

Université de Montréal

**Développement de méthodes de séparation des oligosaccharides
de chitine et de chitosane par électrophorèse capillaire**

Par

Marie-Ève Beaudoin

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
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en chimie

Octobre 2005

© Marie-Ève Beaudoin, 2005



01

3

U54

2006

V.007

01
3
U54
2006
V.007

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Développement de méthodes de séparation des oligosaccharides
de chitine et de chitosane par électrophorèse capillaire**

Présenté par :
Marie-Ève Beaudoin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marius D'Amboise	président-rapporteur
Dr. Karen C. Waldron	directrice de recherche
Dr. Sébastien Sauvé	membre du jury

Sommaire

La chitine, poly- β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acétyl-D-glucosamine, est un déchet important de l'industrie de la pêche puisqu'elle se retrouve dans la carapace des crustacés. La chitine est non soluble dans l'eau, mais peut être convertie en chitosane, un dérivé partiellement ou complètement désacétylé et soluble dans l'eau. La méthode chimique présentement utilisée pour cette conversion est un traitement extrême dans des conditions basiques qui produisent une désacétylation non-spécifique et non reproductible. Une alternative à ce traitement chimique est l'utilisation d'une enzyme similaire à la chitine désacétylase qui produirait une désacétylation spécifique et reproductible tout en ne représentant aucun danger pour l'environnement. La production d'enzyme par l'évolution dirigée est conduite par d'autres groupes de recherche en collaboration avec notre laboratoire de chimie analytique. Afin de caractériser les produits de la réaction enzymatique et ainsi de pouvoir évaluer l'efficacité des enzymes développées, une méthode de séparation par l'électrophorèse capillaire (CE) a été développée pour l'analyse des oligomères de chitine et de chitosane.

Le développement de cette méthode de séparation d'oligomères de chitine et de chitosane par électrophorèse capillaire a débuté par le choix de la méthode de détection. Les oligosaccharides ne possédant pas de groupes chromophoriques, quelques chromophores ainsi qu'un fluorophore ont été testés afin de dériver les oligomères autrement non détectables par l'absorbance UV/Vis. La détection de fluorescence induite par laser est une technique plus dispendieuse, mais offre des avantages considérables dont une très grande sensibilité et une meilleure résolution des pics grâce aux petits volumes d'injection permis. C'est pourquoi cette méthode de détection a été privilégiée par rapport à une détection par UV, une méthode plus économique mais moins sensible. Le fluorophore choisi est l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS), une molécule souvent utilisée dans la littérature pour aider la détection de saccharides. La méthode de dérivation

tirée d'un article a été améliorée afin d'obtenir le rendement le plus élevé notamment pour la dérivation du chitosane. Les conditions optimales de la séparation par électrophorèse capillaire ont également été établies en variant plusieurs paramètres dont la nature, la concentration et le pH du tampon. La complexation de borate a été utilisée afin de ralentir l'élution des composés et d'augmenter la résolution.

Une étude sur le flux électroosmotique (EOF) a également été conduite. Afin de caractériser les charges portées par les APTS-chitines et -chitosanes, une détermination précise du EOF s'est révélée nécessaire. Trois différentes approches ont été testées : l'utilisation d'un marqueur neutre, la détection indirecte ainsi qu'une étude de la variation du courant.

Des échantillons traités avec l'enzyme *AxeA* ont été analysés avec la méthode d'électrophorèse capillaire afin de déterminer si l'enzyme agit de façon spécifique et reproductible sur les oligomères de chitine et de chitosane. Les échantillons traités ont tout simplement été dérivés à l'aide de la méthode améliorée et ce, sans être soumis à une procédure de purification. L'identification des pics obtenus s'est avérée difficile dû à l'absence de standards appropriés.

Afin de palier à ce problème, une étude préliminaire sur le couplage avec la spectrométrie de masse (MS) fût réalisée. En absence d'un instrument de CE-MS, des fractions contenant les analytes séparés furent collectées de l'appareil d'électrophorèse capillaire pour être ensuite analysés par spectrométrie de masse. Étant donné les différences entre ces deux techniques, des ajustements au niveau de la nature du tampon utilisé ont dû être apportés. Quoique la méthode couplée ne soit pas complètement optimisée, cette étude préliminaire servira de guide pour les futures expériences.

Mots-clés : Électrophorèse capillaire / Fluorescence induite par laser / Oligosaccharides de chitine et de chitosane / Dérivation / Acide 8-aminopyrène-

1,3,6-trisulfonique / Complexation de borate / Flux électroosmotique / Collecte de fraction / Couplage CE-MS

Abstract

Chitin, poly- β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetyl-D-glucosamine, is an important waste product of the fisheries industry because it is a major component of the shell of almost all shellfish. Chitin is non-soluble in water but can be converted into chitosan, a partially or completely deacetylated water-soluble derivative. The chemical treatment currently used for the conversion takes place in concentrated NaOH and produces a non-specific and non-reproducible deacetylation. As an alternative to this harsh treatment, an enzyme similar to chitin deacetylase could produce a specific and reproducible deacetylation without representing a danger for the environment. The production of enzyme by the technique known as directed evolution is being carried out by other research groups in collaboration with our analytical chemistry lab. In order to characterize the products of the enzymatic deacetylation and evaluate the efficiency of the enzyme, a separation method by capillary electrophoresis (CE) was developed for the analysis of chitin and chitosan oligomers.

The development of the separation method of chitin and chitosan oligomers started with the choice of the detection method. Oligosaccharides do not possess a chromophoric group thus making UV/Vis detection difficult. A few chromophores and one fluorophore were investigated for the derivatization of the oligomers. Laser induced fluorescence detection is an expensive technique but it offers several advantages including a very high sensitivity and a better resolution due to the very small injected volumes. This is why this technique was chosen over UV detection, a cheaper but less sensitive technique. The fluorophore chosen for the derivatization was 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS), a molecule often cited in the literature for the detection of carbohydrates. The derivatization method found in a recent paper was improved to increase the yield of the reaction, especially for chitosan. The optimum conditions for the capillary electrophoresis separation method were also established by varying some

parameters including the nature, concentration and pH of the buffer. Borate complexation was used in order to slow down the elution and increase the resolution.

A study of the electroosmotic flow (EOF) was also performed. In order to characterize the charges held by the APTS-chitin and -chitosan oligomers, a precise determination of the EOF was necessary. Three different approaches were taken: the use of a neutral marker, indirect detection and a current monitoring study.

Various chitin and chitosan samples were treated with the enzyme *AxeA* and then analyzed by our capillary electrophoresis method in order to determine the specificity and reproducibility character of the enzyme towards oligomers of chitin and chitosan. The samples treated with enzyme were simply derivatized using the improved method without any prior purification. However, identification of the peaks obtained was difficult due to the absence of appropriate standards.

To resolve this problem, a preliminary study on the coupling of CE with mass spectrometry (MS) was conducted. In the absence of a CE-MS instrument, fractions containing the separated analyte were collected at the outlet of the capillary electrophoresis instrument and then analyzed by mass spectrometry. Due to the main differences between these two techniques, some adjustments had to be made especially concerning the nature of the buffer. Even though the coupling method has not been completely optimized at this point, this preliminary study will serve as guidelines for the future experiments.

Keywords: Capillary electrophoresis / Laser-induced fluorescence / Chitin and chitosan oligosaccharides / Derivatization / 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid / Borate complexation / Electroosmotic flow / Fraction collection / CE-MS coupling

Table des matières

Sommaire	i
Abstract.....	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xv
1. Introduction générale	2
1.1 Chitine et chitosane.....	3
1.2 Électrophorèse capillaire	4
1.2.1 Complexation de borate.....	5
1.2.2 Fluorescence induite par laser	6
1.3 Objectifs du projet	8
2. Choix de la méthode de détection	10
2.1 Introduction.....	11
2.2 Matériels et méthodes	14
2.2.1 Provenance des produits	14
2.2.2 Préparation des tampons	15
2.2.3 Procédures de dérivation.....	15
2.2.4 Instrumentation	17
2.3 Résultats et discussion	18
2.3.1 Détection UV sans dérivation.....	18
2.3.2 Détection UV après dérivation	18
2.3.3 Détection LIF après dérivation	25
2.4 Conclusion	25
3. Capillary electrophoresis separation of a mixture of chitin and chitosan oligosaccharides derivatized using a modified fluorophore conjugation procedure	29
3.1 Abstract.....	30

3.2 Introduction.....	30
3.3 Experimental.....	32
3.3.1 Apparatus.....	32
3.3.2 Reagents and materials	32
3.3.3 Solution and sample preparation	33
3.4 Results and discussion	35
3.4.1 Choice of derivatization reagent.....	35
3.4.2 Choice of buffer system.....	36
3.4.3 Atypical migration order.....	38
3.4.4 Modified fluorophore conjugation procedure.....	40
3.4.5 Is borate complexation necessary?	42
3.4.6 Analysis of ISM chitosan samples.....	44
3.5 Conclusions.....	46
4. Caractérisation du flux électroosmotique	48
4.1 Introduction.....	49
4.2 Matériels et méthodes.....	51
4.2.1 Provenance des produits	51
4.2.2 Préparation des tampons	52
4.2.3 Instrumentation	52
4.3 Résultats et discussion	53
4.3.1 Utilisation d'un marqueur.....	53
4.3.2 Détection indirecte.....	55
4.3.3 Étude de la variation du courant	57
4.4 Conclusion	60
5. Analyse d'échantillons produits enzymatiquement.....	63
5.1 Introduction.....	64
5.2 Matériels et méthodes.....	65
5.2.1 Provenance des produits	65
5.2.2 Préparation des tampons	66
5.2.3 Préparation des échantillons	66
5.2.4 Instrumentation	66

5.3 Résultats et discussion	67
5.3.1 Oligomères de chitine	67
5.3.2 ISM chitosane	72
5.4 Conclusion	73
6. Étude préliminaire d'un couplage « off-line » CE-MS.....	75
6.1 Introduction.....	76
6.2 Matériels et méthodes	78
6.2.1 Provenance des produits	78
6.2.2 Préparation des tampons	79
6.2.3 Préparation des échantillons	79
6.2.4 Préparation de la résine et des matrices	80
6.2.5 Instrumentation	80
6.3 Résultats et discussion	81
6.3.1 Premières analyses MALDI.....	81
6.3.2 Procédures de nettoyage de l'échantillon	84
6.3.3 Étude de la morpholine.....	87
6.3.4 Collecte de fractions	91
6.3.5 Analyse MALDI des échantillons récoltés	95
6.3.6 Identification de la source d'hydrolyse.....	96
6.3.7 Étude des tampons de triéthanolamine et d'histidine	98
6.4 Conclusion.....	100
7. Conclusion générale.....	104
7.1 Conclusion	105
7.2 Directions futures.....	107
8. Références.....	111

Liste des tableaux

Table 3.1 Migration time reproducibility for all APTS-oligomers separated in 80mM borate buffer pH 8.4, at 25 kV.	38
Table 3.2 Limits of quantification (LOQ) for all APTS-oligomers under the two sets of derivatization conditions. (LOQ = $10s$, where s is the standard deviation of baseline noise calculated over an interval of ~ 1 min).	40
Tableau 4.1 Détermination du EOF à l'aide de trois techniques différentes (ND : donnée non disponible).....	61
Tableau 6.1 Étude de reproductibilité des temps de migration des oligomères de chitines dans le tampon de morpholine en fonction de la durée du conditionnement initial du capillaire.	91
Tableau 6.2 Étude de reproductibilité des temps de migration des oligomères de chitines dans les trois tampons testés.....	100

Liste des figures

Figure 1-1 Mécanisme de complexation de borate.....	5
Figure 1-2 Schéma de l'appareil de détection de fluorescence par laser [24]......	8
Figure 2-1 Structure des chromophores.....	12
Figure 2-2 Structure du fluorophore.....	14
Figure 2-3 Séparation d'un mélange d'oligomères de chitine et de N-acétyl-glucosamine dérivés avec le PHZ (DP 1-6). La séparation est effectuée dans un tampon de borate 100mM à pH 10.4 et avec un voltage de 12 kV. Le détecteur est ajusté à 254 nm. Identification des pics : 6, hexamère d'APTS-chitine, etc.	20
Figure 2-4 Temps de migration des dérivés ABEE d'oligomères de chitine en fonction du pH d'un tampon de borate à 100mM.....	22
Figure 2-5 Temps de migration des dérivés ABEE d'oligomères de chitine en fonction de la concentration de borate d'un tampon à pH 10.4.....	22
Figure 2-6 Temps de migration des dérivés ABEE d'oligomères de chitine en fonction de la concentration de phosphate d'un tampon à pH 7.0 en présence de 20mM de SDS.....	24
Figure 3-1 APTS derivatization reaction with the disaccharides of chitin and chitosan.....	34
Figure 3-2 Separation of a mixture of APTS-derivatized chitin and chitosan oligomers (DP 2 to 6) carried out in (a) 120mM; (b) 100mM and (c) 80mM sodium borate buffer, pH 8.4, at 25 kV. All other conditions are described in section 3.3. Identification of peaks: 6*, APTS-chitosan oligosaccharide hexamer (DP = 6); 6, APTS-chitin oligosaccharide hexamer (DP = 6); 5*, APTS-chitosan pentamer (DP = 5); 5, APTS-chitin pentamer (DP = 5); and so on.....	39
Figure 3-3 Peak height of APTS-chitin tetramer (■) and APTS-chitosan tetramer (▲) as a function of derivatization time. Separation was carried out in 80mM sodium borate buffer, pH 8.4, at 25 kV. All other conditions are described in section 3.3.....	41
Figure 3-4 Separation of a mixture of APTS-derivatized chitin and chitosan oligomers (DP 2 to 6) carried out in 50mM sodium phosphate buffer, pH 8.5, at 25 kV. Derivatization quenching solvent is (a) Milli-Q water and (b) 80mM borate buffer, pH 8.4. All other conditions are described in section 3.3. Identification of peaks as in Figure 3.2; imp, impurity.	43

- Figure 3-5** Separation of ISM chitosan derivatized with APTS (a) after enzymatic deacetylation and (b) control, carried out in 80mM sodium borate buffer, pH 8.4, at 25 kV. All other conditions are described in section 3.3. Peaks marked with arrows indicate an increase or decrease in peak height after treatment with a deacetylase-like enzyme.44
- Figure 4-1** Variation de la mobilité électroosmotique en fonction du pH50
- Figure 4-2** Molécules testées comme marqueur neutre. a) sel d'acriflavine ; b) acridine orange et c) acridine jaune G54
- Figure 4-3** Séparation d'acridine orange à 0.001 mg/mL. La séparation est effectuée dans un tampon de borate 80mM à pH 8.4 et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.55
- Figure 4-4** Séparation d'une solution de 1% de DMSO. La séparation est effectuée dans un tampon de borate 80mM à pH 8.4 contenant 0.001 mg/mL d'acridine orange et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée de façon indirecte par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.56
- Figure 4-5** Tracé du courant en fonction du temps pour une séparation impliquant un tampon initial de 80mM borate pH 8.4 et un tampon final de 70mM borate pH 8.4. Le point de convergence à 6.0 min se traduit en une valeur de 4.9 min pour le flux électroosmotique à la fenêtre de détection.58
- Figure 4-6** Courbe d'étalonnage du EOF en fonction de la concentration moyenne de borate dans le tampon. Équations : 1) relation linéaire $y = 0.0328x + 2.502$ ($R^2 = 0.9762$); 2) relation quadratique : $y = -0.0009x^2 + 0.1442x - 1.0766$ ($R^2 = 0.9995$).59
- Figure 5-1** Réaction de désacétylation par traitement chimique de la chitine pour la production de chitosan.64
- Figure 5-2** Séparation du trimère d'APTS-chitine (DP 3) a) contrôle et b) après réaction enzymatique avec *AxeA*. La séparation est effectuée dans un tampon de borate 80mM à pH 8.4 et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.68
- Figure 5-3** Séparation de l'APTS-chitine DP 6 a) contrôle et b) après réaction enzymatique avec *AxeA*. L'identification des séries de pics est comme suit : 6, hexamère d'APTS-chitine partiellement désacétylé, etc. Les détails de la séparation sont donnés à la Figure 5.2.70
- Figure 5-4** Séparation d'un mélange d'APTS-chitine DP 2-6 a) contrôle et b) après réaction enzymatique avec *AxeA*. L'identification des séries de pics est comme suit : 6, hexamère d'APTS-chitine partiellement désacétylé, etc. Les détails de la séparation sont donnés à la Figure 5.2.71
- Figure 6-1** Schéma des modes linéaire et réflectron disponibles sur un analyseur de masse TOF77

- Figure 6-2** Influence du tampon borate sur l'analyse MALDI en mode linéaire et positif, des standards de chitine (dimère $[M+Na]^+$ m/z 448, tétramère $[M+Na]^+$ m/z 853, hexamère $[M+Na]^+$ m/z 1260) dilués dans a) de l'eau distillée, b) du tampon 80mM borate pH 8.5 et c) du tampon 50mM borate pH 8.5. La matrice DHB a été préparée dans eau: éthanol 1:1 v/v et traitée avec la résine. ...86
- Figure 6-3** Influence de la nature du tampon MALDI en mode réflectron et positif, des standards de chitine (dimère $[M+Na]^+$ m/z 448, tétramère $[M+Na]^+$ m/z 853, hexamère $[M+Na]^+$ m/z 1260) dilués dans a) de l'eau distillée, b) de la morpholine. La matrice sDHB a été préparée dans eau: acétonitrile 3:7 v/v et traitée avec la résine.88
- Figure 6-4** Séparation d'un mélange d'APTS-chitosanes à a) 100 μ M et b) 25 μ M. La séparation est effectuée dans un tampon de morpholine 80mM à pH 8.0 et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.90
- Figure 6-5** Collecte de fraction dans le tampon de 80mM morpholine pH 8.0 : a) détection du pic d'APTS-hexamère de chitine par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm; b) trace du courant.93
- Figure 6-6** Collecte de fraction dans le tampon de 80mM morpholine pH 8.0 : a) échantillon initial d'APTS-hexamère de chitine à 500 μ M ; b) échantillon collecté d'APTS-hexamère de chitine à 0.5 – 0.9 μ M. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.94
- Figure 6-7** Étude de l'APTS-hexamère de chitine a) sans aucune purification post-réaction et b) obtenu par collecte de fraction, en mode réflectron et négatif (hexamère $[M+Na]^+$ m/z 1260). La matrice sDHB a été préparée dans eau: acétonitrile 3:7 v/v et traitée avec la résine.96
- Figure 6-8** Séparation d'un mélange d'APTS-chitines à 1.56 μ M dans a) 80mM morpholine pH 8.0 ; b) 120mM triéthanolamine pH 8.0 et c) 80mM histidine pH 8.5. L'identification des pics est comme suit : 6, hexamère d'APTS-chitine, etc. Le voltage de séparation est ajustée à 25 kV pour la morpholine et la triéthanolamine et à 10 kV pour l'histidine. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.99

Liste des abréviations

APTS	8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique)
ABEE	p-aminobenzoic ethyl ester (4-aminobenzoate d'éthyle)
BHZ	p-hydrazinobenzensulfonic acid (acide 4-hydrazinobenzène sulfonique)
CE	capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire)
CMC	concentration micellaire critique
CTAB	cetylmethylammonium bromide (bromure de cétyltriméthylammonium)
CZE	capillaire zone electrophoresis (électrophorèse en solution libre)
DHB	acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMSO	diméthylsulfoxyde
DP	degré de polymérisation
EOF	electroosmotic flow (flux électroosmotique)
ESI	electrospray ionization (nébulisation électrostatique)
3-HPA	3-hydroxypicolinic acid (acide 3-hydroxypiccolinique)
LIF	laser induced fluorescence (fluorescence induite par laser)
LOD	limit of detection (limite de détection)
MALDI	matrix assisted laser desorption-ionization (désorption laser avec matrice)
MEKC	micellar electrokinetic chromatography (électrophorèse capillaire en milieu micellaire)
MPP	3-méthyl-1-phényl-2-pyrazolin-5-one
MS	mass spectrometry (spectrométrie de masse)
PHZ	phénylhydrazine
RSD	relative standard deviation (écart-type relatif)

sDHB	super DHB (mélange d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et d'acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodécyl sulfate de sodium)
THAP	2',4',6'-trihydroxyacétophénone
TOF	time-of-flight (temps de vol)
UV	ultraviolet

Remerciements

Je tiens à remercier la Professeure Karen Waldron de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son groupe de recherche. J'ai beaucoup appris au cours des deux dernières années et mon indépendance au laboratoire est un reflet de la confiance qu'elle a toujours eu en mes capacités.

Je veux remercier tous les gens avec qui j'ai dû interagir par le biais de collaborations : Isabelle Boucher (ISM Biopolymer, Inc.), Claude Dupont (INRS-Armand-Frappier), Krista Morley (Université McGill), Audrey Nisole (Université de Montréal) et tout spécialement, Julie Gauthier pour l'excellent travail qu'elle a fait au labo durant l'été 2004.

Je souhaite également remercier la Professeure Joelle Pelletier et tout son groupe de recherche tant pour les discussions scientifiques que pour l'atmosphère amicale et stimulante.

Un gros merci à Obayda Debs et Catherine Dartiguenave pour les études préliminaires sur la spectrométrie de masse.

Finalement, je tiens à remercier ma famille pour le soutien constant qu'elle m'a apporté. Un merci tout spécial à John qui n'a jamais cessé de croire en moi.

1. Introduction générale

1.1 Chitine et chitosane

La chitine est un résidu important de l'industrie de la pêche. Elle est notamment une composante de l'exosquelette d'insectes et de plusieurs crustacés dont le homard, la crevette et le crabe et elle est également retrouvée dans la paroi cellulaire de certaines levures et dans de nombreux types de champignons [1]. Elle est donc présente en très grandes quantités dans la nature. Ce composé, aussi connu sous le nom de poly- β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acétyl-D-glucosamine, est insoluble dans l'eau et possède, par conséquent, des applications limitées. Lorsque la chitine est partiellement ou complètement désacétylée, elle est connue sous le nom de chitosane. Ce dérivé de la chitine est soluble dans l'eau et le pKa de son groupe amine libre est d'environ 6.5 [1-4].

Grâce à cette fonction pouvant être ionisée, le chitosane possède une grande variété d'applications. Il peut être utilisé afin d'améliorer l'absorption de médicaments [2] ou simplement comme vecteur de ces derniers dû à ses caractéristiques de biocompatibilité et biodégradabilité [3]. L'industrie des produits alimentaires et cosmétiques [1] utilise également le chitosane dans divers produits. Il existe même des régimes amaigrissant à base de ce composé [5]. De plus, un groupe de recherche de l'École Polytechnique de Montréal travaille présentement à démontrer que le chitosane peut être utilisé pour la régénération de cartilage.

Le chitosane a donc plusieurs applications mais sa production est difficile. Le traitement extrême présentement utilisé, une longue période de chauffage avec du NaOH concentré, représente un danger pour l'environnement à cause des déchets non biodégradables qui sont générés. De plus, le chitosane produit par cette technique chimique est le résultat d'une désacétylation non spécifique et peu reproductible. Puisque les propriétés fonctionnelles du chitosane sont directement reliées à sa masse moléculaire [6] et aussi très probablement au degré et au patron de désacétylation, il est important de trouver une alternative au traitement

chimique. Grâce à une enzyme similaire à la chitine désacétylase [7], une réaction de désacétylation plus spécifique et reproductible pourrait être obtenue. Le développement d'enzymes mutantes par la technique d'évolution dirigée pourra créer une banque d'enzymes ayant des caractéristiques de désacétylation différentes et donc un degré d'efficacité variable.

Une variété de produits de chitosane devrait être obtenue suite à la réaction de désacétylation enzymatique. Ces produits pourraient avoir le même degré de désacétylation mais une composition différente. Afin de pouvoir les distinguer, il est nécessaire d'utiliser une technique analytique hautement efficace. L'électrophorèse capillaire se classe parmi les meilleures techniques de séparation grâce à sa haute efficacité et a donc été choisie dans le cadre de ce projet.

1.2 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire présente plusieurs avantages comme technique de séparation. Son haut pouvoir de résolution fait d'elle une technique de choix. En électrophorèse capillaire, la séparation se produit lorsque des molécules chargées se déplacent dans un capillaire de faible diamètre sous l'influence d'un champ électrique assez important. Cette technique, introduite par Jorgensen en 1981, augmente en popularité avec les années et de plus en plus d'applications de cette méthode analytique sont développées. Il existe plusieurs modes d'électrophorèse capillaire [8] dont deux qui ont été utilisés lors de ce projet. Le premier et le plus commun, est l'électrophorèse en solution libre (CZE) où la séparation repose sur le rapport charge-sur-masse (q/M). Un deuxième type est l'électrophorèse en milieu micellaire (MEKC) où, cette fois-ci, la séparation dépend d'un mécanisme de partage entre les micelles et la solution tampon (interactions polaires / non polaires). Cette dernière technique est utilisée principalement lorsque les analytes à séparer sont neutres et peuvent donc interagir avec les micelles.

Un des avantages important de l'électrophorèse capillaire comparativement aux techniques analytiques plus populaires dont la

chromatographie liquide à haute performance (CLHP), est le faible volume d'injection et la faible quantité de déchets générés. En effet, le capillaire contient environ 1.0 μL de solution tampon et il est possible d'injecter un volume jusqu'à 1000 plus petit que le volume total du capillaire. Les volumes d'injection sont donc de l'ordre de nanolitres et permettent ainsi une séparation de très haute résolution.

Les mécanismes de séparation en électrophorèse capillaire peuvent être modifiés par l'ajout de différents additifs [9]. Par exemple, l'ajout d'un surfactant cationique peut modifier le flux électroosmotique ; l'ajout un solvant organique peut également modifier le flux mais aussi faire varier la sélectivité et la solubilité des analytes et finalement, l'ajout de borate peut entraîner la formation de complexes avec des composés ayant des groupes $-\text{OH}$, comme montré dans la prochaine section.

1.2.1 Complexation de borate

La complexation de borate avec les saccharides est un phénomène bien décrit dans la littérature [10-22]. Quoique le mécanisme soit connu pour les sucres sous leur forme naturelle, celui concernant les saccharides dérivés n'est pas encore bien compris. Contrairement à ce qu'il a souvent été suggéré, c'est l'ion tétrahydroxyborate et non l'acide borique qui forme le complexe. La Figure 1.1 démontre bien un mécanisme [8, 19] selon lequel l'ion tétrahydroxyborate forme un mono complexe avec deux groupes hydroxyle du monosaccharide.

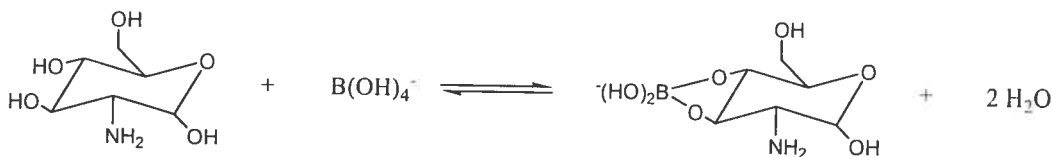


Figure 1-1 Mécanisme de complexation de borate

L'ajout de borate a comme effet d'augmenter la qualité de la séparation en ajoutant une charge négative à un composé autrement neutre. La séparation par électrophorèse capillaire en est donc facilitée. Certaines études ont même démontré que la formation de complexes avec le borate augmente le coefficient d'extinction des saccharides [18]. Il est important de mentionner que le degré de complexation peut varier selon plusieurs facteurs. Premièrement, la position des groupements hydroxyles est très importante. Un complexe plus stable est formé lorsque les groupes hydroxyles sont en position vicinale et il est aussi préférable qu'ils soit *cis* l'un par rapport à l'autre [11, 16, 19]. Un autre facteur important à prendre en considération est le pH ainsi que la concentration de borate [13, 14, 16, 17, 20]. Plus ces deux facteurs sont élevés, plus le degré de complexation est élevé. Finalement, la présence de substituents sur la structure du saccharide peut influencer la complexation [19].

Dans le cas de la complexation entre le borate et les oligomères de chitine et de chitosane dérivés, le mécanisme est incertain. Puisque le chromophore ou fluorophore ajouté se fixe à l'extrémité réductrice du saccharide, il n'existe en fait qu'une seule position favorable (groupes hydroxyles sur carbones vicinaux) pour la complexation avec le borate. Il est peu probable qu'un complexe supplémentaire se forme avec les autres groupements hydroxyles vu la distance élevée les séparant. Donc, tout au long de ce projet, l'hypothèse émise est celle de la formation d'un seul complexe de borate et l'addition d'une seule charge négative et ce, pour tous les oligosaccharides étudiés.

1.2.2 Fluorescence induite par laser

En électrophorèse capillaire, la méthode de détection la plus commune est l'absorbance dans la région de l'ultraviolet (UV). Lorsque les analytes possèdent un groupe chromophore, la détection UV est la plus simple, rapide et économique. Dans le cas de l'analyse de saccharides, la détection UV se retrouve peu performante vu l'absence de groupement capable d'atteindre un niveau d'excitation en absorbant la lumière UV. Un autre type de détection disponible

avec l'électrophorèse capillaire est la fluorescence induite par laser (LIF). Cette méthode offre plusieurs avantages dont une très grande sensibilité et un large domaine de linéarité. Malheureusement, certains inconvénients s'y rattachent dont un important coût d'opération et le fait que peu de molécules possèdent naturellement une fonction fluorescente. La fluorescence est également dépendante de certains facteurs dont la température, le pH et la force ionique [23].

Malgré ces désavantages, la détection de fluorescence induite par laser est l'une des techniques les plus sensibles et des limites de détection (LOD) très basses peuvent être obtenues. En effet, l'intensité de la fluorescence (I_f) est proportionnelle à la puissance radiante incidente de la source (I_0) selon l'équation 1.1 où Φ_f est le ratio du nombre de photons émis sur le nombre des photons absorbés, ϵ est le coefficient d'absorptivité molaire, c est la concentration, et l est la longueur du parcours optique.

$$I_f = 2.303 \Phi_f I_0 \epsilon c l \quad (1.1)$$

Puisqu'un laser est utilisé comme source de radiation et que la focalisation de ce laser est très bonne, la puissance radiante incidente est élevée et entraîne une forte intensité de la fluorescence.

La fluorescence est habituellement mesurée à un angle de 90° afin de limiter l'intensité de la lumière incidente diffuse, mais l'instrument disponible au laboratoire présente une configuration légèrement différente [24] (Figure 1.2). Selon cette configuration, il est techniquement possible d'utiliser deux lasers parallèlement afin de mesurer la fluorescence à deux longueurs d'ondes simultanément. La compagnie Beckman Coulter offre en effet deux lasers différents : un laser d'ions d'argon ayant une λ_{em} de 488 nm et un module de laser diode ayant une λ_{em} de 635 nm. L'instrument disponible au laboratoire ne possède malheureusement que le laser d'ions d'argon (ex., Laser 1 à la fig. 1.2) et un seul filtre d'émission de 520 nm de type « cut-off » au lieu de bade passante, c'est donc cetyte configuration qui a été utilisée lors des mesures de fluorescence.

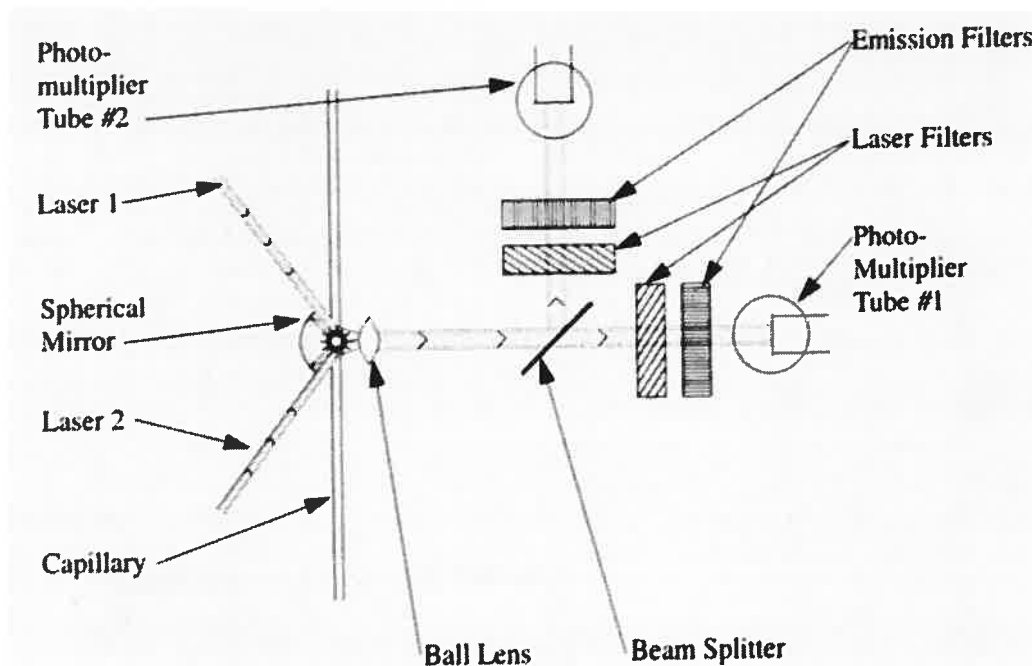


Figure 1-2 Schéma de l'appareil de détection de fluorescence par laser [24].

1.3 Objectifs du projet

Notre groupe de recherche s'intéresse principalement aux applications de l'électrophorèse capillaire. Nous avons donc été approchés par quelques groupes en collaboration afin de développer une méthode d'analyse pour les oligomères de chitine et de chitosane.

Le premier objectif de ce projet était de choisir une méthode de détection. Comme il sera discuté dans le chapitre 2, plusieurs chromophores ainsi qu'un fluorophore ont été testés afin d'obtenir une détection aussi sensible que possible. Un compromis entre le coût d'opération et la sensibilité a dû être fait puisque le choix final s'est avéré être le plus dispendieux mais le plus sensible.

L'étape suivante est une de maximisation. Deux aspects de la méthode ont été travaillés : la dérivation ainsi que la séparation par électrophorèse

capillaire. Cette discussion se retrouve au chapitre 3, dans un manuscrit publié dans le *Journal of Separation Science*.

Dans le chapitre 4, la question de l'état d'ionisation des analytes a été soulevée après l'amélioration de la méthode de séparation et une étude de flux électroosmotique s'est avérée nécessaire. Trois différentes approches ont été prises : l'utilisation d'un marqueur neutre ; la détection indirecte et l'étude de l'évolution du courant.

Après avoir obtenu une méthode de séparation par électrophorèse capillaire, l'analyse d'échantillons produits de façon enzymatique se retrouve au chapitre 5. Les oligomères de chitine et de chitosane ont été traités avec une enzyme similaire à la chitine désacétylase et ensuite analysés avec notre méthode. L'analyse de ce type d'échantillons représente une application possible de la méthode de séparation développée.

Finalement, une étude préliminaire de pseudo-couplage d'un appareil d'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse est présentée au chapitre 6. Cette étude comprend plusieurs facettes dont la collecte de fractions sur l'appareil d'électrophorèse, l'analyse de standards par spectrométrie de masse et le développement d'une méthode de préparations des échantillons. Afin de conjuguer ces deux méthodes très différentes l'une de l'autre, certains paramètres de notre méthode de séparation ont dû être variés dont la nature du tampon pour fins de compatibilité. La reproductibilité ainsi que l'efficacité de chaque tampon a également été étudiée.

2. Choix de la méthode de détection

2.1 Introduction

Selon les objectifs du projet, il est primordial de choisir la méthode de détection en premier lieu. Dans le cas des chitines et chitosanes, ce choix s'est avéré difficile. En effet, trois approches différentes étaient disponibles : une détection dans la partie basse du spectre UV ; une dérivation avec un chromophore suivie de la détection UV et finalement, une dérivation avec un fluorophore suivie de la détection de fluorescence induite par laser.

La première option présente quelques avantages dont un très faible coût d'opération ainsi qu'une préparation d'échantillons assez simplifiée. Les saccharides, même s'ils ne possèdent pas de groupe chromophore, absorbent la lumière UV à une longueur d'onde d'environ 185 nm. Malheureusement, à cette basse longueur d'onde, l'absorptivité molaire des saccharides est faible [23, 25] et il faut également prendre en considération que beaucoup d'autres substances absorbent à de faibles longueurs d'onde (ex., les composants du tampon) créant ainsi un signal de fond plus important.

La deuxième option est celle d'une réaction de dérivation avec un chromophore. Les chromophores sont habituellement peu dispendieux et leur utilisation est assez bien documentée dans la littérature. Lors du choix d'un chromophore, il est important de prendre deux aspects en considération : la difficulté reliée à l'exécution de la réaction de dérivation et la longueur d'onde à laquelle le chromophore a une absorption maximale. Quelques chromophores ont été testés et ils possèdent tous des caractéristiques différentes. Les structures de ces chromophores se retrouvent à la Figure 2.1.

L'acide 4-hydrazinobenzène sulfonique (BHZ), quoique peu souvent utilisé pour les saccharides, a été testé par Wang et Chen [26] pour l'analyse de mono-, di- et trisaccharides. Ce chromophore possède un groupement SO_3H , ayant un faible pK_a , ce qui permet d'ajouter une charge négative sur les saccharides dérivés.

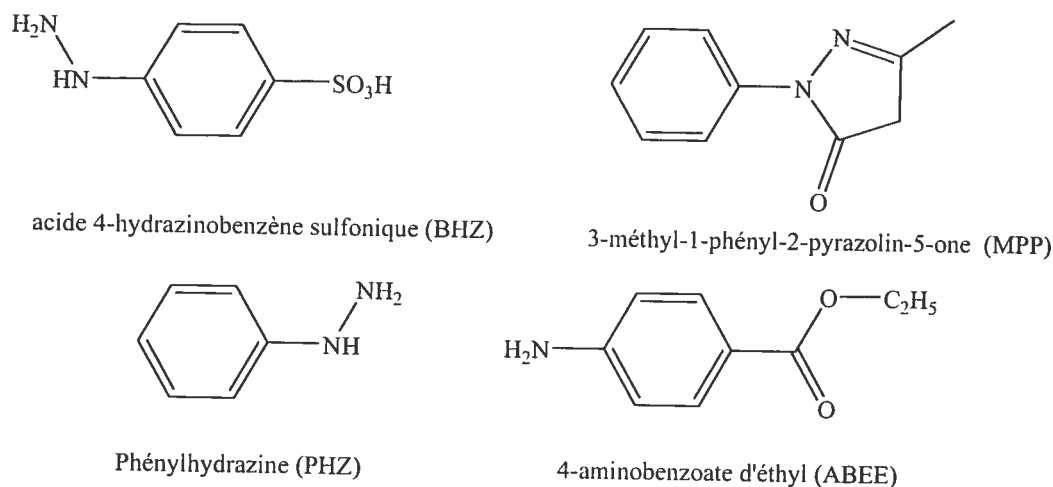


Figure 2-1 Structure des chromophores

Le chromophore 3-méthyl-1-phényl-2-pyrazolin-5-one (MPP) ayant déjà été utilisé pour une dérivation pré-colonne en HPLC, convient tout aussi bien à une méthode d'électrophorèse capillaire [15]. Cette molécule est par contre neutre, donc l'utilisation de complexes de borate est nécessaire à la séparation des oligosaccharides dérivés avec le MPP.

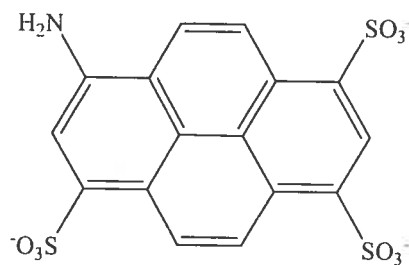
La phénylhydrazine (PHZ) est un chromophore utilisé afin d'influencer le patron de fragmentation des oligosaccharides en spectrométrie de masse [27-29]. La dérivation est simple, rapide et semble être quantitative pour certains oligosaccharides. Quoique la méthode de spectrométrie de masse ne comprenne pas de séparation analytique, la similarité du PHZ avec les autres chromophores testés a permis l'élaboration d'une séparation par électrophorèse capillaire.

Le 4-aminobenzoate d'éthyle (ABEE) est le dernier chromophore étudié dans le contexte de ce projet. Malgré le fait que la dérivation avec le ABEE ne soit pas considérée comme quantitative, l'utilisation de ce chromophore est bien documentée dans la littérature [16, 21, 22, 30-33]. Deux types de réaction de dérivation sont possible avec le ABEE : l'amination réductrice et la glycosylation. Dans le premier cas, le produit final contient un monosaccharide en forme ouverte tandis que dans le deuxième cas, la forme

fermée est conservée. Comme dans les cas du MPP et PHZ, le ABEE n'ajoute pas de charge au saccharide. Il en découle donc que l'utilisation du borate est nécessaire.

Une autre possibilité s'offre pour l'analyse de dérivés de ABEE, c'est-à-dire l'utilisation de l'électrophorèse capillaire en milieu micellaire (MEKC). En 1984, Terabe [34] introduit cette nouvelle méthode pour la séparation d'analytes neutres. Cette technique requiert l'utilisation d'une concentration de surfactant supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). La formation de micelles à l'intérieur du capillaire représente une phase secondaire stable capable de solubiliser les analytes non polaires [35]. Les analytes peuvent donc ainsi se séparer selon leurs propriétés hydrophobes et traversent le capillaire en étant en équilibre entre les micelles et le tampon de séparation. Des micelles de dodécyl sulfate de sodium (SDS) ont été choisies selon le travail de Kratschman *et al.* [36] ainsi que le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) pour simple fin de comparaison avec les résultats obtenus avec le SDS.

La dernière option de détection implique l'utilisation d'un fluorophore. Quoique le fluorophore soit beaucoup plus dispendieux que les chromophores étudiés, la méthode de détection LIF est beaucoup plus sensible que l'UV. Le fluorophore choisi est l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS) et sa structure se retrouve à la Figure 2.2. L'utilisation de ce fluorophore pour l'analyse de saccharide est une procédure bien connue [10, 11, 25, 37-40]. Les APTS-oligomères de chitine ont même été séparés et caractérisés par Wang et Hsieh [37], une méthode qui a servi de point de départ pour ce projet de recherche. Puisque les oligomères de chitosane sont également inclus dans le projet décrit ici, certaines modifications ont dues être apportées à la procédure originale proposée par Wang et Hsieh. Il est important de noter que l'APTS possède trois groupes sulfonates ce qui ajoute trois charges négatives aux saccharides autrement neutres. Tous les détails concernant l'usage de l'APTS se trouvent au chapitre 3.



acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS)

Figure 2-2 Structure du fluorophore

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Provenance des produits¹

Les chromophores BHZ (*ND*), PHZ (*97%*) et MPP (*99%*) ainsi que le borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (*99%*), l'acétate d'éthyle (*99%*), le borohydrure de sodium (NaBH_3CN) (*95%*) et le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) (*99%*) ont tous été achetés de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). L'acétate d'ammonium (*97%*), le méthanol (*99.8%*) et le dodécyl sulfate de sodium (SDS) (*96%*) ont été obtenus chez Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). L'ABEE (*98%*) provient de Fluka (Oakville, ON, Canada), le carbonate de sodium (Na_2CO_3) (*98%*) d'ACP chemicals (Montréal, QC, Canada) et le phosphate dibasique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (*98%*) d'Oméga (Lévis, QC, Canada). Le NaOH (*98%*) a été obtenu de BDH (Toronto, ON, Canada), le HCl (*32-35% dans l'eau*) de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA) et l'acide acétique (*99%*) d'Anachemia (Montréal, QC, Canada).

L'eau distillée a été purifiée par un système Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) et a été utilisée dans la préparation de tous les tampons et échantillons.

¹ La pureté minimum de chaque produit chimique est indiquée entre parenthèse. Tous les produits chimiques ont été utilisés sans purification additionnelle. *ND* : information non-disponible.

Les capillaires de silice fondue ont été achetés de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2 μm , utilisés pour filtrer toutes les solutions, ont été obtenus de Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

Les oligosaccharides standard de chitine (100% acétylés, pureté minimum de 95%) et les oligosaccharides standard de chitosane (100% désacétylé, pureté minimum de 98%), allant du dimère à l'hexamère, ont été obtenus de Seikegaku America (distribué par MJS BioLynx, Brockville, ON, Canada).

2.2.2 Préparation des tampons

Les tampons de borate ont été préparés avec du $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (I = 0.24M, 0.3M and 0.36M) et le pH a été ajusté à 8.4 avec du HCl 2M ou à 10.4 avec du NaOH 2M. Les tampons de phosphate à pH 7.0 et 9.0 ont été préparés avec du $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (I = 0.06M to 0.18M) tandis que du NaOH 2M ou de l'acide phosphorique concentré ont été utilisés pour ajuster le pH. Les solutions de SDS et CTAB ont été préparées dans l'eau et diluées par la suite pour obtenir la concentration finale désirée.

2.2.3 Procédures de dérivation

Acide 4-hydrazinobenzène sulfonique (BHZ)

La procédure de dérivation avec le BHZ a été décrite par Wang et Chen [26]. Une solution de 5mM de saccharide est préparée dans de l'acétate d'ammonium 2M pH 4.1. Un aliquot de 50 μL de cette solution est mélangée avec 50 μL de BHZ 2M préparé dans une solution de carbonate de sodium saturée. L'échantillon est ensuite placé dans un bain à sec à 75° pour 15 minutes et la réaction est arrêtée en plaçant l'échantillon au congélateur à -20°.

Phénylhydrazine (PHZ)

Cette procédure est inspirée du travail de Lattova et Perrault [28] mais un peu modifiée afin d'assurer la purification des échantillons. Une solution de 20

μL de concentration approximative de 0.1 - 0.2M de saccharide dans l'eau distillée est mélangée avec 1 μL de PHZ pure, disponible seulement sous forme liquide. L'échantillon est placé dans un bain à sec à 75° pour 1 heure et la réaction est arrêtée en ajoutant 100 μL d'eau distillée. Trois étapes de purification sont ensuite faites par extraction en utilisant 100 μL d'acétate d'éthyle et en conservant toujours la couche aqueuse. Les échantillons sont placés au SpeedVac (système d'évaporation sous centrifugation de Savant Inc.) pour les assécher complètement et ensuite ils sont reconstitués avec 300 μL d'eau distillée.

3-Méthyl-1-phényl-2-pyrazolin-5-one (MPP)

Pour le MPP, la procédure décrite par Honda *et al.* [15] a été changée afin d'utiliser les produits chimiques disponibles au laboratoire. Un aliquot de 50 μL d'une solution de 10mM de saccharide dilué dans du NaOH 0.3M est mélangé à 50 μL d'une solution de MPP 0.5M dans du méthanol. L'échantillon est placé dans un bain à sec à 70° pour 30 minutes et la réaction est arrêtée en ajoutant 50 μL de HCl 0.03M. Les échantillons sont placés au SpeedVac pour les assécher complètement et ensuite ils sont reconstitués dans 200 μL d'eau distillée et 200 μL d'acétate d'éthyle. Une fois la couche aqueuse récoltée, s'en suit une autre étape au SpeedVac pour une deuxième évaporation complète et une reconstitution finale dans 100 μL de méthanol.

4-Aminobenzoate d'éthyle (ABEE)

Plusieurs variantes de la procédure de dérivation avec ABEE ont été trouvées. C'est l'amination réductrice de Suzuki *et al.* [41] qui a été suivie à la lettre. Un mélange réactionnel composé de 0.2 mg d'ABEE, 41 μL d'acide acétique et de 350 μL de méthanol est préparé et utilisé pour dissoudre 35 mg de NaBH_3CN . Une masse de 1.0 mg de saccharide est dissoute dans 40 μL du mélange réactionnel et le tout est placé dans un bain à sec à 80° pour 30 minutes. La réaction est arrêtée en refroidissant les échantillons à la température de la pièce. Les échantillons sont ensuite complètement évaporés au SpeedVac et ils

sont reconstitués dans 200 μL d'eau distillée et 500 μL d'acétate d'éthyle. Un total de trois étapes d'extraction sont alors exécutées afin de purifier le complexe ABEE-oligomère formé. L'échantillon est encore une fois placé au SpeedVac pour une deuxième évaporation complète et une reconstitution finale dans 500 μL d'eau distillée.

8-Aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS)

La procédure de dérivation avec l'APTS est plus précisément décrite dans le chapitre 3. Tous les détails de la maximisation de cette procédure s'y retrouvent également.

2.2.4 Instrumentation

Les analyses sont faites avec un des deux appareils d'électrophorèse capillaire disponibles au laboratoire. Le premier est un système P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) sur lequel un capillaire de silice fondue ayant une longueur totale de 40 cm (30 cm jusqu'au détecteur) et un diamètre interne de 50 μm est installé. Le deuxième instrument est un système d'électrophorèse capillaire de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). La configuration de la cartouche contenant le capillaire étant différente sur les deux instruments, un capillaire de 50 μm de diamètre interne et d'une longueur totale de 38.5 cm (30 cm au détecteur) est utilisé avec l'instrument d'Agilent. Sur les deux instruments, un détecteur à barrette de diode (PDA) est utilisé afin de récolter l'absorbance sur une plage étendue de longueurs d'onde. La procédure de rinçage du capillaire est la même sur les deux instruments. Avant chaque injection, le capillaire est rincé par pression avec du NaOH 0.1M, de l'eau Milli-Q (distillée) et du tampon pour un remplacement minimal de 10 volumes de capillaire. L'injection de l'échantillon est faite par pression (injection hydrodynamique) à 0.5 psi (ou 3.4 kPa) pour une durée de 10 secondes représentant un volume d'environ 10 nL. Une seconde injection, cette fois-ci de tampon pour mettre l'échantillon en sandwich, a une durée de 5 secondes. Le

voltage de séparation varie entre 10 et 15 kV dépendamment du chromophore employé pour la dérivation. Finalement, la température du capillaire est ajustée à 25° tandis que les échantillons restent à la température de la pièce.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Détection UV sans dérivation

Puisque la détection UV sans réaction de dérivation est la plus simple et la plus économique des méthodes de détection, elle a été testée en premier. Une longueur d'onde de 190 nm a été choisie puisque c'est le minimum possible sur les deux instruments disponibles. Un tampon de borate de 100mM et de pH 10.4 a été sélectionné puisque les oligosaccharides non dérivés ne possèdent aucune charge et que le phénomène de complexation doit être exploité afin d'obtenir des analytes chargés. Le tampon a été préparé avec le sodium de borate disponible et l'eau utilisée était de grade Milli-Q mais non-irradiée. Le tampon a été filtré mais n'a pas été dégazé.

Les résultats obtenus démontrent de larges pics correspondants aux oligosaccharides mais également des pics présents dans tous les échantillons. À une longueur d'onde aussi basse les espèces concomitantes peuvent également absorber et produire des pics. Dû à la faible sélectivité obtenue avec ce type de détection, des études plus poussées n'ont pas été réalisées. Il a donc été décidé de passer à la détection UV jointe à une dérivation chromophorique afin d'augmenter l'intensité obtenue et d'augmenter la sélectivité par le choix de longueur d'ondes spécifiques.

2.3.2 Détection UV après dérivation

Acide 4-hydrazinobenzène sulfonique (BHZ)

La simplicité de la dérivation avec le BHZ justifie son choix comme premier chromophore. Des quatre chromophores étudiés, c'est le seul qui ne

requiert pas d'étape de purification par extraction. De plus, la longueur d'onde conseillée par Wang et Chen [26], correspondant à 200 nm, pourra nous permettre de faire une véritable comparaison entre la détection UV sans et avec ajout d'un chromophore. Les résultats obtenus (électrophérogramme non présenté) sont peu concluants. De larges pics non définis sont obtenus et les différences entre l'échantillon blanc (ne contenant tout simplement pas de saccharide) et les BHZ-chitines sont si minimes que l'identification des pics est très difficile. Vu l'absence d'étape de purification, l'hypothèse émise est que les échantillons pourraient être contaminés par les produits de la réaction. Des travaux plus poussés n'ont pas été fait sur ce chromophore.

Phénylhydrazine (PHZ)

Le PHZ a été choisi vu sa structure très similaire au BHZ. Contrairement à ce dernier, le PHZ ne possède pas de groupe SO_3H capable de fournir une charge négative aux saccharides. Cependant, vu l'utilisation du borate comme tampon de séparation, il est raisonnable d'assumer que la formation de complexes entraîne l'ajout d'une charge négative donc les PHZ-saccharides pourront être séparés par électrophorèse capillaire. Vu les résultats obtenus avec le BHZ, il a été décidé d'ajouter ses étapes d'extraction qui étaient absentes de la procédure originale.

Une longueur d'onde de 254 nm a été choisie selon l'article de Lattova et Perreault [28]. Ceci correspond à une longueur d'onde commune pour un chromophore contenant seulement un cycle benzénique. Quoique d'autres longueurs d'ondes (245 nm, 290 nm et 305 nm) aient été suivies, 254 nm représente le meilleur compromis entre un signal intense des pics de saccharides et un faible bruit sur la ligne de base.

Malheureusement, comme démontré à la Figure 2.3, des pics supplémentaires sont observés. Deux hypothèses sont alors soulevées : le PHZ pourrait réagir avec d'autre espèces présentes dans l'échantillon ou les impuretés associées aux standards. Il a été suggéré de rajouter une étape de séchage au SpeedVac avant les extractions avec l'acétate d'éthyle. Malheureusement, il a été

impossible de se débarrasser des pics supplémentaires. Le PHZ est probablement très réactif et crée ainsi une réaction de dérivation non spécifique aux saccharides. Dû à ce problème majeur, le chromophore PHZ a été abandonné. Il est à noter qu'un blanc (PHZ seul, sans oligomère) a été préparé et que son électrophérogramme ne présentait aucun pic.

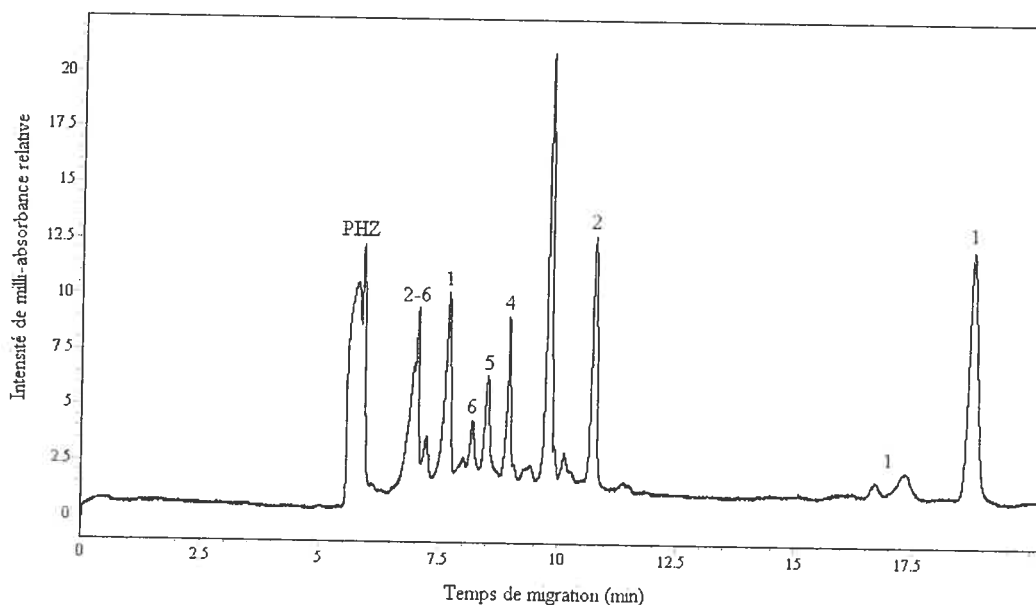


Figure 2-3 Séparation d'un mélange d'oligomères de chitine et de N-acétylglucosamine dérivés avec le PHZ (DP 1-6). La séparation est effectuée dans un tampon de borate 100mM à pH 10.4 et avec un voltage de 12 kV. Le détecteur est ajusté à 254 nm. Identification des pics : 6, hexamère d'APTS-chitine, etc.

3-Méthyl-1-phényl-2-pyrazolin-5-one (MPP)

Dans un tout autre ordre d'idée, le MPP a été choisi vu sa structure si différente des deux autres chromophores préalablement étudiés. Selon Honda *et al.* [15], cette méthode de dérivation est quantitative et la longueur d'onde d'absorption maximale de ce chromophore est de 245 nm. Les résultats de la réaction entre le MPP et les oligomères de chitine sont plus au moins concluants. De nombreux et très intenses pics sont observés sur les électrophérogrammes. En guise d'étape de purification, la méthode proposée contient un ajout d'acétate d'éthyle suivi immédiatement d'une évaporation au SpeedVac. Il est donc normal

de penser qu'en ne se débarrassant pas de la phase organique avant le séchage, il est possible de retrouver quelques impuretés dans l'échantillon séché. Des étapes d'extraction seraient donc nécessaires à l'utilisation de ce chromophore. De plus, le solvant utilisé pour la reconstitution de l'échantillon séché, le méthanol, ne convient pas vraiment à l'électrophorèse capillaire. Il est plus difficile d'obtenir une injection reproductible dû à la viscosité du méthanol. De plus, le courant avait de la difficulté à se stabiliser au début de la séparation dû à la proximité du méthanol et de l'électrode. Parallèlement, de meilleurs résultats ont été obtenus avec le chromophore ABEE. Les travaux sur le MPP ont donc été abandonnés.

4-Aminobenzoate d'éthyle (ABEE)

Le dernier chromophore étudié a été choisi principalement pour sa longueur d'onde d'absorption maximale très différente des autres chromophores. Selon Suzuki *et al.* [41], le λ_{\max} d'ABEE est de 305 nm, c'est donc cette longueur d'onde qui a été utilisée. Puisque l'ABEE ne fournit pas de charge aux saccharides dérivés, il était nécessaire d'utiliser un tampon de borate afin d'induire la complexation avec les analytes neutres afin de les rendre anioniques. Afin de visualiser le degré de complexation obtenu, le pH du tampon de borate et la concentration de borate ont été variés. Les temps de migration des oligomères de chitine ont été utilisés pour construire les Figures 2.4 et 2.5.

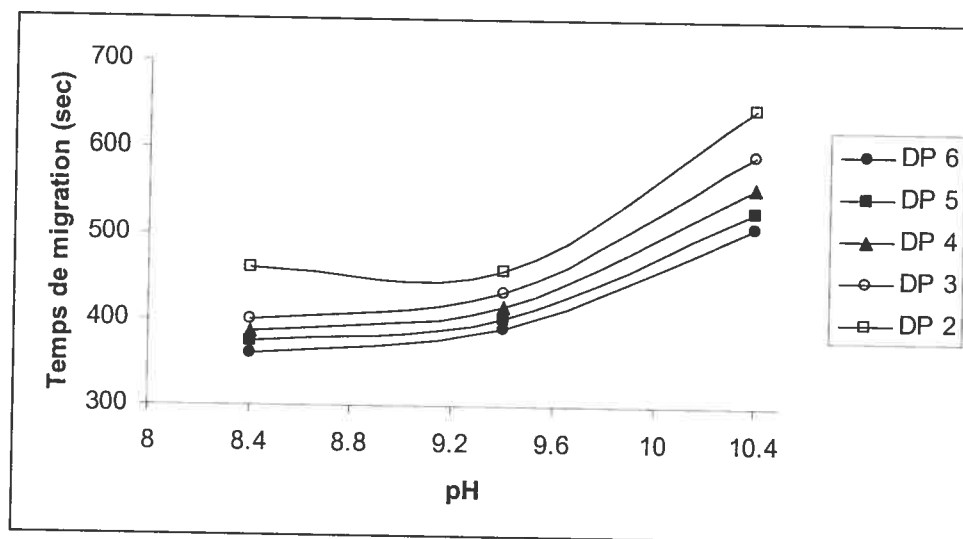


Figure 2-4 Temps de migration des dérivés ABEE d'oligomères de chitine en fonction du pH d'un tampon de borate à 100mM.

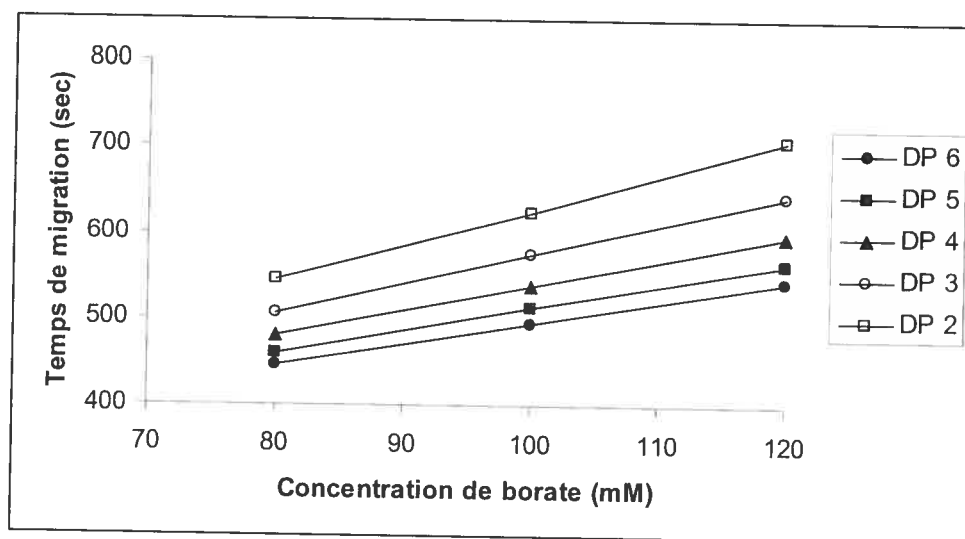


Figure 2-5 Temps de migration des dérivés ABEE d'oligomères de chitine en fonction de la concentration de borate d'un tampon à pH 10.4.

Les figures 2.4 et 2.5 démontrent que la quantité d'ions de borate en solution est reliée à la concentration de borate et à l'augmentation du pH. Les temps de migration sont donc de plus en plus longs puisque la production de

complexe est favorisée dans l'équilibre de la réaction de complexation. Il est également possible que les temps de migration soient affectés par le flux électroosmotique. En effet, plus la concentration de borate augmente, plus le flux électroosmotique ralentit ce qui pourrait expliquer l'augmentation des temps de migration observée. Dans le cas du pH, le flux électroosmotique augmente avec celui-ci donc le ralentissement de la migration observé doit avoir un lien avec la complexation de borate en solution. Il était tout de même nécessaire de confirmer l'utilisation du borate. Pour ce faire, la séparation du même mélange (ABEE-oligomères de chitine, DP 2-6) a été effectuée dans un tampon de phosphate citrate à pH 3.6. À ce pH acide, le groupe amine libre du chromophore devrait être protoné donc porter une charge positive. Cependant, même après 30 minutes d'électrophorèse, un seul pic est observé. Ceci démontre que la séparation des ABEE-chitines doit être faite en présence de borate. Les oligomères de chitosane ont également été dérivés avec l'ABEE, mais les pics n'apparaissent pas sur les électrophérogrammes. Il est important de mentionner que les pics correspondants aux chitines ont une assez faible intensité (environ 1 mAU) donc si les chitosanes ne réagissent pas aussi bien que les chitines lors de la dérivation, il est normal que nous ne puissions pas détecter les pics correspondants aux chitosanes sur les électrophérogrammes. Nous verrons plus tard que l'hypothèse d'un différent niveau de réactivité entre les chitines et les chitosanes a été démontrée par diverses expériences.

Une alternative à l'utilisation du borate est la technique d'électrophorèse en milieu micellaire (MEKC). Selon les travaux de Kratschmar *et al.* [36], les dérivés d'ABEE peuvent être séparés à l'aide de micelles de SDS dans un tampon de phosphate à pH 7.0 en gardant le capillaire à une température de 25-30°. Une étude de la variation de la concentration de SDS a démontré que lorsque la concentration de SDS augmente, la résolution augmente puisque le mécanisme de séparation n'est efficace qu'aux concentrations supérieures à la CMC. Cependant, lorsque la concentration de SDS est trop élevée, les pics deviennent très larges et

l'efficacité de la séparation est tout simplement perdue. Une concentration de SDS 20mM est donc nécessaire pour une séparation dans un tampon à pH 7.0. Une variation de la concentration de phosphate influence également la séparation comme démontré à la Figure 2.6. La variation observée peut être expliquée par plusieurs facteurs. Lorsque la concentration de phosphate augmente, la force ionique augmente et crée un ralentissement du flux électroosmotique. Parallèlement une diminution de la CMC est entraînée et il y a plus de micelles en solution dans le capillaire. Il est donc difficile de tirer une conclusion appropriée en ce qui concerne la relation entre le temps de migration et la concentration de phosphate lorsque la concentration de SDS est maintenue constante.

Une étude similaire a été répétée avec un tampon de phosphate à pH 9.0 mais malgré tous les efforts, la séparation obtenue en présence de SDS n'était pas aussi efficace que celle obtenue grâce à la complexation de borate.

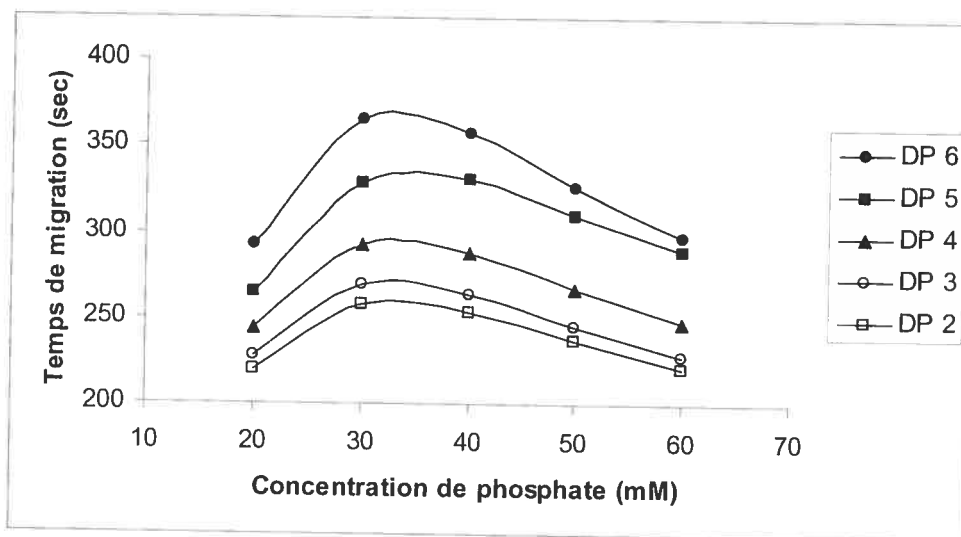


Figure 2-6 Temps de migration des dérivés ABEE d'oligomères de chitine en fonction de la concentration de phosphate d'un tampon à pH 7.0 en présence de 20mM de SDS.

Une autre possibilité qu'offre l'utilisation de surfactants est l'inversion du flux électroosmotique (EOF) qui se dirige normalement vers la cathode. Contrairement au SDS, un surfactant anionique qui forme des micelles en

solution, le CTAB est un surfactant cationique qui s'associe en forme de double couche sur la paroi négative du capillaire à des concentrations plus petites ou égales à sa CMC. La paroi devient donc positive et le flux électroosmotique est inversé (en direction de l'anode). Il devient donc nécessaire d'inverser la polarité du voltage lors de la séparation pour s'assurer que les espèces migrent en direction du détecteur. Malgré tous les efforts fournis dont la variation de la concentration de CTAB, la variation du pH et de la concentration du tampon, il a été impossible d'atteindre une séparation avec résolution à la ligne de base des oligomères de chitine dérivés avec l'ABEE en mode MEKC. Cette partie du projet n'a donc pas été poursuivie plus loin.

2.3.3 Détection LIF après dérivation

8-Aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS)

Puisque la détection LIF possède la réputation d'être très sensible, il a été décidé de tenter l'ajout d'un fluorophore sur les oligomères de chitine et de chitosane. L'APTS possède des caractéristiques intéressantes pour l'électrophorèse capillaire et son utilisation répandue pour l'analyse de saccharides a servi de point de départ. La réaction décrite par Wang et Hsieh [37] fut utilisée mais elle a dû être améliorée parce que le rendement de réaction avec les oligomères de chitosane était beaucoup plus bas que celui avec la chitine. Les travaux d'optimisation de la méthode de dérivation et de la séparation sont présentés en détails dans le chapitre suivant.

2.4 Conclusion

En ce qui concerne le choix de la méthode de détection utilisée pour l'analyse des oligomères de chitine et de chitosane, trois avenues différentes ont été explorées : la détection dans l'UV avec et sans dérivation ainsi que la détection LIF jumelée avec une dérivation.

Sans présence naturelle ou ajoutée par réaction de dérivation, la détection dans l'UV est plutôt difficile. Le choix de la longueur d'onde est limité aux plus basses valeurs disponibles sur l'instrumentation. Une longueur d'onde de 190 nm a été choisie et les résultats obtenus montrent des pics étendus pour les oligomères mais également d'autres pics de source inconnue. Puisque cette longueur d'onde n'est pas du tout spécifique aux saccharides, il s'en suit l'absorption de la lumière UV par les espèces concomitantes de l'échantillon et un électrophérogramme difficile à interpréter. Il est possible d'obtenir de meilleurs résultats à 190 nm en prenant plusieurs précautions comme des tampons très purs et dégazés ou l'utilisation d'eau irradiée. Ces précautions n'ont pas été prises dans le cadre de ce projet puisque d'autres alternatives à une détection à 190 nm étaient disponibles. Cette méthode de détection n'est donc pas à privilégier.

Lorsqu'un chromophore est ajouté par réaction chimique sur les saccharides, le produit obtenu peut être détecté à une longueur d'onde spécifique et il est ainsi possible de ne pas détecter les espèces concomitantes. Quatre chromophores différents ont été étudiés, chacun possédant des caractéristiques différentes et étant détecté à une longueur d'onde différente. Les résultats préliminaires obtenus avec le BHZ et le PHZ n'ont pas été assez concluants pour pousser l'optimisation plus loin. Le chromophore MPP présente un profil intéressant, mais le manque de temps nous a empêché de poursuivre les expériences. Il serait désirable de continuer les recherches en améliorant la méthode de dérivation en essayant un ajout d'étapes d'extraction et une variation de la nature du solvant de reconstitution. Finalement, le chromophore ayant le plus de potentiel est l'ABEE. Grâce à la complexation de borate, il a été possible d'obtenir une séparation avec résolution à la ligne de base pour les oligomères de chitine (DP 2-6). Les efforts faits pour une analyse en mode MEKC, tant avec le SDS que le CTAB comme surfactants, ont été infructueux puisque l'efficacité de la séparation a été diminuée considérablement. Il existe toutefois quelques options

à considérer afin de poursuivre le développement d'une méthode basée sur l'utilisation du ABEE.

Par exemple, il a récemment été découvert que les dérivés d'ABEE peuvent être également détecté par LIF selon Kakehi *et al.* [33]. La technique de détection LIF étant beaucoup plus sensible que l'UV, la dérivation avec l'ABEE pourrait avoir un très grand potentiel pour notre application. De plus, le groupe de Kakehi propose également l'utilisation de variantes du 4-ABEE (utilisé lors de ce projet), c'est-à-dire 2-ABEE et 3-ABEE. En effet, la formation de la base de Schiff lors de l'amination réductrice, est favorisée par une forte densité d'électrons. Selon leurs résultats, il semblerait que les chromophores 2- et 4-ABEE diminue la densité d'électrons tandis que le 3-ABEE l'augmente. Il serait donc intéressant de recommencer la dérivation des chitines et chitosanes avec le 3-ABEE. De plus, afin d'augmenter l'intensité des pics, une autre possibilité s'offre en ce qui a trait à la réaction de dérivation. L'amination réductrice utilisée tout au long de ce projet a le désavantage de produire un saccharide dérivé en forme ouverte. Selon Li et Her [31], il est possible de conserver la forme fermée du saccharide par une dérivation par l'approche d'une réaction de glycosylation. Selon leurs résultats, les dérivés en forme fermée démontrent un meilleur comportement chromatographique que les dérivés en forme ouverte. Il serait donc intéressant de tester cette approche.

La dernière méthode de détection étudiée est le LIF. Quoique cette méthode soit réputée pour sa bonne sensibilité, son important coût d'opération et le fait qu'elle ne soit pas à la portée de tous les laboratoires de recherche en font une méthode difficile d'approche. De plus, le coût des fluorophores nécessaires est beaucoup plus élevé que celui des chromophores (APTS = 13 \$/mg et ABEE = 0.004 \$/mg). Malgré ces désavantages importants, l'excellente sensibilité obtenue fait de cette méthode un élément essentiel à une analyse de faibles concentrations de saccharides. Comme démontré dans le prochain chapitre, la dérivation avec

l'APTS est une méthode facile qui produit des oligomères triplement chargés négativement ce qui élimine la nécessité de complexation avec le borate.

En conclusion, la détection en UV a prouvé son efficacité avec l'utilisation du chromophore ABEE. Cependant, elle n'arrive pas à la cheville de la détection LIF qui la surpasse aisément en ce qui a trait à la sensibilité. Les autres travaux présentés dans ce mémoire ont donc été faits à l'aide de la détection LIF et du fluorophore APTS.

3. Capillary electrophoresis separation of a mixture of chitin and chitosan oligosaccharides derivatized using a modified fluorophore conjugation procedure²

Adapted from:

Marie-Eve Beaudoin, Julie Gauthier, Isabelle Boucher and Karen C. Waldron
Journal of Separation Science 2005, 28, 1390-1398

² Les références de ce chapitre se retrouvent dans la section 8

3.1 Abstract

A capillary electrophoresis (CE) method was developed for the simultaneous analysis of small chitin and chitosan oligosaccharides. For detection purposes, the oligomers were derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS), a well known fluorophore for oligosaccharides analysis. The detection was performed by laser-induced fluorescence (LIF) with an argon ion laser having an excitation wavelength of 488 nm and with emission monitored at 520 nm. Derivatization parameters such as reaction time and conditions were examined. Separation conditions were also varied by testing a range of buffer pHs and concentrations. The best conditions were found using an 80mM borate buffer at pH 8.4. This CE-LIF optimized method was used for the analysis of an enzymatically produced oligo-chitosan sample composed of a complex mixture and having an average degree of polymerization of 3.7 monomer units and 80% deacetylation. The oligo-chitosan sample was treated with a chitin deacetylase-like enzyme, the products were derivatized with APTS, and then analyzed without purification. The goal was to determine whether the deacetylase-like enzyme could increase the extent of deacetylation of the oligo-chitosan sample.

3.2 Introduction

Chitin, which is mainly poly β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetyl-D-glucosamine, is the rigid substance forming the shell of lobsters, shrimps and crabs, and is typically a fisheries waste product. Chemical treatment of chitin removes by heating with concentrated NaOH some of the acetyl groups yielding a soluble derivative called chitosan. Chitosan, defined as either partially or completely deacetylated chitin, is useful in a wide range of applications [1, 7, 42]. At neutral pH, chitosan is a positively charged polymer that is a skin-compatible gel. It can be used to deliver anti-oxidants and vitamins to the skin via cosmetics, to deliver drugs or vaccines, and for tissue transplant engineering. The harsh chemical deacetylation has several drawbacks that include poor reproducibility and non-specific chain

cleavage in the production of chitosan. Alternatively, enzymes like chitin deacetylase [7] have the capability to further deacetylate partially deacetylated chitosan oligosaccharides efficiently, specifically and in a reproducible manner for industrial applications. A method involving the analysis of small chitin and chitosan oligomers is therefore necessary for characterization of the products of the enzymatic reaction (i.e. oligomer size, extent of deacetylation or acetyl group composition) as a means to evaluate the efficiency of chitin deacetylase-like enzymes. Because of its high resolving power, capillary electrophoresis (CE) was chosen as the analysis method.

Due to the absence of a suitable chromophore on the chitin and chitosan structures, the oligomers need to be derivatized before analysis by CE. Several labeling agents for oligosaccharides have been reported in the literature, either for absorbance or fluorescence detection, such as: *p*-hydrazinobenzenesulfonic acid [26, 43, 44], phenylhydrazine [27-29, 45], 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one [13, 15, 46], ethyl 4-aminobenzoate [13, 16, 17, 36, 41], and 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) [10, 11, 13, 37-41, 47]. In this study, chitin and chitosan oligomer standards having degrees of polymerization (DP) ranging from 2 to 6 monomer units were analyzed by CE. Our preliminary studies showed that the non-fluorescent labeling agents either gave poor separations or produced high background noise, so only APTS detected by laser-induced fluorescence (LIF) was considered for further optimization. Acidic and basic electrolytes were tested as potential separation buffers in order to take advantage of the cationic charges on the chitosan oligomers. Borate-based buffers were also tested to see if borate complexation could enhance the separation. Although borate complexation [18] is a relatively well understood mechanism for underivatized carbohydrates, it is not yet clear how the derivatized carbohydrates react when surrounded by borate ions. It is believed that in aqueous solution, it is the tetrahydroxyborate ion ($B(OH)_4^-$) that complexes with carbohydrates in a 1:1 or 1:2 ratio [19]. Wang and Hsieh [37] employed borate buffers for the separation of APTS-derivatized chitin oligomers

alone, but, to our knowledge, chitosan oligomers have never been investigated. In the present study, a partially deacetylated chitosan sample was treated with a chitin deacetylase-like enzyme and the products separated using the developed CE-LIF method.

3.3 Experimental

3.3.1 Apparatus

The analyses were performed on a Beckman P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) with a 59.2 cm long (48.8 cm to detector) uncoated fused silica capillary (50 μm i.d., 360 μm o.d.) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The detection was carried out with a 3 mW argon-ion laser having an excitation wavelength of 488 nm and a 520 nm emission wavelength band pass filter. The capillary was flushed with 0.1M NaOH, Milli-Q water and electrolyte for a minimum replacement of 10 capillary volumes before each injection. The injection of samples was performed hydrodynamically at 0.5 psi (3.4 kPa) for 10 s representing about 10 nL. An electrolyte plug (0.5 psi for 5 s) was always injected afterward. The separation voltage was set at 25 kV and run in either positive or negative mode depending on the separation conditions as indicated in section 3. The capillary temperature was maintained at 25°C while the samples were kept at 4°C.

3.3.2 Reagents and materials³

Chitin oligosaccharide standards (fully acetylated, minimum purity of 95%) and chitosan oligosaccharide standards (100 % deacetylated, minimum purity of 98%) were obtained from Seikagaku America (distributed by MJS

³ The minimum purity of each chemical compound is indicated in brackets. All chemicals were used without further purification.

BioLynx, Brockville, ON, Canada). APTS (96%) was purchased from Fluka (Oakville, ON, Canada) and used without further purification. Sodium tetraborate (99%), monobasic sodium phosphate (98%) and sodium cyanoborohydride (95%) were obtained from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Dibasic sodium phosphate (98%) was purchased from Omega (Lévis, QC, Canada). Sodium hydroxide (98%) was obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada) and glacial acetic acid (99%) from Anachemia (Montréal, QC, Canada).

In-house distilled water was purified by passing it through a multicartridge Milli-Q water filtration/deionization system (Millipore, Milford, MA, USA). All solutions were filtered through 0.2 μm nylon filters obtained from Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada). The enzymatically produced oligo-chitosan sample [48] (provided by ISM Biopolymer, Granby, QC, Canada), further on referred to as ISM chitosan, was composed of a mixture of small chitosan oligomers (average DP 3.7 units and degree of deacetylation of approximately 80 %, measured by thin-layer chromatography, MALDI-Tof MS and sugar reducing technique). The chitin deacetylase-like enzyme, *Streptomyces lividans acetyl xylan esterase A (AxeA)* [49] which is a family 4 carbohydrase esterase that possesses the ability to deacetylate xylan [49, 50] as well as oligo-chitosan [51], was purified according to Dupont *et al.* [49].

3.3.3 Solution and sample preparation

Buffer preparation

All buffers were prepared using Milli-Q water and filtered before use. The 50mM phosphate buffer was prepared with $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I = 0.05M) and the pH was adjusted to 3.6 using concentrated H_3PO_4 . The 50mM phosphate buffer pH 8.5 was prepared with $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I = 0.15M) and the pH was adjusted with NaOH 2M. The borate buffers were prepared with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (I = 0.24M, 0.3M and 0.36M) at concentrations of 80, 100 and 120mM and the desired pH, as indicated in the text, was adjusted with either HCl 2M or NaOH 2M.

Derivatization of samples

The procedure described by Wang and Hsieh [37] for derivatization of chitin oligosaccharides with APTS by reductive amination was slightly modified. The oligomer stock solutions were prepared in Milli-Q water at an approximate concentration of 20mM. In the reaction vial (1.5 mL Eppendorf tube or 200 μ L PCR tubes), 10 μ L of oligomer stock was mixed with 10 μ L of 1M sodium cyanoborohydride and 2 μ L of 0.2M APTS in 15% glacial acetic acid. All solutions were freshly prepared before each derivatization. The reaction mixture was then incubated at 75°C for up to 5 hours, depending on the study. The reaction was quenched by addition of 80mM sodium tetraborate buffer pH 8.4 for a final oligomer concentration of 0.5mM. There were no further purification steps involved. An example of the APTS derivatization reaction with the disaccharides of chitin and chitosan is presented in Fig. 3.1 and a more detailed mechanism can be found in Wang and Hsieh [37]. The derivatized oligomer samples were kept at -20°C prior to CE analysis at which time they were further diluted in electrolyte buffer before injection (to 3.13 μ M for APTS-chitin oligomers and to 25 μ M for APTS-chitosan oligomers)

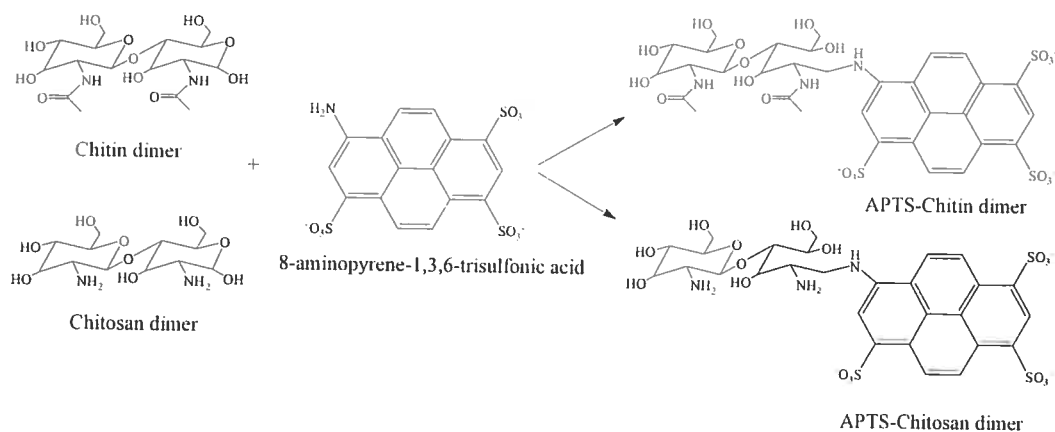


Figure 3-1 APTS derivatization reaction with the disaccharides of chitin and chitosan

The ISM chitosan sample was treated with the deacetylase-like enzyme *AxeA* for 21 hours at 50°C in a pH 6.0 phosphate buffer containing $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and then derivatized with APTS using the above procedure and without being purified before-hand. The sample mixture injected for analysis was thus composed of APTS-derivatized chitosan oligomers, remaining *AxeA* enzyme, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and phosphate buffer pH 6.0. A control sample was treated identically, except no enzyme was added.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Choice of derivatization reagent

In order to detect the oligomers separated by CE, several chromophores and one fluorophore were tested. All of the chromophoric derivatizing reagents could be detected by a conventional UV/Vis detector, usually in the low UV range. Separation of the 10 oligomers was achieved with some of the chromophores tested (*p*-hydrazinobenzenesulfonic acid at 190 nm, phenylhydrazine at 254 nm, 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one at 245 nm and ethyl 4-aminobenzoate at 290 nm) but the high background noise at these detection wavelengths was a major disadvantage. LIF detection with excitation at 488 nm and emission at 520 nm was also tested using the fluorophore APTS [37]. LIF offers high sensitivity detection and a good linear dynamic range. The APTS fluorophore has been extensively used as a derivatization reagent for the analysis of oligosaccharides due to its intense signal and its three negatively charged sulfonate groups, which permit the separation of neutral oligosaccharides. Various parameters of the derivatization method described by Wang and Hsieh [37] were adjusted in order to obtain the highest LIF signal for both the chitin and chitosan oligomers within a reasonable derivatization time.

3.4.2 Choice of buffer system

The conjugation of the APTS fluorophore on the reducing end of every chitin and chitosan oligomer adds three negative charges on the previously neutral or cationic carbohydrates. The approximate pKa of the sulfonate groups of APTS is -0.6 , assuring their deprotonation. In order to find the best separation conditions, two different buffer systems were tested: sodium phosphate and sodium tetraborate. According to Wang and Hsieh [37], a good separation of the anionic APTS-chitin oligomers (all bearing the charge $q = -3$) can be obtained under acidic conditions with a 50mM phosphate buffer at pH 3.6 using a reversed polarity applied voltage to circumvent the low electroosmotic flow. We observed the five anionic APTS-chitin oligomers ($q = -3$), which migrated in order of increasing mass (from dimer to hexamer), as well as unreacted APTS and associated impurities due to the absence of a purification step in the derivatization procedure (data not shown). However, the APTS-derivatized oligomers of chitosan were not observed. Chitosan oligomers have free NH_2 groups with pKa values of about 6.3 [1] so it is presumed that at pH 3.6, chitosan is completely positively charged. The overall charge of each APTS-chitosan oligomer, which depends on the number of carbohydrate units (the DP), should therefore be $q = -1$ to $+3$ for the dimer to hexamer, respectively, in pH 3.6 buffer. Separation under the acidic conditions and reversed polarity thus prevents the net positively charged chitosan oligomers from reaching the detection window located at the anode. Even the APTS-chitosan dimer having a predicted charge of $q = -1$ at pH 3.6 and thus a predicted migration time of approximately 21 min was not seen. The wide range of charges present in the mixture at pH 3.6 (from $q = -3$ to $+3$) renders the acidic phosphate buffer a non-suitable electrolyte for analysis of all ten APTS-derivatized chitin and chitosan oligomers. Therefore an alkaline buffer containing borate was investigated next, based on a review of the literature describing the separation of carbohydrates by CE [13].

When carbohydrates are in the presence of borate ions, complexation occurs and the associated borate ions add negative charges on the analytes. It is also known that variation of the borate concentration and of the pH of the borate buffer have an effect on the degree of borate complexation and thus a direct impact on the electrophoretic mobility of the analytes [16]. However, the exact mechanism of complexation is still unclear for derivatized oligosaccharides such as the APTS conjugates used in this study. The extent of borate complexation depends strongly on the oligomer configuration, the number of hydroxyl groups and the presence of substituents [19]. At this point, it is assumed that all of the APTS-oligomers react in the same ratio, independently of their degree of polymerization, thus adding the same number of charges on each oligomer. On the other hand, there could be a slight difference between the chitin and chitosan oligomers caused by the N-acetyl substitution on chitin oligomers, but this difference cannot be confirmed at this point.

A borate buffer system with pH ranging from 8.4 to 10.4 was tested using normal (positive) applied voltage for separation. The EOF is high under these conditions and thus the highly anionic APTS-derivatized oligomers should migrate through the capillary in order of decreasing mass. The pH 10.4 buffer increased the borate complexation to such a high extent that after 120 minutes of electrophoresis, only a few peaks were detected. Better separations were obtained with pH 9.4 and 8.4, but the buffer stability at pH 9.4 was questionable due to frequent precipitation of the sample solutions. The fastest separation was obtained at pH 8.4, so the borate concentration was then varied while maintaining this pH. As shown in Fig. 3.2 (and also by Wang and Hsieh for APTS-chitin oligomers alone [37]), the extent of borate complexation increases with increasing borate concentration, therefore the electrophoretic mobility of the oligomers increased and their apparent mobility decreased in going from 80 to 120mM sodium borate. The fastest separation still showing baseline resolution of all peaks was obtained with the 80mM borate buffer at pH 8.4. Reproducibility was verified under these

separation conditions and, as seen in Table 3.1, the migration time RSDs ranged from 1.0 % to 3.2 % for all 10 APTS-derivatized oligomers.

Table 3.1 Migration time reproducibility for all APTS-oligomers separated in 80mM borate buffer pH 8.4, at 25 kV.

APTS- Chitin Oligomer	Migration time (min)	% RSD (n = 3)	APTS- Chitosan Oligomer	Migration time (min)	% RSD (n = 3)
Hexamer	10.5	1.2	Hexamer	9.6	1.0
Pentamer	11.8	1.3	Pentamer	10.7	1.3
Tetramer	14.0	1.6	Tetramer	12.6	1.6
Trimer	19.2	2.6	Trimer	16.5	2.1
Dimer	27.4	3.2	Dimer	20.9	2.7

3.4.3 Atypical migration order

As predicted, the migration order in sodium borate buffer at pH 8.4 was hexamer to dimer within a given type (chitin versus chitosan) of derivatized oligosaccharide. However, for oligomers having the same DP, APTS-chitosan (peaks labeled 6*, 5*, 4*,...) eluted before APTS-chitin (peaks labeled 6, 5, 4,...) as seen in Fig. 3.2, which was not expected because the chitosan oligomers, which are 100 % deacetylated, have a lower mass than the chitin oligomers by 42 Da per monomer unit. At pH 8.4 and above, it was assumed that all amine groups of the chitosan oligomers would be fully deprotonated resulting in a net charge on the derivatives of -3 due to the APTS sulfate groups plus -1 due to borate complexation, thus giving them the same charge as the chitin oligomers for a given DP. Three possible explanations for this atypical migration behavior have been considered: the APTS-chitosan oligomers have residual cationic character resulting from a small proportion of amine moieties still in their protonated state; they have a larger hydrated radius than expected relative to their acetylated counterparts; they complex borate to a lesser extent than the chitin oligomers and thus are less negatively charged.

The first hypothesis is less likely because no change in migration order was seen when the pH was increased to 9.4, where chitosan amine groups should be fully deprotonated. The third hypothesis is also not likely because we observed that the APTS-chitosan tetramer eluted before the APTS-chitin tetramer in sodium phosphate buffer at pH 8.5. The second hypothesis is plausible because a graph of the mobility of APTS-chitosan oligomers as a function of $q/M^{1/3}$ (charge-to-mass ratio) had the same slope as that of the APTS-chitin oligomers; i.e., the difference in hydrated radius of the oligosaccharides scales as the DP. In addition, the APTS-chitin tetramer (peak 4, Fig. 3.2c) and the APTS-chitosan pentamer (peak 5*, Fig. 3.2c) have almost identical mass (1337.2 Da and 1332.5 Da, respectively) yet are separated by 3.27 min. We are further investigating the cause of the inverted elution order, including the possibility that chitosan HCl counterions contribute to the observed mobility discrepancies.

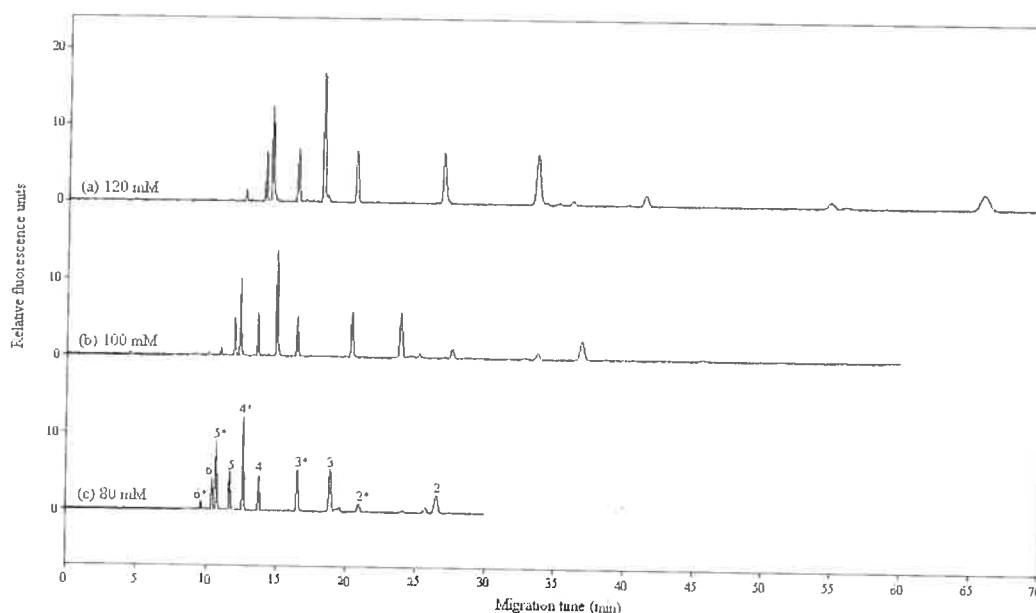


Figure 3-2 Separation of a mixture of APTS-derivatized chitin and chitosan oligomers (DP 2 to 6) carried out in (a) 120mM; (b) 100mM and (c) 80mM sodium borate buffer, pH 8.4, at 25 kV. All other conditions are described in section 3.3. Identification of peaks: 6*, APTS-chitosan oligosaccharide hexamer (DP = 6); 6, APTS-chitin oligosaccharide hexamer (DP = 6); 5*, APTS-chitosan pentamer (DP = 5); 5, APTS-chitin pentamer (DP = 5); and so on.

3.4.4 Modified fluorophore conjugation procedure

The derivatization procedure described by Wang and Hsieh [37] involving reaction of chitin oligosaccharides with APTS for 1 h at 75°C proved to be less efficient for the chitosan oligomers versus the chitin oligomers for the same concentration of oligosaccharide standard. The limit of quantification (LOQ) of the APTS-chitin oligomers was 16 to 460 times lower than for the APTS-chitosan oligomers (Table 3.2; see columns labeled “Dry bath”), which is problematic for quantification of individual oligosaccharides in real samples that contain mixtures of both types. Two different approaches were taken to try to improve the yield of product: first, the derivatization time was varied and second, a base-catalyzed reaction was attempted.

Table 3.2 Limits of quantification (LOQ) for all APTS-oligomers under the two sets of derivatization conditions. (LOQ = 10s, where s is the standard deviation of baseline noise calculated over an interval of ~ 1 min).

APTS- Chitin Oligomer	LOQ (μM)		APTS- Chitosan Oligomer	LOQ (μM)	
	Dry bath 75° for 1 h	PCR machine 75° for 3 h		Dry bath 75° for 1 h	PCR machine 75° for 3 h
Hexamer	0.25	0.12	Hexamer	116	5.3
Pentamer	0.21	0.12	Pentamer	11	2.3
Tetramer	0.28	0.11	Tetramer	4.5	1.5
Trimer	0.20	0.08	Trimer	7.2	3.8
Dimer	0.43	0.23	Dimer	25	22

When we tried to increase the original derivatization time of 1 h to 3 h (at 75°C in a closed vial), complete evaporation of the samples in the dry bath was observed after 2h of reaction time. The dry bath was therefore replaced with a cover-heated PCR machine where, even after 5 h of reaction at 75°C, the complete sample could be recovered without any sign of evaporation. The tetramers of chitosan and chitin were selected (at random) to study the derivatization time. As illustrated in Fig. 3.3, the peak height reached a plateau

after 3 h of reaction. There was a slight increase in product at the 5 h point, but it was not significant enough to justify an extra 2 h of derivatization and of instrument use. Table 3.2 summarizes the LOQs of each APTS-derivative as a function of derivatization time. A 2-fold reduction in LOQ was obtained for all the APTS-chitin oligomers after 3 h of reaction whereas the chitosan derivatives showed decreases in LOQ ranging from 1.1 fold for the dimer to 22 fold for the hexamer.

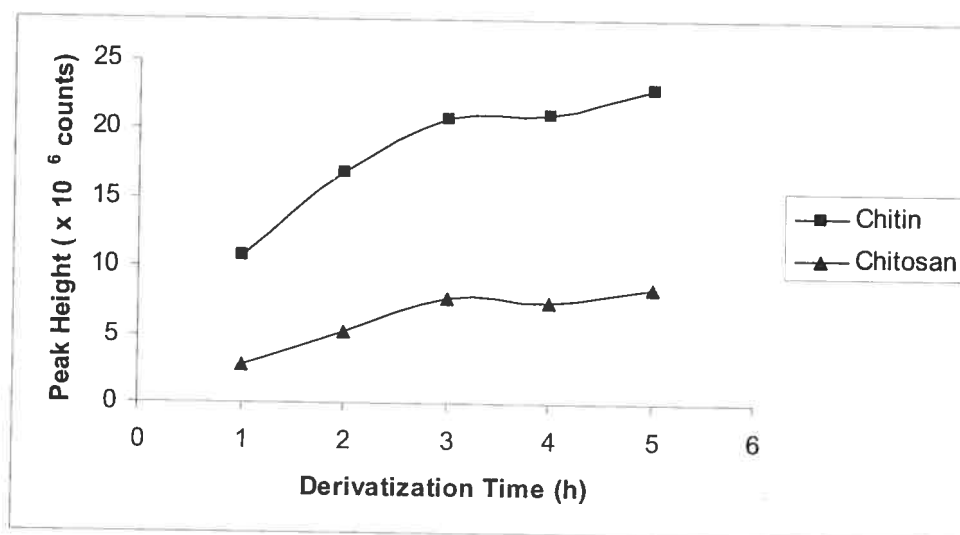


Figure 3-3 Peak height of APTS-chitin tetramer (■) and APTS-chitosan tetramer (▲) as a function of derivatization time. Separation was carried out in 80mM sodium borate buffer, pH 8.4, at 25 kV. All other conditions are described in section 3.3.

Improvement in the derivatization conditions did not completely reduce the large intensity difference between APTS-chitin and -chitosan for a given oligomer length. In the original procedure, the APTS solution was prepared in 15% glacial acetic acid to create an acidic environment, which means the chitosan amine groups should be protonated and thus give cationic oligomers in contrast to the neutral chitin oligomers. We wondered if the positive charges might hinder the derivatization reaction with APTS. Therefore, a base-catalyzed derivatization

was tested in order to render the chitosan oligomers neutral to see if the yield of derivatized product could be increased to match that of the chitin oligomers. The solvent used for APTS was changed to 2M NaOH and the reaction was performed in the cover-heated PRC machine at 75°C for 3 h. However, neither of the oligomers (chitin tetramer and chitosan tetramer) were derivatized under basic conditions. It is assumed that the acidic environment is needed in order to convert the closed form of the oligomers' reducing end to their open form, which then reacts with APTS. In the presence of NaOH, the oligomers probably stayed in their closed form and no reaction with the fluorophore occurred. The fact that chitosan is purchased as an HCl salt might interfere with the way it reacts with APTS, but this hypothesis can not be proven at this point.

3.4.5 Is borate complexation necessary?

In order to verify the necessity of borate complexation for separation in alkaline buffer, a 50mM phosphate buffer at pH 8.5 was tested. Under these conditions, the resolution decreased dramatically and separation of the ten APTS-oligomers was not possible (Fig. 3.4b). Wang and Hsieh [37] also observed a severe loss of separation efficiency for their APTS-chitin oligomers separated in pH 8.0 phosphate buffer. They presumed that the loss of resolution was due to the lack of borate complexation. To check this hypothesis, we modified the derivatization procedure for the chitin and chitosan oligomers by using Milli-Q water instead of 80mM borate buffer as the quenching solvent.

As shown in Fig. 3.4a, the separation was significantly improved by changing the solvent in which the APTS derivatives were quenched to water. The results shown in Fig. 3.4 imply that even the small amount of borate co-injected with sample prepared in borate buffer leads to partial complexation during separation in a non-borate buffer, and this small amount of borate actually degrades the separation efficiency. The separation improvement observed in Fig. 3.4a, in the total absence of borate, is not attributed to a focusing or stacking effect because the electropherograms corresponding to derivatized sample

quenched by water versus derivatized sample quenched by borate solution were practically identical when both were separated in 80mM borate buffer, pH 8.4 (data not shown). Although the separation in phosphate buffer of the water-quenched sample was not optimized, all APTS-chitin and -chitosan peaks were present and exhibit near baseline separation. Therefore, borate complexation may not be a necessity for separation of APTS-derivatized oligomers as the best results were obtained in either the complete absence of borate or in an excess of it, i.e. in a borate-based separation buffer. To permit separation in other buffers and avoid partial borate complexation, water will be used as to quench the derivatization reaction for future studies.

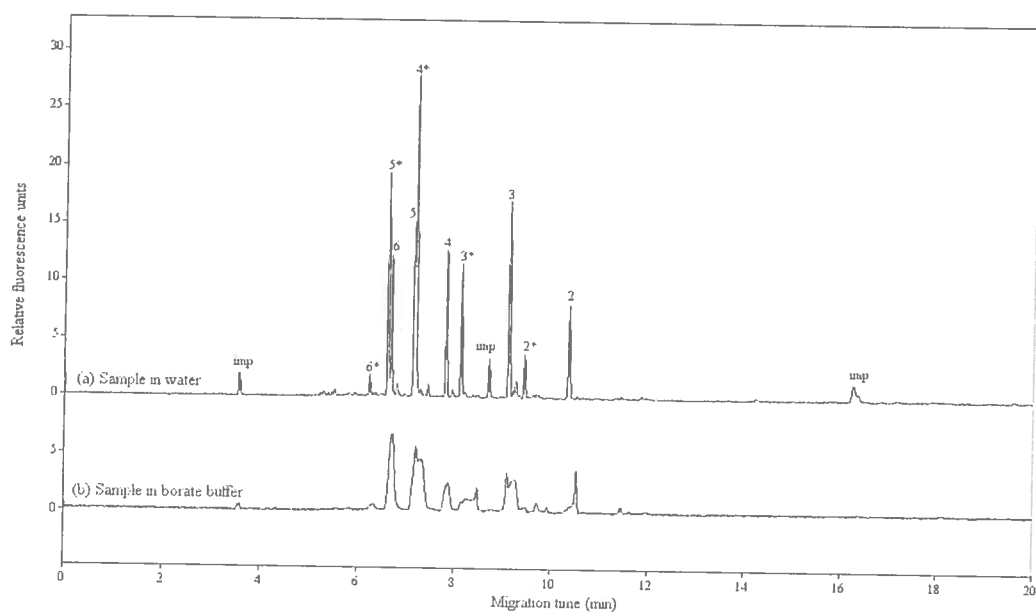


Figure 3-4 Separation of a mixture of APTS-derivatized chitin and chitosan oligomers (DP 2 to 6) carried out in 50mM sodium phosphate buffer, pH 8.5, at 25 kV. Derivatization quenching solvent is (a) Milli-Q water and (b) 80mM borate buffer, pH 8.4. All other conditions are described in section 3.3. Identification of peaks as in Figure 3.2; imp, impurity.

3.4.6 Analysis of ISM chitosan samples

The chitin deacetylase-like enzyme *AxeA* was used to increase the percent deacetylation of the ISM chitosan sample having an initial 20 % level of acetylation. This sample consisted of a mixture of small chitosan oligomers for which the average DP was 3.7 units. The enzymatic reaction was performed in a mixture of phosphate buffer and $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. A sample of ISM chitosan treated with the enzyme and a control (same sample but without enzyme added) were received for CE analysis without being purified before-hand. The improved derivatization procedure was applied and the APTS-chitosan samples were quenched with and separated in the 80mM borate pH 8.4 buffer system.

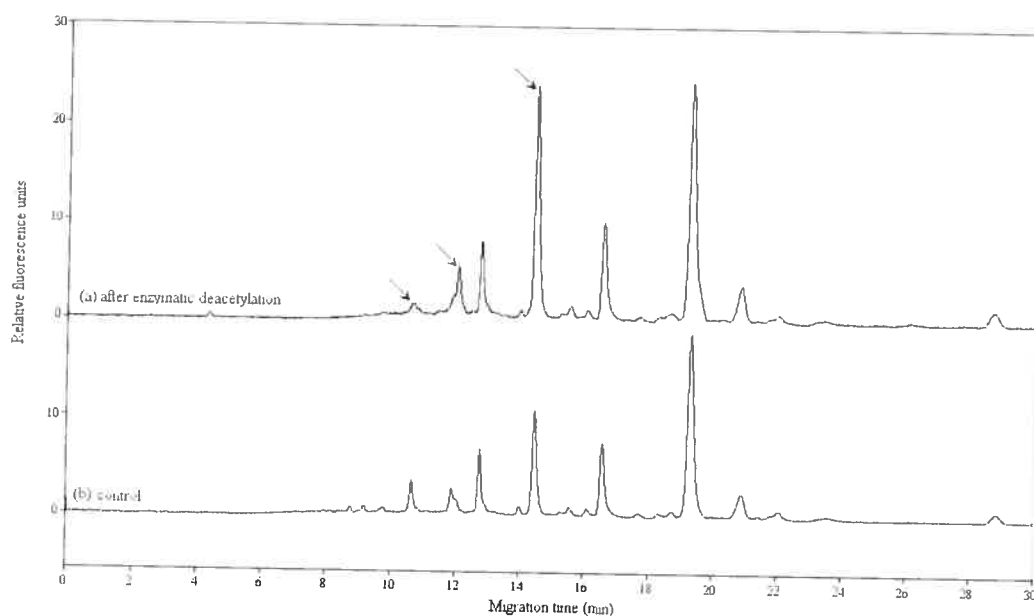


Figure 3-5 Separation of ISM chitosan derivatized with APTS (a) after enzymatic deacetylation and (b) control, carried out in 80mM sodium borate buffer, pH 8.4, at 25 kV. All other conditions are described in section 3.3. Peaks marked with arrows indicate an increase or decrease in peak height after treatment with a deacetylase-like enzyme.

Superposition of the electropherograms of the ISM chitosan sample before and after enzyme treatment (Fig. 3.5) showed a 2-fold increase in peak height for

the peak at 14.4 min, which was presumed to be a tetramer with a high extent of acetylation given its migration time relative to the standards (Fig. 3.2c). We also observed a small decrease and a small increase, respectively, in peak heights at 10.6 min (either deacetylated pentamer or acetylated hexamer) and 12.0 min (possibly acetylated pentamer). The remaining peaks were essentially unaltered by the enzymatic treatment. From these results, it could be hypothesized that the enzyme shows specificity for certain sizes of chitosan oligomers. On the other hand, we expected to see migration time shifts in the *AxeA*-treated ISM chitosan sample relative to the control, rather than peak height changes.

Precise identification of the peaks in the electropherograms of the ISM chitosan sample was difficult due to the lack of specific standards, e.g., chitosan oligomers with known, partial deacetylation. The chitin and chitosan standards used for the method development were 100 % acetylated and 100 % deacetylated, respectively. The obtained ISM chitosan sample was about 80 % deacetylated originally and the treatment with deacetylase-like enzyme added approximately another 5 % deacetylation as determined by an assay for acetyl content[52] carried out by our collaborators. It is most likely that the small increase in percent deacetylation from 80 to 85 % was not enough to induce a shift in migration time since the acetyl loss represents only a 0.7 % decrease in mass of, for example, the chitosan tetramer. Due to the unavailability of a CE system equipped with an electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS), the fraction collection option of the Beckman CE system will be used in order to collect the separated species from the capillary and then perform MS analysis using matrix assisted laser desorption ionization (MALDI). An off-line CE-MS method is currently under development for the precise identification of peaks in the ISM chitosan sample, both before and after treatment with the deacetylase-like enzyme.

3.5 Conclusions

Capillary electrophoretic separation of the fluorescent APTS derivatives of five chitin oligomers (dimer to hexamer) and five chitosan oligomers (dimer to hexamer) was achieved with the aide of borate complexation. The complete separation of the ten-component mixture took less than 30 min and there was no interference during the separation from excess, unreacted APTS, which migrated so slowly in the capillary that it was not detected. Chitin and chitosan oligomers could be successfully detected at concentration levels of $3\mu\text{M}$ and $25\mu\text{M}$, respectively. While further optimization of the derivatization procedure could no doubt lead to lower detection limits for both types of oligosaccharide, this was not our interest given the industrial application of monitoring enzyme products.

APTS derivatization provided a means of detecting the chitin and chitosan oligomers with a degree of sensitivity that eliminated the need for large injection volumes that result in loss of resolution in CE. Our goal to separate, for example, two chitosan oligomers having the same chain length (DP) and percentage deacetylation but different composition of acetyl groups demands very high resolution between neighboring peaks, which can only be achieved when small sample volumes and concentrations can be used. Although we have not made the comparison, CE with UV/Vis absorbance detection at 488 nm of the APTS-oligomers provides a less expensive means of carrying out the separation when LIF is not available.

The enzymatically produced ISM chitosan sample consisting of a mixture of chitosan oligomers having an average DP of 3.7 units and 80 % deacetylation was treated with a chitin deacetylase-like enzyme and analyzed using the developed CE method to monitor the extent of deacetylation. We expected to see the disappearance of peaks from the control sample and appearance of new peaks in the enzyme-treated sample corresponding to a given oligosaccharide having an increased amine content. Results showed specificity of the enzyme for certain DP, but exact identification of the sites of deacetylation is not yet possible by

interpolation without standards that cover a range of percentage deacetylation for a given DP. MS would be useful for the identification but direct coupling of this technique to the CE instrument is not currently available to us. An offline CE-MALDI/MS method will be developed but due to the ionization suppression obtained with sodium tetraborate buffer, the current separation method will have to be adjusted. MS-compatible buffers like morpholine, triethanol amine and histidine are currently under investigation as separation media for the 10 component mixture of APTS-oligomers so that more precise identification of the ISM chitosan sample peaks can be made from collected CE fractions.

Acknowledgements

This research project was financially supported by Strategic Grant No. 257885 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. M-E. Beaudoin acknowledges graduate scholarships from Quebec Funds for Research in Nature and Technology and from the Université de Montréal. The authors wish to thank K. Morley and R. Kauslauskis from McGill University for performing the enzymatic reaction and acetyl content assay, and C. Dupont from the INRS-Armand-Frappier (Institut national de la recherche scientifique du Québec) for providing the oligomer standards and the purified deacetylase-like enzyme.

4. Caractérisation du flux électroosmotique

4.1 Introduction

Deux mécanismes de séparation coexistent en électrophorèse capillaire, l'électromigration et l'électroosmose. L'électromigration représente tout simplement l'attraction que les molécules chargées en solution ont pour la cathode ou l'anode. Sous l'influence d'un champ électrique, les espèces se déplacent vers l'électrode de charge opposée avec une vitesse linéaire selon leur mobilité électrophorétique (μ_{ep}). Ce premier phénomène peut être décrit selon l'équation 4.1 où q est la charge électrique de l'ion, η est la viscosité du milieu et r est le rayon hydrodynamique de l'analyte. L'électromigration est une fonction de l'analyte lui-même et est influencé seulement par la viscosité du tampon.

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \eta \pi r} \quad (4.1)$$

Le deuxième phénomène, le flux électroosmotique, est plutôt une propriété de la solution tampon et ne dépend pas du tout de la nature ou de la charge des analytes en solution. Le capillaire est fait de silice fondue donc la paroi intérieure du capillaire est tapissée de groupes SiOH. Au contact d'une solution aqueuse, ces groupes seront en équilibre avec leur forme déprotonée, le SiO⁻ selon la réaction décrite par 4.2.



Plus le pH de la solution est bas, plus la population de protons en solution sera élevée donc plus l'équilibre sera favorisé vers la formation de SiOH. L'équilibre change de direction à mesure que le pH augmente et de plus en plus de contre-ions (des cations dans la majorité des cas) provenant de la solution tampon se collent sur la paroi afin de respecter la loi de l'électroneutralité. Une double couche d'ions est alors formée : la première couche s'absorbe sur la paroi du capillaire et est très compacte tandis que la deuxième couche est diffuse et plus éloignée de la paroi. La formation de cette double couche entraîne la création

d'une différence de potentiel, connue sous le nom de potentiel zéta (ζ). Lorsque le voltage est appliqué aux électrodes, les cations de la couche diffuse, se mettent en mouvement vers la cathode et puisque ces cations sont solvatés, ils entraînent par le fait même la formation d'un flux vers la cathode. Le flux électroosmotique a un profil plat contrairement au profil parabolique obtenu en chromatographie. Ce profil diminue donc la diffusion et l'élargissement des pic durant le processus de séparation. C'est pour cette raison que les séparations en électrophorèse capillaire sont beaucoup plus efficaces que les séparations par CLHP. L'ordre de grandeur du flux électroosmotique est directement relié à la charge présente sur la paroi [9] donc au pH puisqu'il gère l'équilibre des groupes silanols. Il est donc possible de visualiser la variation de la mobilité électroosmotique (μ_{eof}) comme démontré à la Figure 4.1.

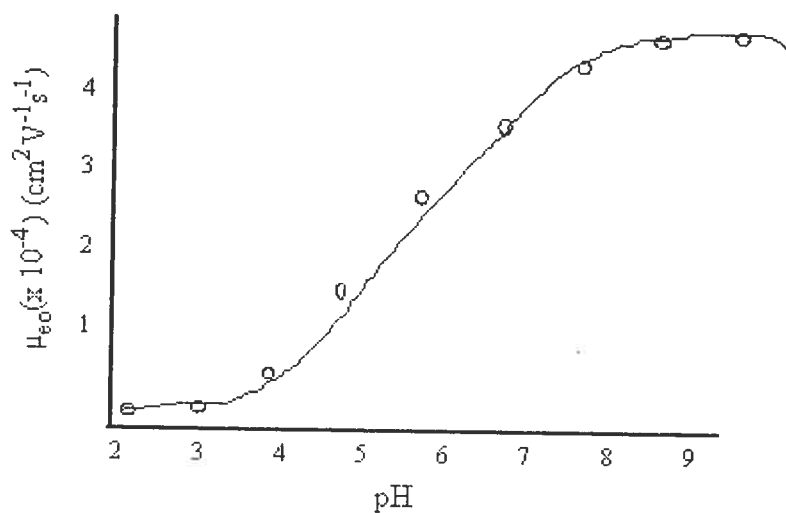


Figure 4-1 Variation de la mobilité électroosmotique en fonction du pH

La mobilité électroosmotique peut également être calculée à partir de l'équation 4.3 où ϵ est la constante diélectrique, ζ est le potentiel zéta et η est la viscosité du milieu.

$$\mu_{eof} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \eta \pi} \quad (4.3)$$

Puisque l'électromigration et l'électroosmose coexistent durant une séparation en électrophorèse capillaire, il est important de mentionner que la vitesse apparente des analytes est décrite par une somme des deux phénomènes comme le montre l'équation 4.4 où E représente le champ électrique.

$$v_{app} = (\mu_{ep} + \mu_{eof}) E \quad (4.4)$$

Le flux électroosmotique occupe donc une place importante dans les séparations électrophorétiques puisqu'il permet d'entraîner tous les analytes neutres jusqu'à la fenêtre de détection. Le EOF ne possède pas de valeur fixe mais varie plutôt avec la nature de la surface du capillaire, le pH, la force ionique et la nature du tampon utilisé. Sa caractérisation est importante et permet entre autres d'évaluer les charges portées par les analytes dans l'échantillon. Il est relativement facile d'étudier le EOF lorsque le type de détection choisi est l'UV. Par contre, les résultats d'une étude poussée du EOF jumelée avec la détection LIF n'ont pas été trouvés dans la littérature.

L'étude préalablement effectuée sur le comportement anormal de migration des oligomères de chitine et de chitosane requiert un calcul de la mobilité de ces molécules afin d'établir une relation avec la masse moléculaire. Il est donc nécessaire de déterminer la valeur la mobilité électroosmotique afin de calculer les mobilités électrophorétiques des chitines et chitosans.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Provenance des produits⁴

Le borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (99%) a été obtenu de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), le HCl (32-35% dans l'eau) provient de EMD

⁴ La pureté minimum de chaque produit chimique est indiquée entre parenthèse. Tous les produits chimiques ont été utilisés sans purification additionnelle.

Chemicals (Gibbstown, NJ, USA), le DMSO (99%) a été acheté chez Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada) et l'acridine orange (*ultrapure*) provient de United States Biochemical Corp. (Cleveland, OH, USA).

L'eau distillée a été purifiée par un système Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) et a été utilisée dans la préparation de tous les tampons et échantillons. Les capillaires de silice fondue ont été achetés de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2 μm , utilisés pour filtrer toutes les solutions, ont été obtenus de Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

4.2.2 Préparation des tampons

Le tampon de borate 80mM a été préparé avec du $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ($I = 0.24\text{M}$) et le pH a été ajusté à 8.4 avec du HCl 2M. Les tampons de concentrations 70 – 30mM ($I = 0.21\text{M}$ à 0.09M) ont été préparés par dilution du tampon à 80mM avec de l'eau distillée.

4.2.3 Instrumentation

Les analyses sont faites avec un système P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) sur lequel un capillaire de silice fondue ayant une longueur totale de 60 cm (50 cm jusqu'au détecteur) et un diamètre interne de 50 μm est installé. La détection est effectuée avec un laser d'ions d'argon de 3 mW ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre de longueur d'onde d'émission de 520 nm. Avant chaque injection, le capillaire est rincé par pression avec du NaOH 0.1M, de l'eau distillée et du tampon pour un remplacement minimal de 10 volumes de capillaire. L'injection de l'échantillon est faite par pression (injection hydrodynamique) à 0.5 psi pour une durée de 10 secondes représentant environ 10 nL. Une seconde injection, cette fois-ci de tampon pour mettre l'échantillon en sandwich, a une durée de 5 secondes. Le voltage de séparation est de 25 kV et la température du capillaire est ajustée à 25° tandis que les échantillons sont réfrigérés à 4°C.

4.3 Résultats et discussion

Dû à l'absence de documentation sur la caractérisation du flux électroosmotique par électrophorèse capillaire et détection de fluorescence induite par laser, trois différentes techniques ont été explorées. Puisque la méthode améliorée de séparation comprend l'utilisation d'un tampon de 80mM borate à pH 8.4, c'est à cette concentration et ce pH que le EOF a été étudié.

4.3.1 Utilisation d'un marqueur

Lorsque la détection UV conventionnelle est utilisée, il est possible d'utiliser une molécule neutre comme le DMSO afin de marquer le flux électroosmotique. Puisque le DMSO possède une viscosité différente de l'eau, son passage à la fenêtre de détection résultera en un pic négatif indiquant un changement d'indice de réfraction. Malheureusement, avec une détection directe en LIF où l'émission de la lumière est mesurée au lieu de la lumière transmise, il a été impossible de voir un pic négatif lors de l'injection du DMSO.

Nous nous sommes donc tournés vers d'autres molécules plus complexes afin de trouver un potentiel marqueur neutre. Deux problèmes se sont rapidement posés : premièrement, très peu de molécules peuvent être détectées aux longueurs d'ondes fixes de l'instrument et deuxièmement, les molécules fluorescentes sont souvent porteuses de charges. En effet, l'intensité de la fluorescence est augmentée par la présence de conjugaison et par la délocalisation de charge. Il est donc très difficile de trouver une molécule neutre et fluorescente qui est excitée à 488 nm.

Malgré tout, il a été décidé de tester quelques molécules (Figure 4.2) dont les propriétés concordaient avec le laser d'ions d'argon : un sel d'acri flavine, l'acridine orange et l'acridine jaune G. Ces trois molécules possèdent trois cycles conjugués ainsi que différents substituents. Malheureusement, la première molécule ne peut être obtenue que sous forme de sel, impliquant immédiatement la présence de charges en solution, elle a donc été mise de côté. L'intensité du

signal obtenu avec l'acridine jaune G était très faible. De plus, cette molécule possède deux groupes amines libres donc les chances de protonation sont élevées.

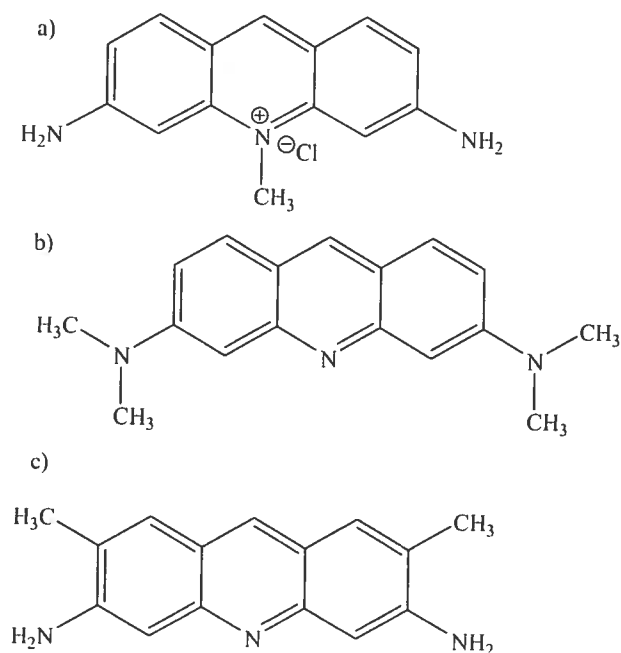


Figure 4-2 Molécules testées comme marqueur neutre. a) sel d'acriflavine ; b) acridine orange et c) acridine jaune G

Des trois molécules fluorescentes testées, seulement l'acridine orange a donné des résultats prometteurs. Comme le montre la Figure 4.3, quoique le pic de l'acridine orange observé à 3.7 min représente très probablement une espèce chargée positivement, un large pic négatif observé à 5.3 min semble indiquer le EOF. Il semblerait qu'après l'injection, la bande de l'échantillon se sépare en deux : une partie chargée positivement, contenant l'acridine orange et une partie neutre, celle-ci contenant tout simplement l'eau utilisée comme solvant. En mode normal, les espèces chargées positivement migrent plus rapidement que les espèces neutres expliquant ainsi l'allure de l'électrophérogramme. D'après les résultats obtenus, il serait possible de caractériser le EOF avec le pic négatif accompagnant le pic de l'acridine orange. Ce n'est cependant peut-être pas la

technique idéale puisque le large pic négatif peut être difficile à intégrer de façon reproductible.

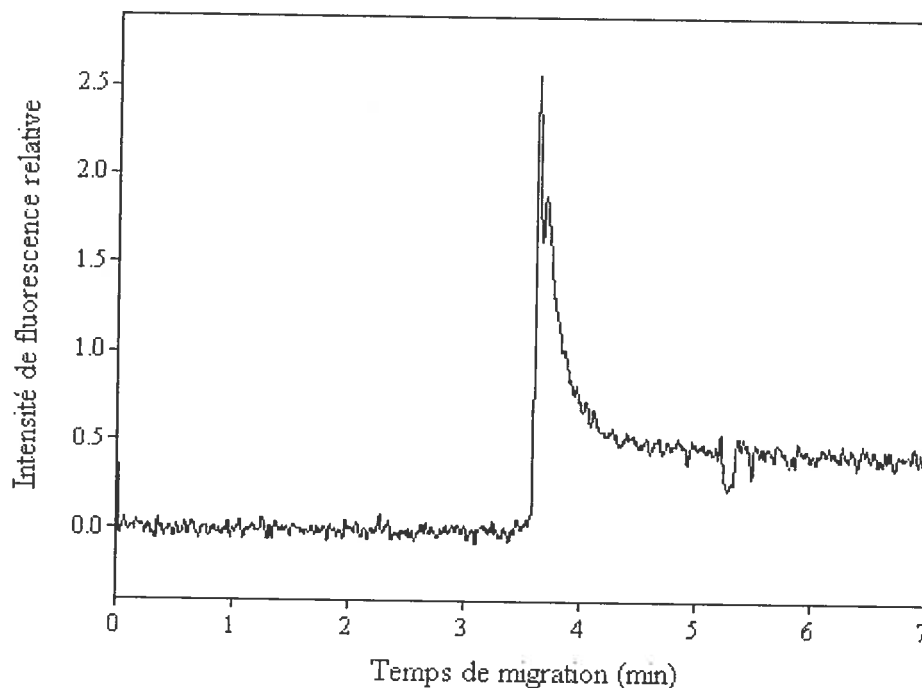


Figure 4-3 Séparation d'acridine orange à 0.001 mg/mL. La séparation est effectuée dans un tampon de borate 80mM à pH 8.4 et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.

4.3.2 Détection indirecte

Dans le même ordre d'idée que l'utilisation d'un marqueur neutre, il a été décidé d'ajouter la molécule fluorescente acridine orange au tampon de séparation et d'ainsi faire de la détection indirecte. Dans cette technique de détection, la solution tampon comprend le chromophore ou fluorophore donc donne un signal constant au détecteur. Lorsque la bande contenant l'analyte non-absorbant passe devant la fenêtre de détection, les molécules de fluorophore du tampon sont déplacées temporairement et un pic négatif est enregistré.

Il reste tout de même important d'avoir un échantillon à injecter. Nous avons choisi le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme marqueur du EOF et avons

ajouté de l'acridine orange dans une concentration de 0.001 mg/mL au tampon de séparation. La Figure 4.4 présente les résultats obtenus.

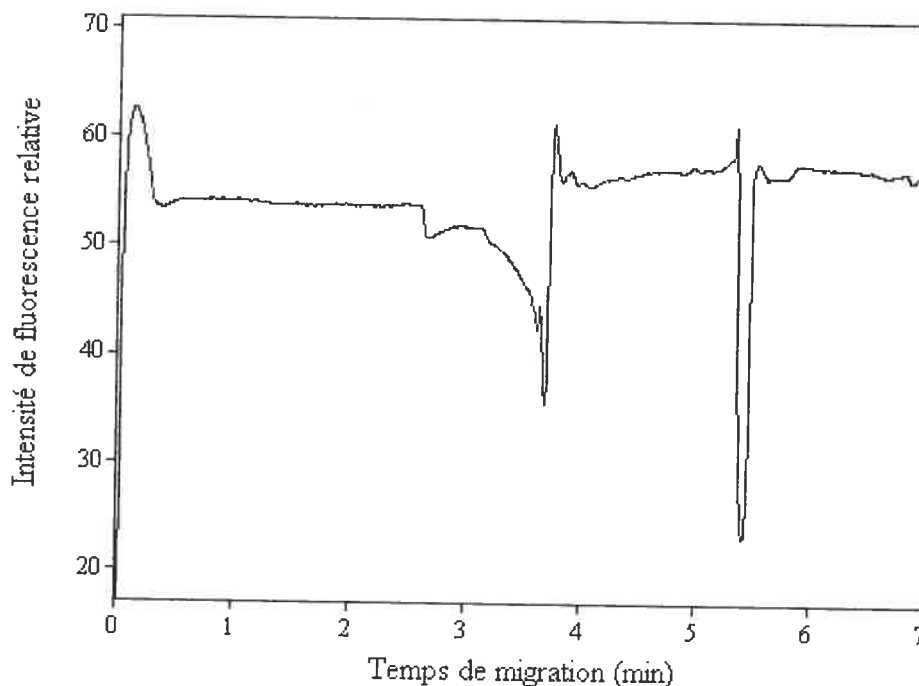


Figure 4-4 Séparation d'une solution de 1% de DMSO. La séparation est effectuée dans un tampon de borate 80mM à pH 8.4 contenant 0.001 mg/mL d'acridine orange et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée de façon indirecte par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.

Dans le cas de la détection indirecte, nous nous référons au terme « pic de système » qui désigne une zone qui ne contient pas d'analyte mais dans laquelle une composante du tampon de séparation est partiellement ou totalement absente [53]. Bref, un pic de système correspond un analyte qui n'a tout simplement pas été injecté. Dans notre cas, après l'injection du DMSO, il se crée une zone où l'acridine orange n'est pas présente et cette zone migrera plus rapidement que le DMSO qui est neutre.

En regardant attentivement la Figure 4.4, il est possible d'y voir l'image inversée du pic positif obtenu à la Figure 4.3. Dans la première figure, le pic de l'acridine orange présente un effet de traînée tandis que le pic de système

correspondant souffre de diffusion frontale dans la deuxième figure. Ce comportement a été confirmé par Desiderio *et al.* lors d'une étude approfondie des pics de système en électrophorèse capillaire [54]. Notons également que le pic positif de la Figure 4.3 a un temps de migration de 3.7 min tandis que le pic de système de la Figure 4.4 a un temps de migration de 3.7 min apportant ainsi la confirmation que ces deux pics correspondent à la même molécule, l'acridine orange.

Le deuxième pic négatif observé à la Figure 4.4 correspond au DMSO et possède un temps de migration de 5.4 min. Deux concentrations différentes de DMSO ont été injectées afin de confirmer l'identité du pic. Le DMSO étant une molécule complètement neutre, il n'y a aucun doute que ce pic correspond au EOF. Grâce à la méthode de détection indirecte, il a donc été possible de caractériser le EOF.

4.3.3 Étude de la variation du courant

Une autre méthode, celle-ci peu conventionnelle, a été testée pour la caractérisation du EOF. Il a été décidé de tenter de construire une courbe d'étalonnage du flux électroosmotique en fonction de la concentration du tampon. Ces deux paramètres sont théoriquement directement proportionnels. L'approche expérimentale comprend l'utilisation d'une gamme de concentrations de borate allant de 80mM à 30mM. Le capillaire a donc été rempli du tampon à 80mM (tampon initial) par une étape de rinçage et la séparation a ensuite été effectuée dans un tampon de plus faible concentration (tampon final). Lorsque le voltage de séparation a été appliqué, le flux électroosmotique a débuté son déplacement vers la cathode. Il existe donc dans le capillaire une zone où les deux tampons se côtoient. À chaque instant, le courant (en mA) était tracé et puisque le courant varie avec la concentration du tampon, une baisse de courant stable a été observée tant et aussi longtemps que les deux tampons co-existaient dans le capillaire. Le courant a atteint un plateau seulement lorsque le capillaire a été rempli complètement du tampon final. La Figure 4.5 montre la trace descendante du

courant et le point de convergence obtenu (6.0 min) indique le moment précis où les dernières traces du tampon initial ont quitté le capillaire.

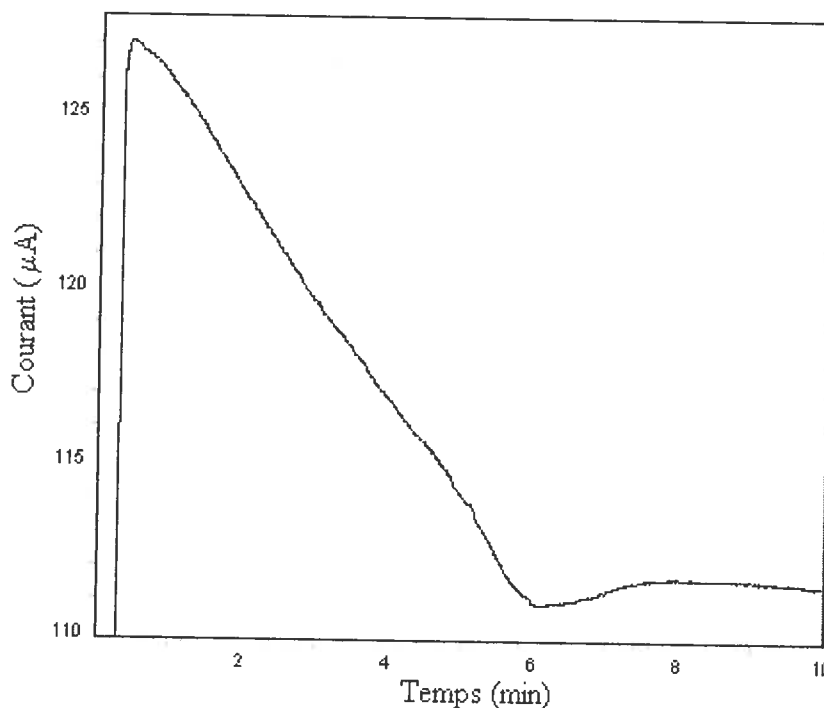


Figure 4-5 Tracé du courant en fonction du temps pour une séparation impliquant un tampon initial de 80mM borate pH 8.4 et un tampon final de 70mM borate pH 8.4. Le point de convergence à 6.0 min se traduit en une valeur de 4.9 min pour le flux électroosmotique à la fenêtre de détection.

Le point de convergence obtenu correspond au temps nécessaire pour que le capillaire se vide complètement du tampon initial. Cependant, la donnée qui nous intéresse est le temps nécessaire pour que le EOF atteigne la fenêtre de détection puisque c'est à cet endroit que la détection LIF se produit. Le capillaire a donc été mesuré très précisément ($L_{tot} = 59.4$ cm et $L_{eff} = 48.6$ cm) et une simple règle de trois a été appliquée. Un temps de 4.92 min a donc été trouvé dans le cas de la Figure 4.5. L'expérience a ensuite été répétée en changeant le tampon final pour un tampon de 60mM borate pH 8.4 et en gardant le même tampon initial. Il

est à noter que le EOF a été mesuré trois fois et ce, pour chaque couple de tampons initial et final.

À partir des données recueillies, une courbe d'étalonnage a été construite (Figure 4.6). Un problème s'est cependant posé puisqu'il était difficile de déterminer la concentration de borate correspondant aux valeurs de EOF calculées. Est-ce celle du tampon initial, du tampon final ou une moyenne des deux concentrations ? Si la concentration initiale est la bonne, alors le couple 80/70 (tampon initial/tampon final) devrait donner le même résultat que le couple 80/40. D'un autre côté, si c'est la concentration finale qui doit être utilisée, alors des résultats identiques devraient être obtenus pour les couples 80/40 et 60/40. Or ces deux hypothèses ont été rejetées par les résultats obtenus avec une variation des couples. C'est donc la moyenne des concentrations (ex. pour une concentration initiale de 80mM et une concentration finale de 60mM, la valeur du EOF mesurée correspond à une concentration de 70mM) qui a été utilisée pour construire la courbe d'étalonnage montrée à la Figure 4.6.

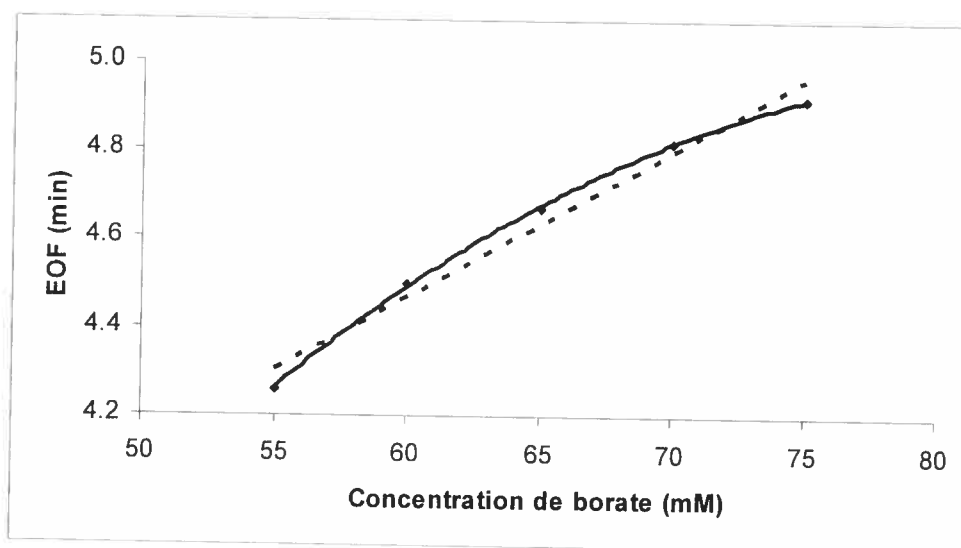


Figure 4-6 Courbe d'étalonnage du EOF en fonction de la concentration moyenne de borate dans le tampon. Équations : 1) relation linéaire $y = 0.0328x + 2.502$ ($R^2 = 0.9762$); 2) relation quadratique : $y = -0.0009x^2 + 0.1442x - 1.0766$ ($R^2 = 0.9995$).

Le coefficient de corrélation obtenu ($R^2 = 0.9762$) indique que la relation n'est pas linéaire entre le EOF et la concentration (ligne pointillée) mais il existe plutôt une relation quadratique entre ces deux facteurs (ligne pleine). L'erreur qui accompagne l'axe de la concentration peut expliquer ce faible éloignement de la linéarité parfaite. De plus, dans le cas des couples de tampons extrêmes (ex. 80/30), il est possible que l'importante différence de force ionique entre les deux tampons coexistant dans le capillaire crée un faible flux hydrodynamique. Le flux électroosmotique serait directement affecté par la présence de ce flux d'apparence parabolique, ce qui pourrait expliquer la linéarité non-parfaite. Puisque c'est le EOF du tampon de 80mM de borate qui était l'objet de cette étude, une extrapolation a été nécessaire afin de trouver une valeur de 5.13 min. Il est donc possible de caractériser le EOF grâce à la méthode de l'étude du courant

4.4 Conclusion

La caractérisation du flux électroosmotique est une étape importante de toute méthode d'électrophorèse capillaire. Puisque le EOF est le seul mécanisme de séparation pouvant entraîner les espèces neutres en solution et qu'il est responsable du passage des espèces négativement chargées (ayant une mobilité en direction de l'injecteur) au détecteur, la détermination de son temps de migration précis permet à l'expérimentateur de déterminer si les autres analytes portent une charge positive ou négative selon leur temps de migration respectif.

Pour qu'une molécule soit fluorescente, elle doit posséder des cycles conjugués et il doit y avoir délocalisation de charge. Il devient donc presque tâche impossible de trouver un marqueur neutre et fluorescent. L'utilisation de l'acridine orange révèle deux pics : le premier chargé positivement (fluorophore) et le deuxième étant neutre (eau distillée utilisée comme solvant). L'utilisation du pic négatif et neutre permet donc d'identifier le temps de migration du EOF.

La deuxième technique utilisée est celle de la détection indirecte jumelée avec l'injection d'un marqueur neutre. L'acridine orange a donc été ajoutée au tampon de séparation afin d'obtenir un signal constant au détecteur. La présence

d'une bande neutre de DMSO déplace ainsi quelques molécules de fluorophore et un pic négatif est obtenu au temps de migration du EOF.

Finalement, une étude de la variation du courant a été réalisée afin de comparer les résultats obtenus avec l'acridine orange. Cette technique implique l'utilisation d'un tampon initial concentré et d'un tampon final dilué. Lorsque les deux tampons coexistent dans le capillaire, le courant descend de façon stable jusqu'à ce que le tampon initial soit complètement éliminé du capillaire. Le courant atteint alors un plateau et le point de convergence indique le temps nécessaire pour vider le capillaire complètement. Une courbe d'étalonnage est ensuite construite et le temps de migration du EOF est extrapolé à partir de l'équation de la courbe. Quelques sources d'erreurs sont présentes avec l'utilisation de cette technique dont la concentration exacte du mélange des tampons. Néanmoins, il a été possible de déterminer le temps de migration du EOF avec cette technique.

Le Tableau 4.1 résume les résultats obtenus à partir des trois techniques de détermination du EOF. Puisque la donnée de l'étude du courant résulte de l'extrapolation de la courbe d'étalonnage, une seule valeur est disponible tandis qu'au moins trois mesures ont été prises pour les deux autres techniques.

Tableau 4.1 Détermination du EOF à l'aide de trois techniques différentes (ND : donnée non disponible)

Méthode	EOF (min)			Moyenne	Écart-type	%RSD
	Essai 1	Essai 2	Essai 3			
Marqueur neutre	5.31	5.31	5.28	5.30	0.02	0.35
Détection indirecte	5.41	5.42	5.44	5.42	0.01	0.25
Étude du courant	5.13	ND	ND	5.13	ND	ND

Un test statistique a été effectué afin de déterminer si les deux moyennes étaient équivalentes selon l'équation 4.5. Puisque les valeurs d'écart-type sont si basses, les moyennes ne sont pas statistiquement égales selon les résultats du test.

En effet, selon cette équation, la valeur du test-T est de 9.25 alors que la valeur maximale permise, à 95% de confiance, est de 2.78.

$$T = \left| \frac{\mu_1 - \mu_2}{\left(\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2} \right)^{1/2}} \right| \quad (4.5)$$

Quoique chaque méthode soit précise, il est nécessaire de choisir une seule technique prédominante pour la caractérisation du EOF. L'utilisation du pic négatif accompagnant l'acridine orange est une méthode risquée puisque le pic neutre est très petit et assez large. Il peut donc y avoir une imprécision dans la détermination du temps de migration. L'étude du courant présente plusieurs désavantages : la préparation de beaucoup de solutions, l'imprécision associée à la concentration ainsi que celle associée à la détermination du point de convergence. Cette technique est donc peu idéale. La détection indirecte avec injection de DMSO représente donc une méthode rapide et efficace, présentant un pic négatif facile à intégrer. Cette technique est donc la plus indiquée pour cette application.

Il est à noter que les résultats obtenus par cette étude du EOF confirment que tous les APTS-oligomères portent des charges négatives. Les temps de migration des APTS-chitines et -chitosans sont tous plus élevés que 5.238 minutes.

5. Analyse d'échantillons produits enzymatiquement

5.1 Introduction

La chitine étant disponible en grandes quantités mais peu utile dû à son insolubilité dans l'eau, il existe un besoin important de la convertir en un dérivé ayant une gamme d'utilisations possibles. C'est par une réaction de désacétylation que le chitosan est produit et c'est ce dérivé qui possède une variété d'applications. Que ce soit dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire, le chitosan est en grande demande [1, 7, 42]. Malheureusement, il est présentement difficile d'effectuer la production de chitosan de façon reproductible et spécifique. La chitine est un déchet qui ne représente aucun danger pour l'environnement. Cependant, afin de la convertir en un produit utile, le chitosane, une réaction avec une base concentrée (Figure 5.1) est nécessaire et représente un danger pour l'environnement par le rejet des réactifs non-utilisés.

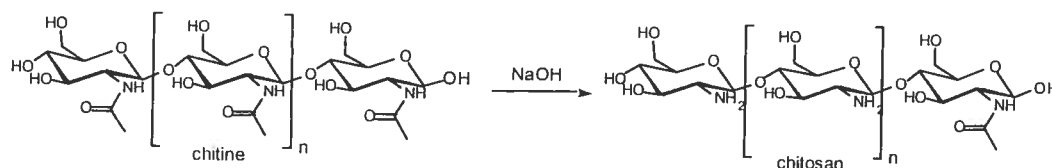


Figure 5-1 Réaction de désacétylation par traitement chimique de la chitine pour la production de chitosan.

L'utilisation d'une enzyme similaire à la chitine désacétylase est donc proposée afin de palier aux problèmes reliés à la production de chitosan. À partir de la technique de l'évolution dirigée, nos collaborateurs travaillent à produire une variété de mutants de l'enzyme *AxeA* afin d'obtenir une meilleure désacétylation. Des échantillons de chitosan partiellement désacétylés ou des oligomères de chitine sont utilisés comme substrat de départ à la réaction enzymatique.

L'électrophorèse capillaire est la méthode analytique choisie afin de déterminer la composition des oligomères avant et après la réaction enzymatique.

Il sera donc ainsi possible d'évaluer l'efficacité des enzymes développées par l'évolution dirigée. La méthode de dérivation et de séparation développée pour les oligomères de chitine et de chitosan est utilisée sans aucun changement. La caractérisation d'oligomères de chitosan produit enzymatiquement est donc une application très intéressante de la méthode développée.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Provenance des produits⁵

Le borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (99%) et le borohydrure de sodium (NaBH_3CN) (95%) proviennent de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) tandis que l'APTS (96%) provient de Fluka (Oakville, ON, Canada).

L'eau distillée a été purifiée par un système Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) et a été utilisée dans la préparation de tous les tampons et échantillons. Les capillaires de silice fondue ont été achetés de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2 μm , utilisés pour filtrer toutes les solutions, ont été obtenus de Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

Les oligosaccharides standard de chitine (100% acétylés, pureté minimum de 95%) et les oligosaccharides standard de chitosan (100% désacétylé, pureté minimum de 98%), allant du dimère à l'hexamère, ont été obtenus de Seikegaku America (distribué par MJS BioLynx, Brockville, ON, Canada). L'échantillon ISM chitosan, produit de façon enzymatique [48] par la compagnie ISM Biopolymer Inc. (Granby, QC, Canada), est composé d'un mélange d'oligomères de chitosan (DP moyen de 3.7 unités et degré de désacétylation d'environ 80%). Une enzyme ayant une activité de chitine désacétylase [50, 51], *AxeA*, a été

⁵ La pureté minimum de chaque produit chimique est indiquée entre parenthèse. Tous les produits chimiques ont été utilisés sans purification additionnelle.

purifiée par Dupont *et al.* [49] et utilisée pour les essais enzymatiques de ce projet.

5.2.2 Préparation des tampons

Le tampon de borate 80mM a été préparé avec du $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ($I = 0.24\text{M}$) et le pH a été ajusté à 8.4 avec du HCl 2M.

5.2.3 Préparation des échantillons

Avant analyse par électrophorèse capillaire, les échantillons ont été traités avec l'enzyme *AxeA*. Ces manipulations ont été effectuées à l'université McGill par K. Morley. La réaction enzymatique se déroule à 50°C pendant 21 heures dans un tampon de phosphate à pH 6.0 qui contient du $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Un échantillon contrôle est traité de la même façon, mais ne contient pas d'enzyme. Après cette réaction, les échantillons sont placés à -20°C et sont dégelés juste au moment de la dérivation avec l'APTS. La réaction de dérivation n'est pas précédée de procédure de purification alors tous les produits de la réaction enzymatiques sont présents dans l'échantillon. La réaction maximisée avec l'APTS est décrite au chapitre 3.

5.2.4 Instrumentation

Les analyses sont faites avec un système P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) sur lequel un capillaire de silice fondue ayant une longueur totale de 60 cm (50 cm jusqu'au détecteur) et un diamètre interne de 50 μm est installé. La détection est effectuée avec un laser d'ions d'argon de 3 mW ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre de longueur d'onde d'émission de 520 nm. Avant chaque injection, le capillaire est rincé par pression avec du NaOH 0.1M, de l'eau distillée et du tampon pour un remplacement minimal de 10 volumes de capillaire. L'injection de l'échantillon est faite par pression (injection hydrodynamique) à 0.5 psi pour une durée de 10 secondes représentant environ 10 nL. Une seconde injection, cette fois-ci de tampon pour

mettre l'échantillon en sandwich, a une durée de 5 secondes. Le voltage de séparation est de 25 kV et la température du capillaire est ajustée à 25° tandis que les échantillons sont réfrigérés à 4°C.

5.3 Résultats et discussion

L'enzyme utilisée doit pouvoir augmenter le degré de désacétylation de l'échantillon de départ. Afin de vérifier l'efficacité de l'enzyme *AxeA*, deux types d'échantillons ont été utilisés. Le premier type d'échantillon est une gamme de standards de chitine (DP 2-6) afin de vérifier la réactivité et la spécificité de l'enzyme. Le dernier est un mélange d'oligomères de chitosan ayant un DP moyen de 3.7 unités et un taux de désacétylation de 80%. C'est échantillon est appelé ISM chitosan puisqu'il provient de la compagnie collaboratrice au projet.

5.3.1 Oligomères de chitine

Les standards utilisés pour le développement de la méthode d'électrophorèse capillaire ont été soumis à l'action de l'enzyme afin de déterminer si cette dernière était active sur des saccharides complètement acétylés. L'expérience a été réalisée en deux parties : premièrement, les oligomères de chitine ont été traités individuellement par *AxeA* et ensuite, des mélanges d'oligomères ont été traités. Ces deux procédures avaient comme but respectivement l'évaluation de la réactivité et de la spécificité d'*AxeA*. Il est important de mentionner que pour chaque oligomère, deux échantillons ont été analysés dont un étant le contrôle ne contenant pas l'enzyme *AxeA*. Les échantillons ont ensuite été dérivés avec la procédure maximisée avec l'APTS.

Pour les oligomères ayant des DP de 2 à 4, une série de nouveaux pics apparaît dans les échantillons désacétylés. Malheureusement, le temps de migration d'aucun de ces pics ne correspond à un standard donc l'identification est difficile. De plus, le mécanisme d'action de l'enzyme n'est pas connu. Un exemple est présenté à la Figure 5.2 pour la désacétylation du trimer de chitine. Il est à noter que cet oligomère présente un pic d'impureté ayant un temps de

migration d'environ 20 min. Puisque les standards de chitine ne sont purs qu'à un minimum de 95%, selon le fournisseur Seikagaku, il est tout à fait normal d'observer un pic supplémentaire. De plus, même si cet échantillon contrôle a subi chaque étape de la réaction de désacétylation enzymatique, c'est-à-dire la dilution dans le tampon de réaction ainsi que l'incubation à 50°C pendant 21 heures, son électrophérogramme correspond parfaitement à un standard de chitine DP 3 n'ayant subi aucune procédure. Il est donc possible de conclure que la réaction de dérivation avec l'APTS est très spécifique aux saccharides et que la présence d'une variété d'espèces concomitantes n'affecte pas son efficacité.

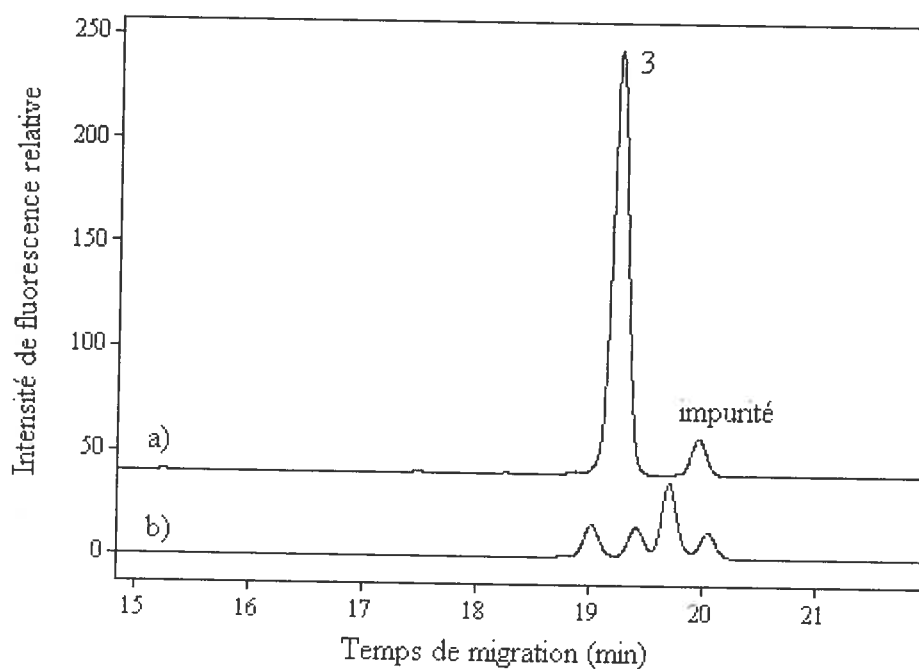


Figure 5-2 Séparation du trimère d'APTS-chitine (DP 3) a) contrôle et b) après réaction enzymatique avec *AxeA*. La séparation est effectuée dans un tampon de borate 80mM à pH 8.4 et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.

Dans le cas du trimère désacétylé par l'enzyme (Figure 5.2b), quelques nouveaux pics apparaissent comparativement au contrôle. Selon une étude de la quantité d'acétate libérée lors de la réaction de désacétylation enzymatique, un pourcentage de désacétylation de 13.6% est enregistré pour le trimère de chitine

préalablement à 0% de deacétylation. Le trimère possède trois sites de désacétylation possible. Deux hypothèses sont donc avancées pour l'explication des pics supplémentaires. La première stipule que l'enzyme ne désacétyle qu'un seul site ce qui entraîne la création de trois nouvelles espèces qui sont des isomères de masse. Ceci implique cependant que la méthode de séparation est capable de résoudre les isomères ce qui est peu probable sans l'ajout d'un additif comme les cyclodextrines, très efficaces au niveau des séparations chirales [9]. La deuxième hypothèse prévoit un pic différent pour la désacétylation d'un, de deux et des trois sites disponibles sur le trimer. Puisque chacun de ces produits possède une masse différente, il est tout a fait juste d'assumer une séparation possible de ces trois espèces. Malheureusement, aucune de ces deux hypothèses ne peut être confirmée dû à la nature des standards disponibles. En effet, les standards de chitine et de chitosane achetés auprès de la compagnie Seikagaku ne sont que 100 % acétylés (chitines) ou 100% désacétylés (chitosanes). Il est présentement impossible d'obtenir des standards partiellement désacétylés donc l'identification des pics supplémentaires est irréalisable. De plus, une extrapolation des temps de migration entre les formes 0% et 100% acétylées afin d'estimer les masses des produits partiellement désacétylés n'est pas possible puisque les mobilités de sont pas proportionnelles au ratio charge-sur-masse comme expliqué à la section 3.4.3.

L'analyse des produits de la réaction enzymatique par électrophorèse capillaire ne donne cependant pas d'informations quantitatives. Comme expliqué au chapitre 3, la chitine et le chitosane ont des rendements différents de dérivation avec l'APTS. Donc même si toute la chitine disponible était convertie en chitosane, il serait impossible de le déterminer par cette méthode. En effet, si on mesure l'aire du pic de l'échantillon contrôle et qu'on compare cette valeur à la somme de l'aire des pics de l'échantillon désacétylé, les deux données ne sont pas du tout similaires.

Pour les oligomères de DP 5 et 6, des pics supplémentaires sont également obtenus, mais puisque ces oligomères ont des temps de migration plus rapide que

les DP 2 à 4, il n'est pas possible d'obtenir une résolution à la ligne de base de ces pics supplémentaires. Il est intéressant de mentionner que dans le cas de ces deux oligomères, l'enzyme semble également posséder des propriétés d'hydrolase. En effet, l'échantillon désacétylé du DP 6 présente les séries de pics correspondant au tétramère, au trimère et au dimère (Figure 5.3) alors que ces oligomères ne devraient pas être présents mais sont tout de même détectés très faiblement dans l'échantillon contrôle sauf pour le dimère qui semble avoir contaminé l'échantillon de départ. Cette activité d'hydrolase ne peut cependant pas être confirmée à ce point par les biochimistes impliqués dans le projet. Cependant, la réactivité de l'enzyme *AxeA* avec les oligomères de chitine est confirmée par une production d'acétate correspondant à un pourcentage final de désacétylation de 24.3% dans le cas de l'hexamère de chitine préalablement à 0% de désacétylation.

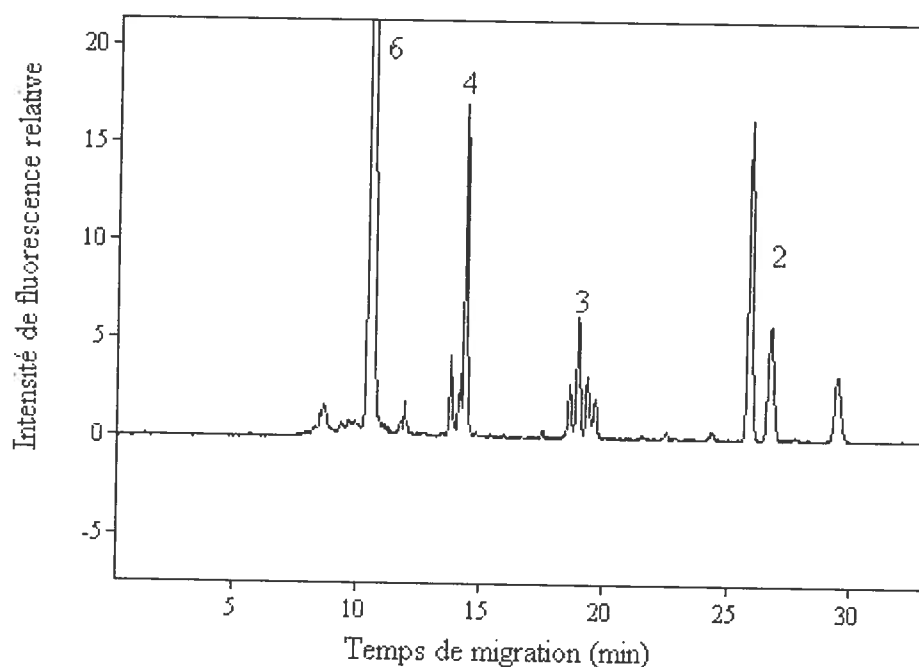


Figure 5-3 Séparation de l'APT-s-chitine DP 6 a) contrôle et b) après réaction enzymatique avec *AxeA*. L'identification des séries de pics est comme suit : 6, hexamère d'APT-s-chitine partiellement désacétylé, etc. Les détails de la séparation sont donnés à la Figure 5.2.

La deuxième partie de l'expérience avec les oligomères de chitine comprend une réaction enzymatique avec trois mélanges différents : DP 2-3, DP 4-6 et DP 2-6. Chaque oligomère a été ajouté en quantité égale dans chaque mélange et la réaction enzymatique a été effectuée sur les trois mélanges et sur les trois contrôles correspondants.

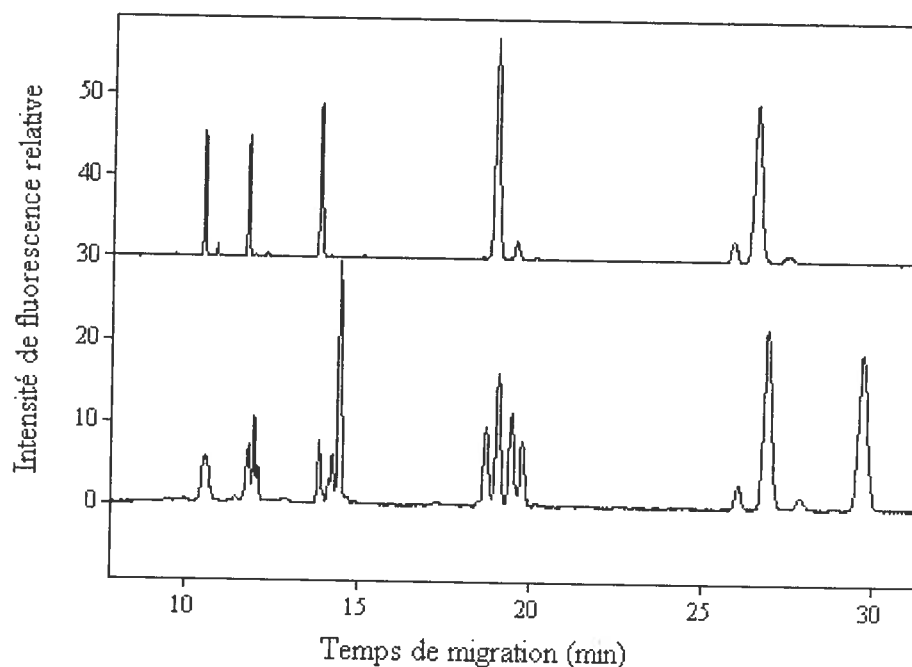


Figure 5-4 Séparation d'un mélange d'APTS-chitine DP 2-6 a) contrôle et b) après réaction enzymatique avec *AxeA*. L'identification des séries de pics est comme suit : 6, hexamère d'APTS-chitine partiellement désacétylé, etc. Les détails de la séparation sont donnés à la Figure 5.2.

Comme démontré à la Figure 5.4, les mêmes séries de pics sont présentes et ce, pour chaque DP. Notons, qu'encore une fois la résolution est fortement diminuée pour les pics du DP 6 et 5 (11 et 12 min, respectivement). Ces résultats indiquent donc que l'enzyme *AxeA* ne favorise pas un oligomère par rapport à un autre. Son activité n'est pas spécifique à la longueur des oligomères disponibles. L'enzyme réagit avec tous les oligomères présents dans le milieu réactionnel. Puisque la réaction enzymatique se déroule sur une période de 21 heures, il serait intéressant de prendre des aliquots après certains intervalles de temps afin de voir

si l'enzyme attaque tous les oligomères en même temps ou si la désacétylation se déroule de façon organisée.

Il est intéressant de mentionner que dans le contexte de cette expérience, il a été nécessaire d'effectuer une dérivation avec l'APTS sur un mélange d'oligomères. Auparavant, dans le cas des standards notamment, chaque oligomère était dérivé individuellement et mélangé après que la réaction était complétée. La dérivation du mélange effectuée avec succès démontre que l'APTS peut s'attacher à plusieurs saccharides dans le même milieu réactionnel.

5.3.2 ISM chitosane

L'étude avec les oligomères de chitine a établi la capacité de l'enzyme de désacétyler un substrat 100% acétylé. Mais qu'en est-il de son efficacité sur les chitosanes partiellement désacétylés? L'échantillon ISM chitosane (DP moyen de 3.7 unités) est un mélange de dimer, trimer et tétramère ayant un degré de désacétylation de 80%. Le but est donc de voir si l'enzyme peut augmenter ce pourcentage de désacétylation initial en vue d'obtenir du chitosan 100% désacétylé. Selon les tests enzymatiques faits par nos collaborateurs de McGill, *AxeA* ajoute seulement un 5% supplémentaire de désacétylation à l'échantillon ISM chitosane. La Figure 3.5 montre les résultats de l'échantillon contrôle et du ISM chitosane désacétylé enzymatiquement. Une discussion de cet électrophérogramme est également comprise dans le chapitre 3.

Cependant, lors de l'écriture de l'article présenté au chapitre 3, les résultats du traitement d'un mélange d'oligomères de chitine avec *AxeA* (section 5.3.1) n'étaient pas disponibles. L'hypothèse alors énoncée était que l'enzyme démontrait de la spécificité pour certaines longueurs d'oligomères de chitosane. Puisque nous avons démontré que *AxeA* n'était pas spécifique à la longueur des oligomères de chitine, il semble peu probable qu'elle le soit pour le chitosane. À ce point-ci, une identification précise des pics dans le l'échantillon ISM chitosane est nécessaire à la compréhension du mécanisme d'action de l'enzyme *AxeA*. L'absence de standards ayant un pourcentage de désacétylation intermédiaire rend

l'identification impossible à partir des temps de migration. Deux solutions se présentent afin de palier à ce problème : la création d'une série de standards de chitosane ayant une plage de degré de désacétylation ou le développement d'une méthode d'électrophorèse capillaire jumelée avec la spectrométrie de masse.

5.4 Conclusion

L'analyse d'échantillons de chitosane produits de façon enzymatique est une application possible de la méthode de dérivation avec l'APTS et de séparation par électrophorèse capillaire. La réaction avec l'enzyme *AxeA* a pour but la désacétylation reproductible et spécifique de chitine ou de chitosane partiellement désacétylé.

L'étude des oligomères de chitine traités individuellement ou en mélange avec l'enzyme a démontré deux propriétés importantes d'*AxeA*. Premièrement, l'enzyme est active puisque chaque oligomère de chitine a été transformé en un mélange de plusieurs autres espèces comme le démontre les électrophérogrammes obtenus. Quoique l'identification de ces espèces produites enzymatiquement pose un problème, deux hypothèses ont été formulées quant à la nature de chaque pic. Les données disponibles à ce point du projet ne permettent pas la réjection ou l'acceptation d'une des deux hypothèses. Deuxièmement, il a été démontré que l'enzyme ne réagit pas spécifiquement avec les oligomères d'une certaine longueur. En effet, l'enzyme agit sur toutes les composantes d'un mélange des APTS-chitines DP 2 à 6 et ce, sans démontrer de préférence pour un oligomère par rapport à un autre. La propriété réactive de l'enzyme semble donc dominer sur une possible caractéristique de spécificité. Une étude de la réaction enzymatique par intervalle de temps pourrait fournir plus d'information sur le mode d'action de l'enzyme lorsqu'une variété d'oligomères est présente dans le milieu réactionnel.

L'analyse d'un échantillon de chitosane partiellement désacétylé par la méthode d'électrophorèse capillaire a montré l'augmentation de l'aire de quelques pics comparativement au contrôle. Selon les résultats enzymatiques, *AxeA* ajouterait seulement 5 % de désacétylation à l'échantillon ISM chitosane. Il est

donc possible de penser que la faible augmentation de masse résultante n'est peut-être pas détectée par CE. Ainsi, au lieu de voir un changement de temps de migration, seulement un changement dans l'aire des pics est observé.

Afin de percer le mystère des propriétés et de l'efficacité de l'enzyme *AxeA*, il est tout à fait nécessaire de pouvoir identifier les pics obtenus par électrophorèse capillaire. Le manque de standards appropriés et de détermination de la masse précise sont les problèmes à affronter. Selon Tolaimate *et al.* [55], il est possible de préparer le chitosane à partir de la chitine selon deux méthodes différentes. Quoique ce groupe applique ces méthodes à de gros polymères de chitine, il serait intéressant d'essayer de désacétyler les oligomères de chitines ayant un DP de 2 à 6 afin de créer une banque de standards. La spectrométrie de masse peut être utilisée pour caractériser les produits d'une réaction de désacétylation maison. Afin de palier au problème de l'identification des pics par la masse, une étude préliminaire d'un couplage CE-MS est présentée au prochain chapitre.

6. Étude préliminaire d'un couplage « off-line » CE-MS

6.1 Introduction

La spectrométrie de masse est une technique analytique de plus en plus populaire. Les données de masse précise qui sont obtenues grâce à cette technique en font une méthode d'analyse très puissante. Plusieurs modes de spectrométrie de masse sont disponibles créant ainsi une variété de types d'analyses. La technique d'ionisation MALDI (« matrix-assisted laser desorption/ionization ») consiste en l'utilisation d'une matrice capable d'absorber l'énergie du laser afin de convertir l'échantillon en ions. Plusieurs matrices sont disponibles sur le marché, mais certaines sont privilégiées pour l'analyse de saccharides dont entre autres le THAP [47, 56], le DHB [27-29, 47, 57-60] et le 3-HPA [61-63]. Le THAP est également la matrice utilisée par la compagnie ISM pour l'analyse de leur chitosanes. Le DHB peut être retrouvé sous une autre forme, sDHB défini comme super DHB, qui consiste tout simplement en un mélange de DHB avec de l'acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque. Une autre technique d'ionisation, l'électronébulisation (ESI), est également disponible pour l'analyse de saccharides [41, 64]. Cette méthode est souvent couplée à un appareil de séparation de chromatographie liquide ou de CE puisque l'échantillon doit être sous une forme liquide avant d'être transféré en MS pour y être ionisé. Cependant, c'est un appareil MALDI qui était disponible donc des analyses par ESI n'ont pas été réalisées.

L'analyseur de masse couplé au MALDI est un temps de vol (TOF) qui peut fonctionner en deux modes différents : le mode linéaire et le mode réflectron. Le principe du TOF est que les ions de petites masses ont une plus grande énergie cinétique et donc voyagent plus rapidement que les ions de grandes masses. Le mode linéaire est caractérisé par une plus faible résolution puisque plusieurs facteurs influencent la distribution de temps de vols des ions possédant le même ratio m/z (masse/charge). Une solution à ce problème est l'utilisation du mode réflectron dans lequel un champ électrique est appliqué afin d'éliminer les différences d'énergies cinétiques des ions ayant le même ratio m/z . La Figure 6.1

[65] présente un schéma des deux modes d'analyse du TOF. Il est à noter que le TOF peut être jumelé avec une ionisation par MALDI, par ESI ou par d'autres types d'ionisation.

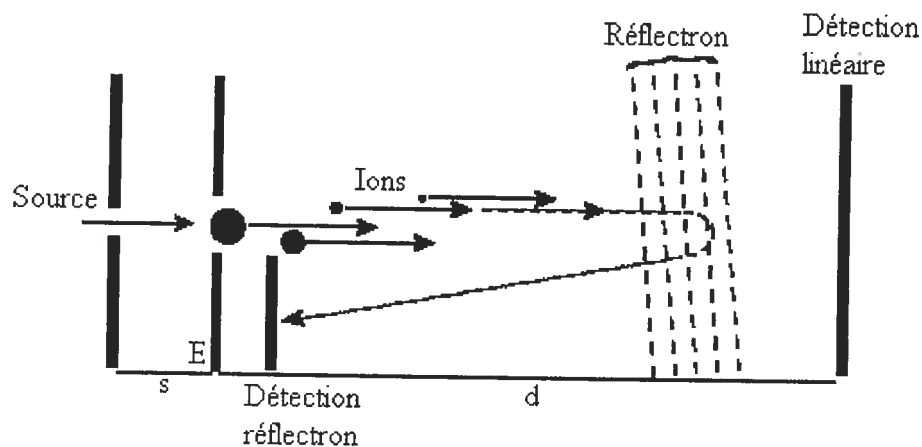


Figure 6-1 Schéma des modes linéaire et réflectron disponibles sur un analyseur de masse TOF

La technique du MALDI présente cependant quelques inconvénients. Le borate qui est utilisé pour faire la séparation en électrophorèse capillaire est nuisible à l'ionisation. De plus, il est impossible de coupler un système de CE avec un spectromètre de masse MALDI puisque la préparation de la plaque est une étape intermédiaire entre les deux analyses.

Afin de palier au premier problème, divers tampons compatibles avec la spectrométrie de masse sont disponibles sur le marché. Ces tampons ont prouvé leur utilité en tant que tampons ayant des caractéristiques intéressantes pour la spectrométrie de masse. Parmi les tampons disponibles, la morpholine [66-70], la triéthanolamine [71] et l'histidine [72] ont fait l'objet d'études de compatibilité, d'efficacité et de reproductibilité dans le cadre de ce projet.

Le deuxième problème peut être contourné avec l'utilisation de la technique de collecte de fractions. L'instrument de Beckman Coulter offre l'option de récolter le liquide sortant du capillaire en établissant certains

paramètres comme la longueur du capillaire et le temps de migration de l'analyte à récolter. Puisque le couplage en ligne d'un appareil de CE et d'un MS est compliqué par les flux très bas du CE et la non compatibilité de la plupart des tampons avec la MS [32], la collecte de fraction a déjà été étudiée par certains groupes [39, 73]. L'analyte est donc isolé des possibles impuretés présentes dans l'échantillon par cette technique, mais la faible concentration récoltée peut entraîner certains problèmes de détection.

6.2 Matériels et méthodes

6.2.1 Provenance des produits⁶

La morpholine (99%), l'acétate de sodium (98%), la triéthanolamine (98%), l'histidine (98%), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (99%) et la résine échangeuse de cations (Dowex 50W8-100) (ND) ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Le méthanol (99.8%) provient de Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada), l'éthanol (99.5%) de Commercial Alcools Inc. (Brampton, ON, Canada) et l'acétonitrile (99.8%) de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA). Le 2',4',6'-trihydroxyacétophénone (THAP) (99.5%) a été acheté de Fluka (Oakville, ON, Canada) et le sDHB (ND) de Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA). Le citrate d'ammonium (98%) provient d'Anachemia (Montréal, QC, Canada).

L'eau distillée a été purifiée par un système Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) et a été utilisée dans la préparation de tous les tampons et échantillons. Les capillaires de silice fondue ont été achetés de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2

⁶ La pureté minimum de chaque produit chimique est indiquée entre parenthèse. Tous les produits chimiques ont été utilisés sans purification additionnelle. ND : information non-disponible.

μm , utilisés pour filtrer toutes les solutions, ont été obtenus de Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

Les oligosaccharides standard de chitine (100% acétylés, pureté minimum de 95%) et les oligosaccharides standard de chitosane (100% désacétylé, pureté minimum de 98%), allant du dimère à l'hexamère, ont été obtenus de Seikegaku America (distribué par MJS BioLynx, Brockville, ON, Canada).

6.2.2 Préparation des tampons

Le tampon de borate 80mM a été préparé avec du $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ($I = 0.24\text{M}$) et le pH a été ajusté à 8.4 avec du HCl 2M. Les tampons de morpholine sont préparés avec de la morpholine 99% pure ($I = 0.028\text{M}$ pour tampon final) et le pH est ajusté avec du HCl 5M. Les tampons de triétanolamine sont préparés à partir de triétanolamine 98% ($I = 0.015\text{M}$ pour tampon final) et le pH est ajusté avec HCl 2M et 5M. Le tampon d'histidine 80mM est préparé avec du L-histidine 98% ($I = 0.032\text{M}$) et le pH est ajusté à 8.5 avec du NaOH 4M.

6.2.3 Préparation des échantillons

Pour l'étude des tampons et les collectes de fractions, les oligomères de chitine et de chitosane ont été dérivés avec l'APTS selon la procédure du chapitre 3. La réaction de dérivation a été arrêtée avec de l'eau distillée et les échantillons ont été conservés à -20°C avant d'être injecté et séparé par la méthode d'électrophorèse capillaire.

Les analyses par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ont demandé une préparation d'échantillon différente. Généralement, $1 \mu\text{L}$ d'un mélange 1:1 échantillon:matrice a été déposé sur une plaque d'acier poli (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) pour les premières expériences puis sur une plaque AnchorChip™ 400/384 TF (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany). Le dépôt a été séché sous vide. La matrice THAP a eu tendance à cristalliser sous forme d'aiguilles ou de duvet blanc. Après séchage, les plaques sont réhydratées

par contact avec l'air ambiant. Les échantillons changent d'apparence et forment de petits cristaux permettant l'obtention de meilleurs résultats.

6.2.4 Préparation de la résine et des matrices

La résine échangeuse de cations sous la forme NH_4^+ a été préparée suivant la méthode de Nordhoff [74, 75] en mélangeant la résine échangeuse d'ions sous la forme H^+ (50-100 mesh, 8% de réticulation, fortement acide) dans une solution d'acétate d'ammonium 1M pendant 12h. Le produit est ensuite filtré et rincé avec de l'acétate de sodium 1M, de l'eau déionisée, de l'acétone et finalement de l'hexane. La résine est séchée et conservée sèche jusqu'à son utilisation.

La matrice DHB (10 mg/ml) a été préparée en dissolvant 1 mg d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dans 100 μL d'une solution EtOH/Eau 1 :1 (v/v) ou eau/acétonitrile (7:1 v/v). La matrice sDHB a été préparée en dissolvant 5 mg du mélange acide 2,5-dihydroxybenzoïque / acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque en proportion 9:1 dans la solution eau/acétonitrile 3:7 (v/v) pour obtenir une concentration de 10 mg/mL. La matrice 2',4',6'-trihydroxyacétophénone (THAP) a été préparée en solution saturée en dissolvant 10 mg de 2',4',6'-trihydroxyacétophénone dans 150 μL de méthanol ou de solution acétonitrile/ammonium citrate 20mM (1:1 v/v). Tout autre changement à ces préparations sera signalé.

6.2.5 Instrumentation

Les analyses sont faites avec un système P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) sur lequel un capillaire de silice fondue ayant une longueur totale de 60 cm (50 cm jusqu'au détecteur) et un diamètre interne de 50 μm est installé. La détection est effectuée avec un laser d'ions d'argon de 3 mW ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre de longueur d'onde d'émission de 520 nm. Avant chaque injection, le capillaire est rincé par pression avec du NaOH 0.1M, de l'eau distillée et du tampon pour un remplacement minimal de 10 volumes de capillaire. L'injection de l'échantillon est faite par

pression (injection hydrodynamique) à 0.5 psi pour une durée de 10 secondes. Une seconde injection, cette fois-ci de tampon pour mettre l'échantillon en sandwich, a une durée de 5 secondes. Le voltage de séparation est de 25 kV et la température du capillaire est ajustée à 25° tandis que les échantillons et le réservoir de collecte sont réfrigérés à 4°C.

Le spectromètre MALDI-TOF utilisé est un Autoflex (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) géré par le programme Flex Control 1.1 pour l'acquisition des spectres et par le programme Flex Analysis™ 2.0 pour le traitement des données. Les dépôts sont irradiés par de la lumière UV à une longueur d'onde de 337 nm issue d'un laser à azote. Les oligosaccharides sont analysés à 20 kV avec le réflectron en mode négatif ou positif avec les différentes matrices. Une calibration externe utilisant les dimère $[(M + Na)^+ = 447,3 \text{ m/z}]$, tétramère $[(M + Na)^+ = 853,7 \text{ m/z}]$, et hexamère $[(M + Na)^+ = 1260,1 \text{ m/z}]$, standards non dérivés a été utilisée pour l'assignement des masses aux ions. Des spectres de 100 coups de laser sont sommés pour obtenir le spectre final. Tous les spectres présentés ont préalablement été lissés.

6.3 Résultats et discussion

La spectrométrie de masse en mode MALDI a été utilisée par Suzuki *et al.* [39] pour l'analyse de saccharides dérivés avec l'APTS. À partir de leurs résultats, une première analyse des APTS-oligomères de chitine et de chitosane a été effectuée. Plusieurs modifications ont dues être apportées à cause de la mauvaise qualité des spectres obtenus. Divers tampons ont été testés ainsi que la méthode de collecte de fractions.

6.3.1 Premières analyses MALDI

Les échantillons utilisés ont été dérivés par amination réductrice avec l'APTS en présence de borohydrure de sodium (NaBH_3CN) afin d'être analysés et détectés par électrophorèse capillaire. Le tampon de 80mM borate pH 8.4 est utilisé pour arrêter la réaction de dérivation (dans certains cas seulement) ainsi

que comme tampon de séparation. Les oligomères de chitine et de chitosane ont été utilisés sans modifications pour les premières analyses par spectrométrie de masse

Il est à noter que, dans le cas des échantillons dérivés, le rendement précis de la réaction de dérivation est inconnu. Les concentrations des produits de dérivation restent donc des approximations, calculées pour un rendement de réaction de 100%.

Les sucres sans dérivation peuvent être facilement étudiés en mode positif par MALDI-TOF avec la matrice THAP. Cependant, l'utilisation de cette matrice pour l'analyse des oligosaccharides-APTS ne donne aucun pic aux masses attendues même pour des rapports matrice/échantillon de 4/1 ou 5/1 (v/v). Le fluorophore pourrait être en partie responsable puisqu'en effet, il est présent dans l'échantillon sous la forme trisodée et cet apport d'ions supplémentaires pourrait contribuer à l'extinction du signal. D'autre part, l'analyse devrait se faire en mode négatif puisque le fluorophore est porteur de trois charges négatives. Quelques hypothèses ont été envisagées pour tenter d'expliquer la perte des pics.

Par exemple, un rapport matrice/échantillon déséquilibré avec une matrice trop peu concentrée conduit à une grande sensibilité aux sels présents dans l'échantillon. Un rapport déséquilibré par une concentration en échantillon élevée et une concentration en matrice trop faible produit une dégradation des échantillons. Il a donc été essayé de déterminer si le rapport des concentrations de la matrice et de l'échantillon utilisé pouvait expliquer l'absence des pics attendus. Pour cela, une concentration en échantillon constante de $1\mu\text{M}$ a été utilisée et la concentration de la matrice a été changée de façon à obtenir un rapport matrice/échantillon compris entre 1000 et 500 000 (mol/mol). Aucune de ces analyses ne contient le pic attribuable à l'oligosaccharide-APTS. D'autre part, de plus faibles rapports matrice/échantillon (1/1, 5/1 et 10/1) ont été testés et un signal a été obtenu pour les deux ratios les plus faibles seulement.

Une bonne matrice doit avoir deux fonctions: la désorption et l'ionisation d'un analyte après irradiation par laser. Le THAP est une matrice dite chaude qui produit de nombreuses fragmentations alors que le DHB est une matrice froide qui limite la fragmentation mais qui contient de nombreux pics dans la région des petites masses. C'est une matrice conseillée pour l'analyse des sucres.

La matrice THAP est souvent utilisée avec une solution de sels d'ammonium (citrate ou tartrate) qui permet d'éliminer les ions sodium du mélange. En effet, les ions alcalins se complexent avec la plupart des oligosaccharides et induisent souvent des clivages non spécifiques, surtout en mode positif. Les sels d'ammonium favorisent la protonation/déprotonation et suppriment la formation d'adduits d'ions alcalins [56]. Quatre composés ont été utilisés au cours de cette étude : THAP dans ACN/citrate d'ammonium 20mM 1/1 (v/v), DHB dans eau/EtOH 1/1 (v/v), DHB préparée en présence de citrate d'ammonium 20mM et une matrice contenant deux fois plus de citrate que de THAP. Malheureusement, aucune de ces matrices ne permet l'obtention de pics correspondants aux APTS-oligomères et ce ni en mode positif, ni en mode négatif.

Des matrices seules et des mélanges de matrices (1:1 v/v) ont été testés pour essayer de voir le dérivé d'APTS. Les matrices DHB, sDHB, THAP, THAP avec citrate et 3-HPA ont été mélangées entre elles après dissolution dans le mélange eau : ACN 3:7 (v/v). En mode réflectron négatif, les spectres MALDI montrent les pics correspondant au saccharide seul avec toutes les matrices alors que le dérivé d'APTS est visible seulement dans sDHB-THAP avec citrate. En mode réflectron positif, les spectres MALDI montrent les pics correspondant au saccharide seul avec toutes les matrices alors que le sucre-dérivé est présent dans toutes les matrices qui contiennent du DHB ou du sDHB mais non dans celles contenant du 3-HPA. Parmi les mélanges de matrices 1 :1 (v/v) seul le mélange de sDHB-THAP avec citrate permet de voir le dérivé d'APTS en mode réflectron négatif et positif avec les signaux les plus intenses. L'influence de la composition

de la matrice a été évaluée en mode réflecton négatif en faisant varier le rapport sDHB/THAP avec citrate. Plus la proportion de sDHB est grande, meilleur est le signal. Les signaux sont généralement plus intenses en mode réflectron positif et les matrices seules donnent des spectres moins bruyants que les co-matrices. C'est donc le sDHB qui a été choisi comme matrice donnant les résultats optimaux.

6.3.2 Procédures de nettoyage de l'échantillon

Les résultats précédents montrent que même l'utilisation de sels d'ammonium n'améliore pas la suppression du signal. Or les échantillons utilisés sont un mélange obtenu après dérivation avec le fluorophore. Ce mélange peut contenir, en plus de l'oligosaccharide-APTS, de l'oligosaccharide n'ayant pas réagi, un excès de fluorophore et de réducteur (NaBH_3CN). Il apparaît donc nécessaire de minimiser la présence de sels et de contaminants (interférents) dans l'échantillon. Trois différentes approches ont été prises : un ajout de résine pour un nettoyage directement dans l'échantillon en solution, l'utilisation d'une membrane pour dialyse et un nettoyage sur le dépôt de matrice et d'échantillon une fois sur la plaque MALDI.

Les billes de résine échangeuses de cations (Dowex 50 WX8-100) sous forme NH_4^+ ont été utilisées [56, 74-76] afin d'éliminer l'excès d'ions alcalins (Na^+ et K^+) et en particulier afin d'échanger les groupements SO_3^-Na^+ de l'APTS en groupements SO_3H . Cette procédure devrait assurer une ionisation du type $[\text{M}-\text{H}]^-$ et ainsi minimiser la perte de sensibilité causée par les adduits de Na^+ . Malheureusement, cette simple étape est insuffisante puisque aucun pic n'est observé. Des essais de nettoyage directement sur la plaque MALDI ont été menés sur les échantillons APTS-oligomères en utilisant quatre différentes méthodes de préparation. Ces méthodes de nettoyage mettent en jeu des quantités croissantes de résine. Voici une courte description des méthodes : 1) dépôt du mélange échantillon et matrice sur la plaque, addition de la résine suivi du séchage ; 2) ajout de billes de résines dans l'échantillon et vortex pendant 10 min, mélange avec la matrice suivi du dépôt sur la plaque ; 3) ajout de billes de résines dans

l'échantillon et vortex pendant 10 min, même traitement avec la matrice, mélange de l'échantillon et la matrice suivi du dépôt sur la plaque; 4) traitement de la matrice et de l'échantillon séparément, dépôt de la matrice sur la plaque et séchage, dépôt de l'échantillon et séchage. Les billes de résine sont enlevées avant l'analyse soit avec un peu de gaz comprimé ou soit avec un embout de pipette. Quelles que soient les quantités de résine utilisées, les analyses MALDI, effectuées en mode négatif, ne donnent aucun pic aux m/z attendus. L'augmentation du temps de contact entre la résine et l'échantillon, mais surtout le traitement de la résine, entraînent une amélioration. Moins de pics provenant de la matrice sont observés lorsque le DHB est traité avec la résine comparativement à cette même matrice non traitée. Le traitement numéro 2 a donc été choisi pour la préparation de tous les échantillons et toutes les matrices. Il est cependant à noter que, malgré les étapes de nettoyage, les adduits de sodium persistent.

Dans le but de se débarrasser des espèces interférentes en MALDI dont le NaBH_3CN et l'APTS en excès, des dialyses avec des membranes [77] dont le seuil de coupure est de 500 Da ont été employées. Les échantillons utilisés sont l'APTS-hexamère de chitine ainsi que des standards de chitines non dérivés, tous préparés dans le tampon borate 80mM pH 8.4. Les échantillons sont préalablement traités avec la résine échangeuse de cations puis soumis à la dialyse pour 30, 60 ou plus de 90 min. Les analyses MALDI ont été réalisées en mode réflectron négatif mais la dialyse ne permet pas de voir les pics aux masses attendues et ce, pour tous les échantillons testés. La technique de dialyse est donc abandonnée comme méthode de nettoyage des échantillons dérivés.

Des standards non dérivés, dilués dans l'eau et traités avec la résine sont préparés en parallèle et donnent de grands pics aux masses attendues. L'influence du tampon borate a donc été étudiée en préparant des standards dans l'eau puis en les diluant avec le tampon 80mM borate pH 8.4. Les résultats de l'analyse MALDI avec la matrice DHB (eau: éthanol 1:1 v/v traitée avec la résine) en mode linéaire et positif sont donnés à la Figure 6.2. Il est à noter que des adduits de

sodium ($[M+Na]^+$) sont obtenus pour tous les standards dans l'eau. Aucun pic n'est obtenu dans ces conditions même après traitement de l'échantillon avec la résine. Le tampon borate semble donc incompatible avec les analyses MALDI. Le borate pourrait être nuisible à la production d'ions lors de l'étape d'ionisation par laser.

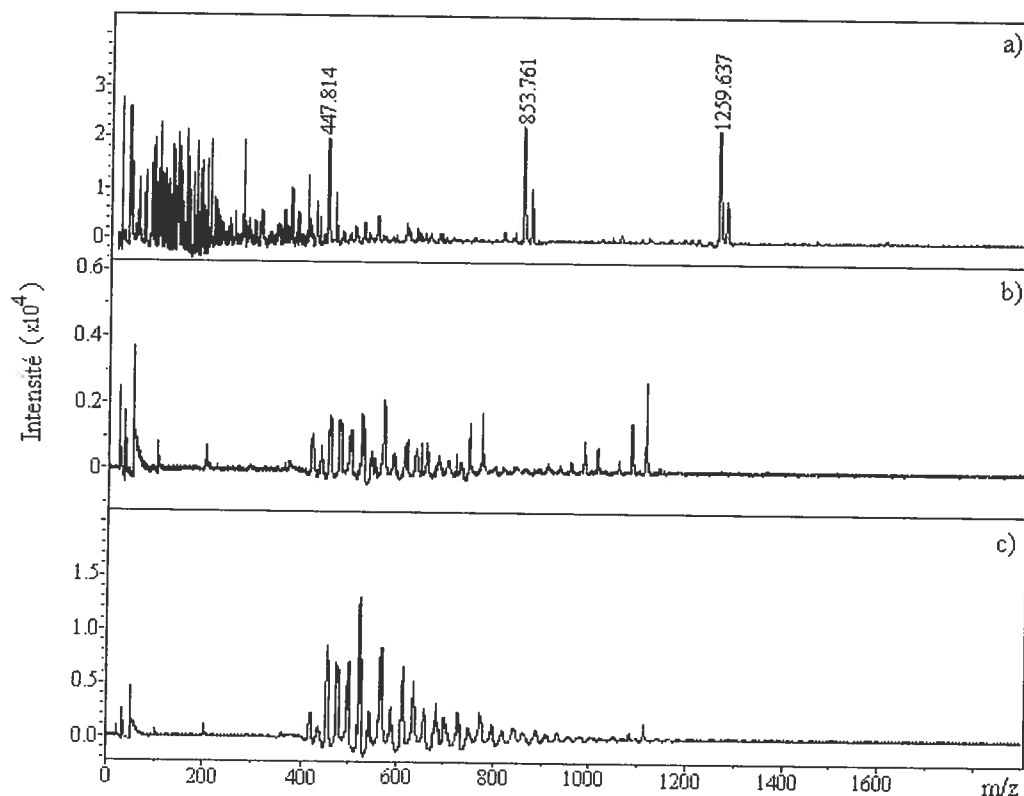


Figure 6-2 Influence du tampon borate sur l'analyse MALDI en mode linéaire et positif, des standards de chitine (dimère $[M+Na]^+$ m/z 448, tétramère $[M+Na]^+$ m/z 853, hexamère $[M+Na]^+$ m/z 1260) dilués dans a) de l'eau distillée, b) du tampon 80mM borate pH 8.5 et c) du tampon 50mM borate pH 8.5. La matrice DHB a été préparée dans eau: éthanol 1:1 v/v et traitée avec la résine.

Afin de se débarrasser du borate, une technique impliquant une solution acidifiée de méthanol [78] est utilisée pour éliminer le reste de réducteur ($NaBH_3CN$) des échantillons dérivés. Deux façons de faire ce nettoyage sont généralement employées dans la littérature : 1) dépôt du mélange matrice-

échantillon sur la plaque, séchage et lavage(s) avec de l'eau ou avec une solution d'acide acétique 1% ou 10% dans le méthanol ; 2) dépôt de matrice sur la plaque, séchage puis addition du mélange matrice-échantillon suivi d'un autre séchage et de lavage(s) avec de l'eau ou avec une solution d'acide acétique 1% ou 10% dans le méthanol [79]. Plusieurs cycles de lavages ont été effectués pour chaque méthode. Encore une fois, les spectres MALDI ne donnent pas de pics correspondant ni aux sucres ni aux sucres dérivés. Cette procédure n'est donc pas efficace pour l'élimination complète du borate.

Malgré tous les efforts faits, il n'a jamais été possible d'observer une masse correspondant à un sucre dérivés. Dans la littérature, l'analyse des saccharides dérivés est habituellement faite avec des concentrations de l'ordre de $10\mu\text{M}$ [47, 76, 80]. Dans le cas des l'échantillons utilisés, les concentrations calculées impliquent que la réaction de dérivation soit de 100% ce qui est, de façon réaliste, très peu probable. La concentration des échantillons est donc probablement plus basse que celle calculée. Ceci pourrait expliquer l'absence de pic des sucres dérivés.

6.3.3 Étude de la morpholine

L'incompatibilité du tampon de borate avec la spectrométrie de masse cause un important problème. L'hypothèse suggérée est que le borate affecte l'étape d'ionisation. Sans une bonne production d'ions, il est tout simplement impossible de faire de la MS. La recherche d'un tampon alternatif au borate est donc nécessaire. La morpholine semble être un tampon compatible avec le MALDI (Figure 6.3) puisque sa présence n'affecte pas l'intensité des pics de façon significative. Il est à noter qu'un couple de pic est observé dans le cas du tétramère et de l'hexamère de chitine. Le premier pic est le plus intense et correspond à l'adduit de sodium tandis que le deuxième pic correspond à l'adduit de potassium.

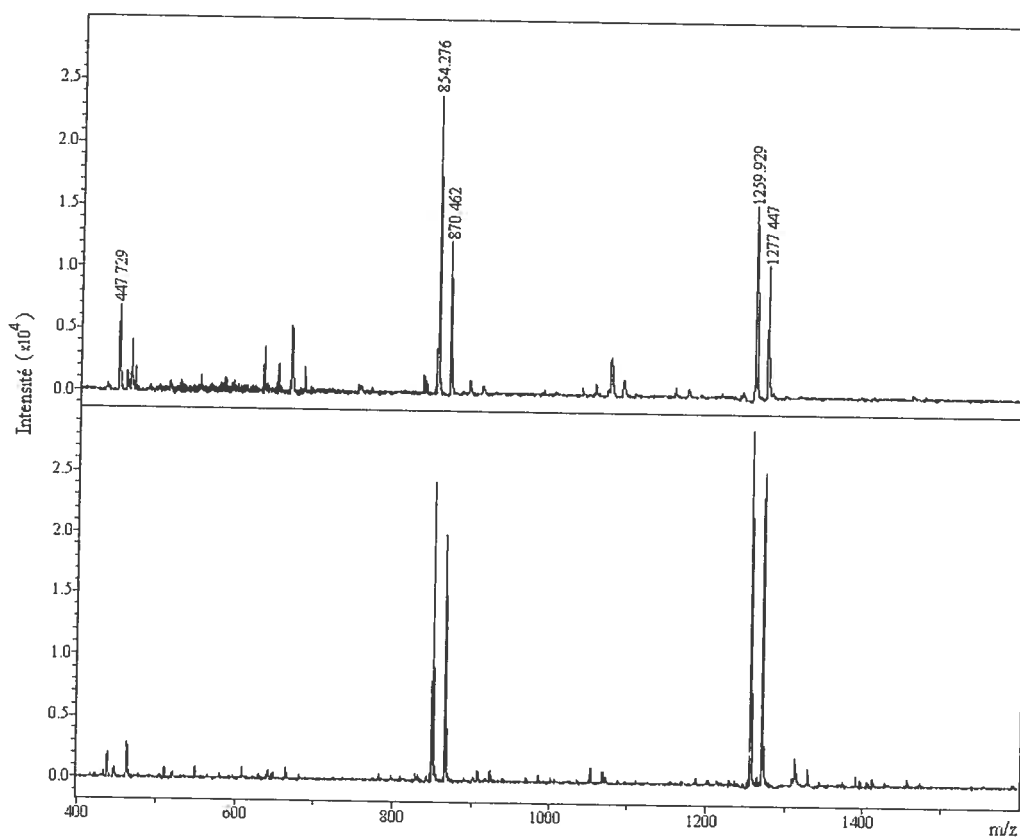


Figure 6-3 Influence de la nature du tampon MALDI en mode en mode réflectron et positif, des standards de chitine (dimère $[M+Na]^+$ m/z 448, tétramère $[M+Na]^+$ m/z 853, hexamère $[M+Na]^+$ m/z 1260) dilués dans a) de l'eau distillée, b) de la morpholine. La matrice sDHB a été préparée dans eau: acétonitrile 3:7 v/v et traitée avec la résine.

Ce tampon a également été utilisé par quelques groupes comme un additif en électrophorèse capillaire. Cependant, son utilisation comme tampon de séparation n'a pas été démontrée clairement dans la littérature. Afin d'évaluer son efficacité à séparer les saccharides, un mélange d'APTS-chitines (3.13 μ M) et de d'APTS-chitosanes (25 μ M) a été injecté. Des concentrations de morpholine variant de 80mM à 120mM ont été testées avec un pH de 8.5, se basant sur la concentration et le pH du tampon de borate optimal. Les temps de migration augmentent avec la concentration du tampon et la co-migration de certaines espèces est observée aux concentrations plus élevées que 80mM. Une série de pH

allant de 7.5 à 9.5 a ensuite été étudiée et l'effet de l'augmentation du flux électroosmotique est observé par des séparations trop rapides à haut pH. La meilleure séparation est obtenue avec un tampon de pH 8.0.

Une série de pics assez intenses (environ 15 RFU) est obtenue avec une séparation dans le tampon optimal de 80mM morpholine pH 8.0. Afin d'identifier les pics de façon appropriée, la technique d'ajouts dosés a été utilisée. Les pics correspondants aux APTS-oligomères de chitine ont été facilement identifiés et curieusement, correspondent à tous les pics de l'électrophérogramme malgré le fait que cinq des dix analytes sont du type chitosane. Deux hypothèses ont alors été énoncées : 1) les chitosanes portent une charge différente dû à leur groupe amine libre ou 2) les limites de détection sont différentes dans le tampon de morpholine.

Afin de tester la première hypothèse, la durée de la séparation a été augmentée jusqu'à 90 minutes mais aucune autre série de pics n'a été observée. Cette observation est confirmée par l'utilisation d'un tampon à pH 9.5 dans lequel la séparation est beaucoup plus rapide à un point tel que le pic d'excès du fluorophore APTS est observé après seulement 12 minutes d'électrophorèse à 25 kV (ce pic n'est jamais détecté dans les autres tampons). Donc même avec une séparation très rapide, il est impossible de voir une série de pics pouvant correspondre aux APTS-chitosanes rejetant ainsi la première hypothèse.

La concentration des oligomères de chitosane a donc été augmentée afin de vérifier la deuxième hypothèse. Comme le démontre bien la Figure 6.4, même à une concentration de 100 μ M, les pics de chitosanes ont une très faible intensité. Ce signal est si faible que, pour réussir à détecter tous les oligomères de chitine et de chitosane, il est nécessaire de diminuer la concentration des APTS-chitines de 3.13 μ M à 0.39 μ M. Il est donc possible de détecter une concentration de chitine 250x plus faible que celle de chitosane dans la morpholine. Ce ratio était de seulement 8x dans le tampon de borate. La morpholine est donc beaucoup moins

efficace que le borate comme tampon de séparation et nuit à la détection des APTS-chitosanes pour une raison non-expliquée.

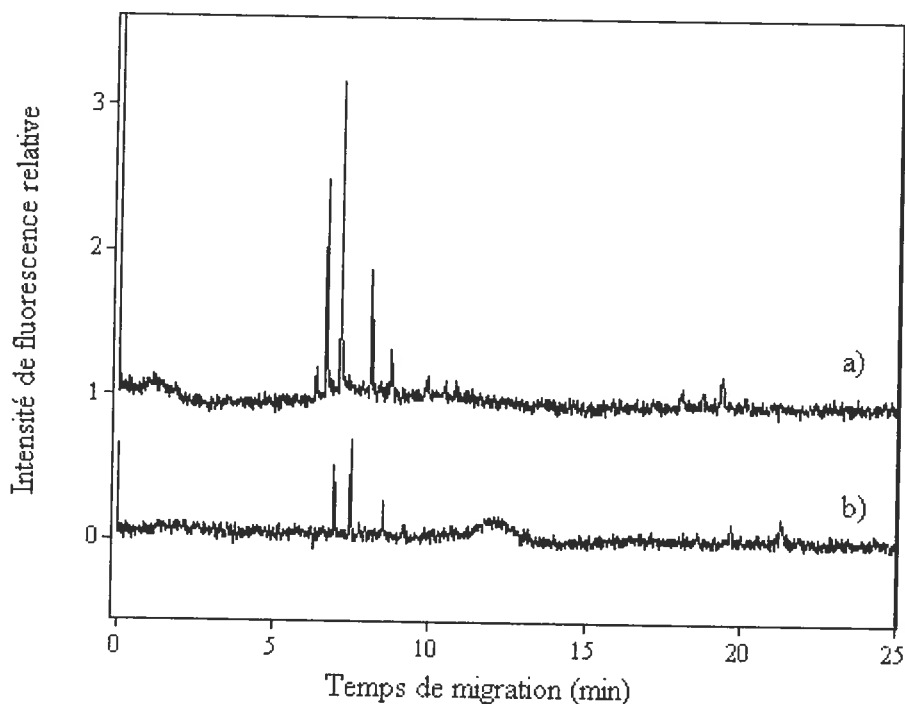


Figure 6-4 Séparation d'un mélange d'APTS-chitosanes à a) 100 μ M et b) 25 μ M. La séparation est effectuée dans un tampon de morpholine 80mM à pH 8.0 et avec un voltage de 25 kV. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.

Malgré tout, il a été décidé de tester la reproductibilité du tampon de morpholine. Pour ce faire, un mélange des APTS-chitines à une concentration de 1.56 μ M a été utilisé. Trois séries de 10 injections ont été faites et chaque série implique l'utilisation d'une paire de bouteilles de 1.5 mL contenant du tampon. Les temps de migration de chaque oligomères ont été utilisé afin d'évaluer la reproductibilité de la séparation. Deux différentes expériences ont été faites, la différence entre elles étant la durée du conditionnement initial. En effet, en début de chaque journée d'utilisation de l'appareil, une étape de conditionnement initial

est effectuée. Cette étape comprend tous les rinçages habituels (NaOH 0.1M, eau distillée et tampon de séparation) ainsi qu'une séparation dans le tampon afin de préparer le capillaire à l'injection des échantillons (atteinte de courant et signal stables). Cette étape a habituellement une durée de 20 minutes mais un conditionnement 12 fois plus long a aussi été testé. Les résultats de l'étude de reproductibilité sont présentés dans le Tableau 6.1.

Bien que les pourcentages d'écart-type relatifs (%RSD) soient diminués de moitié par le long conditionnement initial, cette diminution n'est pas assez significative pour expliquer l'addition de plus de trois heures d'électrophorèse. De plus, la reproductibilité est tout de même acceptable après la première série d'injections et ce, peu importe la durée du conditionnement initial. Il semble par contre que la morpholine ne soit pas adéquate en début de séquence et qu'il soit difficile de conditionner parfaitement le capillaire avec ce tampon.

Tableau 6.1 Étude de reproductibilité des temps de migration des oligomères de chitines dans le tampon de morpholine en fonction de la durée du conditionnement initial du capillaire.

Conditionnement	% RSD du temps de migration	
	20 minutes	240 minutes
Injections 1 à 10	4.1 ^a – 9.6 ^b	1.3 ^a – 4.5 ^b
Injections 11 à 20	0.5 – 2.6	0.3 – 1.5
Injections 21 à 30	0.2 – 1.2	0.3 – 1.5

a : pour le premier pic, l'APTS-hexamère

b : pour le dernier pic, l'APTS-dimère

6.3.4 Collecte de fractions

La méthode par électrophorèse capillaire permet la séparation de toutes les espèces d'un mélange mais l'identification précise de ces espèces n'est pas possible. Pour cette raison, un couplage hors ligne avec la spectrométrie de masse est nécessaire. L'option de collecte de fraction par électrophorèse possède deux

avantages : elle permet d'isoler un analyte du reste de l'échantillon (espèces concomitantes et autres analytes) et permet aussi une analyse subséquente par MALDI. Le tampon de morpholine ayant prouvé son utilité par MS et une certaine efficacité à séparer les APTS-oligomères par CE, il a été décidé de tenter la collecte de fraction avec ce tampon. Puisque l'hexamère de chitine a le plus court temps de migration et la meilleure reproductibilité, les essais ont été fait à partir de cet oligomère seulement.

Il existe deux façons de faire la collecte de fraction, par l'application d'une pression ou par voltage. La technique impliquant la pression est plus compliquée puisqu'elle requiert une étude poussée du flux électroosmotique produit en présence de la morpholine et est moins reproductible. Les collectes ont donc été faites par l'application d'un voltage de 10 kV, le maximum permis par l'instrument. Le principe de la collecte de fraction est simple. En connaissant précisément le temps de migration du début du pic, la largeur du pic en minutes, la longueur totale et la longueur jusqu'à la fenêtre de détection du capillaire, l'ordinateur calcule le temps nécessaire pour que le pic atteigne l'extrémité du capillaire et il récolte la fraction à ce moment précis. La Figure 6.5 démontre les étapes de la collecte de fraction.

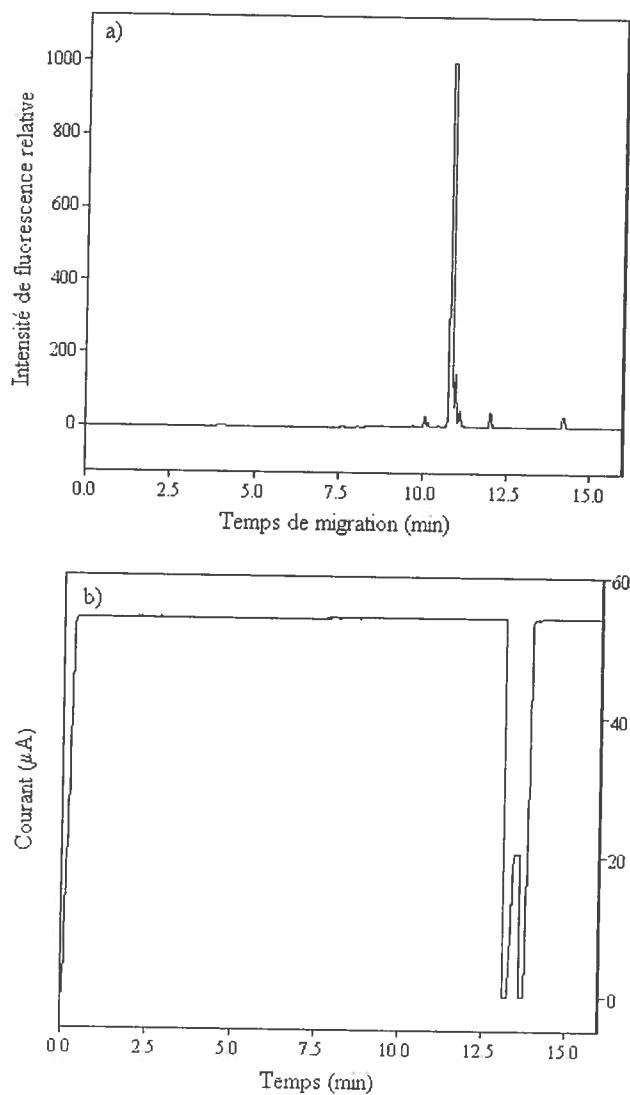


Figure 6-5 Collecte de fraction dans le tampon de 80mM morpholine pH 8.0 : a) détection du pic d'APTS-hexamère de chitine par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm; b) trace du courant.

Dans le panneau a), la détection du pic de l'APTS-hexamère de chitine est montrée. Le temps de migration du pic est de 10.829 minutes. Dans le panneau b), la trace de courant démontre qu'à 13 minutes, le courant tombe à zéro le temps que le réservoir de collecte soit installé à l'extrémité du capillaire. Ce petit réservoir contient 10 μL de solution tampon puisqu'il est impossible d'appliquer

un voltage et d'obtenir un courant sans la présence du tampon. Un voltage de 10 kV est ensuite appliqué et ainsi, le pic bouge et se retrouve dans le réservoir de collecte. Une fois la collecte terminée, le voltage tombe à zéro de nouveau afin que la bouteille contenant le tampon remplace le réservoir de collecte à l'extrémité du capillaire. Le voltage de 25 kV est alors appliqué de nouveau afin de terminer la séparation.

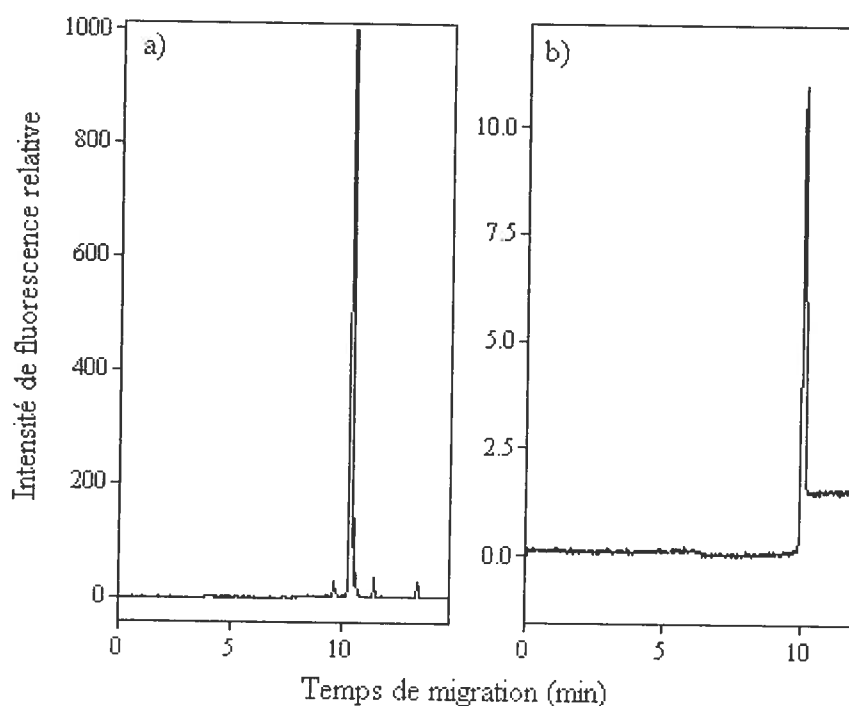


Figure 6-6 Collecte de fraction dans le tampon de 80mM morpholine pH 8.0 : a) échantillon initial d'APTS-hexamère de chitine à 500 μ M ; b) échantillon collecté d'APTS-hexamère de chitine à 0.5 – 0.9 μ M. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.

Il est important de mentionner qu'approximativement 1 nL est collecté par injection. Pour cette raison, un échantillon très concentré a été injecté (échantillon d'APTS-hexamère à 500 μ M) et plusieurs collectes sont effectuées dans le même réservoir. Ce réservoir doit être conservé à une température de 4°C puisqu'il ne contient qu'un très faible volume et qu'à la température de la pièce, ce volume

pourrait s'évaporer très rapidement. Malgré le fait que plusieurs collectes sont effectuées, la concentration finale de la fraction est très faible par rapport à l'échantillon injecté comme démontré par la Figure 6.6.

Après 18 collectes d'un échantillon à 500 μ M (panneau a), la fraction possède une concentration approximative de 0.5 à 0.9 μ M (panneau b). Il existe donc un facteur de dilution de 1000. Dans le cas d'un échantillon initial de chitine très concentré, ce facteur ne cause aucun problème puisque la limite de détection des oligomères de chitine est assez basse. Cependant, le chitosane qui a une limite de détection beaucoup plus élevée ne pourrait probablement pas être observé. De plus, il est peu probable que les échantillons produits enzymatiquement soient aussi concentrés que l'échantillon utilisé dans cette étude. Il reste donc plusieurs problèmes à résoudre avant de pouvoir affirmer que cette méthode de collecte est optimisée.

6.3.5 Analyse MALDI des échantillons récoltés

L'échantillon récolté par la collecte de fraction a ensuite été analysé par MALDI afin de voir si les échantillons dérivés sont détectés et si la procédure de collecte permet d'isoler l'analyte des autres espèces présentes dans l'échantillon.

Selon la Figure 6.7, c'est le sucre seul et non celui dérivé avec l'APTS qui est le pic majeur et ce, même après l'isolation de l'APTS-hexamère. Les autres pics obtenus ne correspondent pas à l'hexamère dérivé, même si de différentes combinaisons d'adduits de sodium ou de potassium ont été considérées. Il est tout à fait impossible que l'APTS-hexamère et que l'hexamère se retrouvent dans la même fraction après la séparation électrophorétique. Puisque ces deux espèces ont des masses et des charges complètement différentes l'une de l'autre, elles ne peuvent tout simplement pas migrer conjointement. Afin d'expliquer les résultats obtenus par MS, l'hypothèse soulevée est celle d'une hydrolyse du lien entre l'APTS et le saccharide après la collecte de fraction.

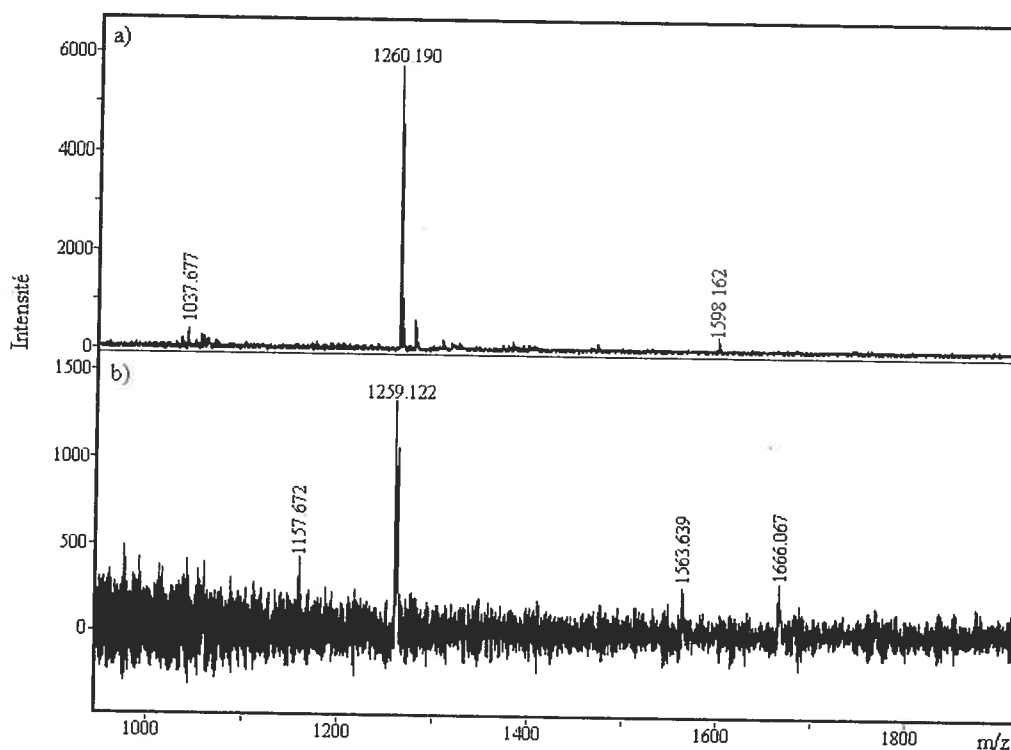


Figure 6-7 Étude de l'APTS-hexamère de chitine a) sans aucune purification post-réaction et b) obtenu par collecte de fraction, en mode réflectron et négatif (hexamère $[M+Na]^+$ m/z 1260). La matrice sDHB a été préparée dans eau: acétonitrile 3:7 v/v et traitée avec la résine.

6.3.6 Identification de la source d'hydrolyse

Cette hydrolyse pourrait être causée par les étapes de préparation de l'échantillon ou par l'analyse MALDI elle-même. Afin de trouver la source de l'hydrolyse, l'APTS-hexamère de chitine a été collecté 20 fois. L'étape de séchage au SpeedVac et de reconstitution dans un plus faible volume, aux fins de pré-concentration de l'échantillon, habituellement effectuée, a cependant été omise dans le cadre de cette expérience. Après les collectes, l'échantillon a été injecté, en utilisant la morpholine comme tampon de séparation, afin de vérifier la présence du pic d'APTS-hexamère isolé. Ensuite, l'échantillon a été traité avec la résine en mélangeant par vortex pendant 10 minutes. Le surnageant a été injecté et

la présence de l'APTS-hexamère a été confirmée. La dernière étape de préparation consiste au mélange de l'échantillon traité et de la matrice, elle aussi préalablement traitée avec la résine. Ce mélange a été injecté dans le capillaire et le pic correspondant à l'APTS-hexamère a encore été détecté. Bien que les aires du pic aient variées au cours de l'expérience, cette variation peut être attribuée au facteur de dilution entre chaque étape. Si l'hydrolyse avait eu lieu, le pic aurait complètement disparu puisque l'hexamère seul ne peut pas être détecté par LIF sans être attaché au fluorophore. Il semble donc que les étapes de préparation de l'échantillon ne sont pas la cause de l'hydrolyse du lien APTS-saccharide. Il serait possible de considérer le laser utilisé par l'appareil de MS comme la source de l'hydrolyse. En effet, afin d'ioniser la matrice, principe essentiel de la technique MALDI, un laser de haute énergie est utilisé. Le lien entre le saccharide et le fluorophore pourrait être trop fragile pour survivre à cette forte absorption d'énergie. Il est impossible de confirmer cette hypothèse à ce point, mais elle semble être la plus logique.

Toutes les analyses de collecte de fraction ont été effectuées à l'aide du tampon de morpholine. Cependant, les résultats obtenus confirment l'inaptitude de la morpholine à produire une séparation reproductible. Pour une série de dix injections, une variation du temps de migration allant jusqu'à une minute est observée. La collecte a été effectuée pendant une période de seulement 12 secondes et le temps précis de collecte est une donnée fixe. Donc, si le temps de migration varie d'une injection à l'autre, il devient très difficile de récolter seulement l'analyte choisi et non les impuretés autour de ce dernier. La possibilité de récolter seulement du tampon et de diluer l'échantillon collecté est aussi à considérer. La morpholine est habituellement utilisée comme un additif en électrophorèse capillaire afin de masquer l'effet résiduel des charges négatives sur la paroi interne du capillaire de silice [68]. Si la morpholine interagit de façon active avec la paroi du capillaire, il est possible de penser que cette fonction fait en sorte que la morpholine ne soit pas un tampon de séparation adéquat. Puisque

la reproductibilité est un facteur primordial lors de la collecte de fraction, il est tout à fait inutile de poursuivre le travail avec la morpholine.

6.3.7 Étude des tampons de triéthanolamine et d'histidine

Le choix d'un nouveau tampon repose sur deux critères : sa compatibilité avec la MS (caractéristiques de volatilité) et, préférablement, l'absence de sels tel ceux du sodium (Na^+) ou du potassium (K^+). C'est encore une fois le mélange des APTS-oligomères de chitine et de chitosane qui est utilisé pour le développement des méthodes de séparation dans les nouveaux tampons.

La triéthanolamine est reconnue pour sa compatibilité avec la spectrométrie de masse [71] mais son utilité comme tampon en électrophorèse capillaire n'a pas été démontrée. Tout comme pour la morpholine, le choix de la concentration et du pH a été basé premièrement sur les conditions dans le borate. Ensuite, des concentrations de 80mM à 120mM ont été testées et dû à une vitesse de séparation beaucoup trop rapide avec la triéthanolamine, il a été décidé de choisir le tampon ayant la plus forte concentration afin de ralentir le flux électroosmotique au maximum. Le même raisonnement a été appliqué au choix du pH. Une très grande variation des temps de migration est observée même avec un petit changement de pH, un temps total d'analyse de 10 minutes est obtenu avec un pH de 8.5 alors que ce temps augmente à 35 minutes à pH 7.5. C'est le pH intermédiaire de 8.0 qui permet de faire un compromis entre la résolution et le temps total d'analyse. La séparation des dix oligomères dérivés par l'APTS est donc possible avec un tampon de 80mM triéthanolamine pH 8.0. L'ordre d'élution obtenu ne se compare pas ni aux attentes théoriques ni à l'ordre obtenu avec le tampon de borate. L'étude n'a cependant pas été poussée puisqu'il s'agissait principalement d'évaluer la capacité du tampon compatible avec la MS à effectuer la séparation.

Dans le cas de l'histidine, son utilisation comme tampon pour l'électrophorèse capillaire et sa compatibilité avec la MS n'ont pas été décrit dans la littérature. L'histidine peut, par contre, être utilisée comme tampon dans

certaines analyses biochimiques [72] et puisque l'analyse des acides aminés est possible par MS, une bonne compatibilité est présumée. Comparativement à la morpholine et à la triéthanolamine, une très bonne séparation a été obtenue sans avoir à varier la concentration et le pH. En effet, avec un tampon de 80mM pH 8.5, les dix oligomères d'APTS-chitine et -chitosane sont séparés en moins de 15 minutes. Tout comme pour la triéthanolamine, l'étude n'a pas été poussée plus loin.

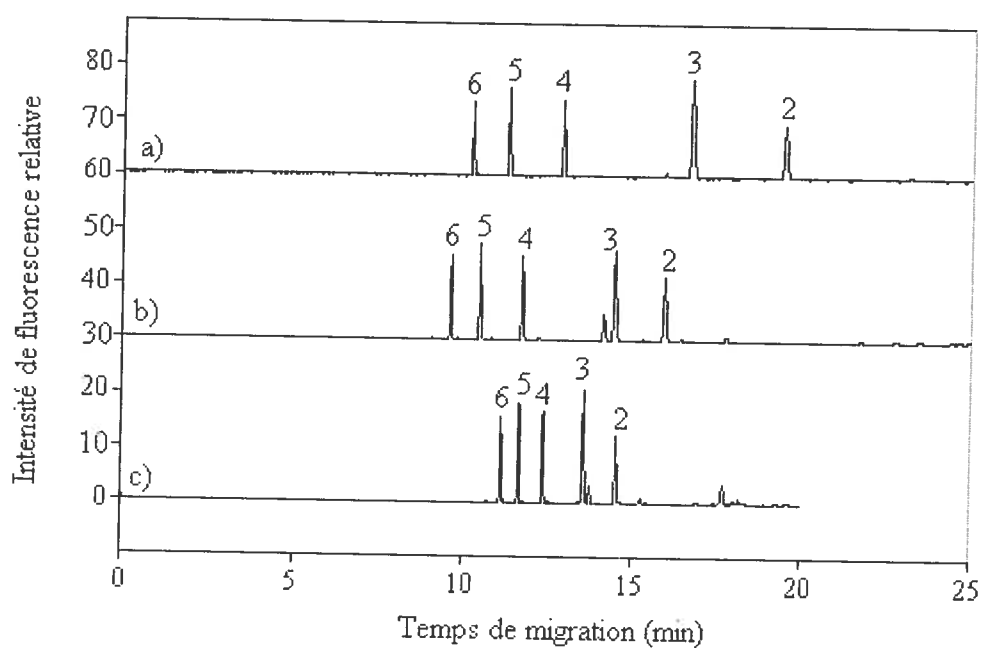


Figure 6-8 Séparation d'un mélange d'APTS-chitines à $1.56\mu\text{M}$ dans a) 80mM morpholine pH 8.0 ; b) 120mM triéthanolamine pH 8.0 et c) 80mM histidine pH 8.5. L'identification des pics est comme suit : 6, hexamère d'APTS-chitine, etc. Le voltage de séparation est ajustée à 25 kV pour la morpholine et la triéthanolamine et à 10 kV pour l'histidine. La détection est effectuée par LIF avec un laser ayant un λ_{ex} de 488 nm.

Après avoir vérifié que les deux tampons avaient la capacité de séparer les APTS-oligomères, une étude de reproductibilité a été conduite. Cette fois-ci, un seul temps de conditionnement initial, 20 minutes, a été testé mais tout comme pour la morpholine, trois séries de dix injections ont été effectuées. Le même

mélange, 1.56 μ M d'APTS-chitines, a été injecté (Figure 6.8) et les temps de migration de chaque oligomère ont été notés. Le Tableau 6.2 résume les résultats obtenus et les compare également à ceux de la morpholine.

Tableau 6.2 Étude de reproductibilité des temps de migration des oligomères de chitines dans les trois tampons testés.

Tampon	% RSD du temps de migration		
	Morpholine	Triéthanolamine	Histidine
Injections 1 à 10	4.2 ^a – 9.6 ^b	2.5 ^a – 4.0 ^b	0.1 ^a – 0.2 ^b
Injections 11 à 20	0.5 – 2.6	0.9 – 1.5	0.3 – 0.4
Injections 21 à 30	0.2 – 1.2	0.8 – 1.1	0.5 – 0.6

a : pour le premier pic, l'APTS-hexamère

b : pour le dernier pic, l'APTS-dimère

Les résultats démontrent que l'histidine est un tampon supérieur quant à la reproductibilité obtenue. La triéthanolamine offre une bonne reproductibilité, mais seulement à partir de la deuxième série, tout comme la morpholine, ce qui n'est pas très avantageux. Il est important de mentionner que ni la triéthanolamine ni l'histidine ne nuisent à la détection des APTS-chitosanes comme observé précédemment avec la morpholine.

6.4 Conclusion

L'analyse des échantillons obtenus enzymatiquement discutée au chapitre 5 a dévoilé une importante lacune de la méthode de séparation : l'habilité d'identifier avec précision les pics correspondants aux espèces partiellement désacétylées. Dû à l'absence de standards appropriés, il a été décidé d'essayer de coupler la méthode de séparation par électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse. Bien que la technique de ESI soit la plus logique à utiliser dû au fait que les échantillons doivent être à l'état liquide et à la possibilité d'un couplage en ligne qu'elle offre, l'inaccessibilité à cette technique ainsi que

les fortes concentrations qu'elle requiert ne font pas d'elle un choix judicieux. Un appareil de MALDI étant disponible, c'est avec cette technique que cette étude préliminaire d'un couplage « off-line » CE-MS a été effectuée.

Parmi les paramètres importants pour l'analyse MALDI se retrouve le choix de la matrice, la composition de l'échantillon et sa préparation. Plusieurs matrices (THAP, DHB, sDHB et 3-HPA) seules ou en mélange ont été étudiées et les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec la matrice sDHB (eau/ACN 3/7 v/v) seule avec un rapport matrice/échantillon de 3/1 à 1/1. Les mélanges de matrice donnent des spectres très bruyants donc plus difficile à analyser.

Dans le cadre de ce projet, les échantillons, issus d'une réaction de dérivaison avec l'APTS, se trouvent en présence des réactifs en excès, des produits de la réaction et d'un tampon. La complexité de ce mélange nécessite par conséquent un traitement de l'échantillon avant son analyse par MALDI. Les traitements utilisés pour réduire cette complexité comprennent les résines échangeuses de cations, les dialyses et les nettoyages sur plaque. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec les résines. Néanmoins, un problème important se pose, celui de la présence de borate, qui supprime la formation d'ion en spectrométrie de masse. Puisqu'il est presque impossible de détecter les masses des pics de saccharide dérivés, une diminution de la quantité d'ions produits n'est pas souhaitable. Ceci requiert donc l'utilisation d'un autre tampon pour l'électrophorèse capillaire.

Dû à sa volatilité, la morpholine a été utilisée et sa compatibilité avec le MALDI a été confirmée. Cependant, il était encore impossible de détecter les échantillons dérivés. La solution suggérée est celle de l'isolation de cet analyte précis dans l'échantillon composé d'espèces concomitantes. La morpholine ayant fait ses preuves comme tampon de séparation a été utilisée et ce, malgré son niveau de reproductibilité un peu faible et la variation des limites de détection qu'elle entraîne. Le pic séparé par électrophorèse capillaire est tout simplement recueilli à l'extrémité du capillaire, par l'application d'un voltage de 10 kV, dans

un faible volume de solution tampon. Cette technique de collecte de fractions permet d'éliminer les traces d'oligomère non dérivé et des réactifs en excès. Puisqu'une très faible quantité d'analyte est récolté (environ 1 nL), il a été nécessaire de répéter l'étape de collecte au moins une vingtaine de fois afin d'obtenir un pic relativement intense.

Malgré les injections répétées, un facteur de dilution d'environ 1000 est obtenu entre l'échantillon injecté et celui récolté. Puisque la limite de détection des APTS-chitosanes est beaucoup plus élevée que celle est APTS-chitines, ce facteur de dilution peut rendre impossible la détection de fractions de chitosanes. La collecte de fraction a également été rendue difficile par la mauvaise reproductibilité de la morpholine qui a comme effet de faire varier le temps de migration parfois jusqu'à une minute pour une série de 10 injections. Puisque la collecte se produit sur seulement 0.2 min, il est tout a fait nécessaire que la migration soit la même d'une injection à l'autre. Des études préliminaires de deux autres tampons, la triéthanolamine et l'histidine, ont données des résultats positifs démontrant leur capacité à séparer les APTS-oligomères de chitine et de chitosane. L'analyse de la reproductibilité à démontrer la supériorité de l'histidine quoique ces deux nouveaux tampons offrent de meilleurs niveaux de reproductibilité comparativement à la morpholine. L'utilisation de phosphate pourrait être également une possibilité, mais il faudrait choisir une forme autre que celle du sel de sodium qui favorise la formation d'adduits en spectrométrie de masse.

L'échantillon isolé et récolté par électrophorèse capillaire a été analysé par MS et les résultats obtenus démontrent un pic majeur correspondant à l'oligomère non dérivé. Cette observation suggère une réaction d'hydrolyse entre les deux analyses, celle de CE et celle de MS. Les étapes de préparation de l'échantillon avant son analyse par MS ont été passées sous la loupe en injectant l'échantillon en CE après chacune des deux étapes. Ni le traitement avec la résine ou le mélange avec la matrice (celle-ci préalablement traitée avec la résine aussi) ont

démontré être la source de l'hydrolyse. Il a donc été suggéré que le laser utilisé en MALDI fournisse assez d'énergie pour briser le lien entre l'APTS et le saccharide.

7. Conclusion générale

7.1 Conclusion

La présence en très grande importance de la chitine dans l'industrie de la pêche requiert le développement d'une technique efficace, spécifique et reproductible pour sa conversion en chitosane, un composé utilisé pour de nombreuses applications. L'utilisation d'enzyme pour cette conversion est une nouvelle approche « verte » et il est nécessaire de pouvoir caractériser les enzymes développées par la technique de l'évolution dirigée. Le haut pouvoir de résolution de l'électrophorèse capillaire fait d'elle une technique très intéressante pour l'analyse des oligomères de chitine et de chitosane.

Le but principal de ce projet étant l'analyse des échantillons de chitosane préparés de façon enzymatique avec l'enzyme *AxeA* et ses variantes, une technique de séparation a été développée avec des standards de chitine et de chitosane. Malheureusement, une des caractéristiques des saccharides en général est l'absence de groupes chromophoriques pouvant faciliter la détection. La détection à de basses longueurs d'onde dans l'ultraviolet étant caractérisée par un très faible signal et un bruit important, il devient donc nécessaire d'ajouter un groupe chromophore ou fluorophore aux saccharides afin de faciliter leur détection. Plusieurs chromophores ont été testés dans le cadre de ce projet, mais l'obtention de résultats décevants a entraîné l'abandon des chromophores.

La détection de fluorescence induite par laser possède plusieurs qualités dont une très grande sensibilité mais un coût assez élevé. Les résultats obtenus avec l'acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS) surpassent grandement les faibles intensités obtenues avec la détection UV. Avec comme point de départ la méthode de séparation des oligomères d'APTS-chitines de Wang et Heish [37], la méthode que nous avons développée incorpore les APTS-chitosanes et démontre également qu'il est inutile d'utiliser le tampon de borate pour arrêter la réaction de dérivatisation. La séparation, dans un tampon de 80mM borate à pH 8.4, des dix APTS-oligomères (du dimère à l'hexamère) est possible en moins de 30 minutes.

Quoique le pH de ce tampon de séparation soit assez élevé pour garantir une déprotonation complète du groupe amine libre des chitosanes, une étude poussée du flux électroosmotique a été conduite afin de s'en assurer. Des trois méthodes testées, c'est la détection indirecte d'un fluorophore ajouté au tampon de séparation qui représente la méthode la plus rapide et reproductible pour la détermination du EOF. La valeur moyenne du EOF obtenue est de 5.238 minutes et confirme que tous les APTS-oligomères sont chargés négativement.

Avec une méthode de séparation efficace à notre disposition, il a été possible de se pencher sur l'analyse des produits de la réaction enzymatique de désacétylation. Les résultats obtenus confirment que l'enzyme désacétyle bel et bien les oligomères de chitine mais cette réaction de désacétylation n'est pas spécifique à la longueur de l'oligomère. Dans le cas d'un mélange d'oligomères de chitosane, l'échantillon traité présente une augmentation ou diminution de l'aire de certains pics. L'apparition de nouveaux pics, comme pour les standards de chitine, n'est pas observée pour cet échantillon. Dans le cas de tous les échantillons analysés, les pics obtenus sur les électrophérogrammes ne peuvent pas être identifiés à l'aide des standards. En effet, les standards de chitine possèdent un degré de désacétylation de 0% tandis que les standards de chitosane sont 100% désacétylés. Les produits de la réaction enzymatique possèdent des degrés de désacétylation intermédiaires et il est donc impossible d'identifier les pics à l'aide des temps de migration vu la différence élevée de masse.

Afin de palier à cet important problème d'identification, une étude préliminaire sur un couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse a été conduite. C'est la matrice sDHB (mélange d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et d'acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque) qui est la plus appropriée pour l'analyse des oligomères de chitine et de chitosane. Les premières analyses par MALDI ont cependant révélées qu'il est essentiel de procéder au nettoyage de l'échantillon, avant son analyse, avec une résine échangeuse de cations afin de réduire les adduits de sodium. La présence de borate n'étant pas

souhaitable en MALDI, la morpholine a été proposée comme tampon de remplacement mais a rapidement été éliminée puisqu'elle nuit à la détection des APTS-chitosanes. Les échantillons analysés par MALDI ont préalablement été séparés par CE et récoltés par collecte de fraction, technique qui implique un facteur de dilution d'environ 1000 entre l'échantillon injecté et celui récolté. Malheureusement, il a été impossible d'observer la masse correspondant au dérivé d'APTS, indiquant une réaction d'hydrolyse potentiellement d'origine instrumentale.

Finalement, une étude préliminaire des tampons de triéthanolamine et d'histidine a été conduite afin de trouver un remplaçant à la morpholine. Les deux tampons ont démontré des capacités à séparer de façon efficace les APTS-oligomères de chitine et de chitosane. Une étude de reproductibilité a révélée la supériorité de l'histidine à produire une séparation très reproductible comparativement à la morpholine et à la triéthanolamine.

7.2 Directions futures

Afin d'atteindre au but ultime de ce projet, celui d'identifier les produits de la réaction enzymatique et de caractériser l'efficacité des enzymes développées, beaucoup de travail reste à accomplir. La méthode de séparation, telle qu'elle est à ce point-ci du projet, ne permet pas une identification précise des pics obtenus. Chaque partie de ce projet comporte d'autres avenues à explorer afin de confirmer et de pousser plus loin les résultats obtenus.

Quoique la méthode de détection par LIF avec la dérivation par l'APTS soit très sensible, elle est également très dispendieuse. Le chromophore ABEE a été étudié par UV, mais peut également être détecté par LIF [33]. Il requiert l'utilisation d'un laser de He-Cd avec une longueur d'onde d'excitation de 325 nm. Cet instrument est disponible au laboratoire donc il est tout a fait possible d'envisager de poursuivre le travail avec l'ABEE. De plus, ce chromophore est disponible sous les formes 2-, 3- et 4-ABEE et les études de Kakehi *et al.* [33] ont démontré un meilleur rendement de réaction pour la forme 3-. C'est le 4-ABEE

qui a été utilisé lors de ce projet donc il serait intéressant de se procurer le 3-ABEE pour fin de comparaison. Le chromophore ABEE peut également être utilisé pour deux types de dérivation : l'amination réductrice (produit en forme ouverte) et la glycosylation (produit en forme fermée). Il a été démontré que les produits en forme fermée possèdent de meilleurs comportements chromatographiques [31] donc ce second type de dérivation pourrait être utile pour les chitosanes.

Dans le cas des autres chromophores, il pourrait être intéressant de poursuivre le travail amorcé avec le MPP. Quoique les résultats préliminaires aient été peu concluants, des étapes d'extraction pourraient être rajoutées afin de purifier les dérivés de MPP. Également, un changement du solvant de reconstitution pour de l'eau distillée, ou peut-être un mélange d'eau et de méthanol si la solubilité devient un problème, pourrait aider à obtenir une meilleure reproductibilité de l'injection.

Peut importe le chromophore ou fluorophore choisi, il serait important de procéder à une étude de rendement de la réaction de dérivation. En dérivant les oligomères individuellement versus en mélange, le rendement de réaction pourrait être compris et amélioré. La différence de rendement entre la chitine et le chitosane devrait également être étudiée et une potentielle désactivation de la fluorescence pourrait être vérifiée en utilisant l'absorbance au lieu de la fluorescence.

En ce qui concerne la méthode de séparation elle-même, il serait possible d'utiliser les additifs afin d'augmenter la résolution et de varier les caractéristiques de la séparation. Des substances organiques peuvent augmenter la sélectivité [13] et l'utilisation de cyclodextrines peuvent permettre la séparation des isomères de saccharides [81], ce qui peut s'avérer utile pour la séparation éventuelle d'une série d'oligomères de chitosanes sur lesquels la position d'un groupe acétyle varie.

Les résultats obtenus pour la caractérisation du flux électroosmotique sont de bonne qualité mais requiert d'être confirmés. L'utilisation de différents fluorophore pour la détection indirecte devrait être testée. Pour l'étude du courant, une plage plus étendue de tampons initial et final devraient être utilisée afin d'éviter de devoir extrapoler sur la courbe de calibration. Finalement, les tampons choisis pourraient être étudiés par détection UV en injectant tout simplement du DMSO et les valeurs d'EOF obtenus pourraient être comparés à celles obtenues par la détection LIF.

En ce qui concerne l'enzyme *AxeA*, il serait intéressant d'étudier son mode d'action lorsqu'elle se retrouve en présence d'oligomères de chitine ou de chitosane. Une expérience possible consisterait au prélèvement d'aliqouts du milieu réactionnel à des intervalles de temps choisis. L'analyse des échantillons produits par réaction enzymatique requiert de meilleurs standards. Il serait important d'essayer de construire une banque de standards de chitosanes ayant des degrés intermédiaires de désacétylation. La conversion de chitine en chitosane est possible [55] et la variation des conditions de réaction pourrait permettre la production des standards nécessaires. Les produits de cette réaction de désacétylation maison pourraient être analysés facilement par spectrométrie de masse. Également, afin de pouvoir confirmer la présence de nouveaux pics et de comparer les temps de migration par rapport aux standards, il serait important d'utiliser un standard interne. Comme standard interne, un disaccharide dérivé avec l'APTS pourrait être utilisé afin de corriger les fluctuations du EOF ainsi que les variations associées au volume d'injection, permettant ainsi un certain niveau de quantification. Finalement, il reste beaucoup d'avenues à explorer dans le cadre du couplage CE-MS. Les conditions de spectrométrie de masse sont loin d'être optimales puisqu'il est toujours impossible de détecter les saccharides dérivés. Il serait important de trouver la source de l'hydrolyse du lien entre l'APTS et l'oligomère. De plus, l'utilisation d'un meilleur système de tampon pourrait améliorer la qualité des spectres

obtenus. Il reste donc à vérifier la compatibilité de l'histidine avec la MS. Un tampon de phosphate pourrait être également considéré mais il serait important d'essayer d'utiliser un sel de phosphate autre que celui de sodium ou potassium afin de limiter la proportion d'adduits. Des sels d'ammonium et de calcium sont entre autres disponibles sur le marché.

8. Références

- [1] Peter, M. G., *J.M.S.-Pure Appl. Chem.* 1995, *A32*, 629-640.
- [2] Qaqish, R. B., Amiji, M. M., *Carbohydrate Polymers* 1999, *38*, 99-107.
- [3] Ban, E., Choi, O. K., Ryu, J. C., Yoo, Y. S., *Electrophoresis* 2001, *22*, 2217-2221.
- [4] Sun, P., Landman, A., Hartwick, R. A., *J Microcol Sep* 1994, *6*, 403-407.
- [5] Martineau, W., *Canadian Chemical News* 2004, *56*, 23-25.
- [6] Hsu, S.-C., Don, T.-M., Chiu, W.-Y., *Polymer Degradation and Stability* 2002, *75*, 73-83.
- [7] Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V., *Trends Biotechnol* 2000, *18*, 305-312.
- [8] El Rassi, Z., Nashabeh, W., in: El Rassi, Z. (Ed.), *Carbohydrate Analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands 1995, pp. 267-360.
- [9] Heiger, D., *High performance capillary electrophoresis: An introduction*, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, 2000, pp. 11-69.
- [10] Guttman, A., *J Chromatogr A* 1997, *763*, 271-277.
- [11] Chen, F. T., Evangelista, R. A., *Anal Biochem* 1995, *230*, 273-280.
- [12] Lagane, B., Treilhou, M., Couderc, F., *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2000, *28*, 251-255.
- [13] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 1999, *20*, 3134-3144.
- [14] Denuziere, A., Taverna, M., Ferrier, D., Domard, A., *Electrophoresis* 1997, *18*, 745-750.
- [15] Honda, S., Suzuki, S., Nose, A., Yamamoto, K., Kakehi, K., *Carbohydr Res* 1991, *215*, 193-198.
- [16] Vorndran, A. E., Grill, E., Huber, C., Oefner, P. J., Bonn, G. K., *Chromatographia* 1992, *34*, 109-114.
- [17] Oefner, P. J., Vorndran, A. E., Grill, E., Huber, C., Bonn, G. K., *Chromatographia* 1992, *34*, 308-316.

- [18] Andersen, K. E., Bjerregaard, C., Sorensen, H., *J Agric Food Chem* 2003, *51*, 7234-7239.
- [19] Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H. M., *Anal Chem* 1991, *63*, 1541-1547.
- [20] Klockow, A., Amado, R., Widmer, H. M., Paulus, A., *Electrophoresis* 1996, *17*, 110-119.
- [21] Nguyen, D. T., Lerch, H., Zemmann, A., Bonn, G., *Chromatographia* 1997, *46*, 113-121.
- [22] Chang, L. W., Guo, Q., Yu, Z. L., Chen, Y., Zhu, A., *Chinese Chemical Letters* 1996, *7*, 159-160.
- [23] El Rassi, Z., Smith, J. T., in: El Rassi, Z. (Ed.), *Carbohydrate Analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands 1995, pp. 607-640.
- [24] Beckman-Coulter, *32 Karat - Software user's guide version 4.0*, p. 2-15, Fullerton, CA.
- [25] Evangelista, R. A., Liu, M.-S., Chen, F.-T. A., *Anal Chem* 1995, *67*, 2239-2245.
- [26] Wang, X., Chen, Y., *Carbohydr Res* 2001, *332*, 191-196.
- [27] Lattova, E., Perreault, H., *J Chromatogr A* 2003, *1016*, 71-87.
- [28] Lattova, E., Perreault, H., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, *793*, 167-179.
- [29] Lattova, E., Perreault, H., Krokhin, O., *J Am Soc Mass Spectrom* 2004, *15*, 725-735.
- [30] Kwon, H., Kim, J., *J Liq Chromatogr* 1995, *18*, 1437-1449.
- [31] Li, D. T., Her, G. R., *J Mass Spectrom* 1998, *33*, 644-652.
- [32] Schmid, D. G., Behnke, B., Kempter, C., Metzger, J. W., Kuhn, R., *Mikrochim. Acta*. 2001, *137*, 111-118.

- [33] Kakehi, K., Funakubo, T., Suzuki, S., Oda, Y., Kitada, Y., *J Chromatogr A* 1999, 863, 205-218.
- [34] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal Chem* 1984, 56, 111-113.
- [35] Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., *Principles of Instrumental Analysis*, Harcourt Brace & Company, Orlando, Florida 1998, pp. 778-795.
- [36] Kratschmar, D., Wallner, S., Florenski, M., Schmid, D., Kuhn, R., *Chromatographia* 1999, 50, 596-600.
- [37] Wang, C. Y., Hsieh, Y. Z., *J Chromatogr A* 2002, 979, 431-438.
- [38] Guttman, A., Chen, F. T., Evangelista, R. A., Cooke, N., *Anal Biochem* 1996, 233, 234-242.
- [39] Suzuki, H., Muller, O., Guttman, A., Karger, B. L., *Anal Chem* 1997, 69, 4554-4559.
- [40] Chen, F.-T. A., in: Thibault, P., Honda, S. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2003, pp. 105-119.
- [41] Suzuki, S., Kelly, J. F., Locke, S. J., Thibault, P., Honda, S., in: Thibault, P., Honda, S. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2003, pp. 41-69.
- [42] Chen, T., Embree, H. D., Brown, E. M., Taylor, M. M., Payne, G. F., *Biomaterials* 2003, 24, 2831-2841.
- [43] Johnson, M. W., Osuji, G. O., *Anal Biochem* 1976, 70, 45-53.
- [44] Osuji, G. O., Johnson, M. W., *FEBS Lett* 1977, 83, 85-88.
- [45] Takeda, Y., *Carbohydr Res* 1979, 77, 9-23.
- [46] Honda, S., in: Thibault, P., Honda, S. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2003, pp. 81-92.
- [47] Papac, D. I., Wong, A., Jones, A. J., *Anal Chem* 1996, 68, 3215-3223.
- [48] Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W. A., Brzezinski, R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 38, 188-193.

- [49] Dupont, C., Daigneault, N., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., *Biochem J* 1996, *319* (Pt 3), 881-886.
- [50] Biely, P., Cote, G. L., Kremnický, L., Greene, R. V., Dupont, C., Kluepfel, D., *FEBS Lett* 1996, *396*, 257-260.
- [51] Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C., Bouriotis, V., *Carbohydr Res* 2003, *338*, 687-692.
- [52] Baumann, M., Stümer, R., Bornscheuer, U. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, *40*, 4201-4204.
- [53] Gebauer, P., Borecka, P., Bocek, P., *Anal Chem* 1998, *70*, 3397-3406.
- [54] Desiderio, C., Fanali, S., Gebauer, P., Bocek, P., *J Chromatogr A* 1997, *772*, 81-89.
- [55] Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., *Polymer* 2003, *44*, 7939-7952.
- [56] Zhu, Y. F., Taranenko, N. I., Allman, S. L., Martin, S. A., Haff, L., Chen, C. H., *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996, *10*, 1591-1596.
- [57] Stahl, B., Steup, M., Karas, M., Hillenkamp, F., *Anal Chem* 1991, *63*, 1463-1466.
- [58] Mele, A., Malpezzi, L., *J Am Soc Mass Spectrom* 2000, *11*, 228-236.
- [59] An, H. J., Franz, A. H., Lebrilla, C. B., *J Chromatogr A* 2003, *1004*, 121-129.
- [60] Cabalkova, J., Zidkova, J., Pribyla, L., Chmelik, J., *Electrophoresis* 2004, *25*, 487-493.
- [61] Wang, B. H., Biemann, K., *Anal Chem* 1994, *66*, 1918-1924.
- [62] Arkady, I. G., Wilkinson, W. R., Proctor, A., Hercules, D. M., *Anal Chem* 1995, *67*, 1034-1041.
- [63] Harvey, D. J., *J Chromatogr A* 1996, *720*, 429-446.
- [64] Monsarrat, B., Brando, T., Condouret, P., Nigou, J., Puzo, G., *Glycobiology* 1999, *9*, 335-342.
- [65] Gates, P., www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tof-massspec.html, Bristol 2004.

- [66] Li, J., Purves, R. W., Richards, J. C., Ionalytics Corporation 2004.
- [67] Cifuentes, A., Rodríguez, M. A., García-Montelongo, F. J., *J Chromatogr A* 1996, 742, 257-266.
- [68] Cifuentes, A., de Frutos, M., Santos, J. M., Diez-Masa, J. C., *J Chromatogr A* 1993, 655, 63-72.
- [69] Bondoux, G., Jandik, P., Jones, W. R., *J Chromatogr* 1992, 602, 79-88.
- [70] Garcia, M. C., Hogenboom, A. C., Zappey, H., Irth, H., *J Chromatogr A* 2002, 957, 187-199.
- [71] Perrin, D. D., Dempsey, B., *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall Ltd, London 1979.
- [72] Kappelgaard, A. M., Bojesen, A., Skydsgaard, K., Sjogren, I., Laursen, T., *Horm Res* 2004, 62 Suppl 3, 98-103.
- [73] Minarik, M., Foret, F., Karger, B. L., *Electrophoresis* 2000, 21, 247-254.
- [74] Nordhoff, E., Ingendoh, A., Cramer, R., Overberg, A., Stahl, B., Karas, M., Hillenkamp, F., Crain, P. F., *Rapid Commun Mass Spectrom* 1992, 6, 771-776.
- [75] Wangt, B. H., Biemann, K., *Anal Chem* 1994, 66, 1918-1924.
- [76] Suzuki, H., Muller, O., Guttman, A., Karger, B. L., *Anal Chem* 1997, 69, 4554-4559.
- [77] Kuster, B., Naven, T. J., Harvey, D. J., *J Mass Spectrom* 1996, 10, 1131-1140.
- [78] Ahmed, M. U., Brinkmann-Frye, E., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., *Biochem J* 1997, 324, 565-570.
- [79] Rusconi, F., Schmitter, J. M., *Analisis Magazine* 1998, 26, M13-M17.
- [80] Lemoine, J., Cabanes-Macheteau, M., Bardor, M., Michalski, J.-C., Faye, L., Lerouge, P., *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000, 14, 100-104.
- [81] Berthod, A., Chang, S. S. C., Kullman, J. P. S., Armstrong, D. W., *Talanta* 1998, 47, 1001-1012.

