

Université de Montréal

Développement de méthodes analytiques de séparation des produits de digestion
enzymatique des dérivés de cellulose

par

Fatima Farhat

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de la
Maîtrise ès Science (M.Sc.)
en chimie

Décembre 2009

© Fatima Farhat, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Développement de méthodes analytiques de séparation des produits de digestion
enzymatique des dérivés de cellulose

Présenté par :
Fatima Farhat

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Dominic Rochefort
président-rapporteur

Dr. Karen C. Waldron
directrice de recherche

Dr. Pierre Chaurand
membre du jury

Sommaire

La cellulose et ses dérivés sont utilisés dans un vaste nombre d'applications incluant le domaine pharmaceutique pour la fabrication de médicaments en tant qu'excipient. Différents dérivés cellulosiques tels que le carboxyméthylcellulose (CMC) et l'hydroxyéthylcellulose (HEC) sont disponibles sur le commerce. Le degré de polymérisation et de modification diffèrent énormément d'un fournisseur à l'autre tout dépendamment de l'origine de la cellulose et de leur procédé de dérivation, leur conférant ainsi différentes propriétés physico-chimiques qui leurs sont propres, telles que la viscosité et la solubilité. Notre intérêt est de développer une méthode analytique permettant de distinguer la différence entre deux sources d'un produit CMC ou HEC. L'objectif spécifique de cette étude de maîtrise était l'obtention d'un profil cartographique de ces biopolymères complexes et ce, par le développement d'une méthode de digestion enzymatique donnant les oligosaccharides de plus petites tailles et par la séparation de ces oligosaccharides par les méthodes chromatographiques simples. La digestion fut étudiée avec différents paramètres, tel que le milieu de l'hydrolyse, le pH, la température, le temps de digestion et le ratio substrat/enzyme. Une cellulase de *Trichoderma reesei ATCC 26921* fut utilisée pour la digestion partielle de nos échantillons de cellulose. Les oligosaccharides ne possédant pas de groupements chromophores ou fluorophores, ils ne peuvent donc être détectés ni par absorbance UV-Vis, ni par fluorescence. Il a donc été question d'élaborer une méthode de marquage des oligosaccharides avec différents agents, tels que l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS), le 3-acétylamino-6-aminoacridine (AA-Ac) et la phénylhydrazine (PHN). Enfin, l'utilisation de l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide à haute performance a permis la séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose. Pour chacune de ces méthodes analytiques, plusieurs paramètres de séparation ont été étudiés.

Mots-clés : Électrophorèse capillaire / Fluorescence induite par laser / Chromatographie liquide à haute performance / Chromatographie liquide à interactions hydrophiles / UV-Vis / Digestion partielle / Produits de digestion enzymatique / Acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique / Phénylhydrazine / Dérivés de cellulose

Abstract

Cellulose and its derivatives are used in a wide range of applications, including the pharmaceutical industry for the manufacturing of medicines as inactive additives. Various cellulosic derivatives such as carboxymethylcellulose (CMC) and hydroxyethylcellulose (HEC) are readily available for such use. The degree of polymerization and modification differs from one supplier to the other, according to the origin of the cellulose and its process of chemical modification, conferring on them different physico-chemical properties, such as viscosity and solubility. Our interest is to develop an analytical method that can distinguish between different sources of a given CMC or HEC product. The specific objective of this master's study was to obtain a fingerprint of these complex biopolymers by developing an enzymatic digestion method to produce smaller oligosaccharides that could be separated by simple chromatographic methods. The digestion was studied as a function of various parameters, such as the composition of the hydrolysis solution, the pH, the temperature, the duration of digestion and the substrate/enzyme ratio. A cellulase enzyme from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 was used for the partial digestion of our samples of cellulose. Since these oligosaccharides do not possess a chromophore or fluorophore, they can't be detected either by absorbance or fluorescence. It was thus necessary to work out the labeling method for oligosaccharides using various agents, such as 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS), 3-acetylamino-6-aminoacridine (AA-Ac) and phenylhydrazine (PHN). Finally, the use of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography allowed the separation of the enzymatic digestion products of the cellulose derivatives (CMC and HEC). For each of these analytical separation techniques, several parameters of the separation were studied.

Keywords: Capillary electrophoresis / Laser-induced fluorescence / High-performance liquid chromatography / Hydrophilic interaction chromatography / UV detection / Partial digestion / Enzymatic digestion products / 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid / Phenylhydrazine / Cellulose derivatives

Table des matières

Sommaire	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xvi
Remerciements	xviii
1 Introduction générale	1
1.1 La cellulose et ses dérivés	2
1.2 Hydrolyse acide (acétolyse)	5
1.3 Digestion enzymatique	6
1.4 Quelques définitions.....	6
1.5 Objectifs du projet.....	7
2 Techniques analytiques et méthodes de détection des dérivés cellulosiques 8	
2.1 Électrophorèse capillaire	9
2.1.1 Séparation par CE.....	10
2.1.2 Détection par absorbance	10
2.1.3 Détection par Fluorescence Induite par Laser (LIF).....	13
2.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	16
2.2.1 Séparation par HPLC.....	17
2.2.2 Chromatographie liquide en phase inverse.....	19
2.2.3 Chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC)	19
2.2.4 Détection UV-Vis.....	21
3 Partie expérimentale.....	22
3.1 Produits chimiques	23
3.2 Hydrolyse acide.....	23
3.2.1 Réaction d'hydrolyse acide	23
3.3 Digestion enzymatique	24

3.3.1	<i>Préparation des solutions tampons</i>	24
3.3.2	<i>Réaction de digestion enzymatique</i>	24
3.4	Réaction de marquage	24
3.4.1	<i>Réaction de marquage avec l'APTS</i>	24
3.4.2	<i>Réaction de marquage avec l'AA-Ac</i>	25
3.4.3	<i>Réaction de marquage avec la PHN</i>	25
3.5	Séparation par CE des produits de digestion enzymatique	26
3.5.1	<i>Préparation des solutions tampons</i>	26
3.5.2	<i>Instrumentation et méthode</i>	26
3.6	Séparation par HPLC des produits de digestion enzymatique	27
3.6.1	<i>Instrumentation et méthode</i>	27
4	Résultats et discussion	28
4.1	Hydrolyse acide.....	29
4.2	Digestion enzymatique.....	30
4.3	Choix du fluorophore pour la détection LIF	32
4.4	Étude des paramètres de la séparation CE des produits de digestion enzymatique.....	34
4.4.1	<i>Choix du tampon de séparation</i>	34
4.4.2	<i>Étude des blancs de digestion</i>	35
4.4.3	<i>Choix de la concentration du tampon de séparation</i>	36
4.5	Ordre de migration et séparation.....	38
4.6	Étude des paramètres de la digestion enzymatique	42
4.6.1	<i>Temps de la digestion enzymatique</i>	42
4.6.2	<i>Température de la digestion enzymatique</i>	44
4.6.3	<i>Arrêt de la digestion enzymatique</i>	45
4.6.4	<i>Choix du chromophore pour la détection UV</i>	47
4.6.5	<i>Choix de la longueur d'onde de détection</i>	49
4.6.6	<i>Choix du milieu de la digestion enzymatique</i>	52
4.6.7	<i>Effet du pH du milieu de la digestion enzymatique</i>	54
4.6.8	<i>Effet du ratio substrat sur enzyme (S/E)</i>	55
4.6.9	<i>Répétabilité de la méthode de séparation</i>	60

4.7	Séparation par HPLC-UV des produits de digestion enzymatique	62
4.7.1	<i>Effet du chromophore</i>	63
4.7.2	<i>Effet de la longueur d'onde de détection</i>	64
4.7.3	<i>Effet de la colonne de séparation</i>	65
4.7.4	<i>Effet de l'éluant</i>	68
4.7.5	<i>Effet du débit d'élution</i>	72
4.7.6	<i>Effet de la proportion de MeOH dans la phase mobile</i>	75
4.7.7	<i>Effet du gradient</i>	79
4.7.8	<i>Répétabilité de la méthode de séparation</i>	83
5	Conclusion	86
5.1	Conclusion.....	87
5.2	Travaux futurs	89
6	Bibliographie	88
7	Annexe	xix

Liste des tableaux

Tableau I : Effet de la longueur d'onde d'absorbance sur le rapport signal (S) sur bruit (B), limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) du glucose-APTS présent dans un échantillon de CMC suite à une digestion enzymatique.	51
Tableau II : Résolution entre les pics 1-2 et 3-4 (Fig 4.27) lors de la séparation du HEC avec le MeOH:H ₂ O et l'ACN:H ₂ O sur une colonne cyano.....	72
Tableau III : Résolution (R), nombre de plateaux théoriques (N) et facteur de rétention (k') de différents oligosaccharides séparés à divers débits d'élution.....	74
Tableau IV : Comparaison de la résolution selon le gradient d'élution.	82
Tableau V: Méthode utilisée pour le conditionnement d'un nouveau capillaire en électrophorèse capillaire.	xxi
Tableau VI : Méthode utilisée pour la séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose par électrophorèse capillaire...xxii	
Tableau VII : Méthode utilisée pour la séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose par HPLC.....	xxiii

Liste des figures

Figure 1.1 : Interactions de type liaison hydrogène présentes dans la cellulose.	2
Figure 1.2 : Illustration de la carboxyméthylcellulose (CMC).	3
Figure 1.3 : Illustration de l'hydroxyéthylcellulose (HEC).	4
Figure 2.1 : Schéma du principe de fonctionnement de l'électrophorèse capillaire [46].	10
Figure 2.2 : Schéma de l'appareil de détection par barrette de diode (DAD) dans le UV-Vis [46].	11
Figure 2.3 : Structure chimique de la phénylhydrazine (PHN).	12
Figure 2.4 : Structure chimique de l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS).	13
Figure 2.5 : Schéma de l'appareil de détection par fluorescence induite par laser (LIF).	14
Figure 2.6 : Structure chimique du 3-(Acétylamino)-6-aminoacridine (AA-Ac).	15
Figure 2.7 : Schéma général de marquage du terminus réducteur des produits de dépolymérisation avec différents chromophores ou fluorophores, H ₂ N-R [39].	16
Figure 2.8 : Schéma du principe de fonctionnement de la chromatographie liquide à haute performance [46].	17
Figure 2.9 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC).	20
Figure 4.1 : Électrophorégrammes des produits de l'hydrolyse acide avec le TFA de trois différents échantillons de CMC, marqués avec l'APTS. Les séparations ont été effectuées sur une même journée dans un tampon tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5 avec un voltage de 25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{ex} de 488 nm.	30
Figure 4.2 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique pendant 3 jours à la température de la pièce, de quatre différents échantillons de	

- CMC, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.1. 32
- Figure 4.3 :** Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à la température de la pièce, avec un ratio S/E de 1/2 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec a) l'APTS et b) l'AA-Ac. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.1. 33
- Figure 4.4 :** Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 2 heures à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans a) tampon tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5 avec un voltage de 25 kV et b) tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{ex} de 488 nm. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 35
- Figure 4.5 :** Électrophorégrammes des blancs de a) l'enzyme dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 et b) l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, chauffés à 37°C pendant 3 jours et mis en contact avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{ex} de 488 nm. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 36
- Figure 4.6 :** Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium à pH 2.9 aux concentrations a) 30 mM, b) 50 mM, c) 70 mM et d) 90 mM avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée de la même façon qu'à la figure 4.4. 38
- Figure 4.7:** Électrophorégrammes de a) CMC de départ sans dépolymérisation et b) des produits de digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours

- à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.5. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 41
- Figure 4.8 :** Électrophorégrammes du a) HEC de départ sans dépolymérisation et b) des produits de digestion enzymatique du HEC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.5. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 41
- Figure 4.9 :** Électrophorégramme du glucose dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 chauffé à 37°C pendant 3 jours et marqué avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.5. 42
- Figure 4.10 :** Effet du temps sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du HEC effectuée à 37°C avec un ratio S/E de 25/1, pendant a) 2h, b) 4h, c) 6h et d) 72h et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.6. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 44
- Figure 4.11 :** Effet de la température sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du HEC pendant 3 jours avec un ratio S/E de 1/2, effectuées à a) 22°C et b) 37°C et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.6. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 45
- Figure 4.12 :** Effet de la méthode d'arrêt de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0. Arrêt de la digestion par a) diminution du pH et b) diminution de la température du milieu. La

séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.6. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 47

Figure 4.13 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 a) sans marquage, b) marqués avec la PHN et c) marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée avec le détecteur UV à une longueur d'onde de 200 nm. 49

Figure 4.14 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée de la même façon qu'à la figure 4.13. La détection a été effectuée avec le détecteur UV à une longueur d'onde de a) 200 b) 214 c) 254 et d) 280 nm. * : pic de fond provenant de l'excès d'APTS. 51

Figure 4.15 : Effet du milieu de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes du a) CMC de départ et b) des produits de la digestion enzymatique effectuée dans l'eau pure Milli-Q à pH 5.0 à 37°C pendant 3 jours avec un ratio S/E de 25/1 et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.13. 53

Figure 4.16 : Effet du milieu de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes du a) CMC de départ et b) des produits de la digestion enzymatique effectuée dans le tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 à 37°C pendant 3 jours avec un ratio S/E de 25/1 et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.13. 54

Figure 4.17 : Effet du pH du milieu de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à TP avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM aux pH a) 4.5, b) 5.0, c) 5.5 et d) 6.0. La

- séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.13..... 55
- Figure 4.18:** Surfaces sous deux pics des produits de digestion enzymatique (à 1.5 et 2.5 min) en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée à la réaction d'hydrolyse enzymatique du CMC, 10 mg/mL..... 57
- Figure 4.19 :** Effet du ratio S/E sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de a) 25/1 et b) 1/2, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{ex} de 488 nm. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS..... 59
- Figure 4.20 :** Effet du ratio S/E sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du HEC pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de a) 25/1 et b) 1/2, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.19. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS..... 59
- Figure 4.21 :** Électrophorégrammes du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 avec un ratio S/E de 25/1. La séparation a été effectuée à trois reprises le 19 août 2009. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.19. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 61
- Figure 4.22 :** Électrophorégrammes du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 avec un ratio S/E de 25/1. La séparation a été effectuée le a) 16 janvier 2009 et b) 19 août 2009. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.19. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS. 62
- Figure 4.23 :** Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec a) l'AA-Ac à 432 nm, b) l'APTS à 340 nm et c) la PHN à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH et 50% (v/v) d'acide

acétique 0.1 M dans l'eau Milli-Q, avec un débit d'élution de 0.5 mL/min sur une colonne de phase stationnaire cyano. 64

Figure 4.24 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à a) 500, b) 475, c) 445 et d) 340 nm. La séparation a été effectuée de la même façon que la figure 4.23. 65

Figure 4.25 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN, détectés à 340 nm et séparés sur une colonne a) C₁₈, b) NH₂ et c) CN. Pour les trois phases stationnaires, la séparation a été effectuée en mode isocratique avec 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH et 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans l'eau Milli-Q, avec un débit d'élution de 1.0 mL/min. 67

Figure 4.26 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec a) acide acétique 0.1 M dans le MeOH, b) acide acétique 0.1 M dans l'eau Milli-Q et c) acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O. Le débit d'élution a été de 1.0 mL/min sur une colonne CN. 70

Figure 4.27 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec a) l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O et b) l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 ACN:H₂O. Le débit d'élution a été de 1.0 mL/min sur une colonne CN. 71

Figure 4.28 : Effet du débit d'élution de la phase mobile sur les aires des pics des différents oligosaccharides 1 à 4, selon la figure 4.27. La séparation a été effectuée sur une colonne CN avec une phase mobile composée d'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O. 75

Figure 4.29 : Effet de la proportion de MeOH dans la phase mobile sur le facteur de rétention des pics 1 à 4, selon la figure 4.27. La séparation a été effectuée sur une colonne CN avec un débit d'élution de 0.5 mL/min. Les différentes phases mobiles de MeOH:H₂O sont composées d'une concentration fixe de 0.1 M d'acide acétique dans le mélange. 78

- Figure 4.30 :** Chromatogramme des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec l'acide acétique 0.1 M dans 70:30 MeOH:H₂O. Le débit d'élution a été de 0.5 mL/min sur une colonne CN..... 79
- Figure 4.31 :** Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC aux différents gradients d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH testés : a) 40-90% en 5 min, b) 10-60% en 5 min, c) 40-60% en 20 min et d) 30-50% en 20 min. 82
- Figure 4.32 :** Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm obtenus le a) 30 avril 2009, b) 4 mai 2009 et c) 22 mai 2009. La séparation du même échantillon sur trois jours différents a été effectuée en mode isocratique avec l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O et un débit d'élution de 1.0 mL/min sur une colonne CN..... 83
- Figure 4.33 :** Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm obtenus à trois reprises le 27 mai 2009. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O et un débit d'élution de 1.0 mL/min sur une colonne CN..... 84

Liste des abréviations

AA-Ac	3-Acétylamino-6-aminoacridine
AB	Aminobenzamide
ACN	Acétonitrile
AMAC	Aminoacridine
ANTS	Acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique
AP	2-Aminopyridine
APTS	Acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique
ATT	6-Aza-2-thiothymine
C ₈	Colonne octyle
C ₁₈	Colonne octadécyle
CE	Électrophorèse capillaire
CEC	Électrochromatographie capillaire
CMC	Carboxyméthylcellulose
CN	Colonne cyano
DAD	Détection par barrette de diode
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DP	Degré de polymérisation
DS	Degré de substitution
ESI	Nébulisation électrostatique
GC	Chromatographie gazeuse
HABA	acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque
HEC	Hydroxyéthylcellulose
HILIC	Chromatographie liquide à interactions hydrophiles
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
k'	Facteur de rétention
LIF	Fluorescence induite par laser
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification

m/r	Rapport masse sur rayon hydraté
MALDI-ToF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
N	Nombre de plateaux théoriques
NH ₂	Colonne amino
PDA	Détecteur à barrette de diodes
PHN	Phénylhydrazine
PMP	1-Phényl-3-méthyl-5-pyrazolone
R	Résolution
S/B	Rapport signal sur bruit
S/E	Ratio substrat sur enzyme
TFA	Acide trifluoroacétique
T _m	Temps de migration
T _M	Temps mort
T _R	Temps de rétention
UGA	Unité de glucose anhydre
UV	Ultraviolet
W	Largeur à la base

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord la Professeure Karen Waldron pour m'avoir confié ce projet et pour m'avoir initié à l'univers des celluloses. Je la remercie aussi pour sa confiance et pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire de recherche. Tout au cours des deux dernières années, elle m'a beaucoup soutenue et aidée.

Je voudrais aussi remercier Vy Nguyen, Marie-Christine Tang, Georgiana Roman et Shao Ming pour leur accueil et leur aide à mon arrivée au laboratoire, ainsi que l'ensemble des étudiants du groupe de recherche du Dr. Dominic Rochefort pour leur encadrement et leur sympathie.

Je tiens également à remercier Mathieu Cambon et Jérôme Mellet, les deux stagiaires d'été, pour leurs études et leurs connaissances sur les divers sujets en chimie analytique.

Enfin, je voudrais dire un gros merci à ma famille pour le support continu qu'elle m'a apportée tout au long de mes études, ainsi qu'à mon mari qui a toujours cru en moi et qui n'a jamais cessé de m'encourager.

1 Introduction générale

1.1 La cellulose et ses dérivés

La cellulose est une ressource renouvelable et non toxique provenant principalement du coton et du bois [1]. Elle représente plus de 50% de la biomasse, ce qui la qualifie de la matière organique la plus abondante sur Terre. Elle est le principal constituant des végétaux et en particulier de leur paroi cellulaire. L'homme ne peut digérer la cellulose. Cependant, cette dernière est essentielle au bon fonctionnement des intestins.

La cellulose est un long polymère linéaire composé de 2000 à 14 000 unités de *D*-anhydroglucose (UGA) reliées les unes aux autres par des liaisons glycosidiques β -(1 \rightarrow 4) (Fig 1.1). Ces types de liaisons rendent le polymère insoluble dans l'eau et résistant aux dégradations chimiques et physiques, à cause de la présence d'un nombre élevé de ponts hydrogènes formés tout au long de la chaîne, en particulier entre la fonction hydroxyle sur le carbone 3 et la fonction éther de l'unité *D*-anhydroglucose. De plus, la rigidité de la liaison C₁-O-C₄ de deux unités de glucose adjacentes amplifie l'insolubilité de la cellulose [2].

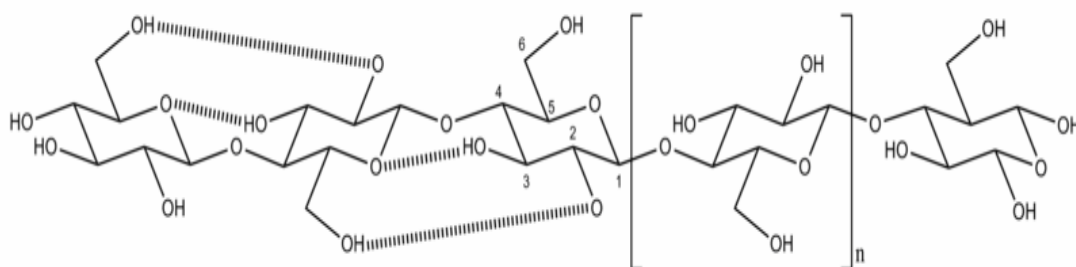


Figure 1.1 : Interactions de type liaison hydrogène présentes dans la cellulose.

Afin de faciliter la solubilisation de la cellulose pour des applications industrielles, il est essentiel de diminuer le nombre de ponts hydrogènes présents dans la molécule et ce, en la modifiant chimiquement. La modification se fait en substituant le groupement hydroxyle des carbones 2, 3 et 6 par différents autres groupements fonctionnels, tels que le carboxyméthyle et l'hydroxyéthyle [2-4]. Cependant, en substituant un très grand nombre de groupements hydroxyles par des

fonctions hydrophobes, la molécule devient soluble dans l'acétone et dans d'autres solvants, mais insoluble dans l'eau [2]. Ceci dit, le degré de polymérisation et de substitution de la cellulose entraîne un changement des propriétés physico-chimiques, telles que la viscosité et la solubilité. Il est donc possible de contrôler la modification ainsi que le degré de polymérisation, jusqu'à obtention des propriétés physico-chimiques désirées.

Les dérivés cellulosiques sont utilisés dans le domaine pharmaceutique pour la fabrication de médicaments en tant qu'excipient, c'est-à-dire un ingrédient non-actif [5-10]. Ils sont aussi utilisés en tant qu'additif dans la nourriture, la peinture, les cosmétiques et dans les textiles [11, 12]. Dans le domaine de la construction, ils peuvent être ajoutés dans le mélange de ciment et de gypse, afin de permettre la dispersion du ciment et du sable [13].

Différents dérivés cellulosiques tels que le carboxyméthylcellulose (CMC) et l'hydroxyéthylcellulose (HEC) sont disponibles sur le commerce. Le degré de polymérisation et de modification diffèrent énormément d'un fournisseur à l'autre tout dépendamment de l'origine de la cellulose et de leur procédé de dérivation, leur conférant ainsi différentes propriétés physico-chimiques qui leurs sont propres.

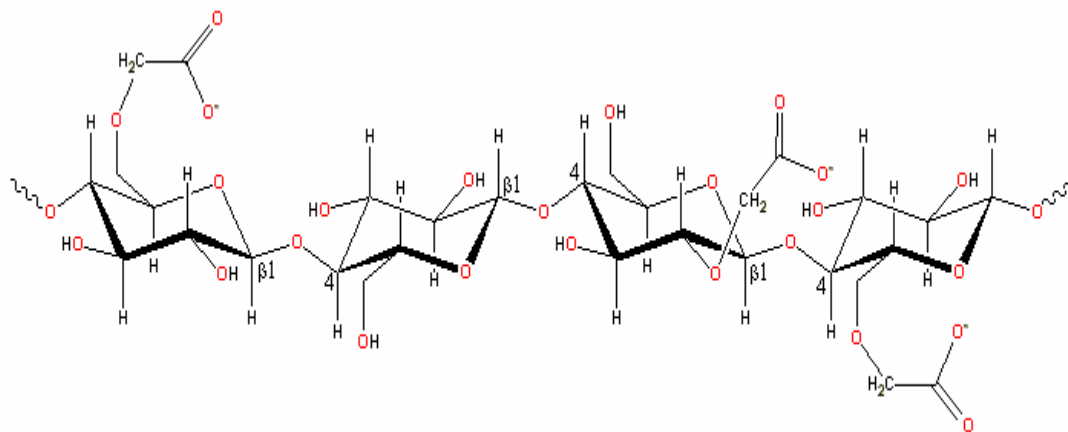


Figure 1.2 : Illustration de la carboxyméthylcellulose (CMC).

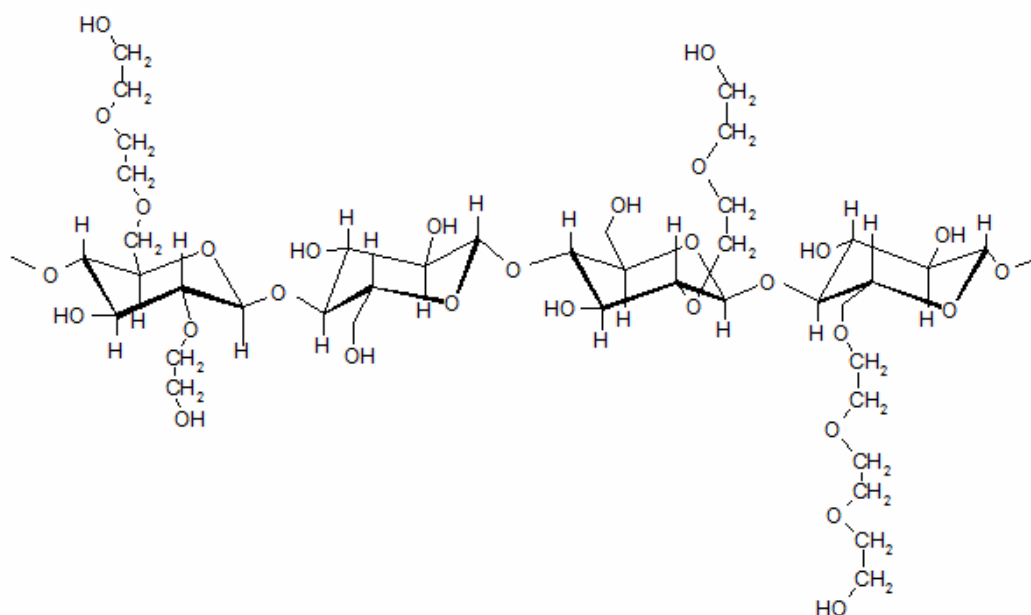


Figure 1.3 : Illustration de l'hydroxyéthylcellulose (HEC).

Afin de combiner la variation de ces propriétés avec un dérivé cellulosique donné, il faut connaître la composition chimique de ces macromolécules. Différentes méthodes analytiques, telles que la fluorimétrie [14], la viscosimétrie [15, 16] et la spectroscopie infrarouge à Transformation de Fourier (FTIR) [6, 10, 17-20] peuvent être employées. Plusieurs études récentes ont montré que la résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique efficace à cette fin. En effet, Lopes *et al.* [21] ont étudié par RMN différents électrolytes de polymères à base de cellulose. Aussi, Regiani *et al.* [22] ont réussi à synthétiser un mince film d'hydroxyéthylcellulose/polyéther et à le caractériser par RMN. Même si cette méthode semble être un outil très puissant pour l'étude des macromolécules, elle est longue et coûteuse. Les techniques chromatographiques sont une autre possibilité. Cependant, la plupart des auteurs [23-28] utilisent les méthodes chromatographiques pour la séparation des hydrates de carbones. Peu d'études ont été effectuées sur la séparation des dérivés de cellulose par les méthodes chromatographiques [12, 29-31]. Heinze et Pfeiffer [32] se sont penchés sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), afin de caractériser les différentes chaînes de glucose mono-, di- et tricarboxyméthylés, suite à une dégradation acide du

carboxyméthylcellulose avec l'acide perchlorique. Pour leur part, Liu *et al.* [33] ont réussi à caractériser des dérivés d'hydroxyéthylcellulose cationiques en utilisant la chromatographie d'exclusion moléculaire (SEC) à triple détection. La caractérisation des carbohydrates par électrophorèse capillaire (CE) a pris ampleur ces dernières années [34-41]. La séparation des produits de dégradation des dérivés de cellulose par CE a aussi été sujeté dans différents travaux récents [42, 43]. En effet, Kathalijne *et al.* [44] ont réussi à déterminer le degré de substitution de différents carboxyméthylcelluloses par CE.

Une multitude de techniques analytiques sont mises à notre disposition pour l'étude des dérivés de cellulose. Lors de ce projet, la caractérisation qualitative des dérivés de cellulose se fera par électrophorèse capillaire et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Ces deux techniques ont été choisies dû à leur forte capacité de séparer des mélanges complexes. Aussi, elles permettent de quantifier et d'identifier les différents oligosaccharides obtenus suite à la dégradation des dérivés de cellulose, lorsque des étalons standards sont disponibles. Enfin, ces deux techniques, lorsque couplées avec la spectrométrie de masse, permettent d'étudier de façon plus approfondie les dérivés de cellulose, ainsi que les produits de dépolymérisation. Quelle que soit la technique utilisée pour analyser les dérivés cellulosiques, il est primordial de procéder à une dépolymérisation des échantillons jusqu'à obtention de chaînes de masses et de longueurs plus petites [3]. Différentes techniques permettent la dépolymérisation de la cellulose, dont l'hydrolyse acide et la digestion enzymatique.

1.2 Hydrolyse acide (acétolyse)

Dans les dernières décennies, plusieurs recherches sur les dérivés cellulosiques impliquant l'hydrolyse acide ont été effectuées [2, 11, 13, 43]. L'acétolyse consiste au mélange du dérivé de cellulose avec un acide fort, tel que l'acide trifluoroacétique (TFA), et au chauffage de ce dernier pendant 4 heures à 90°C [11]. L'hydrolyse acide permet la rupture des liens glycosidiques β -(1→4) des unités de glucoses adjacentes.

Malgré la simplicité de cette technique, elle n'est pas spécifique, puisque très rapidement les liens sont brisés et le polymère est converti en glucose.

1.3 Digestion enzymatique

Outre l'hydrolyse acide, il est possible de réduire la longueur des chaînes et ce, en présence d'une enzyme [2, 3, 12, 45]. Chaque enzyme possède son propre mécanisme d'action, mais jusqu'à aujourd'hui, le mécanisme d'action enzymatique n'est pas encore bien compris, pour un vaste nombre d'enzymes. Les cellulases sont des enzymes qui permettent de décomposer la cellulose. Étant des catalyseurs biologiques, elles réagissent à faibles concentrations et restent intactes en fin de la réaction. Plusieurs facteurs peuvent modifier la cinétique de la réaction enzymatique, tels que la concentration en enzyme et en substrat, les caractéristiques physico-chimiques du milieu de réaction, soit la température et le pH, et finalement le temps de l'hydrolyse. *Trichoderma reesei* est un champignon filamenteux, mésophile et microscopique qui sécrète une grande quantité d'enzymes cellulosiques. Les chercheurs le considèrent comme étant un modèle de référence pour la transformation de la cellulose végétale en sucres simples, c'est-à-dire la digestion enzymatique.

1.4 Quelques définitions

On définira le degré de polymérisation (DP) comme étant le nombre d'unité de glucose présent dans la chaîne et le degré de substitution (DS) ou de modification comme étant le nombre de groupements carboxyméthyle ou d'hydroxyéthyle qui remplace les fonctions hydroxyles des différentes unités de glucose. Afin de ne pas se confondre, on parlera de dérivation lorsqu'on se réfère à la modification de la cellulose, c'est-à-dire l'ajout du carboxyméthylcellulose ou de l'hydroxyéthylcellulose. On décrira le marquage comme étant la réaction entre les produits de digestion enzymatique et un chromophore ou un fluorophore, afin qu'ils puissent être détectés durant les séparations analytiques.

1.5 Objectifs du projet

Ce projet vise donc à développer une méthode analytique permettant la caractérisation qualitative des produits de dépolymérisation enzymatique des dérivés cellulosiques, selon trois axes. Le premier est le développement et l'optimisation d'une méthode de digestion enzymatique donnant les oligosaccharides de plus petites tailles. Le second est l'optimisation d'une méthode de marquage avec un fluorophore ou un chromophore, afin que les oligosaccharides puissent être détectés. Finalement, le développement et l'optimisation de la séparation par électrophorèse capillaire (CE) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplés à différents détecteurs, pour obtenir un profil cartographique des dérivés cellulosiques. La séparation des oligosaccharides se fera selon leur degré de polymérisation et leur degré de substitution. Cette étude permettra aussi de déterminer si l'enzyme produit une certaine spécificité lors de la digestion des celluloses.

La chromatographie liquide à haute performance et l'électrophorèse capillaire sont deux techniques analytiques de séparation qui ont pris ampleur les dernières décennies et qui possèdent un vaste domaine d'applications. En HPLC, la séparation des molécules se fait selon leur hydrophobicité, tandis qu'en CE, elle se fait selon leur rapport masse sur rayon hydraté (m/r). Ces deux techniques complémentaires seront étudiées en optimisant quelques paramètres de séparation, afin qu'elles soient comparées.

2 Techniques analytiques et méthodes de détection des dérivés celluloses

La caractérisation et la séparation des différents oligosaccharides devront se faire en utilisant une technique analytique très efficace et puissante, qui permettra non seulement d'identifier les molécules aux différents degrés de polymérisation, mais aussi d'identifier les fragments aux degrés de polymérisation semblables, mais aux degrés de substitution différents. Puisque les dérivés cellulosiques ne possèdent guère de groupement chromophore ou fluorophore, le choix de la méthode de détection devra se faire de manière audacieuse.

2.1 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique introduite dans les années 1960 et conçue pour l'analyse de mélanges complexes de molécules biologiques ne pouvant pas être séparés complètement par les techniques chromatographiques. Cette méthode de séparation repose sur les différences de mobilités de molécules chargées en solution, sous l'influence d'un champ électrique appliqué. La migration des analytes se fait donc en fonction de leur rapport masse sur rayon hydraté. Il existe plusieurs modes de séparation en CE, mais le plus couramment utilisé est le CE en solution libre (FSCE : Free solution capillary electrophoresis). Ce mode de séparation est basé sur deux phénomènes qui coexistent et qui déterminent la migration sélective des analytes. Ces phénomènes sont l'électro-osmose, c'est-à-dire le déplacement de la solution tampon suite au potentiel zeta qui se forme sur la paroi du capillaire, grâce à la présence de la double couche électrique et l'électromigration, soit le déplacement des espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique pouvant atteindre 30 kV. Le CE est la première technique analytique qui a été étudiée pour la séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose, puisque c'est une technique rapide, simple et permet de séparer efficacement les molécules chargées [39]. C'est une méthode sensible, nécessitant un système de détection approprié pour pouvoir détecter les dérivés cellulosiques.

2.1.1 Séparation par CE

En CE, un capillaire en verre de silice d'une longueur totale entre 20 et 80 cm et d'un diamètre entre 20 et 100 μm est utilisé. La solution à analyser est introduite dans le capillaire en appliquant une pression. Les extrémités de ce capillaire baignent dans deux réservoirs d'un même électrolyte, dans lesquels sont plongés des électrodes. Une différence de potentiel pouvant atteindre 30 kV est appliquée aux bornes des électrodes. À cet effet, les espèces migrent à travers le capillaire et leur passage est enregistré à l'aide d'un système de détection. Deux types d'écoulement existent, soit l'écoulement normal (cathodique) et l'écoulement inverse (anodique). Lors de l'écoulement cathodique, une différence de potentielle positive est appliquée, afin de permettre l'avancement des cations en milieu de pH élevé (milieu basique), suivis des molécules neutres et des anions. Dans le cas inverse, l'application d'un voltage négatif, lors de l'écoulement anodique, assure la migration des anions en milieu de bas pH (milieu acide), suivis des molécules neutres et des cations.

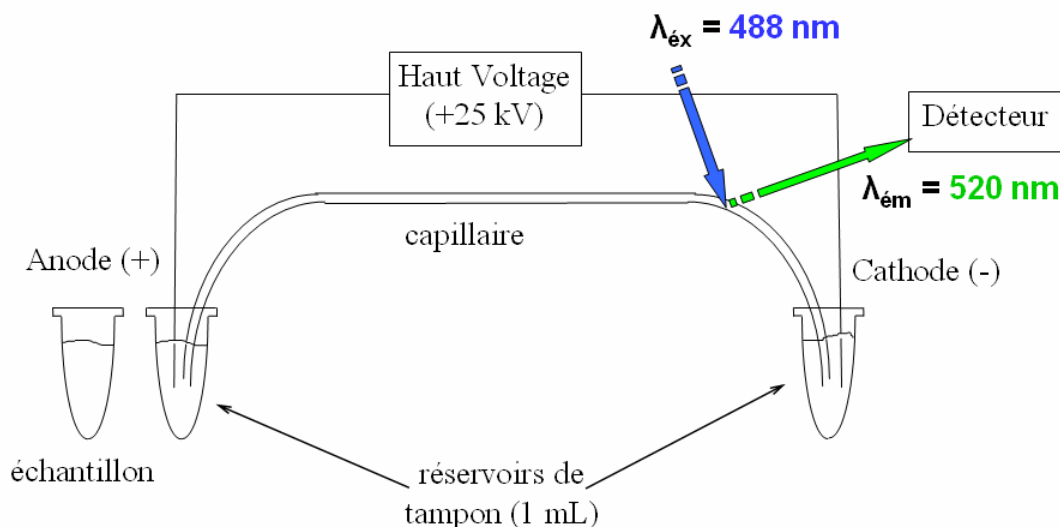


Figure 2.1 : Schéma du principe de fonctionnement de l'électrophorèse capillaire [46].

2.1.2 Détection par absorbance

En CE, le capillaire est utilisé comme cellule de détection. Par chauffage rapide, la gaine polyimide protectrice du capillaire est éliminée sur une distance de 1 à 3 mm

pour découvrir la silice fondue nue. Une intensité lumineuse est appliquée de façon perpendiculaire à travers cette nouvelle fenêtre dans le capillaire et lorsqu'un composé passe, il absorbe une certaine quantité de lumière, selon sa structure moléculaire, que le détecteur transcrit sous forme de signal.

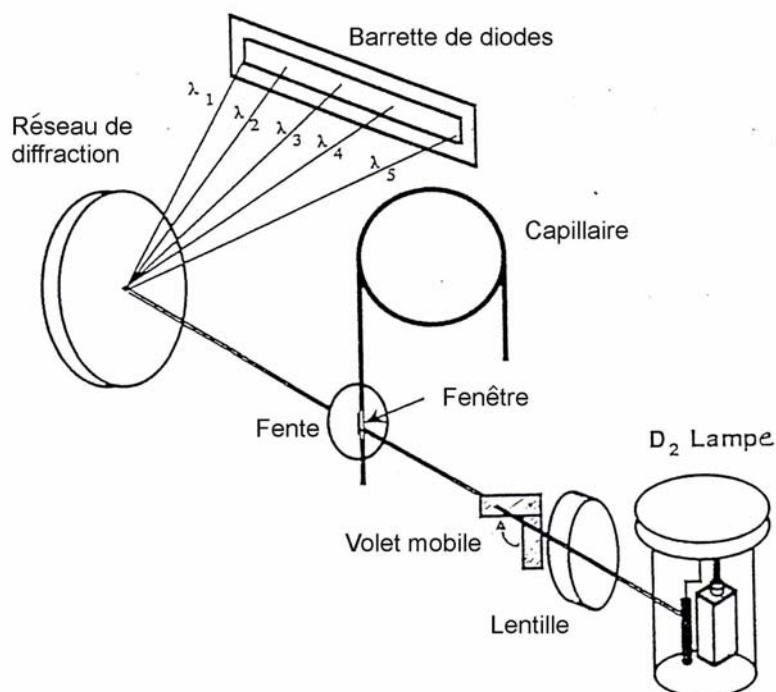


Figure 2.2 : Schéma de l'appareil de détection par barrette de diode (DAD) dans le UV-Vis [46].

Compte tenu du faible parcours optique à travers le capillaire, cette méthode de détection est moins sensible que pour l'HPLC, si la solution absorbe et que les coefficients d'absorptions molaires ϵ sont identiques. Dans le cas où la solution absorbe peu ou pas, tel que dans le cas des dérivés cellulosiques, puisqu'ils ne possèdent aucun groupement chromophore, la détection par absorbance UV-Vis est presque impossible. Dans ce dernier cas, on peut avoir recours à la détection UV indirecte ou au marquage des analytes avec un chromophore. La détection UV indirecte consiste à introduire dans l'électrolyte un ion visualisant, c'est-à-dire une molécule qui absorbe fortement dans l'UV. Les analytes vont déplacer ces ions

visualisants contenus dans le milieu, ce qui engendrera une perte en absorbance, qui est alors enregistrée par un pic négatif. Une méthode plus sensible que la détection UV indirecte consiste à greffer un chromophore à une molécule qui n'absorbe pas dans l'UV, ce qui permettra de faciliter sa détection par absorbance.

Plusieurs molécules peuvent servir d'agent chromophore pour le marquage des oligosaccharides, telles que l'Aminobenzamide (AB) [47], le 1-Phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMP) [47], le 2-Aminoacridine (AMAC) [48], le 3-Acétylamino-6-aminoacridine (AA-Ac) [48], la Phénylhydrazine (PHN) [47, 49] et l'acide 8-Aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS) [40]. Les réactions de marquage de ces derniers varient les unes des autres et chacune possède ses avantages et ses inconvénients. Tous ces agents chromophores possèdent un ou plusieurs groupements amines. La réaction de marquage consiste à la réduction de l'amine à l'extrémité réductrice de la chaîne [50]. Lors de ce projet, seuls la PHN et l'APTS ont été testés comme chromophore pour la détection par absorbance UV-Vis en CE.

Le premier chromophore qui a été utilisé est la PHN (Fig 2.3) qui a été étudiée dans les années antérieures par Marie-Ève Beaudoin [51] et Marie-Christine Tang [52], du même groupe de recherche. Une longueur d'onde de 200 nm a été choisie. Le marquage des oligosaccharides avec la PHN possède plusieurs avantages, dont un temps de réaction très court. De plus, Lattova et Perreault ont montrés que la PHN permettait une meilleure fragmentation des oligosaccharides en spectrométrie de masse (MS) [47, 49, 53]. La PHN a donc été utilisé avec l'espoir d'obtenir non seulement un profil cartographique par CE, mais aussi les spectres de masse.

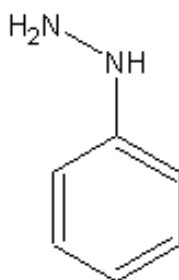


Figure 2.3 : Structure chimique de la phénylhydrazine (PHN).

Le second chromophore qui a été testé est l'APTS (Fig 2.4). Quatre différentes longueurs d'ondes ont été expérimentées, afin de voir celle qui permet une absorbance maximale. Cette dernière correspond à 200 nm. Le marquage avec l'APTS présente plusieurs avantages en CE. Tout d'abord, comparativement à la PHN, l'APTS possède quatre fonctions aromatiques, ce qui permet une plus grande absorbance des molécules dans le visible. De plus, il contient trois groupements sulfonates chargés, permettant ainsi une meilleure séparation en CE. Enfin, l'APTS est aussi un fluorophore, pouvant être détecté avec un détecteur à fluorescence induite par laser.

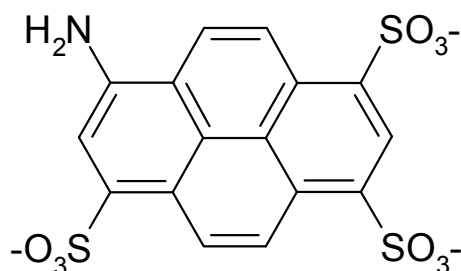


Figure 2.4 : Structure chimique de l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS).

2.1.3 Détection par Fluorescence Induite par Laser (LIF)

Outre la détection par absorbance UV, un second détecteur peut être utilisé en CE, soit le détecteur LIF. Le laser est utilisé comme source d'excitation, puisqu'il émet un faisceau lumineux d'une longueur d'onde correspondant à une bande d'absorption de l'agent de marquage et une grande intensité grâce à la cohérence de cette source lumineuse. La fibre optique conduit ce faisceau lumineux directement à la fenêtre de détection du capillaire. Le faisceau traverse respectivement la fenêtre du capillaire et donc l'analyte. Le groupement fluorescent greffé sur l'analyte est excité à cette longueur d'onde et émet des photons de longueur d'onde plus élevée et donc d'une plus faible énergie. Afin de limiter la lumière incidente diffuse, le signal fluorescent est récupéré de façon perpendiculaire à l'aide d'une petite lentille sphérique. Le signal traverse par la suite un premier filtre optique, qui empêche le

passage des signaux d'excitation et un deuxième filtre spatial, qui ne laisse passer que les raies les plus intenses du signal. Finalement, le signal est récupéré par un photomultiplicateur et converti en voltage, afin d'obtenir un électrophorogramme.

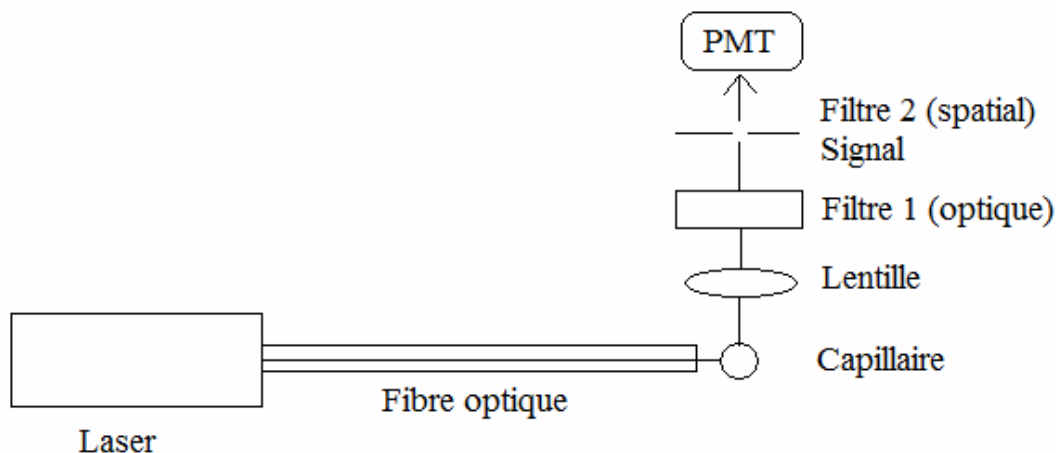


Figure 2.5 : Schéma de l'appareil de détection par fluorescence induite par laser (LIF).

Le détecteur LIF est plus spécifique que le détecteur UV, puisque seules les molécules fluorescentes pour une longueur d'onde d'excitation donnée peuvent être détectées. Le laser utilisé au laboratoire est un laser d'ions d'argon ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Enfin, lorsque couplé au CE, le détecteur LIF possède des limites de détection plus basse que l'UV, soit de l'ordre du nanomolaire. Toutefois, malgré tous ces avantages de l'utilisation du détecteur LIF, une étape de marquage avec un fluorophore est requise avant l'analyse des produits de digestion enzymatique, sans quoi ils ne peuvent être détectés.

Jusqu'à aujourd'hui, on retrouve dans la littérature plusieurs articles faisant référence au marquage de petits oligosaccharides [35, 40, 48, 54], mais peu sur le marquage des produits de digestion des dérivés celluloses [43] ou sur le marquage d'oligosaccharides de grandes tailles [37, 55]. Tout comme les chromophores, la réaction de marquage des fluorophores résulte en la réduction de l'amine à l'extrémité réductrice de la chaîne de cellulose. Plusieurs agents fluorescents sont disponibles pour permettre un bon marquage et une bonne séparation en

électrophorèse capillaire. Parmi eux, il est possible de nommer le 3-(acétylamino)-6-aminoacridine (AA-Ac) [48], le 2-aminopyridine (AP) [54] et l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS)[35, 36]. Evangelista *et al.* [36] ont étudié la séparation de sucres marqués avec l'APTS par CE-LIF. Une étude sur la caractérisation de dérivés cellulosiques marqués à l'APTS a été faite par Stefansson *et al.* [43]

Malgré la multitude d'agents fluorophores disponibles, les choix sont limités, puisque deux conditions doivent être respectées. Tout d'abord, la longueur d'onde d'excitation maximale du fluorophore doit être proche de la longueur d'onde émise par le laser, soit de 488 nm. En second lieu, il est préférable d'utiliser un agent fluorescent chargé, qui permettra une séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés cellulosiques en électrophorèse capillaire. Lors de ce projet, les produits de digestion enzymatique ont été marqués avec deux fluorophores différents, soit l'APTS, dont la structure est présentée sur la Fig 2.4 et l'AA-Ac, ayant la structure ici-dessous.

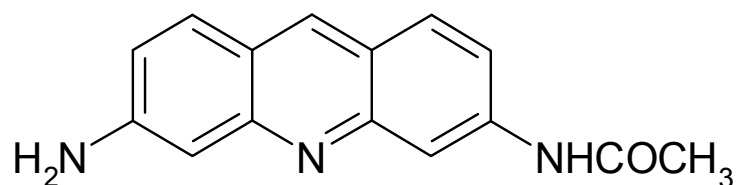


Figure 2.6 : Structure chimique du 3-(Acétylamino)-6-aminoacridine (AA-Ac).

L'AA-Ac est une molécule fluorescente dérivée du 2-aminoacridone (2-AMAC). Il a été démontré que l'AA-Ac est un excellent agent fluorescent pour les oligosaccharides, puisque son intensité de fluorescence est deux fois plus élevée que le 2-AMAC [48]. Cependant, comparativement à l'APTS, il ne possède aucune charge, diminuant ainsi les chances d'avoir une bonne séparation en électrophorèse capillaire, si les analytes ne portent pas leur propre charge. L'AA-Ac a surtout été testé avec l'espoir d'obtenir les spectres de masse des oligosaccharides.

La réaction de marquage des oligosaccharides a été développée et beaucoup étudiée dans diverses études précédentes. Elle s'effectue par réduction de l'amine via la formation d'une base de Schiff, telle que décrite par la figure suivante.

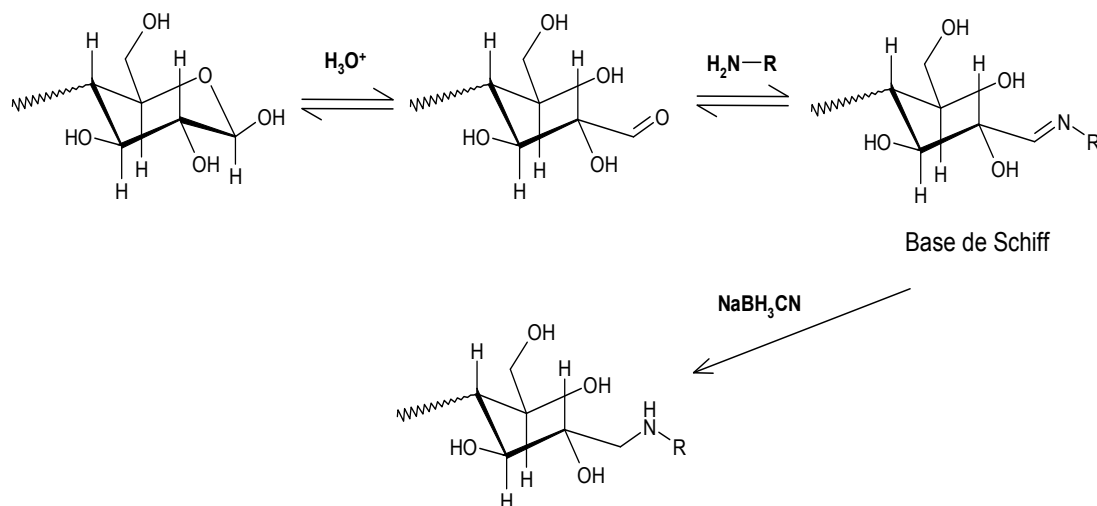


Figure 2.7 : Schéma général de marquage du terminus réducteur des produits de dépolymérisation avec différents chromophores ou fluorophores, H_2N-R [39].

2.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les premiers travaux sur la chromatographie remontent au début du siècle avec la découverte de la chromatographie sur colonne. Par la suite, il y a eu l'explication du principe de l'élution des composés après leur séparation sur une colonne. Ce n'est qu'en 1967 que l'HPLC a pris un grand essor. La rétention des analytes est basée selon leur hydrophobicité et leur capacité à interagir avec la phase stationnaire. Plusieurs forces d'attractions permettent aux analytes d'être retenus par la phase stationnaire, telles que les ponts hydrogènes et les forces de Van Der Waals. L'HPLC est la seconde technique analytique utilisée lors de ce projet, puisque c'est une technique rapide, possédant un appareillage facilement disponible et qui permet d'analyser des composés thermosensibles, très polaires ou dont la masse est élevée (>1000 g/mol) par rapport à la chromatographie gazeuse (GC). La seule obligation de l'utilisation de cette méthode est que l'analyte doit être soluble dans la phase mobile. Ceci dit, les solutés se retrouvent en compétition avec la phase mobile pour interagir

avec les sites de la phase stationnaire. L'HPLC est une technique de séparation complémentaire au CE.

2.2.1 Séparation par HPLC

L'HPLC est composée de plusieurs éléments essentiels, tels qu'un réservoir d'éluant (phase mobile), une pompe débitométrique, un injecteur, une colonne (phase stationnaire), un détecteur et un enregistreur. Une fois que l'éluant est filtré et dégazé, il est entraîné vers la colonne à l'aide d'une pompe débitométrique, qui applique une pression élevée. Le mélange à séparer est injecté dans la colonne et est dilué dans la phase mobile, pour ensuite être entraîné à travers la colonne. Un détecteur placé à la sortie de la colonne analytique couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé d'un chromatogramme.

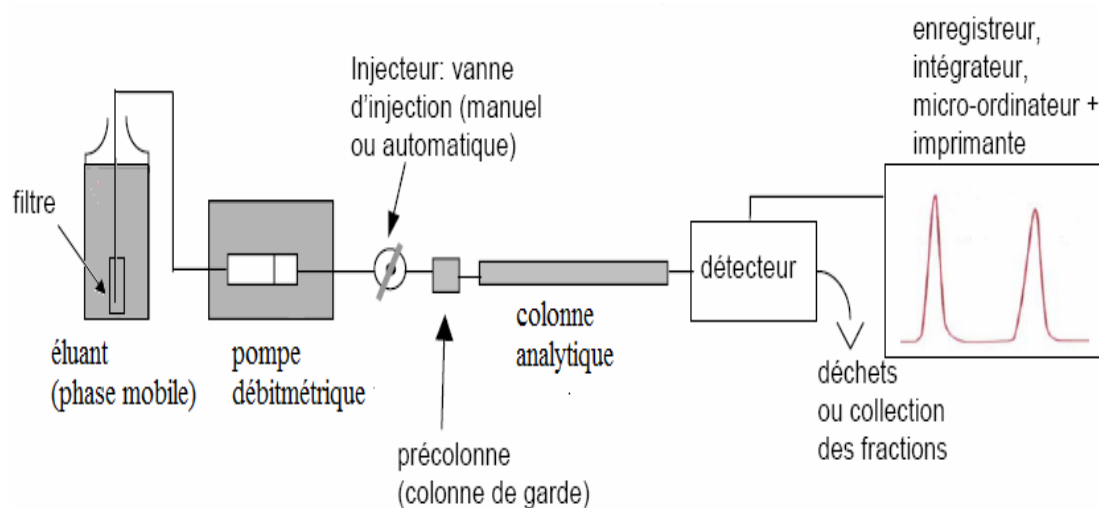


Figure 2.8 : Schéma du principe de fonctionnement de la chromatographie liquide à haute performance [46].

On retrouve dans la littérature plusieurs articles se référant à la séparation d'oligosaccharides par HPLC [24, 56], mais très peu sur la séparation de dérivés cellulosiques [12, 30, 57]. De plus, le mode de détection employé avec les méthodes chromatographiques est surtout la détection par spectrométrie de masse, qui devient de plus en plus populaire année après année. Puisque lors de ce projet, l'HPLC utilisé est couplé à un détecteur UV-Vis, la séparation des produits de digestion

enzymatique n'a pas été facile, car ils ne peuvent être détectés par absorbance à leur état natif. Encore une fois, il est important de procéder au marquage avec un chromophore. Contrairement au CE, la présence de molécules chargées n'est pas nécessaire pour avoir une bonne séparation en HPLC. Ainsi, le choix du chromophore est plus facile et n'est pas limité.

Plusieurs colonnes avec différentes polarités sont disponibles pour jouer le rôle de phase stationnaire en HPLC, parmi lesquelles il est possible de nommer les colonnes octadécyle (C_{18}), décyle (C_8), phényle, amino (NH_2), cyano (CN) et diol. Lattova et Perreault [49] ont utilisés une colonne C_{18} pour séparer un mélange de *N*-glycans libérés d'ovalbumine de poule. Pour sa part, Broberg [24] a testé une colonne de carbone graphite pour séparer des oligosaccharides à leur état natif et marqué. Puisque les fonctions hydroxyles présentes sur les unités de glucose anhydre (UGA) des dérivés cellulosiques rendent les produits de digestion enzymatique polaires, il est préférable d'utiliser une colonne polaire pour assurer de bonnes interactions avec les analytes. Ainsi, une colonne C_{18} ne retiendra pas les produits de dépolymérisation enzymatique et ne permettra donc pas une très bonne séparation en HPLC. Marie-Christine Tang [52] s'est penchée sur l'utilisation de deux colonnes polaires, soit la colonne CN et la colonne NH_2 pour la séparation des chitooligosaccharides. Lors de ce projet, les produits de dépolymérisation enzymatique ont été séparés par trois colonnes différentes : C_{18} , NH_2 et CN, afin de les comparer.

Il existe différents types d'HPLC [58] : la chromatographie de partage ou liquide-liquide, la chromatographie d'adsorption aussi nommée liquide-solide, la chromatographie par échange d'ions, la chromatographie d'exclusion moléculaire. Pour la séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés cellulosiques, c'est la chromatographie de partage qui a été employée et qui peut être utilisée en phase normale, inverse ou en mode HILIC (Chromatographie liquide à interactions hydrophiles).

2.2.2 Chromatographie liquide en phase inverse

L'HPLC en phase inverse est une technique de séparation de routine en raison de sa fiabilité [26]. La phase stationnaire étant composée de gel de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 à 18 carbones, elle nécessite donc une phase mobile de caractère polaire, telle que l'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) ou l'eau (H₂O). Dans ce cas, les composés les plus polaires éluent en premier, puisqu'ils interagissent moins avec la phase stationnaire apolaire. Puisque les produits de digestion enzymatique des dérivés celluloses ont un caractère très polaire, l'application de l'HPLC en mode inverse ne permet pas d'avoir une bonne séparation, puisque leurs interactions avec la phase stationnaire apolaire seraient faibles et ils auraient donc tendance à éluer tous en même temps.

2.2.3 Chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC)

La chromatographie liquide à interactions hydrophiles est un cas spécial de la chromatographie en phase normale. Ce mode d'interaction est surtout utilisé pour l'analyse de familles de solutés très polaires. Les premières études en mode HILIC ont été effectuées en 1975 lorsque Linden et Lawhead [27] ont séparés un mélange de carbohydrates avec une colonne amino dans un éluant composé d'acétonitrile et d'eau en proportion 75:25. C'est en 1990 qu'Alpert [59, 60] suggéra l'acronyme HILIC «*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*» pour désigner ce mode de séparation, mais ce n'est qu'à partir de 2003, que les scientifiques s'intéressent davantage sur le sujet. Deux conditions sont indispensables afin de pouvoir séparer les composés polaires en mode HILIC. Tout d'abord, la phase mobile doit contenir un minimum de 5% d'eau et doit être riche en solvants organiques et par la suite, la phase stationnaire doit être polaire. Jusqu'à aujourd'hui, les mécanismes de rétention selon ce mode chromatographique sont encore mal connus, mais les chercheurs observent tous que l'ordre d'élution est l'opposé de celui en chromatographie liquide en phase inverse. Le principe de séparation en mode HILIC connu jusqu'à aujourd'hui repose sur la formation d'une mince couche d'eau à la surface de la phase stationnaire, qui est polaire. Il se produit donc de fortes interactions entre les analytes et cette pellicule humide. Un équilibre de répartition des molécules polaires apparaît

entre la phase mobile et la mince couche humide de la phase stationnaire. La rétention des composés dépend donc de leurs interactions avec les différentes phases impliquées.

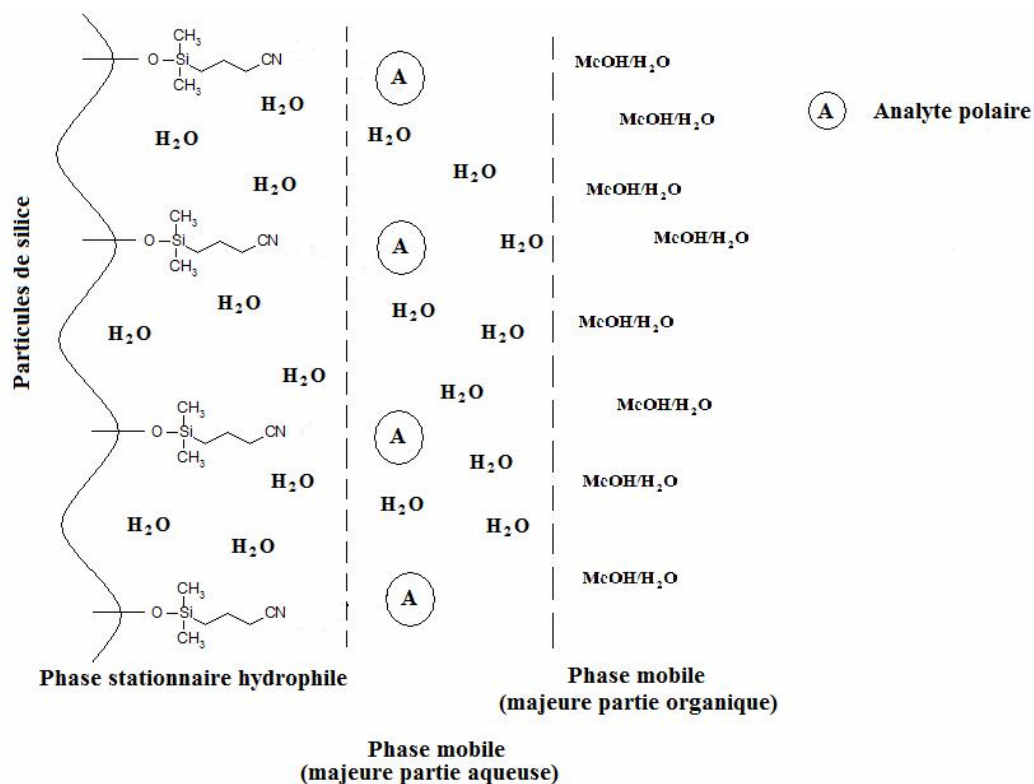


Figure 2.9 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC).

Plusieurs phases stationnaires peuvent être employées en mode HILIC. Les premières phases stationnaires utilisées étaient les colonnes de base de silice modifiées avec des groupements amines, permettant la séparation des hydrates de carbone. Par la suite, les modifications des colonnes à base de silice se sont faites avec des groupements diols et amides pour la séparation des protéines et des peptides [61]. Outre ces phases stationnaires, les colonnes cyano, hydroxy, diol et carbohydrates possèdent un grand caractère polaire, permettant ainsi d'adsorber les molécules d'eau de la phase mobile.

Les produits de digestion enzymatique étant très polaires, leur séparation a donc été effectuée par chromatographie HILIC, en testant différentes colonnes et diverses phases mobiles et en variant plusieurs paramètres de séparation, tels que le débit d'élution, la longueur d'onde de détection, ainsi que le mode de séparation.

2.2.4 Détection UV-Vis

Outre l'électrochimie, la spectrofluorimétrie et la spectrophotométrie, le mode de détection le plus employé en chromatographie HILIC est le réfractomètre, qui est une méthode permettant l'analyse des sucres ayant de faibles concentrations pouvant atteindre 25ng/mL [29]. Puisque le réfractomètre est un détecteur universel, les groupements chromophores ne sont donc pas nécessaires, afin que les sucres soient détectés. Cependant, la sensibilité du réfractomètre change avec la composition du solvant. C'est pour cette raison que certains auteurs [62-64] recommandent l'utilisation du détecteur de diffusion de lumière (ELSD : evaporative light-scattering detector) pour l'analyse de carbohydrates en mode HILIC, puisque ce dernier est compatible avec les solvants utilisés et sa sensibilité est acceptable.

Lors de ce projet, c'est la détection par absorbance UV-Vis qui a été utilisée pour la détection des oligosaccharides marqués par HPLC. Ceci nous permettrait de faire une comparaison des deux techniques de séparation utilisées. En chromatographie liquide, le chemin optique étant plus grand qu'en électrophorèse capillaire, la détection par absorbance se trouve donc à être plus sensible.

3 Partie expérimentale

3.1 *Produits chimiques*

Le carboxyméthylcellulose (nom commercial : CMC7LFPH, pureté de 99,5%) et l'hydroxyéthylcellulose (Natrosol HHX) ont été obtenus en donation d'une compagnie pharmaceutique. L'enzyme Cellulase de la souche *Trichoderma Reesei* ATCC 26921, l'acide trifluoroacétique (TFA pur à 99%), le tétraborate de sodium (pureté de 99%), l'acide borique, le phosphate de sodium monobasique (98,7%), dibasique, l'acide phosphorique (85%), la phénylhydrazine (PHN, pureté de 97%), le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN , pureté de 94%), le méthanol ACS reagent grade (pureté de 99,8%) et l'acétate de sodium trihydraté (pureté de 99%) ont été achetés de la compagnie Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). L'acide acétique glacial (17 M, pureté de 99,5%) a été obtenu de la compagnie Anachemia (Montréal, Québec, Canada). L'acide chlorhydrique (12 M) et l'acétonitrile HPLC grade ont été achetés de EMD Science (affilié de Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Le sel 8-aminopyrène-1,3,6- trisulfonique (APTS) a été acheté de Fluka (Oakville, Ontario, Canada). Le 3-(acétylamino)-6-aminoacridine (AA-Ac) a été préparé dans un autre groupe de recherche de l'Université de Montréal et ce, en mélangeant de l'hydrochlorure de 3,6-diaminoacridine avec de l'acétique anhydride pendant 3 jours à -10°C . Le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été récupéré du laboratoire de la Professeure Andréa Schmitzer. L'acétate d'ammonium (pureté de 99,7%) a été obtenu de la compagnie Fisher (New Jersey, USA). L'eau utilisée pour la dilution des échantillons et pour quencher la réaction de marquage a été purifiée avec un système de filtration Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA).

3.2 *Hydrolyse acide*

3.2.1 *Réaction d'hydrolyse acide*

La dépolymérisation acide a été effectuée selon Momcilovic *et al.* [3] Aucune modification n'a été apportée. Une masse d'environ 10 mg de dérivé cellulosique est mélangée avec 1 mL de TFA (2 M). Le mélange est chauffé pendant 2 h à 95°C tout en remuant de temps en temps. Finalement, le mélange est refroidi à la température de la pièce et est dilué dans l'eau pure à la concentration désirée.

3.3 Digestion enzymatique

3.3.1 Préparation des solutions tampons

Les solutions d'acétate de sodium 50 mM aux différents pH (4.4, 4.9, 5.3 et 5.9) ont tous été préparées avec du $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ et du CH_3COOH 17 M. Toutes ces solutions ont été préparées dans l'eau pure Milli-Q et filtrées avec des filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2 μm (Chromatographic Specialties, Brockville, ON, Canada).

3.3.2 Réaction de digestion enzymatique

La digestion enzymatique a été effectuée selon Cohen *et al.* [12] tout en optimisant les différents paramètres utilisés par ces derniers. Ils ont suggéré de mélanger 1 μM d'enzyme avec 10 mg/mL de cellulose dans 50 mM d'acétate d'ammonium à pH 5.0 et de garder ce mélange à la température de la pièce pendant 72 h. L'enzyme utilisée au cours de ce projet n'a pas été préalablement purifiée. D'après quelques résultats, elle semble donner une activité spécifique envers la cellulose. L'arrêt de l'hydrolyse a été effectué en entreposant l'échantillon à 4°C. Lors de ce projet, la digestion enzymatique a été effectuée dans deux milieux différents, soit dans l'acétate de sodium et dans l'eau Milli-Q. Différents pH du milieu de digestion ont été testés entre 4.4 et 5.9. La digestion a été effectuée à 22°C (la température de la pièce) et à 37°C. Le ratio substrat sur enzyme, le temps de digestion, ainsi que la façon d'arrêter l'hydrolyse ont aussi été variés et optimisés. Les résultats correspondants se retrouvent dans le chapitre suivant.

3.4 Réaction de marquage

3.4.1 Réaction de marquage avec l'APTS

La procédure de marquage avec l'APTS a été décrite par Wang et Hsieh [40] et par Beaudoin *et al.* [51] et a été très adoptée dans le groupe de recherche durant les années antérieures. Elle a consistée en la préparation d'une solution d'APTS 0.2 M dans 15% d'acide acétique glacial et une solution fraîche de cyanoborohydrure de

sodium 1 M dans l'eau pure. Par la suite, un aliquote de 10 μ L d'oligosaccharide d'une concentration de 10 mg/mL a été mélangé avec 2 μ L d'APTS et 10 μ L de cyanoborohydrure de sodium fraîchement préparé. L'échantillon a par la suite été centrifugé et chauffé à une température constante de 75°C pendant 3 h et la réaction a été arrêtée avec l'ajout d'eau Milli-Q, jusqu'à obtention de la concentration désirée.

3.4.2 Réaction de marquage avec l'AA-Ac

La procédure de marquage avec l'AA-Ac a été inspirée du travail de Charlwood *et al.* [48] en y apportant une modification. Une première solution d'acide acétique 15% dans le DMSO a été préparée. Des volumes de 200 μ L de ce mélange ont été utilisés séparément pour dissoudre 12,5 mg de NaBH₃CN et 2,5 mg d'AA-Ac. Le milieu réactionnel a été préparé en mélangeant 10 μ L d'oligosaccharides de concentration de 10 mg/mL avec 10 μ L de la solution NaBH₃CN et 10 μ L de la solution AA-Ac. Par la suite, le mélange a été chauffé à 80°C pendant 30 minutes. Afin d'assurer un marquage totale des oligomères avec le fluorophore, le milieu réactionnel a été mélangé et chauffé à une température de 75°C pendant une heure et demie. La réaction a été quenchée avec l'ajout d'eau Milli-Q, jusqu'à obtention de la concentration désirée.

3.4.3 Réaction de marquage avec la PHN

En ce qui concerne le marquage des oligosaccharides avec la PHN, la procédure de Lattova et Perreault [49, 53] a été employée avec certaines modifications. Une solution de 200 μ L d'oligosaccharides de concentration de 10 mg/mL a été mélangée avec 10 μ L de PHN pure. Le mélange a été chauffé pendant 1 h à température constante de 80°C et l'arrêt de la réaction a été effectué en plaçant l'échantillon au congélateur à une température de -20°C. L'échantillon a été dilué dans l'eau pure, jusqu'à obtention de la concentration désirée pour chaque analyse. Ne connaissant pas la concentration molaire des oligosaccharides, il a été difficile de connaître la quantité de PHN à ajouter, afin qu'elle soit en excès.

3.5 Séparation par CE des produits de digestion enzymatique

3.5.1 Préparation des solutions tampons

La solution tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3.0 a été préparée avec du $C_2H_3O_2NH_4$ et du $C_2H_3O_2H$ 17M. Le tampon tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5 a été préparé avec du $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ et du H_3BO_3 . Les solutions tampons phosphate de sodium 50 mM aux pH 2.5 et 2.9 et celles aux différentes concentrations ont été préparées avec du H_3PO_4 et du NaH_2PO_4 . Le phosphate de sodium 50 mM aux pH 6.6, 7.0 et 8.3 ont été préparés avec du NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 . Toutes les solutions tampons ont été préparées dans l'eau pure Milli-Q et filtrées avec des filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2 μm .

3.5.2 Instrumentation et méthode

L'instrument de CE qui a été utilisé est le *P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System* de la compagnie Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), contrôlé par le logiciel 32 Karat (version 5.0), de la même compagnie. Le capillaire de silice fondue qui a été utilisé tout au long du projet possède une longueur totale de 60 cm et une longueur au détecteur de 50 cm, le diamètre interne étant de 50 μm et le diamètre externe de 360 μm . La détection a été faite avec deux différents détecteurs provenant de la même compagnie. Le premier détecteur qui a été utilisé est un laser d'ions d'argon de 3 mW possédant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre d'émission de 520 nm. Le second détecteur qui a été utilisé est un détecteur d'absorption UV ayant des filtres optiques permettant de détecter à quatre longueurs d'onde différentes : 200, 214, 254 et 280 nm. La détection des produits de digestion enzymatique a été testée à ces différentes longueurs d'onde et les résultats se retrouvent au chapitre suivant.

Avant chaque analyse, le capillaire a été nettoyé avec du NaOH 0.1 M, de l'eau pure Milli-Q et le tampon de séparation. Les injections qui ont été effectuées sont de type hydrodynamique. L'échantillon a été injecté pendant 10 secondes à une pression de 0.5 psi, correspondant à un volume d'injection de 1 nL. L'optimisation de la

séparation a été effectuée en variant le voltage de séparation, ainsi qu'en testant plusieurs tampons à concentrations et pH différents. Les résultats sont spécifiés dans le chapitre suivant.

3.6 Séparation par HPLC des produits de digestion enzymatique

3.6.1 Instrumentation et méthode

L'appareillage HPLC qui a été utilisé est un système *Agilent Chemstation 1200 Series* de la compagnie Agilent (Santa Clara, CA, USA), contrôlé par le logiciel HP ChemStation (version B.04.01), de la même compagnie et muni d'un détecteur d'absorption DAD permettant de balayer des longueurs d'onde entre 200 et 800 nm. L'injection a été automatisée et le volume d'injection a été programmé à 10 μ L. Trois colonnes ont été utilisées pour la séparation des produits de digestion enzymatique. La première colonne a été munie d'une phase stationnaire C_{18} , *Supelcosil LC-318*, de la compagnie *Phenomenex* (Madrid, CA, USA), 250 x 4.6 mm, dont le diamètre des particules est 5 μ m. Les deux autres colonnes ont été munies des phases stationnaires CN et NH_2 de la même compagnie, 150 x 4.6 mm. Ces dernières ont été utilisées en mode HILIC. Afin d'optimiser la séparation, les éluions en mode isocratique et en mode gradient ont tous deux été testées. La séparation a été effectuée avec différents éluants, soit ACN:H₂O et MeOH:H₂O, tout en variant la polarité de ce dernier, selon le ratio solvant:eau. Différents débits d'éluion ont aussi été testés : 0.3, 0.5, 1.0 et 1.5 mL/min. Les résultats permettant les meilleures séparations se retrouvent dans le chapitre suivant.

Avant chaque analyse, la colonne a été rincée avec l'éluant utilisé en appliquant un débit de 1.5 mL/min pendant une durée d'environ quinze minutes, afin de faire sortir de la colonne toutes les composantes de la séparation précédente.

4 Résultats et discussion

Au cours de ce projet, les divers paramètres de la digestion, du marquage et de la séparation par CE ont été étudiés en même temps. Les études concernant l'hydrolyse acide et la digestion enzymatique sont présentées dans les sections 4.1 et 4.2 respectivement. Le choix de l'agent fluorescent de marquage pour la détection LIF, ainsi que les paramètres étudiés pour la séparation par CE sont présentés dans les sections 4.3 et 4.4. Les analyses CE de différents blancs, ainsi que des produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose sont présentées dans la section 4.5. La section 4.6 présente les différentes études effectuées concernant la digestion enzymatique partielle des dérivés de cellulose. Enfin, il est important de mentionner que durant l'étude du projet, le détecteur LIF ne fonctionnait plus pendant un certain temps. Ainsi, quelques analyses ont été effectuées avec le détecteur UV.

4.1 Hydrolyse acide

Deux approches ont été utilisées pour couper le long polymère de dérivé de cellulose en plus petits oligosaccharides, la première étant la digestion acide et la seconde, la digestion enzymatique. Plusieurs études précédentes [2, 11, 13, 43] ont démontrées l'application de l'hydrolyse acide, afin de couper un long polymère en chaînes de masses et de longueurs plus petites. Cependant, l'acétolyse est surtout utilisée pour une digestion complète, puisque très rapidement, en présence d'un acide fort, le long polymère est coupé en unité de glucose. Il est donc très difficile de contrôler la cinétique de cette réaction.

Divers acides peuvent être utilisés, mais dans notre cas, c'est le TFA qui a été employé. Les échantillons de CMC ont été préparés ayant une concentration massique de 10mg/mL dans le TFA 2M. D'après l'électrophorégramme correspondant (Fig 4.1 a), un pic dédoublé et mal séparé aux environs de 6 min a été observé. Ces pics pourraient correspondre au glucose marqué à l'APTS, ainsi qu'à l'excès d'APTS présent dans l'échantillon. D'autres signaux sont observés à proximité de 10 min, qui pourraient être reliés à d'autres produits générés lors de l'hydrolyse, tel que le carboxyméthylglucose, mais vu leurs très faibles intensités, il est difficile de confirmer si ce sont des produits d'intérêts ou des impuretés.

Afin de vérifier la reproductibilité de l'hydrolyse acide, deux autres aliquots ont été préparés, hydrolysés, marqués et analysés par CE-LIF. D'après les électrophorégrammes 4.1 b et c, l'analyse des échantillons permet de confirmer la reproductibilité de la réaction d'hydrolyse acide, puisque les mêmes pics sont observés avec de légères différences des temps de migrations et avec des intensités semblables. Puisque l'acétolyse permet une hydrolyse complète et que notre intérêt est de procéder à une hydrolyse partielle, la seconde approche a donc été étudiée, optimisée et employée pour la suite du projet.

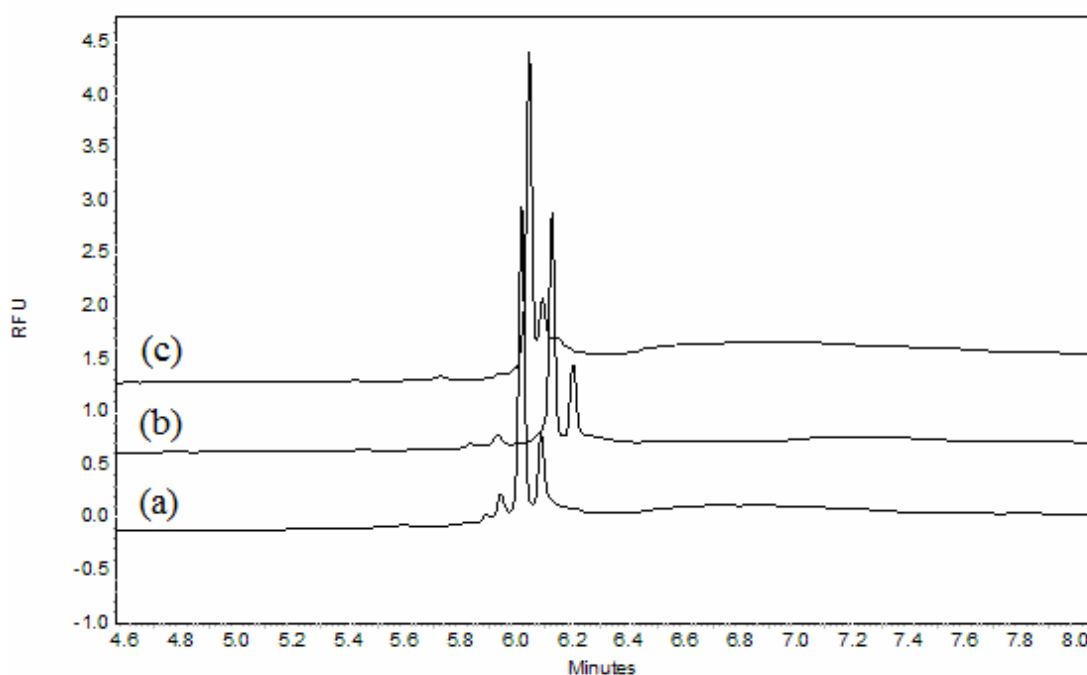


Figure 4.1 : Électrophorégrammes des produits de l'hydrolyse acide avec le TFA de trois différents échantillons de CMC, marqués avec l'APTS. Les séparations ont été effectuées sur une même journée dans un tampon tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5 avec un voltage de 25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{ex} de 488 nm.

4.2 Digestion enzymatique

Lors de la digestion enzymatique, c'est une enzyme qui permet de couper le long polymère en plus courtes chaînes d'unités de glucose. La plupart des journaux littéraires s'intéressent au mécanisme et à la cinétique de la dégradation enzymatique [65]. Cette approche permet une plus grande spécificité que l'hydrolyse

acide, puisqu'il est possible de contrôler la concentration de substrat, d'enzyme et le temps d'hydrolyse. Les cellulases sont les enzymes qui permettent la décomposition de la cellulose en unités de glucose. Il existe plusieurs cellulases, alors le choix de cette dernière est basé sur le nombre d'unités d'activité (U) par mg de solide. Une unité correspond à 1.0 μmol de cellulose transformé en glucose en une heure à pH 5.0 et à 37°C. Lors de notre projet, c'est une cellulase provenant de la souche *Trichoderma reesei* ATCC 26921 et possédant 6 U/mg de solide qui a été employée. Puisque notre objectif est d'obtenir une empreinte des oligosaccharides, une digestion jusqu'à obtention des unités de glucose est à éviter.

Afin d'étudier l'efficacité et la spécificité de la digestion enzymatique, quatre échantillons de CMC ont été préparés dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 et digérés pendant 3 jours à la température de la pièce, la concentration de substrat et d'enzyme étant de 1mg/mL. Tout d'abord, comparativement à l'hydrolyse acide, la digestion enzymatique génère plus de pics ayant des intensités plus élevées et ce, même si la concentration massique de CMC dans l'échantillon est plus petite que lors de l'hydrolyse acide. De plus, un pic saturé à environ 14 min est observé à la figure 4.2, correspondant à l'excès d'APTS qui n'a pas réagit avec les produits de digestion. Enfin, l'analyse des quatre échantillons conduit à des électrophorogrammes ayant une allure assez similaire, même si quelques pics sont observés avec des intensités un peu différentes. Ceci signifie que les mêmes produits sont générés et donc que la dépolymérisation enzymatique se produit de façon assez reproductible pour notre étude.

Puisque la présence d'enzyme dans l'échantillon permet une meilleure digestion des dérivés cellulosiques, cette approche a été utilisée au cours du projet en étudiant les différents paramètres.

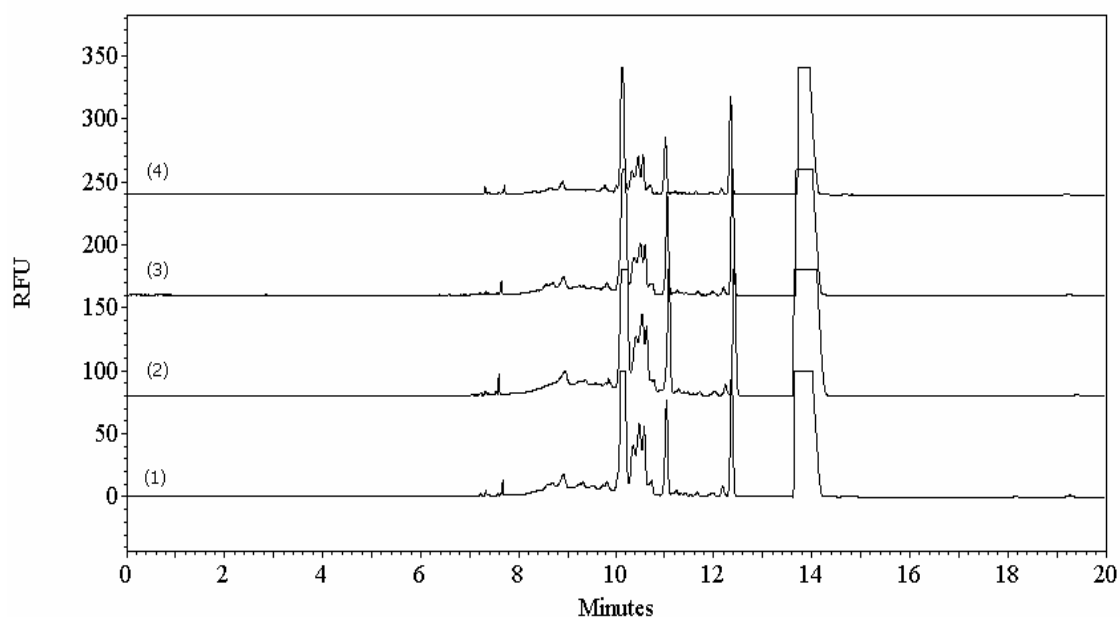


Figure 4.2 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique pendant 3 jours à la température de la pièce, de quatre différents échantillons de CMC, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.1.

4.3 *Choix du fluorophore pour la détection LIF*

L'APTS est l'agent fluorescent qui est souvent utilisé pour le marquage des sucres. Dans notre groupe de recherche, il a été utilisé auparavant pour le marquage des chitosanes et chitines, des oligomères à base de glucosamines acétylés [34]. Ces derniers n'étant pas chargés, il a fallu les marquer avec un fluorophore portant des charges, permettant la séparation par CE. Puisque le CMC possède une charge négative, un fluorophore ne portant aucune charge, l'AA-Ac, a été testé en parallèle avec l'utilisation de l'APTS. Deux échantillons de CMC ont été digérés avec l'enzyme dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 pendant 3 jours à la température de la pièce avec une proportion substrat sur enzyme (S/E) de 1/2. Le premier échantillon a été marqué avec l'APTS et le second avec l'AA-Ac.

On peut remarquer qu'une meilleure détection et une meilleure séparation sont observées lorsque l'APTS sert d'agent fluorescent de marquage (Fig 4.3). Avec

l'utilisation de l'AA-Ac, les produits de digestion enzymatique ne sont pas bien dispersés, ils sortent tous en même temps, tandis qu'avec l'utilisation de l'APTS, les pics sont bien étalés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les oligosaccharides libérés par l'enzyme ne sont pas tous chargés et que l'AA-Ac ne leur apporte aucune charge supplémentaire, d'où la mauvaise séparation. La vitesse d'élution des produits est très proche au flux électroosmotique. L'APTS ajoute aux oligosaccharides trois charges négatives, provenant des groupements sulfonates, leurs permettant d'être mieux séparés les uns des autres. De plus, il semblerait que l'APTS permet une meilleure fluorescence des oligosaccharides que l'AA-Ac. Ceci est observé par l'intensité des pics des différents produits, qui est plus élevé lorsqu'ils sont marqués avec l'APTS. Une étude poussée sur le rendement du marquage n'a pas été effectuée, mais à première vue, il semblerait qu'il soit plus faible pour l'AA-Ac. En somme, la détection et la séparation des produits de dépolymérisation enzymatique sont facilitées par leur marquage avec l'APTS.

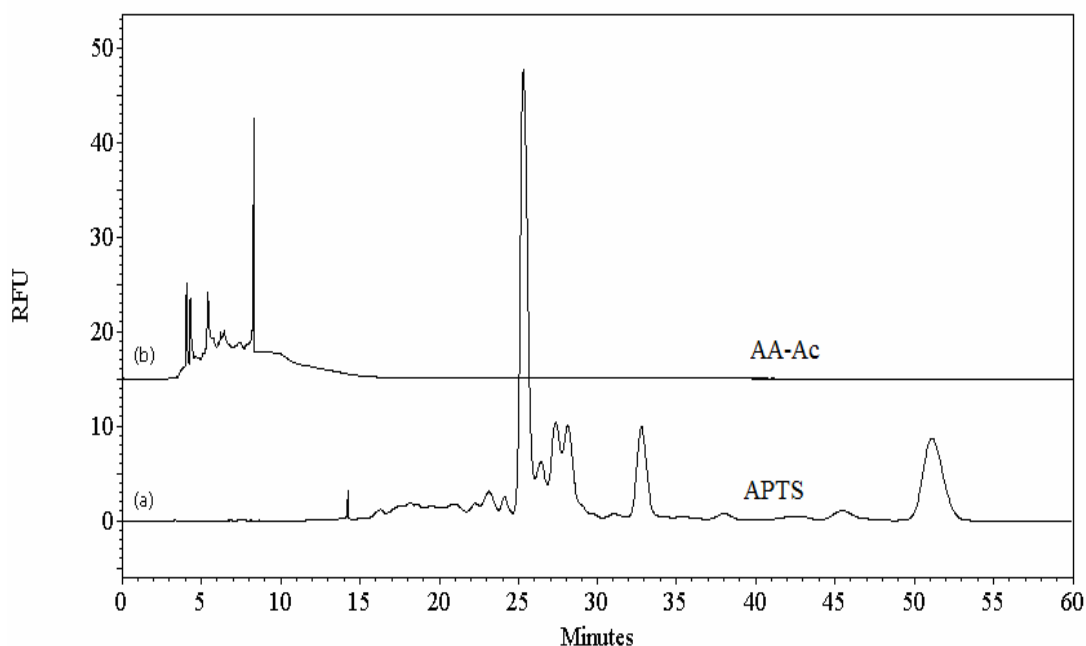


Figure 4.3 : Électrophorogrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à la température de la pièce, avec un ratio S/E de 1/2 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec a) l'APTS et b) l'AA-Ac. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.1.

4.4 Étude des paramètres de la séparation CE des produits de digestion enzymatique

4.4.1 Choix du tampon de séparation

La séparation des glucides se fait généralement avec le tampon tétraborate de sodium, afin qu'il y ait complexation entre le borate et l'oligosaccharide. L'utilisation du borate a pour effet d'augmenter la qualité de la séparation et ce, par apport d'une charge négative au glucide. Dans le cas de la séparation des produits oligosaccharides de digestion enzymatique du CMC, le tampon borate a été utilisé au cours de plusieurs mois. Cependant, son utilisation n'était pas nécessaire, puisque les oligosaccharides étaient préalablement marqués avec l'APTS et donc chargés. Le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 a donc été testé, afin de comparer son efficacité par rapport au tétraborate de sodium.

Tout d'abord, la séparation avec le tétraborate de sodium à polarité normale, ne semble pas être très bien réussie, puisque seuls quelques pics sont observés, ayant de faibles intensités (Fig 4.4a). Théoriquement, le pH élevé du tampon tétraborate de sodium devrait permettre la migration de tous les analytes, puisque le flux électroosmotique serait élevé. Cependant, d'après les résultats obtenus, seuls quelques analytes ont migrés avec l'utilisation de ce tampon. On pourrait expliquer ces résultats par le fait que les oligosaccharides sont très chargés négativement. En effet, les oligosaccharides de CMC peuvent être chargés -1, l'APTS contribue à trois charges négatives et le borate à une charge négative. La contribution de ces charges négatives, retarde la migration des oligosaccharides, même si le flux électroosmotique est élevé. C'est pour cette raison qu'après 20 min d'analyse, seuls quelques produits de digestion enzymatique sont observés.

En ce qui attrait l'utilisation du tampon phosphate de sodium à polarité inverse, il semble permettre une meilleure séparation des oligosaccharides, puisqu'on observe la migration de plusieurs produits de digestion enzymatique, avec des intensités élevés (Fig 4.4b). Puisque le voltage appliqué est négatif, les oligosaccharides

anioniques migrent en premier, d'où leur sortie dans les quinze premières minutes. Ceci dit, la séparation des différents échantillons a été effectuée avec le tampon phosphate de sodium. Le seul inconvénient de l'utilisation du tampon phosphate de sodium est l'élution des produits secondaires de dégradation d'APTS (de 4.5 à 6.1 min sur la Fig 4.4b), le marqueur fluorescent qui est ajouté en excès dans la réaction de marquage. L'identification des produits secondaires de dégradation d'APTS sur les différents électrophorégrammes a été effectuée à partir des électrophorégrammes de différents blancs, qui seront montrés plus tard.

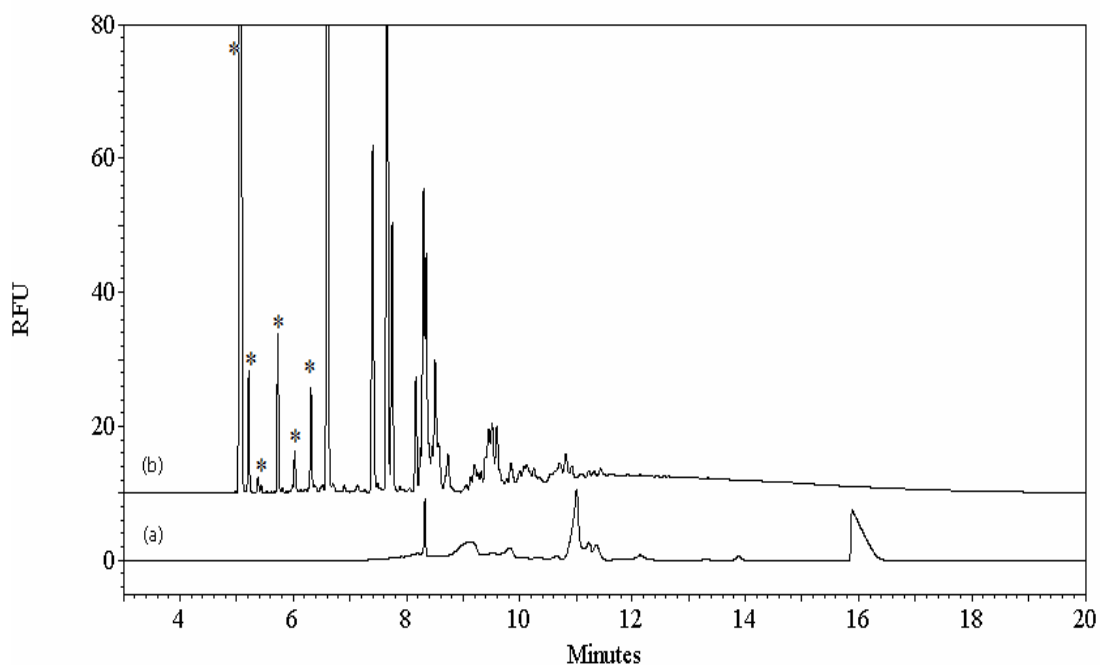


Figure 4.4 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 2 heures à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans a) tampon tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5 avec un voltage de 25 kV et b) tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{ex} de 488 nm. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

4.4.2 Étude des blancs de digestion

Sachant que l'APTS ne réagit guère avec le tampon acétate de sodium et avec l'enzyme, puisqu'ils ne possèdent aucune fonction aldéhyde, des échantillons de blanc ont été préparés en absence de substrat de départ (CMC ou HEC). Le premier

blanc correspond à l'enzyme dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 et le second blanc correspond seulement à l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0. Ces deux échantillons de blanc ont été chauffés à 37°C pendant 3 jours. Même si aucune réaction de marquage n'est possible entre l'APTS et ces blancs, ils ont quand même été chauffés en présence d'APTS et analysés par LIF. Sur la figure 4.5, on peut voir que les électrophorégrammes de l'enzyme sans substrat et de l'acétate de sodium tout seul sont similaires à ceux du CMC (Fig 4.7 a) et du HEC (Fig 4.8 a) de départ sans digestion enzymatique. En somme, on peut confirmer que les pics présents avant 6.5 min correspondent bel et bien aux produits de dégradation de l'APTS.

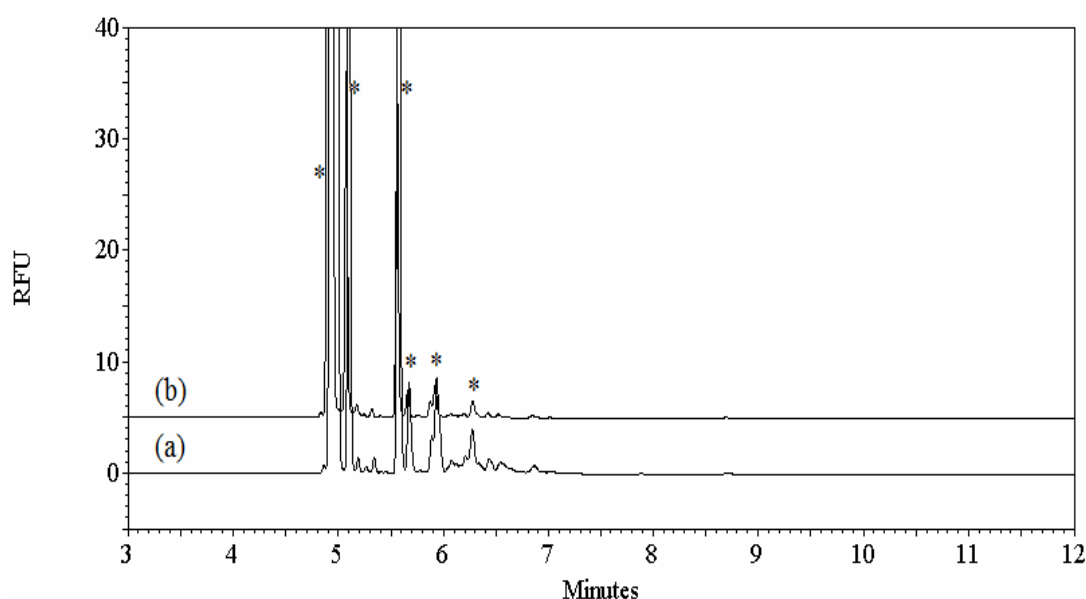


Figure 4.5 : Électrophorégrammes des blancs de a) l'enzyme dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 et b) l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, chauffés à 37°C pendant 3 jours et mis en contact avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

4.4.3 Choix de la concentration du tampon de séparation

La concentration du tampon de séparation est aussi un paramètre important à prendre en considération, puisqu'elle a un effet sur le flux électroosmotique. En effet, plus la force ionique du tampon est élevée, plus la double couche électrique à la paroi du capillaire est compressée, ce qui diminue le flux électroosmotique et retarde la

migration des oligosaccharides. Les produits de digestion enzymatique du CMC marqués avec l'APTS ont été séparés avec différentes concentrations de tampons phosphate de sodium à pH 2.9. La figure 4.6 montre l'effet de la concentration sur la migration des produits obtenus suite à la digestion enzymatique du CMC pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0. Différents pics ont été assignés de 1 à 5, afin de faciliter l'explication des résultats. Les pics suivants n'ont pas été assignés, mais correspondent aux différents produits de digestion enzymatique.

En théorie, l'augmentation de la concentration du tampon de séparation entraîne une diminution du flux électroosmotique et donc une augmentation des temps de migration des analytes. C'est ce qui est observé à la figure 4.6 pour les premiers pics correspondants aux produits de dégradation de l'APTS et pour les différents autres analytes, lorsque la séparation a été effectuée à 30, 70 et 90 mM (Fig 4.6 a, c et d). Cependant, lorsque la séparation a été faite avec le phosphate 50 mM, un petit décalage de l'électrophorégramme est observé (Fig 4.6 b). En effet, les temps de migration des différents oligomères-APTS sont les plus élevés à cette concentration. Ces analyses ont été effectuées à maintes reprises et les mêmes résultats sont obtenus.

Le choix de la concentration du tampon a donc été effectué en étudiant la séparation des ions. D'après la figure suivante, un effet inexplicable est observé lorsque la séparation des oligomères-APTS a été effectuée à 50 mM (Fig 4.6 b). En effet, à cette concentration, on peut observer la présence de plus de pics, qui sont absents sur les autres électrophorégrammes. De plus, sur la figure 4.6 b, on peut voir que les pics no 1 et 2 ($t_m=4.8$ min) correspondant aux produits secondaires de l'APTS, ainsi que les pics no 4 et 5 ($t_m=7.2$ min) correspondant à deux différents oligomères-APTS semblent être bien résolus. Les séparations qui ont été effectuées à 30, 70 et 90 mM ne permettent pas de bien séparer ces pics. En somme, l'utilisation du tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 permet d'avoir la meilleure séparation de nos analytes, d'où son utilisation lors de ce projet.

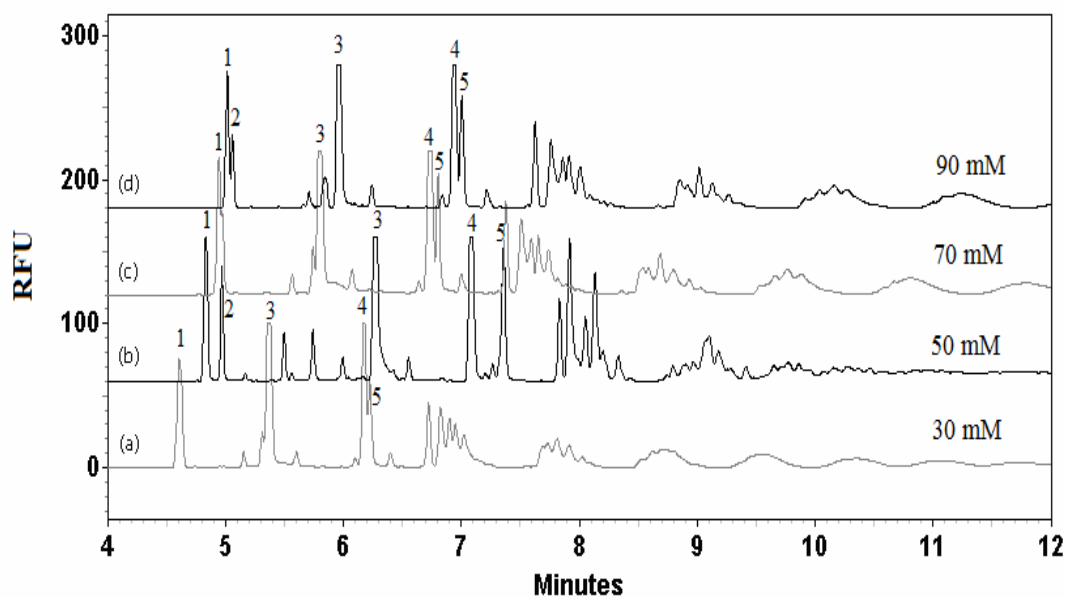


Figure 4.6 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium à pH 2.9 aux concentrations a) 30 mM, b) 50 mM, c) 70 mM et d) 90 mM avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée de la même façon qu'à la figure 4.4.

4.5 *Ordre de migration et séparation*

Afin de caractériser de façon qualitative les oligosaccharides obtenus, il était question de procéder à l'analyse des dérivés cellulosiques en absence et en présence d'enzyme, c'est-à-dire avant et après digestion enzymatique. Quatre échantillons ont donc été préparés et analysés : CMC et HEC, les deux sans dépolymérisation enzymatique mais marqués à l'APTS, et CMC et HEC avec digestion enzymatique et marqués au fluorophore. On peut voir sur les électrophorégrammes des figures 4.7a et 4.8a, que le CMC et l'HEC de départ (e.g. les substrats) possèdent la même allure que la figure 4.5. Ce résultat peut provenir de deux facteurs. En premier lieu, l'APTS n'a peut-être pas réagi avec les substrats de départ, puisque leur masse moléculaire est très élevée, alors seuls les pics correspondant aux produits secondaires de l'APTS sont observés sur les électrophorégrammes. En second lieu, l'APTS aurait réagi avec

les substrats de départ, mais puisque leur masse moléculaire est très élevée, leur temps de migration sera donc très grand, voire même qu'ils ne migreront peut-être pas. En effet, une analyse de ces échantillons a été effectuée pendant 90 min et aucun pic supplémentaire n'a été observé. Il est donc aisé d'affirmer que les pics observés sur ces électrophorégrammes correspondent aux produits de dégradation de l'APTS.

En comparant les analyses effectuées des échantillons CMC (Fig 4.7a et b) et HEC (Fig 4.8a et b) avant et après digestion enzymatique, on peut observer la présence des mêmes pics avant 6.5 min, correspondant aux pics d'APTS. Cependant, au delà de ce temps, plusieurs pics d'intensités élevées sont observés sur les électrophorégrammes des figures 4.7b et 4.8b. Ces pics correspondent aux produits générés par l'enzyme, c'est-à-dire aux oligosaccharides ayant différents degrés de polymérisation. Étant donné l'absence des standards correspondant aux différents degrés de polymérisation, seul le glucose-APTS (DP=1) a pu être assigné sur les électrophorégrammes. Ceci est fait grâce à l'analyse d'un échantillon de glucose individuel (Fig 4.9), traité de la même manière que le CMC et l'HEC.

Entamons maintenant l'analyse des produits finaux du CMC (Fig 4.7b) et de l'HEC (Fig 4.8b). L'APTS semble mieux réagir avec les produits enzymatiques du CMC, puisque les pics correspondants à ces produits, qui éluent entre 6.5 et 11 min, sont plus intenses que ceux de l'HEC. De plus, un pic à 7.2 min est perçu pour l'électrophorégramme des produits finaux du CMC, mais est absent pour l'HEC. Étant donné qu'il a une intensité élevée et qu'il ne correspond pas à un pic de glucose-APTS, l'hypothèse émise est qu'il pourrait représenter le maltose-APTS.

Il est important de discuter l'ordre de migration des différents oligosaccharides. Puisque la séparation a été effectuée à polarité inverse, les anions migrent en premier, suivis des composés neutres et positifs. Lors de ce projet, les biopolymères ont été marqués avec l'APTS, leur conférant 3 charges négatives par APTS. Il est faux de croire que tous les analytes possèdent le même nombre de charges négatives, puisque le groupement carboxyméthyle présent sur quelques unités de glucose anhydre

possède une charge négative. Ainsi, quelques oligomères libérés suite à la digestion enzymatique peuvent posséder ce groupement COO^- et suite au marquage avec l'APTS, seront chargés -4, -5, etc., tout dépendamment du nombre de modifications effectuées par le fournisseur, c'est-à-dire tout dépendamment du nombre de groupements COO^- présents sur leurs chaînes. L'ordre de migration est donc basé sur la masse et sur la charge de ces oligomères. Ceci dit, pour une charge donnée, un oligomère ayant une faible masse moléculaire, aura une plus grande mobilité électrophorétique qu'un oligomère de masse moléculaire plus élevée et sera par conséquent plus attiré vers l'anode.

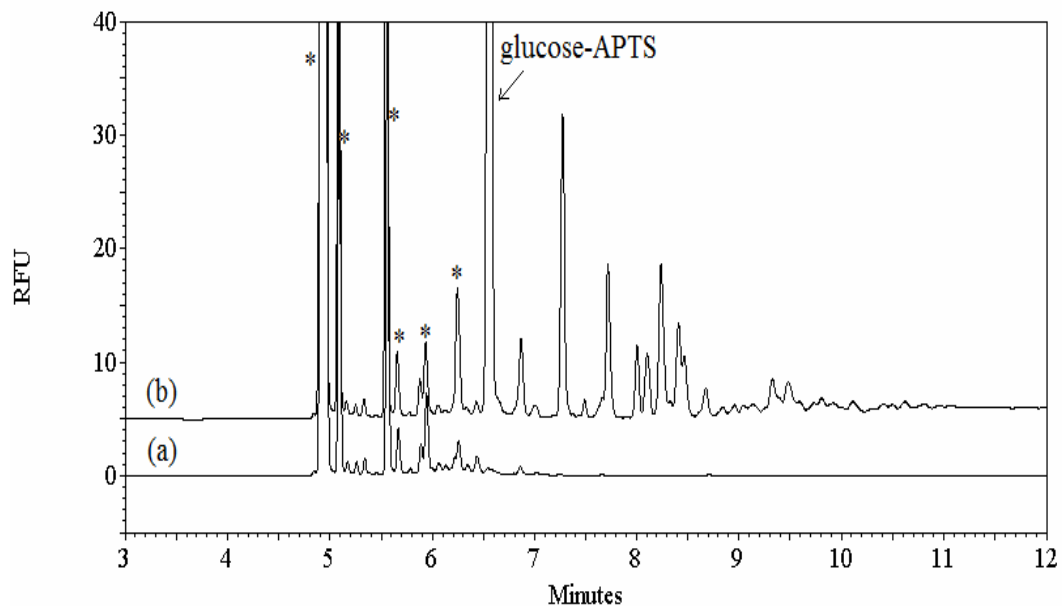


Figure 4.7: Électrophorégrammes de a) CMC de départ sans dépolymérisation et b) des produits de digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.5. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

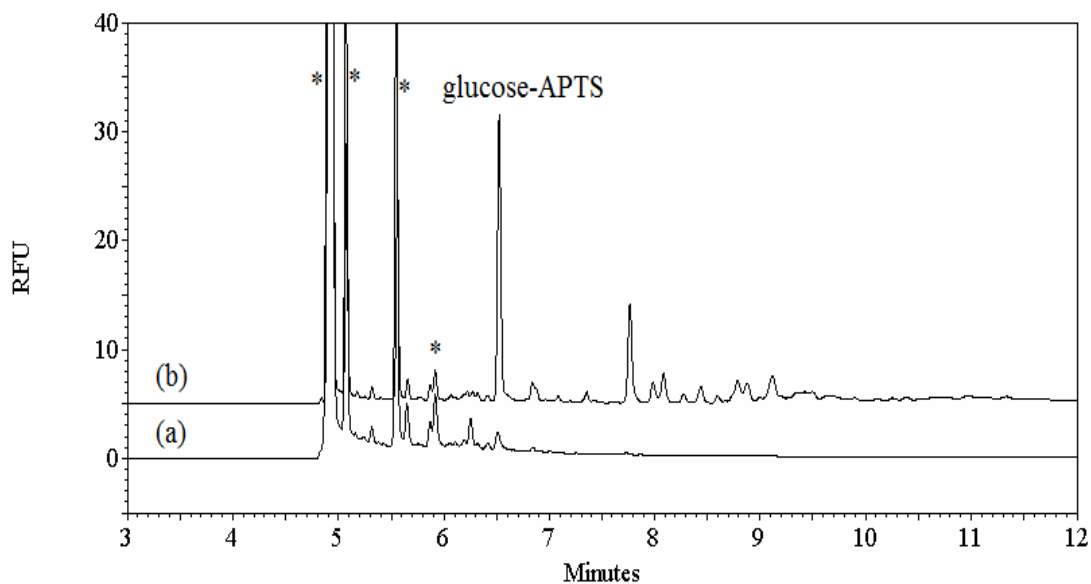


Figure 4.8 : Électrophorégrammes du a) HEC de départ sans dépolymérisation et b) des produits de digestion enzymatique du HEC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.5. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

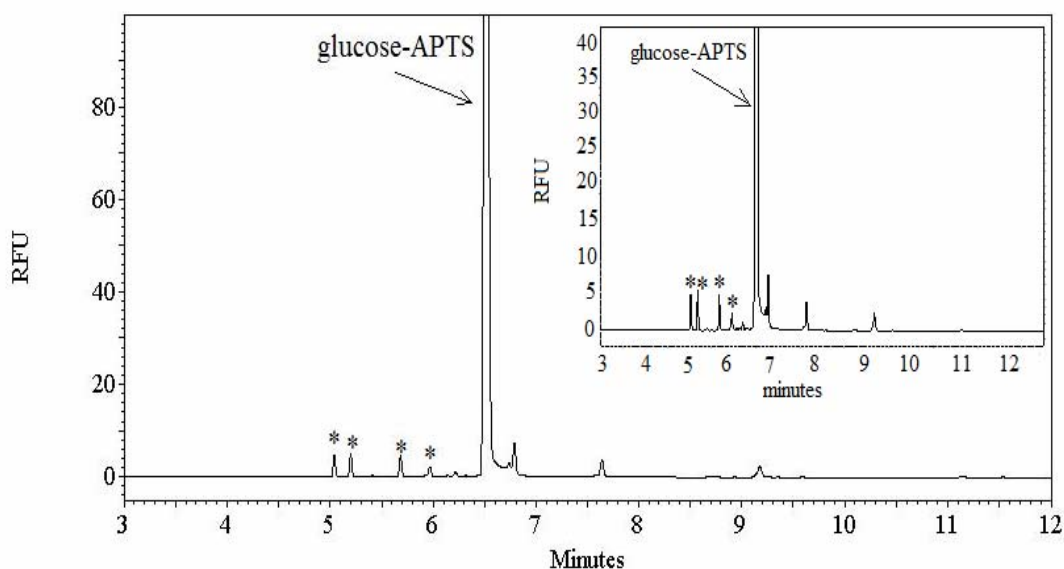


Figure 4.9 : Électrophorégramme du glucose dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 chauffé à 37°C pendant 3 jours et marqué avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.5.

4.6 Étude des paramètres de la digestion enzymatique

4.6.1 Temps de la digestion enzymatique

L'objectif du projet est d'obtenir un profil cartographique des produits de dépolymérisation enzymatique en effectuant une hydrolyse partielle. Le temps d'hydrolyse est déterminé tout dépendamment de la masse molaire des dérivés cellulosiques, ainsi que du rendement des produits de digestion obtenus. Bashir *et al.* [2] ont effectués une dépolymérisation enzymatique d'un acétate de cellulose ayant une masse molaire de 60 kDa pendant 36 heures. Pour leur part, Momcilovic *et al.* [3] ont fait réagir le CMC avec l'enzyme pendant plus de 4 jours. Pour des masses molaires atteignant 250 kDa, les chercheurs [12, 66, 67] ont effectués la digestion pendant 72 heures. Lors de ce projet, le CMC et le HEC ont été dépolymérisés à 37°C dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 avec un ratio S/E de 25/1 pendant 2, 4, 6 et 72 heures.

Pour les 4 durées de digestion étudiées, les mêmes pics sont observés (Fig 4.10), ce qui désigne que les mêmes produits de digestion sont générés. À la Fig 4.10d, il est possible de constater un décalage des temps de migrations des pics, par rapport aux trois autres électrophorégrammes (Fig 4.10 a, b et c), qui ont une allure très reproductible. Ce décalage peut être causé par l'augmentation de la force ionique ou par la diminution du flux électroosmotique. En effet, après 72 h de digestion, la nature de l'échantillon a beaucoup changé en ce qui concerne la force ionique, le pH, la viscosité, etc. et tous ces paramètres jouent un rôle pendant l'injection de l'échantillon en CE. On peut aussi constater sur les électrophorégrammes a, b et c, que le glucose-APTS migre plus tôt que prévu, tel que montré sur la figure 4.9. En effet, ces analyses n'ont pas tous été effectuées dans la même journée, d'où le déplacement de la fenêtre d'élution et le décalage des différents électrophorégrammes.

En se fiant aux pics numérotés de 1 à 5, qui représentent différents produits de digestion enzymatique du HEC, il est observé qu'après trois jours de dépolymérisation enzymatique, la hauteur des pics est plus élevée. Ceci signifie que la quantité des différents oligosaccharides, sans pouvoir les caractériser, est plus grande après trois jours de digestion enzymatique. La même tendance a été observée pour le CMC. Ces résultats semblent être logiques, puisque d'après les courbes cinétiques d'une réaction Michaelis-Menten, la concentration des produits augmente en fonction du temps. Puisque les masses molaires du CMC et du HEC sont très élevées, pouvant atteindre jusqu'à 1 MDa, la réaction ne semble pas être complète après 72 heures à 37°C. Si la réaction avait duré plus longtemps, la concentration des produits de digestion augmenterait jusqu'à un certain point critique et diminuerait. Ce point critique correspond à la conversion de tous les oligosaccharides en glucose. Dans notre cas, le temps d'hydrolyse permettant une digestion partielle, tout en ayant le meilleur rendement des produits de digestion enzymatique, semble être de 72 heures.

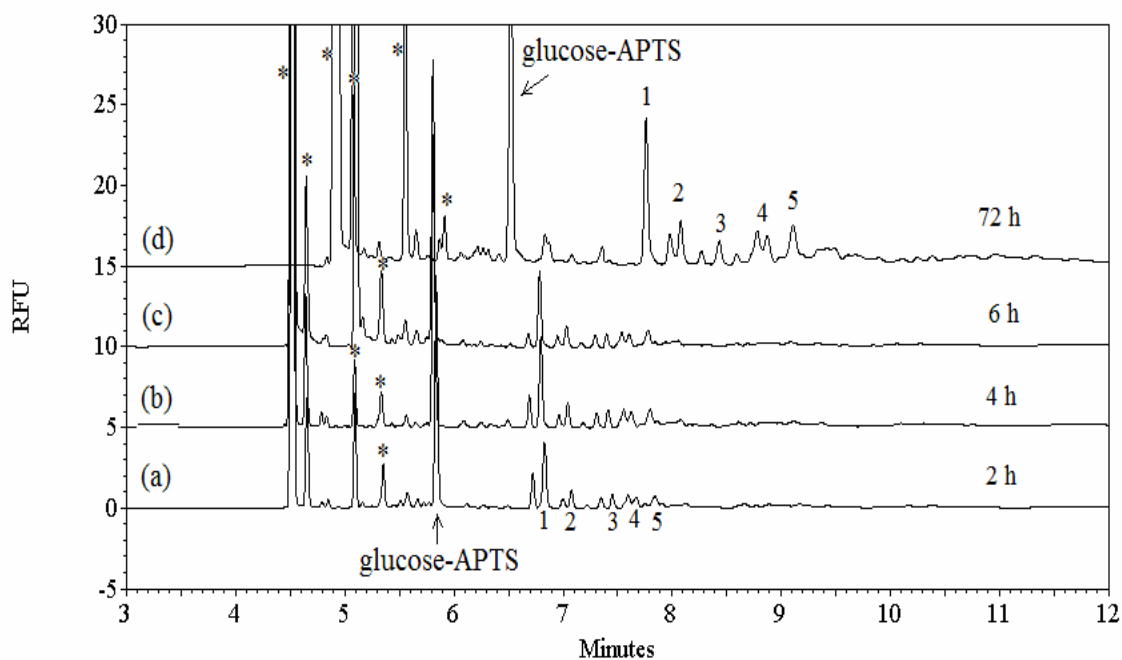


Figure 4.10 : Effet du temps sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du HEC effectuée à 37°C avec un ratio S/E de 25/1, pendant a) 2h, b) 4h, c) 6h et d) 72h et marqués avec l’APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu’à la figure 4.6. * : pics de fond provenant de l’excès d’APTS.

4.6.2 Température de la digestion enzymatique

La température du milieu réactionnel est un paramètre important à étudier, puisqu’elle est directement liée à la cinétique de la réaction. Afin d’étudier l’influence de ce paramètre, l’HEC préparé dans l’acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, a été digéré pendant trois jours avec un ratio S/E de 1/2 à deux températures différentes, soit : 22°C et 37°C. D’après les résultats, les mêmes produits sont générés dans les deux cas, puisque les mêmes pics sont présents sur les deux électrophorégrammes (Fig 4.11). Cependant, les pics sont plus intenses lorsque la réaction est produite à 37°C. Les mêmes résultats ont été obtenus pour le CMC. Théoriquement, la température à laquelle l’activité d’une enzyme est optimale, se trouve à être aux environs de 37-38°C. Même si à 37°C la cinétique de la réaction est la plus élevée, il est étonnant de voir qu’après 3j, la digestion enzymatique n’est pas complète, puisque

plusieurs produits sont observés (Fig 4.11 b). Si la réaction enzymatique avait été complète, seules les pics correspondant au glucose et au carboxyméthylglucose marqués avec l'APTS auraient été observés. L'étude de la digestion enzymatique à des températures plus élevées, telles que 50°C ou 80°C, n'a pas été nécessaire, puisqu'à ces températures, l'enzyme est dénaturée et ne permet aucune digestion. Encore une fois, le glucose-APTS migre plus tôt que 6.5 min, dû au décalage de la fenêtre d'éluion provenant du flux électroosmotique.

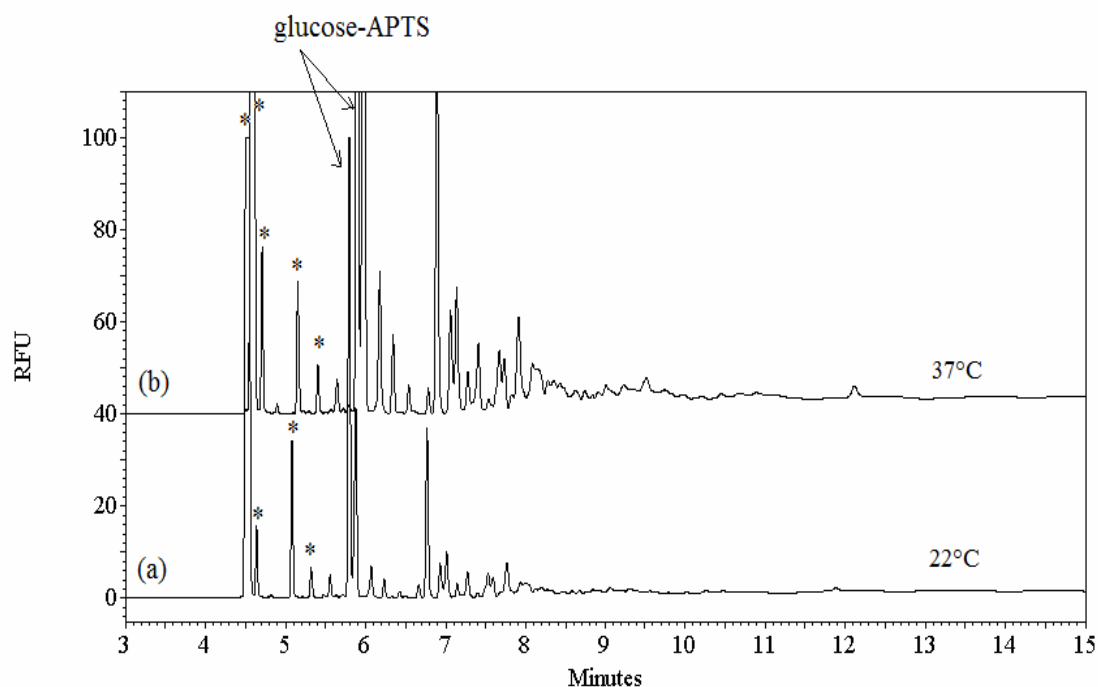


Figure 4.11 : Effet de la température sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du HEC pendant 3 jours avec un ratio S/E de 1/2, effectuées à a) 22°C et b) 37°C et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.6. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

4.6.3 Arrêt de la digestion enzymatique

L'ajout d'un inhibiteur enzymatique permet de diminuer la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme, en se fixant sur le site actif de cette dernière. Comme mentionné précédemment, la vitesse de réaction dépend aussi de la température et du pH de l'environnement réactionnel. Chacun de ces deux facteurs

possède une zone optimale dans laquelle la vitesse réactionnelle est la meilleure. En s'éloignant des zones optimums, l'enzyme devient dénaturée et inactive, ce qui entraîne l'arrêt de la réaction. Deux échantillons de CMC ont été préparés dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 pendant trois jours, à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1. La réaction enzymatique du premier aliquot a été arrêtée avec l'ajout de quelques gouttes de HCl 2 M, jusqu'à ce que le pH atteigne 2.0, tandis que l'arrêt de l'enzyme dans le second échantillon est produit en trempant l'échantillon dans un bain de glace jusqu'à ce que la température atteigne 0°C. L'échantillon est par la suite entreposé dans le congélateur à -20°C.

Lors de la diminution du pH du milieu avec l'ajout de quelques gouttes de HCl, seuls quelques pics sont observés (Fig 4.12 a), correspondant aux produits de dégradation de l'APTS. Aucun produit de digestion n'est perçu sur l'électrophorégramme correspondant. Cependant, en arrêtant la digestion enzymatique par diminution de la température de l'échantillon jusqu'à une température de -20°C, les produits générés lors de l'hydrolyse enzymatique sont observés (Fig 4.12 b). Suite à l'arrêt de la digestion enzymatique par diminution de pH, on pourrait croire que le marquage des oligomères avec l'APTS n'a pas été effectué, à cause de la présence de HCl dans le milieu. Cependant, la réaction de marquage avec l'APTS se fait nécessairement en milieu acide, alors la présence de HCl ne devrait pas empêcher la réaction de marquage entre le fluorophore et les oligomères. L'hypothèse émise est directement liée au système d'électrophorèse capillaire. L'ajout d'ions Cl⁻ dans le milieu réactionnel augmente la force ionique de l'échantillon et engendre la défocalisation des pics[46].

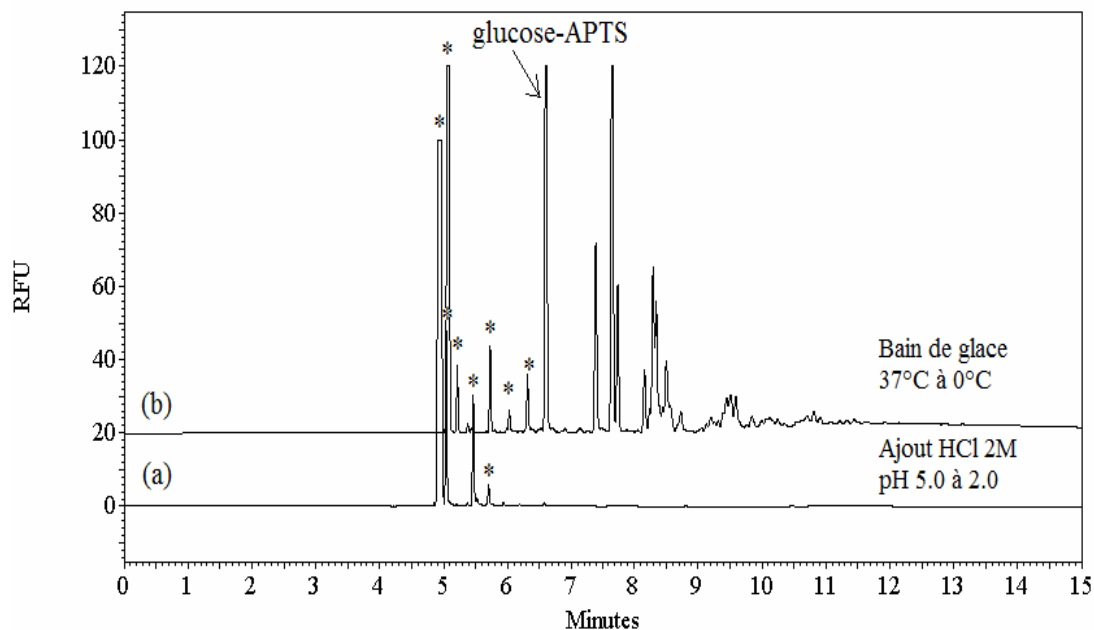


Figure 4.12 : Effet de la méthode d'arrêt de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0. Arrêt de la digestion par a) diminution du pH et b) diminution de la température du milieu. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.6. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

4.6.4 Choix du chromophore pour la détection UV

Pendant un certain moment, un problème est survenu avec le détecteur LIF, il a donc fallu effectuer les analyses en utilisant le détecteur UV. Kathalijne *et al.* [44] ont réussi à déterminer le degré de substitution du CMC par électrophorèse capillaire couplé d'un détecteur UV et ce, en absence de marquage avec un agent chromophore. En effet, ils ont pu détecter les produits de digestion enzymatique à une longueur d'onde de 196 nm.

La première approche qui a été étudiée lors de ce projet et la plus simple, a été l'analyse des produits de digestion enzymatique des dérivés celluloses et ce, sans marquage, malgré l'absence de fonctions chromophores sur ces derniers. Une longueur d'onde de 200 nm a été choisie. En se fiant sur la figure 4.13, on peut voir qu'aucun signal n'est observé sur l'électrophorégramme a. Ce résultat peut provenir

de deux facteurs. En premier lieu, sous leur forme non-marquée, les produits d'hydrolyse ne possèdent aucun agent chromophore, permettant d'absorber dans l'UV, d'où l'absence de pics. En second lieu, puisque quelques oligomères sont négatifs et d'autres sont neutres, tout dépendamment si des modifications sont présentes sur leurs chaînes ou non, et que le flux électroosmotique est nul à un pH de séparation de 2.9, alors un temps d'analyse de 15 min n'est pas suffisant pour faire migrer tous les analytes. Ceci dit, une séparation avec un temps d'analyse plus élevé en utilisant le même tampon peut être testée, afin de vérifier si la totalité des analytes vont migrer. De plus, l'utilisation d'un tampon de séparation ayant un pH plus élevé, tel que le tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5, permettrait peut-être d'observer la migration des analytes, puisqu'à ce pH, le flux électro-osmotique est élevé. L'échantillon sans marquage a par la suite été analysé avec le détecteur PDA, afin de déterminer la longueur d'onde d'absorbance maximale, mais aucun signal n'a été observé. Il a donc fallu déterminer quel chromophore permettait la meilleure détection des produits dépolymérisés. Motellier *et al.* [42] ont reporté une liste complète d'agents chromophores pour l'analyse de produits de dégradation de la cellulose par CE.

Les produits de dépolymérisation enzymatique marqués avec la phénylhydrazine (PHN) et l'APTS ont donc été analysés afin d'étudier l'effet du groupement chromophore sur la détection. En observant l'électrophorégramme b, des pics très minimes sont perçus, représentant quelques oligosaccharides-PHN. Cependant, l'intensité des pics laisse à croire que la détection est mauvaise lorsque les oligomères sont marqués avec la PHN. Puisque la PHN n'apporte aucune charge négative supplémentaire aux oligosaccharides, ces derniers sont soit faiblement chargés négatif, soit neutres. Ainsi, ils sont plus lents et par conséquent leur temps de migration est peut-être plus élevé. Encore une fois, une analyse plus longue ou l'utilisation d'un tampon de séparation ayant un pH plus élevé permettrait peut-être d'observer la migration des analytes marqués avec la PHN.

Enfin, des signaux plus intenses sont observés lorsque les analytes sont marqués avec l'APTS (Fig 4.13 c). Le marquage des analytes avec la PHN et l'APTS ne donnent pas le même effet, puisque l'APTS possède quatre cycles aromatiques dans son chromophore pouvant absorber fortement dans l'UV, tandis que la PHN n'en possède qu'un seul, ce qui ne facilite pas la détection en absorbance. Plus une molécule possède de groupements fonctionnels pouvant absorber dans l'UV, meilleure est sa détection à la longueur d'onde d'absorption maximale. Malgré le coût élevé de l'APTS, il a quand même été utilisé tout au long du projet, puisqu'il joue le double rôle de chromophore/fluorophore et de porteur de charges négatives.

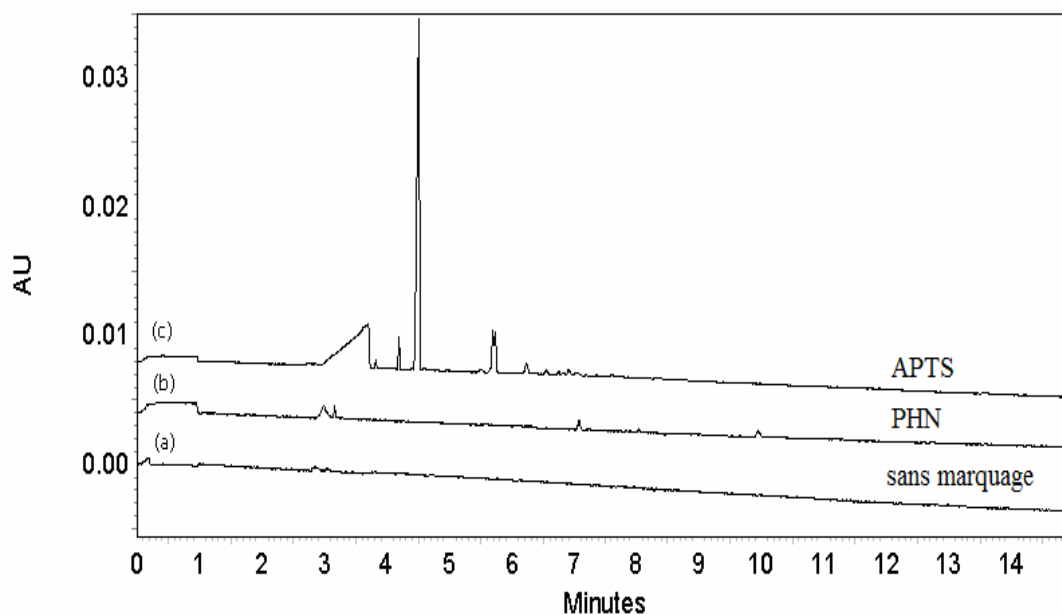


Figure 4.13 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 a) sans marquage, b) marqués avec la PHN et c) marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée avec le détecteur UV à une longueur d'onde de 200 nm.

4.6.5 Choix de la longueur d'onde de détection

Chaque groupement chromophore possède une longueur d'onde à laquelle son absorbance est maximale. La présence dans une molécule de plusieurs chromophores se traduit par une additivité des absorbances, ainsi qu'un effet bathochrome, c'est-à-

dire le déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde (plus basse énergie). Il a donc été question de déterminer la meilleure longueur d'onde d'absorbance des oligosaccharides-APTS parmi ceux du détecteur UV soit : 200, 214, 254 et 280 nm.

D'après la figure 4.14, il est possible de voir qu'en augmentant la longueur d'onde, l'intensité des pics diminue, voire même qu'ils disparaissent. Plus de produits d'hydrolyse sont observés à 200 nm, comparativement à l'électrophorégramme correspondant à une longueur d'onde de 280 nm. De plus, un pic intense entre 3 et 4 minutes est perçu qu'à une longueur de 200 nm et disparaît aux autres longueurs d'onde. Ce pic peut être associé à l'excès d'APTS dans l'échantillon.

Par la suite, le tableau I répertorie le ratio signal sur bruit, ainsi que la limite de détection et la limite de quantification du glucose-APTS présent dans l'échantillon de CMC suite à la digestion pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0. Le bruit a été déterminé par le pic-à-pic de la ligne de base entre 1 et 2 min. En général, on constate que le signal diminue avec l'augmentation de la longueur d'onde, mais cette dernière n'a aucun effet sur le bruit. Ainsi, le ratio signal sur bruit est le plus grand à 200 nm. À cette longueur d'onde, les limites de détection et de quantification du glucose-APTS sont respectivement de 0.10 et 0.33 mg/mL, tandis qu'à 280 nm, elles sont de 0.57 et 1.9 mg/mL, soit environ 6 fois plus élevé. En somme, d'après ces données, on peut affirmer que la longueur d'onde permettant la meilleure détection avec le système CE-UV disponible correspond à 200 nm.

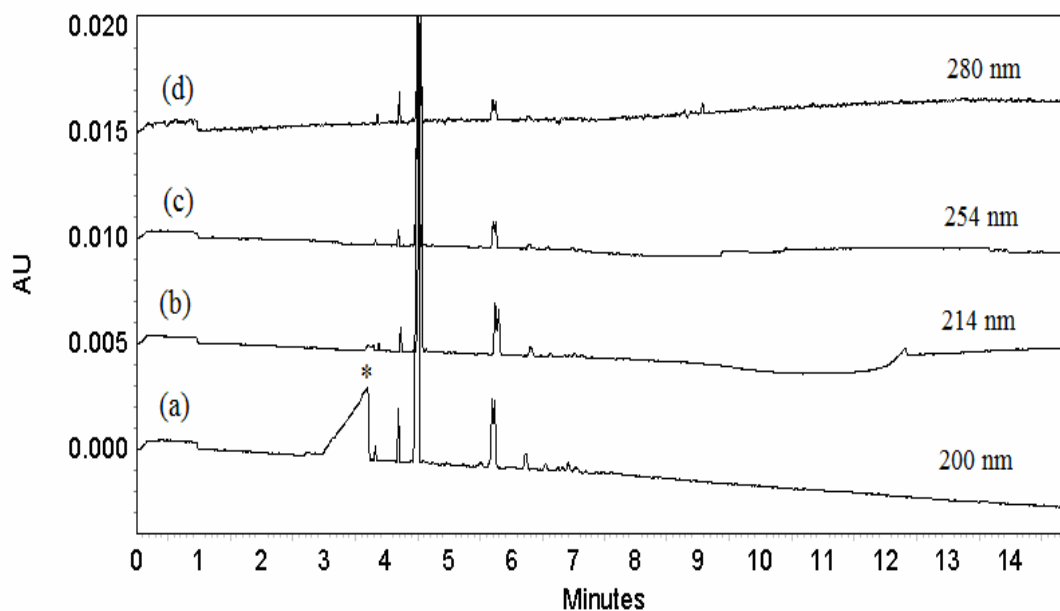


Figure 4.14 : Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C, avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée de la même façon qu'à la figure 4.13. La détection a été effectuée avec le détecteur UV à une longueur d'onde de a) 200 b) 214 c) 254 et d) 280 nm. * : pic de fond provenant de l'excès d'APTS.

Tableau I : Effet de la longueur d'onde d'absorbance sur le rapport signal (S) sur bruit (B), limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) du glucose-APTS présent dans un échantillon de CMC suite à une digestion enzymatique.

Longueur d'onde (nm)	S _{glucose} (u.a)	B _{1-2min} ^{a)} (u.a)	S/B	LOD _{glucose} ^{b)} (mg/mL)	LOQ _{glucose} ^{b)} (mg/mL)
200	0.0033	0.00018	18	0.10	0.33
214	0.0024	0.00014	17	0.11	0.37
254	0.0012	0.00014	8	0.23	0.77
280	0.00095	0.00029	3	0.57	1.9

a) Le bruit (B) a été déterminé par le pic-à-pic de la ligne de base entre 1 et 2 min.

b) La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées selon la méthode en annexe.

4.6.6 *Choix du milieu de la digestion enzymatique*

Le choix du milieu de l'hydrolyse se base sur la capacité du substrat et de l'enzyme à solubiliser dans cet environnement. La digestion enzymatique peut être effectuée dans une solution tampon, telle que l'acétate d'ammonium [12] et l'acétate de sodium [45] ou dans l'eau [66]. Sachant que les dérivés cellulosiques et l'enzyme sont solubles en milieu aqueux, l'HEC étant le moins soluble, la dépolymérisation enzymatique a été étudiée dans deux différents environnements, soit dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 et dans l'eau pure à pH 5.0. La digestion du CMC et du HEC a été effectuée à 37°C pendant 3 jours avec un ratio S/E de 25/1. Ces analyses ont été effectuées avec le détecteur UV, puisqu'un problème avec le détecteur LIF est survenu.

La figure 4.15, montre un agrandissement des électrophorégrammes du CMC de départ (Fig 4.15 a) et des produits de digestion obtenus dans l'eau pure Milli-Q (Fig 4.15 b). Seuls les pics d'intérêts ont été illustrés. Les mêmes pics sont observés sur les deux électrophorégrammes, avec des intensités égales, mais avec un léger décalage causé par le flux électroosmotique. Les mêmes tendances ont été observées pour l'HEC. Ces résultats démontrent que la digestion enzymatique n'a pas eu lieu dans l'eau pure, même après 3 jours, puisqu'aucun produit de dépolymérisation n'est observé. Malgré que le pH de l'eau pure soit égal à 5.0 et que l'intervalle d'activité de la cellulase utilisée lors de ce projet se situe entre 4.5 et 6.0, l'enzyme semble être inactive dans l'eau. L'effet d'une force ionique faible est observé. En effet, l'eau pourrait être à l'origine du gonflement de l'enzyme. Elle entourerait la cellulase pour l'empêcher d'être active.

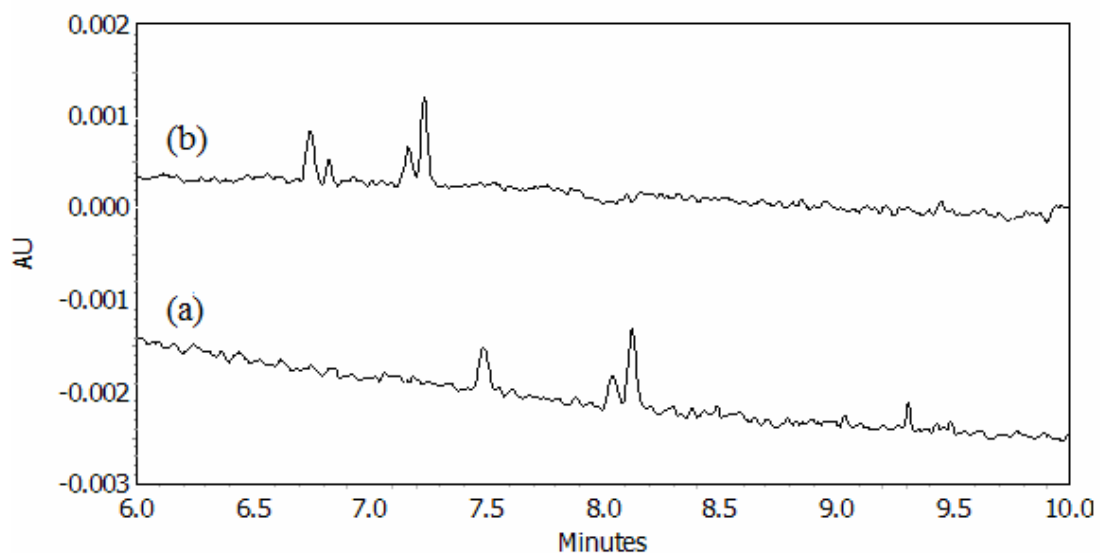


Figure 4.15 : Effet du milieu de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes du a) CMC de départ et b) des produits de la digestion enzymatique effectuée dans l'eau pure Milli-Q à pH 5.0 à 37°C pendant 3 jours avec un ratio S/E de 25/1 et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.13.

Pour ce qui est de la digestion enzymatique dans le tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5.0, une différence est observée entre les électrophorégrammes avant et après digestion enzymatique. À la Fig 4.16, on peut observer l'ajout de différents pics, à partir de 6 min, qui correspondent aux produits libérés par l'enzyme. Ceci permet de confirmer que l'enzyme est active en milieu tamponné. Les mêmes résultats ont été observés pour l'HEC. Une hypothèse a été posée qui stipule que la présence des ions acétate dans le milieu réactionnel pourrait influencer sur l'activité de l'enzyme et faciliterait la formation du complexe substrat-enzyme. En effet, la charge des ions dans le milieu réactionnel permettrait à l'enzyme de se fixer plus facilement au substrat. Une étude sur la force ionique du milieu réactionnel aurait pu être effectuée avec une solution de 50 mM de NaCl dans l'eau. Les analyses auraient permis de confirmer si la présence d'ions acétate est nécessaire, afin que la digestion enzymatique ait lieu. Cependant, dû au manque de temps, cette étude n'a pas été effectuée.

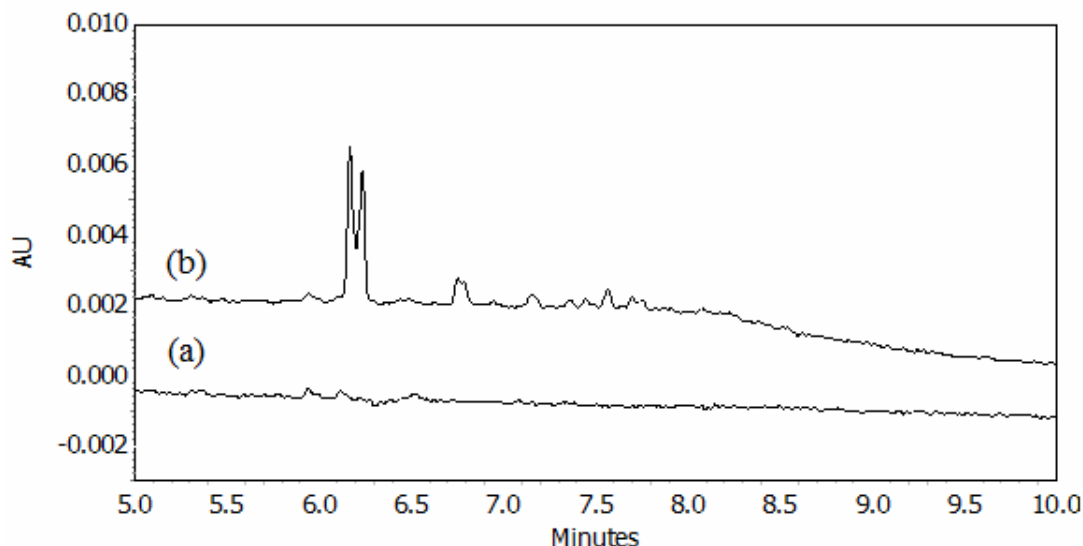


Figure 4.16 : Effet du milieu de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes du a) CMC de départ et b) des produits de la digestion enzymatique effectuée dans le tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 à 37°C pendant 3 jours avec un ratio S/E de 25/1 et marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.13.

4.6.7 Effet du pH du milieu de la digestion enzymatique

Le pH de l'environnement dans lequel se fait la réaction enzymatique a un effet direct sur la vitesse de réaction. Les enzymes, qui sont des protéines, possèdent des propriétés qui sont très sensibles aux variations de pH. À l'exception de quelques enzymes, telle que la pepsine qui possède une activité maximale à pH 2.0, la majorité des enzymes sont actives dans un intervalle de pH se situant entre 5 et 9. Aux pH très acides et très basiques, elles deviennent inactives. D'après le fournisseur, la cellulase *Trichoderma reesei* ATCC 26921 utilisée lors de ce projet possède un intervalle de pH allant de 4.5 à 6.0, pour une activité maximale. La digestion du CMC dans l'acétate de sodium 50 mM pendant trois jours à la température de la pièce avec un ratio S/E de 25/1 a donc été effectuée aux pH 4.5, 5.0, 5.5 et 6.0, afin d'étudier l'effet du pH du milieu de digestion enzymatique.

Les résultats obtenus (Fig 4.17) démontrent que l'augmentation du pH réactionnel résulte en l'augmentation du nombre de pics et de l'intensité de ces

derniers. En effet, plus le pH est élevé, plus de produits dépolymérisés sont observés et leur concentration est plus élevée. À partir de 8 min, différents produits sont formés lorsque l'environnement de la réaction possède un pH de 6.0. Ainsi, à ce pH, la réaction est assez rapide, sans qu'elle soit complète, provoquant ainsi une libération de plusieurs oligosaccharides divers.

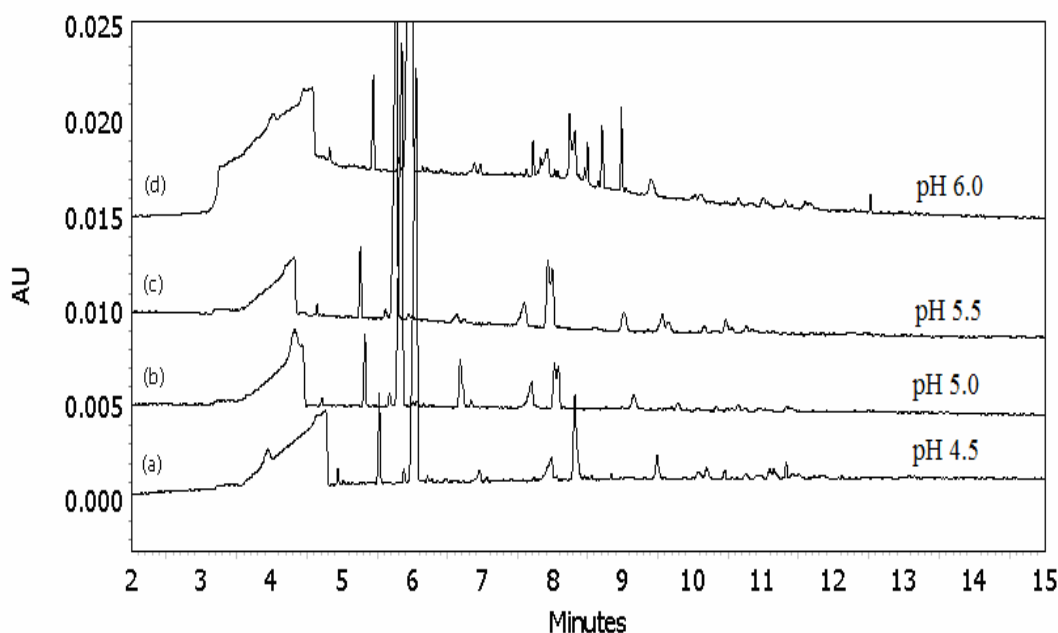


Figure 4.17 : Effet du pH du milieu de la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC digéré pendant 3 jours à TP avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM aux pH a) 4.5, b) 5.0, c) 5.5 et d) 6.0. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.13.

4.6.8 Effet du ratio substrat sur enzyme (S/E)

Lors d'une réaction entre un substrat et une enzyme, cette dernière sert de catalyseur qui permet d'accélérer jusqu'à des millions de fois une réaction chimique. Quelle soit ajoutée en quantité basse ou élevée, cela n'a aucune importance pour qu'une réaction soit complète, mais la quantité d'enzyme joue un rôle important sur la vitesse de réaction. En effet, après avoir complexé avec une molécule de substrat, un produit est généré et l'enzyme est libérée. Cette même molécule d'enzyme peut complexer avec différentes molécules de substrats, tant et aussi longtemps qu'elle

n'est pas dénaturée dans l'échantillon. La quantité d'enzyme ajoutée dans un échantillon est généralement 20 fois moins que la quantité de substrat. Ne connaissant pas la masse molaire exacte de nos substrats et de l'enzyme, il a donc été difficile de déterminer les masses respectives à ajouter dans l'échantillon. Tout d'abord, différents ratios S/E ont été testés, tout en gardant la masse du substrat constante à 10 mg, afin d'étudier l'effet de la quantité d'enzyme ajoutée sur la digestion enzymatique. Quatre premiers échantillons de CMC ont été préparés en faisant varier la quantité d'enzyme comme suit : 2, 1, 0.5 et 0.4 mg. La réaction est effectuée dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 pendant trois jours à la température de la pièce [45, 68]. La séparation a été faite avec le même tampon à pH 8.5 que pour les études de l'hydrolyse acide. La détection a été effectuée en absorbance, due à la défektivité du détecteur LIF.

À partir des électrophorogrammes obtenus, la surface sous les pics de deux produits obtenus, sans pouvoir les caractériser, a été comparée pour les différents ratios S/E. La figure 4.18 démontre que la surface sous les pics augmente peu en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée à la réaction, mais non pas de façon linéaire. Ces résultats suivent la théorie correspondante aux enzymes, qui stipule que la vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la concentration d'enzyme [69]. Ainsi, lorsque la vitesse augmente, une plus grande quantité de produits est générée pour un intervalle de temps donné. Il est important de mentionner que les analyses ont été effectuées qu'une seule fois et il n'est donc pas possible de vérifier la reproductibilité de l'injection.

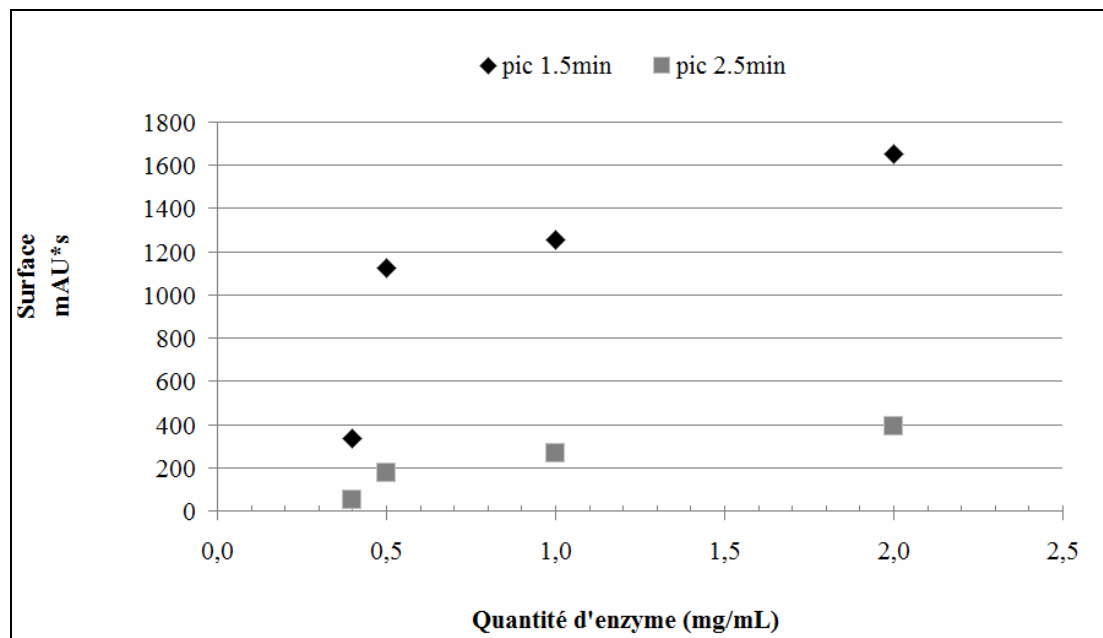


Figure 4.18: Surfaces sous deux pics des produits de digestion enzymatique (à 1.5 et 2.5 min) en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée à la réaction d'hydrolyse enzymatique du CMC, 10 mg/mL.

De plus, au cours de ce projet, les échantillons de CMC et HEC préalablement préparés dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 et digérés pendant 3 j à 37°C avec des ratios S/E de 25/1 et 1/2 ont été analysés par CE, afin d'être comparés. À ce moment, le détecteur qui a été utilisé est le LIF. La séparation a été faite dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9. Due à la multitude d'analyse à effectuer, les échantillons avec des ratios S/E de 5/1, 10/1 et 20/1 n'ont pas été analysés.

D'après les résultats correspondants, des produits de digestion enzymatique marqués avec l'APTS, il est possible de voir qu'avec un ratio S/E de 25/1, plusieurs pics sont observés ayant des intensités plus ou moins élevés (Fig 4.19 a). Cependant, en augmentant de 50 fois la concentration massique de l'enzyme, de nouveaux oligosaccharides sont observés et l'intensité des pics augmente fortement, correspondant à une dégradation plus élevée du CMC (Fig 4.19 b) et du HEC (Fig 4.20 b). Ceci dit, une augmentation de la quantité d'enzyme entraîne un meilleur

rendement du complexe substrat-enzyme et donc une plus grande production de produits d'hydrolyse. Puisque l'analyse CE-LIF a été effectuée à pH 2.9 et le voltage appliqué a été de -25 kV, les petits anions migrent en premier. Ainsi, les pics observés avant 6.5 min sur les électrophorégrammes 4.19a et 4.20a et ceux avant 5.6 min sur les électrophorégrammes 4.19b et 4.20b, correspondent aux produits secondaires de l'APTS et représentent les signaux de fond.

En comparant les électrophorégrammes obtenus pour le CMC et le HEC, il est possible de remarquer que l'intensité des signaux est légèrement plus élevée pour le CMC que pour le HEC. Ces différences en intensités peuvent provenir de deux sources, qui sont difficiles à vérifier individuellement. Tout d'abord, le CMC est plus soluble en milieu aqueux que le HEC. En effet, lorsque le HEC est ajouté à l'acétate de sodium, il n'est pas totalement dissout, mais prend plutôt une forme visqueuse. Les groupements hydroxyéthyles du HEC permettent la formation de plus de liaisons hydrogènes que les groupements carboxyméthyles du CMC, ce qui rend le HEC moins soluble que le CMC. Après traitement enzymatique, la solubilité du HEC augmente et la solution devient moins visqueuse. Ceci dit, une plus petite quantité de HEC réagit avec l'enzyme, ce qui engendre la formation de moins de produits de digestion enzymatique. Aussi, le mécanisme d'action de l'enzyme n'est pas connu. En milieu gélatineux, elle n'est peut-être pas fonctionnelle à 100%. La seconde hypothèse stipule que les oligosaccharides du HEC sont moins facile à marquer avec l'APTS que les oligosaccharides du CMC, d'où la présence de pics moins intenses à la Fig 4.20. Les mécanismes trouvés jusqu'à aujourd'hui concernant le marquage avec l'APTS démontrent tous une réaction entre la fonction aldéhyde de l'oligosaccharide et la fonction amine de l'agent de marquage. Cependant, aucune étude n'a révélé sur la préférence de l'agent de marquage envers un certain analyte. Un test pourrait donc être effectué en utilisant un autre fluorophore que l'APTS pour marquer les différents oligosaccharides. Ceci permettrait de vérifier si l'APTS a une préférence concernant l'analyte qu'il marque.

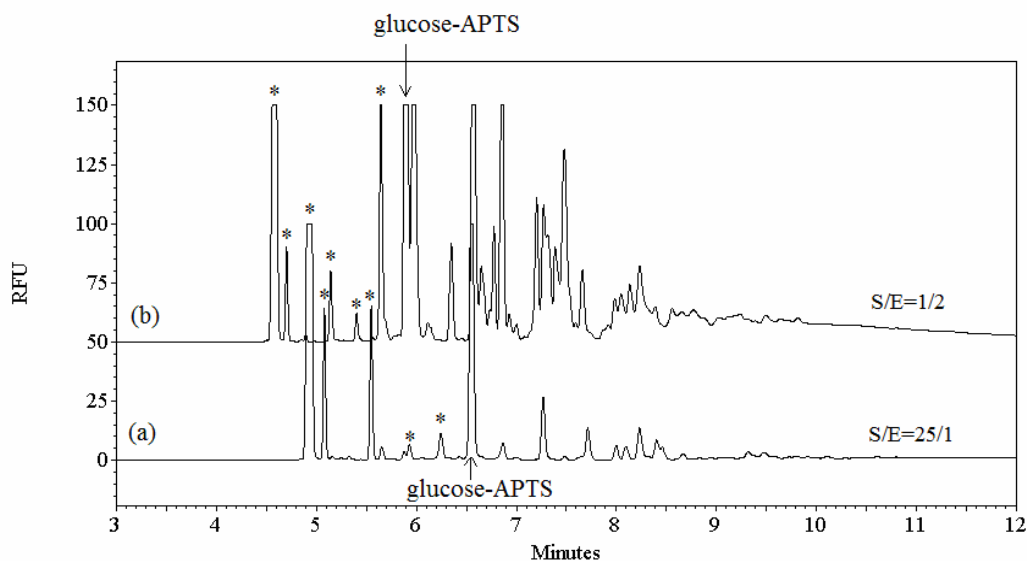


Figure 4.19 : Effet du ratio S/E sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du CMC pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de a) 25/1 et b) 1/2, marqués avec l'APTS. La séparation a été effectuée dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV. La détection a été effectuée par LIF avec un laser ayant une λ_{exc} de 488 nm. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

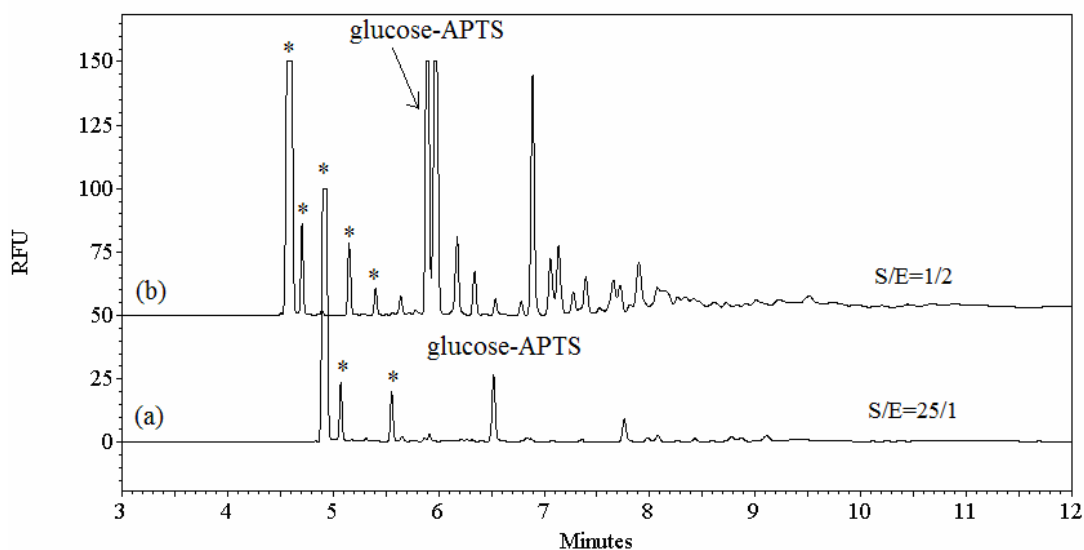


Figure 4.20 : Effet du ratio S/E sur la digestion enzymatique. Électrophorégrammes des produits de la digestion enzymatique du HEC pendant 3 jours à 37°C avec un ratio S/E de a) 25/1 et b) 1/2, marqués avec l'APTS. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.19. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

4.6.9 Répétabilité de la méthode de séparation

Afin qu'une méthode analytique soit fiable, il est important que les résultats soient reproductibles. Afin de vérifier la répétabilité de la méthode d'électrophorèse capillaire, le même échantillon a été injecté à deux reprises dans un intervalle de sept mois et à trois reprises dans une même journée. L'échantillon analysé lors de ces études est le CMC digéré pendant 3 jours à 37°C dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 avec un ratio S/E de 25/1. La séparation a été effectuée dans le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec un voltage de -25 kV.

Lorsque l'échantillon a été analysé à trois reprises dans une même journée, on obtient une bonne précision en temps de migration pour les électrophorégrammes (Fig 4.21). L'écart-type relatif (RSD) est de 0.31% et de 0.26% pour les pics à 4.7 min et 8.1 min respectivement, qui sont indiqués par les flèches sur la Fig 4.21. La précision sur les aires de ces deux pics a aussi été déterminée en calculant le RSD, mais elle semble être moins bonne que celle calculée pour les temps de migration. Le RSD sur les aires est de 10,1% pour le pic à 4.7 min et de 6.87% pour le pic à 8.1 min. On peut donc conclure qu'à court terme, la méthode de séparation est répétable, puisqu'elle permet une bonne précision de la séparation dans une même journée.

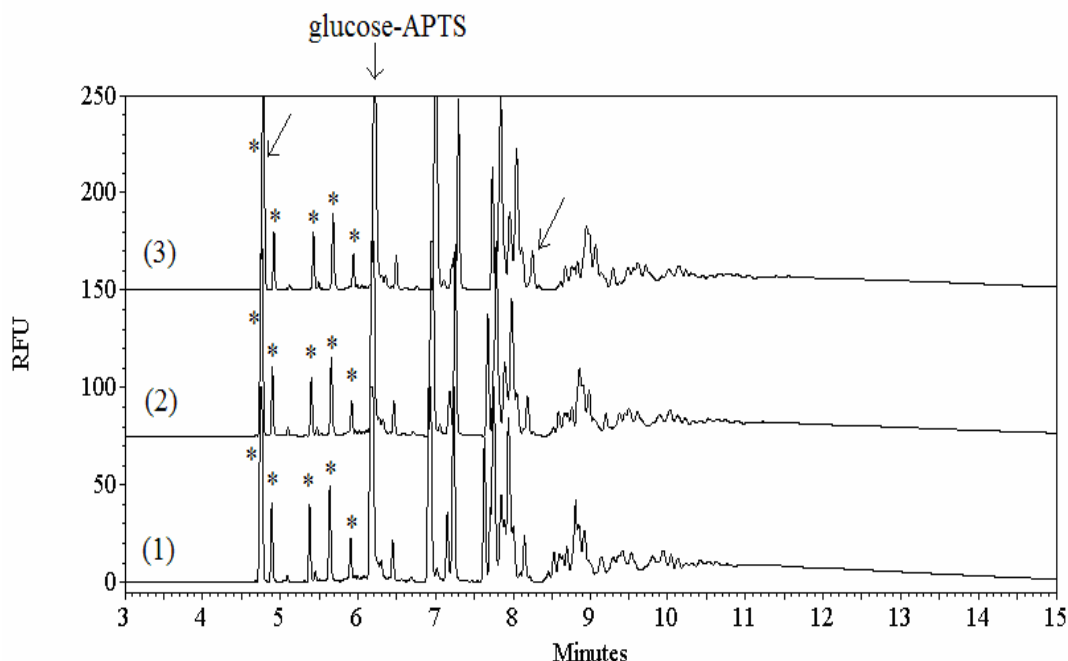


Figure 4.21 : Électrophorégrammes du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 avec un ratio S/E de 25/1. La séparation a été effectuée à trois reprises le 19 août 2009. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.19. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

Lorsque le même échantillon a été analysé sur deux jours différents dans une période de sept mois, on peut voir facilement que la précision de la méthode a diminué (Fig 4.22). De plus, on aurait tendance à se demander si la dépolymérisation enzymatique se poursuit même lorsque l'échantillon a été entreposé à -20°C, puisque de nouveaux pics intenses sont observés lorsque l'analyse a été effectuée 7 mois plus tard (Fig 4.22b). On pense que l'enzyme est totalement inactive à cette température, mais ce n'est pas le cas. L'arrêt de la digestion enzymatique a été effectué en trempant l'échantillon dans un bain de glace et en l'entreposant dans le congélateur à -20°C. Il est possible que la diminution de la température ne permette pas une dénaturation complète de la cellulase et que l'excès d'APTS ont tous deux contribué à la formation d'autres produits APTS-oligomères durant 7 mois d'entreposage à -20°C. Aussi, il se pourrait qu'une hydrolyse chimique des produits APTS-oligomères soit produite à cette température, donnant les pics supplémentaires vus sur

la Fig 4.22b. Cependant, aucun échantillon de contrôle n'a été effectué pour le confirmer (par exemple, un blanc sans substrat qui est entreposé pendant 7 mois). Le chauffage de l'échantillon à environ 70°C permettrait peut-être une dénaturation de l'enzyme, mais cette méthode n'a pas été envisagée due au manque de temps. Il est aussi possible de voir un décalage de la fenêtre d'éluion, qui provient de la variation du flux électroosmotique. Ceci est dû au fait que les deux analyses n'ont pas été effectuées dans une même journée.

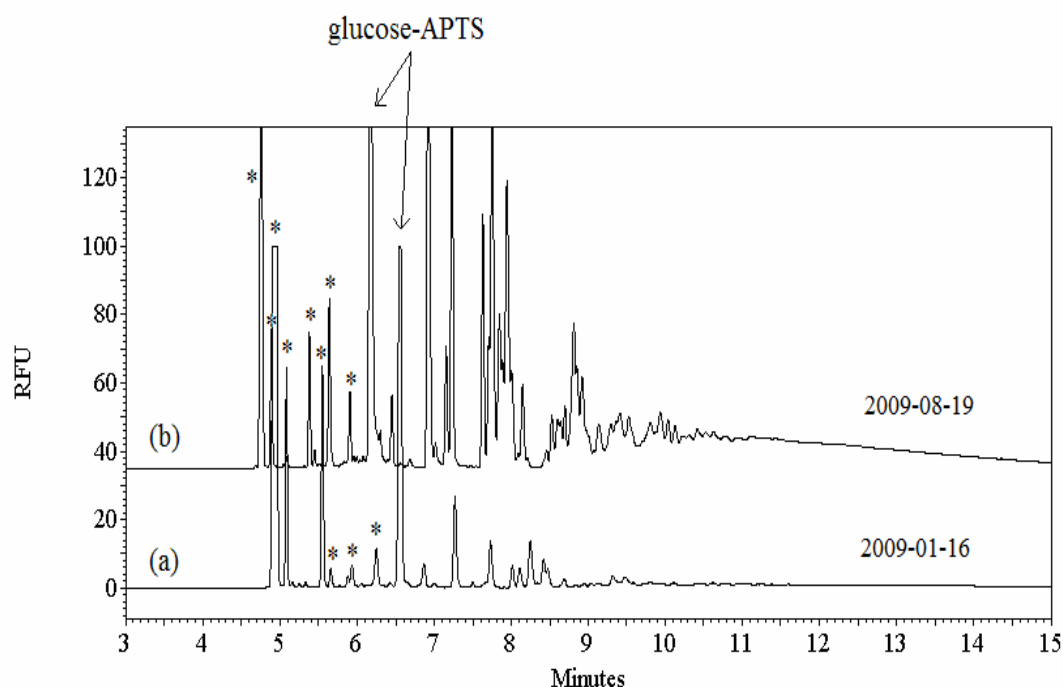


Figure 4.22 : Électrophorégrammes du CMC digéré pendant 3 jours à 37°C dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 avec un ratio S/E de 25/1. La séparation a été effectuée le a) 16 janvier 2009 et b) 19 août 2009. La séparation et la détection ont été effectuées de la même façon qu'à la figure 4.19. * : pics de fond provenant de l'excès d'APTS.

4.7 Séparation par HPLC-UV des produits de digestion enzymatique

Contrairement à l'électrophorèse capillaire, qui nécessite des analytes chargés afin qu'une bonne séparation se produise, les molécules à séparer en HPLC doivent préférablement être moins polaires. Lors de l'optimisation des paramètres de détection et de séparation en HPLC, c'est l'HEC qui a été utilisé, puisque

contrairement au CMC, il ne possède aucune charge. L'échantillon HEC digéré pendant trois jours à 37°C avec un ratio S/E de 25/1 dans l'acétate de sodium 50 mM à pH 5.0 a été utilisé tout au long des études de la méthode chromatographique.

4.7.1 *Effet du chromophore*

Les mêmes agents chromophores qu'en électrophorèse capillaire ont été testés, soit l'AA-Ac, l'APTS et la PHN. Même si l'AA-Ac et l'APTS possèdent plus de groupements chromophores que la PHN, il semblerait que la détection est la meilleure lorsque les analytes sont marqués avec la PHN. En effet, à 432 nm, qui est le maximum d'absorbance de l'AA-Ac, deux faibles signaux de 0.5 et 1.5 mAU sont présents entre 6 et 7 min (Fig 4.23a). Cependant, leur intensité est tellement faible, qu'ils n'ont pas été pris en considération. De plus, les analyses ont été effectuées avec un détecteur à barrette de diodes avec enregistrement entre 200 et 800 nm, mais aucune longueur d'onde ne permettait une bonne détection des analytes. Par la suite, on peut voir sur le chromatogramme correspondant à la fig 4.23b, que le marquage des analytes avec l'APTS permet une faible détection, mais ne permet aucune séparation, probablement à cause de la forte charge négative sur l'APTS. Seuls deux vrais pics sont observés entre 3 et 4 min (Fig 4.23b). Afin d'obtenir une bonne séparation des analytes marqués avec l'APTS, il aurait fallu utiliser la chromatographie par échange d'anions [23, 31, 70], puisque cette technique permet la séparation d'analytes chargés. Enfin, on peut voir sur le chromatogramme à la fig 4.23c, correspondant au marquage des analytes avec la PHN, la présence de plusieurs pics intenses. Une analyse de l'agent de marquage seul, la PHN, dans l'acétate de sodium nous a permis d'affirmer que le pic intense à 5 min correspond à l'excès de PHN présent dans l'échantillon. Suite à ces résultats, il est possible d'affirmer que la PHN représente un bon agent chromophore, puisque la détection et la séparation par HPLC sont facilitées.

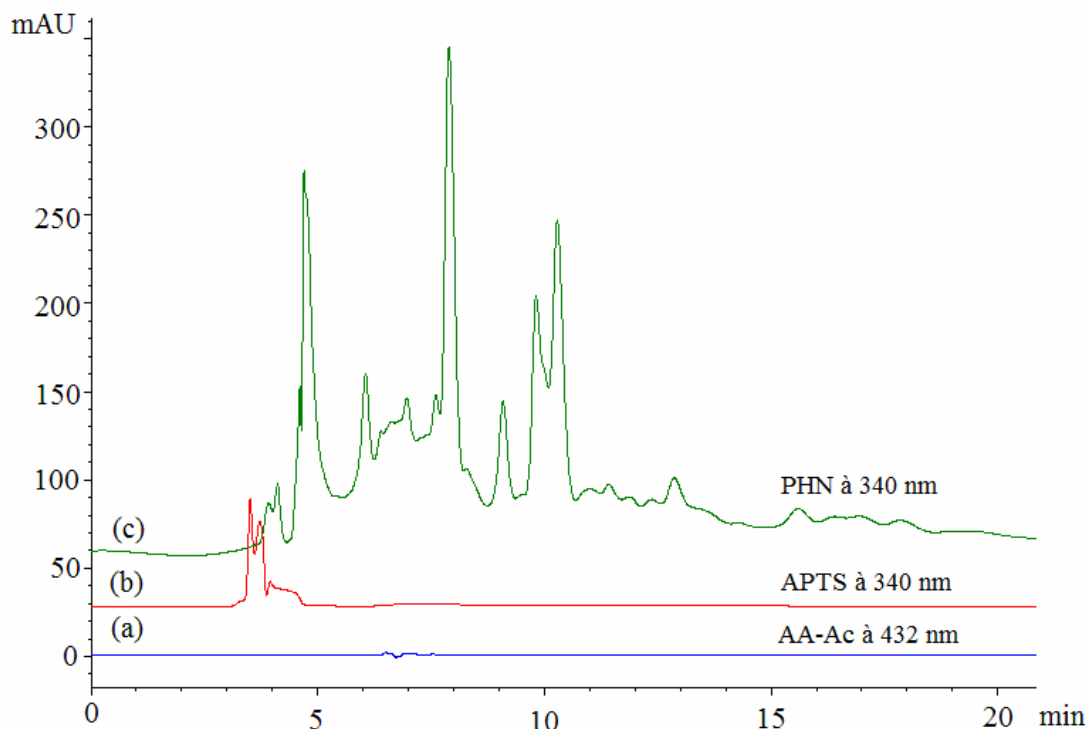


Figure 4.23 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec a) l'AA-Ac à 432 nm, b) l'APTS à 340 nm et c) la PHN à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH et 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans l'eau Milli-Q, avec un débit d'élution de 0.5 mL/min sur une colonne de phase stationnaire cyano.

4.7.2 Effet de la longueur d'onde de détection

Une première analyse a été effectuée à une longueur d'onde de 290 nm, mais seul un pic intense de 3000 mAU a été observé, correspondant à l'excès de PHN. En effet, le signal intense de la PHN avait caché les pics des produits de digestion enzymatique. Ainsi, l'absence d'autres pics sur le chromatogramme permet de dire que la détection des produits de digestion enzymatique du HEC n'est pas possible à cette longueur d'onde. Il a donc été question d'effectuer une injection permettant la détection à différentes longueurs d'ondes, telles que : 340, 445, 475 et 500 nm, suite à l'analyse des spectres du détecteur DAD. À la figure 4.24, on peut voir que la diminution de la longueur d'onde (chromatogrammes a → d) engendre une augmentation de l'intensité des signaux. Les mêmes pics sont observés, mais avec des intensités différentes. Lorsque la détection se fait à une longueur d'onde de 340 nm,

représenté par le chromatogramme d, l'intensité des signaux est maximale. En effet, à cette longueur d'onde, le signal de la PHN ne vient pas cacher les autres pics, ce qui permet une bonne détection de tous les oligosaccharides.

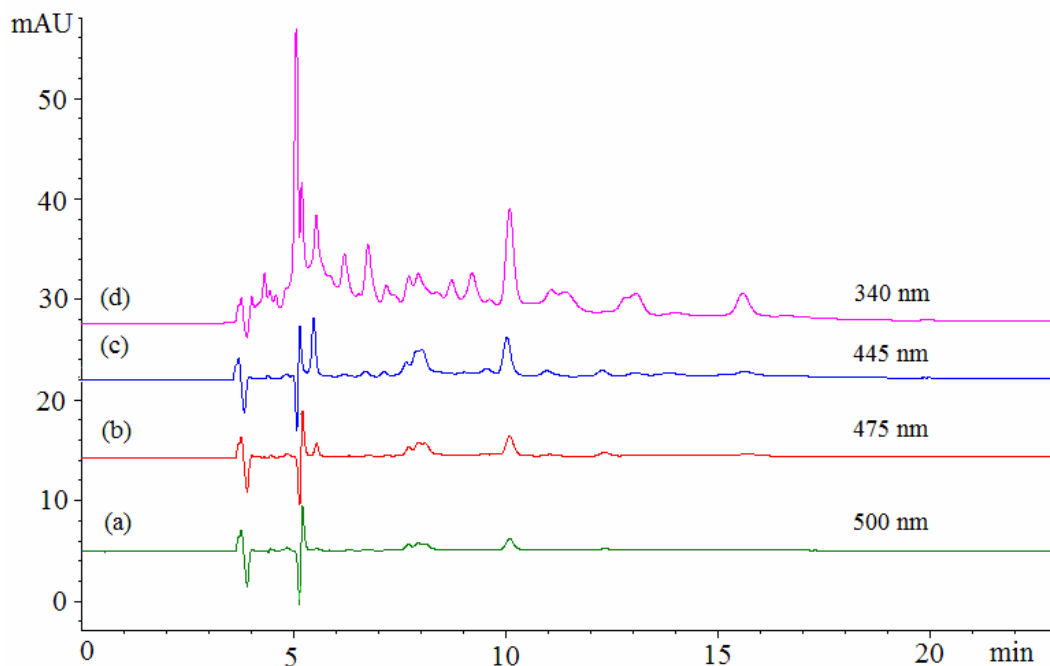


Figure 4.24 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à a) 500, b) 475, c) 445 et d) 340 nm. La séparation a été effectuée de la même façon que la figure 4.23.

4.7.3 Effet de la colonne de séparation

Le choix de la phase stationnaire se fait généralement selon la polarité des analytes à séparer. Lors de ce projet, trois colonnes de phase stationnaire différentes ont été testées, soit une première colonne ayant une phase stationnaire greffée de groupements octadécyles (C_{18}), une seconde colonne greffée de groupements amino et une troisième de groupements cyano. La première colonne a été utilisée en phase inverse, tandis que les deux autres en mode chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC). Pour ce dernier mode, qui est une variation du mode normal, la rétention des analytes est facilitée par la fine couche d'eau présente à la surface de la phase stationnaire [71].

Aucune séparation n'a été produite avec l'utilisation d'une colonne C₁₈ en phase inverse, lors de la séparation des produits de digestion enzymatique du HEC. En effet, un pic intense et large est observé, qui pourrait caractériser la rétention de tous les analytes en même temps. Puisque les analytes (oligomères-PHN) sont tous relativement polaires, ils n'ont aucune interaction avec la phase stationnaire, qui est apolaire. L'éluant étant moins polaire, il va donc interagir davantage avec la phase stationnaire et entraîner les molécules de l'échantillon à la sortie de la colonne.

Puisque les dérivés cellulosiques sont assez polaires, l'utilisation d'une colonne possédant ce même type de polarité est préférable. La colonne amine devrait donc permettre une bonne séparation des produits d'hydrolyse enzymatique, tout en retenant les solutés les plus polaires. Cependant, la séparation en mode HILIC sur la colonne amine (Fig 4.25b) ne semble pas être meilleure qu'en phase inverse avec la colonne C₁₈, puisqu'encore une fois, le nombre de pics était minime. De plus, la plupart des signaux observés ont une intensité assez faible. Enfin, le pic intense à 3.8 min, représente possiblement la co-élution des analytes. Ceci dit, les analytes ont très peu d'affinité pour la phase stationnaire amine.

L'avantage de procéder à une séparation avec une colonne cyano est son utilisation tant en phase normale qu'en phase inverse. On peut voir sur la figure 4.25c que la colonne CN permet une meilleure séparation que les autres colonnes testées. Ces résultats peuvent être dues aux plus grandes interactions des analytes pour la phase stationnaire cyano, ainsi qu'à d'autres facteurs encore inconnues. En effet, la séparation en mode HILIC est complexe et n'est pas encore bien compris jusqu'à aujourd'hui. Ainsi, plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle sur la séparation, mais ne sont pas encore bien connus.

Plusieurs pics plus ou moins intenses sont perçus au cours des 20 premières minutes de séparation (Fig 4.25c). L'identification des différents signaux est impossible, due au manque d'oligosaccharides aux différents degrés de polymérisation. Les étalons de glucose-PHN et maltose-PHN n'ont pas été analysés,

à cause du manque de temps. Puisque le but du projet est l'obtention d'un profil cartographique des produits d'hydrolyse enzymatique, de façon qualitative, l'identification des analytes est donc facultative. Il serait logique d'affirmer qu'en mode HILIC, l'ordre d'élution se fait du soluté le moins polaire au soluté le plus polaire. Puisque le glucose est un monosaccharide et possède une masse molaire basse, ses interactions avec la phase stationnaire sont minimales et élué donc en premier. De la même façon, le maltose possède un degré de polymérisation de 2, il aura donc une plus grande affinité pour la phase stationnaire que le glucose-PHN et éluera donc en second. Ceci dit, la rétention des analytes se fait selon le degré de polymérisation. Plus le degré de polymérisation de l'oligosaccharide est élevé, plus grand sera son affinité pour la phase stationnaire et plus il sera retardé à éluer de la colonne [72].

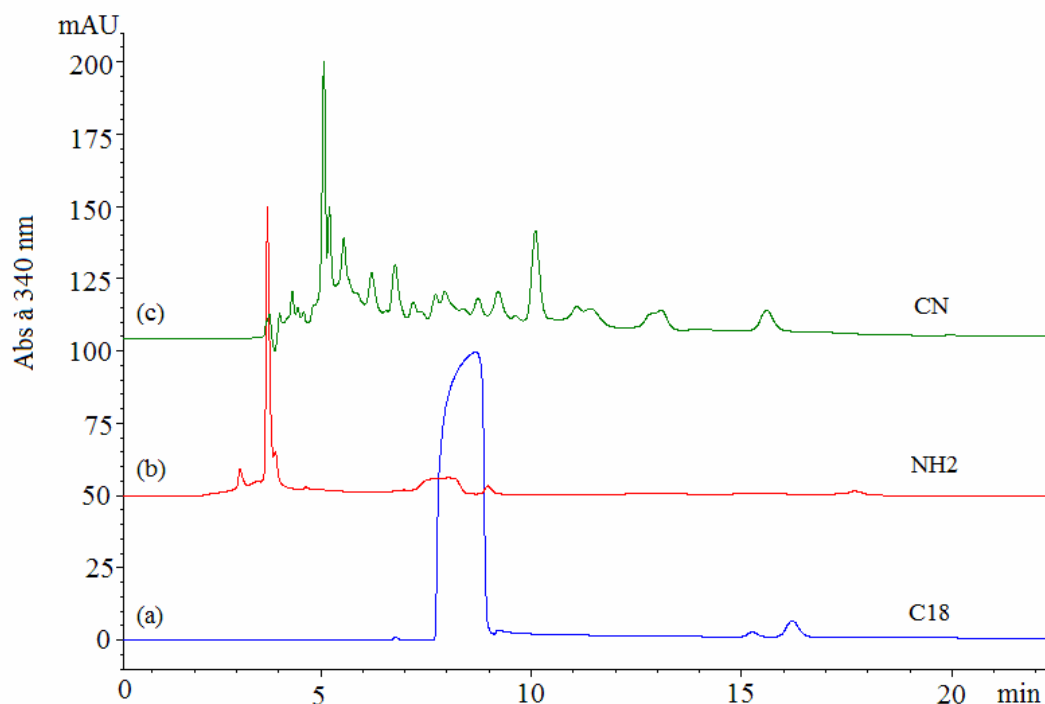


Figure 4.25 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN, détectés à 340 nm et séparés sur une colonne a) C₁₈, b) NH₂ et c) CN. Pour les trois phases stationnaires, la séparation a été effectuée en mode isocratique avec 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH et 50% (v/v) d'acide acétique 0.1 M dans l'eau Milli-Q, avec un débit d'élution de 1.0 mL/min.

4.7.4 Effet de l'éluant

Les oligosaccharides très polaires sont extrêmement difficiles à séparer en HPLC, sans l'utilisation d'un éluant fortement alcalin [73]. Le choix de la phase mobile se fait selon la phase stationnaire choisie et le milieu dans lequel se trouvent les échantillons. La colonne utilisée étant polaire, l'éluant doit être moins polaire. Le fait que les dérivés cellulosiques soient en milieu aqueux empêche l'utilisation de solvants organiques, tel que l'hexane, comme phase mobile. Aussi, il se produirait une agrégation des molécules aqueuses et organiques, ce qui nuirait et dégraderait la colonne. En mode normal, où la phase est greffée d' amino ou de cyano, le pouvoir d'élution est le plus fort pour l'eau, suivi du méthanol et de l'acétonitrile.

Au départ, deux éluants composés d'acide acétique 0.1 M dans l'eau pure ou dans le méthanol ont été testés. Cependant, le chromatogramme de la figure 4.26a montre que lorsque le MeOH est utilisé, aucune séparation n'est observée. Seuls deux pics très larges à faibles signaux sont présents, qui représenteraient presque la co-élution de tous les analytes. En ce qui concerne l'utilisation de l'eau pure avec l'acide acétique 0.1 M, qui est représenté par le chromatogramme à la figure 4.26b, tous les analytes ont tendance à éluer dans un intervalle de 10 min, ce qui empêcherait d'avoir une bonne séparation. Un troisième éluant a donc été préparé par un mélange de ces solvants, tout en gardant la concentration d'acide acétique la même. Une solution de 0.1 M d'acide acétique dans 50:50 d'eau et de MeOH (Fig 4.26c) a permis aux analytes d'éluer plus lentement, puisqu'on observe une séparation des analytes dans un intervalle de 15 min. Cependant, on peut voir que les pics sont larges.

En comparant tout d'abord les chromatogrammes des figures 4.26a et b, aucune séparation n'est obtenue lorsque le MeOH sert d'éluant, mais l'utilisation de l'eau semble permettre une bonne séparation. La force éluotrope de l'eau est de 10.2 et celui du méthanol est de 5.1, on aurait tendance à croire que les oligosaccharides éluent plus rapidement avec l'eau, ce qui engendrerait une mauvaise séparation des analytes. Lorsque la force éluante diminue, comme c'est le cas pour le MeOH, la phase mobile prend plus de temps pour entraîner les analytes vers la colonne et une

meilleure séparation des analytes devrait se faire voir. C'est ce qui devrait être observé lorsque la séparation est effectuée en mode normale. Cependant, lors de ce projet, le mode HILIC a été employé. D'après la figure 4.26a, il semble que le MeOH possède une force éluante plus élevée que l'eau, puisqu'on peut observer une co-élution des produits, dans un intervalle de 5 min. En effet, puisque la séparation se fait en mode HILIC, un minimum de 5% d'eau est requis, afin de permettre la formation de la mince couche d'eau à la surface de la phase stationnaire. C'est la présence de cette mince couche d'eau qui permet la séparation des oligosaccharides. En utilisant que le MeOH, aucune couche d'eau n'est formée et les interactions hydrogènes entre les analytes et la phase mobile sont très élevées, d'où la co-élution de tous les produits de digestion enzymatique en même temps.

En mélangeant le MeOH avec l'eau, la force éluotrope se situe entre les deux. Ainsi, en utilisant un mélange 50:50 MeOH:H₂O, la force éluante du mélange est de 7.65, en excluant l'influence de l'acide acétique. Sur le chromatogramme de la figure 4.26c, on peut voir que même si quelques signaux sont moins intenses que ceux présents sur le chromatogramme de la figure 4.26b, une meilleure séparation des oligosaccharides est obtenue, puisque les analytes éluent sur une fenêtre d'élution plus large.

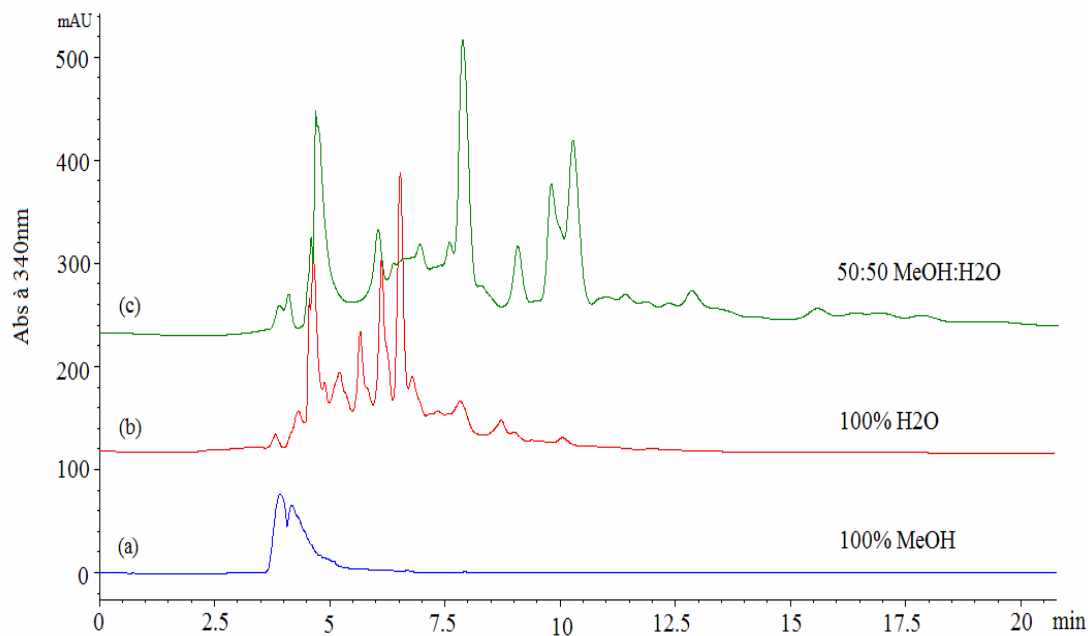


Figure 4.26 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec a) acide acétique 0.1 M dans le MeOH, b) acide acétique 0.1 M dans l'eau Milli-Q et c) acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O. Le débit d'élution a été de 1.0 mL/min sur une colonne CN.

Un mélange acétonitrile avec l'eau a aussi été préparé, afin d'étudier le pouvoir d'élution de cette phase mobile. Les séparations obtenues avec le MeOH:H₂O et l'ACN:H₂O sont très similaires. En effet, les mêmes pics sont observés, ayant des intensités semblables. Par contre, la séparation des oligosaccharides avec l'éluant MeOH:H₂O semble avoir une fenêtre d'élution plus longue, que lors de l'utilisation de l'ACN:H₂O. Ceci s'explique par le fait que l'acétonitrile possède une force éluotrope plus élevée que le méthanol, soit de 5.8. Le pouvoir d'élution du mélange ACN:H₂O est donc plus fort et entraîne plus rapidement les produits de digestion enzymatique à l'extérieur de la colonne, d'où leur temps de rétention plus bas.

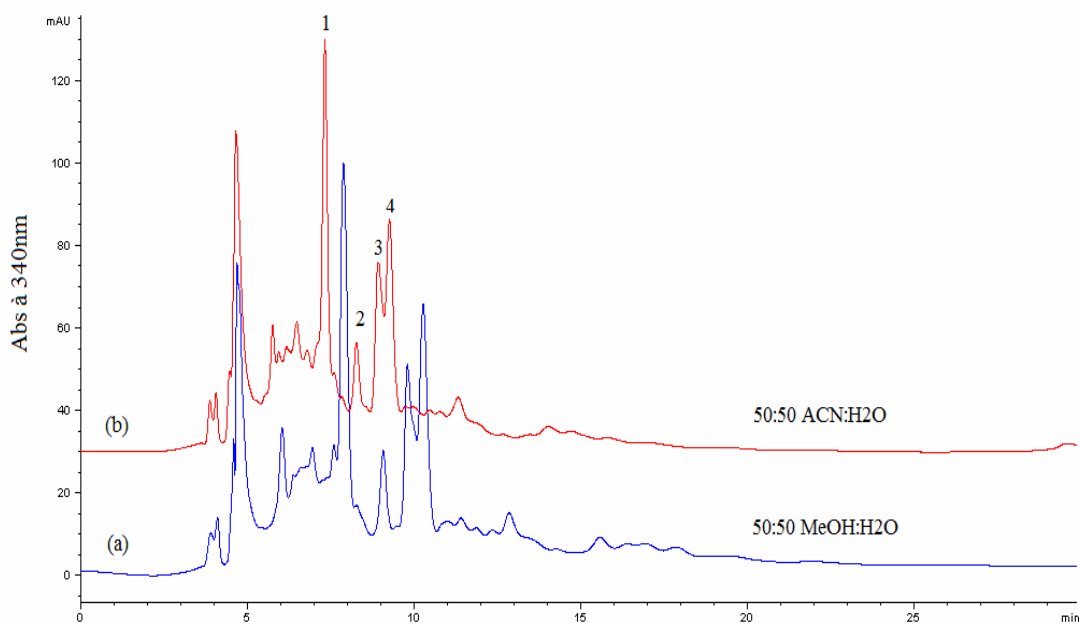


Figure 4.27 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec a) l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O et b) l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 ACN:H₂O. Le débit d'élution a été de 1.0 mL/min sur une colonne CN.

Le choix de l'éluant s'est donc fait en calculant les résolutions entre les pics 1-2 et 3-4, indiqués à la figure 4.27, que l'on peut retrouver au tableau II. Il est important de mentionner que la caractérisation de ces pics n'a pas pu être effectuée, dû au manque des étalons d'oligomères. Les temps de rétention ainsi que les largeurs à la base des différents pics sont plus élevés lorsque la phase mobile utilisée est le MeOH:H₂O. Même si la différence est minime, on peut quand même voir une meilleure résolution des oligosaccharides avec ce même éluant. Enfin, puisque l'acétonitrile semble être en pénurie mondiale, les diverses séparations en HPLC ont été effectuées avec le MeOH:H₂O.

Tableau II : Résolution entre les pics 1-2 et 3-4 (Fig 4.27) lors de la séparation du HEC avec le MeOH:H₂O et l'ACN:H₂O sur une colonne cyano.

Éluant	Pic	t _R [*] (min)	W [*] (min)	R ₁₋₂	R ₃₋₄
50:50 ACN:Eau	1	7.327	0.2183	3.7	1.3
	2	8.276	0.2926		
	3	8.928	0.2446		
	4	9.263	0.2551		
50:50 MeOH:Eau	1	7.885	0.2582	4.3	1.6
	2	9.079	0.2953		
	3	9.808	0.2857		
	4	10.276	0.2877		

* Les valeurs des temps de rétention et des largeurs à la base des différents oligosaccharides ont été déterminées à partir du logiciel utilisé.

4.7.5 Effet du débit d'élution

Le débit d'élution est un paramètre important faisant varier la rétention des analytes. De plus, il a un effet direct sur la limite de détection. Liu *et al.* [56] ont remarqué que la diminution du débit engendrait une augmentation de la sensibilité du détecteur. Cette tendance a été étudiée et discutée par plusieurs chercheurs [74-77]. Lors de la séparation des oligosaccharides, différents débits ont été testés, soit 0.3, 0.5 et 1.0 mL/min. En se fiant au tableau III, on peut voir que l'augmentation du débit augmente la vitesse de sortie des différents oligosaccharides, puisque leur temps de rétention diminue. Aucune tendance n'est observée entre le débit et la résolution entre les pics 1 et 2, tandis qu'on peut observer qu'en augmentant le débit, la résolution entre les pics 3 et 4 diminue. Ceci semble être logique, puisqu'en augmentant le débit, on pousse les analytes à sortir plus rapidement de la colonne, ce qui les rend moins bien séparés.

Les effets de diffusion longitudinale et de résistance au transfert de masse, qui sont deux facteurs contribuant à l'élargissement des pics, dépendent du débit de la phase mobile. Cependant, d'après les résultats du tableau III, on peut voir que l'efficacité de la séparation n'est pas affectée par le débit, puisque pour un même pic, le nombre de plateaux théoriques semble être aléatoire d'un débit à l'autre. En effet, le nombre de plateaux théoriques (N) des pics 1 et 2 augmente fortement lorsque le débit passe de 0.3 à 0.5 mL/min et diminue faiblement lorsque le débit passe de 0.5 à 1.0 mL/min. On pourrait croire qu'on se situe dans la partie inférieure du graphique de van Deemter. Cependant, en ce qui concerne les pics 3 et 4, l'efficacité diminue avec l'augmentation du débit d'élution. Même si la résolution entre les pics 3 et 4, présentée dans le tableau III, est plus élevée que 4.5 pour les différents débits étudiés, la figure 4.27 ne montre aucune séparation entre ces deux pics. Il se pourrait que les produits correspondant à ces deux pics ne soient pas entièrement purs. Dans ce cas, les temps de rétention et la largeur à la base seraient affectés et fausseraient les calculs de R et N.

Le facteur de rétention k' est un paramètre qui décrit le rapport entre le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire et le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile. Il représente une grandeur qui est caractéristique à un produit donné. Théoriquement, k' est indépendant du débit de la phase mobile. C'est ce que démontrent les résultats obtenus lors du projet. Ainsi, quel que soit le débit, chaque oligosaccharide possède un k' qui lui est propre. Lorsque k' change d'une analyse à l'autre pour un même soluté, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne ou qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou de la phase stationnaire.

Tableau III : Résolution (R), nombre de plateaux théoriques (N) et facteur de rétention (k') de différents oligosaccharides séparés à divers débits d'élution.

Débit (mL/min)	Pic ^a	t_R (min)	t'_R ^b (min)	k'	W (min)	N	R_{1-2}	R_{3-4}
0.3	1	13.991	7.547	1.2	0.848	4300	2.6	7.1
	2	16.788	10.344	1.6	1.285	2700		
	3	26.144	19.700	3.1	0.747	19600		
	4	32.107	25.663	4.0	0.928	19100		
0.5	1	8.297	4.470	1.2	0.319	10800	5.3	5.1
	2	10.042	6.215	1.6	0.340	13900		
	3	15.275	11.448	3.0	0.493	15300		
	4	18.819	14.992	3.9	0.905	6900		
1.0	1	4.172	2.245	1.2	0.168	9900	4.9	4.6
	2	5.039	3.112	1.6	0.189	11300		
	3	7.673	5.746	3.0	0.284	11600		
	4	9.444	7.517	3.9	0.478	6200		

^a Pics numérotés à la figure 4.27

^b t_M à 0.3 mL/min = 6.444 min

t_M à 0.5 mL/min = 3.827 min

t_M à 1.0 mL/min = 1.927 min

Un graphique des aires sous les pics en fonction du débit de la phase mobile a été tracé (Fig 4.28). On peut voir que l'aire sous les pics 1 et 2 diminue avec l'augmentation du débit de la phase mobile. Ceci peut s'expliquer par l'hypothèse suivante qui stipule que l'augmentation du débit de la phase mobile va engendrer une diminution du nombre de points permettant de tracer le pic. Ainsi, lorsque le débit est élevé, il n'y a pas suffisamment de points, qui reliés ensemble vont permettre le traçage du pic, d'où il pourrait être déformé. Lorsque le débit est bas, une multitude de points sont présents pour tracer le pic et on permet donc une bonne formation du pic. Le même effet a été observé par Schmidt *et al.* [77] lorsqu'ils ont tracé la hauteur

des différents pics en fonction du débit d'élution. Cependant, en observant les graphiques des aires sous les pics 3 et 4 en fonction du débit d'élution, aucune tendance n'est observée. Encore une fois, ceci pourrait être dû au fait que les composés correspondant aux pics 3 et 4 ne sont pas purs, ce qui pourrait affecter les aires sous leurs pics.

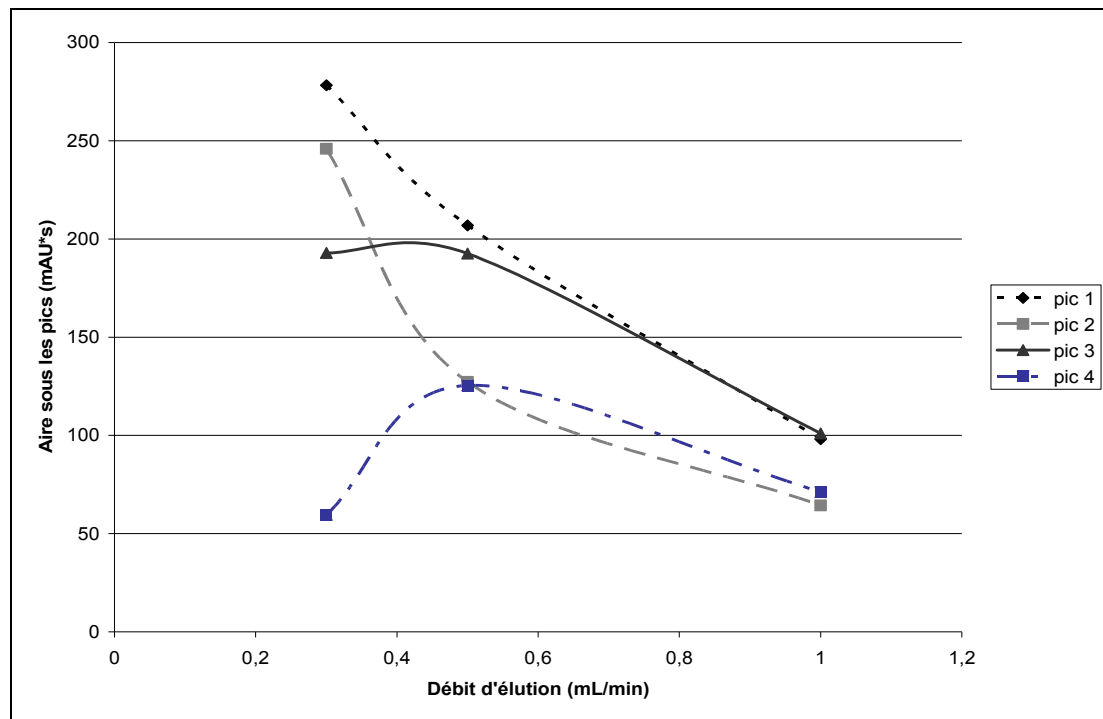


Figure 4.28 : Effet du débit d'élution de la phase mobile sur les aires des pics des différents oligosaccharides 1 à 4, selon la figure 4.27. La séparation a été effectuée sur une colonne CN avec une phase mobile composée d'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O.

4.7.6 Effet de la proportion de MeOH dans la phase mobile

La concentration d'un modificateur organique dans la phase mobile contrôle la rétention et la sélectivité des oligosaccharides sur la phase stationnaire [28]. Il a été observé précédemment que la séparation des oligosaccharides est meilleure lorsque le H₂O:MeOH 50:50 est utilisé comme phase mobile. Il a donc été intéressant d'effectuer différentes séparations des produits de digestion enzymatique du HEC en variant la proportion de MeOH dans la phase mobile. Le facteur de rétention de

quatre différents oligosaccharides a été déterminé pour chacune des concentrations de MeOH. Il est observé sur la figure 4.29 qu'en augmentant de 10% à 40% la concentration de MeOH dans l'éluant pour une concentration d'acide acétique constante de 0.1 M, les temps de rétention ainsi que les facteurs de rétention des différents pics diminuent. Afin d'expliquer ces résultats, il est important de comprendre les notions de base de la chromatographie ainsi que le mode HILIC. Les oligosaccharides étant polaires, la phase stationnaire et la phase mobile le sont aussi. En augmentant la concentration de MeOH dans l'éluant, on diminue sa polarité, puisque la concentration de l'eau se trouve à être diminuée, par conséquent. Cependant, même si la polarité de la phase mobile diminue, elle reste plus polaire que la colonne stationnaire, greffée de groupements cyano. L'élution des oligosaccharides est surtout basée sur les interactions de ponts hydrogènes qu'ils possèdent avec la colonne stationnaire, la mince couche d'eau à la surface de la phase stationnaire, ainsi qu'avec la phase mobile. En augmentant la concentration de MeOH de 10% à 40%, on diminue la concentration de l'eau de 90% à 60%. Puisque la concentration de l'eau est diminuée, les interactions des oligosaccharides avec la mince couche d'eau à la surface de la phase stationnaire sont diminuées, tandis que celles entre les oligosaccharides et la phase mobile composée de MeOH et d'eau sont augmentées, d'où l'élution forte des oligosaccharides.

Lorsque la concentration de MeOH correspond à 60% du volume de l'éluant, les temps de rétention ont tendance à augmenter, effet contraire de ce qui a été observé précédemment. Puisque le mécanisme du principe HILIC n'est pas encore connu avec certitude jusqu'à aujourd'hui, il a été très difficile d'expliquer ce résultat. De plus, ces analyses n'ont pas été effectuées à plusieurs reprises, afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Cependant, les résultats observés laissent à croire qu'il existe une proportion optimale de MeOH et d'eau, afin que la séparation en mode HILIC soit la meilleure. De plus, lorsque le pourcentage de MeOH atteint 70%, seuls trois pics mal résolus ont été observés (Fig 4.30). Enfin, de 80% à 100% de MeOH, seul un pic large et intense est observé, correspondant à l'élution de tous les analytes en même temps. Théoriquement, une proportion minimale de 5% est nécessaire pour

la formation de la mince couche d'eau. Cependant, d'après les résultats, il est observé que la proportion de l'eau ne semble pas être assez élevée à $\leq 30\%$ pour permettre la formation de la mince couche à la surface de la phase stationnaire. Ainsi, les interactions de ponts hydrogènes entre les oligosaccharides et la phase mobile composée de MeOH et d'eau, semblent être les plus élevées lorsque la proportion en MeOH est $\geq 70\%$, d'où la co-élution des analytes.

Lors de ce projet, aucun facteur de rétention n'était visé. Cependant, il était question d'étudier la variation du facteur de rétention en fonction de la concentration de MeOH dans la phase mobile. Afin d'optimiser une séparation analytique par HPLC, il est question de minimiser le facteur de rétention k' . Ainsi, il semblerait que lorsque la proportion en MeOH dans la phase mobile est de 40%, k' est le plus bas. Ceci dit, lors de la séparation en mode isocratique, une proportion de 40% en MeOH dans la phase mobile semble être la meilleure à utiliser.

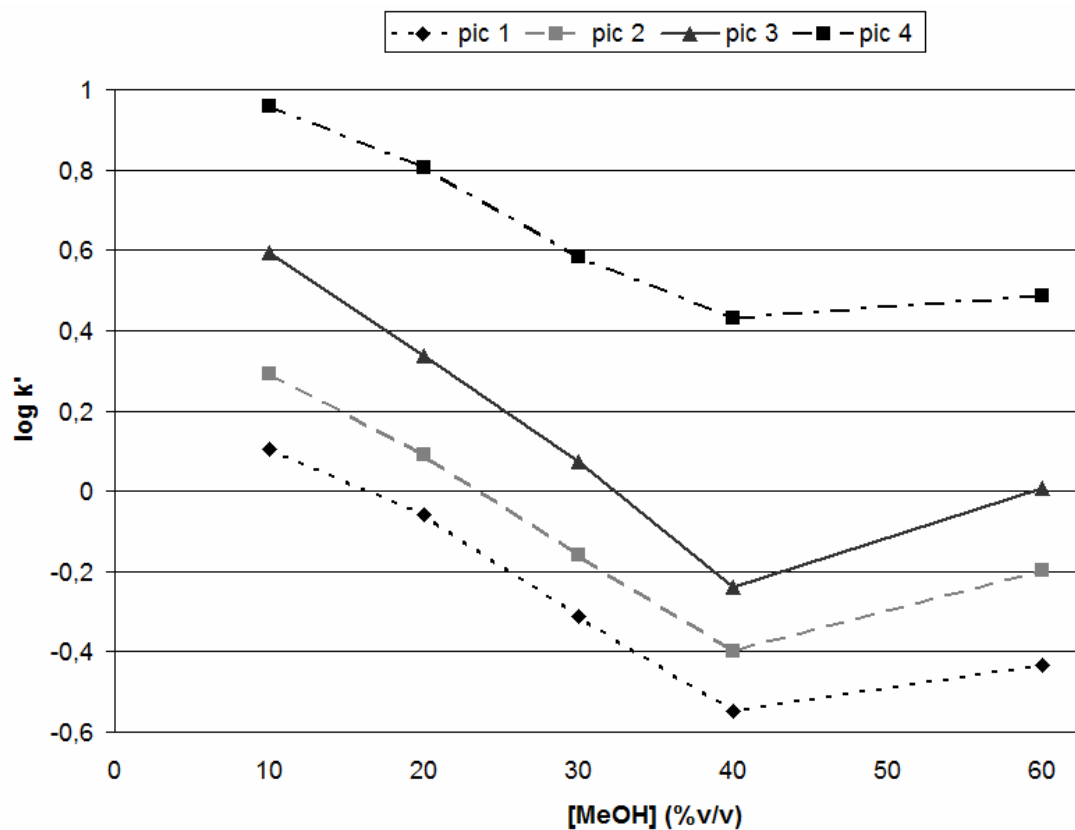


Figure 4.29 : Effet de la proportion de MeOH dans la phase mobile sur le facteur de rétention des pics 1 à 4, selon la figure 4.27. La séparation a été effectuée sur une colonne CN avec un débit d'élution de 0.5 mL/min. Les différentes phases mobiles de MeOH:H₂O sont composées d'une concentration fixe de 0.1 M d'acide acétique dans le mélange.

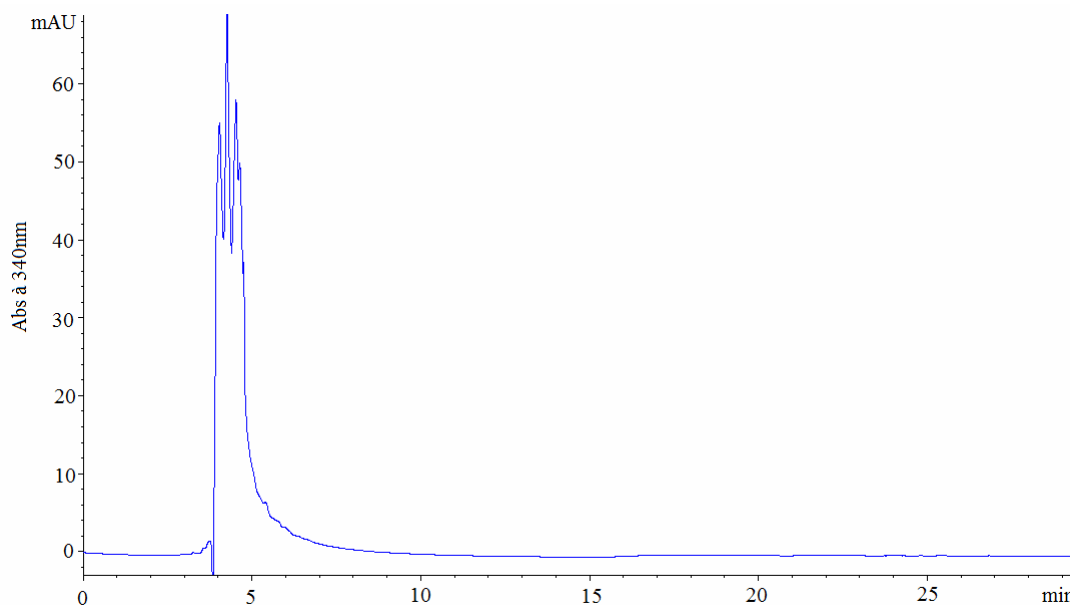


Figure 4.30 : Chromatogramme des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec l'acide acétique 0.1 M dans 70:30 MeOH:H₂O. Le débit d'élution a été de 0.5 mL/min sur une colonne CN.

4.7.7 Effet du gradient

Toutes les séparations HPLC précédentes ont été effectuées en mode isocratique. Le mode gradient permet aux oligosaccharides d'éluer plus rapidement qu'en mode isocratique, puisqu'il est possible de contrôler la polarité de l'éluant au fur et à mesure que la séparation se fait. Différents gradients ont ainsi été testés, afin de déterminer la meilleure séparation. En premier lieu, les séparations en mode gradient ont été effectuées en diminuant le pourcentage de MeOH, c'est-à-dire en augmentant la polarité de l'éluant au cours de l'analyse et ce, avec différents intervalles de temps. Les gradients d'élution cités sont représentés par le pourcentage de MeOH au départ et à la fin. Lorsque les séparations sont effectuées avec des gradients en MeOH 100-40%, 90-40%, 50-40% et 30-10% avec différents intervalles de temps, aucune séparation n'est observée. De gros pics intenses caractérisant la co-élution des oligosaccharides sont observés.

Il a donc été question de procéder à une séparation avec une diminution de la polarité du solvant d'élution, c'est-à-dire en augmentant la concentration de MeOH au cours de la séparation analytique. La figure 4.31 rassemble les différents chromatogrammes correspondant aux gradients testés, où la proportion en MeOH a été augmentée. Le tableau IV répertorie la résolution entre les paires de pics 1-2 et 3-4 selon les gradients testés. En premier lieu, si l'on se fie qu'à la plage de gradient qui est la même pour les gradients a et b, soit une augmentation de 50% en MeOH durant 5 min, on peut voir que lorsque la concentration de MeOH de départ est la plus élevée, les temps d'élution et la résolution entre les pics sont les plus bas. Cette même tendance est observée lorsqu'on compare les gradients c et d, correspondant à une augmentation de 20% du pourcentage de MeOH en 20 min. Cependant, la différence du pourcentage de MeOH au départ étant minime entre les gradients c et d, les temps de rétention respectifs pour chaque oligosaccharide diffèrent très peu d'un gradient à l'autre. Une différence d'élution des analytes correspondant à 2 min est observée entre les gradients c et d.

Par la suite, il est possible de remarquer que lorsque le pourcentage de MeOH final est le plus bas, les analytes éluent plus lentement et sont plus étalés, ce qui résulte d'un temps d'analyse total plus élevé et d'une fenêtre d'élution plus large. Une fenêtre d'élution élargie nous permet d'avoir un aperçu de la quantité de pics théoriquement possible et donc une approximation du nombre de produits présents dans l'échantillon analysé. Aussi, lorsque la proportion de MeOH finale est la plus basse, une meilleure résolution entre les différents oligosaccharides est obtenue. En effet, c'est ce qui est observé sur les chromatogrammes de la figure 4.31, ainsi qu'au tableau IV. La séparation des pics 1-2, ainsi que des pics 3-4 sur le chromatogramme de la figure 4.31a est très mauvaise, correspondant à une résolution de 1.40 et 0.71 respectivement. Cependant, une meilleure séparation des pics 1-2 et 3-4 peut être observée sur le chromatogramme de la figure 4.31d, correspondant à une résolution de 8.05 et 6.59 respectivement. Ceci semble logique, puisque lorsque la proportion de MeOH est la plus basse, la proportion en H₂O est la plus élevée. Ainsi, une plus grande couche d'eau est possiblement formée à la surface de la phase stationnaire,

retenant plus longtemps les analytes. Dans le cas contraire, lorsque le pourcentage de MeOH final est le plus élevé, les temps de rétention des produits de digestion enzymatique sont très proches les uns des autres, ce qui engendre une mauvaise séparation des pics et des résolutions très basses. En effet, en augmentant la concentration de MeOH de 40 à 90% au cours de l'analyse, on peut voir à la figure 4.31a que le temps d'élution du pic #1 est très proche du temps mort. Il a été montré précédemment, en mode isocratique, que lorsque la concentration de MeOH dans l'éluant atteint 70%, aucune séparation n'est observée. Ceci a été expliqué précédemment par le principe HILIC. Même si théoriquement, une proportion de 5% en eau est suffisante pour la formation de la mince couche d'eau, il semblerait que dans notre cas, une proportion plus basse que 30% en eau dans la phase mobile ne permet pas la formation de la mince couche à la surface de la phase stationnaire. Ainsi, l'élution des analytes se fait plus rapidement, puisque les interactions entre les oligosaccharides et la mince couche d'eau formée sont moindres. Ils interagissent donc de manière maximale avec la phase mobile composée de MeOH et d'eau, d'où on observe l'élution rapide des analytes.

Enfin, lorsque la plage du gradient d'élution est basse, sans tenir compte de l'intervalle de temps, on peut voir que de meilleures résolutions sont obtenues. Logiquement, puisqu'on augmente peu la proportion de MeOH, la quantité d'eau dans la phase mobile diminue aussi peu. Elle reste donc en quantité suffisante pour former la mince couche à la surface de la colonne cyano, en accord avec la théorie du mode HILIC. Ainsi, la surface d'interaction entre les oligosaccharides et la couche d'eau est élevée, permettant une plus grande rétention des analytes et une meilleure résolution entre les pics.

Suite à l'étude de la séparation des produits de digestion enzymatique en mode isocratique et en mode gradient, il est possible d'affirmer que la séparation en mode gradient avec l'augmentation de la proportion de MeOH dans la phase mobile de 30 à 50% en 20 min, semble être meilleure que la séparation en mode isocratique avec une proportion en MeOH de 40%. En effet, la séparation des produits de digestion

enzymatique des dérivés de cellulose en mode isocratique résulte en un temps d'analyse total de 15 min, tandis que la séparation en mode gradient résulte en un temps d'analyse total de 40 minutes et donc d'une fenêtre d'élution plus large. L'utilisation du mode gradient a donc permis d'observer plus de produits que le mode isocratique.

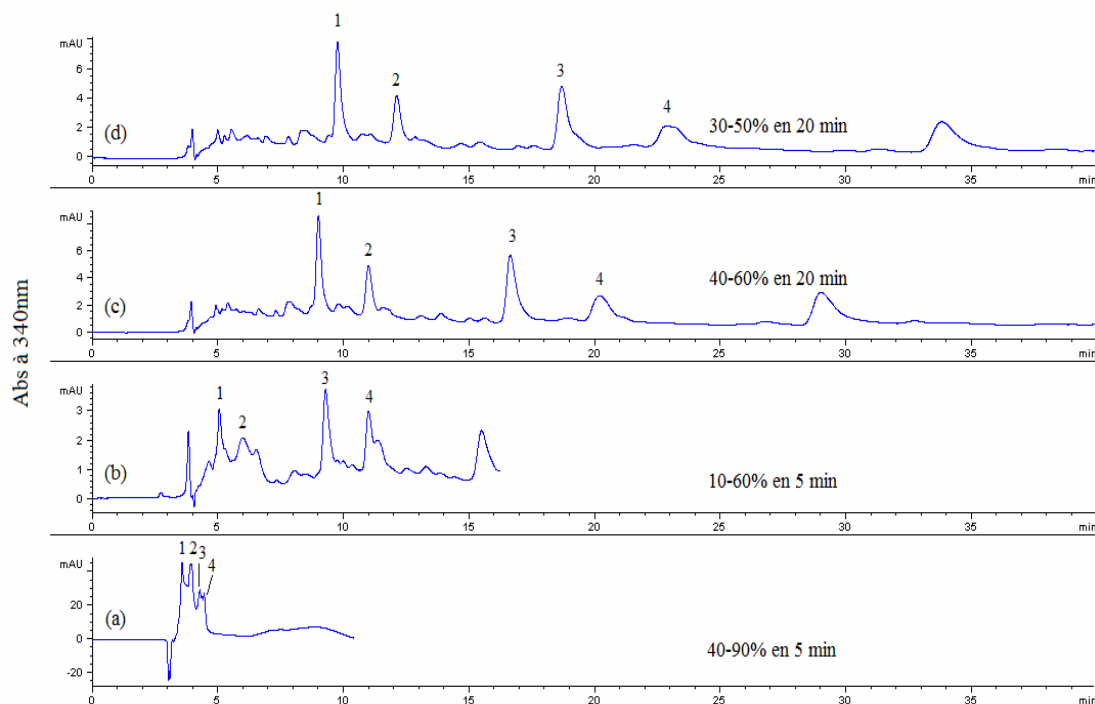


Figure 4.31 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC aux différents gradients d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH testés : a) 40-90% en 5 min, b) 10-60% en 5 min, c) 40-60% en 20 min et d) 30-50% en 20 min.

Tableau IV : Comparaison de la résolution selon le gradient d'élution.

No	Gradient de MeOH	Intervalle de temps (min)	R_{1-2}	R_{3-4}	% par min
a	40-90%	5	1.40	0.71	10
b	10-60%	5	2.19	6.35	10
c	40-60%	20	7.17	6.11	1
d	30-50%	20	8.05	6.59	1

4.7.8 Répétabilité de la méthode de séparation

Tout comme en électrophorèse capillaire, il est important d'évaluer la fiabilité de la méthode HPLC en étudiant la reproductibilité des séparations à court terme et à long terme. En procédant à l'analyse des produits de digestion enzymatique du HEC à trois reprises avec un intervalle de temps de quelques jours, on peut observer à la figure 4.32 une bonne séparation et une bonne détection des oligosaccharides. Cependant, les résultats ne sont pas reproductibles. Cette non répétabilité des résultats peut s'expliquer par le fait que l'échantillon n'a pas été entreposé dans le congélateur entre les différentes analyses, il a donc pu se dégrader entre temps [78]. En effet, tout au long des analyses HPLC, l'échantillon est resté placé dans la machine, ce qui a engendré une dégradation des phénylhydrazones, résultant d'un précipité au fond du tube. Il est donc impossible d'affirmer que la méthode HPLC est reproductible lorsque la séparation est effectuée à différents jours. Il est important de mentionner que la préparation de nouveaux échantillons n'a pas été effectuée, à cause du manque de temps.

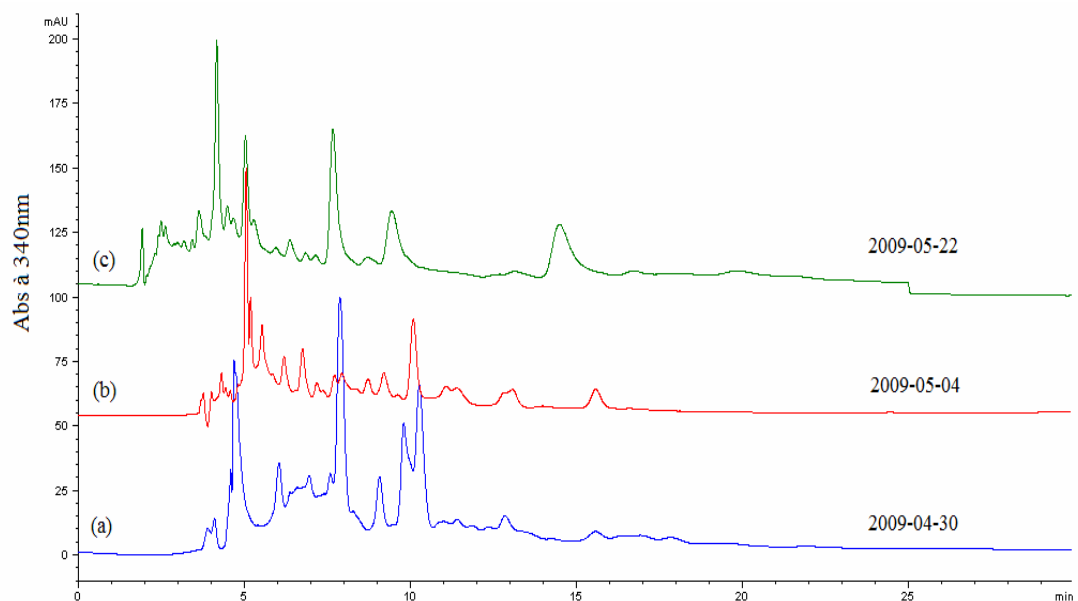


Figure 4.32 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm obtenus le a) 30 avril 2009, b) 4 mai 2009 et c) 22 mai 2009. La séparation du même échantillon sur trois jours différents a été effectuée en mode isocratique avec l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O et un débit d'élution de 1.0 mL/min sur une colonne CN.

Par la suite, lorsque l'échantillon est analysé à trois reprises dans une même journée, les résultats sont reproductibles (Fig 4.33), mais encore une fois ces chromatogrammes ne ressemblent nullement à aucun des chromatogrammes de la figure 4.32. Presqu'aucune séparation n'est produite, puisque la plupart des pics se chevauchent, représentant la co-élution de plusieurs oligosaccharides. En somme, on peut conclure qu'à court terme, la méthode de séparation HPLC est répétable, puisqu'il permet l'obtention des mêmes tracés chromatographiques. Cependant, la méthode globale regroupant la digestion enzymatique, le marquage, ainsi que l'analyse n'est pas très reproductible.

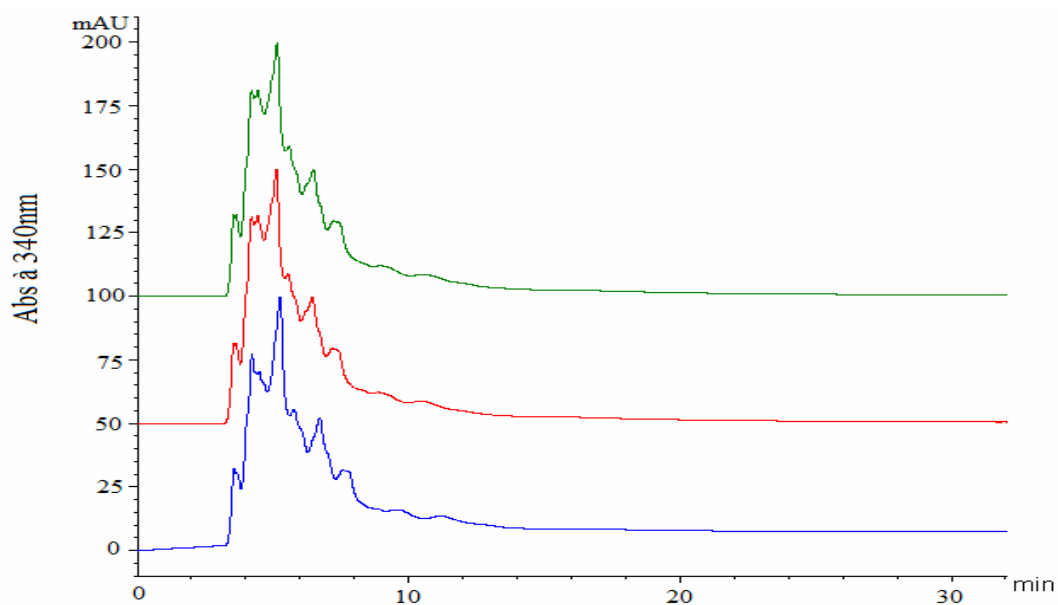


Figure 4.33 : Chromatogrammes des produits de digestion enzymatique du HEC marqués avec la PHN et détectés à 340 nm obtenus à trois reprises le 27 mai 2009. La séparation a été effectuée en mode isocratique avec l'acide acétique 0.1 M dans 50:50 MeOH:H₂O et un débit d'élution de 1.0 mL/min sur une colonne CN.

Le CE et l'HPLC ont donc permis de répondre aux objectifs du projet qui consistaient à maximiser le nombre d'oligomères et produire une carte oligomérique. L'utilisation du CE-LIF a permis d'obtenir un maximum de 23 pics et de 19 pics lors de la séparation respective des produits de digestion enzymatique du CMC et de l'HEC et ce, lorsque ces derniers sont digérés pendant 3 jours à 37°C dans l'acétate

de sodium 50 mM à pH 5.0, avec un ratio S/E de 1/2, marqués avec l'APTS et séparés avec le phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 avec l'application d'un voltage de -25 kV et une détection à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Pour sa part, l'HPLC-UV a permis la séparation sur une colonne CN d'un maximum de 12 produits du HEC libérés par l'enzyme avec les mêmes conditions de digestion citées plus haut, marqués avec la PHN, séparés avec une phase mobile composée de 0.1 M d'acide acétique dans 50:50 MeOH:H₂O avec un débit d'élution de 0.5 mL/min en mode isocratique et détectés à une longueur d'onde de 340 nm. L'utilisation d'un gradient en MeOH de 30 à 50% en 20 min a aussi permis l'obtention de 12 pics.

5 Conclusion

5.1 Conclusion

L'objectif principal de ce projet étant la séparation des oligosaccharides obtenus suite à une digestion partielle des dérivés carboxyméthyle et hydroxyéthyle de cellulose, il est possible d'affirmer que ce but a été atteint. En effet, l'étude de la réaction d'hydrolyse, la séparation et la détection des oligosaccharides a permis l'obtention d'un profil cartographique des dérivés cellulosiques. Deux techniques d'hydrolyse ont été élaborées, soit l'acétolyse et la digestion enzymatique, mais seule cette dernière a permis de couper partiellement le long polymère cellulósique et d'obtenir divers oligosaccharides. En effet, l'hydrolyse acide du CMC dans le TFA semblait être complète après 2 heures, puisque seul le glucose-APTS était observé sur les électrophorégrammes. Cependant, Momcilovic *et al.* [66] ont procédé à une dépolymérisation acide du méthylcellulose pendant 2 heures dans le TFA et ont réussi à obtenir et à caractériser 8 oligosaccharides. Par la suite, la température, le temps de l'hydrolyse, la quantité d'enzyme, le milieu de la digestion enzymatique et son pH, ainsi que la façon par laquelle la digestion est arrêtée ont été sujets lors de ce projet. La digestion des dérivés cellulósiques en présence d'une enzyme peut donner lieu à une multitude de produits possédant différents degrés de polymérisation et de substitution. Deux techniques analytiques de séparation, le CE et l'HPLC, ont permis l'obtention d'un profil cartographique des dérivés de cellulose.

Afin de détecter les produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose, il a été essentiel de les marquer avec un agent de marquage. Puisque la PHN et l'APTS possèdent des groupements chromophores, ils ont donc été testés lors de la détection dans l'ultraviolet. En ce qui concerne la détection par fluorescence, ce sont les molécules d'AA-Ac et d'APTS qui ont été testées. Contrairement aux résultats de Charlwood *et al.* [48] qui ont démontré que l'AA-Ac est un agent de marquage très efficace pouvant être détecté par fluorescence et par absorbance, nos résultats ont montrés que le rendement de marquage de l'AA-Ac avec les produits de digestion enzymatique est faible. Ainsi, quel que soit le mode de détection, absorbance ou fluorescence, le marquage des oligosaccharides avec l'APTS semblait permettre une meilleure détection et une meilleure séparation des produits de digestion enzymatique

par CE. En effet, les résultats obtenus avec l'APTS surpassent grandement la séparation et la faible détection obtenue lors du marquage des oligosaccharides avec la PHN ou l'AA-Ac. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Wang [40], Beaudoin [34, 51] et Tang [52]. Ceci démontre le rôle des quatre groupements chromophores et de la triple charge sur les différents sulfonates de la molécule d'APTS.

La séparation des produits de l'hydrolyse enzymatique des dérivés de cellulose avec le tampon tétraborate de sodium 80 mM à pH 8.5 et le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 2.9 a été possible en moins de 15 minutes, mais seul le tampon phosphate a permis une bonne résolution entre les différents pics. En effet, le tampon tétraborate de sodium a permis la séparation de 8 oligosaccharides, tandis que le tampon phosphate de sodium en a séparé 22 dans un même intervalle de temps, soit en moins de 15 min. Le pH de ce tampon étant très bas, le flux électroosmotique est presque nul et seule la mobilité électrophorétique contribue à la séparation des oligosaccharides. À première vue, on pourrait croire que la séparation des produits de digestion enzymatique dans le tétraborate de sodium n'a pas été efficace, dû au nombre de pics observés. Cependant, Osthoff *et al.* [79] ont réussi à séparer 9 oligosaccharides en 13 min, ce qui n'est pas loin de nos résultats.

En comparaison, la chromatographie liquide à haute performance n'a permis aucune séparation des oligosaccharides marqués avec l'APTS, probablement à cause de la forte charge négative sur l'APTS. Les échantillons marqués avec l'AA-Ac et la PHN ont donc été analysés, mais seule la PHN a permis une bonne détection et une bonne séparation des produits de digestion enzymatique. Contrairement à ce qui a été observé par Lattova et Perreault [49], la grande polarité des oligosaccharides n'a permis aucune séparation en phase inverse sur une colonne C₁₈. En effet, un pic large et intense représentant la co-élution des produits d'hydrolyse a été observé à environ 5 minutes. Parmi les colonnes polaires amino et cyano, c'est cette dernière qui a permis la meilleure séparation des pics et ce, en moins de 20 min, en mode HILIC. En ce qui concerne le solvant d'élution, une meilleure résolution est observée avec un

mélange d'acide acétique 0.1 M dans le MeOH:H₂O 50:50 (v/v), à une longueur d'onde de détection de 340 nm, un débit d'élution de 1.0 mL/min et un volume injecté de 10 µL. Pour sa part, l'ACN a aussi permis une bonne séparation, mais la pénurie mondiale de ce solvant nous a obligés à éliminer ce choix.

La séparation par HPLC avec un détecteur UV ne semble pas être meilleure qu'en CE couplé d'un détecteur LIF. En effet, la sensibilité du détecteur LIF permet la détection de plus d'oligosaccharides, puisque davantage de pics sont observés. Ceci est probablement dû au fait que le détecteur LIF possède une sensibilité plus élevée que le détecteur UV et permet la détection de plus petites quantités d'analytes que le détecteur UV. Aussi, le rendement de marquage de la PHN avec les oligosaccharides n'est peut-être pas aussi élevé que celui de l'APTS avec les oligosaccharides, ce qui va augmenter l'efficacité de la séparation CE-LIF par rapport à la séparation HPLC-UV. Avec ces deux méthodes de séparation à notre disposition, il a été possible de se pencher sur l'analyse des produits de digestion enzymatique du CMC et du HEC. Cependant, une difficulté se pose lors de l'identification des différents pics observés, due à l'absence de standards correspondants aux chaînes de glucose anhydre avec différents DP. Il ne faut pas oublier que les différents oligosaccharides obtenus suite à la digestion enzymatique peuvent posséder des modifications sur leur chaîne, d'où la complication à trouver un standard et à assigner les différents pics.

5.2 Travaux futurs

Le but principal de ce projet étant la séparation des produits libérés par l'enzyme cellulase, les forces et faiblesses rencontrées au cours de ce projet permettent d'établir d'autres objectifs secondaires, afin d'avancer ce projet. Les méthodes de séparations développées à ce point-ci du projet ne permettent guère d'identifier précisément les différents pics observés. Les directions futures peuvent donc être basées sur l'identification des différents oligosaccharides obtenus suite à la digestion partielle des dérivés de cellulose par l'enzyme, ainsi qu'à l'amélioration des techniques de séparation déjà développées.

Tout au long des différentes méthodologies effectuées, le marquage des oligosaccharides semble inévitable, puisqu'elle facilite la séparation et permet une meilleure détection des analytes. Quoique le marquage des oligosaccharides avec l'APTS en CE est très sensible, son coût élevé est incontournable. La grande efficacité à fluorescer, ainsi que la triple charge sur les groupements sulfonates rendent l'APTS avantageux par rapport aux autres fluorophores. L'enjeu qui se pose est donc de trouver une molécule semblable à l'APTS, qui aurait les mêmes fonctions que cette dernière. Paulus et Klockow [38] ont utilisé l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS) pour la détection et la séparation de différents hydrates de carbone par CE-LIF. De plus, ce produit a un coût 22 fois moindre que l'APTS. Le marquage avec l'ANTS facilite grandement la détection des oligosaccharides, même si son rendement de marquage est plus faible que celui de l'APTS. Ce fluorophore requiert l'utilisation d'un laser He-Cd ayant une longueur d'onde d'excitation de 325 nm, qui est disponible dans notre laboratoire de recherche, mais qui n'est pas fonctionnel pour le moment.

Dans le cas des autres fluorophores, il serait intéressant d'essayer le marquage des oligosaccharides avec le 2-Aminoacridine (AMAC) [48]. Cette molécule peut être détectée par LIF et permet une bonne absorbance en UV-Vis à une longueur d'onde de 254 nm. En effet, Kitagawa *et al.* [80] ont réussi à détecter des disaccharides marqués avec l'AMAC et à les séparer par CE et HPLC. Cependant, le marquage avec l'AMAC permet une meilleure séparation en HPLC qu'en CE, puisque cette molécule ne contribue pas à ajouter des charges aux oligosaccharides, ce qui peut affecter l'efficacité de la résolution par CE. Afin de déjouer cette difficulté, le tampon tétraborate de sodium peut être utilisé lors de la séparation. En effet, l'ion tétrahydroxyborate forme un complexe avec deux fonctions hydroxyles du polysaccharide et par conséquent, une charge négative est ajoutée sur ce dernier. Ce phénomène est connu sous le nom de complexation de borate et a souvent été observé lors de la séparation de saccharides par CE. [79]

En ce qui attrait la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC), il serait intéressant d'utiliser d'autres phases stationnaires conçues spécialement pour ce mode. L'utilisation d'une colonne diol, qui est plus polaire que la colonne CN, permettrait peut-être une meilleure séparation des composés fortement polaires. Ceci dit, les interactions des analytes avec la phase stationnaire polaire seraient plus élevées. De plus, il serait intéressant d'explorer les nouvelles colonnes chromatographiques permettant la séparation d'analytes chargés, telles que la colonne Obelisc N utilisée en phase normale [81]. Cette dernière est composée d'une surface de silice sur laquelle sont greffés des anions séparés des cations par une chaîne hydrophile (type Zwitterionique). Ainsi, des analytes chargés négativement pourront interagir avec les cations, ce qui permet d'avoir une rétention des molécules chargées. Plus une molécule est chargée négativement, davantage seront ses interactions avec la phase stationnaire positive.

En ce qui concerne la digestion enzymatique avec la cellulase provenant de la souche *Trichoderma Reesei*, il serait captivant d'effectuer une étude plus poussée sur les différents paramètres déjà étudiés. En effet, il serait intéressant d'étudier d'autres températures, temps, milieux et pH de la digestion enzymatique. La dénaturation de l'enzyme pourrait aussi être testée en augmentant la température. Sachant que la cellulase utilisée au cours de ce projet possède 6 U/mg de solide, il serait intéressant de valider cette information provenant du fournisseur. Une expérience possible consisterait à effectuer une courbe d'étalonnage de l'aire du pic du glucose en fonction de sa concentration, pour ensuite quantifier le glucose libéré pendant la digestion enzymatique. Ainsi, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme serait étudiée pour fin de comparaison avec d'autres cellulases présentes sur le marché. Cette procédure pourrait aussi permettre une quantification de quelques oligosaccharides libérés par l'enzyme, pour lesquels des standards seraient disponibles.

La spectrométrie de masse est un outil important à étudier, qui permettrait de détourner le problème d'identification des produits de digestion enzymatique, en absence de standards. En effet, il est possible d'utiliser la MS comme méthode de

caractérisation, afin d'obtenir plus d'information sur les différents oligosaccharides libérés par l'enzyme. Différents auteurs utilisent la MS pour séparer des oligosaccharides ayant des chaînes plus ou moins longues [82, 83]. Un marquage des oligosaccharides avec le 2-aminobenzamide (AB) serait à suggérer [84]. Wührer *et al.* [84] ont employé cet ionophore pour le marquage de glycans, qu'ils ont analysé par MALDI-ToF-MS en modes positif et négatif. L'utilisation d'une matrice telle que le 6-aza-2-thiothymine (ATT) leur a permis de détecter en mode négatif les espèces $[M-H]^-$ en plus des espèces $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ détectées en mode positif. Pour des analyses plus poussées, la spectrométrie de masse en tandem serait intéressante. Mischnick *et al.* [85] ont analysé un échantillon des produits de l'hydrolyse de l'éther de cellulose en utilisant comme source d'ionisation la nébulisation électrostatique (ESI). Ils ont réussi à caractériser et quantifier les oligosaccharides ayant différents degrés de polymérisation (DP) et degrés de substitution (DS).

Le couplage de l'électrophorèse capillaire ou de la chromatographie liquide à haute performance avec la spectrométrie de masse a pris ampleur ces dernières années [41, 86, 87]. Il serait captivant d'explorer ces techniques plus profondément. Par contre, on ne peut pas utiliser les mêmes conditions de séparation développées lors de ce projet, puisque les tampons pour le CE ne sont pas compatibles avec le MS. Ceci dit, l'application de l'électrophorèse capillaire couplé à la spectrométrie de masse, permettrait d'atteindre plus profondément l'objectif ultime de ce projet, tout en permettant l'identification des différents produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose. Les différents paramètres de la digestion enzymatique ont été étudiés au cours de ce projet et pourraient être appliqués dans le futur sans aucune modification. Il serait donc utile d'étudier et d'optimiser les conditions de séparation par CE-MS en étudiant différentes solutions tampons, différentes matrices et divers agents marqueurs.

Enfin, l'électrochromatographie capillaire (CEC) peut être une nouvelle alternative pour la séparation des oligosaccharides produits par digestion enzymatique du CMC et du HEC. Cette dernière est une technique séparative qui

possède une haute résolution et est très efficace pour les petites particules de phases stationnaires. De façon simple, l'application d'un champ électrique entraîne la phase mobile et les solutés à travers une phase stationnaire. La séparation des analytes se fait selon leur mobilité électrophorétique, leur coefficient de partage entre la phase stationnaire et la phase mobile, ainsi qu'en fonction du flux électroosmotique. Tout comme l'HPLC, une panoplie de phases stationnaires peut être utilisée. De plus, des recherches en cours permettent de réaliser un gradient du flux électroosmotique par variation de la différence de potentiel, ce qui entraînerait peut-être une meilleure séparation des oligosaccharides.

6 Bibliographie

1. Latif, A., T. Anwar, and S. Noor, *Two-step synthesis and characterization of carboxymethylcellulose from rayon grade wood pulp and cotton linter*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2007. **29**(2): p. 143-150.
2. Bashir, S., P. Critchley, and P.J. Derrick, *Use of enzymatic digestion and chemical methylation followed by matrix-assisted laser desorption / ionisation (MALDI) mass spectrometry to sequence a 60 kDa commercial fraction of cellulose acetate*. Cellulose, 2001. **8**: p. 81-89.
3. Momcilovic, D., B. Wittgren, K.-G. Wahlund, J. Karlsson, and G. Brinkmalm, *Sample preparation effects in matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of partially depolymerised carboxymethyl cellulose*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**: p. 1107-1115.
4. Saake, B., S. Horner, J. Puls, T. Heinze, and W. Koch, *A new approach in the analysis of the substituent distribution of carboxymethyl celluloses*. Cellulose, 2001. **8**: p. 59-67.
5. Zheng, W., D. Sauer, and J.W. McGinity, *Influence of hydroxyethylcellulose on the drug release properties of theophylline pellets coated with Eudragit RS 30 D*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. **59**(1): p. 147-154.
6. Rigo, M.V.R., D.A. Allemandi, and R.H. Manzo, *Swellable drug-polyelectrolyte matrices of drug-carboxymethylcellulose complexes. Characterization and delivery properties*. Drug Delivery, 2009. **16**(2): p. 108-115.
7. Shelton, M.C., J.D. Posey-Dowty, L. Lingerfelt, S.K. Kirk, S. Klein, and K.J. Edgar, *Enhanced dissolution of poorly soluble drugs from solid dispersions in carboxymethylcellulose acetate butyrate matrices*. ACS Symposium Series, 2009. **1017**: p. 93-113.
8. Buhus, G., M. Popa, and J. Desbrieres, *Hydrogels based on carboxymethylcellulose and gelatin for inclusion and release of chloramphenicol*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 2009. **24**(6): p. 525-545.
9. Garzon, M.d.L., A. Tecante, M. Ramirez-Gilly, and J. Palacios, *Viscoelastic behavior of solutions and hydrated tablets of individual hydroxypropylmethylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and their mixtures*. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica, 2009. **8**(3): p. 307-318.

10. Kulkarni, R.V. and S. Biswanath, *Novel pH-sensitive interpenetrating network hydrogel beads of carboxymethylcellulose-(polyacrylamide-grafted-alginate) for controlled release of ketoprofen: preparation and characterization*. Current Drug Delivery, 2008. **5**(4): p. 256-264.
11. Enebro, J. and S. Karlsson, *Improved matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of carboxymethyl cellulose*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**: p. 3693-3698.
12. Cohen, A., H. Schagerlöf, C. Nilsson, C. Melander, F. Tjerneld, and L. Gorton, *Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of enzyme-hydrolysed carboxymethylcellulose for investigation of enzyme selectivity and substituent pattern*. Journal of Chromatography A, 2004. **1029**: p. 87-95.
13. Momcilovic, D., B. Wittgren, K.-G. Wahlund, J. Karlsson, and G. Brinkmalm, *Sample preparation effects in matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of partially depolymerised methyl cellulose*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**: p. 1116-1124.
14. Nishikawa, K., A. Yekta, H.H. Pham, and M.A. Winnik, *Fluorescence studies of hydrophobically modified hydroxyethylcellulose (HMHEC) and pyrene-labeled HMHEC*. Langmuir, 1998. **14**: p. 7119-7129.
15. Svenson, S. and R.K. Prud'homme, *Unexpected changes of the shear viscosity in mixtures of hydrophobically modified hydroxyethylcellulose and CTAB/NaSal at low and high temperatures*. Polymeric Materials Science and Engineering, 1999. **81**: p. 503-504.
16. Zhou, J., Y. Qin, S. Yiu, and L. Zhang, *Homogenous synthesis of hydroxyethylcellulose in NaOH/Urea aqueous solution*. Macromolecular Bioscience, 2006. **6**: p. 84-89.
17. Gomez-Burgaz, M., G. Torrado, and S. Torrado, *Characterization and superficial transformations on mini-matrices made of interpolymers of chitosan and carboxymethylcellulose during in vitro clarithromycin release*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **73**(1): p. 130-139.
18. Britto, D.d. and O.B.G. Assis, *Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty forms*. Thermochimica Acta, 2009. **494**: p. 115-122.
19. Xiao, C., Y. Lu, H. Liu, and L. Zhang, *Preparation and characterization of konjac glucomannan and sodium carboxymethylcellulose blend films*. Journal of Applied Polymer Science, 2001. **80**: p. 26-31.

20. Yu, J., J. Yang, B. Liu, and X. Ma, *Preparation and characterization of glycerol plasticized-pea starch/ZnO-carboxymethylcellulose sodium nanocomposites*. *Bioresource Technology*, 2009. **100**: p. 2832-2841.
21. Lopes, L.V.S., G.O. Machado, A. Pawlicka, and J.P. Donoso, *Nuclear magnetic resonance and conductivity study of hydroxyethylcellulose based polymer gel electrolytes*. *Electrochimica Acta*, 2005. **50**: p. 3978-3984.
22. Regiani, A.M., C.E. Tambelli, A. Pawlicka, A.A.S. Curvelo, A. Gandini, J.-F. LeNest, and J.P. Donoso, *DSC and solid state NMR characterization of hydroxyethylcellulose/polyether film*. *Polymer International*, 2000. **49**: p. 960-964.
23. Bauer, H. and W. Voelter, *Ion exchange chromatography of carbohydrates*. *Chromatographia*, 1976. **9**(9): p. 433-439.
24. Broberg, A., *High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and N,N-dimethylation*. *Carbohydrate Research*, 2007. **342**: p. 1462-1469.
25. Camilleri, P., D. Tolson, and H. Birell, *Direct structural analysis of 2-aminoacridone derivatized oligosaccharides by high-performance liquid chromatography/mass spectrometric detection*. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1998. **12**: p. 144-148.
26. Koizumi, K., *High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **720**(1-2): p. 119-126.
27. Linden, J.C. and C.L. Lawhead, *Liquid chromatography of saccharides*. *Journal of Chromatography A*, 1975. **105**(1): p. 125-133.
28. Ying, L., S. Urgaonkar, J.G. Verkade, and D.W. Armstrong, *Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1079**: p. 146-152.
29. Churms, S.C., *Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **720**(1-2): p. 75-91.
30. Richardson, S., J. Lundqvist, B. Wittgren, F. Tjerneld, and L. Gorton, *Initial characterization of ethyl(hydroxyethyl) cellulose using enzymic degradation and chromatographic methods*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**: p. 1359-1363.

31. Thompson, C.M., *High resolution ion-exchange cellulose chromatography*. Laboratory Practice, 1967. **16**(8): p. 968-979.
32. Heinze, T. and K. Pfeiffer, *Studies on the synthesis and characterization of carboxymethylcellulose*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie, 1999. **266**: p. 37-45.
33. Liu, X.M., W. Gao, E.P. Maziarz, J.C. Salamone, J. Duex, and E. Xia, *Detailed characterization of cationic hydroxyethylcellulose derivatives using aqueous size-exclusion chromatography with on-line triple detection*. Journal of Chromatography A, 2006. **1104**: p. 145-153.
34. Beaudoin, M.-È., J. Gauthier, I. Boucher, and K.C. Waldron, *Capillary electrophoresis separation of a mixture of chitin et chitosan oligosaccharides derivatized using a modified fluorophore conjugation procedure*. Journal of Separation Science, 2005. **28**: p. 1390-1398.
35. Chen, F.-T.A. and R.A. Evangelista, *Analysis of mono- and oligosaccharide isomers derivatized with 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence*. Analytical Biochemistry, 1995. **230**: p. 273-280.
36. Evangelista, R.A., M.-S. Liu, and F.-T.A. Chen, *Characterization of 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. Analytical Chemistry, 1995. **67**: p. 2239-2245.
37. Kabel, M.A., W.H. Heijnis, E.J. Bakx, R. Kuijpers, A.G.J. Voragen, and H.A. Schols, *Capillary electrophoresis fingerprinting, quantification and mass-identification of various 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-derivatized oligomers derived from plant polysaccharides*. Journal of Chromatography A, 2006. **1137**: p. 119-126.
38. Paulus, A. and A. Klockow, *Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1996. **720**: p. 353-376.
39. Thibault, P. and S. Honda, *Capillary electrophoresis of carbohydrates*, in *Methods in molecular biology*, ed. J.M. Walker, Vol. 213. 2003, Totowa, New Jersey: Humana p.115.
40. Wang, C.-Y. and Y.-Z. Hsieh, *Analysis of chitin oligosaccharides by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence*. Journal of Chromatography A, 2002. **979**: p. 431-438.

41. Wolff, M.W., H.G. Bazin, and R.J. Lindhardt, *Analysis of fluorescently labeled oligosaccharides by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry*. Biotechnology Techniques, 1999. **13**: p. 797-801.
42. Motellier, S., C. Richet, and P. Merel, *Analysis of cellulose degradation products by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1998. **804**: p. 363-370.
43. Stefansson, M., *Characterization of cellulose derivatives and their migration behaviour in capillary electrophoresis*. Carbohydrate Research, 1998. **312**: p. 45-52.
44. Kathalijne, A., F.A. Oudhoff, W.T. Kok, and P.H. Wijnen, *Determination of the degree of substitution and its distribution of carboxymethylcelluloses by capillary zone electrophoresis*. Carbohydrate Research, 2004. **339**: p. 1917-1924.
45. Karlsson, J., D. Momcilovic, B. Wittgren, M. Schülein, F. Tjerneld, and G. Brinkmalm, *Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from Humicola insolens and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from Trichoderma reesei*. Biopolymers, 2002. **63**: p. 32-40.
46. Waldron, K.C., *Notes de cours CHM2102: Chimie analytique II*, Université de Montréal: Montréal,
47. Lattova, E., S. Snovida, and H. Perreault, *Influence of the labeling group on ionization and fragmentation of carbohydrates in mass spectrometry*. Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**: p. 683-696.
48. Charlwood, J., H. Birrell, A. Gribble, V. Burdes, D. Tolson, and P. Camilleri, *A probe for the versatile analysis and characterization of N-linked oligosaccharides*. Analytical Chemistry, 2000. **72**: p. 1453-1461.
49. Lattova, E. and H. Perreault, *Profiling of N-linked oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2003. **1016**: p. 71-87.
50. Lamari, F.N., R. Kuhn, and N.K. Karamanos, *Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis*. Journal of Chromatography B, 2003. **793**(1): p. 15-36.

51. Beaudoin, M.-È., *Développement de méthodes de séparation des oligosaccharides de chitine et chitosane par électrophorèse capillaire*, Département de chimie, 2005, Université de Montréal: Montréal, mémoire de maîtrise.
52. Tang, M.-C., *Développement de méthodes de séparation des chitooligosaccharides obtenus par déacétylation enzymatique*, Département de chimie, 2007, Université de Montréal: Montréal, mémoire de maîtrise.
53. Lattova, E. and H. Perreault, *Labelling saccharides with phenylhyrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, 2003. **793**: p. 167-179.
54. Evangelista, R.A., A. Guttman, and F.-T.A. Chen, *Acid-catalyzed reductive amination of aldoses with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate*. *Electrophoresis*, 1996. **17**: p. 347-351.
55. Suzuki, H., O. Muller, A. Guttman, and B.L. Karger, *Analysis of 1-Aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(22): p. 4554-4559.
56. Liu, Y., S. Urgaonkar, J.G. Verkade, and D.W. Armstrong, *Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1079**(1-2): p. 146-152.
57. Rashan Jr., J. and R. Chen, *Developing a versatile gradient elution LC/ELSD method for analyzing cellulose derivatives in pharmaceutical formulations*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007. **44**: p. 23-28.
58. Skoog, D.A., D.M. West, and F.J. Holler, *Chimie analytique*. 7^{ème} ed. 1997, Bruxelles, Italie: de boeck. p.660.
59. Alpert, A.J., *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*. *Journal of Chromatography A*, 1990. **499**: p. 177-196.
60. Alpert, A.J., A.K. Shukla, L.R. Shukla, S.W. Zieske, M.A.J. Yuen, A. Ferguson, M.P. Mehlert, and R. Orlando, *Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates*. *Journal of Chromatography A*, 1994. **676**(1): p. 191-202.
61. Ikegami, T., K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, and N. Tanaka, *Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1184**: p. 474-503.

62. Clement, A., D. Yong, and C. Brechet, *Simultaneous identification of sugars by HPLC using evaporative light scattering detection (ELSD) and refractive index detection (RI). Application to plant tissues*. Journal of Liquid Chromatography, 1992. **15**: p. 805-817.
63. Herbreteau, B., *Review and state of sugar analysis by high performance liquid chromatography*. Analisis, 1992. **20**: p. 355-374.
64. Herbreteau, B., M. Lafosse, L. Morin-Allory, and M. Dreux, *Separation of sugars and polyols by liquid chromatography using bare silica gels and evaporative light scattering detection*. Analytica Chimica Acta, 1992. **267**: p. 147-156.
65. Ereemeeva, T., T. Bikova, M. Eisimonte, U. Viesturs, and A. Treimanis, *Fractionation and molecular characteristics of cellulose during enzymatic hydrolysis*. Cellulose, 2001. **8**: p. 69-79.
66. Momcilovic, D., H. Schagerlöf, D. Röme, M. Jörntén-Karlsson, K.-E. Karlsson, B. Wittgren, F. Tjerneld, K.-G. Wahlund, and G. Brinkmalm, *Derivatization using dimethylamine for tandem mass spectrometric structure analysis of enzymatically and acidically depolymerized methyl cellulose*. Analytical Chemistry, 2005. **77**: p. 2948-2959.
67. Momcilovic, D., H. Schagerlöf, B. Wittgren, K.-G. Wahlund, and G. Brinkmalm, *Improved chemical analysis of cellulose ethers using dialkylamine derivatization and mass spectrometry*. Biomacromolecules, 2005. **6**: p. 2793-2799.
68. Schagerlöf, H., S. Richardson, D. Momcilovic, D. Brinkmalm, B. Wittgren, and F. Tjerneld, *Characterization of chemical substitution of hydroxypropyl cellulose using enzymatic degradation*. Biomacromolecules, 2006. **7**: p. 80-85.
69. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*, ed. Wiley. 3rd ed. 2004, Danvers, USA. p.472-495.
70. Joshua, H. and M. Goetz, *Separation of nucleobases on polar amino cyano high-performance liquid chromatography columns*. Journal of Chromatography 1984. **303**(1): p. 185-189.
71. Hemstrom, P. and K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(12): p. 1784-1821.

72. Suzuki, H., E. Kato, A. Matsuzaki, M. Ishikawa, Y. Harada, K. Tanikawa, and H. Nakagawa, *Analysis of saccharides possessing post-translational protein modifications by phenylhydrazine labeling using high-performance liquid chromatography*. Analytical Sciences, 2009. **25**: p. 1039-1042.
73. Robinson, S., E. Bergstöm, M. Seymour, and J. Thomas-Oates, *Screening of underivatized oligosaccharides extracted from the stems of Triticum aestivum using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2007. **79**: p. 2437-2445.
74. Abian, J., A.J. Oosterkamp, and E. Gelpi, *Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations*. Journal of Mass Spectrometry, 1999. **34**: p. 244-254.
75. Desai, M.J. and D.W. Armstrong, *Analysis of native amino acid and peptide enantiomers by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry 2004. **39**(2): p. 177-187.
76. Desai, M.J. and D.W. Armstrong, *Transforming chiral liquid chromatography methodologies into more sensitive liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry without losing enantioselectivity*. Journal of Chromatography A, 2004. **1035**(2): p. 203-210.
77. Schmidt, A., M. Karas, and T. Dülcks, *Effect of different solution flow rates of analyte ion signals in Nano-ESI MS, or: when does ESI turn into Nano-ESI?* Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**: p. 492-500.
78. El Hamdaoui, A., D. Reyx, and I. Campistron, *Effet d'extrémité de chaîne dans l'oxydation du caoutchouc naturel accélérée par la phénylhydrazine*. European Polymer Journal, 1999. **35**: p. 2165-2183.
79. Osthoff, H.D., K. Sujino, M.M. Palcic, and N.J. Dovichi, *Effects of amine modifiers on the separation of tetramethylrhodamine-labeled mono- and oligosaccharides by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2000. **895**: p. 285-290.
80. Kitagawa, H., A. Kinoshita, and K. Sugahara, *Microanalysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. Analytical Biochemistry, 1995. **232**: p. 114-121.
81. *SIELC Technologies*. 2002-2009, Illinois, USA, Available from: www.sielc.com/Products_Obelisc.html, 2009-12-03

82. Malvagna, P., G. Impallomeni, R. Cozzolino, E. Spina, and D. Garozzo, *New results on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of widely polydisperse hydrosoluble polymers*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002. **16**: p. 1599-1603.
83. Snovida, S.I. and H. Perreault, *A 2,5-dihydroxybenzoic acid/N,N-dimethylaniline matrix for the analysis of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**: p. 3711-3715.
84. Wuhrer, M. and A.M. Deelder, *Negative-mode MALDI-ToF/ToF-MS of oligosaccharides labeled with 2-Aminobenzamide*. Analytical Chemistry, 2005. **77**: p. 6954-6959.
85. Mischnick, P., W. Niedner, and R. Adden, *Possibilities of mass spectrometry and tandem-mass spectrometry in the analysis of cellulose ethers*. Macromolecular Symposia, 2005. **223**: p. 67-77.
86. Hsu, J., S.J. Chang, and A.H. Franz, *MALDI-ToF and ESI-MS analysis of oligosaccharides labeled with a new multifunctional oligosaccharide tag*. Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**: p. 194-204.
87. Mou, Q., Y. Zhang, L. Huang, and Z. Wang, *Separation and identification of oligosaccharides labeled with 3-amino-9-ethylcarbazole using high performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Sepu, 2009. **27**(1): p. 24-28.

7 Annexe

Équation 1: Exemple de calcul de LOD et LOQ du glucose-APTS à 200 nm.

La limite de detection a été déterminée à 3σ en mesurant le bruit pic-à-pic (N_{p-p}) sur le signal de fond pour une durée d'éluion d'environ 50 secondes. Un exemple de calcul est donné ci-dessous pour le pic de glucose-APTS, 2.5mg/mL. La limite de quantification a été déterminée à 10σ .

$$\sigma \cong \frac{1}{4} N_{p-p}$$

$$\sigma \cong \frac{1}{4} (0.00018 AU)$$

$$\sigma \cong 0.000045 AU$$

$$3\sigma \cong 0.000135 AU$$

$S_{\text{glucose-APTS}} = 0.0033 AU$ pour une concentration de 2.5mg/mL, alors :

$$LOD = \frac{0.000135 AU \times 2.5 mg / mL}{0.0033 AU}$$

$$LOD = 0.10 mg / mL$$

$$LOQ = 3.333 \times LOD$$

$$LOQ = 3.333 \times 0.10 mg / mL$$

$$LOQ = 0.33 mg / mL$$

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	3.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	MeOH-waste
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	1.00 min	BI:A2	BO:A2	forward	eau-waste
3		Rinse - Pressure	10.0 psi	1.00 min	BI:A3	BO:A3	forward	NaOH 1M-waste
4		Wait		1.00 min	BI:A4	BO:A4		eau-eau
5		Rinse - Pressure	20.0 psi	1.00 min	BI:A2	BO:A2	forward	eau-waste
6		Rinse - Pressure	15.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	tampon phosphate 50mM pH 2.921-waste
7	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	5.00 min	BI:B2	BO:B2	0.17 Min ramp, normal polarity	Séparation tampon phosphate 50mM pH2.921
8	5.00	End						

Tableau V: Méthode utilisée pour le conditionnement d'un nouveau capillaire en électrophorèse capillaire.

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	2.50 min	BI:A3	BO:A3	forward	NaOH 0.1M-waste
2		Wait		0.01 min	BI:A1	BO:A1		eau-eau
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	2.50 min	BI:A2	BO:A2	forward	eau-waste
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A3	forward	Tampon sodium phosphate 50mM pH2,924-waste
5		Inject - Pressure	0.5 psi	10.0 sec	SI:A1	BO:A4	Override, forward	Échantillon-waste
6		Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	BI:B1	BO:A3	No override, forward	Tampon sodium phosphate 50mM pH2,924-waste
7	0.00	Separate - Voltage	25.0 KV	20.00 min	BI:B2	BO:B2	0.17 Min ramp, reverse polarity	Séparation tampon sodium phosphate 50mM pH2,924
8	1.00	Autozero						
9	20.01	End						

Tableau VI : Méthode utilisée pour la séparation des produits de digestion enzymatique des dérivés de cellulose par électrophorèse capillaire.

