'ion [M-197-15]<sup>+</sup> à m/z 523 qui est noyé dans l'amas ionique à 522 u. à partir de cet ion, la perte du radical (C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>)<sup>•</sup> permet enfin la formation de son ion fils [M-197-15-(C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>)]<sup>+</sup> à m/z 326 (figure 189).

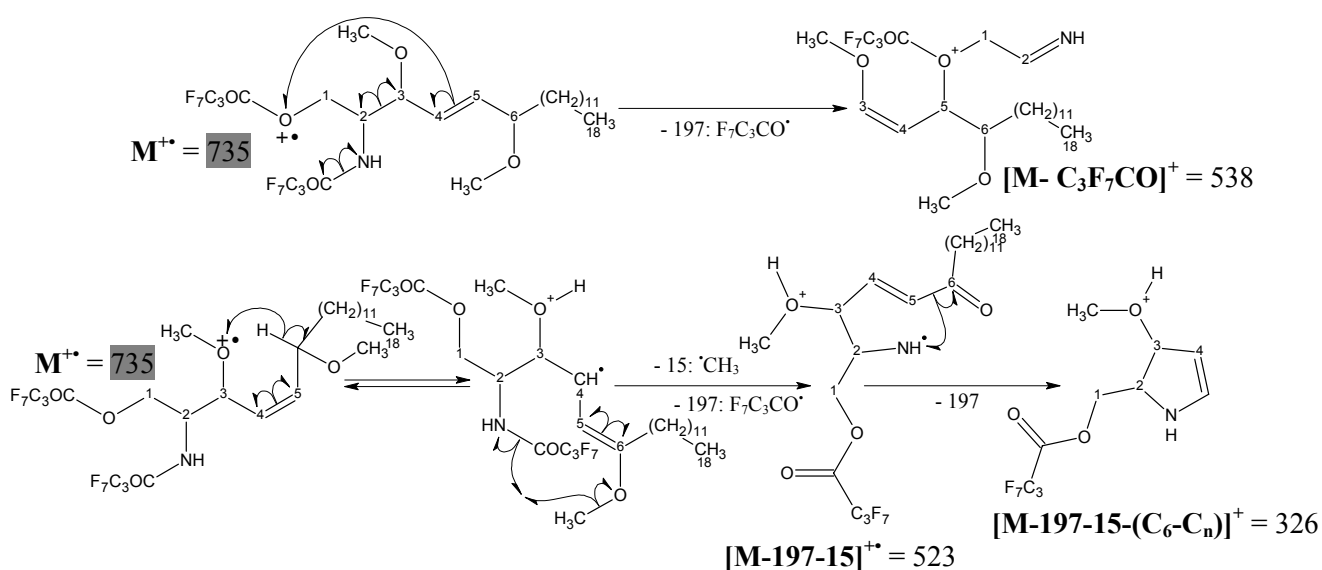
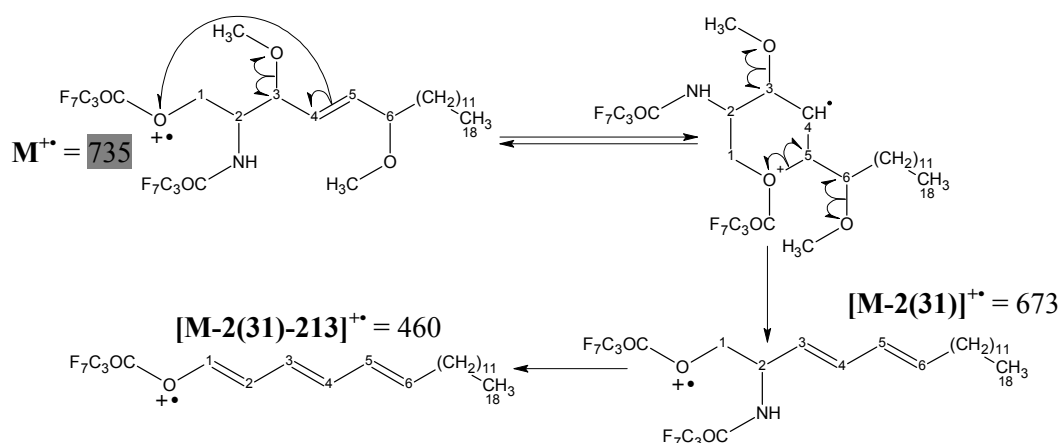


Figure 189: voie particulière de fragmentation par perte du radical F<sub>7</sub>C<sub>3</sub>CO<sup>•</sup>.

Il existe une dernière voie de fragmentation qui est en fait constituée de trois voies parallèles. Elles ont toutes en commun le fait qu'elles débutent par la perte d'un des groupements O-méthyl-éthers. Pour cela, il peut y avoir une rupture homolytique classique des deux groupements placés de chaque côté de la double liaison. Ce processus fournit l'ion  $[M-2(31)]^{+\bullet}$  à  $m/z$  673. Cet ion est d'ailleurs la preuve de la présence de deux groupements O-méthyl-éthers sur le dérivé. Pour finir, cet ion peut encore donner son ion fils  $[M-2(31)-213]^{+\bullet}$  à  $m/z$  460 par perte d'une molécule d'heptafluorobutyramide ( $F_7C_3CONH_2$ ) (figure 190).



**Figure 190: voie de fragmentation due à la perte concomitante des deux groupements métoxy**

Une deuxième possibilité est envisageable pour expliquer la perte des groupements O-méthyl-éthers. Il s'agit d'un mécanisme de réarrangement d'un hydrogène du groupe méthyle partant vers le carbone de la double liaison. Ce réarrangement aboutit à la perte d'une molécule de  $CH_2O$  pour donner l'ion  $[M-30]^{+\bullet}$  d'une masse de 705 u. Ainsi, comme pour les voies X et Z des dérivés HFB, ces deux formes ioniques fournissent un amas ionique de forme pseudo-gaussienne découlant de la présence concomitante de la voie classique (M-31) et de la voie de réarrangement (M-30). En outre, il existe deux groupements méthyles sur ce composé, il y a donc deux voies de fragmentation débutant par ce mécanisme de réarrangement.

Une voie donne l'ion  $[M-30]^{+\bullet}$  à  $m/z$  705 ayant une double liaison entre les carbones  $C_5-C_6$ . Cet ion, par perte d'une molécule d'heptafluorobutyramide ( $F_7C_3CONH_2$ ), donne l'ion  $[M-30-213]^{+\bullet}$  à  $m/z$  492. Il peut à son tour perdre une molécule de méthanol pour donner  $[M-30-213-32]^{+\bullet}$  à 460 u. remarquons que cet ion appelé ici  $[M-30-213-32]^{+\bullet}$  est exactement le même que l'ion  $[M-2(31)-213]^{+\bullet}$  de la voie précédente (figure 190). Enfin,  $[M-30]^{+\bullet}$  à  $m/z$  705 peut également donner  $[M-30-227]^+$  à  $m/z$  478 par la perte d'un radical  $F_7C_3COO-CH_2^\bullet$ , puis  $[M-30-227-32]^+$  à  $m/z$  446 par celle d'une molécule de méthanol (figure 191).

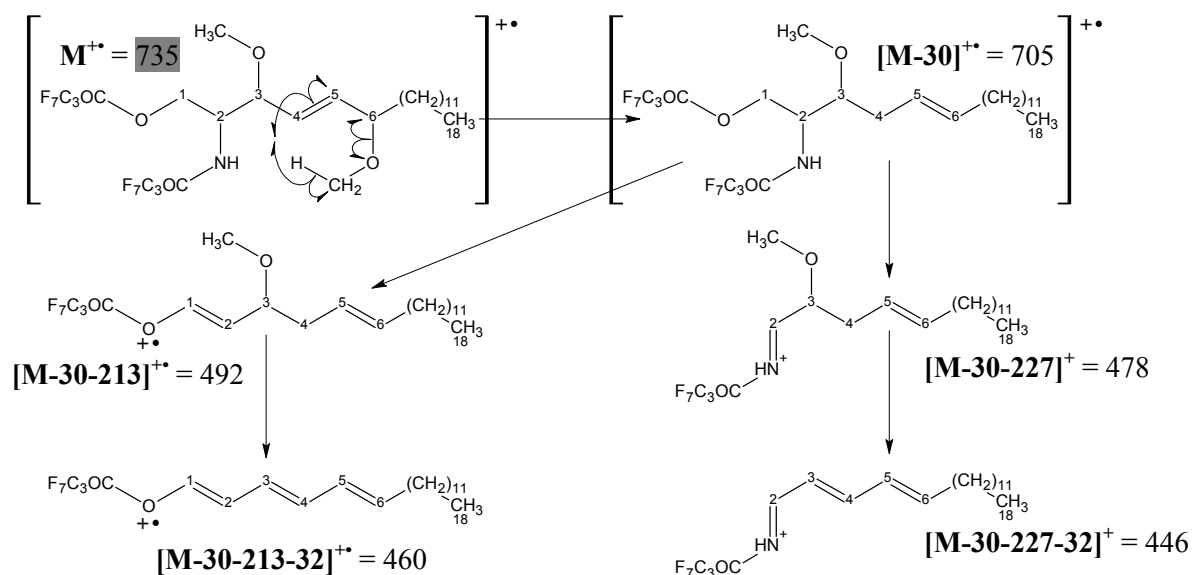


Figure 191: une des voies de fragmentation due à la perte d'un groupement  $\text{CH}_2\text{O}$

Une deuxième voie donne l'ion  $[\text{M}-30]^{+\bullet}$  ayant une double liaison entre les carbones  $\text{C}_3\text{-C}_4$ . Cette voie donne des ions isomères de la précédente et un ion supplémentaire  $[\text{M}-30-15]^+$  à  $m/z$  690 par perte d'un radical méthyle (figure 192).

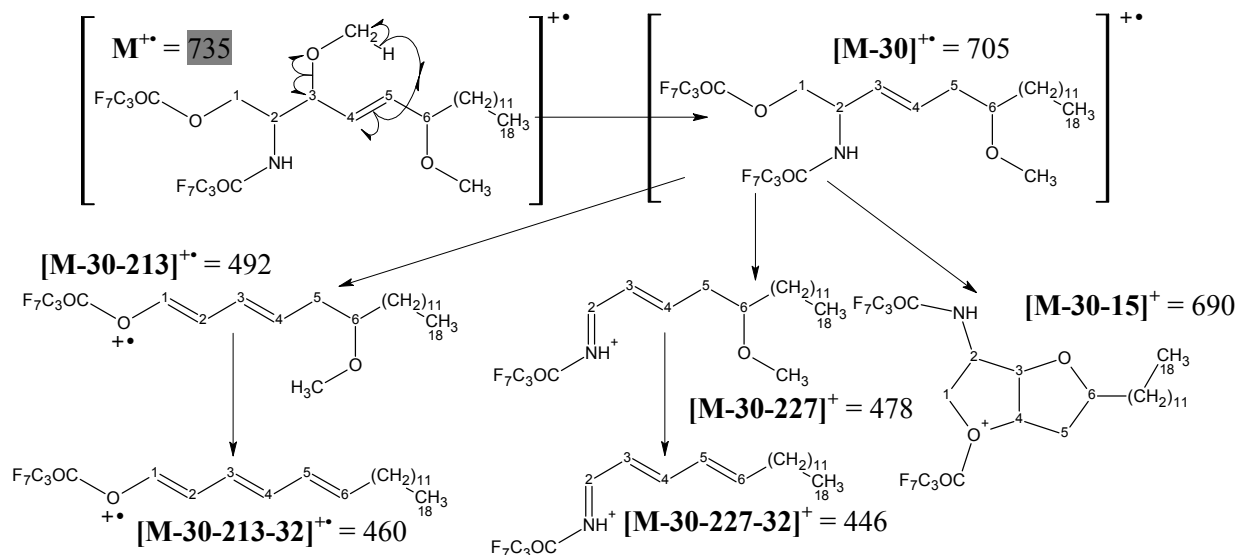


Figure 192: une des voies de fragmentation due à la perte d'un groupement  $\text{CH}_2\text{O}$

#### **IV. Exemple d'utilisation des dérivés HFB pour l'analyse de composés glycolipidiques**

Nous venons de voir que les dérivés HFB sont bien adaptés à l'analyse des composés lipidiques. En ajoutant à cela leur capacité à former des dérivés avec les O-méthyl-glycosides, cette méthode de dérivation semble être parfaitement recommandable pour l'analyse complète de la composition des glycolipides. Ainsi, nous allons décrire deux analyses de ce type de composés. La première s'attache à déterminer la composition complète des gangliosides des membranes plasmiques synaptosomales du cerveau de rat; la seconde, à déterminer la composition de Glycosyl-phosphatidylinositols (GPI) d'origines variables.

##### **A. Caractérisation de la structure des gangliosides des membranes plasmiques synaptosomales du cerveau de rat**

###### **1) Introduction**

En 1980, Zanetta et coll. avaient publié une étude de la composition des gangliosides du cervelet de rat. Afin de déterminer cette composition, les auteurs utilisèrent le protocole suivant: (1) après extraction des gangliosides par des mélanges chloroforme/méthanol et partition de phase (Suzuki K., 1964); (2) les constituants de la phase supérieure étaient saponifiés et séparés selon leur charge (nombre d'acides sialiques) par l'utilisation d'une chromatographie d'échange ionique sur DEAE-Sephadex et élution par un gradient de formiate d'ammonium en présence de méthanol (Momoi T. et coll., 1976); (3) les fractions contenant en gros, les mono-, di-, tri- et tetra-sialogangliosides étaient purifiées par chromatographie sur couche mince à l'aide d'un nouveau solvant de migration; (4) enfin, les gangliosides identifiés par le résorcinol/HCl (Svennerholm L., 1957) étaient caractérisés, soit par traitement enzymatique, soit par GC après méthanolyse et transformation en dérivé TFA (Zanetta J. P. et coll., 1972). A cette époque, le responsable du Dr Zanetta incitait à faire ces analyses en utilisant les dérivés TMS (après N-réacétylation) plus sensibles que les dérivés TFA. Or, il est apparu que les résultats de ces analyses ont été très décevants. En effet, les analyses des dérivés TMS montraient une absence d'hexosamine (GalNAc) et d'acides sialiques, contrairement aux dérivés TFA qui donnaient une composition molaire correcte (à 0,1% près) des mêmes composés. Ces expériences préliminaires suggéraient que la formation des dérivés TMS pouvait être influencée par la présence de traces de silice provenant de la dernière étape de purification des composés (comme elle l'était par la présence de sels et de

détergents). C'est en fait cet échec de l'analyse en GC de ces composés qui a incité le Dr. Zanetta à développer la méthodologie des dérivés HFB. Ce protocole d'isolement des gangliosides avait permis d'en décrire 28 types différents (Zanetta J. P. et coll., 1980). Ainsi, cette approche avait permis de montrer, pour la première fois, une hétérogénéité extrême des gangliosides du système nerveux central de rat, les études précédentes (conduites par TLC dans des solvants peu résolutifs) n'en identifiant que huit. Dans ce même article, il était démontré que les rapports entre gangliosides étaient profondément modifiés lors du développement post-natal et que ces variations n'impliquaient pas forcément les mêmes entités que celles proposées au préalable.

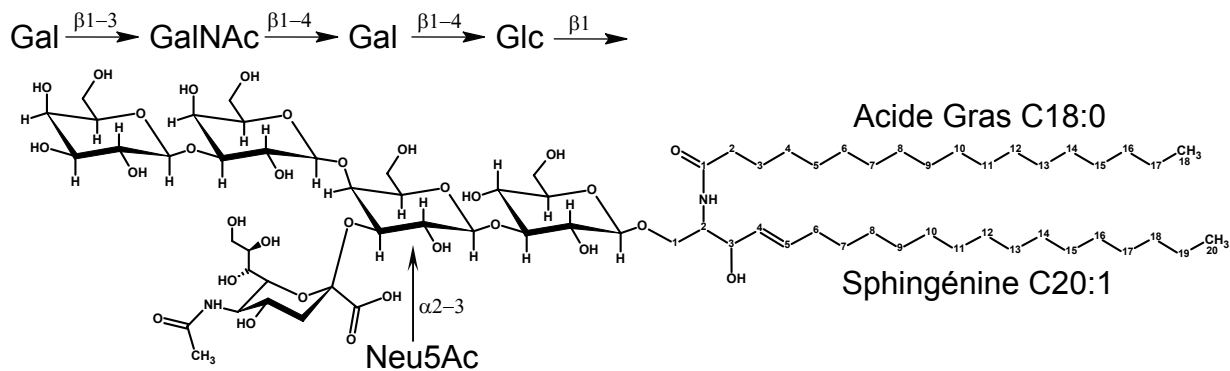
La même méthodologie d'isolement des gangliosides a été appliquée par le Dr. Zanetta lors de son arrivée à l'UMR sur un pool total de gangliosides isolés des membranes plasmiques synaptosomales du cervelet de rat, à la différence que la phase supérieure de Folch n'a pas été soumise à une saponification, d'où la préservation des O-acétylation possibles des acides sialiques. Après l'application du protocole complet, 42 échantillons ont pu être isolés. En fait, l'hétérogénéité du matériel était a priori moindre puisque Momoi et coll. (1976) avaient montré que lors de la séparation d'échange ionique sur DEAE Séphadex, ils avaient une séparation incomplète entre mono- et di-, entre di- et tri- et entre tri- et tetra-sialogangliosides. Néanmoins, l'utilisation de l'HPLC permettait d'isoler tous les composés, certains se trouvant dans deux fractions différentes (mono- et di-sialogangliosides, par exemple), mais avec le même Rf. En conséquence, dans ce qui suit, on ne sera pas étonné de retrouver un composé mono-sialylé mineur dans la fraction contenant en majorité les di-sialogangliosides (voir les tri-sialogangliosides). En 1999, nous avons repris ces échantillons. Mais pour aller plus loin que de simples chromatographies en couche mince ou chromatographies de phase gazeuse pour caractériser la structure des gangliosides, nous avons imaginé un protocole faisant intervenir différentes techniques de spectrométrie de masse. En effet, depuis les années 80, ces techniques ont évolué et se sont démocratisées, permettant actuellement de caractériser chaque ganglioside le plus fidèlement possible en analysant des quantités d'échantillons compatibles avec les concentrations physiologiques.

## **2) Problèmes de l'analyse structurale des gangliosides**

### **a) Rappels sur la structure des gangliosides**

Les gangliosides sont des glycolipides sialylés. Ce sont des molécules amphiphiles, composées de deux régions principales: l'une est hydrophobe et intramembranaire, l'autre est hydrophile et extracellulaire.

La région hydrophobe est localisée dans le feuillet externe des membranes plasmiques. Elle est constituée d'un céramide (Cer) issu de l'association par une liaison amide, d'un amino-alcool (la base sphingoïde) et d'un acide gras à longue chaîne. La chaîne oligosaccharidique est orientée vers le milieu extracellulaire. Elle est composée d'un enchaînement de longueur variable de résidus monosaccharidiques bien définis, sur lesquels se trouve un nombre différent d'acides sialiques (en général sur les résidus de Gal). En outre, il a été décrit la possibilité d'y trouver un résidu de fucose (Fuc) (figure 193).



**Figure193: structure d'un GM1a**

Qu'il s'agisse des bases sphingoïdes, des acides gras ou des acides sialiques, ces trois types de composés sont connus pour avoir une grande variabilité structurale. Il est donc évident que les gangliosides constituent une famille de molécules extrêmement hétérogène. Cette complexité de structure est d'ailleurs à l'origine de la nomenclature la plus communément utilisée pour différencier les constituants de cette famille.

### **b) La nomenclature abrégée de Svennerholm (1963).**

Le fait que nous soyons en présence de gangliosides est indiqué par la lettre G. Elle est suivie par le nombre de résidus d'acides sialiques, désigné par les lettres M pour mono-, D pour di-, T pour tri-, Q pour tetra- et P pour penta-sialo-ganglioside. Un nombre est alors attribué individuellement à chaque composé, en fonction de sa migration lors des chromatographies en couche mince. Ce chiffre renseigne en fait sur le nombre de résidus monosaccharidiques présents dans la chaîne hydrophile:

1 = quatre sucres: Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Gal( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1)Cer

2 = trois sucres: GalNAc( $\beta$ 1-4)Gal( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1)Cer

3 = deux sucres: Gal( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1)Cer

4 = un sucre: Gal( $\beta$ 1)Cer

Enfin, une lettre (a, b ou c) peut y être ajoutée pour décrire l'emplacement des acides sialiques sur la chaîne glycanique.

a : il y a un acide sialique sur le galactose central

b : il y a deux acides sialiques sur le galactose central

c : il y a trois acides sialiques sur le galactose central

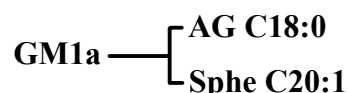
#### Remarques:

- La lettre X peut être utilisée pour envisager plusieurs possibilités de sialylations sur une même chaîne glycanique.

- La lettre b placée derrière GM1 signifie que l'acide sialique est placé sur le galactose terminal.

- Seules les chaînes de type GX1 sont véritablement des gangliosides au sens propre du terme. Les autres (GX2, GX3 et GX4) n'en sont pas, mais sont souvent considérés comme tels, en raison de leur appartenance à la même voie de biosynthèse et de la présence d'acides sialiques.

Cette nomenclature n'est certes pas complète et ne permet pas de décrire avec précision la structure fine d'un ganglioside. Notamment, elle ne permet pas de décrire la composition de l'encrage lipidique. Malgré cet inconvénient important, cette nomenclature semble la plus facile d'utilisation. En effet, elle permet de décrire simplement la structure des gangliosides, contrairement à la nomenclature officielle qui est pratiquement inutilisable en raison de sa complexité et de la longueur des noms qu'elle donne aux molécules. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, quand la description de la partie lipidique sera nécessaire, nous utiliserons cette nomenclature en y adjoignant la composition du céramide. Ainsi, l'exemple précédent sera nommé:



#### c) L'analyse de la structure des gangliosides par MALDI-TOF: avantages et inconvénients

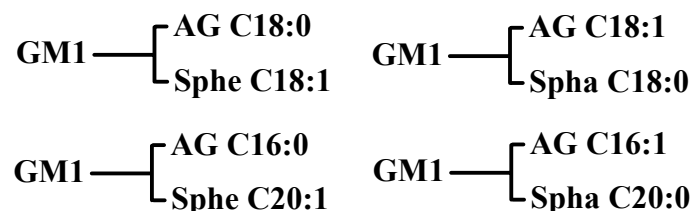
Ces dernières années, on a vu apparaître plusieurs études faisant intervenir l'analyse de la structure des gangliosides par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par une

matrice (MALDI) (Juhasz P. et coll., 1992; Harvey D. J., 1995; Powell A. K. et coll., 1996 et Sugiyama E. et coll., 1997). Cette technique permet une bonne caractérisation des gangliosides en partant de quantités très faibles d'échantillon (quelques pmol, voire moins, pour les dérivés per-méthylés). C'est donc naturellement la méthode que nous avons choisie pour la caractérisation de nos échantillons. Ainsi, il est possible d'analyser les gangliosides sous forme native (Juhasz P. et coll., 1992 et Harvey D. J., 1995). Toutefois, la désorption par MALDI est un processus qui libère une quantité d'énergie suffisamment importante pour arracher les acides sialiques branchés sur les glycoconjugués ou bien pour induire la perte de CO<sub>2</sub> à partir des fonctions acides. Cela donne des spectres qui ne comportent malheureusement qu'un faible signal correspondant au ganglioside intact. Dans ce cas, le signal est remplacé par des pics correspondant aux produits de la perte des acides sialiques ou seulement d'une molécule de CO<sub>2</sub>. En tout cas, cela fournit des spectres très riches en pics et parfois difficiles à analyser. Pour éviter cela, il est recommandé de faire subir une méthyl-estérification de la fonction acide portée par le carbone 1 des acides sialiques (Powell A. K. et coll., 1996 et Sugiyama E. et coll., 1997). Les gangliosides, ainsi protégés, deviennent beaucoup moins sensibles lors de la désorption laser et les spectres montrent quasi-exclusivement les pics correspondant au gangliosides méthyl-estérifiés intacts. Quant aux gangliosides qui ont été per-méthylés, cela permet d'augmenter de façon très importante le signal des dérivés, ce qui autorise l'analyse de quantités d'échantillons très faibles, de l'ordre d'une dizaine de fmol. En outre, ce type de dérivation semble être une bonne protection des acides sialiques qui ne présentent qu'une dégradation marginale qui, dans certains cas, peut être très informative (Juhasz P. et coll., 1992).

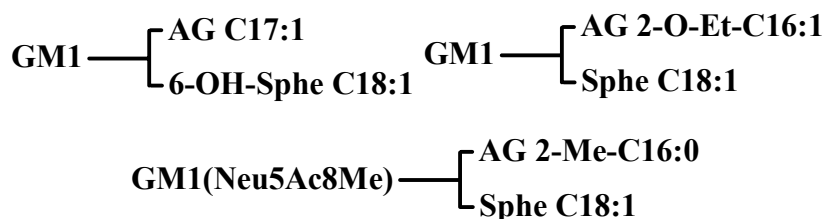
Un des gros avantages de l'analyse structurale de gangliosides par MALDI-TOF provient du fait que cette technique permet dans certains cas de déterminer l'emplacement des acides sialiques sur la chaîne glycanique. Ainsi, il est possible de distinguer deux gangliosides comme le GD1a et le GD1b qui ont pourtant la même masse. Dans le cas des dérivés natifs, des per-méthylés et dans une moindre mesure, dans celui des dérivés méthyl-esters, ce sont les variations de dégradations des acides sialiques qui vont permettre de déterminer sur quel galactose ils sont greffés (Juhasz P. et coll., 1992; Powell A. K. et coll., 1996). Dans d'autres cas, c'est la forme ionique obtenue qui va permettre de déterminer la structure du ganglioside. Ainsi, un GD1a méthyl-estérifié analysé en mode négatif donne principalement un ion  $[M+Na-2H]^-$ , alors qu'un GD1b donne principalement un ion  $[M-H_2O-H]^-$  (Sugiyama E. et coll., 1997).



Cependant, le gros problème de l'analyse de produit par le MALDI-TOF vient du fait que, les spectres montrant la masse moléculaire (totale), il est parfois impossible de déterminer la structure exacte d'une molécule. Ainsi tous les gangliosides suivants (très classiques et parmi les plus abondants des gangliosides de mammifères) varient par leur partie lipidique mais ont exactement la même masse ( $M = 1546,8$  u.):



Cette masse est aussi celle de composés hypothétiques dont la partie céramide est beaucoup moins classique. La présence d'un acide sialique différent d'un Neu5Ac peut aussi être envisagée. Il est donc possible d'imaginer l'existence de composés "exotiques" qui restent théoriquement envisageables, tels que:



On comprend donc que la simple utilisation du MALDI-TOF n'est pas suffisante pour déterminer la composition exacte d'un échantillon en ganglioside. Il est donc absolument nécessaire, en plus de cette méthode, d'analyser les échantillons avec une méthode qui permette de connaître avec certitude la composition de chaque ganglioside; à savoir, la composition en monosaccharides, acides gras et bases sphingoïdes de chaque échantillon. Pour cela il faut utiliser une technique de spectrométrie de masse qui permette d'analyser des fragments. Ainsi, en plus de certaines techniques fragmentaires comme l'ESI-MS, le PSD-MALDI-TOF, etc., dont les fragmentations sont parfois aléatoires et souvent insuffisantes pour déterminer la composition complète d'un ganglioside, il nous a semblé que la méthode de GC-MS par impact électronique des dérivés HFB obtenus après méthanolyse des gangliosides pourrait être une bonne technique. En effet, comme nous l'avons déjà décrit dans les chapitres précédents, elle est très bien adaptée à la détermination de la composition d'un échantillon en acides sialiques, autres monosaccharides, acides gras et bases sphingoïdes. Nous avons donc développé un protocole d'analyse des gangliosides qui fait intervenir cette

méthode, puis nous l'avons appliqué à l'analyse de la composition totale en gangliosides des SPM du cerveau de rat. Ce protocole est le suivant (figure 194):

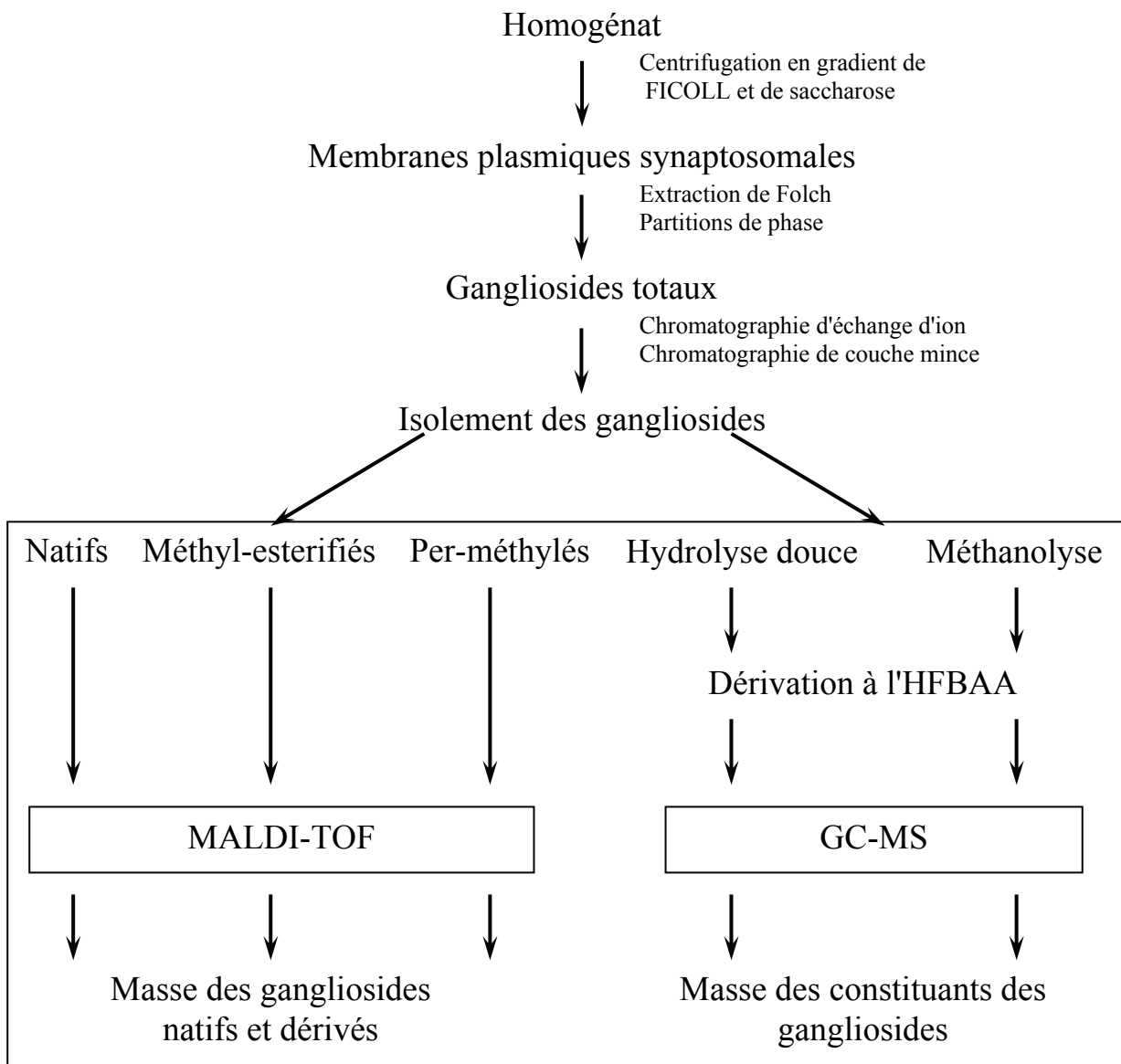


Figure 194: protocole analytique des gangliosides

### **3) Analyse de la composition gangliosidique totale des membranes plasmiques synaptosomales du cerveau de rat**

#### **a) Matériels et méthodes**

Les étapes d'extraction et de purification des gangliosides des SPM n'ayant pas été réalisés lors de cette thèse, nous ne les développerons pas ici. Nos explications débiteront donc au niveau des différents types d'analyses par spectrométrie de masse.

Toutes les informations nécessaires à l'analyse des acides sialiques après hydrolyse douce et formation des dérivés HFB, ont été développées dans le chapitre qui y est dévolu (voir p. 207). Il en est de même pour les analyses après méthanolyse des monosaccharides (voir P. 115), des FAME's (voir p. 240) et des dérivés des bases sphingoïdes (voir p. 247) qui ont également été largement décrites dans les chapitres correspondants. C'est pourquoi, nous ne développerons ici que les différentes techniques de dérivation des gangliosides en vue d'analyse par MALDI-TOF.

La spectrométrie de masse par désorption laser assisté par une matrice (MALDI), consiste à mélanger la substance à analyser avec une solution de molécules aromatiques (la matrice) qui possède une forte absorption à la longueur d'onde du laser (337 nm pour un laser à azote). Lors de l'irradiation par le laser, libérant une importante quantité d'énergie dans la phase condensée, il y a une désorption des ions formés par transfert de proton entre la matrice photo-excitée et la substance à analyser. Les ions formés parcourent alors un analyseur à temps de vol (TOF) qui permet d'étudier des molécules de masses moléculaires élevées sans les dégrader. Dans notre cas, la matrice choisie est une solution de DHB (acide 2,5-dihydroxy-benzoïque à 10 mg/ml dans un mélange CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O: 70/30, v/v). matrice qui a la particularité de donner de bons résultats quel que soit le type de dérivés de gangliosides analysé (gangliosides natifs, méthyl-estérifiés ou per-méthylés).

- Dans le cas des gangliosides natifs, le protocole analytique est le suivant:

L'échantillon à analyser est directement repris par une solution de chloroforme/méthanol (1/2, v/v) afin d'obtenir la concentration idéale d'environ 10 pmol/μl. 1 μl de matrice est placé sur la cible puis, 1 μl de la solution de ganglioside y est ajouté et mélangé délicatement par plusieurs aspirations successives avec la pipette de dépôt.

- Pour les gangliosides méthyl-estérifiés, la méthode du groupe de D. J. Harvey est très efficace. Le protocole en est le suivant:

L'échantillon (10 μl d'une solution d'environ 10 pmol/μl de gangliosides dans un mélange chloroforme/méthanol: 1/2, v/v) est séché sous un courant d'azote. On y ajoute 50 μl de DMSO et 50 μl d'iodure de méthyle (ICH<sub>3</sub>). La réaction est conduite pendant 2 h, à température ambiante et à l'obscurité. L'excès d'ICH<sub>3</sub> est évaporé sous azote tandis que le DMSO est ensuite éliminé par lyophilisation (Powell A. K. et coll., 1996).

Pour le dépôt, l'échantillon est repris par 20 μl d'un mélange (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O: 90/10, v/v). 1 μl d'une solution de matrice DHB est placé sur la cible avant d'y ajouter 1 μl de l'échantillon et après mélange des deux solutions, on sèche sous un courant d'air.

- Pour la formation des dérivés per-méthylés, nous avons utilisé le protocole déjà décrit dans les généralités pour l'analyse en GC-MS des dérivés per-méthylés des monosaccharides (Ciucanu et coll., 1984). Nous rappelons ici brièvement ce protocole:

L'échantillon (10  $\mu$ l d'une solution d'environ 10 pmol/ $\mu$ l dans un mélange chloroforme/méthanol: 1/2, v/v) est séché sous un courant d'azote. Il est repris par 200  $\mu$ l de DMSO anhydre sous argon, soniqué pendant 5 min, puis on y ajoute une pincée de NaOH pulvérisée et 100  $\mu$ l d'ICH<sub>3</sub>. Ce mélange est alors soniqué pendant une heure. Au bout de ce laps de temps, la méthylation est stoppée par l'addition de 1 ml de chloroforme et 1 ml d'acide acétique à 5%. Après agitation puis décantation, la phase aqueuse supérieure est éliminée et la phase chloroformique est rincée au moins 8 fois par 1 ml d'eau. Cette phase organique ainsi rincée contenant uniquement les gangliosides per-méthylés est alors séchée puis reprise par environ 20 à 50  $\mu$ l de chloroforme avant d'en déposer 1  $\mu$ l dans 1  $\mu$ l de matrice préalablement placé sur la cible.

- Notons que pour les dérivés natifs, les meilleurs résultats que nous ayons obtenus l'ont été en mode réflectron négatif, alors que pour les dérivés méthyl-esters et per-méthylés, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le mode réflectron positif.

## **b) Résultats et discussion**

Après avoir isolé les SPM du cerveau de rat, la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex a permis de séparer grossièrement les gangliosides en quatre sous-familles en fonction de leurs charges. La première, dénommée I, contenait essentiellement les mono-sialogangliosides, la seconde II contenait les di-sialogangliosides, la troisième III les tri-sialogangliosides et enfin la quatrième IV contenait les gangliosides de plus de trois acides sialiques. Chacune de ces quatre fractions a ensuite subi une chromatographie préparative sur couche mince (Zanetta J. P. et coll., 1980). Au terme de ces séparations, 37 spots différents ont été obtenus. La série I présentait 8 spots, dont un majeur qui a été divisé en deux échantillons (composés I5 et I5'). Ainsi, 9 échantillons ont été isolés et appelés I1, I2, I3, I4, I5, I5', I6, I7 et I8. Notons que I1 est le spot de plus fort Rf et I8 de plus faible Rf. La série II a donné 14 spots qui ont été nommés de II1 à II14, la série III a donné 9 spots (de III1 à III9) et enfin, la série IV a donné 5 spots (de IV1 à IV5, selon les migrations). Ces 37 échantillons ont subi les différentes analyses de spectrométrie de masse que nous avons décrites. Les résultats que nous avons obtenus pour chaque échantillon présentent les mêmes caractéristiques lors des analyses en MALDI-TOF. C'est pourquoi, afin de raccourcir ce chapitre, nous ne

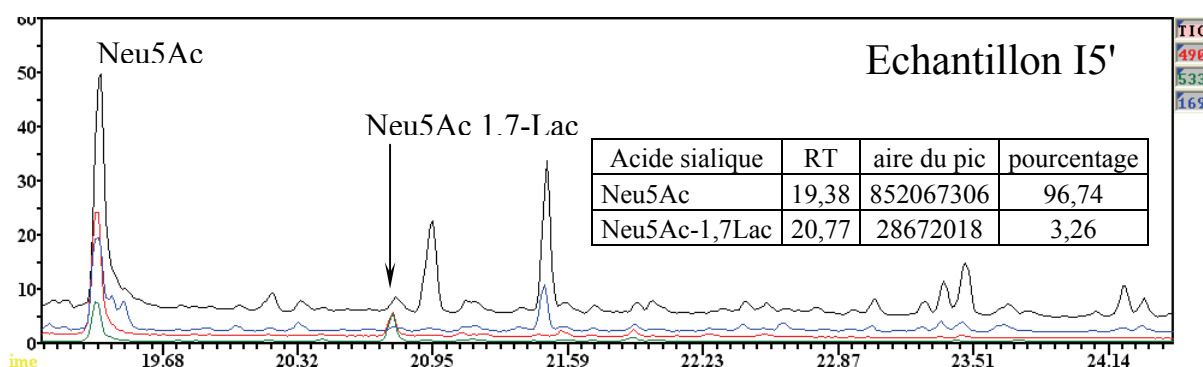
développons ici que ceux qui correspondent au ganglioside le plus abondant, le GM1. Les résultats obtenus pour les autres échantillons seront donc résumés dans les tableaux 13-16 p.288-289.

**(1) Les résultats obtenus pour le GM1 .**

Trois spots de chromatographie sur couche mince correspondent au GM1, il s'agit des spots I4, I5 et I5'. En fait, I5 et I5' présentent exactement les mêmes caractéristiques quel que soit le type d'analyse. Il s'agit donc du même composé. Nous n'allons donc développer que les données obtenues pour I4 et I5'.

**(a) La GC-MS après hydrolyse douce et dérivation par l'HFBA**

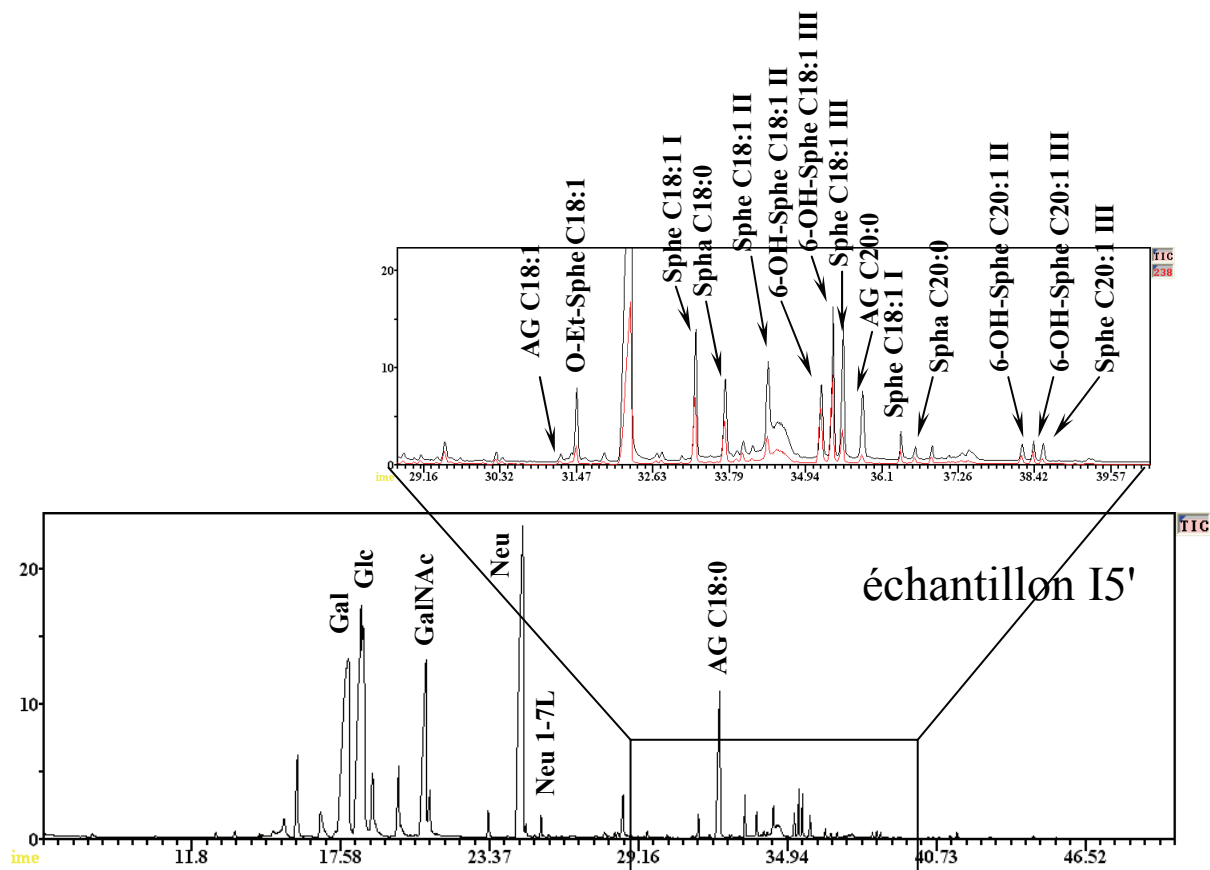
Comme nous l'avons déjà expliqué, cette technique permet de déterminer la composition d'un échantillon en acide sialique. Ici, les deux échantillons I4 et I5' donnent des résultats presque identiques. Ils contiennent quasi-exclusivement du Neu5Ac, accompagné d'une toute petite quantité de ce même acide sialique sous sa forme lactone. Ce fait est parfaitement illustré par le chromatogramme obtenu pour l'échantillon I5' (figure 195).



**Figure 195: chromatogramme obtenu à partir de l'échantillon I5',** après hydrolyse douce, méthylation et dérivation par l'HFBA. Les chromatogrammes reconstitués à partir des ions diagnostiques y sont ajoutés.

**(b) La GC-MS après méthanolyse et dérivation à l'HFBA**

Comme nous le savons maintenant, cette méthode permet de déterminer la composition d'un échantillon en monosaccharides, acides gras et bases sphingoïdes. Ainsi, au premier regard, les chromatogrammes obtenus à partir des deux échantillons I4 et I5' sont assez semblables. C'est pourquoi, nous n'illustrons les résultats qu'avec celui du I5' qui correspond au composé le plus abondant des deux (figure 196).



**Figure 196: chromatogramme obtenu à partir de l'échantillon I5'.** Après méthanolyse et dérivation par l'HFBA. La partie du chromatogramme montrant les lipides a été amplifiée. **En rouge:** chromatogramme obtenu uniquement à partir de l'ion diagnostique des bases sphingoïdes à m/z 238 u.

Lorsque l'on observe le tableau récapitulatifs de la composition de ces deux échantillons (tableau 7), on constate que la composition relative molaire en monosaccharides correspond bien à la structure du GM1. On peut toutefois noter une réponse des résidus de Gal un peu faible par rapport à une quantité théorique de 2 résidus par molécule de ganglioside.

| Monosaccharides |                       |                        |
|-----------------|-----------------------|------------------------|
|                 | Rapport Molaire de I4 | Rapport Molaire de I5' |
| Gal             | 1,65                  | 1,56                   |
| Glc             | 1,04                  | 1,35                   |
| GalNAc          | 1,00                  | 1,00                   |
| NeuAc           | 1,00                  | 0,99                   |
| Neu-1,7Lac      | 0,02                  | 0,02                   |
| Total           | 4,58                  | 4,92                   |

**Tableau 7: composition monosaccharidique des échantillons I4 et I5'** déterminée par GC-MS Après méthanolyse et dérivation par l'HFBA

En revanche, la composition lipidique est assez différente d'un échantillon à l'autre (tableaux 8 et 9). En effet, en ce qui concerne les acides gras: bien que l'octadécanoate (C18:0) soit majoritaire dans les deux échantillons, il est extrêmement abondant dans le I5' et ne représente qu'un peu plus de la moitié des acides gras pour l'échantillon I4. Pour ce qui est des bases

sphingoïdes, l'échantillons I5' a une composition très classique en regard des résultats obtenus pour l'ensemble des 37 échantillons. Par contre, l'échantillons I4' montre une présence importante de bases sphingoïdes plus rares qui, d'après leur spectre de masse, présentent des groupements O-éthyles (Pons A. et coll., 2000).

| Acides gras                    |                     |                      |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|
|                                | Pourcentage pour I4 | Pourcentage pour I5' |
| tétradécanoate C14:0           | 5,14                | 0,00                 |
| Me-?-tétradécanoate Me-?-C14:0 | 0,80                | 0,00                 |
| Me-?-tétradécanoate Me-?-C14:0 | 0,60                | 0,00                 |
| pentadécanoate C15:0           | 2,05                | 0,00                 |
| hexadécanoate C16:0            | 20,05               | 1,36                 |
| Me-?-hexadécanoate Me-?-C16:0  | 0,20                | 0,00                 |
| Me-2-hexadécanoate Me-2-C16:0  | 0,39                | 0,00                 |
| heptadécanoate C17:0           | 0,94                | 0,00                 |
| octadécanoate C18:0            | 64,67               | 91,01                |
| Me-2-octadécanoate Me-2-C18:0  | 1,66                | 0,00                 |
| nonadécanoate C19:0            | 0,28                | 0,00                 |
| eicosanoate C20:0              | 3,21                | 7,28                 |
| hénicosanoate C21:0            | 0,00                | 0,07                 |
| docosanoate C22:0              | 0,00                | 0,19                 |
| tétracosanoate C24:0           | 0,00                | 0,08                 |
| Total                          | 100,00              | 100,00               |

**Tableau 8: composition en acides gras des échantillons I4 et I5', déterminée par GC-MS après méthanolyse et dérivation par l'HFBA.**

| Bases sphingoïdes   |                     |                      |
|---------------------|---------------------|----------------------|
|                     | Pourcentage pour I4 | Pourcentage pour I5' |
| ?-O-Et-Sphe C18:1   | 8,91                | 6,65                 |
| 3-O-Et- Spha C15:0  | 21,57               | 0,29                 |
| Spha C18:0          | 13,49               | 9,58                 |
| 6-OH-Sphe C18:1 III | 19,18               | 45,63                |
| Sphe C18:1 III      | 9,73                | 25,34                |
| 3-O-Et- Spha C17:0  | 24,56               | 0,47                 |
| Spha C20:0          | 2,56                | 1,76                 |
| 6-OH-Sphe C20:1 III | trace               | 6,35                 |
| Sphe C20:1 III      | trace               | 3,93                 |
| Total               | 100,00              | 100,00               |

**Tableau 9: composition en bases sphingoïdes des échantillons I4 et I5', déterminée par GC-MS après méthanolyse et dérivation par l'HFB.**

*(c) Analyse MALDI des échantillons natifs*

Il arrive que les traitements utilisés pour dériver des échantillons, dégradent tout ou partie des molécules qu'ils contiennent. Ainsi, lorsque c'est possible, il est toujours préférable d'analyser

des échantillons ayant subi le moins de manipulations possibles pour éviter l'apparition d'artéfacts. Cette technique permet donc d'analyser la composition de gangliosides assez purs sans les modifier. Cependant, nous rappellerons qu'elle ne permet pas de protéger correctement les acides sialiques lors de l'impact du laser. C'est pourquoi, dans de nombreuses situations, les spectres des gangliosides natifs présentent des pics prédominants qui sont sous-sialylés par rapport à la molécule de départ. En outre, cette technique est la moins efficace des trois (natif, méthyl-estérification et per-méthylation) en ce qui concerne la sensibilité des appareils de MALDI-TOF. Il arrive donc bien souvent que la conjonction de la dégradation des acides sialiques et de la faible sensibilité de cette technique fournisse des spectres qui ne sont que difficilement exploitables. Enfin, dans bien des cas, les meilleurs résultats sont obtenus lors d'analyses en mode réflecton négatif. C'est le cas ici du spectre obtenu pour l'échantillon I4 (figure 197).

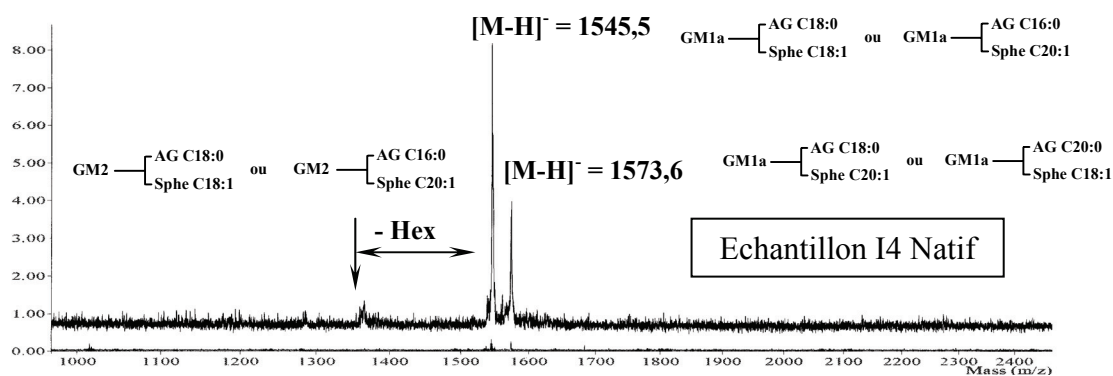


Figure 197: spectre de masse MALDI négatif de l'échantillon I4 natif; la matrice est du DHB.

On obtient principalement deux pics qui correspondent à des formes ioniques du type  $[M-H]^-$ . Ces masses correspondent bien à des gangliosides GM1 dont la partie lipidique est variable. Ainsi le pic à 1545,5 u peut correspondre à un GM1 dont la partie céramide peut être double. Soit, elle est constituée de l'acide gras le plus abondant (déterminé par la GC-MS, voir le tableau 8 p. 277), c'est-à-dire de l'octadécanoate (C18:0); dans ce cas et en regard de la masse du composé, la base sphingoïde ne peut être que de la sphingosine (Sphe C18:1). Soit, elle est constituée d'hexadécanoate (C16:0) et de sphingénine à 20 carbone (Sphe C20:1). Toutefois, selon le chromatogramme de l'échantillon I4, ces bases ne sont pas les plus abondantes (voir le tableau 9 p. 277). En outre, si la partie lipidique de ce céramide était formé d'une des bases les plus abondantes, le pic aurait une masse différente de celle obtenue. Pour les mêmes raisons, le pic à 1573.6 u peut correspondre à deux céramides possibles (figure 197). Enfin, un pic de masse inférieure correspond à la perte d'un hexose à partir du GM1 le plus abondant ( $[M-H]^- = 1545,5$ ), il s'agit donc d'un GM2. Cette perte d'hexose est d'ailleurs une indication que le GM1 en question est un GM1a. En effet, un GM1b, portant l'acide sialique sur le résidu



de Gal le plus externe, perdrait nécessairement le Gal accompagné de l'acide sialique. En outre, nous n'observons pas la perte d'un résidu d'acide sialique qui est généralement plus caractéristique d'un positionnement en bout de chaîne.

D'ailleurs, dans le cas de l'échantillon I5'(non présenté), on obtient un spectre identique en ce qui concerne la présence des deux grands pics. Cependant, le petit pic correspondant à  $[M-Hex-H]^+$  et remplacé par deux pics qui proviennent de la perte d'un acide sialique à partir du GM1. Ces pics correspondent donc à du GA1 (asialo-GM1). Cette fois-ci, et pour les raisons expliquées au dessus, cela montre que le GM1 est un GM1b avec l'acide sialique en position externe.

#### (d) Analyse MALDI des échantillons méthyl-estérifiés

Nous avons déjà expliqué que cette technique est reconnue pour éviter la dégradation des acides sialiques sous l'effet du laser. Cela a pour effet d'augmenter le signal qui correspond aux gangliosides réellement présents dans l'échantillon par rapport à l'analyse des gangliosides natifs.

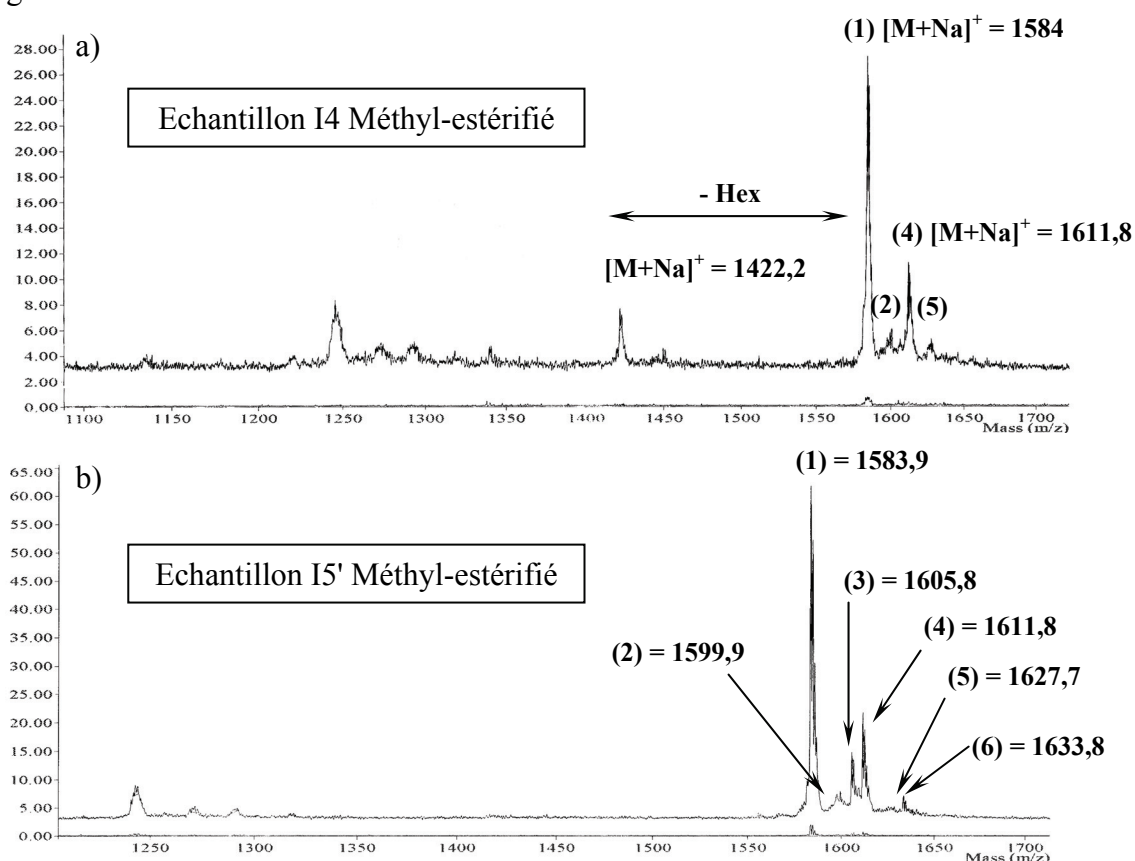
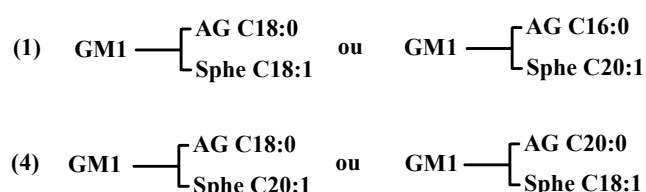


Figure 198: spectres de masse MALDI positif des échantillons I4 et I5' méthyl-estérifiés dans du DHB: a) échantillon I4; b) échantillon I5'; la matrice est du DHB.

En effet, les pics dus à la perte des acides sialiques n'apparaissant pas, cela évite la diminution apparente des gangliosides montrant le plus grand nombre d'acides sialiques. Cette technique permet donc d'obtenir une vision plus fidèle à la réalité quant à la composition d'un mélange de gangliosides qui comporterait des niveaux divers de sialylation. Ainsi, les échantillons I4 et I5' donnent les spectres présentés figure 198.

Dans les deux cas, on retrouve le même massif très majoritaire contenant les pics (1) 1583,9, (2) 1599,7, (3) 1605,8, (4) 1611,8, (5) 1627,7 et (6) 1633,8. Comme bien souvent avec ce type de dérivés, les deux pics les plus abondants (1 et 4) peuvent correspondre à des formes ioniques du type  $[M+Na]^+$ . Il s'agit des mêmes gangliosides que ceux envisagés avec les composés natifs (voir le tableau 11). Ils sont les suivant:



On remarque que ces deux ions sont accompagnés de quatre autres ions de masses plus élevées. Deux ont une masse plus élevée de 16 u (2 et 5), deux autres ont une masse plus élevée de 22 u (3 et 6). En fait ces ions peuvent correspondre aux mêmes gangliosides que 1 et 4 mais sous la forme ionique  $[M+K]^+$  (2 et 5) et  $[M+2Na-H]^+$  (3 et 6). Ces deux formes ioniques étant classiques pour ce type de dérivés, cette possibilité est tout à fait plausible. Cependant, en regard de la composition de la partie lipidique déterminée en GC-MS, il est également possible d'envisager que ces ions puissent se trouver sous la forme  $[M+Na]^+$ . Dans ce cas, ces pics correspondraient à d'autres GM1 dont la partie céramide serait moins classique. Ces différentes possibilités ont été résumées dans le tableau suivant (tableau 10):

| Céramide  | GM1        |            |             |
|---|------------|------------|-------------|
|   | $Na^+$     | $K^+$      | $[2Na-H]^+$ |
| AG C18:0 / O-Et-Sphe C18:1<br>ou AG C16:0 / O-Et-Sphe C20:1 | (5) 1627,8 | 1643,9     | 1649,8      |
| AG C18:0 / Sphe C20:1                                       | (4) 1611,8 | (5) 1627,9 | (6) 1633,8  |
| AG C16:0 / O-Et-Sphe C18:1<br>ou AG C18:0 / 6-OH-Sphe C18:1 | (2) 1599,8 | 1615,9     | 1621,8      |
| AG C18:0 / Sphe C18:1<br>ou AG C16:0 / Sphe C20:1           | (1) 1583,8 | (2) 1599,9 | (3) 1605,8  |

**Tableau 10: résumé des différentes formes possibles de GM1 présents dans les échantillons I4 et I5' méthyl-estérifiés**, en envisageant les différentes parties céramides et formes ioniques possibles.

Nous ferons aussi remarquer que les deux spectres diffèrent (figure 198): celui de l'échantillon I4 contient deux pics à 1422,2 et 1450.2 u, alors que ce n'est pas le cas de celui du I5'. Il semble évident que ces deux ions sont les équivalents des ions 1 et 4, mais à une masse inférieure d'environ 162 u. Cet incrément de masse correspond à la perte d'un résidu d'hexose. Ces deux pics sont donc ceux qui représentent le GM1 dégradé sous sa forme GM2 par perte du résidu de Gal placé en bout de chaîne glycanique. Ainsi, la présence de ce GM2 indique que l'échantillon I4 contient du GM1a. Inversement, l'absence des ions représentant le GM2 dans le spectre de l'échantillon I5' est bien la preuve que cet échantillon contient du GM1b. Il faut aussi remarquer que dans ce spectre, il n'y a pas de perte d'un résidu d'acides sialique méthyl-estérifié. Ce type de dérivé (méthyl-ester) empêche donc efficacement la perte des acides sialiques placés en bout de chaîne glycanique contrairement à ce qui se passe avec les dérivés natifs.

(e) Analyse MALDI des échantillons per-méthylés

Cette méthode, beaucoup plus sensible que les deux précédentes permet, en général, d'obtenir plus d'informations sur la présence des gangliosides les moins abondants d'un mélange. Ainsi, les spectres des échantillons I4 (figure 199) et I5' (figure 200) sont très riches en pics si on les compare avec leurs équivalents natifs et méthyl-esters.

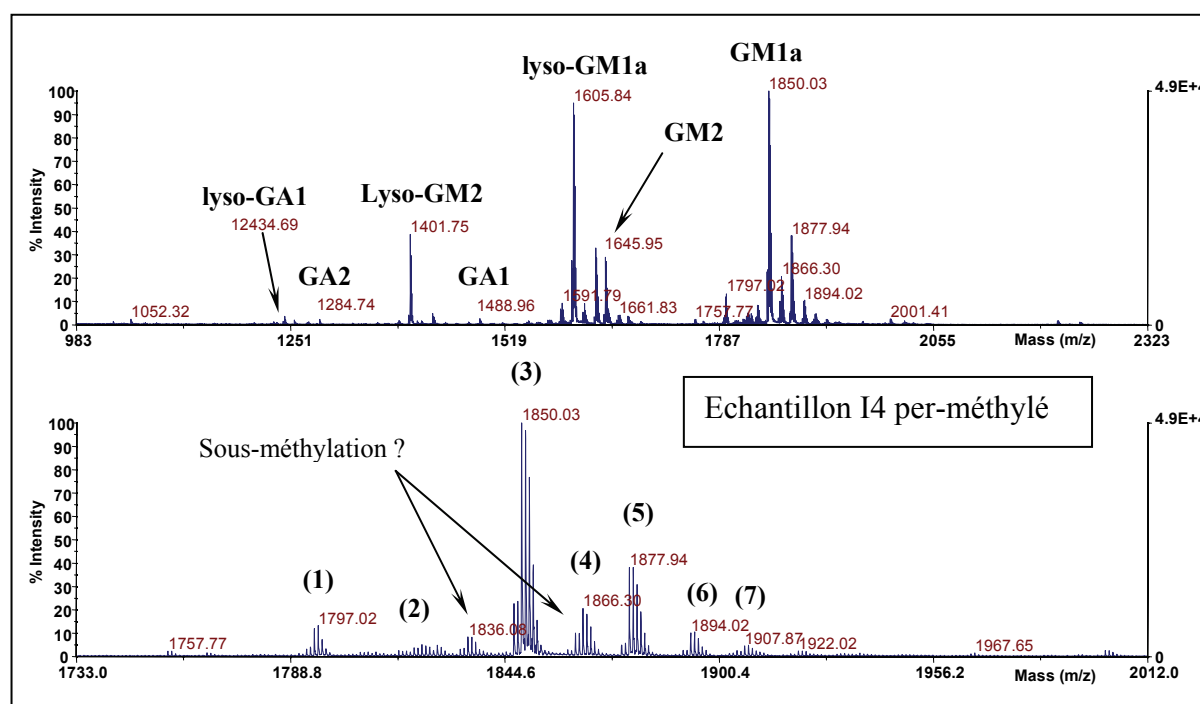


Figure 199: spectres de masse MALDI positif de l'échantillon I4 per-méthylés; la matrice est du DHB.

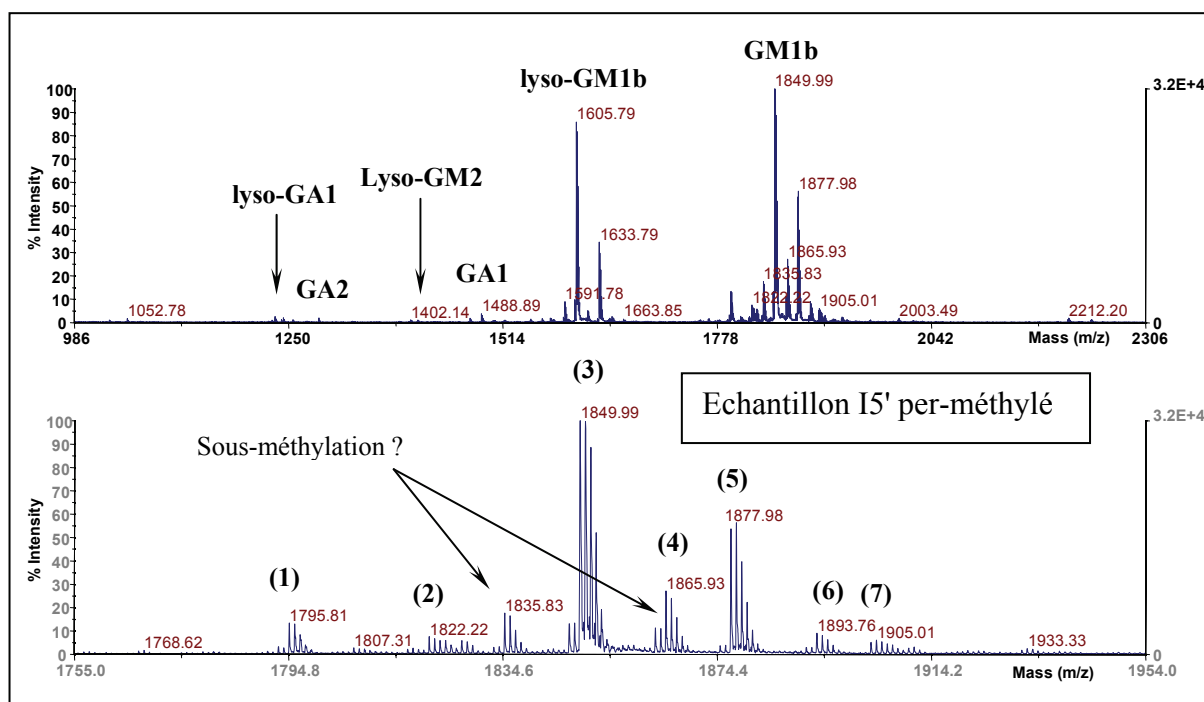


Figure 200: spectres de masse MALDI positif de l'échantillons I5' per-méthylés; la matrice est du DHB.

Sur les deux spectres, l'amas ionique le plus abondant est celui qui correspond aux ions du GM1. Cette partie des spectres a d'ailleurs été agrandie pour mieux distinguer tous les ions qui s'y trouvent. En utilisant les résultats obtenus en GC-MS, nous avons pu calculer les masses théoriques de 28 GM1 dont les parties céramides sont constituées des lipides qui avaient été déterminés comme étant les plus abondants. En comparant ces chiffres avec les masses obtenues sur le spectre, il est ainsi possible de définir les différents GM1 susceptibles d'être présents dans les échantillons. Il sont résumés dans le tableau 11.

| Céramides possibles   | GM1                             |                                |
|---|---------------------------------|--------------------------------|
|   | Na <sup>+</sup> masse théorique | K <sup>+</sup> masse théorique |
| AG C18:1 / 6-OH-Sphe C20:1  | (7) 1906,3                      | 1922,4                         |
| AG C18:0 / O-Et-Sphe C18:1<br>ou AG C16:0 / O-Et-Sphe C20:1   | (6) 1894,3                      | 1910,4                         |
| AG C18:0 / Sphe C20:1<br>ou AG C18:1 / 6-OH-Sphe C18:1  | (5) 1878,3                      | (6) 1894,4                     |
| AG C16:0 / O-Et-Sphe C18:1  | (4) 1866,3                      | 1882,4                         |
| AG C18:1 / 3-O-Et Spha C17:0<br>ou AG C18:0 / Sphe C18:1<br>ou AG C16:0 / Sphe C20:1<br>ou AG C16:1 / 6-OH-Sphe C18:1 | (3) 1850,3                      | (4) 1866,4                     |
| AG C16:0 / Sphe C18:1   | (2) 1822,2                      | 1838,3                         |
| AG C16:0 / 3-O-Et Spha C15:0  | (1) 1796,2                      | 1812,3                         |

Tableau 11: résumé des différentes formes possibles de GM1 présents dans les échantillons I4 et I5' per-méthylés

Comme on peut le constater et bien que nous avons défini 28 possibilités au départ, cette comparaison permet de ne retenir que des candidats potentiels. Cependant, il arrive qu'une même masse corresponde à plusieurs GM1 dont les parties céramides diffèrent. Dans ce cas, il est impossible d'annoncer une structure avec certitude. En outre, certains pics ne peuvent être attribués à aucun des 28 types de céramides prédéfinis. Cela est le cas des massifs isotopiques de masses d'environ 1836 et 1864 u. Ces massifs se trouvant 14 u en dessous des deux amas ioniques les plus abondants des GM1 (à 1850 et 1878 u), il pourrait s'agir des mêmes composés, mais sous une forme sous-méthylée.

Les spectres montrent également une caractéristique très intéressante. En effet, un autre amas ionique très abondant, présent sur les deux spectres, se situe à environ 244,2 u en dessous de l'amas correspondant aux GM1. Lorsque l'on analyse finement cet amas en le comparant à celui des GM1, on s'aperçoit qu'il ne présente pas exactement les mêmes incréments de masse entre ces différents pics. Ainsi, dans l'amas des GM1, le pic (3) le plus abondant à 1850 u se trouve 16 u au dessous du suivant (4) à 1866 u. Cela est d'ailleurs souvent caractéristique d'un composé unique sous les deux formes ioniques classiques  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$ . En revanche, le pic le plus abondant de cet amas ionique inconnu (à 1605,79 u) n'est pas suivi d'un pic 16 u au dessus, mais par un pic (à 1619,78 u) qui se trouve seulement à 14 u. Cette particularité nous fait penser que, contrairement à son homologue (3) de l'amas des GM1 (à 1850 u), il ne s'agit pas d'un ion du type  $[M+Na]^+$ . Cette masse de 1605,79 u pourrait correspondre, non pas à un GM1, mais à un lyso-GM1, c'est-à-dire à un GM1 ayant perdu l'acide gras. Ainsi, la partie lipidique de ce ganglioside n'est plus un céramide, mais une simple base sphingoïde. Dans ce cas, les masses que l'on observe dans cet amas correspondent à des formes ioniques du type  $[M+2Na-H]^+$ , et les masses observées dans les spectres concordent avec les structures regroupées dans le tableau 12:

| lyso-GM1 |                         |                                       |
|----------|-------------------------|---------------------------------------|
| pic      | Bases                   | Forme ionique $[M+2Na-H]^+$ théorique |
| 1663.85  | 6-OH-Sphe C20:1         | 1664,0                                |
| 1633.79  | Sphe C20:1              | 1633,9                                |
| 1619.78  | Sphe C20:1 sous-méthylé | 1619.8                                |
| 1605.79  | Sphe C18:1              | 1605,9                                |
| 1591,79  | Sphe C18:1 sous-méthylé | 1591.8                                |

Tableau 12: résumé des différentes formes possibles de lyso-GM1 présents dans les échantillons I4 et I5' per-méthylés, en envisageant les différentes bases sphingoïdes possibles.

Encore une fois, certains pics ne peuvent être attribués qu'à des formes sous méthylés des deux lyso-GM1 les plus abondants. Il nous faut aussi remarquer que ces formes lyso-gangliosides n'apparaissent pas lors des analyses des dérivés natifs et méthyl-estérifiés. Il est donc envisageable qu'elles soient produites durant le processus de per-méthylation. Or, les équipes ayant utilisé les dérivés per-méthylés pour analyser les gangliosides (Juhasz P. et coll., 1992) n'ont pas rapporté ce type de dégradation des gangliosides. Toutefois, nous ferons remarquer que nous n'utilisons pas la même méthode de méthylation et que celle que nous avons choisie se produit en milieu très basique. Ce milieu est donc susceptible d'entraîner la dé-acylation des céramides. Si cela était le cas, cette caractéristique serait très intéressante pour l'analyse des gangliosides puisque cela permettrait d'accéder à des informations sur la composition en base sphingoïde. En effet, nous avons déjà montré que, bien souvent, il est impossible de distinguer deux céramides différents ayant une masse identique. Cela est d'ailleurs le cas du pic numéro 3 des spectres de I4 et I5' per-méthylés (figure 198 et tableau 12) qui peuvent correspondre à quatre GM1 comportant les céramides suivants:



Le tableau 13 nous permet d'éliminer avec certitude deux de ces structures car elles ne peuvent pas fournir les lyso-GM1 contenant les Sphe C18:1 et Sphe C20:1.

Enfin, comme pour les analyses des dérivés natifs et méthyl-esters, les dérivés per-méthylés permettent de déterminer s'il s'agit d'un GM1a ou d'un GM1b. Ainsi, il est clair que le spectre de l'échantillon I4 (figure 199) présente des amas ioniques assez abondants correspondant aux ions des formes GM2 et lyso-GM2. Cet échantillon contient donc GM1a. Par contre, le spectre de l'échantillon I5' (figure 200) ne montre qu'une très faible quantité de ces deux amas ioniques. Il s'agit donc d'un échantillon contenant du GM1b.

*(f) Synthèse des résultats obtenus par les cinq analyses.*

A l'aide des cinq méthodes d'analyses différentes employées sur chaque échantillon, il nous a été possible de déterminer par la GC-MS que les échantillons I4 et I5' ne contiennent que des acides sialiques du type Neu5Ac et que la composition glycanique correspond bien à celle de GM1. En outre la composition lipidique nous a permis de déterminer les types de céramides envisageables pour ces échantillons. Quant aux analyses par MALDI-TOF, bien que les

analyses des dérivés natifs et méthyl-esters ont permis d'identifier les gangliosides les plus abondants et de déterminer le point de branchement de l'acide sialique, c'est la technique de per-méthylation qui est la plus informative. En fait, dans bien des cas, cette méthode se suffit à elle-même et il n'est pas absolument nécessaire d'utiliser les deux autres, bien que par souci d'information, nous préférons utiliser les trois méthodes. Ainsi, nous avons pu déterminer que l'échantillon I4 contient du GM1a dont le céramide est constitué principalement d'acide gras C18:0 (et C16:0 dans une moindre mesure). Quant aux bases sphingoïdes, les résultats sont un peu plus confus. En effet, alors que la GC-MS annonce une présence importante de bases du type 3-O-Et-Spha C15:0 et C17:0, les résultats en MALDI semblent ne pas corroborer cette constatation et privilégier les bases plus classiques que sont Sphe C18:1 et Sphe C20:1. Il est à remarquer que ces deux bases quelque peu "exotiques", également présentes dans d'autres échantillons, ne le sont jamais en aussi grande quantité que dans le cas de l'échantillon I4. Nous pensons donc qu'il pourrait s'agir d'un artefact et que dans le cas de cet échantillon, les sphingénines soient les plus abondantes. Pour l'échantillon I5', la composition lipidique est beaucoup plus classique et montre que les acides gras prédominants sont C18:0 et C16:0 et que les bases sont des Sphe C18:1 et Sphe C20:1. En outre, le spectre MALDI est sans équivoque car il montre que le ganglioside est un GM1b.

## ***(2) Les résultats obtenus pour les 35 autres échantillons.***

A part quelques exceptions, la plupart des autres échantillons ont montré la même composition en ce qui concerne les acides sialiques (sauf pour le di-sialoganglioside II8 qui est particulièrement riche en Neu5Ac-1,7Lac). La composition glycanique est en général bien définie par GC-MS et correspond à ce qui est attendu. Enfin, les informations données par les trois types de dérivés analysés par MALDI-TOF permettent, la plus part du temps, de déterminer: (1) la longueur de la chaîne glycanique; (2) le nombre d'acides sialiques qui y est attaché, mais aussi, dans bien des cas, leur emplacement; (3) la composition du céramide, notamment grâce à l'apparition des lyso-gangliosides lors de l'analyse des échantillons per-méthylés. A ce sujet, il faut noter que de nombreux échantillons présentent également des formes lyso- lors des analyses des dérivés natifs et méthyl-estérifiés. Dans ce cas, il s'agit de composés naturellement sous la forme lyso- et leur apparition n'est pas due au traitement de per-méthylation. Ainsi, nos études ont permis de déterminer les compositions de l'ensemble des échantillons de gangliosides isolés du cerveau de rat. Ils sont résumés dans les tableaux 13, 14, 15 et 16:

| <b>Mono-sialogangliosides</b> |                      |
|-------------------------------|----------------------|
| Echantillon                   | type de gangliosides |
| I1                            | trace de GM1a        |
| I2                            | GM3                  |
| I3                            | GM2                  |
| I4                            | GM1a                 |
| I5                            | mélange GM1a et GM1b |
| I5'                           | GM1b                 |
| I6                            | GD1a                 |
| I7                            | GD1b                 |
| I8                            | GD1c                 |

**Tableau 13: composition en gangliosides des échantillons mono-sialylés.**

| <b>Di-sialogangliosides</b> |  |
|-----------------------------|--|
| Echantillon                 | type de gangliosides   |
| II1                         | lyso-sulfatide S-Gal-?O-Et-Sphe C18:1<br>et trace du sulfatide identique avec AG C18:0   |
| II2                         | lyso-sulfatide S-Gal-3-O-Et-Spha C15:0 et C17:0<br>et trace des sulfatides avec AG C18:0 |
| II3                         | peut-être: lyso GD1b ou Lyso GD3   |
| II4                         | GD3  |
| II5                         | trace de GM3-sulfaté<br>et peut-être: lyso GD1c  |
| II6                         | GD1?   |
| II7                         | peut-être: lyso GD1a ou GD1a   |
| II8                         | GD1? Comportant un Neu5Ac-1,7Lac   |
| II9                         | GD1a   |
| II10                        | GalNac-GD1?  |
| II11                        | GD1b   |
| II12                        | GT1b   |
| II13                        | lyso GQ1b ou GQ1b  |
| II14                        | GQ1b   |

**Tableau 14: composition en gangliosides des échantillons di-sialylés.**

| <b>Tri-sialogangliosides</b> |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| Echantillon                  | type de gangliosides             |
| III1                         | GM1b<br>et trace de GT1? et GD1? |
| III2                         | GD1a                             |
| III3                         | GT1a                             |
| III4                         | GT1b                             |
| III5                         | lyso GT1b ou c                   |
| III6                         | lyso GT1b ou c                   |
| III7                         | GT1c                             |
| III8                         | GT1c                             |
| III9                         | GQ1?                             |

**Tableau 15: composition en gangliosides des échantillons tri-sialylés.**



| <b>Tétra-sialogangliosides</b> |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| Echantillon                    | type de gangliosides |
| IV1                            | GQ1b                 |
| IV2                            | GQ1c                 |
| IV3                            | lyso GQ1?            |
| IV4                            | lyso GQ1c            |
| IV5                            | -                    |

**Tableau 16: composition en gangliosides des échantillons tétra-sialylés.**

Au vu de ces résultats, il semble que les formes lyso-gangliosides naturelles (qui ne sont pas formées pendant la per-méthylation) aient une tendance à traîner un peu plus que les gangliosides contenant un céramide sur les plaques de chromatographie en couche mince. En effet, le fait que la fonction amine des bases sphingoïdes soit libre, augmente la polarité des formes lyso- qui migrent en dessous des spots correspondant à leurs équivalents céramides. Toutefois cette constatation qui est valable pour les échantillons mono-, tri- et tétra-sialylés, ne semble pas se produire dans le cas des di-sialylés. Toutefois, pour les raisons discutées ci-dessus, les informations sur les formes lyso- du tableau des disialylés sont à prendre avec précaution et ne doivent pas remettre en cause les résultats des autres tableaux.

## **B. Détermination de la composition de GPI**

### **1) Problèmes de l'analyse des GPI**

Les Glycosyl-phosphatidylinositols sont des composés que l'on retrouve aussi bien chez les mammifères que chez les organismes inférieurs. Pour les premiers, la plus part d'entre eux sont des encrages membranaires de glycoprotéines et la forme libre (glycolipidique) n'est pas clairement identifiée. En revanche, cette forme est majoritaire dans les membranes de parasites, et la partie lipidique est un glycérophospholipide à phosphatidylinositol classique (GPI) ou un inositol-phosphocéramide (GPI-Cer). Dans tous les cas, ces molécules sont connues pour connaître les problèmes d'analyses suivants:

- les GPI ont des propriétés de solubilités particulières qui les rendent insolubles dans la plupart des solvants, excepté dans un mélange (chloroforme, méthanol, eau: 10/10/3 v/v/v). Dans les autres solvants, ils forment des micelles qui ont la particularité de diminuer la sensibilité des GPI aux réactifs d'hydrolyse ou de méthanolyse.

- En outre, la présence de GlcN (et non de GlcNAc) liée à l'Inositol fait que cette liaison glycosidique est extrêmement stable aux conditions acides, en raison de l'effet protecteur de la fonction amine libre protonée ( $\text{NH}_3^+$ ) du carbone 2 (phénomène déjà discuté dans le chapitre dévolu à l'analyse des protéoglycannes).

- Un autre problème provient de la stabilité des groupements phosphate dans ces mêmes conditions acides. En effet, les monosaccharides phosphorylés ne peuvent être quantifiés convenablement par rapport aux autres monosaccharides, car ils ne forment pas de dérivés correctement bloqués, et sont donc insuffisamment volatils. Ainsi, pour des standards de composition connue et dans les conditions standard de méthanolyse des glycolipides, suivies de l'acylation par l'HFBA, le recouvrement des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides n'est pas représentatif de la structure attendue. Dans ce cas, le meso-inositol et la glucosamine ne sont pas détectés et le taux des autres monosaccharides est largement dépendant de la présence de groupements phosphates. Le taux des bases sphingoïdes est aussi réduit de façon significative par rapport à leur quantité initiale dans les composés.

- Enfin, notons que même après acylation à l'HFBA à haute température, les échantillons restent partiellement insolubles et le mélange d'acylation est visiblement trouble.

Toutes ces constatations suggèrent que le faible taux de recouvrement provient essentiellement du problème d'insolubilité des GPI et GPI-Cer dans le mélange de méthanolyse, de la présence d'une GlcN et de la stabilité des groupements phosphates qui empêche la dérivation adéquate des monosaccharides phosphatés en composés suffisamment volatils.

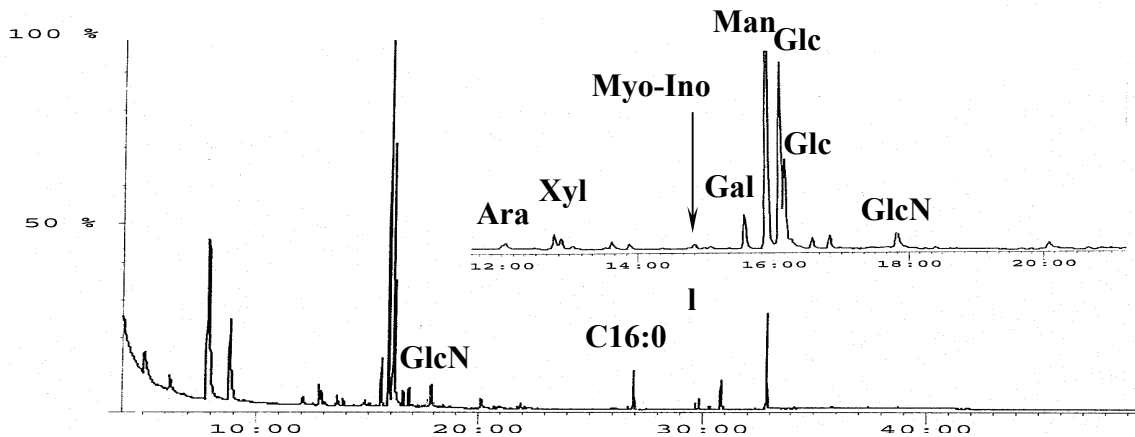
## **2) Solution aux problèmes**

Dans le chapitre sur l'analyse des protéoglycannes, nous avons expliqué que la rupture de la liaison glycosidique des hexosamines (fonction amine libre) devenait facile quand le groupement  $\text{NH}_2$  se trouve acylé (acétylé ou heptafluorobutyrylé). C'est pourquoi, à des échantillons de GPI qui avaient fait l'objet d'une méthanolyse anhydre, suivie d'une acylation par l'HFBA, nous avons fait subir à nouveau un deuxième cycle de méthanolyse/acylation. Avec ce protocole, le disaccharide  $\text{GlcNH}_2\text{-Ins}$ , qui n'est pas clivé lors de la première méthanolyse, se retrouve, après acylation par l'HFBA, acylé au niveau des hydroxyles libres, mais aussi au niveau de la fonction amine. Lors de la seconde méthanolyse, puisque les groupements HFB résistent aisément à ce traitement, l'effet protecteur de la fonction  $\text{NH}_3^+$  ne

peut plus avoir lieu et la liaison est rompue. Certaines des liaisons phospho-esters sont relativement stables lors de la première méthanolyse. Nous avons vérifié ce point en utilisant un standard de Man-6-P. Or, après un seul cycle de méthanolyse/acylation, les dérivés HFB de ce composé ne sont pas suffisamment dérivés (il n'y a pas de groupement HFB sur le phosphate) pour être volatils dans les conditions de températures utilisées pour l'analyse des autres constituants. Dans ce cas, on voit uniquement une faible quantité de dérivés HFB de O-méthyl-glycosides déphosphorylés et cette quantité est bien inférieure à celle que l'on devrait trouver si le taux de rupture de la liaison phospho-ester était total. Par contre, après le deuxième cycle de méthanolyse/acylation, la quantité de dérivés HFB de O-méthyl-glycosides déphosphorylés est totale. Les liaisons phospho-esters sont donc totalement rompues au cours de la seconde méthanolyse. Ce même phénomène est observable quand on analyse la composition glycanique de composés standards de GPI de composition connue, dont la proportion des monosaccharides devient exacte après deux cycles successifs. Cela suggère que la présence de groupement HFB au voisinage des groupements phosphates des dérivés obtenus après le premier cycle de méthanolyse/acylation, permet une déstabilisation des liaisons phospho-esters qui deviennent sensibles au deuxième cycle de méthanolyse. Puisque c'est le premier cycle d'acylation qui permet la rupture de la liaison phosphate lors de la deuxième méthanolyse, nous nous sommes demandés s'il n'était pas possible de sauter la première étape de méthanolyse, consommatrice de temps. Mais dans ce cas, on ne retrouve qu'une faible quantité de dérivés. En effet, il semble que les GPI ne sont vraiment pas assez solubles dans le mélange d'acylation. Il faut donc qu'ils aient d'abord subi la première méthanolyse qui va libérer des O-méthyl-glycosides libres et phosphatés, ainsi que le dimère GlcNH<sub>2</sub>-Ins. Puis, ces composés pourront être correctement acylés lors de la première acylation. Une fois acylés, on remarque que ces composés deviennent parfaitement solubles au cours du deuxième cycle de méthanolyse et il en est de même durant la deuxième acylation. Ainsi, bien que cette procédure prenne 48 heures, elle présente l'avantage que les échantillons ne sont jamais fractionnés ou transvasés avant leur injection en GC-MS. En effet, ils restent du début à la fin dans un seul et même tube, ce qui permet de favoriser de bonnes analyses quantitatives.

### 3) Analyse de GPI dont la partie lipidique est constituée d'un alkyl-acylglycérol.

Après avoir subi un double cycle de méthanolyse/acylation, un échantillon de GPI isolé de *Phytomonas serpens* montre les composés suivant (figure 201):



**Figure 201:** chromatogramme, après méthanolyse et acylation à l'HFBA, d'un échantillon de GPI isolé de *Phytomonas serpens*.

On peut remarquer que les dérivés des monosaccharides sont parfaitement séparés de ceux des lipides (FAMES et alkylglycérol). La composition des FAMES est simple, avec la présence quasi unique des C16:0 et C18:0 linéaires. L'alkylglycérol est un C16:0, facilement identifiable par l'ions à  $m/z$  467, spécifique des alkylglycérol, et celui à 224 u, spécifique de la longueur de la chaîne d'alcool gras. La composition monosaccharidique indique la présence majoritaire de Man, mais aussi de Gal, Glc, Ara, Xyl, GlcN et Ins. Toutefois, pour deux raisons, la quantité de ce dernier reste difficile à estimer avec le chromatogramme en TIC. Tout d'abord, le pic d'Ins montre une tendance à traîner et la fin du pic chevauche un pic de la forme furanique du Gal. Ensuite, la limite de masse de l'appareil de spectrométrie de masse étant de 1000 u, il est impossible d'obtenir la totalité du spectre de ce dérivé de 1356 u. Le TIC est donc sous-estimé car il manque l'intégration des ions de hautes masses (M-213, M-214, M-227). Cependant, la quantification de Ins reste possible en affectant un facteur de 4 à l'aire du pic. En outre, nous avons souvent observé que la réponse en TIC est proportionnelle à la quantité de matériel. Donc, plus un composé a une masse importante, plus il a de chances de produire des ions détectables. Ainsi, un rapport molaire correct peut être déterminé entre les différents composés, avec moins de 10% d'erreur, quand on divise l'aire des pics en TIC par la masse moléculaire des produits.

#### 4) Analyse de GPI dont la partie lipidique est constituée d'un céramide.

Un échantillon de GPI isolés de *Tulamen* montre le chromatogramme suivant (figure 202):

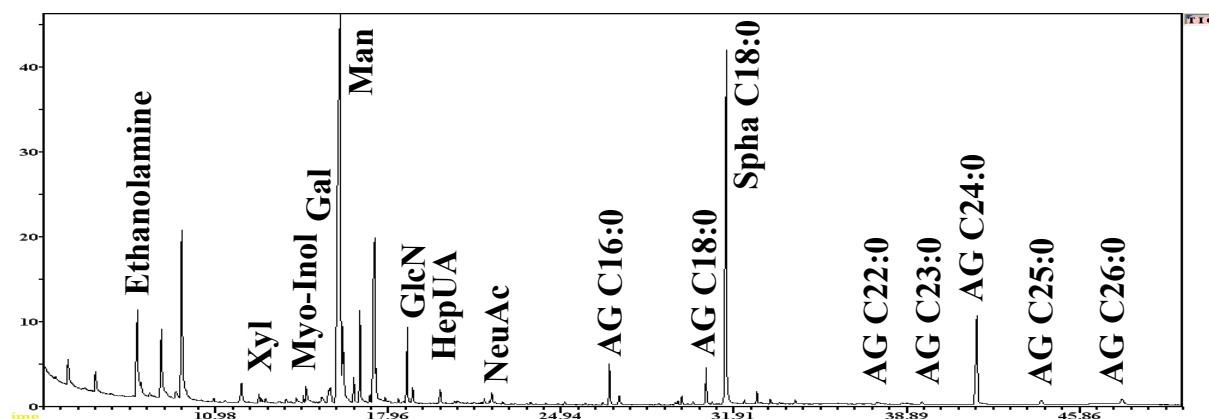


Figure 202: chromatogramme, après méthanolyse et acylation à l'HFBA, d'un échantillon de GPI isolé de *Tulamen*.

La composition en acide gras présente une large hétérogénéité, avec toutefois, la prévalence des composés linéaires en C16:0, C18:0 et C24:0. Quelques acides gras insaturés ou ramifiés sont aussi présents, mais en très faible quantité. Pour les bases sphingoïdes, c'est la sphinganine C18:0 qui est largement majoritaire, mais on trouve aussi quelques traces de Spha C17:0 et C19:0, une Phytosphingosine C22:0 et une Sphingénine C18:1. Les monosaccharides sont du Xyl, Ins, Gal, Man, Glc, GlcN, et NeuAc. Un autre dérivé de monosaccharide mineur est présent à  $R_t = 20,02$  min. Son spectre montre des ions, à  $m/z$  537 et 323 u, caractéristiques des acides uroniques. Toutefois, il montre également un ion très intense à 751 u et d'autres ions à des masses supérieures à celles des acides hexuroniques. Ainsi, ce dérivé pourrait être celui d'un acide hepturonique de forme pyranique, puisqu'il n'y a pas d'ion à 525 u. Enfin, au début du chromatogramme, on remarque un pic dont le spectre de masse correspond au dérivé di-HFB de l'éthanolamine de masse  $m/z$  453 u. Ce composé étant très volatil, il est courant que sa quantification soit sous-estimée.

## V. Conclusion

Ces travaux ont démontré que quelque soit le type de lipides, ceux-ci peuvent être analysés après méthanolyse anhydre et dérivation à l'anhydride heptafluorobutyrique. Nous insistons sur le fait que la dérivation par les HFB a montré d'intéressantes caractéristiques pour l'étude des acides gras hydroxylés et pour celle des différents types de bases sphingoïdes. Et cela, même dans des mélanges complexes, contenant non seulement les lipides, mais aussi d'autres

composés comme des oligosaccharides ou des composés d'origine protéique (acides aminés, peptides, etc.). En outre, l'analyse des lipides peut être appliquée directement sur un homogénat, sans des étapes intermédiaires et complexes de purification. Cette méthode est donc tout à fait indiquée pour l'analyse de la composition des différentes familles de glycolipides, puisqu'en un seul chromatogramme, tous les constituants de ces composés peuvent être identifiés et quantifiés. Ainsi, il nous a été possible de déterminer rapidement la composition de gangliosides ainsi que de GPI. En effet, pour l'analyse de mélanges très complexes, l'utilisation des ions diagnostiques de chaque famille de composés est une aide précieuse qui permet de discriminer aisément et rapidement les différents représentants du mélange comportant plus de 200 composés. Enfin, nous ajouterons que les dérivés HFB ont l'avantage d'être formés en une seule étape pour toutes les familles de lipides et sont très stables dans le temps.



# Détermination de la composition de la partie protéique des glycoprotéines

## **I. Introduction**

Au cours de ce mémoire, nous avons déjà montré l'intérêt de l'utilisation des dérivés HFB pour l'analyse en GC-MS des monosaccharides classiques (pentoses et hexoses, neutres ou acides). Nous avons montré que ces dérivés étaient bien adaptés à la caractérisation et à la quantification des acides sialiques. Puis, ils se sont également montrés efficaces pour l'analyse de nombreux lipides. L'ensemble de ces résultats nous ayant permis de démontrer les atouts de cette méthode pour l'étude de la composition complète des glycolipides, il nous restait à nous intéresser à l'autre type de glycoconjugués que sont les glycoprotéines. Sur la base de travaux antérieurs sur la formation d'esters de dérivé HFB d'acides aminés et notamment les isoamyl-esters (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973 et Felker P. et coll., 1975), nos études à ce sujet ont abouti au développement d'un protocole analytique en trois étapes qui permet maintenant de définir la composition complète de n'importe quel glycoconjugué. C'est ce protocole que nous avons présenté dans les publications qui suivent (Pons A. et coll., 2003a et Zanetta J. P. et coll., 2004). La première publication décrit ce protocole analytique et montre que cette technique permet d'étudier avec de bons résultats quantitatifs la composition complète d'une glycoprotéine que ce soit en acide sialiques, en monosaccharides ou en acides aminés sur le même échantillon en trois étapes successives de GC/MS des dérivés HFB. Cet article démontre qu'il est possible, en utilisant ce procédé, de quantifier Trp et His, habituellement difficiles à analyser. La seconde publication qui s'appuie sur les résultats et le protocole de la précédente, s'attache à démontrer que cette technique permet aussi de caractériser et de quantifier une forme particulière de glycosylation qu'est la C-mannosylation de certains résidus Trp sur les glycoprotéines de mammifères.

## **II. La première publication (Pons A. et coll., 2003a)**

### **A. Introduction à la première publication (Pons A. et coll., 2003a)**

Déjà en 1973, le Dr Zanetta avait développé une technique d'analyse en chromatographie de phase gazeuse des dérivés HFB d'isoamyl-esters d'acides aminés (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Cette méthode avait montré des résultats encourageants pour l'analyse de la quasi-



totalité des 20 acides aminés composants les protéines. Nous avons donc décidé de reprendre ces travaux pour les adapter à l'analyse complète de la composition des glycoprotéines (parties glycanique et protéique). Les résultats obtenus lors de la dérivation des acides aminés, ainsi que ceux, déjà discutés, des O-méthyl-glycosides et lipides, ont permis la mise au point d'un protocole analytique permettant de déterminer la composition complète de n'importe quel glycoconjugué. Ce protocole s'applique sur un seul et même échantillon en trois étapes successives sans que l'échantillon ne quitte le tube d'analyse. Cela permet d'éviter que des transferts de tubes à tubes n'induisent des variations de réponses relatives molaires par perte de composés et donc des problèmes de quantification des dérivés. En outre, cette technique permet de partir d'une quantité minimale de départ en glycoprotéine (1 à 10 µg), et d'analyser des protéines isolées par électrophorèse puis transférées sur membrane de PVDF. Ce protocole suit les étapes suivantes: (1) la première étape, après hydrolyse douce, méthylation et acylation, permet d'étudier la composition en acides sialiques; (2) la deuxième, après méthanolyse anhydre en milieu acide et acylation, permet de déterminer la composition en monosaccharides et en lipides; (3) la troisième, après hydrolyse acide, transestérification et acylation, permet d'étudier la composition en acides aminés. En outre, nous allons voir que cette méthodologie en trois étapes, permet de protéger les résidus Trp et His de leur dégradation durant l'étape d'hydrolyse protéique (troisième étape). Ce phénomène permettant, contrairement à d'autres méthodologies analytiques classiques de la composition en acides aminés, de quantifier ces deux composés au sein d'une protéine.

## **B. La publication**

## Sequential GC/MS Analysis of Sialic Acids, Monosaccharides, and Amino Acids of Glycoproteins on a Single Sample as Heptafluorobutyrate Derivatives

Alexandre Pons,<sup>1</sup> Colette Richet,<sup>‡</sup> Catherine Robbe,<sup>1</sup> Annkatrin Herrmann,<sup>#</sup> Philippe Timmerman,<sup>1</sup> Guillemette Huet,<sup>‡</sup> Yves Leroy,<sup>1</sup> Ingemar Carlstedt,<sup>#</sup> Calliope Capon,<sup>1</sup> and Jean-Pierre Zanetta\*<sup>1,‡</sup>

CNRS Unité Mixte de Recherche 8576, Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Inserm U560, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France, and Lund University, Department of Cell and Molecular Biology, Mucosal Biology Group, BMC C13, SE-22184, Lund, Sweden

Received February 13, 2003; Revised Manuscript Received April 10, 2003

**ABSTRACT:** A GC/MS procedure was developed for the analysis of all major constituents of glycoproteins. The rationale for this approach is that by using GC/MS analysis of the constituents as heptafluorobutyrate derivatives, it was possible to quantitatively determine the sialic acid, monosaccharide, fatty acids (when present), and the amino acid composition with the sample remaining in the same reaction vessel during the entire procedure. A mild acid hydrolysis was used to liberate sialic acids and was followed by formation of methyl-esters of heptafluorobutyrate (HFB) derivatives. After GC/MS analysis of sialic acids, the remaining material was submitted to acid-catalyzed methanolysis followed by the formation of HFB derivatives. After GC/MS analysis of the monosaccharides, the sample was supplemented with norleucine (as internal standard) and hydrolyzed with 6 M HCl followed by the formation of isoamyl-esters of HFB derivatives and GC/MS analysis. His and Trp residues were modified during the step of acid-catalyzed methanolysis, but the resulting derivatives were stable during acid hydrolysis and quantitatively recovered by GC/MS analysis. As a result, all constituents of glycoproteins (sialic acids, monosaccharides (or di- and trisaccharides) and amino acids) are identified in the electron impact mode of ionization and quantified using three GC/MS analysis in the same chromatographic conditions and using a limited number of reagents, a considerable advantage over previous techniques. This method is very sensitive, all data (qualitative and quantitative) being obtained at the sub-nanomolar level of initial material.

In previous studies (1–3), we have demonstrated that the complete analysis of the constituents of glycolipids could be performed by GC/MS analysis of heptafluorobutyrate derivatives of the various constituents liberated using acid-catalyzed methanolysis. During this procedure, the released monosaccharides are transformed into their *O*-methyl glycosides and *O*-methyl glycosides of their methyl esters, fatty acids as their methyl esters (FAMES)<sup>1</sup> and long-chain bases as free compounds or as degradation products that could be unambiguously identified. High-temperature acylation with heptafluorobutyric anhydride allows complete blockage of alcohol and amino groups as heptafluorobutyrate derivatives, after which all constituents become volatile and suitable for

GC analysis. The assignment of relative molar response factors for the various compounds using the total ion counts in the electron impact mode (3) allowed the molar compositions of glycosphingolipids to be obtained in a reproducible way with the sample remaining in the same test tube during all cleavage/derivatization steps. The same methodology was successfully applied to study the diversity of sialic acids (4), and 38 different sialic acid derivatives could be identified using GC/MS analysis. For gangliosides, it was possible to first analyze the sialic acids, and after methanolysis of the remaining material to obtain a complete quantitative determination of all monosaccharides, fatty acid methyl-esters, long-chains bases, again with the sample remaining in the same tube.

Here, we have adapted these approaches to analyze glycoproteins—a challenging task considering the potential complexity of these macromolecules. Indeed, previous approaches needed several techniques and several apparatus, such as HPLC and/or gas chromatography for the separation of the different constituents in separate experiments. Due to difficulties of coupling such techniques with mass spectrometry, the different compounds were mainly identified through their retention time, a criterion largely insufficient for analyzing samples of unknown composition. In contrast, GC/MS analyses of stable volatile compounds offered the possibility to analyze complex mixtures (1–4) because the nature of the constituent of each peak can be certified by its

\* Correspondence should be addressed to Dr. Jean-Pierre Zanetta, CNRS UMR 8576, Bat C9 USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex. Tel: 33 3 20 43 40 10. Fax: 33 3 20 43 65 55. E-mail: Jean-Pierre.Zanetta@univ-lille1.fr.

<sup>1</sup> CNRS Unité Mixte de Recherche 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille.

<sup>‡</sup> Inserm U560.

<sup>#</sup> Lund University.

<sup>1</sup> Abbreviations: *amu*: atomic mass unit; *CI*: chemical ionization; *EI*: electron impact ionization; *FAMES*: fatty acid methyl-esters; *GC*: gas chromatography; *MS*: mass-spectrometry; *HFB*: heptafluorobutyrate; *HFBAA*: heptafluorobutyric anhydride; *Kdn*: 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid; *RT*: retention time; *rMR*: relative molar response; *rRT*: relative retention time; *TIC*: total ion count; *Uro*: uromodulin. The nomenclature of the other sialic acids was after Schauer and Kamerling (12).

## **C. Discussions sur la première publication (Pons A. et coll., 2003a)**

### **1) Les problèmes de l'analyse des acides aminés en GC-MS et les solutions que nous proposons.**

#### **a) Raisons du choix de l'utilisation des isoamyl-esters des dérivés HFB d'acides aminés**

Comme nous l'avons décrit dans la partie généralité, de très nombreux types de dérivés différents ont été utilisés pour l'analyse en chromatographie de phase gazeuse des acides aminés. Toutes ces méthodes de dérivation furent développées pour palier les nombreux problèmes qu'engendre l'analyse d'une famille de composés aussi variés que celle des acides aminés. Comme bien souvent, on retrouve en compétition les dérivés TMS et différents dérivés acylés. Le choix des composés acylés avait été fait par certaines équipes, surtout car ils sont beaucoup plus stables que les dérivés TMS, notamment en ce qui concerne la dérivation des fonctions amines. Par contre, certains des acides aminés ainsi dérivés (acétyle, TFA, PFP) ont l'inconvénient d'être trop volatils. Ainsi, avec de tels dérivés, il est difficile d'obtenir des résultats quantitatifs pour les plus légers d'entre eux (Gly, Ala, Val, Ser, Thr, Ile, Leu et Pro), car il est impossible d'évaporer l'excès de réactif avant injection des dérivés dans l'appareil chromatographique sans en perdre une certaine quantité. Comme nous l'avons déjà signifié, autant cela n'était pas gênant avec les colonnes remplies de l'époque car elles supportent l'injection des échantillons dans le mélange acylant, mais avec les colonnes capillaires, il est absolument obligatoire de se débarrasser de l'excès d'anhydride et de l'acide formé par la réaction d'acylation afin de préserver les colonnes. C'est pourquoi, l'analyse des acides aminés par acylation s'est tournée vers la production des dérivés plus lourds que sont les HFB (voir les généralités). En effet, avec ces composés, il devient possible d'évaporer les échantillons sous un courant d'azote sans perdre les dérivés les plus volatils.

Les dérivés acylés ont aussi l'inconvénient, par rapport aux TMS, de nécessiter l'estérification des fonctions acides avant de dériver le reste des fonctions libres, ce qui implique une réaction de dérivation supplémentaire. Pour cela, différents types d'estérification ont été utilisés (voir les généralités), mais encore une fois, pour des raisons de volatilité, nous avons préféré utiliser les alcools les plus "lourds". L'isoamyl-estérification a été choisie car elle permet un meilleur comportement chromatographique que les butyl-esters (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Toutefois, la faible solubilité des acides aminés dans les alcools "lourds" implique que cette réaction se fasse, soit par l'utilisation d'un acide catalytique fort (normalité de 3 à 8

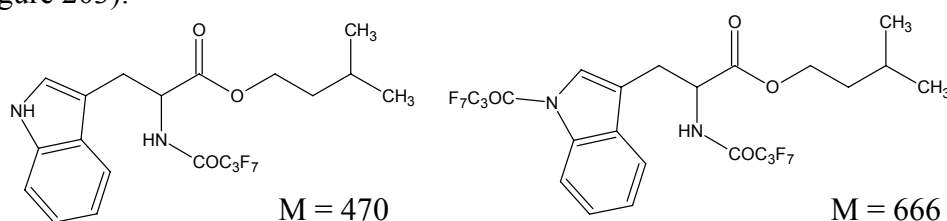
N selon les équipes et le type d'estérification), soit par une réaction supplémentaire de trans-estérification. Tout comme l'équipe de Gehrke (voir les généralités), nous pensons que l'utilisation d'acides fort risque d'induire la dégradation des acides aminés les plus fragiles et que la trans-estérification, qui présente d'excellents rendements, semble meilleure sur le plan de la solubilité des acides aminés dans les alcools "lourds". C'est pourquoi, l'isoamyl-estérification, choisie par le docteur Zanetta en 1973, suit ce principe en formant d'abord des méthyl-esters avec du méthanol/HCl 1,25 N à température ambiante pendant 30 min, avant de les trans-estérifier par de l'alcool isoamylique/HCl 1,25 N à 110°C pendant 1 h 45 (Zanetta J. P. et Vincendon G., 1973). Dernièrement, Nous avons apporté quelques modifications à ce protocole en utilisant, pour la première estérification, du méthanol/HCl à 0,5 N pendant 1 h 30 à 80°C et pour la trans-estérification de l'alcool isoamylique/HCl 1,5 N pendant 20 h à 100°C (Pons A. et coll., 2003a et 2003b). Certains de ces changements ont été effectués pour des raisons pratiques, notamment afin d'utiliser le même agent de méthanolyse que nous utilisons pour l'analyse des monosaccharides et des lipides, d'autant plus que la faible normalité de l'acide ne change pas le rendement de la méthyl-estérification et doit permettre de mieux respecter les acides aminés. Par contre, il était nécessaire de modifier les conditions de l'étape de trans-estérification puisqu'il ne s'agissait plus non seulement de trans-estérifier les acides aminés mais également de transformer les O-méthyl-glycosides des monosaccharides résistant à l'hydrolyse acide (hexosamines) en O-isoamyl-glycosides. Ce point était essentiel puisque le fait d'avoir quantitativement les hexosamines stables sur le même chromatogramme que celui des acides aminés permettait de travailler sans standard interne pour obtenir le pourcentage de glycosylation des glycoprotéines.

## **b) Problèmes engendrés par l'hydrolyse des liaisons peptidiques.**

Au sujet du problème de la force des acides, nous avons déjà discuté des différentes techniques utilisables pour libérer les acides aminés constitutifs d'une protéine. Nous avons vu que la technique la plus couramment utilisée consiste en une hydrolyse de la liaison peptidique par l'utilisation d'HCl 6 N à 110°C pendant 20 à 24 h. Aussi, parce qu'elle a un bon rendement d'hydrolyse (95%) et quelle permet la libération de tous les acides aminés en une seule étape, c'est la méthode que nous avons choisie. Toutefois, il est maintenant bien connu que cette technique favorise la dégradation de certains acides aminés.

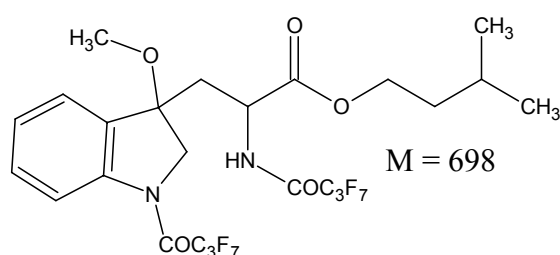
### **(1) Cas du tryptophane (Trp)**

Trp est habituellement presque totalement dégradé par les techniques d'hydrolyses acides et il est très difficile de le quantifier quel que soit le type de dérivés utilisé pour caractériser les acides aminés. D'ailleurs, lorsque nous analysons un standard d'acides aminés contenant Trp en lui faisant subir une hydrolyse à l'HCl 6 N, puis une trans-estérification, une acylation par l'HFBAA et un passage en GC-MS (uniquement la troisième étape du protocole), sur le chromatogramme résultant, nous n'obtenons aucuns pic susceptible de correspondre à un dérivé portant ou non un groupement HFB sur le cycle indole. En effet, si Trp n'était pas ou partiellement dégradé lors de l'hydrolyse, nous nous attendrions à retrouver un des dérivé suivant (figure 203):



**Figure 203: les structures du Trp attendues après hydrolyse à l'HCL 6N, puis trans-estérification et acation par IF**

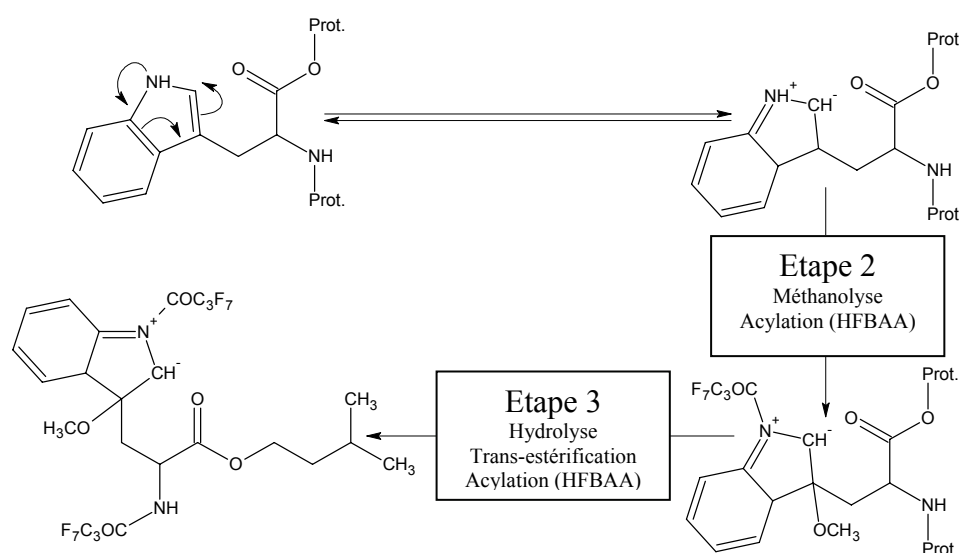
Or, ceci n'est pas le cas. Comme lors de nombreuses études précédentes (voir les généralités), cela montre bien que Trp est totalement détruit durant l'hydrolyse peptidique. Cependant, si le même mélange de standard d'acides aminés subit au moins les deux dernières étapes du protocole (figure 1: Pons A. et coll., 2003a), un pic apparaît à  $R_t = 32,66$  min (tableau 1: Pons A. et coll., 2003a). Le spectre de masse qui y correspond (figure 5: Pons A. et coll., 2003a) est caractéristique d'un dérivé ayant un cycle indole O-méthylé et portant un HFB sur la fonction amine. Nous l'avons nommé Trp<sup>#</sup> pour le différencier des deux précédents (figure 204).



**Figure 204: structure du dérivé HFB de l'isoamyl-ester de Trp (Trp\*) obtenu après notre protocole.**

Il est donc évident que ce protocole présente une caractéristique inattendue qui permet de protéger Trp durant la phase d'hydrolyse. En effet, au cours de la seconde étape du protocole, pendant laquelle les échantillons subissent une méthanolyse catalysée par un acide en milieu anhydre, le Trp fixe une molécule de méthanol sur un des deux carbones C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> du cycle indolique. En regard du spectre de masse obtenu, il nous est encore impossible de déterminer lequel des deux carbones porte le groupement O-méthyle et lequel porte un hydrogène.

Cependant, nous penchons plutôt pour une O-méthylation du carbone C<sub>3</sub> en raison d'une délocalisation possible du doublet libre de l'atome N<sub>1</sub> qui induit une charge électro-négative du carbone C<sub>2</sub>. Ainsi, Nous pensons que ce carbone 2 subit plus aisément une protonation et par conséquent, que la O-méthylation est favorisée en C<sub>3</sub> par un mécanisme de substitution nucléophile. En tout état de cause, nous pensons que cette réaction d'addition, qui supprime le caractère aromatique du noyau indole, permet ensuite de dériver la fonction amine voisine par un groupement heptafluorobutyrate au cours de la phase suivante d'acylation par l'HFBA (figure 205). Or, comme nous l'avons souvent remarqué, le fait de dériver des composés par une multitude de groupements HFB rend les dérivés plus résistant à l'hydrolyse. Ce phénomène peut d'ailleurs être comparé au fait (discuté dans la publication) que nous retrouvons un quantité significative de dérivé HFB des O-isoamyl-glycosides alors que les hexose neutres sont connus pour être fortement dégradés durant la phase d'hydrolyse à l'HCl 6 N. Le résidu Trp ainsi dérivé devient donc lui aussi résistant à l'étape d'hydrolyse.



**Figure 205: formation supposée du dérivé HFB de l'isoamyl-ester du Trp (Trp\*).**

Ce phénomène semble effectivement avoir lieu puisque, lorsque l'on analyse des protéines connues pour contenir des résidus Trp, on retrouve un dérivé dont le spectre (figure 5: Pons A. et coll., 2003a) correspond exactement à cette structure. En outre, la quantification du pic, si on y applique un coefficient de réponse molaire de 0,741 montre une composition réaliste de la protéine en Trp (voir le tableau 2: Pons A. et coll., 2003a pour MUC2 et l'uromoduline). Ce coefficient de réponse molaire n'est pas très élevé, comme pour la plupart des acides aminés possédant plus d'une fonction amine, mais tout de même proches de celles attendues. Par contre, nos analyses ont montré qu'un facteur important pour aboutir à une réaction

quantitative était d'utiliser une quantité adéquate de réactif de méthanolyse de façon à ce que la méthanolyse s'effectue dans le milieu le plus anhydre possible (au moins 500  $\mu$ l de méthanol/HCl pour 20  $\mu$ g de glycoprotéine). Ainsi, ce coefficient de réponse molaire permet de quantifier le nombre de résidus Trp par protéine en donnant des résultats tout à fait satisfaisants. Il semble donc que le problème rémanent de la dégradation du Trp par l'hydrolyse peptidique soit réglé par la phase précédente de méthanolyse acide (figure 1: Pons A. et coll., 2003a). En outre, comme nous le verrons plus tard, cette particularité est également à l'origine de la possibilité d'analyser le dérivé His ainsi que celui du Trp-C-mannosylé.

## ***(2) Cas de l'histidine (His)***

Ce phénomène que nous venons de décrire pour Trp semble aussi protéger His de la dégradation durant la phase d'hydrolyse protéique. Sur le plan expérimental, c'est d'ailleurs le cas de His qui nous a fait supposer que la méthanolyse était capable de la modifier. En effet, sur des standard de His, ou après hydrolyse acide de protéines, le protocole de formation des dérivés choisi fournit deux pics caractéristiques de His (mono- et di-acylés, le premier présentant des traînées importantes car les deux fonctions aminées du cycles ne sont pas dérivées). Par contre, aucun de ces pics n'était détectable après méthanolyse suivie d'hydrolyse acide et analyse GC/MS des dérivés. Ceci suggérait que His avait été modifiée lors de la méthanolyse, et très probablement par addition d'une molécule de MeOH sur le cycle imidazole. Un tel pic possédant l'ion moléculaire attendu était effectivement présent sur les spectres en quantité importante. Comme His est stable à l'hydrolyse acide et détectable en tant que telle, quelle que soit la méthode utilisée (avec des réponses relatives molaires faibles mais adaptées), personne n'a proposé une dégradation d'His lors de l'hydrolyse acide, ni sa modification. Ainsi, après la méthanolyse de la deuxième étape du protocole, His donne aussi un dérivé O-méthylé qui va pouvoir subir l'addition d'un HFB supplémentaire sur la fonction amine voisine du cycle imidazole (figure 2g: Pons A. et coll., 2003a). Cela permet d'obtenir His sous la forme d'un pic chromatographique bien symétrique. Toutefois, His peut donner un autre pic si la protéine à analyser est présente en trop grande quantité lors de la phase de méthanolyse (deuxième étape du protocole). En effet, rappelons que la force de l'acide est faible durant cette étape (0,5 N) car il ne sert dans cette réaction que de catalyseur à la rupture des liaisons glycaniques et lipidiques. Mais une trop forte présence de protéine induit la diminution de la concentration de l'acide par protonation des groupement basiques de certains

acides aminés. Non seulement cette diminution de la force de l'acide risque de diminuer le rendement de la libérations des O-méthyl-glycosides et lipides, mais aussi, ne permet plus l'addition du O-méthyle sur le cycle imidazole. Ainsi His apparaît sous la forme d'un dérivé dont le groupement imidazol n'est ni O-méthylé, ni acylé par un HFB ce qui fait qu'il reste sous sa forme aromatique. C'est le dérivé qui est classiquement décrit lorsqu'un standard d'His ne subit que la troisième étape du protocole. Le pic qui y correspond a un temps de rétention de 28,19 min (tableau 1: Pons A. et coll., 2003a) et son spectre de masse est caractéristique (voir plus loin la partie spectrométrie de masse). Remarquons qu'il existe une autre forme de ce dérivé qui provient de l'équilibre entre la forme amine et la forme imine que peut prendre His. Ainsi, il arrive que His donne deux pics dans les conditions classiques d'hydrolyse protéique. La forme imine (la plus abondante) qui conserve un potentiel de délocalisation des doubles liaisons peut donc interagir avec la phase stationnaire de la colonne, ce qui explique la forte tendance de ce pic à traîner. Pour éviter la formation de ces deux composés, il faut donc que durant la seconde étape du protocole d'analyse, la quantité de glycoprotéines à analysée ne soit pas supérieur à 50 µg pour 500 µl de mélange de méthanol. Dans ces conditions, seul le dérivé His<sup>#</sup> est visible et il n'y a aucun problème de quantification de His, ce qui est un progrès important par rapport à la méthode classique.

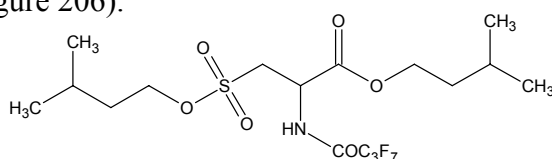
### ***(3) Cas des acides aminés dont le radical contient une amide (Gln et Asn).***

Un autre artéfact bien connu de l'hydrolyse à l'HCl 6 N est que Gln et Asn sont transformés respectivement en Glu et Asp par la destruction de la fonction amide et il devient impossible de les quantifier. Bien sur, dans notre protocole, cela n'a pas vraiment d'importance puisque ces fonctions amides sont déjà dégradées lors de l'étape de méthanolise (seconde étape du protocole). En effet, lors de ce traitement, Gln et Asn donnent des méthyl-esters de Glu et Asp. Le résultat final sera donc le même puisque ces composés sont ensuite trans-estérifiés par un groupement isoamyle lors de la troisième étape, et ainsi, Gln et Asn seront respectivement quantifiés comme leur équivalent acide dicarboxylique respectif. Malheureusement, ce problème de transformation de ces deux composés est commun à toutes les méthodes d'analyse de la composition en acides aminés puisque les liaisons peptidiques sont aussi des fonctions amides. Ainsi, toute méthode efficace pour rompre les liaisons peptidiques est destructrice pour les fonctions amides de Gln et Asn. Il est donc impossible de quantifier ces deux composés après hydrolyse acide.

### ***(4) Problèmes d'oxydation de certains acides aminés***



Les résidus Cys sont connus pour former un dimère (cystine: Cys<sub>2</sub>) par oxydation. Ce phénomène se retrouve lors de ce protocole, mais comme quasiment 100% des Cys vont former des dimères qui sont aisément caractérisables, ce résidu (cys)<sub>2</sub> n'est pas difficile à quantifier. Notons aussi que dans le cas d'un mélange de Cys et d'homocys, un mélange de dimères de Cys<sub>2</sub>, homoCys<sub>2</sub> et d'un hybride est observable. En outre, il faut prêter une attention toute particulière à l'oxygène lors de l'hydrolyse acide, car sa présence induit une oxydation plus poussée de cet acide aminé. Ainsi, Cys ne donne pas que de la Cys<sub>2</sub>, mais est aussi partiellement oxydée en CysSO<sub>3</sub>H (acide cystéique) qui va être isoamyl-estérifié durant la troisième étape du protocole, non seulement au niveau de la fonction acide, mais aussi sur le groupement sulfate (figure 206).



**Figure 206: dérivé HFB de l'isoamyl-ester de la CysSO<sub>3</sub>H**

Ce composé est parfaitement quantifiable, car il donne un pic bien symétrique dont toutes les fonctions polaires sont bloquées. Enfin, dans le cas où la protéine a subi une réduction des ponts disulfures par le mercapto-éthanol suivie d'une S-carboxyméthylation par l'iodoacétamide, on obtient un résidu S-carboxy-méthyl-cystéine (SCCys) qui une fois dérivé donne un seul pic aisément identifiable (voir le tableau 1 et la figure 5: Pons A. et coll., 2003a).

Quant aux Ser et Met, ils peuvent aussi être en partie oxydés (5 et 15% respectivement) (Husek P. et coll., 1975). Notamment, Met donne de la Met-sulfone (metSO) et Met-sulfoxyde (MetSO<sub>2</sub>).

### **c) Problèmes engendrés lors de la phase d'acylation par l'HFBA.**

Dans la partie généralité, nous avons décrit l'utilisation de produits antioxydants lors de l'acylation pour éviter la formation de composés parasites à partir des Cys, Met, His et Trp. Toutefois, bien que cette technique semble être efficace (March J. F., 1975 et Pearce R. J., 1977), d'autres auteurs trouvent qu'elle n'a que peu d'effets bénéfiques et pensent que l'oxydation provient en fait de l'utilisation d'HFBA contaminé. Ils préfèrent donc l'emploi d'un agent acylant très pur (>99%) ce qui évite les oxydations durant l'étape d'acylation et donne de bons résultats pour ces acides aminés sans utilisation d'antioxydants. Nos études semble abonder dans ce sens, puisque bien que nous retrouvons trois pic correspondant à Met

(Met, MetSO<sub>2</sub> et MetSO), le premier reste très majoritaire puisqu'il représente 97,8% de la somme des trois. Pour cys, on ne retrouve pas CysSO<sub>3</sub>H si les conditions d'hydrolyse et d'acylation sont bien respectées et comme on l'a déjà dit au dessus, seule Cys<sub>2</sub> est retrouvée.

Nous avons aussi mentionné que certains auteurs ont décrit un problème lors de l'évaporation de l'HFBA en excès à la fin de la phase de dérivation. Cela induirait une dégradation du dérivé His di-HFB en sa forme mono-HFB. Cette constatation n'est plus valable ici puisque lors de la deuxième étape du protocole analytique, si la quantité de mélange de méthanol est suffisante, l'ensemble des résidus His sont O-méthylés ce qui fournit un dérivé unique et stable à l'hydrolyse et à l'évaporation. Ainsi, les techniques de co-injections décrites précédemment (Roach C. W. et coll., 1969c; Moss C. W. et coll., 1971 et Jonsson J. et coll., 1973) deviennent inutiles, d'autant qu'elles ne sont pas envisageables pour les colonnes capillaires.

Enfin, Arg est le seul résidu à donner systématiquement 2 pics, qui correspondent aux deux formes tri-HFB et di-HFB (voir la figure 2e: Pons A. et coll., 2003a). Or, si le premier ne présente pas de problème d'analyse, le second présente une très forte traînée. Toutefois, nos nombreuses expérimentations nous ont permis de nous rendre compte que le rapport entre ces deux types de dérivés est constant ce qui permet de ne quantifier Arg que sur le pic symétrique du composé tri-HFB en y appliquant le coefficient de réponse de 0,213 (tableau 1: Pons A. et coll., 2003a).

## **2) La spectrométrie de masse des dérivés HFB d'isoamyl-esters d'acides aminés**

Bien que la publication contienne les spectres des principaux dérivés HFB d'isoamyl-ester d'acides aminés, certaines informations spécifiques à des cas particuliers n'y sont pas discutées. C'est pourquoi, nous les illustrons dans cette partie en essayant de les expliquer.

### **a) L'ion moléculaire M<sup>+</sup>**

C'est en 1975 que la première étude de spectrométrie de masse par impact électronique des dérivés HFB d'isoamyl-esters d'acides aminés a été conduite (Felker P. et coll., 1975). Cette étude montra, tout comme nos résultats, que les spectres de masses des dérivés d'acides aminés sont riches d'informations bien qu'ils ne présentent pas toujours l'ion moléculaire de façon abondante. De ce fait, quand cet ion existe, il est très souvent nécessaire d'amplifier le spectre de masse pour le faire apparaître (sauf pour Pro, Met, Phe, Lys, Tyr, Glu, Arg di- et

tri-HFB, His<sup>#</sup>, Trp, Cys<sub>2</sub>, HCys-Cys et HCys<sub>2</sub>). A ce sujet, la comparaison de nos résultats avec ceux de Felker montre quelques petites variations, par exemple, ils annoncent ne pas obtenir d'ion moléculaire pour Thr, Ser, Hypro, Ile et Asp alors que nous les observons. Cependant, ces petites différences ne portent pas à conséquence et sont probablement dues à l'amélioration de la sensibilité des spectromètres de masses.

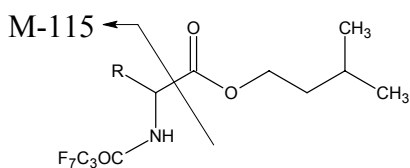
## **b) L'ion de base des spectres**

Dans nos travaux, l'ion de base (le plus abondant) est le plus souvent l'ion m/z 71 qui correspond au groupement isoamyle (sauf pour les acides aminés aromatiques pour lesquels il est faible ou absent). C'est pourquoi il est un bon marqueur des acides aminés puisque tous subissent au moins une isoamyl-estérification. Ainsi, il est aisé de retrouver les acides aminés dans un mélange complexe, par la reconstitution du chromatogramme en utilisant cet ion. Notons que cet ion permet également de discriminer les dérivés O-isoamyl-glycosides lorsque des monosaccharides sont présent dans le l'échantillon analysé. Dans les travaux de Felker (Felker P. et coll., 1975), bien que ce même ion soit important, l'ion de base est plutôt à m/z 43, il provient d'un mécanisme de rupture favorisé bien connu du groupement isoamylique au niveau du branchement *iso*. Toutefois, notons que dans notre protocole, nous n'enregistrons les spectres de masse qu'à partir de 45 u. Il ne nous est donc pas possible de voir cet ion. En effet, même si les ions de faible masse apportent des d'informations structurales importantes sur les branchements des chaînes carbonées, leur présence, souvent avec une très forte amplitude, a tendance à écraser des ions bien plus faibles au niveau des hautes masses. Ainsi, les spectres deviennent plus difficiles à caractériser. C'est pourquoi, nous préférons nous passer de ces informations, qui ne sont pas indispensables à la caractérisation des dérivés, en ne nous intéressant qu'aux ions de plus de 45 u. De cette façon, les spectres montrent des ions de hautes masses plus abondants qui permettent de caractériser plus aisément le composé.

## **c) Les ions diagnostiques permettant de caractériser les acides aminés.**

### **(1) *En général***

Qu'i s'agisse de l'étude de Felker ou de la notre, les spectres présentent un ion souvent abondant à M-115 qui permet de déterminer la masse du dérivé (sauf pour Met, MetSO<sub>2</sub>, MetSO, et His<sup>#</sup>). Cet ion provient de la perte de la fonction carboxylique flanquée de l'isoamyl-ester (figure 207).

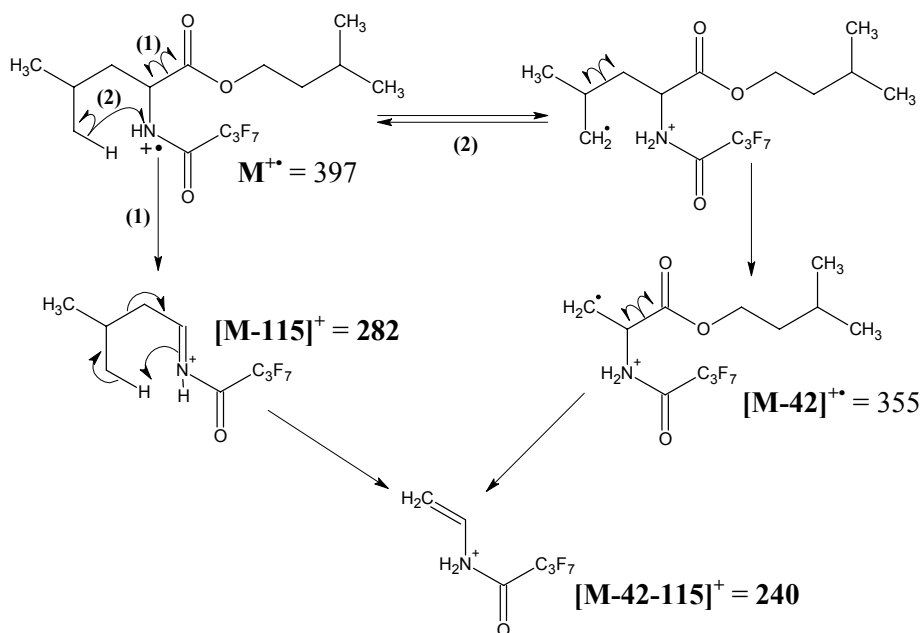


**Figure 207: formation de l'ion  $[M-115]^+$  qui permet de déterminer la masse du dérivé (sauf pour Met, MetSO<sub>2</sub>, MetSO, et His<sup>#</sup>).**

C'est essentiellement cet ion qui permet de caractériser l'acide aminé lors de l'analyse de son spectre, sauf dans les cas des dérivés de la Met et de l'His dont les spectres ne le montrent pas (voir plus loin comment les identifier), ainsi que dans le cas particulier d'isomères de masses identiques (Leu, Ile, Nle). Mais comme le faisait remarquer Felker, dans ce cas de figure, le spectre de masse de chaque composé isomère présente des amplitudes pour certains ions qui sont caractéristiques du composé. C'est cette particularité qui permet de discriminer les différents spectres sans aucune ambiguïté.

## (2) Cas des isomères Leu, Ile et Nle

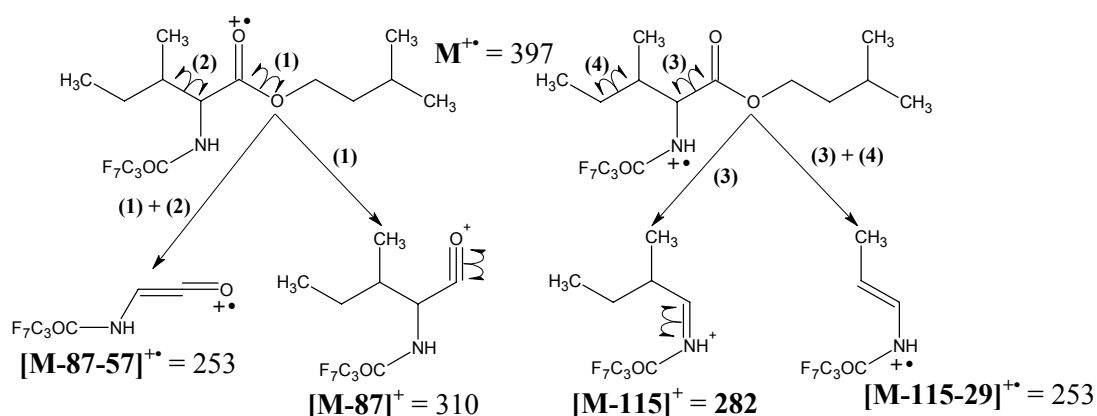
Comme nous pouvons le constater (figure 4: Pons A. et coll., 2003a) Les spectres correspondants à ces trois dérivés présentent bien l'ion  $[M-115]^+$  à  $m/z$  282, cependant, ne permettant pas de différencier les trois acides aminés, Il faut utiliser d'autres ions pour les caractériser.



**Figure 208: formation de l'ion intense à  $m/z$  240 u pour le dérivé HFB de l'isoamyl-ester de Leu**

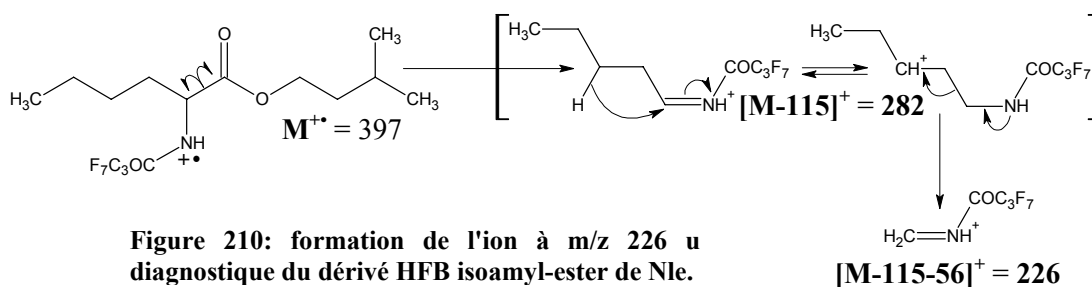
- Le spectre de Leu présente un ion à  $m/z$  240 aussi (voire plus) intense que l'ion  $[M-115]^+$ . Cette caractéristique a aussi été rapportée par Felker même si cet ion était moins intense dans son étude que dans la notre. En tout état de cause, cette forte intensité s'explique par le fait que les ruptures radicalaires sont classiquement favorisées au niveau des carbones tertiaires plutôt que secondaires et donc au niveau des branchements sur les chaînes carbonées. Aussi, dans le cas du dérivé de Leu, la rupture est favorisée entre les carbones  $\beta$  et  $\gamma$ . La formation de cet ion devrait donc pouvoir suivre une des deux voies de fragmentation présentées ci-dessus (figure 208).

- Le spectre de Ile présente, quant à lui, un ion à  $m/z$  253 un peu plus intense que les deux ions à 214 et 226 u. Il avait aussi été rapporté par Felker comme étant l'ion diagnostique de Ile. Encore une fois, on remarque que sa formation peut provenir de la rupture favorisée de la liaison comportant un carbone tertiaire. Elle a donc lieu soit entre les carbones  $\beta$  et  $\gamma$  (voie 1), soit entre les carbones  $\alpha$  et  $\beta$  (voie 2), ce qui donne deux voies de fragmentation (figure 209).



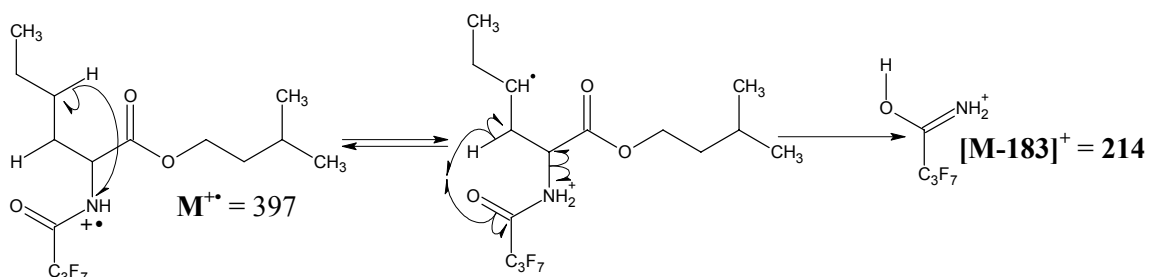
**Figure 209: les deux voies de fragmentations permettant d'obtenir l'ion diagnostique du dérivé HFB isoamyl-ester de Ile à  $m/z$  253 u.**

- Enfin, le spectre de Nle, que nous utilisons comme standard, présente deux ions très intenses aux masses 214 et 226 u. Dans le cas de ce dérivé, il n'y a pas de carbone tertiaire le long de la chaîne carbonée. La rupture de la liaison est donc favorisée au niveau du carbone  $\alpha$  aminé. Ainsi, la formation de l'ion à  $m/z$  226 pourrait s'expliquer de cette façon (figure 210):



**Figure 210: formation de l'ion à  $m/z$  226 u diagnostique du dérivé HFB isoamyl-ester de Nle.**

Remarquons que les deux ions  $[M-115]^+$  et  $[M-115-56]^+$  sont stabilisés par la délocalisation de la charge entre le carbone  $\alpha$  aminé et la fonction amine, ce qui expliquerait que ces deux ions soient si abondants. Quant à l'ion à  $m/z$  214, il ne peut s'expliquer que par un mécanisme compliqué (mais reconnu) de double réarrangement d'hydrogènes vers le groupement heptafluorobutyramide (figure 211).



**Figure 211: formation de l'ion à  $m/z$  214 u diagnostique du dérivé HFB isoamyl-ester de Nle.**

Cet ion n'est bien évidemment pas spécifique à Nle, car on le retrouve dans le spectre de tous les acides aminés qui possèdent en même temps des hydrogènes aux positions  $\beta$  et  $\gamma$  de la chaîne. Cependant aucun spectre d'autres acides aminés ne présente cet ion avec une telle intensité. En effet, tous les autres acides aminés possèdent un groupement actif en terme de fragmentation dans les environs des deux carbones  $\beta$  et  $\gamma$  ce qui favorise d'autres type de fragmentations et donc, par compétition, diminue la possibilité de cette fragmentation.

### **(3) Cas des dérivés de Met**

Nous avons vu que Met subi une oxydation lors des étapes d'hydrolyse et de dérivation pour donner deux autres composés très mineurs que sont MetSO et MetSO<sub>2</sub>. Dans la publication, nous n'avons donner que le spectre du dérivé HFB isoamyl-ester de Met (figure 4: Pons A. et coll., 2003a), car il représente presque 98% de la somme des trois dérivés (tableau 1: Pons A. et coll., 2003a). Afin d'être plus complet, nous présentons les spectres de masse CI et EI des deux composés d'oxydation et comparons les schémas de fragmentation de ces trois composés.

- Pour le dérivé de MetSO<sub>2</sub>, le spectre de masse CI montre surtout un ion abondant à  $m/z$  465, comme le plus souvent avec les dérivés HFB, il correspond à l'ion  $[M+NH_4]^+$ . D'autres ions résultant de fragmentation sont aussi observables sur ce spectre, mais ils ne présentent que peu d'intérêt. En effet, ce type de spectre n'a pour but que de déterminer la masse moléculaire du dérivé, et ainsi de permettre la confirmation de la masse de l'ion moléculaire sur le spectre de masse EI (figure 212).

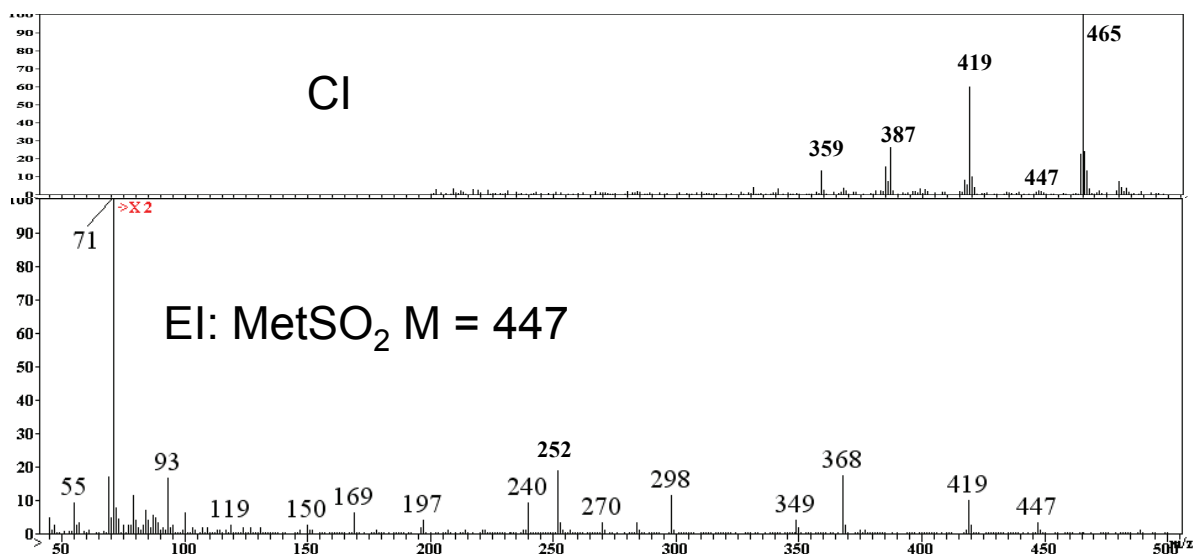


Figure 212: spectres de masse CI (ammoniac) et EI du dérivé HFB de l'isoamyl-ester de MetSO<sub>2</sub>

Comme nous l'avons déjà mentionné, le spectre EI de ce composé ne montre pas d'ion  $[M-115]^+$  à  $m/z$  332. Toutefois, sa masse moléculaire est facilement déterminée par la présence de l'ion moléculaire qui, s'il n'est pas vraiment abondant, est tout de même bien présent. Les principaux ions de ce spectre proviennent des ruptures suivantes (figure 213):

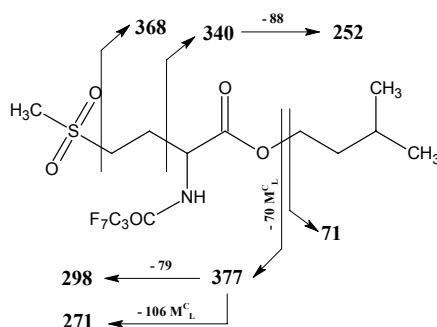


Figure 213: fragmentations principales du dérivé HFB isoamyl-ester de MetSO<sub>2</sub>

Trois ions à  $m/z$  252, 298 et 368 sont d'intensités suffisantes pour être de bons ions diagnostiques, mais malheureusement, ces ions sont aussi très communs dans les spectres d'autres acides aminés.

- Pour le dérivé de MetSO, comme dans la plus part des cas des spectres CI des dérivés HFB, on retrouve les deux ions  $[M+H]^+$  à  $m/z$  432 et  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  449. Le spectre EI présente, comme celui de Met et MetSO<sub>2</sub>, l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  à  $m/z$  431. On ne retrouve pas plus l'ion  $[M-115]^+$  à  $m/z$  316 (figure 214).

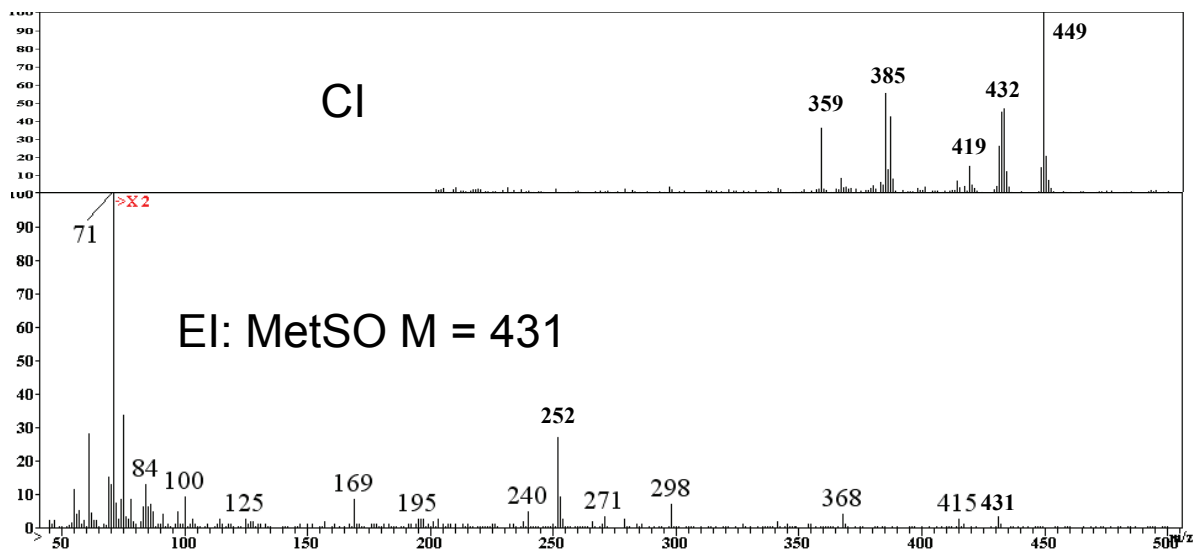


Figure 214: spectres de masse CI (ammoniac) et EI du dérivé HFB de l'isoamyl-ester de MetSO

Enfin, comme pour le dérivé de MetSO<sub>2</sub>, on observe encore des ions intenses à m/z 252, 298 et 368 qui proviennent des mécanismes de fragmentation que voici (figures 215):

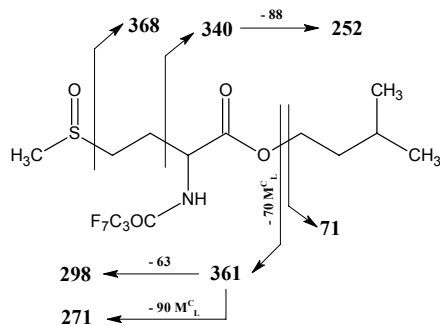


Figure 215: fragmentations principales du dérivé HFB isoamyl-ester de MetSO

- Remarquons que ces deux dérivés oxydés ne donnent pas de spectre particulièrement informatif sur le plan structural, puisque aucun ion intense ne permet de caractériser la composition du groupement soufré. Pour de plus amples informations, il faudra analyser les ions de faible intensité. Mais, dans bien des cas, la faible quantité de ces composés oxydés ne permet pas de faire ressortir ces ions du bruit de fond. Ceci n'est pas le cas du dérivé de la Met, dont le spectre EI (figure 4: Pons A. et coll., 2003a) montre un grand nombre d'ions informatifs de la structure du dérivé et notamment de la composition de la partie soufrée (figure 216):



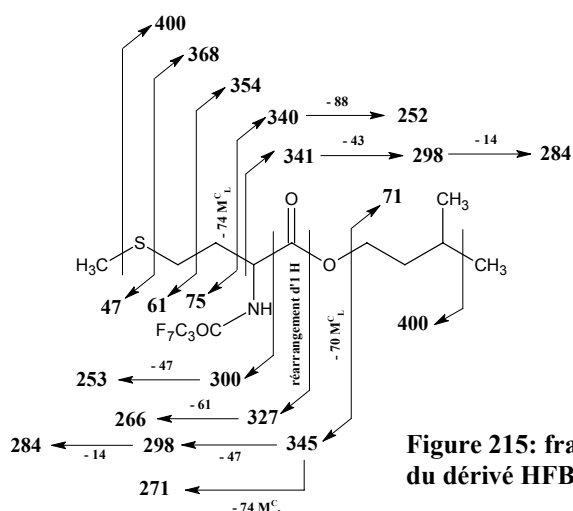


Figure 215: fragmentations principales du dérivé HFB isoamyl-ester de Met

#### (4) Cas des dérivés de l'Histidine ( $\text{His}^\#$ et $\text{His}$ ) et particularité des acides aminés aromatiques

Dans la publication, nous avons décrit un dérivé Di-HFB de l'isoamyl-ester de His-O-méthylée ( $\text{His}^\#$ ). Ce dérivé étant illustré par son spectre (figure 5: Pons A. et coll., 2003a) et par sa structure (figure 2g: Pons A. et coll., 2003a), nous ne les reprendrons pas ici. Cependant, nous ferons remarquer que le spectre de masse ne présente pas l'ion classique  $[\text{M}-115]^+$ , qui permet habituellement de caractériser un dérivé HFB d'isoamyl-ester d'acide aminé. En revanche, un autre ion  $[\text{M}-71]^+$ , tout aussi courant mais habituellement plus faible, est bien présent à  $m/z$  578. C'est d'ailleurs cet ion qui nous sert d'ion diagnostique. Rappelons que cette forme de dérivé est largement majoritaire, à tel point qu'elle est unique si les conditions de méthanolyse de la deuxième étape du protocole sont respectées. Dans le cas contraire, apparaît un pic correspondant à une forme non O-méthylée de His. Cette fois, le cycle imidazole n'étant pas O-méthylé, il ne peut pas être acylé par un HFB. Cela, en raison du potentiel de délocalisation du cycle qui empêche l'acylation des fonctions imines. Ce dérivé peut donc interagir avec la phase stationnaire de la colonne, ce qui explique qu'il apparaisse sous la forme d'un pic présentant une forte traînée. Toutefois, le spectre est clair et montre les mêmes règles de fragmentation que la plupart des autres dérivés HFB d'isoamyl-ester d'acides aminés. En effet, à côté de l'ion moléculaire  $\text{M}^{++}$  bien visible à  $m/z$  421, on retrouve l'ion  $[\text{M}-115]^+$  à  $m/z$  306 très abondant qui permet de caractériser le dérivé. Ces ions sont accompagnés par d'autres qui sont intenses et très informatifs sur la structure du composé (figure 217).

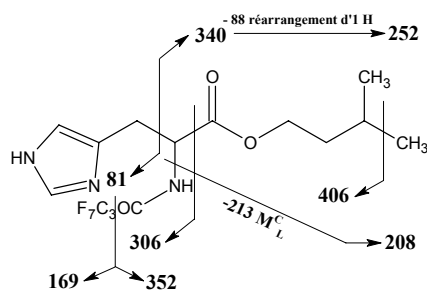


Figure 217: fragmentations principales du dérivé HFB isoamyl-ester de His

Le spectre de masse de ce composé n'avait pas été incéré dans la publication, c'est pourquoi nous le plaçons ici (figure 218).

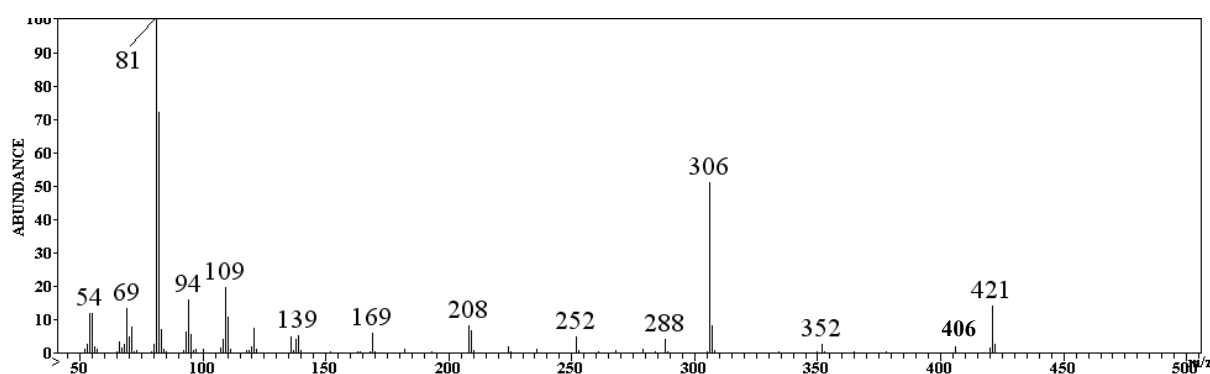


Figure 218: spectre de masse EI du dérivé HFB de l'isoamyl-ester de His

Notons que l'ion de base du spectre, de façon non conventionnelle, n'est pas ici à  $m/z$  71 mais à  $m/z$  81. Cet ion correspond très certainement à la partie radicalaire en  $\alpha$  spécifique de His. Il est d'ailleurs courant que les acides aminés comportant une fonction aromatique fournissent abondamment cet ion spécifique du radical en  $\alpha$ . C'est ce que l'on peut observer sur les spectres de Phe (figure 4: Pons A. et coll., 2003a), où l'ion de base est à  $m/z$  91, et celui de Tyr (figure 5: Pons A. et coll., 2003a), où un des ions majeurs est à  $m/z$  303 (figure 219).

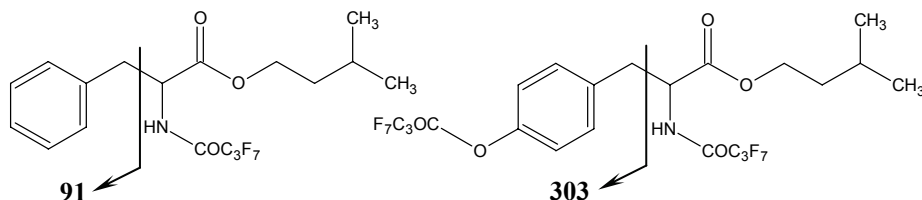


Figure 219: fragmentations spécifiques des dérivés HFB des l'isoamyl-ester de Phe et Tyr

### **III. La deuxième publication (Zanetta J. P. et coll., 2004)**

#### **A. Introduction à la deuxième publication (Zanetta J. P. et coll., 2004)**

Depuis quelques années, Une nouvelle forme de C-glycosylation des protéines de mammifère a été décrite dans la littérature (Hofsteenge J. et coll., 1994; de Beer T. et coll., 1995 et Löffler A. et coll., 1996). Il s'agit d'une C-mannosylation de résidus Trp contenues dans les protéines, souvent au niveau de séquences consensus du type Trp-X-X-Trp. Or, Dans la première publication (Pons A. et coll., 2003a), nous avons expliqué que la deuxième étape du protocole permet de former des dérivés HFB de O-méthyl-glycosides des hexoses et que cette particularité permet de les protéger lors de la troisième étape du protocole (hydrolyse protéique à l'HCl 6 N). Cette propriété montre une grosse différence avec le protocole classique qui ne fait appelle qu'à l'hydrolyse protéique. Dans ce cas, les composés monosaccharidiques sont sous forme libre et sont détruits par ce traitement acide, ce qui n'est plus le cas lorsque l'on applique le protocole en trois étapes. En outre, nous avons aussi démontré que ce protocole permet aussi de protéger Trp lors de cette hydrolyse. C'est pourquoi, nous avons pensé que le même phénomène de protection pouvait avoir lieu pour les résidus (C-Man-)Trp. Nous nous sommes donc attaché à démontrer cette hypothèse en analysant des protéines ou peptides reconnues pour contenir ce type de glycosylation. Nous avons aussi cherché à déterminer si ce type de glycosylation était présent dans tout le règne animal et les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans la deuxième publication (Zanetta J. P. et coll., 2004).

#### **B. La publication**

## Quantitative gas chromatography/mass spectrometry determination of C-mannosylation of tryptophan residues in glycoproteins

Jean-Pierre Zanetta,<sup>a,\*</sup> Alexandre Pons,<sup>a</sup> Colette Richet,<sup>b</sup> Guillemette Huet,<sup>b</sup> Philippe Timmerman,<sup>a</sup> Yves Leroy,<sup>a</sup> Anne Bohin,<sup>a</sup> Jean-Pierre Bohin,<sup>a</sup> Pierre-André Trinel,<sup>c</sup> Daniel Poulain,<sup>c</sup> and Jan Hofsteenge<sup>d</sup>

<sup>a</sup> CNRS Unité Mixte de Recherche 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille Bâtiment C9, 59655, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>b</sup> INSERM U560, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

<sup>c</sup> INSERM E360, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

<sup>d</sup> Friedrich Miescher-Institut, Maulbeerstrasse 66, PO Box 2543, CH-4002, Basel, Switzerland

Received 19 November 2003

Available online 10 May 2004

### Abstract

C-mannosylation of Trp residue is one of the most recently discovered types of glycosylation, but the identification of these mannosylated residues in proteins is rather tedious. In a previous paper [Biochemistry 42 (2003) 8342], it was reported that the complete analysis of all constituents of glycoproteins (sialic acids, monosaccharides, and amino acids) could be determined on the same sample in three different steps of gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. It was observed that during the acid-catalyzed methanolysis step used for liberation of monosaccharide from classical *O*- and *N*-glycans, Trp and His were quantitatively transformed by the addition of a methanol molecule on their indole and imidazole groups, respectively. These derivatives were stable to acid hydrolysis used for the liberation of amino acids. Since monosaccharide derivatives were also stabilized as heptafluorobutyrate derivatives of *O*-methyl-glycosides, it was suggested that C-mannosides of Trp residues could quantitatively be recovered. Based on the analyses of standard compounds, peptides and RNase 2 from human urine, we report that C<sub>(2)</sub>-mannosylated Trp could be quantitatively recovered and identified during the step of amino acid analysis. Analyses of different samples indicated that this type of glycosylation is absent in bacteria and yeasts.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Monosaccharide; Amino acids; Gas chromatography; Mass spectrometry; C-mannoside

C-mannosylation of Trp ((C-Man-)Trp)<sup>1</sup> residues is one of the most recently discovered types of glycosylation of proteins [1–3]. The biosynthesis of C-mannosylation occurs through a dolichol-linked precursor [4], the exact mechanism giving rise to the formation of a C–C bond between the  $\alpha$ -mannose residue and the C(2)

atom of the indole ring of Trp. The reaction is catalyzed by a microsome-associated transferase, whose activity can be detected in various organisms and most organs from mice [4]. Based on several studies, a consensus sequence for C-mannosylation, Trp–x–x–Trp, was deduced [5], the C-mannosylation occurring on the first Trp residue of the sequence, with the possibility that the second Trp residue might be replaced by another aromatic amino acid. Subsequently, however, exceptions to this rule were found. For instance, human fibrinogen B $\beta$ , tenascin, and N Cam L1 contain this motif, but are not C-mannosylated. In these proteins a large hydrophobic amino acid follows the first Trp, a feature that inhibits C-mannosylation (T. Smilda and J. Hofsteenge,

\* Corresponding author. Fax: +33-3-20-43-65-55.

E-mail address: [Jean-Pierre.Zanetta@univ-lille1.fr](mailto:Jean-Pierre.Zanetta@univ-lille1.fr) (J.-P. Zanetta).

<sup>1</sup> Abbreviations used: (C-Man-)Trp, C-mannosylation of Trp; HFB, heptafluorobutyrate; EI, electron impact; CI, chemical ionization; rMR, relative molar response; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry; GPI, glycosyl-phosphatidylinositol; HFBA, heptafluorobutyric anhydride; LB, Luria-Bertani; Nle, norleucine.

### **C. Discussion sur la caractérisation de la structure du dérivé du (C-Man-)Trp par la spectrométrie de masse**

En appliquant les principes de la dérivation du Trp et des Hexoses décrits dans la première publication (Pons A. et coll., 2003a), nous nous attendions à ce que le dérivé du (C-Man-)Trp, obtenu par le protocole à trois étapes (ou au moins les deux dernières), ait la structure présentée dans la figure 2a (Zanetta J. P. et coll., 2004), c'est-à-dire que ce dérivé présente une O-méthylation du carbone 3 du cycle indole, un groupement HFB sur l'amine du même cycle, un isoamyl-ester à la place de la fonction acide, un groupement HFB sur la fonction  $\alpha$  aminée, et enfin, une heptafluorobutyrylation de chaque hydroxyle du résidu de Man. Dans ces conditions, on obtient un dérivé d'une masse de 1644 u. Nous avons donc analysé un standard de (C-Man-)Trp libre avec un appareil NERMAG limité en masse à 2000 u pour obtenir les spectres de masse d'ionisation chimique et d'impact électronique.

Comme nous l'avons cité dans la publication (Zanetta J. P. et coll., 2004), le spectre de masse en mode  $CI^+$  montre un ion très faible à  $m/z$  1662. Comme bien souvent, il s'agit de l'ion quasi-moléculaire  $[M+NH_4]^+$ . Il est accompagné d'un ion bien plus abondant à  $m/z$  1573 qui pourrait correspondre à l'ion fragment  $[M-71]^+$ . En tout cas, ces deux ions semblent indiquer que le dérivé que nous attendions est bien celui qui est formé.

Afin d'aller plus loin dans l'analyse, nous avons étudié le spectre EI du même dérivé. Le spectre limité à 1000 u (obtenu avec l'appareil Finnigan Automass II) est présenté Figure 1c de la publication, alors que celui qui est limité à 2000 u (NERMAG) est présenté figure 2b. Nous pouvons remarquer que, bien que l'on retrouve les mêmes ions sur les deux spectres, certains d'entre eux n'ont pas la même intensité. Ainsi, on observe des ions à  $m/z$  591, 667 et 880 qui sont très intenses dans les deux spectres, alors que celui à  $m/z$  281, très intense dans le spectre limité à 2000 u, est d'amplitude moindre dans le spectre limité à 1000 u. Ces phénomènes n'ont que peu d'importance et pourraient, entre autre, être attribués aux différences de pression au sein des deux appareils. La quasi-totalité des ions visibles dans le spectre de masse limité à 2000 u sont riches d'informations structurales. Ainsi, les principaux d'entre eux sont résumés dans le tableau 1 (Zanetta J. P. et coll., 2004). Toutefois, ce tableau montre certains ions comme provenant de fragmentations qui nous paraissent maintenant très incertaines. C'est pourquoi, nous le remplaçons ici (tableau 17) en résolvant les incertitudes et nous tentons d'expliquer les mécanismes plausibles de la formation de certains de ces ions, soit parce qu'ils ont un grand intérêt sur le plan structural et analytique, soit parce que leur formation n'est pas évidente et quelle nécessite une illustration.

| ion  | intensité  | ion  | intensité                                |
|------|--|------|--|
| 1559 | 0,08% M-15-70(réar.)   | 1138 | 0,52% ?                                  |
| 1538 | 0,23% M-19-87 ou M-20-86   | 1128 | 0,42% 1538-197-213 ou 1243-115           |
| 1510 | 0,07% M-19-115 ou M-20-114                                       | 1115 | 0,27% 1217-32(MeOH)-70(réar.)            |
| 1490 | 0,04% 1559-69  | 1104 | 0,85% M-115-213-212                      |
| 1461 | 0,07% M-88(réar. d'un H)-19-76<br>ou M-87-20(HF)-76 ou 1538-76-1 | 1100 | 0,37% 1510-197-213                       |
| 1297 | 0,21% 1510-213   | 1020 | 0,27% 1217-197                           |
| 1243 | 0,15% M-19-169-213<br>ou 1510-70(réar.)-213                      | 941  | 0,15% 1154-213                           |
| 1241 | 0,18% M-20(HF)-169-214   | 880  | 78,10% M-227-340-197<br>ou M-213-197-354 |
| 1217 | 0,14% M-213-214  | 863  | 3,28% 1217-354                           |
| 1204 | 0,13% M-15-212-213   | 861  | 16,35% 880-19                            |
| 1180 | 0,14% M-70-197-197   | 683  | 7,66% 880-197                            |
| 1166 | 0,25% 1217-19-32(MeOH)   | 667  | 100% 880-213                             |
| 1155 | 1,93% 1217-19-43   | 666  | 40,99% 880-214                           |
| 1154 | 2,65% M-19-43-214-214<br>ou 1217-20-43                           | 591  | 47,59% 1538-947                          |
| 1153 | 1,39% M-20-43-214-214  |      |  |

**Tableau 17: intensités relatives et explications des fragments provenant de l'analyse en EI-MS du dérivé HFB du résidu O-isoamyl-ester du (C-Man)-Trp<sup>#</sup>**

## 1) L'ion moléculaire et les ions primaires

Comme bien souvent à de telles masses (au dessus de 1500 u), il est impossible de distinguer l'ion moléculaire. Dans le cas de ce dérivé, il en est malheureusement de même pour des ions primaires habituellement obtenus pour les dérivés HFB (M-214 = [M-HOOC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, M-213 = [M-OOCC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, M-197 = [M-OCC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, M-169 = [M-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, M-69 = [M-CF<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, M-20 = [M-F]<sup>+</sup> et M-19 = [M-HF]<sup>+</sup>), ou pour les ions primaires des dérivés isoamyl-estérifiés (M-71 = [M-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, M-87 = [M-OC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup> et M-115 = [M-COOC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>). Les premiers ions visibles sur le spectre ne sont donc pas ceux que nous avons l'habitude d'obtenir pour ces dérivés. En fait, les premiers que l'on observe sont des ions secondaires et ils proviennent d'un mélange des deux mécanismes classiques suivants:

## 2) Les ions secondaires du spectre

Le premier ion visible, malgré qu'il soit très faible, est [M-15-70]<sup>+</sup> à m/z 1559. Il est sans doute obtenu par la perte d'un groupement méthyle (celui du O-méthyle) et du groupement isoamylique selon un mécanisme de réarrangement d'un hydrogène. Il est suivi de l'ion [M-19-87]<sup>+</sup> (ou [M-20-86]<sup>+</sup>) d'une masse de 1538 u. Il provient certainement de la perte de deux radicaux que sont, un fluor (<sup>•</sup>F) et l'isoamylate (<sup>•</sup>OC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>) ou de deux molécule que sont HF et OC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>. L'ion [M-19-115]<sup>+</sup> (ou [M-20-114]<sup>+</sup>) à m/z 1510, est également obtenu par la perte

d'un fluor, mais cette fois-ci, accompagnée par celle du radical ( $\cdot\text{COOC}_5\text{H}_{11}$ ) ou bien par la perte de molécule de HF et de  $\text{COOC}_5\text{H}_{10}$ .

Ces trois ions vont ensuite continuer leur dégradation pour fournir de nombreux ions fils du spectre par des mécanismes de fragmentations classiques des dérivés HFB, isoamyl-esters ou O-méthyles. Ils proviennent de la perte de groupements ou radicaux de masse 214, 213, 197, 169, 69, 20 ou 19 (HFB), de masse 115, 87, 71, 70, 43 ou 15 (isoamyl-ester), et de masse 32, 31 ou 15 (O-méthyle). Ainsi,  $[\text{M}-15-70]^+$  à  $m/z$  1559 va donner l'ion de masse 1490 u;  $[\text{M}-20-86]^{+\bullet}$  d'une masse de 1538 u peut fournir les ions de masse 1461 u (figure 220), 1128 u et surtout un ion imposant à 591 u par la perte du résidu de C-Man (figure 222); Quant à  $[\text{M}-20-114]^{+\bullet}$  à  $m/z$  1510, il donne les ions fils de masse 1297, 1243, 1128 et 1100 u.

Parmi les autres ions de haute masse visibles sur le spectre, on trouve d'autres ions secondaires. Il s'agit des ions de masse 1241 et 1217 u. Ce dernier provient de la perte successive d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique et d'un radical heptafluorobutyrate. Il est à l'origine de plusieurs ions fils à  $m/z$  1166, 1154, 1115, 1020, 941, et 863 (figure 221).

### **3) L'ion caractéristique de la présence d'un groupement indole**

Un ion fils de haute masse à  $m/z$  1461 ne semble pouvoir s'expliquer que par la présence du groupement indole. Sa formation est susceptible de suivre trois voies différentes qui conduisent à des ions distincts (voir le tableau 17 p. 313). Toutefois, une seule montre un ion intermédiaire présent dans le spectre ( $m/z$  1538). C'est pourquoi, nous n'illustrons que celle-ci, car nous la pensons favorisée.

L'ion moléculaire pourrait donner l'ion  $[\text{M}-20-86]^{+\bullet}$  d'une masse de 1538 u, déjà discuté précédemment, par perte concécutive des deux molécules HF et  $\text{OC}_5\text{H}_{10}$  puis stabilisation par formation d'un cycle à 6 atomes. Cet ion est susceptible de subir la perte du cycle aromatique de l'indole (masse 76 u) par résonance. Toutefois, cela fait apparaître un radical libre sur un atome d'oxygène, ce qui est peu stable. C'est pourquoi, nous envisageons le départ d'un hydrogène afin de stabiliser l'ion. Ainsi, ce mécanisme permettrait la formation d'un dérivé tricyclique plus stable à  $m/z$  1461 (figure 220). Nous ne sommes bien évidemment pas certains de la structure exacte des différents ions que nous présentons qui, il faut bien l'avouer, semble bien compliqués. Toutefois la formation d'ions présentant ces masses, provient très certainement de la perte de groupements dont les masses sont celles que nous annonçons.

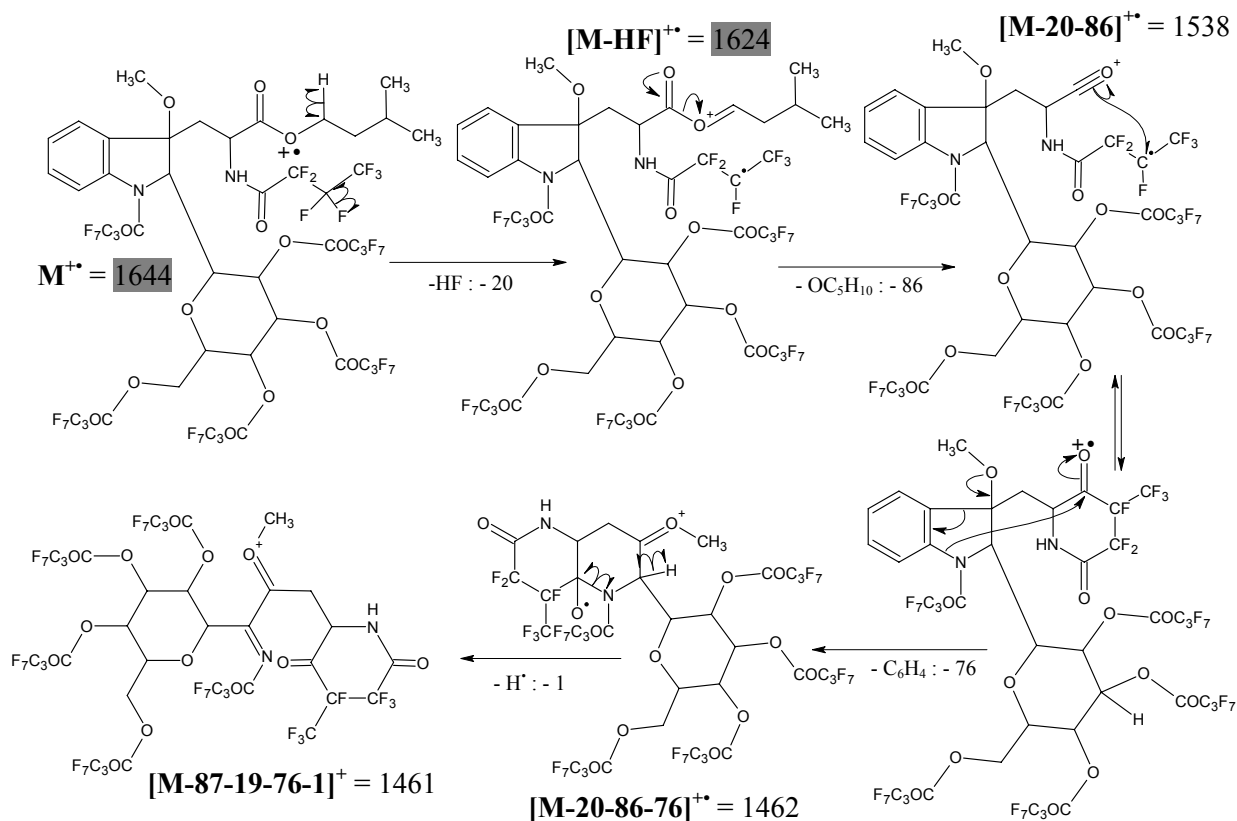


Figure 220: formation d'un ion caractéristique de la présence d'un groupement indole

#### 4) Les ions caractéristiques de la présence d'un groupement O-méthyle

La présence d'un groupement O-méthyle sur une molécule est en général déterminée par la perte du radical  $\cdot\text{OCH}_3$  ( $M = 31$  u) ou d'une molécule de méthanol ( $M = 32$  u). Dans ce cas, seuls deux ions du spectre sont susceptibles de présenter une perte de ce type pour leurs formations. Un provient de l'ion  $[M-214-213]^+$  ( $X_2^+$ ) à  $m/z$  1217 qui doit être dû à deux étapes successives de fragmentation. Cependant, on n'aperçoit pas le résultat de la première ( $X_1^+$ ) sur le spectre. Cet ion  $X_2^+$  est à l'origine de beaucoup d'ions du spectre aux masses: 1154, 1020, 941 et 863 u (voir le tableau 17 p. 313), mais surtout, il fournit un ion à  $m/z$  1115. Sa formation passe sans doute par un intermédiaire  $[X_2-32]^+$ , instable et invisible qui, par la perte d'une molécule de  $\text{C}_5\text{H}_{10}$  après réarrangement d'un hydrogène va donner l'ion  $[X_2-32-70]^+$ . La deuxième voie débute par la formation de l'ion  $[M-HF]^+$  à  $m/z$  1624 qui après la perte successive de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (32 u),  $\cdot\text{OCOC}_3\text{F}_7$  (213 u) et  $\text{NH}_2\text{COC}_3\text{F}_7$  (213 u) va donner l'ion  $[X_1-HF-32-213]^+$  à  $m/z$  1166 (figure 221).



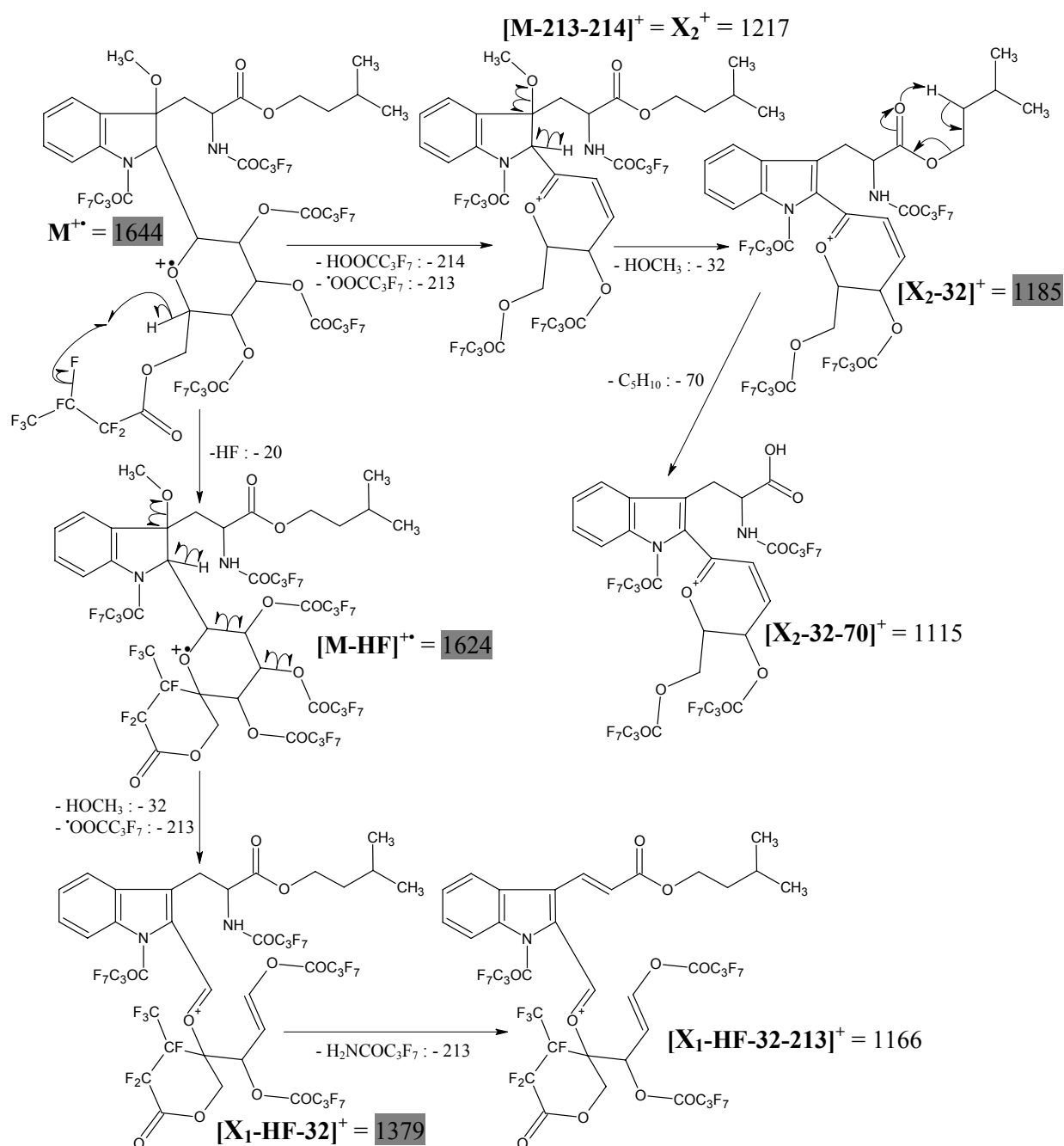
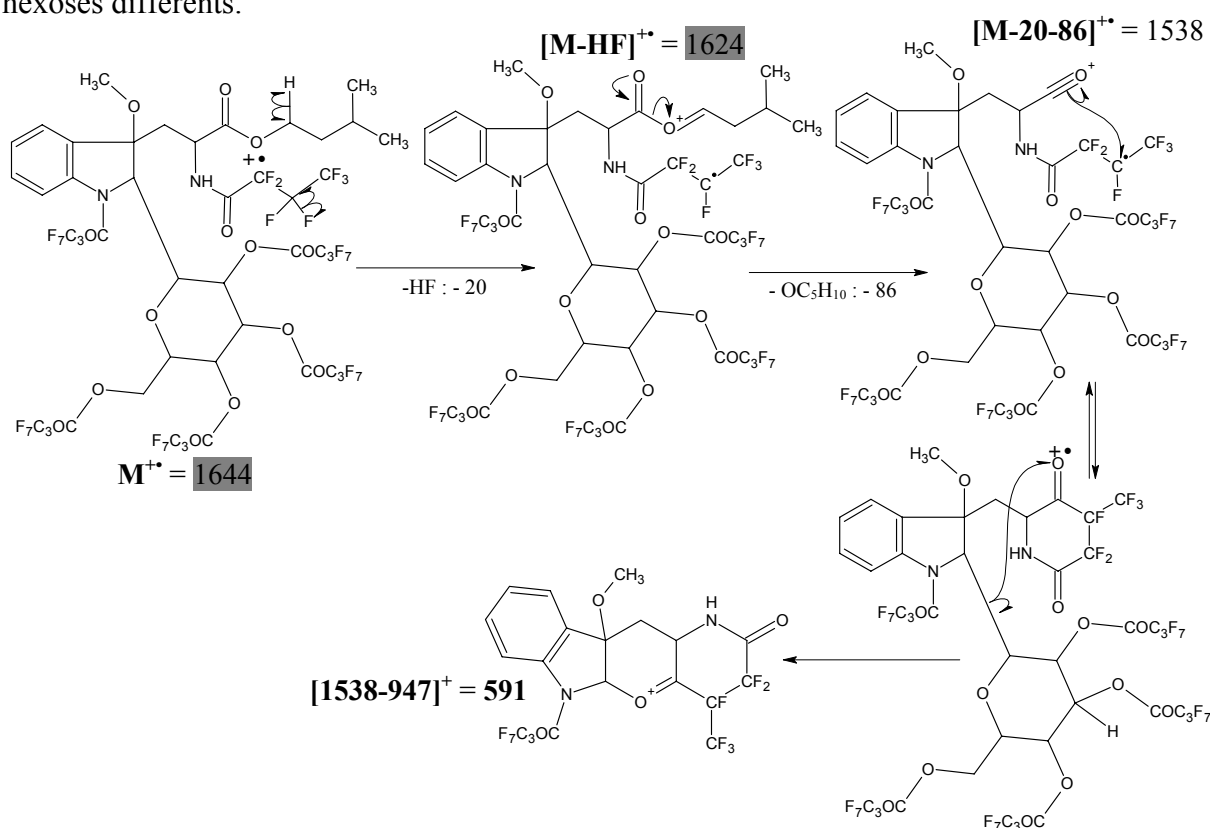


Figure 221: formation des ions caractéristiques de la présence d'un groupement O-méthyle

## 5) L'ion caractéristique de la présence d'un hexose

Seul un ion imposant à  $m/z$  591 nous semble être formé par la perte en bloc du résidu de mannose, et cela directement à partir de l'ion  $[M-20-86]^{++}$  à  $m/z$  1538. Cet ion  $[1538-947]^{++}$  est la seule information directe de la présence sur le dérivé HFB d'isoamyl-ester du (C-Man-)Trp d'un hexose per-heptafluorobutyrylé (figure 222). Remarquons que cet ion, qui permet de penser qu'il existe un résidu hexose, ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agisse d'un Man. Pour cela, il faudrait trouver un ion diagnostique de l'énantiométrie des monosaccharides

comme il en existe pour les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides. En effet, souvenons nous qu'un ion  $B_3$  permet, en fonction de son intensité, de déterminer à quel énantiomère de monosaccharide on a affaire (voir le chapitre sur l'analyse des dérivés HFB des O-méthyl-glycosides). Dans le cas qui nous intéresse ici, il est impossible de former un ion  $B_3$  puisque celui-ci nécessite un groupement O-méthyle sur le carbone 1 pour être formé. Cependant, le fait qu'il n'y ait pas d'ion  $B_3$  ne veut pas dire qu'il est impossible de déterminer quel type d'hexose est présent sur le dérivé. En effet, d'autres ions spécifiques de cette famille de dérivés pourraient jouer le même rôle. Ils nous sont actuellement inconnus, mais il est possible de tenter de les caractériser en comparant les spectres de résidus de Trp portant des hexoses différents.



## 6) La perte d'un résidu de 354 u est à l'origine des ions les plus intenses du spectre.

A partir de l'ion moléculaire, la perte concomitante de deux radicaux de masse 197 et 213 u, permettrait d'obtenir un ion instable  $[M-197-213]^{+\bullet}$  à  $m/z$  1234. Cet ion perd à son tour un radical d'une masse de 354 u pour donner un des ions les plus abondants du spectre  $[M-197-213-354]^+$  à  $m/z$  880. Bien sur, il nous est impossible de savoir d'où proviennent les radicaux

de 197 et 213 u. Ils peuvent, en théorie, provenir de n'importe quel groupement HFB présent sur le dérivé. Cependant, l'ion  $[M-197-213-354]^+$  à  $m/z$  880 ne doit montrer qu'une charge positive et aucun électron radicalaire libre. Les seules façons d'obtenir ce résultat consistent en la formation d'une double liaison ou d'un cycle. C'est cette dernière possibilité que nous avons arbitrairement choisi d'illustrer sur la figure 223, sachant tout de même, qu'il existe évidemment différents types d'ion envisageables à  $m/z$  880. Par la suite, cet ion à  $m/z$  880 subit la perte d'une molécule d'acide heptafluorobutyrique pour donner l'ion  $[880-214]^+$  à 666 u. A partir de l'ion instable  $[M-197-213]^{+*}$  à  $m/z$  1234, si cette perte du radical de 354 u est accompagnée d'une autre, on obtient un des trois ions intenses  $[1234-353-19]^{+*}$ ,  $[1234-353-197]^{+*}$  ou  $[1234-353-213]^{+*}$ . Nous ne développerons pas ici ces mécanismes qui sont des plus classiques pour les dérivés HFB et qui ont déjà été expliqués à de nombreuses reprises dans ce mémoire (figure 223).

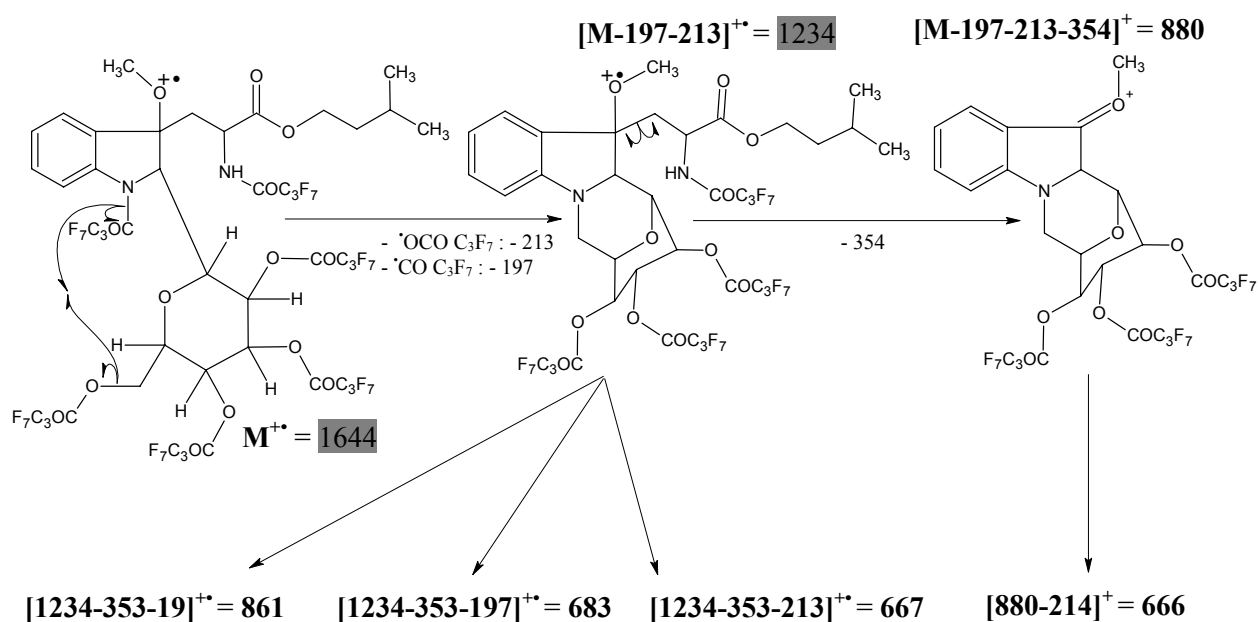


Figure 223: formation des ions les plus intenses du spectre

#### IV. Conclusion

Le fait de former des dérivés HFB d'isoamyl-esters d'acides aminés pour analyser la composition d'une protéine n'a rien de révolutionnaire. En effet, ce type de dérivé n'est pas nouveau, comme on peut le constater dans la partie "généralités" de ce travail où nous avons résumé les travaux antérieurs sur l'utilisation d'esters de dérivés d'acides aminés acylés, soit par des groupements TFA, soit par des HFB. Cette synthèse bibliographique montre bien que l'ensemble de ces études décrit des problèmes d'analyse de certains composés qui sont

imputables à la phase de libération des acides aminés par l'hydrolyse protéique classique. Or, lorsque nous avons décidé de développer un protocole analytique de l'ensemble des constituants des glycoprotéines qui puisse s'appliquer sur un seul et même échantillon, il nous semblait évident que la détermination de la composition de la partie glycannique (première et deuxième étapes du protocole) devait se produire avant celle de la partie protéique (troisième étape du protocole). Essentiellement, car l'hydrolyse protéique nécessaire à la libération des acides aminés dégrade les composants des glycannes. En procédant dans cet ordre, nous nous sommes aperçus que certains pics chromatographiques qui correspondaient à des dérivés d'acides aminés étaient variables entre le protocole en trois étapes et le protocole classique de l'analyse de la composition en acides aminé (troisième étape uniquement). C'est ainsi que nous avons pu déterminer que le fait de faire subir à un échantillon protéique la deuxième étape avant la troisième, permet de régler la plupart des problèmes décrits dans la littérature au sujet de l'hydrolyse protéique, surtout en ce qui concerne la dégradation des résidus Trp et His. En outre, comme le décrit la seconde publication (Zanetta J. P. et coll., 2004), ce protocole permet d'analyser rapidement et aisément la forme particulière de glycosylation que constituent les (C-Man)-Trp, qui sont habituellement difficiles à étudier par d'autres méthodologies.



# **CONCLUSION GENERALE ET RESUME**



## **I. Généralités**

Au cours des différents chapitres de ce travail, nous avons tenté de décrire les avantages de l'utilisation des dérivés HFB pour l'étude en GC-MS de l'ensemble des constituants des glycoconjugués.

Nous avons pu démontrer que cette méthode est très simple à mettre en œuvre et ne présente aucune difficulté particulière quant à la formation des dérivés. Ces derniers sont formés par blocage des fonctions hydroxyles et amines libres des composés à analyser en les rendant apolaires. Ainsi, ils ont montré un excellent comportement chromatographique sur les colonnes capillaires de type diméthyl-siloxane avec lesquelles ils n'interagissent pas du tout. Or, cela n'est pas toujours le cas d'autres dérivés acylés (acétylés et trifluoroacétylés) qui sont un peu plus polaires et de ce fait, interagissent quelque peu avec la phase stationnaire des colonnes. Cela a pour effet de retarder leur élution malgré leur masse moins importante par rapport à leurs équivalents HFB.

Nous avons également insisté sur le fait que les dérivés HFB sont certainement parmi les plus stables dans le temps, notamment comparativement aux dérivés TMS qui restent les plus utilisés malgré le fait qu'ils doivent être analysés très rapidement après leur formation. Ce phénomène est essentiellement dû à la stabilité plus importante des liaisons esters (sur les fonctions hydroxyles) ou amides (sur les fonctions amines) des dérivés HFB, comparée à celle des liaisons éthers (sur les fonctions hydroxyles) des dérivés TMS. Ceci est d'autant plus vrai pour les composés contenant des fonctions amines libres qui donnent, lorsqu'elles sont dérivés par les TMS, des dérivés très instables aux températures élevées des injecteurs des chromatographes. Ainsi, nous pensons que c'est cette dernière particularité qui est à l'origine de la supériorité des dérivés HFB sur les TMS pour l'analyse quantitative des molécules aminées telles que celles que nous avons analysées (osamines, acides sialiques, bases sphingoïdes et acides aminés).

Si l'on passe outre le prix de l'appareil analytique, la dérivation par les HFB est une méthode assez bon marché, dont les réactifs de libération et de dérivation des constituants à analyser sont peu coûteux. Seules les colonnes capillaires ont un prix relativement élevé. C'est pourquoi, en raison de leur fragilité, nous recommandons de faire attention à ne pas les martyriser. Toutefois, notons qu'elles peuvent garder un comportement linéaire pendant six mois d'utilisations intensives si le protocole analytique est bien respecté, notamment en ce qui concerne les phases d'évaporations sous azote des résidus acides apparus après acylation.



Quant au temps nécessaire à une analyse, même si les différentes phases de libération des composés (20 h pour la méthanolyse, 16 h pour l'hydrolyse protéique) et celle de méthyl-estérification des acides sialiques (une nuit, mais ce temps peut être raccourci) sont assez longues, les autres phases du protocole sont relativement courtes, même pour le passage en GC-MS dont un cycle analytique ne dépasse pas l'heure. Ainsi, à moins d'effectuer le protocole complet en trois étapes sur un échantillon, la composition en acides sialiques (étape 1), en monosaccharides et en lipides (étape 2) ou en acides aminés (étape 3) peut être obtenue en une journée. Evidemment, il est possible d'améliorer ce rendement puisqu'une bonne organisation du travail permet d'étudier la composition d'un échantillon toute les heures et ainsi, d'envisager l'utilisation de cette méthode pour des analyses de routines, comme cela peut être le cas dans l'industrie ou dans les laboratoires d'analyses.

Nous avons décrit l'emploi de cette technique pour l'analyse aussi bien qualitative que quantitative des différentes familles de composés que sont: les sucres, les lipides et les protéines. Jusqu'à maintenant, seule la dérivation par les TMS avait montré de bons résultats pour l'ensemble de ces familles de composés. D'ailleurs, comme le prouve le très grand nombre de publications faisant intervenir cette technique, c'est sans doute cette sorte "d'universalité analytique" qui est à l'origine de la généralisation de ce procédé dans la plus part des laboratoires qui s'intéressent à la structure moléculaire. Or, nous pensons avoir démontré que la dérivation par des groupements HFB est au moins aussi efficace que cette technique tout en étant aussi généraliste. Nous pensons même que les dérivés HFB sont d'utilisation plus aisée, mais surtout, qu'ils présentent, contrairement aux dérivés TMS, l'avantage d'être beaucoup plus stables et de permettre véritablement l'analyse quantitative des composés aminés qui sont nombreux parmi les composés que nous avons analysés (hexosamines, acides sialiques, bases sphingoïdes, acides aminés). Ainsi, ce document c'est attaché à démontrer l'intérêt de la dérivation par les HFB de toutes les familles de composés que l'on puisse trouver dans la composition des glycoconjugués. Les résumés pour chacune d'entre-elles sont les suivants:

## **II. Analyse de la composition monosaccharidique des glycoconjugués**

Avant même la dérivation des composés, il faut choisir la méthode la plus adaptée à la libération des monosaccharides. Nous avons préféré la méthanolyse car elle concilie une libération quasi-complète de ces derniers au respect de leur structure intime, excepté dans les

cas des molécules acétylées (N-acétyl-osamines et acides sialiques) qui connaissent une N- et O-dé-acétylation systématique. Toutefois, nous avons montré que cela ne constitue pas un problème puisque toutes les fonctions amines et/ou hydroxyles libérées par ce traitement se trouvent ensuite dérivées lors de l'acylation par l'HFBA. En effet, nos travaux ont montré qu'en ce qui concerne les molécules qui étaient N-acétylées, les groupement HFB fixés sur une fonction amine par une liaison de type amide ont une excellente stabilité lors des injections. Cela nous a donc permis d'étudier quantitativement les dérivés des N-acétyl-hexosamines et des acides sialiques. C'est d'ailleurs à nos yeux, cette particularité qui représente le principal avantage de l'utilisation des dérivés HFB par rapport à celle des TMS, toutefois bien plus largement utilisés. En outre, les particularités intéressantes de la méthanolyse sont, non seulement qu'elle permet de former des O-méthyl-glycosides plus stables que les équivalents libres (glycosides), mais aussi qu'elle permet de former directement des méthyl-esters à partir des acides sialiques..

Les dérivés HFB des O-méthyl-glycosides sont relativement lourds. Ainsi, ils permettent d'évaporer sous un courant d'azote l'acide formé pendant la phase d'acylation (dans notre cas, de l'acide heptafluorobutyrique), sans perdre les dérivés les plus légers (pentoses et désoxy-hexoses). Or, cette possibilité n'est pas l'apanage d'autres techniques d'acylation comme l'acétylation mais surtout la trifluoroacétylation pour lesquelles des études ont rapporté une perte plus ou moins prononcée des dérivés les plus légers. Pourtant, malgré cette masse plus importante, les dérivés HFB, qui sont parfaitement apolaires, sortent rapidement de la colonne, ce qui permet de les séparer de dérivés pourtant plus légers comme ceux des lipides (FAMES et bases sphingoïdes) qui sortent plus tard.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, bien que nous n'ayons pas fait d'études avec des dérivés deutérés, nous avons décrit les principaux mécanismes de fragmentation de chaque composé monosaccharidique étudié. Cela, en nous basant sur les principes, déjà connus, de fragmentation d'autres types de dérivés (per-méthylés, per-acétylés, TFA et TMS). Ainsi, nous avons déterminé l'existence d'ions spécifiques (diagnostiques) à chaque famille d'ose qui permettent de reconstituer un chromatogramme afin de discriminer rapidement tous les composés monosaccharidiques d'un échantillon. En outre, pour les composés de même masse, il est possible de différencier sans aucune ambiguïté les énantiomères grâce à l'amplitude de l'ion  $B_3$ . La recherche d'un autre ion ( $E_1$ ) permet, quant à elle, de déterminer si l'on a affaire à un dérivé de monosaccharide de forme furanique ou de forme pyranique.

Enfin, les membres de notre équipe ont décrit deux particularités d'importance à l'utilisation de la méthode des dérivés HFB pour les O-méthyl-glycosides. Tout d'abord, elle permet la

discrimination de la première GlcNAc des chaînes N-glycanniques par rapport aux autres GlcNAc présentes dans ce type d'oligosaccharides. Ne contenant qu'un seul de ces résidus, la composition monosaccharidique d'une de ces chaînes peut donc être obtenue par comparaison de la quantité des autres monosaccharides par rapport à celle de ce composé. En outre, cela permet aussi de déterminer, à partir d'une glycoprotéine isolée, si elle contient uniquement des N-glycannes, des O-glycannes ou les deux. La deuxième particularité de cette méthode est qu'il est possible, à la condition d'ajouter de l'acétate de baryum au mélange de méthanolyse, de déterminer de façon précise la composition monosaccharidique des protéoglycannes.

Nous avons également décrit les lacunes de l'utilisation des dérivés HFB des O-méthylglycosides pour l'analyse des acides sialiques. En effet, nombre de leurs groupements (N- et O-acéthyles, N-glycolyle, 9-O-lactyle, 8-sulfate, etc...) sont bien connus pour ne pas supporter la méthanolyse anhydre. Nous nous sommes donc appliqués, toujours en utilisant la dérivation par les HFB, à développer une variante au protocole analytique des sucres afin que les résidus des acides sialiques ne soient plus dégradés et qu'ainsi, ils puissent être analysés, non seulement de façon quantitative, mais aussi qualitative.

### **III. Analyse de la composition en acides sialiques des glycoconjugués**

Puisque la méthanolyse dégrade les acides sialiques, nous avons choisi, dans le cas de la nécessité d'une analyse qualitative, de libérer ces composés par une méthode d'hydrolyse douce à l'acide acétique. En effet, cette dernière connaît des rendements de libération assez importants, si elle est conduite dans de bonnes conditions. Toutefois, contrairement à la méthanolyse, elle ne permet pas de méthyl-estérifier la fonction acide. Il est donc nécessaire de bloquer cette fonction en utilisant une étape supplémentaire de méthyl-estérification par le diazométhane. Après cela l'acylation par des groupements HFB ne présentent aucunes difficultés.

Cette nouvelle méthode présente des avantages importants par rapport à d'autres techniques précédentes (TMS), Encore une fois, en raison de la dérivation des fonctions amines et de la stabilité des dérivés HFB. En outre, il n'est pas nécessaire d'appliquer aux échantillons d'origine biologique d'étapes intermédiaires de purification des acides sialiques après leur libération par l'hydrolyse ménagée. Ainsi, qu'il s'agisse de glycolipides ou d'oligosaccharides, les échantillons peuvent être traités dans un seul tube tout au long du protocole analytique, sans élimination des autres dérivés. Pour l'analyse de glycoprotéines, une simple et courte

étape de centrifugation est suffisante pour éliminer le matériel insoluble qui ne contient qu'une très faible quantité d'acides sialiques.

Cette méthode est aussi plus sensible que d'autres. D'abord, car il n'est point besoin d'une étape de purification qui peut amener la perte de composés d'importance. C'est notamment le cas des formes lactones probablement perdues lors du passage dans des colonnes échangeuses d'ions, de la transformation des composés de la famille du Neu en base de Schiff et des problèmes d'isomérisation de groupements O-acétyles, qui ont été décrits durant certaines phases de purification ou de formation des dérivés TMS. Ensuite, car les composés dérivés par de nombreux groupements HFB permettent une hausse de la sensibilité des spectromètres de masse (surtout en mode CI<sup>-</sup>). Grâce à cela, environ 0,1 ng d'acides sialiques suffisent largement à une analyse de bonne facture. Il est donc tout à fait envisageable, comme nous l'avons fait, d'analyser la composition d'un échantillon obtenu à partir d'une biopsie. En effet, la sensibilité de cette méthode et son respect de la structure fine des composés, nous permet de déterminer si des variations qualitatives ou quantitatives de la population en acides sialiques peuvent être les marqueurs de certaines pathologies (cancers et infections bactériennes ou virales). Ainsi, cette technique pourrait être utilisée en routine dans des laboratoires d'analyses biologiques ou médicales.

Durant nos travaux, nous avons démontré que ce protocole analytique permettait la formation de dérivés peu conventionnels, puisque nous sommes maintenant convaincus que les composés de la famille du Neu5Ac donnent des dérivés qui apparaissent sous forme de lactames en spectrométrie de masse. Pour les composés des familles des Neu5Gc et Neu, nous ne savons pas encore avec certitude si leurs dérivés connaissent ou non une acylation supplémentaire pour donner une amine tertiaire. Ces quelques points restant à affiner, ils feront l'objet de nos prochaines expérimentations.

Cependant, cette méthode promet déjà d'être parfaitement adaptée à l'étude de la composition d'un échantillon (même complexe) en acides sialiques. Elle permet de discriminer rapidement toutes les particularités qui définissent les différentes familles de ces composés, par reconstitution du chromatogramme à l'aide d'ions diagnostiques (ion à  $m/z$  73 pour les 9-O-Ac, à 84 u pour les 4-O-Ac, à 112 u pour les 9-O-lactyl, à 122 u pour les 8-sulfate, etc...). En outre, nos nombreuses investigations, à partir d'échantillons très variés, nous ont permis de soulever la question de l'existence *in vivo* des acides sialiques sous forme lactone, ce qui ouvre des perspectives de recherches quant à leur formation et leurs possibles activités biologiques.

#### **IV. Analyse de la composition en lipides des glycoconjugués**

Les dérivés HFB de lipides comme les cholestérols ont déjà été bien étudiés et ont montré de bons résultats. Nos travaux se sont attachés à d'autres types de lipides qui peuvent être analysés après méthanolyse anhydre et dérivation par l'HFBA. Ainsi, nous avons vu que, comme d'autres méthodes, la dérivation par les HFB permet d'analyser la composition lipidique d'un mélange en: acides gras, monoalkylglycérols et plasmalogènes. Mais surtout, nous ferons remarquer que ce type de dérivation a montré d'intéressantes caractéristiques pour l'étude des acides gras hydroxylés et, au moins en ce qui concerne les mono-hydroxylés, pour le positionnement des groupements hydroxyles. Un autre grand intérêt de l'utilisation des dérivés HFB concerne la détermination de la composition d'un échantillon en bases sphingoïdes, puisqu'elles contiennent une fonction amine qui est parfaitement dérivée par l'HFBA. Ainsi, les dérivés des bases sphingoïdes ont donné des spectres qui nous ont permis de déterminer les ions diagnostiques qui servent à discriminer rapidement les différentes familles de bases que sont: les sphingénines, les sphinganines et les phytosphingosines, mais aussi la famille peu connue des 6-hydroxy-sphingénines. Pour chacune de ces familles, nous avons décrit les différents composés formés durant la méthanolyse à partir d'un individu et bien qu'ils puissent parfois être nombreux (3 pour les sphingénines, 5 pour les 6-OH-sphingénines, ect...), nous avons caractérisé les dérivés qui en découlent. Selon certains auteurs, cette multiplicité de dérivés par composés est un problème pour l'analyse des chromatogrammes. Cependant, nous rappellerons que ces dérivés ont de bons comportements chromatographiques et donnent des pics bien individualisés, de forme pseudo-gaussienne, dont le rapport des uns envers les autres reste constant. Ainsi, nous pensons que ce nombre élevé de dérivés par composé n'est pas forcément très gênant. D'autant plus que cela peut avoir comme intérêt de choisir le dérivé que l'on veut utiliser pour quantifier un composé, lorsqu'il a un grand nombre de produits dans un échantillon, favorisant les chevauchements de pics.

En outre, cette technique a été utilisée pour l'étude de mélanges complexes, contenant non seulement des lipides, mais aussi d'autres composés comme des oligosaccharides ou des composés d'origine protéique (acides aminés ou peptides). Cela, directement sur un homogénat, sans étapes intermédiaires et complexes de purification. Cette méthode est donc tout à fait indiquée pour l'analyse de la composition des différentes familles de glycolipides, puisqu'en un seul chromatogramme, tous les constituants de ces composés peuvent être identifiés et quantifiés. Ainsi, il nous a été possible de déterminer rapidement la composition

de molécules aussi complexes que des gangliosides ou des GPI. En effet, pour de tels composés, l'utilisation des ions diagnostiques de chaque famille lipidique est une aide précieuse qui permet de discriminer aisément et rapidement les différents représentants d'un mélange pouvant parfois comporter jusqu'à 200 composés. Enfin, nous ajouterons que les dérivés HFB ont l'avantage d'être formés en une seule étape et qu'ils sont très stables dans le temps, quelque soit la famille de lipides étudiée.

## **V. Avantage du protocole en trois étapes pour l'analyse de glycoprotéines et notamment de la composition en acides aminés**

En nous basant sur les travaux précédents de la formation de dérivés HFB pour l'analyse de la partie glycanique des glycoprotéines (zanetta J. P. et coll., 1999), nous avons développé un protocole analytique, en trois étapes, de la composition complète des glycoprotéines (partie glycanique et aglycone). La première de ces étapes, après hydrolyse douce, permet de déterminer la composition en acides sialiques. La seconde, après méthanolyse, donne la composition en monosaccharides. Puis, la troisième donne la composition en acides aminés. Cette dernière étape fait intervenir la formation de dérivés HFB d'isoamyl-esters d'acides aminés et a montré des résultats comparables aux autres dérivés acylés de ce type. Cependant, la particularité de notre protocole en trois étapes successives nous a permis de nous apercevoir que l'étape de méthanolyse, précédant l'hydrolyse protéique classique, permet de régler certains inconvénients de la dernière étape lorsqu'elle est appliquée seule. Ainsi, ce protocole permet de caractériser et de quantifier les résidus Trp et His d'une protéine. En effet, comme l'a montré l'étude de leurs spectres de masse, ces composés forment, après la méthanolyse, des dérivés O-méthylés au niveau du cycle aromatique. Ce phénomène leur fait perdre la capacité de délocalisation des doubles liaisons du cycle à l'origine de leur dégradation lors de l'étape suivante d'hydrolyse protéique. Ainsi protégés, ces composés deviennent résistants à l'hydrolyse et, après acylation par l'HFBAA, donnent des dérivés stables qui peuvent être quantifiés. Ce même phénomène nous a également permis d'analyser une glycosylation particulière qu'est la C-mannosylation des protéines. Elle consiste en un résidu de Man branché sur un Trp par une simple liaison C-C. Ainsi, La caractérisation de ce composé était impossible par la méthode d'hydrolyse protéique traditionnelle qui dégrade le Trp et les glycosides. Mais, la protection des résidus de Man et Trp, par O-méthylation puis heptafluorobutyrylation lors de la seconde étape du protocole, rend leur analyse possible après l'hydrolyse protéique.

En outre, après la troisième étape, les chromatogrammes montrent des pics correspondant aux dérivés d'acides aminés, bien individualisés, de forme pseudo-gaussienne et bien séparés de ceux correspondant aux monosaccharides (O-isoamyl-glycosides) non dégradés après l'hydrolyse protéique (puisque eux aussi sont protégés de la dégradation grâce à la seconde étape). Chaque dérivé d'acide aminé donne un spectre de masse très claire dont les spécificités permettent de caractériser son propriétaire sans aucune ambiguïté.

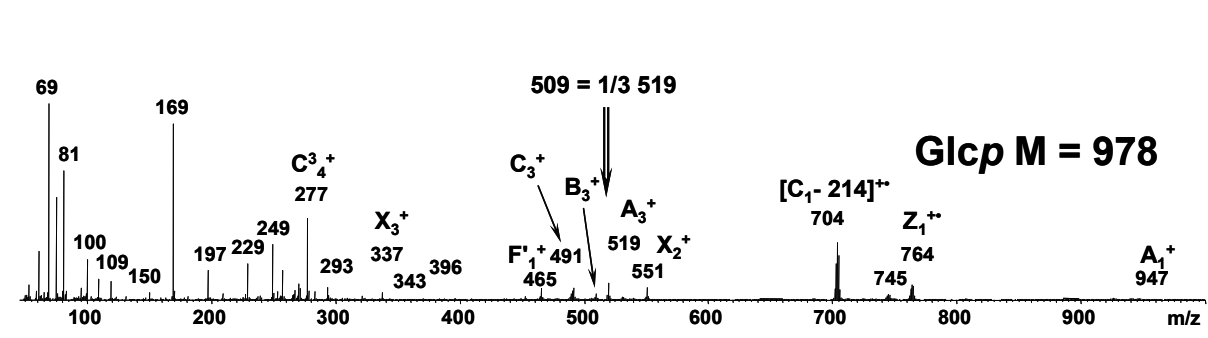
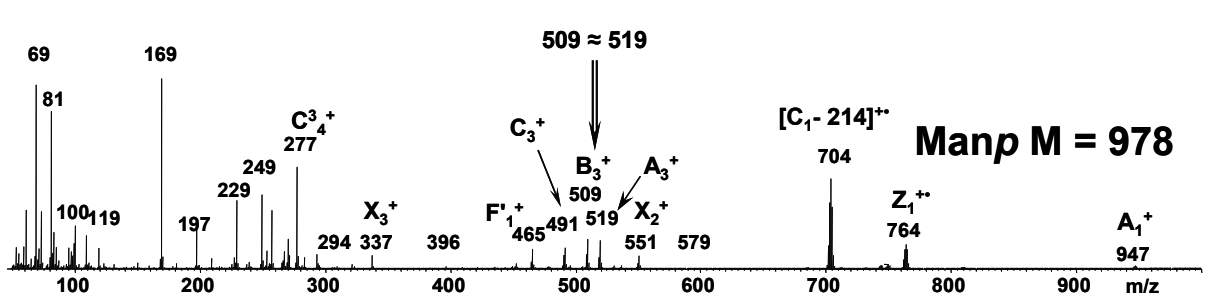
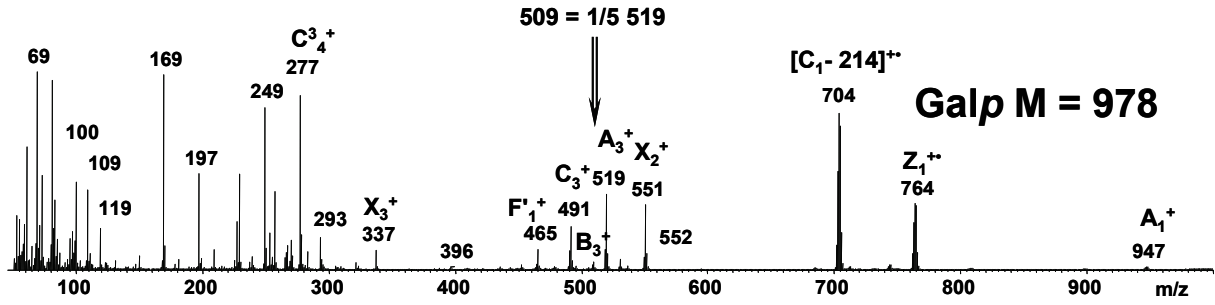
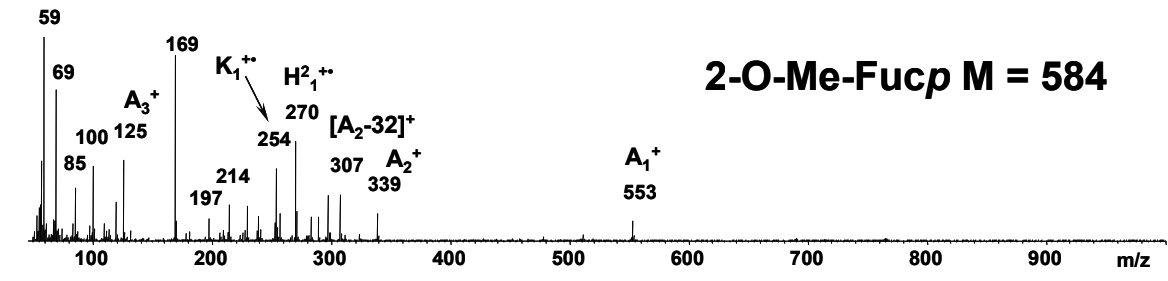
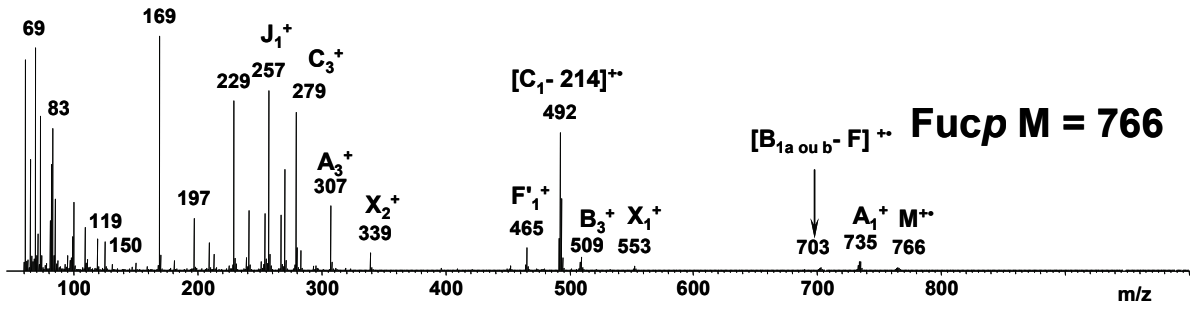
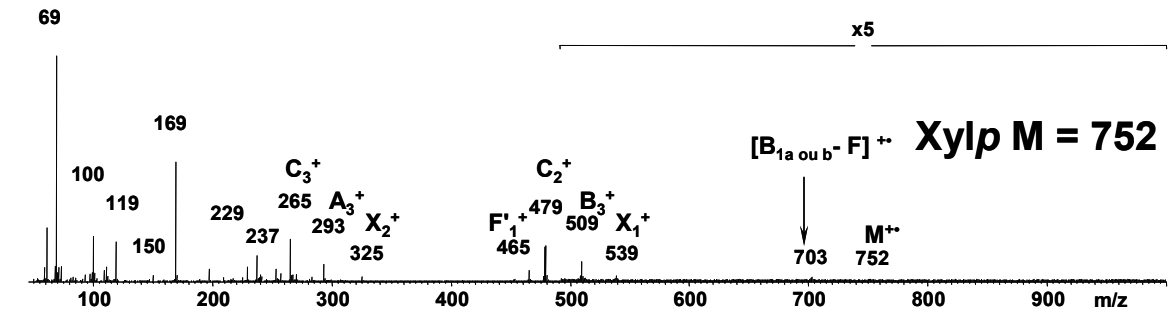
La sensibilité de cette technique permet d'analyser des quantités de glycoprotéines de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{g}$  pour la préparation de 200  $\mu\text{l}$  de produit dérivé, dont seulement 1  $\mu\text{l}$  est injecté. Cela autorise donc des quantités moindres en cas de nécessité. En tout cas, ces quantités sont tout à fait en accord avec celles qui sont couramment utilisées pour des séparations de protéines sur gel SDS-PAGE. Il est donc possible, après transfert sur membrane de PVDF, de faire subir le protocole analytique à un spot isolé de cette dernière, ce qui constitue un moyen efficace de détermination des constituants d'une glycoprotéine purifiée.

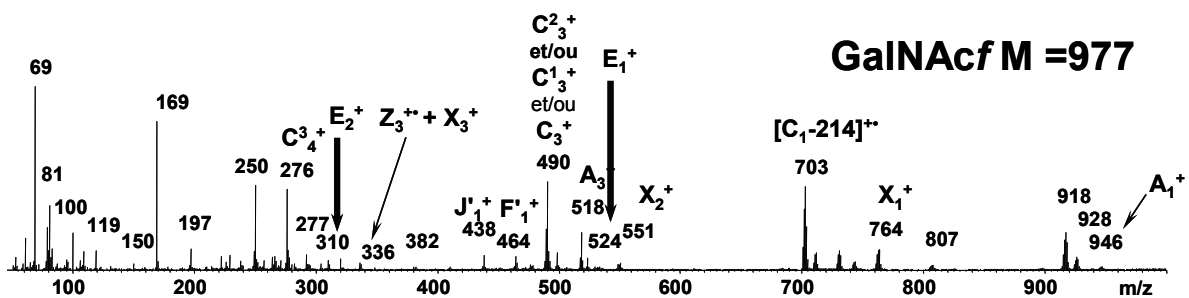
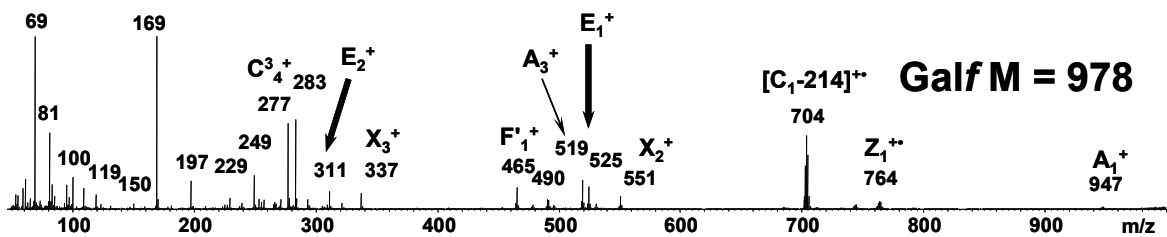
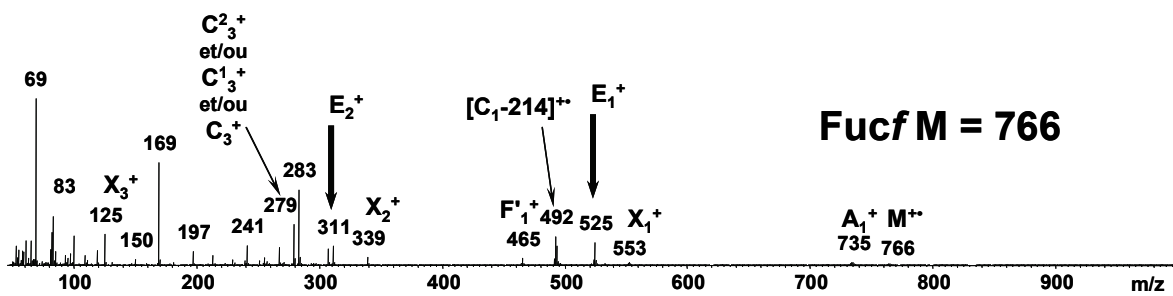
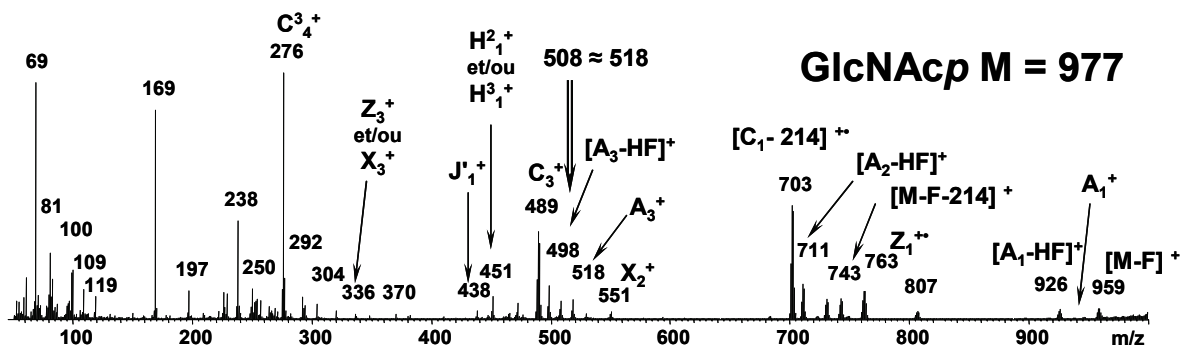
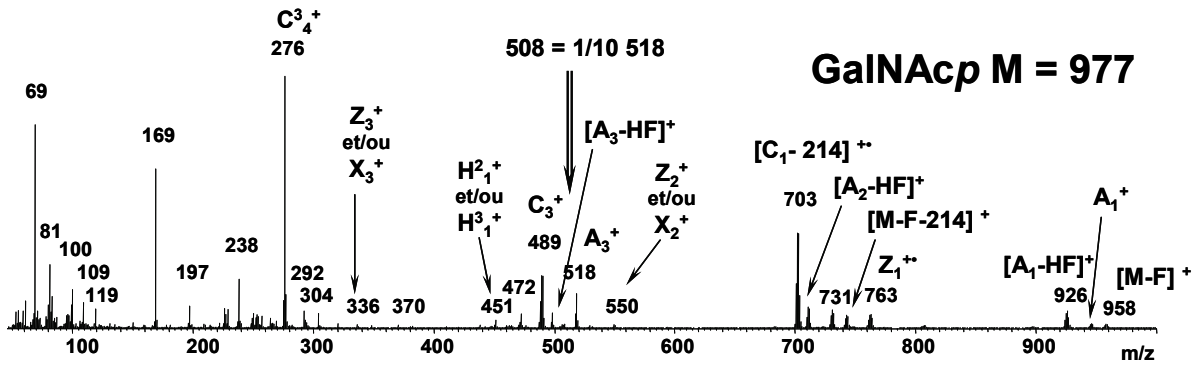
# **ANNEXE**

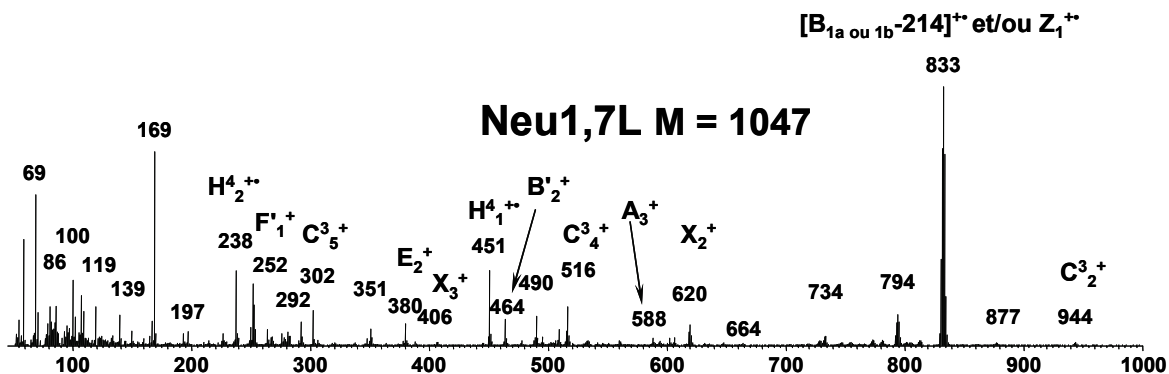
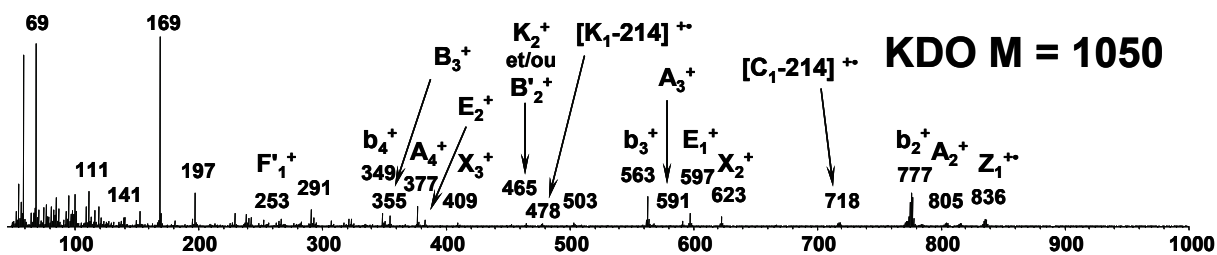
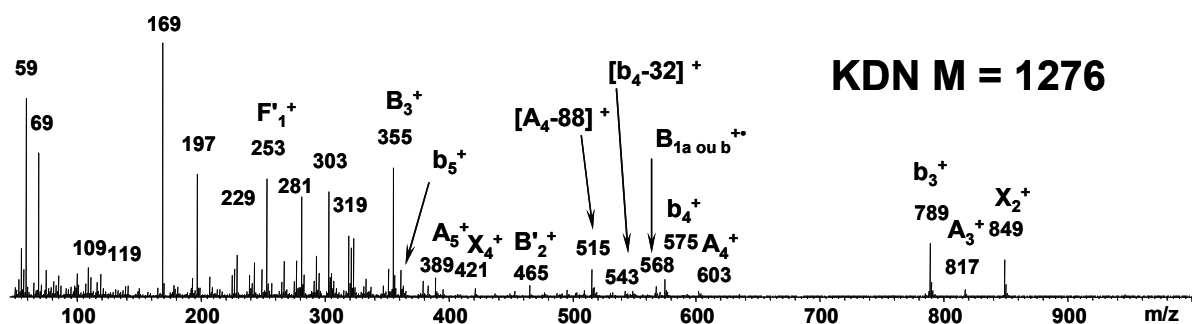
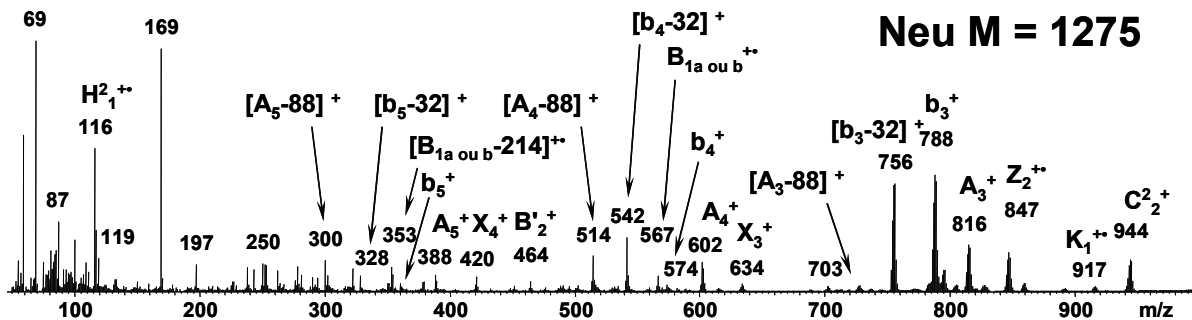
Spectres de masse EI décrits dans ce mémoire.

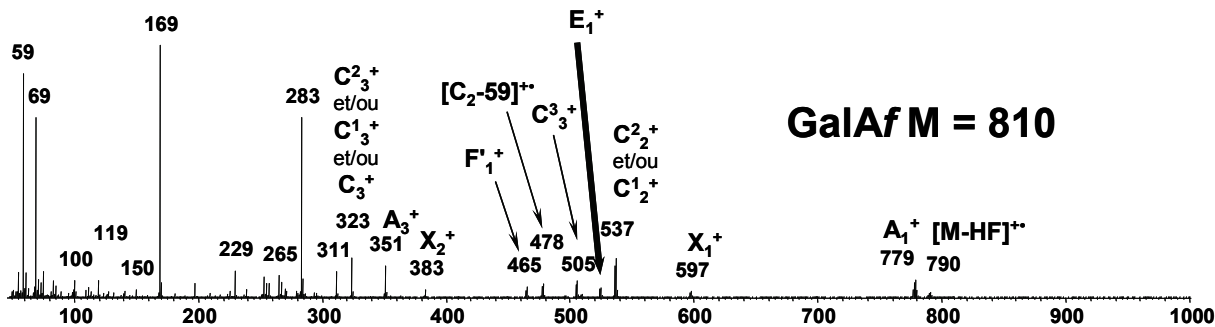
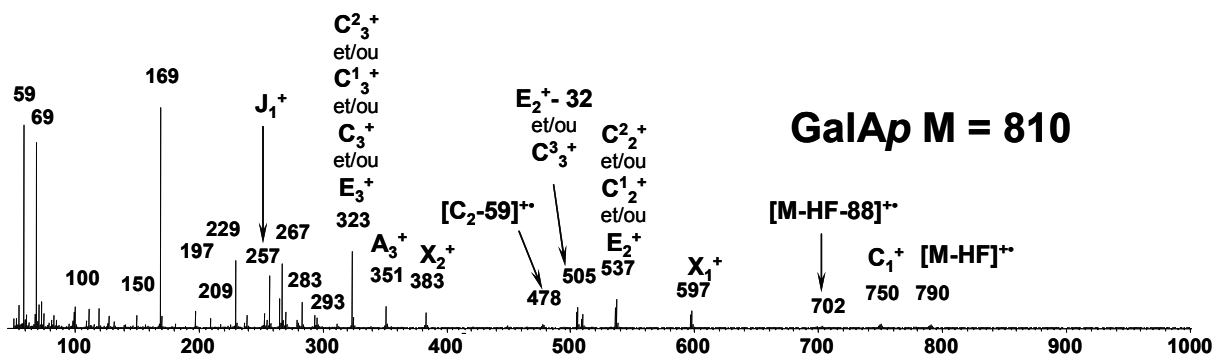
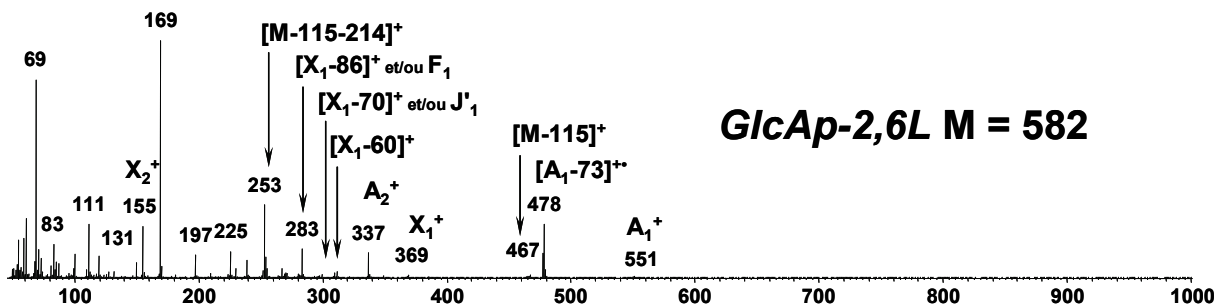
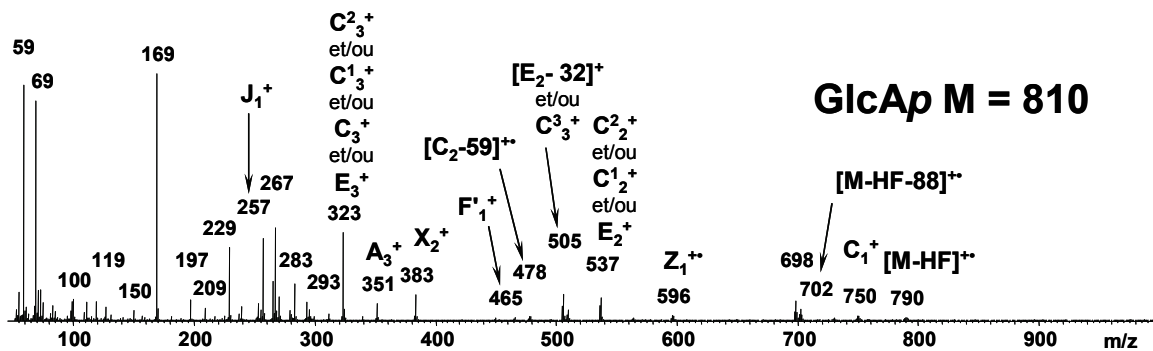


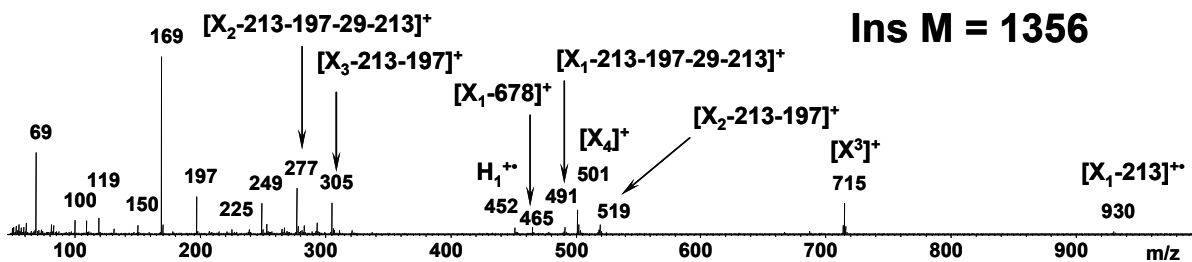
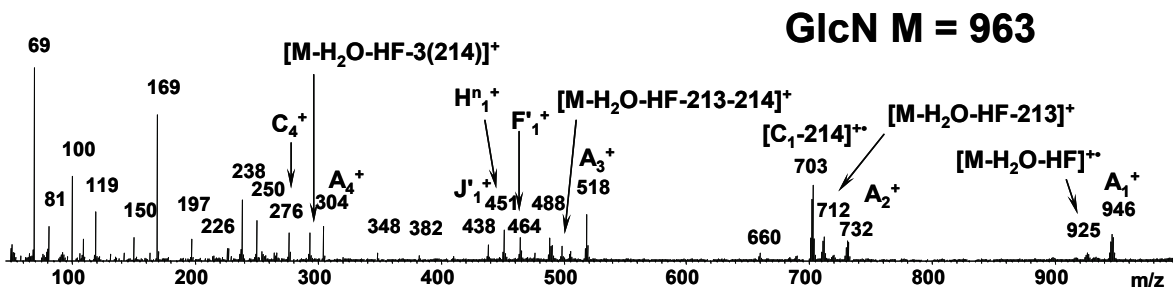
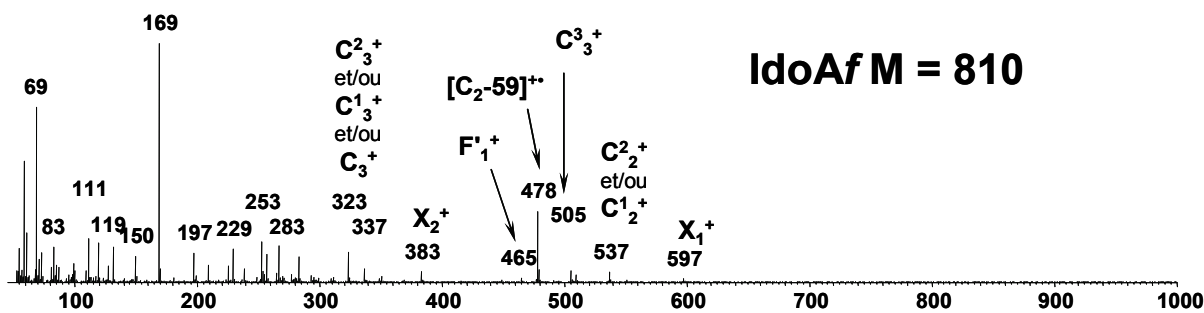
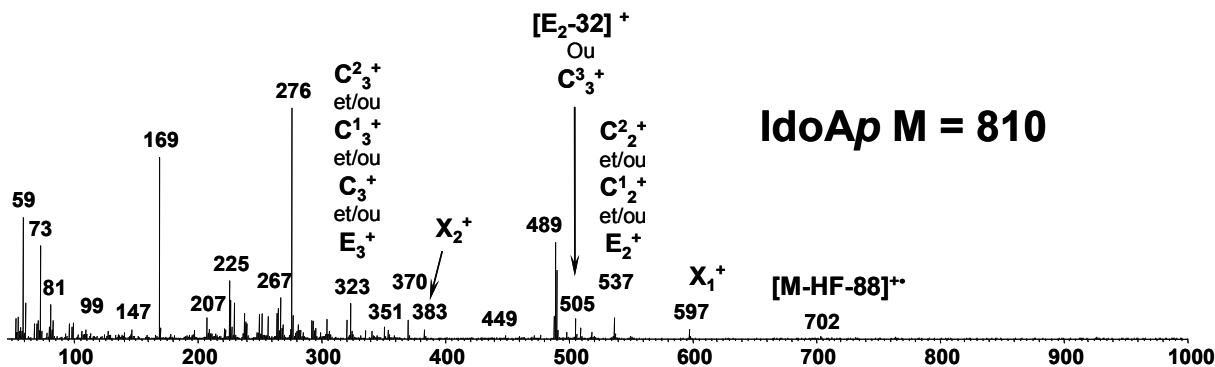


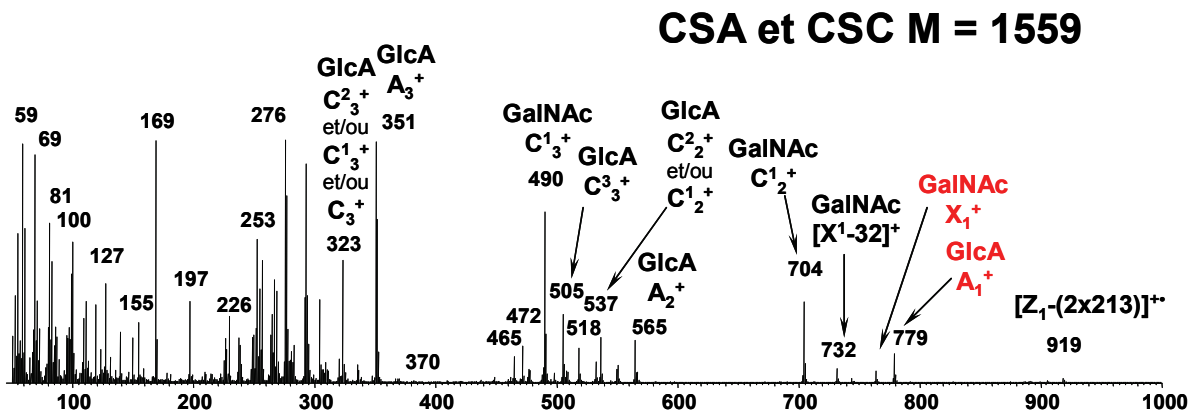
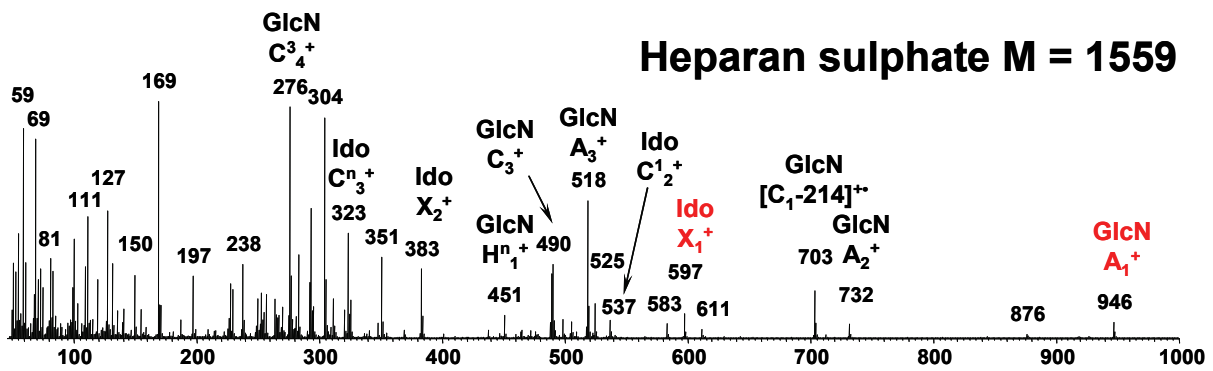












# **BIBLIOGRAPHIE**





- **Adams R. F.** (1974) Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **95**, 189-212.
- **Albersheim P., Nevins D. J., English P. D. and Karr A.** (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, **5**, 340-345.
- **Alugupalli S., Portaels F. and Larsson L.** (1994) Systematic study of the 3-hydroxy fatty acid composition of mycobacteria. *J. Bacteriol.*, **176**, 2962-2969.
- **Aluyi H. A. S. and Drucker D. B.** (1979) Fingerprint of carbohydrates of *streptococcus mutans* by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **178**, 209-218.
- **Andersson B. A.** (1978) Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. *Prog. Chem. Fats Other Lipids*, **16**, 279-308.
- **Andersson B. A. and Holman R. T.** (1975) Mass spectrometric localization of methyl branching in fatty acids using acylpyrrolidines. *Lipids*, **10**, 716-718.
- **Andersson B. A. and Holman R. T.** (1974a) Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids*, **9**, 185-190.
- **Andersson B. A., Heimermann W. H. and Holman R. T.** (1974b) Comparison of pyrrolidides with other amides for mass spectral determination of structure of insaturated fatty acids. *Lipids*, **9**, 443-449.
- **Andrews M. A.** (1989) Capillary gas-chromatographic analysis of monosaccharides: improvements and comparisons using trifluoroacetylation and trimethylsilylation of sugar O-benzyl- and O-methyl-oximes. *Carbohydr. Res.*, **194**, 1-19.
- **Angara T. et Varki A.** (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids : An evolutionary perspective. *Chem. Rev.* **102**, 439-469.
- **Anumula K. R. and Taylor P. B.** (1992) A comprehensive procedure for preparation of partially methylated aldito acetates from glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.*, **203**, 101-108.
- **Apon J. M. B. and Nicolaides N.** (1975) The determination of the position isomers of the methyl branched fatty acids methyl esters by capillary GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 467-473.
- **Baenziger J. and Kornfeld S.** (1974) Structure of the carbohydrate units of IgE immunoglobulin. II. Sequence of the sialic acid-containing glycopeptides. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1897-1903.
- **Bhattacharjee A. K. and Jennings H. J.** (1976) Determination of the linkages in some methylated, sialic acid-containing, meningococcal polysaccharides by mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, **51**, 253-261.

- **Bhatti T., Chambers R. E. and Clamp J. R.** (1970) The gas chromatographic properties of biologically important N-acetylglucosamine derivatives, monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides and pentasaccharides. *Biochim. Biophys. Acta.*, **222**, 339-347.
- **Biermann C. J., Kinoshita C. M. Marlett J. D. and Steele R. D.** (1986) Analysis of amino acids as tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **357**, 330-334.
- **Bishop C. T.** (1962) Separation of carbohydrate derivatives by gas liquid partition chromatography. *Methods Biochem. Anal.*, **Vol. X**, 1-42.
- **Bishop C. T.** (1964) Gas-liquid chromatography of carbohydrate derivatives. *Advan. Carbohydr. Chem.*, **19**, 95-147.
- **Bjorndal H., Lindberg B., Pilotti A. and Svensson S.** (1970) Mass spectra of partially methylated alditol acetates. Part II. Deuterium labelling experiment. *Carbohydr. Res.*, **15**, 339-349.
- **Blau K. and Darbre A.** (1965) Gas chromatography of volatile amino derivatives: II. Leucine, cysteine, proline, hydroxyproline, methionine, phenylalanine, aspartic acid and glutamic acid. *J. Chromatogr.*, **17**, 445-449.
- **Blau K. and Darbre A.** (1967) Gas chromatography of volatile amino acid derivatives: III. Aspartic acid, lysine, ornithine, tryptophan and tyrosine. *J. Chromatogr.*, **26**, 35-40.
- **Boyenaems J. M., Brash A. R., Oates J. A. and Hubbard W. C.** (1980) Preparation and assay of monohydroxy-eicosatetraenoic acids. *Anal. Biochem.*, **104**, 259-267.
- **Bruvier C., Leroy Y., Montreuil J., Fournet B. and Kamerling J. P.** (1981) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methyl esters of methyl N-acetyl-N-methyl- $\beta$ -D-neuraminate methyl glycoside. *J. Chromatogr.*, **210**, 487-504.
- **Buscher H. P., Casals-Stenzel J. and Schauer R.** (1974) New sialic acids. Identification of N-glycoloyl-O-acetylneuraminic acids and N-acetyl-O-glycoloylneuraminic acids by improved methods for detection of N-acyl and O-acyl groups and by gas-liquid chromatography. *Eur. J. Biochem.*, **50**, 71-82.
- **Canalon P. and Klingman J. D.** (1974) An improved procedure for preparing the n-butyl-trifluoroacetyl amino acid derivatives and its application in the study of radioactive amino acids from biological sources. *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 349-355.
- **Capella P. and Zorzut C. M.** (1968) Determination of double bond position in monounsaturated fatty acid esters by mass spectrometry of their trimethylsilyloxy derivatives. *Anal. Chem.*, **40**, 1458-1463.
- **Carballeira N. M., Shalabi F. and Cruz C.** (1994) Thietane, tetrahydrothiophene and tetrahydrothiopyran formation in reaction of methylene-interrupted dienates with dimethyl disulfide. *Tetrahedron*, **35**, 5575-5578.

- **Carter H. E. and Gaver R. C.** (1967) Improved reagent for trimethylsilylation of sphingolipid bases. *J. Lipid Res.*, **8**, 391-395.
- **Casals-Stenzel J. Buscher H. P. and Schauer R.** (1975) Gas-liquid chromatography of N- and O-acylated neuraminic acids. *Anal. Biochem.*, **65**, 507-524.
- **Chambers R. E. and Clamp J. R.** (1971) An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochem. J.*, **125**, 1009-1018.
- **Chaplin M. F.** (1982) A rapid and selective method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **123**, 336-341.
- **Chaplin M. F.** (1994) carbohydrate analysis: A practical approach *Chaplin M. F. and Kennedy J. F. Eds., Oxford Univ. Press, Oxford/New York/London.*, 1-41.
- **Chauhan J., Darbre A and Carlyle R. F.** (1982) Determination of urinary amino acids by means of glass capillary gas-liquid chromatography with alkali-flame ionisation and flame ionisation detection. *J. Chromatogr.*, **227**, 305-321.
- **Chizhov O. S., Molodtsov N. V. and Kochetkov N. K.** (1967) Mass spectrometry of trimethylsilyl ethers of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **4**, 273-276.
- **Christie W. W.** (1998) Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, **33**, 343-353.
- **Christie W. W. Bremachany E. Y., Johnson S. B. and Holman R. T.** (1986) A comparison of pyrrolidide and picolinyl ester derivatives for the identification of fatty acids in natural samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids*, **21**, 657-661.
- **Christie W. W., Bremachany E. Y. and Holman R. T.** (1987) Mass spectra of the picolinyl esters of isomeric mono- and dienoic fatty acids. *Lipids*, **22**, 224-228.
- **Ciucanu I. and Kerek F.** (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **131**, 209-217.
- **Clamp J. R., Dawson G. and Hough L.** (1967) The simultaneous estimation of 6-deoxy-L- galactose (L-fucose), D-mannose, D-galactose, 2-acetamido-1-deoxy-D-glucose (N-acetyl-D-glucosamine) and N-acetylneuraminic acid (sialic acid) in glycopeptides and glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **148**, 342-349.
- **Coduti P. L. and Bush C. A.** (1977) Structure determination of N-acetyl amino sugar derivatives and disaccharides by gas chromatography and mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **78**, 21-38.
- **Coulter J. R. and Hann C. S.** (1968) A practical quantitative gas chromatographic analysis of amino acids using the n-propyl N-acetyl esters. *J. Chromatogr.*, **36**, 42-49
- **Craven D. A. and Gehrke C. W.** (1968) quantitative determination of N-acetylneuraminic acid by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **37**, 414-421.

- **Darbre A. and Blau K.** (1965a) Gas Chromatography of volatile amino acid derivatives. I. Alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, serine and threonine. *J. Chromatogr.*, **17**, 31-49.
- **Darbre A. and Blau K.** (1965b) Trifluoroacetylated amino acid ester : The stability of the derivatives of cysteine, hydroxyproline, serine, threonine and thyrosine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **100**, 298-300.
- **Darbre A. and Blau K.** (1967) Gas Chromatography of volatile amino acid derivatives. IV. Mixed stationary phase for the separation of N-trifluoroacetylated amino acid n-amyl esters. *J. Chromatogr.*, **29**, 49-57.
- **Darbre A. and Blau K.** (1966) Breakdown of trifluoroacetylated esters of cysteine and hydroxyl amino acids during gas chromatography : effects caused by some polar stationary phases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **126**, 591-593.
- **Darbre A. and Islam A.** (1968) Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl ester. *Biochem. J.*, **106**, 923-925.
- **de Beer T., Vliegthart J. F., Loffler A. and Hofsteenge J.** (1995) The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is  $\alpha$ -mannopyranose. *Biochemistry*, **34**, 11785-11789.
- **De Neef J.** (1969) Quantitative determination of mixtures of monosaccharides, disaccharides and alditols as their trimethylsilyl ether derivatives by gas-liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.*, **26**, 485-490
- **Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M. and Kochetkov N. K.** (1971) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of aldonitrile acetates and partially methylated aldonitrile acetates. *Carbohydr. Res.*, **19**, 432-435.
- **Dommes V., Wirtz-Peitz F. and Kunau W. H.** (1976) Structure determination of polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry-A comparison of fragmentation patterns of various derivatives. *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 360-366.
- **Early R. J., Thompson J. R, Sedgwick G. W., Kelly J. M. and Christopherson R. J.** (1987) Capillary gas chromatographic analysis of amino acids in blood and protein hydrolysates as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **416**, 15-23.
- **Eder K.** (1995) Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **671**, 113-131.
- **Elwood P. C., Reid W. K., Marcell P. D., Allen R. H. and Kolhouse J. F.** (1988) Determination of the carbohydrate composition of mammalian glycoproteins by capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **175**, 202-211.
- **Felker P. and Bandurski R. S.** (1975) Quantitative gas-liquid chromatography and mass spectrometry of the N(O)-perfluorobutyryl-O-isoamyl derivatives of amino acids. *Anal. Biochem.*, **67**, 245-262.

- **Francis G. W.** (1981) Alkylthiolation for the determination of double bond position in unsaturated fatty acid esters. *Chem. Phys. Lipids*, **29**, 369-374.
- **Funakoshi I. and Yamashina I.** (1980) Quantitative determination of partially methylated alditol acetate of amino sugar by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **107**, 265-270.
- **Gaskell S. J. and Brooks J. W.** (1976) New derivatives for the analysis of shingosine long-chain bases by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **122**, 415-423.
- **Gaver R. C. and Sweeley C. C.** (1965) Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298.
- **Gehrke C. W. and Takeda H.** (1973) Gas-liquid chromatographic studies on the twenty protein amino acids : A single-column separation. *J. Chromatogr.*, **76**, 63-75.
- **Gehrke C. W. and Leimer K.** (1971a) Trimethylsilylation of amino acids, derivatization and chromatography. *J. Chromatogr.*, **57**, 219-238.
- **Gehrke C. W. and Shahrokhi F.** (1966) Chromatographic separation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters of amino acids. *Anal. Biochem.*, **15**, 97-108.
- **Gehrke C. W., Kuo K. and Zumwalt R. W.** (1971b) The complete gas-liquid chromatographic separation of the twenty protein amino acids. *J. Chromatogr.*, **57**, 209-217.
- **Gehrke C. W., Lamkin W. M., Stalling D. L. and Shahrokhi F.** (1965) Quantitative gas chromatography of amino-acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 328-334.
- **Gehrke C. W., nakamoto H. and Zumwalt R. W.** (1969) Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **45**, 24-51.
- **Gehrke C. W., Zumwalt R. W. and Wall L. L.** (1968) Gas-liquid chromatography of protein amino acids separation factors. *J. Chromatogr.*, **37**, 398-413.
- **Griggs L. J., Post A., White E. R., Finkelstein J. A., Moechel W. E., Holden K. G., Zarembo J. E. and Weisbach J. A.** (1971) Identification and quantitation of alditol acetates of neutral and amino sugars from mucins by automated gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **43**, 369-381.
- **Hakomori S.** (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, **55**, 205-208.
- **Hamilton J. T. and Christie W. W.** (2000) Mechanisms for ion formation during the electron impact-mass spectrometry of picolinyl ester and 4,4-dimethylloxasoline derivatives of fatty acids. *Chem. Phys. Lipids*, **105**, 93-104.
- **Hara S., Yamaguchi M., Takemori Y., Furuhashi K., Ogura H. and Nakamura M.** (1989) Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **179**, 162-166.

- **Harvey D. J.** (1984) Picolinyl derivatives for the characterization of cyclopropane fatty acids by mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 187-192.
- **Harvey D. J.** (1982) Picolinyl esters as derivatives for the structural determination of long chain branched and unsaturated fatty acids. *Biomed. Mass Spectrom.*, **9**, 33-38.
- **Harvey D. J.** (1995) Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of sphingo- and glycosphingo-lipids. *J. Mass Spectrom.*, **30**, 1311-1324.
- **Haverkamp J., Kamerling J. P. and Vliegthart J. F. G.** (1977) Methylation analysis determination of acylneuraminic acid residue type 2→8 glycosidic linkage. *FEBS lett.*, **73**, 215-261.
- **Hayashi A., and Matsubara T.** (1971) Determination of the structure of shinga-4,8-dienine from oyster glycolipids by gas chromatography and mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.*, **248**, 306-314.
- **Hayashi A., Mishima Y. and Matsubara T.** (1990) Occurrence and structural determination of octadecasphinga-4,8,10-trienine. *Chem. Phys. Lipids*, **52**, 171-178.
- **Heyns K., Kiessling G. und Müller.** (1967) Massenspektrometrische untersuchungen: Die massenspektrometrische bestimmung der verknüpfungs-stellen amminozuckerhaltiger polaccharide. Massenspektren von derivaten der 2-amino-2-deoxy-D-Galaktose. *Carbohydr. Res.*, **4**, 452-464.
- **Heyns K., Sperling K. R. and Grutzmacher H. F.** (1969) Massenspektrometrische untersuchungen. Kombination von gaschromatographie und massenspektrometrie zur analyse partiell methylierter zuckerderivate. Die massenspektren von partiell methylierten methylglucosiden. *Carbohydr. Res.*, **9**, 79-97.
- **Hofsteenge J., Muller D. R., de Beer T., Loffler A., Richter W. J. and Vliegthart J. F.** (1994) New type of linkage between a carbohydrate and a proteine : C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry*, **33**, 13524-13530.
- **Husek P. and Macek K.** (1975) Gas chromatography of amino acids. *J. Chromatogr.*, **113**, 139-230.
- **Ikekawa N.** (1963) Gas chromatography of amino acids. *J. biochem.*, **54**, 279-282.
- **Inoue S. and Matsumura G.** (1979) Identification of the N-glycolylneuraminil-(2→8)-N-glycolylneuraminyl group in a trout-egg glycoprotein by methylation analysis and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, **74**, 361-368.
- **Irie A., Kubo H. and Hoshi M.** (1990) Glucosylceramide having a novel tri-unsaturated long-chain base from spermatozoa of starfish, *Asterias amurensis*. *J. Biochem.*, **107**, 578-586.
- **Islam A. and Darbre A.** (1969) Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters. Development of mixed stationary phase for their separation. *J. Chromatogr.*, **43**, 11-24.

- **IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature.** (1997) Nomenclature of glycolipids. *Eur. J. Biochem.*, **257**, 293-298.
- **Janssen G. and Parmentier G.** (1978) Determination of double bond positions in fatty acids with conjugated double bonds. *Biomed. Mass Spectrom.*, **5**, 439-443.
- **Jeffrey P. L. and Rienits K. G.** (1967) An improved method for the isolation of hexuronic acid from chondroitin sulphate preparations. *Biochim. Biophys. Acta.*, **141**, 179-181.
- **Joh Y. -G., Elenkov I. J., Stefanov K. L., Popov S. S., Dobson G. and Christie W. W.** (1997) Novel di-, tri-, and tetraenoic fatty acids with bis-methylene-interrupted double-bond systems from the sponge *Haliclona cinerea*. *Lipids*, **32**, 13- 17.
- **Johnson D. E., Scott J. S. and Meister A.** (1961) Gas-liquid chromatography of amino acid derivatives. *Anal. Chem.*, **33**, 669-673.
- **Jonsson J., Eyem J. and Sjoquist J.** (1973) Quantitative gas chromatographic analysis of amino acids on a short glass capillary column. *Anal. Biochem.*, **51**, 204-219.
- **Juhasz P. and Costello C. E.** (1992) Matrix-assisted laser desorption of underivatized and permethylated gangliosides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **3**, 785-796.
- **Kadowaki H., Bremer E. G., Evans J. E., Jungalwala F. B. and McCuer R. H.** (1983) Acetonitril-hydrochloric acid hydrolysis of gangliosides for high performance liquid chromatographic analysis of their long chain bases. *J. Lipid Res.*, **24**, 1389-1397.
- **Kaiser F. E., Gehrke C. W., Zumwalt R. W. and Kuo K. C.** (1974) Amino acids analysis. Hydrolysis, ion-exchange cleanup, derivatization and quantitation by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **94**, 113-133.
- **Takehi K., Kinoshita M., Kitano K., Morita M. and Oda Y.** (2001) Lactone formation of N-acetylneuraminic acid oligomers and polymers as examined by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.*, **22**, 3466-3470.
- **Kamerling J. P. and Vliegenthart J. F. G.** (1974) Mass spectrometry of pertrimethylsilyl neuraminic acid derivatives. *Carbohydr. Res.*, **33**, 297-306.
- **Kamerling J. P. and Vliegenthart J. F. G.** (1982) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of sialic acids. R. Schauer, ed., *Sialic acids. Chemistry, metabolism and fonction*. Springer Verlag, New York. 95-125.
- **Kamerling J. P., Gerwing G. J., Vliegenthart J. F. G. and Clamp J. R.** (1975b) Characterisation by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.*, **151**, 491-495.
- **Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G., Versluis C. and Schauer R.** (1975a) Identification of O-acetylated N-acylneuraminic acids by mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, **41**, 7-17.



- **Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G., Schauer R., Strecker G. and Montreuil J.** (1975c) Isolation and identification of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid from the urine of a patient with sialuria. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 253-258.
- **Karkkainen J. and Vihko R.** (1969) Characterisation of 2-amino-2-deoxy-D-glucose, 2-amino-2-deoxy-D-galactose, and related compounds, as their trimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, **10**, 113-120.
- **Karkkainen J., Lehtonen A. and Nikkari T.** (1965) Determination of glucosamine and galactosamine by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **20**, 457-462.
- **Karlsson K. A.** (1970) Sphingolipid long chain bases. *Lipids*, **11**, 878-891.
- **Kim J. H., Shome B., Liao T. and Pierce J. G.** (1967) Analysis of neutral sugars by gas-liquid chromatography of alditol acetates : Application to thyrotropic hormone and other glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **20**, 258-274.
- **Kircher H. W.** (1960) Gas-liquid partition chromatography of methylated sugars. *Anal. Chem.*, **32**, 1103-1106.
- **Klein A., Diaz S., Ferreira I., Lamblin G., Roussel P. and Manzi A.E.** (1997) New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach: liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SIA quinoxalinones. *Glycobiology*, **7**, 421-432.
- **Kochetkov N. K. and Chizhov O. S.** (1966) Mass spectrometry of carbohydrate derivatives *Advan. Carbohydr. Chem.*, **21**, 39-93.
- **Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Kadentsev V. I., Smirnova G. P. and Zhukova I. G.** (1973) Mass spectra of acetylated derivatives of sialic acids. *Carbohydr. Res.*, **27**, 5-10.
- **Kovacik V., Bauer S., Rosyk J. and Kovac P.** (1968) Mass spectrometry of uronic acid derivatives. Part III. The fragmentation of methyl ester methyl glycosides of methylated uronic and aldobiouronic acids. *Carbohydr. Res.*, **8**, 282-290.
- **Krisnangkura K. and Sweeley C. C.** (1974) Mass Spectra of various deuterium-labelled forms of bis-O-trimethylsilyl-N-acetylsphinganine. *Chem. Phys. Lipids*, **13**, 415-428.
- **Lachovitzki N. and Bjorklund B.** (1970) Determination of amino acids by gas chromatography of trifluoroacetylated n-butyl ester derivatives. *Anal. Biochem.*, **38**, 446-453.
- **Laine R. A. and Sweeley C. C.** (1971) Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **43**, 533-538.
- **Laine R. A. and Sweeley C. C.** (1973) O-methyl oximes sugars. Analysis as O-trimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, **27**, 199-213.

- **Laker M. F.** (1979) Estimation of disaccharides in plasma and urine by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **163**, 9-18.
- **Laker M. F.** (1980) Estimation of neutral sugars and alcohols in biological fluids by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **184**, 457-470.
- **Lamkin W. M. and Gehrke C. W.** (1965) Quantitative gas chromatography of amino acids. Preparation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters. *Anal. Chem.*, **37**, 383-389.
- **Lehnhardt W. F. and Winzler J.** (1968) Determination of neutral sugars in glycoproteins by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **34**, 471-479.
- **Leonhardt B. A. and DeVilbiss E. D.** (1985) Separation and double bond determination on nanogram quantities of aliphatic monounsaturated alcohols, aldehydes and fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr.*, **322**, 484-490.
- **Lifely M. R., Gilbert A. S. and Moreno C.** (1981) Sialic acid polysaccharide antigens of nesseria meningitidis and esherichia coli : esterification between adjacent residues. *Carbohydr. Res.*, **94**, 193-203.
- **Lifely M. R., Gilbert A. S. and Moreno C.** (1984) Rate, mechanism, and immunochemical studies of lactonisation in serogroup B and C of nesseria meningitidis. *Carbohydr. Res.*, **134**, 229-243.
- **Löffler A., Doucey M. A., Jansson A. M., Muller D. R., de Beer T., Hess D., Meldal M., Richter W. J. Vliegthart J. F. and Hofsteenge J.** (1996) Spectroscopic and protein chemical analyses demonstrate the presence of C-mannosylated tryptophan in intact human RNase 2 and its isoformes. *Biochemistry*, **35**, 12005-12014.
- **MacKenzie S. L. and Holme K. R.** (1984) Analysis of conifer leaf free amino acids by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **299**, 387-396.
- **MacKenzie S. L.** (1987) Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutyryl isobutyl esters. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **70**, 151-160.
- **MacKenzie S. L. and Hogge L. R.** (1977) Gas chromatography-mass spectrometry of the N(O)-heptafluorobutyryl isobutyl esters of the protein amino acids using electron impact ionisation. *J. Chromatogr.*, **132**, 485-493.
- **MacKenzie S. L. and Tenaschuk D.** (1974) Gas-liquid chromatography of N-heptafluorobutyryl isobutyl esters of amino acids. *J. Chromatogr.*, **97**, 19-24.
- **MacKenzie S. L. and Tenaschuk D.** (1975) Rapid formation of amino acid isobutyl ester for gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **111**, 413-415.
- **MacKenzie S. L. and Tenaschuk D.** (1979a) Quantitative formation of N(o,S)-heptafluorobutyryl isobutyl amino acids for gas chromatographic analysis. I. Esterification. *J. Chromatogr.*, **171**, 195-208.

- **MacKenzie S. L. and Tenaschuk D.** (1979b) Quantitative formation of N(o,S)-heptafluorobutyryl isobutyl amino acids for gas chromatographic analysis. II. Acylation. *J. Chromatogr.*, **173**, 53-63.
- **Maes E., Stecker G., Timmerman Ph., Leroy Y. and Zanetta J. P.** (1999) Quantitative cleavage of the N-glycosidic bond under the normal conditions of methanolysis used for the analysis of glycoprotein monosaccharides. *Anal. Biochem.*, **267**, 300-308.
- **Malykh Y. N., Schauer R. and Shaw L.** (2001) N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*, **83**, 623-634.
- **March J. F.** (1975) A modified technique for the quantitative analysis of amino acids by gas chromatography using heptafluorobutyryl n-propyl derivatives. *Anal. Biochem.*, **69**, 420-442.
- **Matsubara T. and Hayashi A.** (1991) Fragmentation pathways of O-trimethylsilyl ethers of dihydroxy long-chain bases analysed by linked-scan mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **562**, 119-124.
- **Mawhinney T. P., robinett R. S. R., Atalay A. and Madson M. A.** (1986) Analysis of amino acids as their tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **358**, 231-242.
- **McCloskey J. A.** (1969) Mass spectrometry of lipids and steroids. *Meth. Enzymol.*, **14**, 382-449.
- **McGuire E. J. and Binkley S. B.** (1964) The structure and chemistry of colominic acid. *Biochemistry*, **3**, 247-251.
- **McInnes A. G., Ball D. H., Cooper F. P. and Bishop C. T.** (1958) Separation of carbohydrate derivatives by gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **1**, 556-557.
- **Mega T. and Ikenaka T.** (1982) Methanolysis products of asparagine-linked N-acetylglucosamine and a new method for determination of N- and O-glycosidic N-acetylglucosamine in glycoproteins that contain asparagine-linked carbohydrates. *Anal. Biochem.*, **119**, 17-24.
- **Momoi T., Ando S. and Magai Y.** ( 1976) High resolution preparative column chromatographic system for gangliosides using DEAE-Sephadex and a new porous silica, Iatrobeads. *Biochim. Biophys. Acta.*, **441**, 488-497.
- **Mononen I.** (1981) Quantitative analysis, by gas-liquid chromatography and mass fragmentography, of monosaccharides after methanolysis and deamination. *Carbohydr. Res.*, **88**, 39-50.
- **Mononen I. and Karkkainen J.** (1975) Quantitative determination of neuraminic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *FEBS lett.*, **59**, 190-193.
- **Moor J. and Waight E. S.** (1975) The mass spectra of permethylated oligosaccharides. *Biomed. mass spectrom.*, **2**, 36-45.

- **Morgan I. G., Wolfe L. S., Mandel P. and Gombo G.** (1971) Isolation of plasma membranes from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.*, **241**, 737-751.
- **Morrison W. R.** (1969) Polar lipids in bovine milk I. Long-chain bases in sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **176**, 537-546.
- **Morrison W. R. and Day J. D.** (1970) Polar lipids in bovine milk II. Long-chain bases, normal and 2-hydroxy fatty acids, and isomeric *cis* and *trans* monoenoic fatty acids in the sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **202**, 460-467.
- **Moss W. and Lambert M. A.** (1974) Analysis of hydroxyproline and hydroxylysine by gas chromatography. *Anal. Biochem.*, **59**, 259-262.
- **Moss W., Lambert M. A. and Diaz F.** (1971) Gas-liquid chromatography of twenty protein amino acids on a single column. *J. Chromatogr.*, **60**, 134-136.
- **Nakai T. and Ohta T.** (1976) Beta-3-oxindolylalanine: The main intermediate in tryptophan degradation occurring in acid hydrolysis of protein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **420**, 258-264.
- **Nichols F. C.** (1998) Novel ceramides recovered from *Porphyromonas gingivalis*: relationship to adult periodontitis. *J. Lipid Res.*, **39**, 2360-2372.
- **Niedermeier W.** (1971) Gas chromatography of neutral and amino sugars in glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **40**, 465-475.
- **Oades J. M.** (1967) Gas-liquid chromatography of alditol acetates and its application to the analysis of sugars in complex hydrolysates. *J. Chromatogr.*, **28**, 246-252.
- **Ohta T. and Nakai T.** (1978) The reaction of tryptophan with cystine during acid hydrolysis of protein. Formation of tryptathionine as a transient intermediate in a model system. *Biochim. Biophys. Acta.*, **533**, 440-445.
- **Olsson N. U., Kaufmann P. and Dzeletovic S.** (1997) Preparation and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of N-acetyl-O-trimethylsilyl derivatives of long-chain base residues of natural sphingomyelin. *J. Chromatogr.*, **698**, 1-8.
- **Ovodov Y. S. and Evtushenko E. V.** (1967) Analysis of sugar mixtures by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **31**, 527-530.
- **Pearce R. J.** (1977) Amino acid analysis by gas-liquid chromatography of N-heptafluorobutyryl isobutyl esters. Complete resolution using a support-coated open-tubular capillary column. *J. Chromatogr.*, **136**, 113-126.
- **Phillips D. V. and Smith A. E.** (1973) A rapid method for gas chromatographic analysis of mono- and disaccharide mixtures. *Anal. Biochem.*, **54**, 95-101.

- **Polito A. J., Akita T. and Sweeley C. C.** (1968) Gas chromatography and mass spectrometry of sphingolipid bases. Characterisation of sphinga-4,14-dienine from plasma sphingomyelin. *Biochemistry*, **7**, 2609-2613.
- **Pollock G. E.** (1967) Separation of amino acids by gas chromatography using new fluoro derivatives. *Anal. Chem.*, **39**, 1194-1196.
- **Pons A., Leroy Y., Timmerman P., Richet C., Huet G. and Zanetta J. P.** (2003b) Use of heptafluorobutyrate derivatives for the complete analysis of constituents of glycoproteins and glycolipids. *Recent Res. Devel. Anal. Biochem.*, **3**, 81-100.
- **Pons A., Popa J., Portoukalian J., Boddon J., Ardail D., Kol O., Martin-Martin M. J., Hueso P., Timmerman P., Leroy Y. and Zanetta J. P.** (2000) Single-step gas chromatography-mass spectrometry analysis of glycolipid constituents as heptafluorobutyrate derivatives with a special reference to the lipid portion. *Anal. Biochem.*, **284**, 201-216.
- **Pons A., Richet C., Robbe C., Herrmann A., Timmerman P., Huet G., Leroy Y., Carlstedt I., Capon C. and Zanetta J. P.** (2003a) Sequential GC/MS analysis of sialic acids, monosaccharides, and amino acids of glycoproteins on a single sample as heptafluorobutyrate derivatives. *Biochemistry*, **42**, 8342-8353.
- **Pons A., Timmerman P., Leroy Y. and Zanetta J. P.** (2002) Gas-chromatography/mass spectrometry analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases. *J. Lipid Res.*, **43**, 794-804.
- **Powell A. K. and Harvey D. J.** (1996) Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1027-1032.
- **Pritchard D. G. and Niedermeier W.** (1978) Sensitive gas chromatographic determination of the monosaccharide composition of glycoproteins using electron capture detection. *J. Chromatogr.*, **152**, 487-494.
- **Radhakrishnamurthy B., Dalferes Jr. E. R. and Berenson G. S.** (1966) determination of hexosamines by gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **17**, 545-550.
- **Radhakrishnamurthy B., Dalferes Jr. E. R. and Berenson G. S.** (1968) Analyses of glycosaminoglycans by gas-liquid chromatography and the nature of hexuronic acids in heparin. *Anal. Biochem.*, **24**, 397-408.
- **Rauvala H. and Karkkainen J.** (1977) Methylation analysis of neuraminic acids by gas chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, **56**, 1-9.
- **Reid P. E., Donaldson B., Secret D. W. and Bradford B.** (1970) A simple, rapid, isothermal gas chromatographic procedure for the analysis of monosaccharide mixtures. *J. Chromatogr.*, **47**, 199-208.
- **Rivière M., Fournié J. J., Monsarrat B. and Puzo G.** (1988) Identification of partially methylated methyl glycosides by gas chromatography-mass spectrometry of trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **445**, 87-95.

- **Roach D. and Gehrke C. W.** (1970) The hydrolysis of proteins. *J. Chromatogr.*, **52**, 393-404.
- **Roach D. and Gehrke C. W.** (1969a) The gas-liquid chromatography of amino acids. *J. Chromatogr.*, **43**, 303-310.
- **Roach D. and Gehrke C. W.** (1969b) Direct esterification of amino acids : Gas liquid chromatography of N-TFA n-butyl esters. *J. Chromatogr.*, **44**, 269-278.
- **Roach D., Gehrke C. W. and zumwalt R. W.** (1969c) Quantitative gas-liquid chromatography of histidine. *J. Chromatogr.*, **43**, 311-321.
- **Roboz J., Susuki R. and Bekesi J. G.** (1978) Determination of neraminidase-susceptible and total N-acetylneuraminic acid in cells by selected ion monitoring. *Anal. Biochem.*, **87**, 195-205.
- **Robson K. J., Stewart M. E., Michelsen S., Lazo N. D. and Downing D. T.** (1994) 6-hydroxy-4-sphingene in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.*, **35**, 2060-2068.
- **Rontani J. F.** (1998) Electron ionisation mass spectrometric determination of double bond position in monounsaturated  $\alpha,\beta$ - and  $\beta,\gamma$ -isomeric isoprenoid acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 961-967.
- **Ryhage R. and Stenhagen E.** (1960) Mass spectrometry in lipid research. *J. Lipid Res.*, **1**, 361-390.
- **Saroff H. A. and Karmen A.** (1960) Gas chromatography of the N-trifluoroacetylmethyl esters of the amino acids. *Anal. Biochem.*, **1**, 344-350.
- **Saroff H. A., Karmen A. and Healy J. W.** (1962) Gas chromatography of the amino acid ester in amonia. *J. Cromatogr.*, **9**, 122-123.
- **Schauer R., Schmid H., Pommerencke J., Iwersen M. and Kohla G.** (2001) Metabolism and role of O-acetylated sialic acids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **491**, 325-342.
- **Schauer R.** (1978) Characterization of sialic acids. *Meth. Enzymol.* **50**, 64-89.
- **Schauer R., Haverkamp J., Wember M., Vliegthart J. F. G. and Kamerling J. P.** (1976) N-acetyl-9-O-lactylneuraminic acid, a new acylneuraminic acid from bovine submandibular gland. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 237-242.
- **Schwarzmann G. O. H. and Jeanloz R. W.** (1974) Separation by gas-liquid chromatography, and identification by mass spectrometry, of the methyl ether of 2-deoxy-2-(N-methylacetamido)-D-glucose. *Carbohydr. Res.*, **34**, 161
- **Shantha N. C. and Napolitano G. E.** (1992) Gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr.*, **624**, 37-51.

- **Shaw D. H. and Moss G. W.** (1969) Quantitative estimation of neutral sugars by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **41**, 350-357.
- **Smith E. D. and Sheppard H.** (1965) Quantitative gas chromatography of amino-acids as trimethylsilyl derivatives. *Nature*, **208**, 878-880.
- **Spitzer V.** (1997) Structure analysis of fatty acids by gas chromatography-low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives-A review. *Prog. Lipid Res.*, **35**, 387-408.
- **Stalling D. L. and Gehrke C. W.** (1966) Quantitative analysis of amino acids by gas chromatography : Acylation of arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 329-335.
- **Stalling D. L. Gille G. and Gehrke C. W.** (1967) Quantitative gas chromatography of aminoacids : Interesterification studies. *Anal. Biochem.*, **18**, 118-125.
- **Stalling D. L., Gehrke C. W. and Zumwalt R. W.** (1968) A new silylation reagent for amino acids Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 616-622.
- **Steffenrud S., Borgeat P., Salari H., Evans M. J. and Bertrand M. J.** (1987) Gas chromatography-mass spectrometry of monohydroxyeicosatetraenoic acids as their methyl ester trimethylsilyl, allyldimethylsilyl and tert-butyldimethylsilyl ethers. *J. Chromatogr.*, **416**, 219-235.
- **Stellner K., Saito H. and Hakomori S. I.** (1973) Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 464-472.
- **Stewart M. E. and Downing D. T.** (1995) Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually Long-chain dihydrosphingosines. *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 613-618.
- **Stewart M. E. and Downing D. T.** (1999) A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J. Lipid Res.*, **40**, 1434-1439.
- **Sugiyama E., Hara A., Uemura K.-I. and Taketomi T.** (1997) Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction to ganglioside analyses. *Glycobiology*, **7**, 719-724.
- **Sullivan J. E. and Schewe L. R.** (1977) Preparation and gas chromatography of highly volatile trifluoroacetylated carbohydrates using N-methyl bis(trifluoroacetamide). *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 196-197.
- **Suzuki K.** (1964) A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside patterns. *Life Sci.*, **35**, 1227-1233.
- **Svennerholm L.** (1957) Quantitative estimation of acids: A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**, 604-611.

- **Sweeley C. C. and Moscatelli E. A.** (1959) Qualitative microanalysis and estimation of sphingolipid bases. *J. Lipid Res.*, **1**, 40-47.
- **Sweeley C. C. and Walker B.** (1964) Determination of carbohydrates in glycolipids and gangliosides by gas chromatography. *Anal. Biochem.*, **36**, 1461-1466.
- **Sweeley C. C., Bentley R., Makita M. and Wells W. W.** (1963) Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497-2507.
- **Tai T., Yamashita K. and Kobata A.** (1975) Synthesis and mass fragmentographic analysis of partially O-methylated 2-N-methylglucosamines. *J. Biochem.*, **78**, 679-686.
- **Takahashi T., Ramachandramurthy P. and Liener I. E.** (1967) Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **133**, 123-133.
- **Traving C. and Schauer R.** (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 1330-1349.
- **Van Halbeek H., Haverkamp J., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G., Versuis C. and Schauer R.** (1978) Sialic acids in permethylation analysis: preparation and identification of partially O-methylated derivatives of methyl N-acetyl-N-methyl- $\beta$ -D-neuraminate methyl glycoside. *Carbohydr. Res.*, **60**, 51-62.
- **Vandenheuvel W. J. A. and Cohen J. S.** (1970a) Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of carbone-13 enriched amino acids as trimethylsilyl derivatives. *Biochim. Biophys. Acta.*, **208**, 251-259.
- **Vandenheuvel W. J. A., Smith J. L., Putter I. and Cohen J. S.** (1970b) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of deuterium-containing amino acids as their trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **50**, 405-412.
- **Varma R., Varma R. S. and Wardi A. H.** (1973) Separation of aldonitrile acetates of neutral sugars by gas-liquid chromatography and its application to polysaccharides. *J. Chromatogr.*, **77**, 222-227.
- **Vincenti M., Guglielmetti G., Cassani G. and Tonini C.** (1987) Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.*, **59**, 694-699.
- **White D. C., Tucker A. N. and Sweeley C. C.** (1969) Characterisation of the *iso*-branched sphinganine from the ceramide phospholipids of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **187**, 527-532.
- **Whitfield D. M., Stojkovski S., Pang H., Baptista J. and Sarkar B.** (1991) Diagnostic methods for the determination of iduronic acid in oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, **194**, 259-267.



- **Yasugi E., Kasama T. and Seyama Y.** (1987) Branched long chain bases in cerebrosides of the guinea pig harderian gland. *J. Biochem.*, **102**, 1477-1482.
- **Yasugi E., Kasama T. and Seyama Y.** (1988) Identification of 10-methysphinganine in cerebrosides of guinea pig harderian gland. *J. Biochem.*, **103**, 889-893.
- **Yokota M. and Mori T.** (1977) Gas-liquid chromatographic analysis of the monosaccharide composition of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) derived from animal tissues. *Carbohydr. Res.*, **59**, 289-298.
- **Youngs C. G.** (1959) Analysis of mixtures of amino acids by gas phase chromatography. *Anal. Chem.*, **31**, 1019-1021.
- **Yu Q. T., Liu B. N., Zhang J. Y. and Huang Z. H.** (1989) Location of double bonds in fatty acids of fish oil and rat testis lipids. Gas chromatography-mass spectrometry of oxazoline derivatives. *Lipids*, **24**, 79-83.
- **Yu R. K. and Ledeen R. W.** (1970) Gas-liquid chromatographic assay of lipid-bond sialic acids: measurement of gangliosides in brain of several species. *J. Lip. Res.*, **11**, 506-516.
- **Yu R. K. and Ledeen R. W.** (1969) Configuration of the ketosidic bond of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1306-1313.
- **Zanetta J. P., Pons A., Richet C., Huet G., Timmerman P., Leroy Y., Bohin A., Bohin J. P., Trinel P. A., Poulain D. and Hofsteenge J.** (2004) Quantitative gas chromatography/mass spectrometry determination of C-mannosylation of tryptophan residues in glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **329**, 199-206.
- **Zanetta J. P., Breckenridge W. C. and Vincendon G.** (1972) Analysis of Monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives : Application to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.*, **69**, 291-304.
- **Zanetta J. P., Pons A., Iwersen M., Mariller C., Leroy Y., Timmerman P. and Schauer R.** (2001) Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiology*, **11**, 663-679.
- **Zanetta J. P., Timmerman P. and Leroy Y.** (1999a) Gas-liquid chromatography of heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns : a method for the quantitative determination of monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*, **9**, 255-266.
- **Zanetta J. P., Timmerman P. and Leroy Y.** (1999b) Determination of constituents of sulphated proteoglycans using a methanolysis procedure and gas chromatography / mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycoconj. J.*, **16**, 617-627.
- **Zanetta J. P., Vitiello F. and Vincendon G.** (1980) Gangliosides from rat cerebellum: Demonstration of considerable heterogeneity using a new solvent for thin layer chromatography. *Lipids*, **15**, 1055-1061.

- **Zanetta J.P., Vincendon G.** (1973) Gas-liquid chromatography of the N(O)-heptafluorobutyrate esters of isoamyl esters of amino acids. Separation and quantitative determination of the constituent amino acids of proteins. *J. Chromatogr.*, **76**, 91-99.
- **Zhang J. Y., Yu Q. T., Liu B. N. and Huang Z. H.** (1988) Chemical modification in mass spectrometry IV: 2-alkenyl-4,4-dimethyloxazolines as derivatives for double bond location of long-chain olefinic acids. *Biomed. Env. Mass Spectrom.*, **15**, 33-44.
- **Zhang Y. and Lee Y. C.** (1999) Acid-catalysed lactonization of  $\alpha$ 2,8-linked oligo/polysialic acids studied by high performance anion-exchange chromatography. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6183-6189.
- **Zlatkis A., Oro J. F. and Kimball A. P.** (1960) Direct amino acid analysis by gas chromatography. *Anal. Chem.*, **32**, 162-164.
- **Zomzely C., Marco G. and Emery E.** (1962) Gas chromatography of the n-butyl-N-trifluoroacetyl derivatives of amino acids. *Anal. Chem.*, **34**, 1414-1417.
- **Zumwalt R. W., Kuo K. and Gehrke C. W.** (1971) A nanogram and picogram method for amino acid analysis by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **57**, 193-208.



# **PUBLICATIONS**



## Liste des publications auxquelles nous avons participées.

- **Zanetta J. P., Pons A., Richet C., Huet G., Timmerman P., Leroy Y., Bohin A., Bohin J. P., Trinel P. A., Poulain D. and Hofsteenge J.** Quantitative gas chromatography/mass spectrometry determination of C-mannosylation of tryptophan residues in glycoproteins. *Anal. Biochem.* 2004 Jun 15; 329(2): 199-206.
- **Pons A., Leroy Y., Timmerman P., Richet C., Huet G. and Zanetta J. P.** Use of heptafluorobutyrate derivatives for the complete analysis of constituents of glycoproteins and glycolipids. *Recent Res. Devel. Anal. Biochem.* 2003; 3: 81-100.
- **Pons A., Richet C., Robbe C., Herrmann A., Timmerman P., Huet G., Leroy Y., Carlstedt I., Capon C. and Zanetta J. P.** Sequential GC/MS analysis of sialic acids, monosaccharides, and amino acids of glycoproteins on a single sample as heptafluorobutyrate derivatives. *Biochemistry.* 2003 Jul 15; 42(27): 8342-53.
- **Leteurtre E., Gouyer V., Delacour D., Hemon B., Pons A., Richet C., Zanetta J.P. and Huet G.** Induction of a storage phenotype and abnormal intracellular localization of apical glycoproteins are two independent responses to GalNAc $\alpha$ -O-bn. *J. Histochem. Cytochem.* 2003 Mar; 51(3): 349-61.
- **Bulai T., Bratosin D., Pons A., Montreuil J. and Zanetta J. P.** Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acids in relation with blood groups. *FEBS Lett.* 2003 Jan 16; 534(1-3): 185-9.
- **Pons A., Timmerman P., Leroy Y. and Zanetta J. P.** Gas-chromatography/mass-spectrometry analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases. *J. Lipid Res.* 2002 May; 43(5): 794-804.
- **Zanetta J. P., Pons A., Iwersen M., Mariller C., Leroy Y., Timmerman P. and Schauer R.** Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiology.* 2001 Aug; 11(8): 663-76.
- **Samyn-Petit B., Gruber V., Flahaut C., Wajda-Dubos J. P., Farrer S., Pons A., Desmaizieres G., Slomianny M. C., Theisen M. and Delannoy P.** N-glycosylation potential of maize: the human lactoferrin used as a model. *Glycoconj. J.* 2001 Jul; 18(7): 519-27.
- **Ardail D., Popa I., Alcantara K., Pons A., Zanetta J. P., Louisot P., Thomas L. and Portoukalian J.** Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 2001 Jan 19; 488(3): 160-4.

• **Pons A., Popa J., Portoukalian J., Bodennec J., Ardail D., Kol O., Martin-Martin M. J., Hueso P., Timmerman P., Leroy Y. and Zanetta J. P.** Single-step gas chromatography-mass spectrometry analysis of glycolipid constituents as heptafluorobutyrate derivatives with a special reference to the lipid portion.  
*Anal. Biochem.* 2000 Sep 10; 284(2): 201-16.

• **Zanetta J. P., Gouyer V., Maes E., Pons A., Hemon B., Zweibaum A., Delannoy P. and Huet G.** Massive in vitro synthesis of tagged oligosaccharides in 1-benzyl-2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-galactopyranoside treated HT-29 cells.  
*Glycobiology.* 2000 Jun; 10(6): 565-75.