

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**Développement de méthodes de séparation des chitooligosaccharides  
obtenus par déacétylation enzymatique**

Marie-Christine Tang

Département de Chimie  
Faculté des Arts et des Sciences

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

30 Avril 2008

© Marie-Christine Tang, 2008



Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

*Développement de méthodes de séparation des chitooligosaccharides  
obtenus par déacétylation enzymatique*

Présenté par :

Marie-Christine Tang

A été évalué par un jury composé de :

Dr. Dominic Rochefort	président-rapporteur
Dr. Karen C. Waldron	directrice de recherche
Dr. Jean-François Masson	membre du jury

## RÉSUMÉ

Les chitooligosaccharides (COS) sont des formes entièrement ou partiellement déacétylées des oligosaccharides de chitine (poly $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acétyl-D-glucosamine) retrouvés dans les déchets de la pêche. Nos collaborateurs en biochimie développent une enzyme déacétylase mutante provenant d'une souche *Axe A* afin de remplacer le procédé chimique actuellement utilisé en industrie. La procédure chimique étant polluante, l'alternative enzymatique possède le double avantage d'être une méthode plus verte et de permettre une certaine sélectivité au niveau de la réaction de déacétylation.

Les enzymes déacétylase produisent des espèces possédant des degrés de déacétylation variés dont des isomères positionnels. Notre objectif est de développer une méthode rapide de criblage pour ces produits de réaction enzymatique, permettant ainsi d'orienter les prochaines mutations. La présence d'isomères positionnels des COS des techniques analytiques de haute résolution telles que l'électrophorèse capillaire avec détection par fluorescence induite par laser (CE-LIF) ainsi que la chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse (LC-MS) qui ont été étudiées à cette fin.

D'une part, les analyses par CE-LIF avec un tampon d'histidine ont permis de séparer avec une bonne résolution plusieurs produits de déacétylation de l'hexasaccharide de chitine dérivé avec l'APTS (8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate). L'identification exacte des différents produits observés par spectrométrie de masse a été empêchée par l'impossibilité d'ioniser les molécules dérivées. Par ailleurs, une méthode CE-MS (électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse) a tout de même permis de confirmer la présence de chitooligosaccharides de degrés de déacétylation différents.

D'autre part, les analyses par LC-MS utilisant un gradient HILIC (chromatographie liquide à interaction hydrophile) sur une colonne cyano ont permis

de séparer et identifier jusqu'à 9 différentes formes des chitooligosaccharides non-dérivés produits par déacétylation enzymatique. Bien que les différents degrés de déacétylation puissent être discriminés par MS, l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a permis l'identification d'environ 20 séquences uniques. Par contre, il a été impossible de distinguer l'extrémité réductrice de l'extrémité non-réductrice de l'oligosaccharide non dérivé. Un séquençage hypothétique a tout de même été établi à partir de certains ions diagnostiques. Une dérivation semble donc nécessaire pour éclaircir ce problème dans le futur.

*Mots-clés: Chitooligosaccharides, déacétylation enzymatique, électrophorèse capillaire, fluorescence induite par laser, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, spectrométrie de masse en tandem, séquençage des oligosaccharides, dérivation des oligosaccharides*

*ABSTRACT*

Chitoooligosaccharides (COS) are the fully or partially deacetylated form of chitin oligosaccharides (poly $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine), the latter being a fisheries waste product whereas the former is a biocompatible polymer of interest to the pharmaceutical and cosmetics industry. Our collaborators in biochemistry are evolving variants (mutants) of *Axe A* chitin deacetylase enzymes to replace the usual chemical deacetylation procedure with the goal of making industrially useful COS. The enzymatic procedure has the advantages over the chemical process of being environmentally friendly and can allow selectivity in the deacetylation reaction.

The deacetylase enzymes produce COS of different degree of deacetylation, including positional isomers. Our goal is to develop rapid separations-based screening of the enzyme variants' products to determine their deacetylation products and therefore direct further enzyme evolutions. Due to the presence of positional isomers of the COS, high resolution techniques like capillary electrophoresis (CE) with laser induced fluorescence (LIF) detection and liquid chromatography (LC) coupled to electrospray mass spectrometry (ESI/MS) were investigated.

By CE-LIF using a histidine buffer, we have been able to partially separate the multiple products formed by enzymatic deacetylation of fluorescently labeled chitin hexasaccharide, which is the fully acetylated substrate. Without any standards available, the use of mass spectrometry is required to confirm the identity of the different isomers. Unfortunately, we were unable to ionize the labeled COS. Nevertheless, CE-MS analysis has confirmed the presence of deacetylation products of different degree of deacetylation.

By HILIC LC-MS on a polar cyano column, we have been able to separate up to 9 different forms of COS arising from varying degrees of enzymatic deacetylation of the unlabeled substrate, chitin hexasaccharide. Although mass spectrometry allows us to differentiate all the degree of deacetylation (DDA), tandem mass spectrometry

allowed us to identify up to 20 different sequences from positional isomers of varying DDA. However, it was impossible to readily distinguish the non-reducing end and the reducing end of the native saccharides. Using certain diagnostic ions, tentative sequencing of the COS has been made. In the future, derivation may be necessary to be able to correctly sequence the COS.

**Keywords:** *chitooligosaccharide, enzymatic deacetylation, capillary electrophoresis, laser induced fluorescence, liquid chromatography, mass spectrometry, tandem mass spectrometry, oligosaccharide sequencing, oligosaccharide labelling*

## Table des matières

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xv
<b><u>1 INTRODUCTION</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1 DE LA CHITINE AU CHITOSANE	2
1.2 PRODUITS DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE DE LA CHITINE	3
1.3 QUELQUES DÉFINITIONS	4
1.4 OBJECTIFS DU PROJET	5
<b><u>2 TECHNIQUES ANALYTIQUES ET MÉTHODES DE DÉTECTION DES OLIGOSACCHARIDES</u></b>	<b><u>6</u></b>
2.1 ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE	7
2.1.1 DÉTECTION PAR FLUORESCENCE INDUITE PAR LASER	12
2.1.2 DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	15
2.2 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	19
2.2.1 DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	22
2.2.2 DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM	23
<b><u>3 PARTIE EXPÉRIMENTALE</u></b>	<b><u>26</u></b>
3.1 PRODUITS CHIMIQUES	27
3.2 RÉACTIONS DE DÉRIVATION ET RÉACTION DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE	27
3.2.1 RÉACTION DE DÉRIVATION AVEC LA 8-AMINOPYRÈNE TRISULFONATE	27
3.2.2 RÉACTION DE DÉRIVATION AVEC LA PHÉNYLHYDRAZINE	27
3.2.3 RÉACTION DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE DU SUBSTRAT NATIF ET DÉRIVÉ	28



<b>3.3</b>	<b>INSTRUMENTATION ET MÉTHODES</b>	<b>29</b>
3.3.1	ANALYSES MS DES HEXASACCHARIDES CHITINE ET CHITOSANE	29
3.3.2	ANALYSES CE-LIF DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION D'A <sub>6</sub> DÉRIVÉS ET D'A <sub>6</sub> -APTS	29
3.3.3	ANALYSES CE-MS DES PRODUITS DE DEACEATYLATION D'A <sub>6</sub>	30
3.3.4	ANALYSES LC-MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION D'A <sub>6</sub>	30
3.3.5	ANALYSES MS/MS DES STANDARDS	31
3.3.6	ANALYSES LC-MS/MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub>	32
3.3.7	ANALYSES LC-MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> -PHZ	32
<b>4</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>IDENTIFICATION MS DES HEXASACCHARIDES DE CHITINE ET CHITOSANE</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>CE-LIF DES PRODUITS DÉRIVÉS DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE</b>	<b>37</b>
4.2.1	RÉACTION DE DÉRIVATION	37
4.2.2	CHOIX DU TAMPON DE SÉPARATION EN CE-LIF	40
4.2.3	COMPARAISON DES APPROCHES POUR LA DÉRIVATION AVEC L'APTS	44
4.2.4	ANALYSE MS DES PRODUITS DERIVES AVEC L'APTS	46
<b>4.3</b>	<b>CE-MS DES PRODUITS NATIFS DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE</b>	<b>50</b>
4.3.1	CHOIX DU TAMPON DE SÉPARATION EN CE-MS	50
4.3.2	CHOIX DU LIQUIDE D'APPOINT	54
4.3.3	ORDRE DE MIGRATION ET SÉPARATION	55
<b>4.4</b>	<b>LC-MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE</b>	<b>57</b>
4.4.1	DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE LC-MS	57
4.4.2	COMPARAISON DES VARIANTS D'ENZYME	63
<b>4.5</b>	<b>ANALYSES MS/MS DES STANDARDS</b>	<b>64</b>
4.5.1	ANALYSES MS/MS DES OLIGOSACCHARIDES NON-DERIVES	65
4.5.2	ANALYSES MS/MS DES OLIGOSACCHARIDES DÉRIVÉS AVEC LA PHZ	68
<b>4.6</b>	<b>LC-MS/MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION ENZYMATIQUE</b>	<b>71</b>
4.6.1	SÉQUENÇAGE DES CHITO-OLIGOSACCHARIDES	71
4.6.2	CARACTÉRISATION DES PROFILS DE DÉACÉTYLATION SELON CHAQUE CLONE	80
<b>4.7</b>	<b>LC-MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A<sub>6</sub>-PHZ</b>	<b>81</b>
4.7.1	ANALYSES MS PAR INJECTION DIRECTE DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DÉRIVÉS AVEC LA PHZ	82

4.7.2	ANALYSES LC-MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DÉRIVÉS AVEC LA PHZ	84
<b>5</b>	<b><u>COMPARAISON DES MÉTHODES ANALYTIQUES</u></b>	<b>85</b>
5.1	REPRODUCTIBILITÉ ET EFFET DE MATRICE	86
5.2	EFFICACITÉ ET APPLICATION À L'ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES	94
5.3	COUPLAGE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	95
5.4	FACILITÉ D'UTILISATION	96
5.5	POSSIBILITÉ DE QUANTIFICATION	97
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>98</b>
6.1	CONCLUSION	99
6.2	TRAVAUX FUTURS	103
<b>7</b>	<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>106</b>

## Liste des tableaux

TABLEAU 1.1 NOMBRE D'ISOMÈRES PAR DEGRÉ DE DÉACÉTYLATION _____	4
TABLEAU 2.1 PRINCIPAUX AGENTS DE DÉRIVATION POUR L'ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES _____	14
TABLEAU 4.1 MASSES MOLÉCULAIRES ET VALEURS M/Z DES IONS QUASI-MOLÉCULAIRES DES PRODUITS THÉORIQUES DE DÉACÉTYLATION DE L'HEXAMÈRE DE CHITINE _____	36
TABLEAU 4.2 INFLUENCE DU CATALYSEUR ACIDE POUR LA RÉACTION DE DÉRIVATION DE L'OLIGOSACCHARIDE AVEC L'APTS _____	38
TABLEAU 4.3 RENDEMENT DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE DE DÉACÉTYLATION SELON LE SUBSTRAT _____	45
TABLEAU 4.4 NOMBRE DE PLATEAUX THÉORIQUES <sup>A</sup> SELON LE PH DU TAMPON DE SÉPARATION _____	51
TABLEAU 4.5 PARAMÈTRES DE COMPARAISON POUR LE CHOIX DE LA CONCENTRATION _____	53
TABLEAU 4.6 COMPARAISON DE LA RÉOLUTION SELON LE GRADIENT _____	60
TABLEAU 4.7 RENDEMENT DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE DE DÉACÉTYLATION SELON L'ENZYME _____	64
TABLEAU 4.8 SÉQUENÇAGE DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> OBTENUS DE L'ENZYME <i>AXE A</i> _____	77
TABLEAU 4.9 SÉQUENÇAGE DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> OBTENUS DE L'ENZYME B4-F6 _____	78
TABLEAU 4.10 SÉQUENÇAGE DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> OBTENUS DE L'ENZYME B4-A7 _____	79
TABLEAU 4.11 RENDEMENT DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE DE DÉACÉTYLATION DU SUBSTRAT A <sub>6</sub> -PHZ AVEC L'ENZYME <i>AXE A</i> _____	82
TABLEAU 4.12 MASSES ATTENDUES POUR LES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DÉRIVÉS AVEC LA PHÉNYLHYDRAZINE _____	83
TABLEAU 5.1 REPRODUCTIBILITÉ DU TEMPS DE RÉTENTION DE A <sub>4</sub> D <sub>2</sub> SELON LA TECHNIQUE	87
TABLEAU 5.2 REPRODUCTIBILITÉ DES TEMPS DE MIGRATION EN CE-LIF POUR DES INJECTIONS RÉPÉTÉES POUR TOUS LES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION _____	87

TABLEAU 5.3 REPRODUCTIBILITÉ QUOTIDIENNE DES TEMPS DE MIGRATION EN CE-LIF POUR LES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION PRINCIPAUX _____	87
TABLEAU 5.4 REPRODUCTIBILITÉ DES TEMPS DE RÉTENTION EN LC-MS POUR DES INJECTIONS RÉPÉTÉES POUR TOUS LES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION* _____	89
TABLEAU 5.5 REPRODUCTIBILITÉ DES TEMPS DE RÉTENTION EN LC-MS D'UN JOUR À L'AUTRE POUR TOUS LES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION* _____	90
TABLEAU 5.6 REPRODUCTIBILITÉ D'UNE RÉACTION À L'AUTRE DES TEMPS DE RÉTENTION EN LC-MS POUR TOUS LES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION* _____	90

## Liste des figures

FIGURE 1.1 STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE A) LA CHITINE B) LE CHITOSANE _____	2
FIGURE 2.1 SCHÉMA DE LA DOUBLE COUCHE ÉLECTRIQUE OÙ (A) PAROI DU CAPILLAIRE, (B) COUCHE ADSORBÉE ET (C) COUCHE DIFFUSE _____	8
FIGURE 2.2 VARIATION DU FLUX ÉLECTROSMOTIQUE SELON LE PH _____	9
FIGURE 2.3 SCHÉMA DE L'ORDRE DE MIGRATION DES IONS EN ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE [8] _____	10
FIGURE 2.4 PROFIL DU DÉBIT ET DU CHROMATOGRAMME OBTENU EN (A) ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE ET (B) CHROMATOGRAPHIQUE LIQUIDE [8] _____	11
FIGURE 2.5 RÉACTION DE DÉRIVATION DES CHITOLIGOSACCHARIDES PAR RÉDUCTION DE L'AMINE _____	15
FIGURE 2.6 SCHÉMA DU PROCESSUS D'IONISATION PAR NÉBULISATION ÉLECTROSTATIQUE [35] _____	16
FIGURE 2.7 SCHEMA DE (A) L'INTERFACE ESI COAXIALE [36] ET (B) VUE RAPPROCHEE DE LA POINTE DE L'AIGUILLE [37] _____	18
FIGURE 2.8 SCHÉMA DE LA FRAGMENTATION DE 2 ISOMÈRES DE A <sub>4</sub> D <sub>2</sub> (A) AAADDA (B) ADDAAA _____	25
FIGURE 4.1 SPECTRE DE MASSE PAR TOF DE (A) L'HEXASACCHARIDE DE CHITINE (A <sub>6</sub> ) ET CHITOSANE (D <sub>6</sub> ) (B) [M+H] <sup>+</sup> ET [M+NA] <sup>+</sup> DE A <sub>6</sub> (C) [M+2H] <sup>2+</sup> ET [M+H+NA] <sup>2+</sup> DE A <sub>6</sub>	35
FIGURE 4.2 ÉLECTROPHÉROGRAMME DE L'HEXAMÈRE DE CHITINE (A <sub>6</sub> ) DÉRIVÉ AVEC APTS EN MILIEU (A) ACIDE ACÉTIQUE (B) ACIDE CITRIQUE _____	38
FIGURE 4.3 ÉLECTROPHÉROGRAMME DE L'HEXAMÈRE DE CHITOSANE (D <sub>6</sub> ) DÉRIVÉ AVEC L'APTS EN MILIEU (A) ACIDE ACÉTIQUE (B) ACIDE CITRIQUE _____	39
FIGURE 4.4 ÉLECTROPHÉROGRAMMES DE LA RÉACTION DE DÉRIVATION AVEC L'APTS DE A <sub>6</sub> EN MILIEU (A) AQUEUX (B) THF _____	40
FIGURE 4.5 ÉLECTROPHÉROGRAMME DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DU SUBTRAT A <sub>6</sub> - APTS ANALYSÉ AVEC UN TAMPON BORATE 80 mM, PH 8,45; 25kV _____	41
FIGURE 4.6 ÉLECTROPHÉROGRAMME DES STANDARDS DE CHITINE ET CHITOSANE ANALYSÉ AVEC UN TAMPON HISTDINE 90 mM, PH 6,5; 25kV _____	42

FIGURE 4.7 ÉLECTROPHÉROGRAMMES DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DU SUBSTRAT A <sub>6</sub> -APTS TAMPON HISTIDINE 90 MM, PH 6,5; 25KV	43
FIGURE 4.8 ÉLECTROPHÉROGRAMMES DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DÉRIVÉS DANS DES TAMPONS DE 80MM À PH 6,5, 25KV (A) D'HISTIDINE (B) D'IMIDAZOLE (C) DE TRIÉTHANOLAMINE	44
FIGURE 4.9 ÉLECTROPHÉROGRAMME DE LA DÉRIVATION DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DU SUBSTRAT A <sub>6</sub> DANS LE TAMPON 80MM HISTIDINE PH 6.5, 25KV	45
FIGURE 4.10 ÉLECTROPHÉROGRAMMES DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DU SUBSTRAT DÉRIVÉ, A <sub>6</sub> -APTS DANS LE TAMPON 80MM HISTIDINE PH 6.5, 25KV	46
FIGURE 4.11 SPECTRE DE MASSE DE L'A <sub>6</sub> -APTS PAR MALDI-TOF EN MODE RÉFLECTRON POSITIF (A) SANS AUCUNE PURIFICATION, POST-RÉACTION ET (B) APRÈS COLLECTION DE FRACTION (MATRICE : SDHB PRÉPARÉE DANS EAU: ACÉTONITRILE 3:7 (V/V) ET TRAITÉE AVEC UNE RÉSINE) [60]	48
FIGURE 4.12 SPECTRE MS (ESI-Q) DE A <sub>6</sub> -APTS EN MODE NÉGATIF	49
FIGURE 4.13 SPECTRE DE MASSE (ESI-TOF) DE A <sub>6</sub> -APTS EN MODE ION NÉGATIF	49
FIGURE 4.14 EIE SUPERPOSÉS DES STANDARDS D <sub>6</sub> (493,2 M/Z) ET A <sub>6</sub> (619 M/Z) ANALYSÉS DANS DES TAMPONS D'AMMONIUM ACÉTATE 10 MM À (A) PH 3 (B) PH 3,5 (C) PH 4 (D) PH 5 (E) PH 6,7	51
FIGURE 4.15 EIE SUPERPOSÉS DES STANDARDS D <sub>6</sub> (493,2 M/Z) ET A <sub>6</sub> (619,2 M/Z); TAMPONS ACÉTATE D'AMMONIUM, PH 3,5 À (A) 5 MM (B) 10 MM (C) 20 MM (D) 50 MM	53
FIGURE 4.16 EIE SUPERPOSÉS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION, ANALYSE DANS UN TAMPON D'AMMONIUM ACETATE 10 MM PH 3,5 ET AVEC UN LIQUIDE D'APPOINT AYANT 0,2% ACIDE ACETIQUE DANS (A) MEOH/H <sub>2</sub> O (1:1), (B) IPA/H <sub>2</sub> O (3:1)	55
FIGURE 4.17 EIC DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE L'ENZYME SAUVAGE AXE A (GRADIENT HILIC; COLONNE CYANO)	58
FIGURE 4.18 EICS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION SELON LES DIFFÉRENTS GRADIENTS (A) 90-30% (B) 80-10% (C) 70-10% (D) 60-10% SUR 18 MINUTES	59
FIGURE 4.19 EIC DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE L'ENZYME SAUVAGE AXE A (GRADIENT HILIC SUR LA COLONNE AMINE)	61

FIGURE 4.20 COMPARAISON DE LA PRODUCTION DE PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE L'ENZYME <i>AXE A</i> ET DES CLONES B4-F6 ET B4-A7	64
FIGURE 4.21 SPECTRE MS/MS DE A <sub>6</sub>	66
FIGURE 4.22 SPECTRE MS/MS DE D <sub>6</sub>	67
FIGURE 4.23 EXTRÉMITÉ RÉDUCTRICE DE L'OLIGOSACCHARIDE DÉRIVÉ AVEC LA PHÉNYLHYDRAZINE (PHZ)	68
FIGURE 4.24 SPECTRE MS/MS DE A <sub>6</sub> -PHZ	69
FIGURE 4.25 SPECTRE MS/MS DE D <sub>6</sub> -PHZ	70
FIGURE 4.26 CHROMATOGRAMME LC-MS/MS DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE <i>AXE A</i>	73
FIGURE 4.27 SPECTRE MS/MS DE A <sub>4</sub> D <sub>2</sub> À 7,51-7,59 MIN. DU PIC, ISSU DE L'ION PRÉCURSEUR 577,2 M/Z	75
FIGURE 4.28 SPECTRE MS/MS DE A <sub>4</sub> D <sub>2</sub> À 7,74-7,79 MIN. DU PIC, ISSU DE L'ION PRÉCURSEUR 577,2 M/Z	76
FIGURE 4.29 SPECTRE MS/MS DE A <sub>4</sub> D <sub>2</sub> À 8,09-8,23 MIN. DU PIC, ISSU DE L'ION PRÉCURSEUR 577,2 M/Z	76
FIGURE 4.30 PROFIL PROPOSÉ DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> PAR L'ENZYME <i>AXE A</i>	80
FIGURE 4.31 PROFIL PROPOSÉ DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> PAR L'ENZYME B4-F6	81
FIGURE 4.32 PROFIL PROPOSÉ DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> PAR L'ENZYME B4-A7	81
FIGURE 4.33 SPECTRE MS (ESI-IT) DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DU SUBSTRAT A <sub>6</sub> -PHZ	83
FIGURE 5.1 EIC DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION OBTENUS DE L'ENZYME CLONE B4F6 (RÉACTION DU 20 JUIN 2006); ANALYSÉ LE 23 JUIN 2006	91
FIGURE 5.2 EIC DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION OBTENUS DE L'ENZYME CLONE B4F6 (RÉACTION DU 20 JUIN 2006); ANALYSÉ LE 28 JUIN 2006	91
FIGURE 5.3 EIC DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION OBTENUS DE L'ENZYME CLONE B4F6 (RÉACTION DU 20 JUIN 2006); ANALYSÉ LE 20 SEPTEMBRE 2006	91
FIGURE 5.4 ÉLECTROPHÉROGRAMME (CE-LIF) DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE A <sub>6</sub> -APTS (TAMPONS 80 MM HISTIDINE, PH 6,5) ANALYSÉ LE 10 JANVIER 2007	93

FIGURE 5.5 ÉLECTROPHÉROGRAMME (CE-LIF) DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE  
A<sub>6</sub>-APTS (TAMPONS 80 MM HISTIDINE, PH 6,5) ANALYSÉ LE 19 JUILLET 2007 \_\_\_\_\_ 93

FIGURE 5.6 ÉLECTROPHÉROGRAMME (CE-LIF) DES PRODUITS DE DÉACÉTYLATION DE  
A<sub>6</sub>-APTS (TAMPONS 80 MM HISTIDINE, PH 6,5) ANALYSÉ LE 23 OCTOBRE 2007 \_\_\_\_\_ 94



## Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
APTS	Acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique
CE	Électrophorèse Capillaire (Capillary Electrophoresis)
CID	Dissociation activée par collision (Collision Induced Dissociation)
COS	Chitoooligosaccharide
CV	Coefficient de variation
DDA	Degré de Déacétylation
EIE	Électrophérogramme d'ion extrait (Extracted Ion Electropherogram)
EIC	Chromatogramme d'ion extrait (Extracted Ion Chromatogram)
EOF	Flux électroomotique (Electroomotic Flow)
ESI	Nébulisation électrostatique (Electrospray Ionisation)
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acétyl-glucosamine
HILIC	Chromatographie liquide à interaction hydrophile (Hydrophilic Interaction Chromatography)
IT	Trappe ionique (Ion Trap)
LC	Chromatographie Liquide (Liquid Chromatography)
LIF	Fluorescence Induite par Laser (Laser Induced Fluorescence)
MALDI	Désorption laser avec matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)
MS	Spectrométrie de Masse (Mass Spectrometry)
N	Nombre de plateaux théoriques
N/D	Information non disponible
PHZ	Phénylhydrazine
Q	Simple Quadripôle (Single Quadrupole)
QQQ	Triple Quadripôle
TIC	Chromatogramme du scan total (Total Ion Chromatogram)
TOF	Temps d'envol (Time of Flight)

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier la Dr. Karen Waldron pour m'avoir prise sous son aile et offert l'opportunité de faire ma maîtrise sous sa direction. Au cours de ces deux années passées, ma confiance en moi et mon indépendance se sont épanouies. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait voir l'importance non seulement de rechercher mais aussi de partager la science tant aux étudiants (à travers les démos et les stagiaires) qu'à nos pairs (lors des conférences).

Je désire aussi remercier les gens du laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal, Alexandra Furtos et Karine Venne de m'avoir donné un accès privilégié au lab et pour tous leurs conseils judicieux et discussions animées.

Je voudrais aussi souligner la collaboration de tous les membres du groupe de recherche associé au projet chitosane, particulièrement Joëlle Pelletier, Audrey Nisole, Claude Dupont et Guillaume Brault et le financement de ce projet par la subvention CRSNG stratégique de Claude Dupont en collaboration avec ISM Biopolymer (Granby, Qc).

Merci aussi à tous mes camarades de laboratoire et de l'aile U, Vy, Anne-Laure, Karine et Georgiana et à ceux de « l'autre côté », PO, Pedro et les autres joyeux lurons du bureau à la porte fermée (...) qui ont meublé mes jours à la maîtrise de moult péripéties, fous rires et... ah oui de bonne chimie (!).

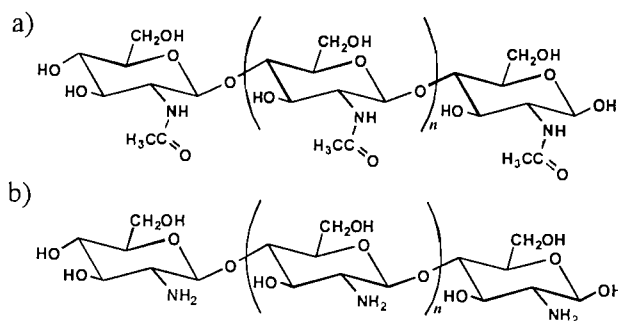
Merci à toute ma famille et amis qui m'ont patiemment écouté raconter mes déboires du laboratoire sans pour autant avoir la moindre idée de ce que tout cela voulait dire et à leur encouragement subséquent.

Enfin, à François pour avoir la patience de me supporter au quotidien et de m'encourager à toujours donner le meilleur de moi-même.

# 1 INTRODUCTION

### 1.1 De la chitine au chitosane

Le chitosane est une forme partiellement ou complètement déacétylée de la chitine, poly $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine. Ces deux molécules sont des chaînes linéaires glycosidiques constituées d'unités de glucosamine N-acétylée (GlcNAc) dans le cas de la chitine et de glucosamine (GlcN) pour le chitosane, dont les groupements amines ont un  $pK_a$  d'environ 6,5. Leurs formules moléculaires sont respectivement  $HO-(C_8H_{13}NO_5)_n-H$  et  $HO-(C_6H_{11}NO_4)_n-H$  (figure 1.1).



**Figure 1.1** Structure moléculaire de a) la chitine b) le chitosane

La chitine est un polysaccharide naturel et la biomasse la plus abondante sur Terre après la cellulose. La chitine est produite par plusieurs organismes vivants, elle fait partie de la structure de l'exosquelette d'arthropodes et des membranes cellulaires de certains champignons et levures. On la retrouve donc dans les déchets de la pêche tels que dans les coquilles de crabe et de crustacés, source première de la chitine commerciale [1]. Bien que la chitine peut être utilisée dans différents domaines, dont celui des matériaux pour la confection de membranes ou de films [1], c'est sous sa forme déacétylée qu'elle suscite le plus d'intérêt.

Lorsque la chitine est déacétylée à environ 50%, cette molécule devient soluble en milieu aqueux légèrement acide et on l'appelle alors chitosane. La solubilisation du chitosane est possible via la protonation de ses groupements amines ( $-NH_2$ ) [1-3]. Le chitosane possède des caractéristiques physico-chimiques et biologiques variées. Il se retrouvera donc dans des secteurs aussi diversifiés que l'agriculture, le traitement des eaux, l'alimentation, les cosmétiques et la pharmaceutique. Ses propriétés physico-chimiques lui permettent d'être utilisé aussi bien comme flocculant pour clarifier l'eau des piscines que pour réduire l'électricité

statique des cheveux [1]. Actuellement, le chitosane profite d'un intérêt croissant dans les domaines pharmaceutique et biomédical pour son utilisation en tant que transporteur de médicament [1] et comme biomatériau dans la régénération de tissus [4]. En effet, le chitosane possède une faible toxicité ( $LD_{50}$  16g/kg par voie orale sur des souris [5]) et est peu allergène. De plus, au niveau biologique il est biocompatible, biodégradable et biologiquement actif [1-3]. L'activité biologique du chitosane inclut entre autres des propriétés anti-inflammatoire, anti-fongique et anti-bactérien exploitées dans les domaines biomédicaux et agricoles. De plus, l'utilisation du chitosane permet une guérison accélérée des blessures.

Le chitosane est le plus souvent obtenu par traitement thermochimique industriel au NaOH. Cette méthode provoque une distribution aléatoire des degrés de déacétylation et de polymérisation des oligosaccharides de chitosane. La composition exacte en termes de longueur de la chaîne (degré de polymérisation) ainsi que le pourcentage d'unités déacétylés (degré de déacétylation) influence les propriétés biochimiques et de biocompatibilité de la molécule de chitosane. Par contre, l'utilisation alternative d'une enzyme déacétylase permettrait alors de développer des procédés contrôlant ces différents paramètres [6]. En effet, une telle méthode utilisant une enzyme évoluée de façon à contrôler la sélectivité au niveau de la déacétylation représente un avantage marqué en plus de se conformer à l'idéologie des procédés verts.

## ***1.2 Produits de déacétylation enzymatique de la chitine***

On retrouve les enzymes déacétylases dans plusieurs champignons et algues. Selon sa souche, l'enzyme aura un mécanisme d'action différent. Il s'avère que pour certaines enzymes, la longueur de la chaîne de saccharides (le substrat) influence l'efficacité de la déacétylation [6]. Par ailleurs, l'étude de ces mécanismes permet d'effectuer des mutations de cette enzyme afin d'en augmenter la performance. Nos collaborateurs en biochimie travaillent sur la mutation par évolution dirigée de l'enzyme d'acetyl xylane esterase A (*AxeA*) provenant d'une souche de *Streptomyces lividians* [7] afin d'améliorer l'efficacité de la déacétylation.

### 1.3 Quelques définitions

On définira ici le *degré de déacétylation* (DDA) par le nombre d'unités de sucre déacétylé (GlcN) de l'oligosaccharide et *degré de polymérisation* (DP) par le nombre d'unités de la chaîne (longueur). De plus, afin d'alléger le texte, ainsi que simplifier la nomenclature des différents produits de déacétylation, la lettre A correspondra à l'unité de glucosamine N-acétylée (GlcNAc) alors que la lettre D correspondra à l'unité de glucosamine (GlcN), soit celle déacétylée; le chiffre suivant la lettre indique le nombre d'unité de celle-ci. Par exemple, A<sub>4</sub>D<sub>2</sub> veut dire que la molécule possède 4 unités GlcNAc et 2 unités de GlcN indépendamment de sa séquence. Dans ce même cas, on dira que l'oligosaccharide possède un degré de déacétylation de 2 et un degré de polymérisation de 6. Le tableau 1.1 résume la gamme des différents produits de déacétylation pouvant provenir de l'hexasaccharide de chitine (A<sub>6</sub>) comme seul substrat. L'hexasaccharide de chitine a été choisi comme substrat-exemple, car il est l'oligomère le plus grand disponible commercialement à prix raisonnable. Puisque l'hexasaccharide n'est pas une molécule symétrique, jusqu'à 63 structures uniques peuvent être obtenues. Bien que la production des 63 isomères par l'enzyme n'est pas attendue, la séparation et l'identification de ces structures représentent tout un défi analytique.

**Tableau 1.1** Nombre d'isomères par degré de déacétylation

Nom	DDA	Nombre d'isomères	Exemple de séquence
A <sub>6</sub>	0	1	■—■—■—■—■—■
A <sub>5</sub> D <sub>1</sub>	1	6	■—□—■—■—■—■
A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	2	15	□—■—■—□—■—■
A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	3	20	■—■—□—■—□—□
A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	4	15	□—■—□—□—□—■
A <sub>1</sub> D <sub>5</sub>	5	6	□—□—■—□—□—□
D <sub>6</sub>	6	1	□—□—□—□—□—□

Légende :    □ GlcN    ■ GlcNAc

#### ***1.4 Objectifs du projet***

Ce projet vise donc à développer une méthode de criblage rapide afin de caractériser les produits de déacétylation enzymatique et ainsi permettre d'orienter les prochaines mutations de l'enzyme *Axe A*. La séparation des différents oligosaccharides obtenus devra simultanément se faire selon leur degré de déacétylation ainsi que leur degré de polymérisation. L'identification des produits de déacétylation permettra non seulement d'améliorer l'efficacité de l'enzyme par l'introduction de mutation, mais aussi de déterminer si celle-ci produit une forme spécifique de déacétylation de l'oligosaccharide.

L'électrophorèse capillaire ainsi que la chromatographie liquide, deux techniques analytiques robustes et bien connues seront étudiées et comparées afin d'en retirer les avantages de chacune. Ces deux techniques seront aussi couplées à la spectrométrie de masse. Cette dernière constituera en quelque sorte une deuxième dimension de séparation tout en permettant l'identification par la masse des différents produits de déacétylation, les temps de rétention/migration n'étant pas suffisants puisque leurs standards ne sont pas disponibles et sont difficiles à synthétiser. De plus, deux agents de dérivation seront utilisés dans cette étude. Le premier permettra la détection par fluorescence en électrophorèse capillaire alors que le deuxième facilitera le séquençage des COS par LC-MS/MS. Conséquemment, la dérivation des COS aura aussi une influence sur la séparation selon la technique utilisée.

## **2 TECHNIQUES ANALYTIQUES ET MÉTHODES DE DÉTECTION DES OLIGOSACCHARIDES**

*« Machines fail, eyes don't. »*

*- Master Chief (Halo: The Fall of the Reich)*



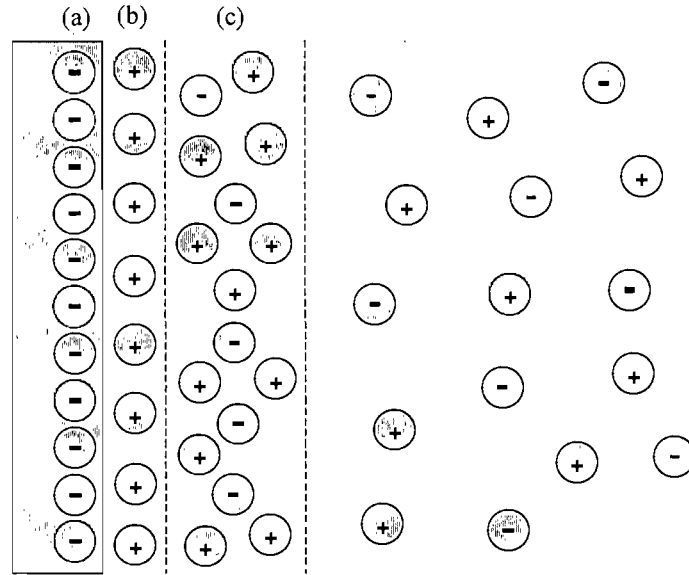
Afin de séparer et identifier les différents oligosaccharides, la technique de séparation analytique devra être assez performante pour discriminer des molécules très semblables, voire des isomères positionnels. De plus, les molécules de chitine et de chitosane, comme la plupart des saccharides ne possèdent pas de groupement chromophore ou fluorophore. Le choix de la méthode de détection devra donc tenir compte de cet aspect.

## *2.1 Électrophorèse capillaire*

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique apparue dans les années 80 et souvent appliquée pour la séparation de molécules biologiques telles que les protéines, les acides nucléiques et les hydrates de carbones. Il existe plusieurs types de séparation en électrophorèse capillaire, comme l'électrophorèse de zone (sur gel), en solution libre, électrocinétique micellaire et à focalisation isoélectrique. La technique utilisée pour cette étude est l'électrophorèse capillaire en solution libre, la forme la plus simple. En électrophorèse, les analytes sont séparés selon leur rapport charge sur le rayon hydraté ( $q/r$ ) sous l'effet d'un champ électrique. Le rapport charge sur masse ( $q/m$ ) est souvent utilisé comme une approximation de  $q/r$ . Deux mouvements principaux dictent la progression des analytes, soit le flux électroosmotique (EOF) et la mobilité électrophorétique. Ces deux mouvements dépendent respectivement des paramètres physiques de la technique et des propriétés moléculaires de l'analyte.

Le flux électroosmotique est le déplacement de la solution tampon à l'intérieur du capillaire lors de l'application d'une différence de potentiel. Ce déplacement est dû à la double couche électrique qui existe à la surface de la paroi du capillaire (figure 2.1). La surface de la paroi du capillaire de silice est chargée négativement à cause des groupements silanol; il se crée alors une accumulation de charge positive près de la paroi formant ainsi la double couche électrique. Celle-ci est formée d'une couche adsorbée (figure 2.1(b)) où les cations sont fortement retenus à la surface du capillaire et d'une couche diffuse (figure 2.1(c)) où il y a accumulation de cations, mais de population moins dense. Sous l'effet d'un champ électrique, les

ions positifs de la couche diffuse se déplacent vers la cathode entraînant avec eux les ions du reste de la solution donnant ainsi lieu au flux électroosmotique.

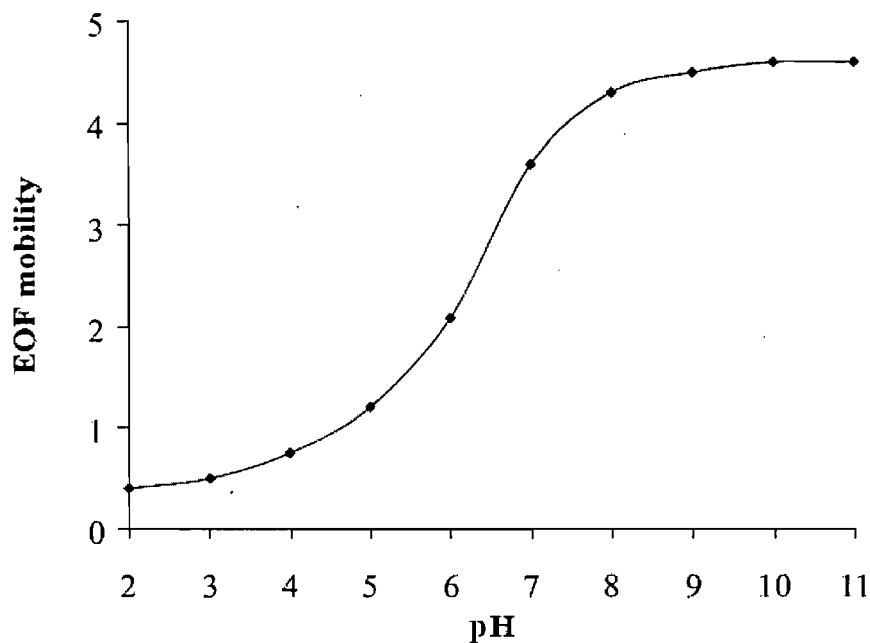


**Figure 2.1** Schéma de la double couche électrique où (a) paroi du capillaire, (b) couche adsorbée et (c) couche diffuse

La mobilité électroosmotique ( $\mu_{eo}$ ) est alors décrite par l'équation suivante :

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (1)$$

où  $\varepsilon$  est la constante diélectrique,  $\zeta$  est le potentiel zêta et  $\eta$  la viscosité de la solution. L'accumulation de charge dans la couche adsorbée provoque une différence de potentiel appelée potentiel zêta. La valeur du potentiel zêta varie selon le pH et la force ionique du tampon puisqu'ils déterminent la densité de charge retrouvée dans la double couche électronique. Conséquemment l'EOF est influencé par ces deux paramètres. La figure 2.2 représente la variation de l'EOF selon le pH pour une analyse CE en solution libre utilisant un capillaire de silice. Ainsi, le flux électroosmotique est plus bas à bas pH puisque la densité de charge de la double couche électronique est élevée et diminue le potentiel zêta et inversement l'EOF augmentera avec le pH. La force ionique fera varier l'EOF selon le même raisonnement.



**Figure 2.2** Variation du flux électroosmotique selon le pH

Pour sa part, la mobilité électrophorétique représente le déplacement de l'ion sous l'effet d'un champ électrique. La mobilité de l'ion est déterminée par le rapport entre la force électrique appliquée qui entraîne l'ion vers l'une ou l'autre électrode et la force de friction entre l'ion et la solution tampon.

La mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) d'un ion est donc exprimée tel que :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

où  $q$  est la charge de l'ion,  $\eta$  la viscosité de la solution et  $r$  le rayon hydraté de l'ion. La charge et le rayon hydraté d'un ion sont donc deux facteurs déterminants de sa mobilité électrophorétique. La charge détermine le sens du déplacement de l'ion (vers la cathode ou l'anode) alors que le rayon hydraté est responsable de l'ampleur de la force de friction de l'ion. Ainsi le  $pK_a$  permet d'évaluer la séparation entre différentes molécules, puisqu'il détermine leur état de charge.

Enfin, la mobilité globale d'un ion, dénommée mobilité apparente ( $\mu_{app}$ ) se traduit donc par la somme des mobilités électroosmotique et électrophorétique de l'ion et est exprimée tel que :

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (3)$$

La figure 2.3 illustre l'ordre de migration des ions dans un capillaire de silice utilisant un voltage à polarité normale (soit la cathode à l'extrémité du détecteur et l'anode à l'extrémité de l'injection). Tel qu'illustré, les cations migrent en premier et les anions en dernier. Dans le cas des molécules neutres, puisqu'elles ne possèdent pas de mobilité électrophorétique (vu l'absence de charge), elles migrent avec le flux électroosmotique. Il n'est donc pas possible de les séparer dans des conditions d'électrophorèse en solution libre. Par ailleurs, il est possible de changer cet ordre de migration en inversant le potentiel ou encore en modifiant la surface du capillaire.

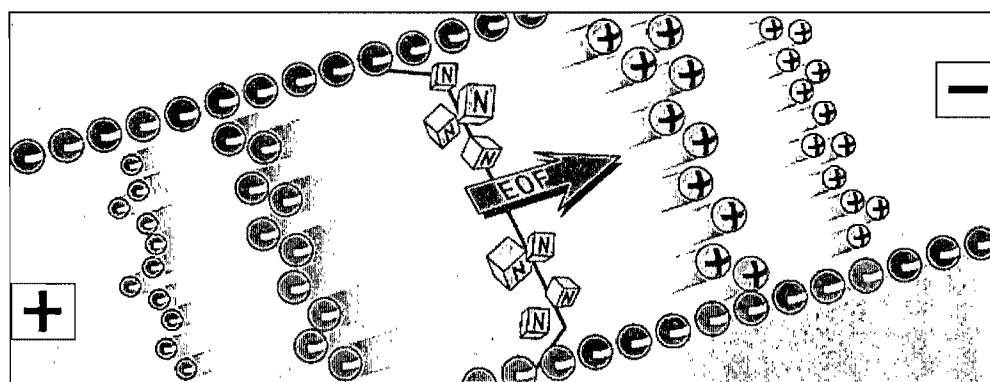
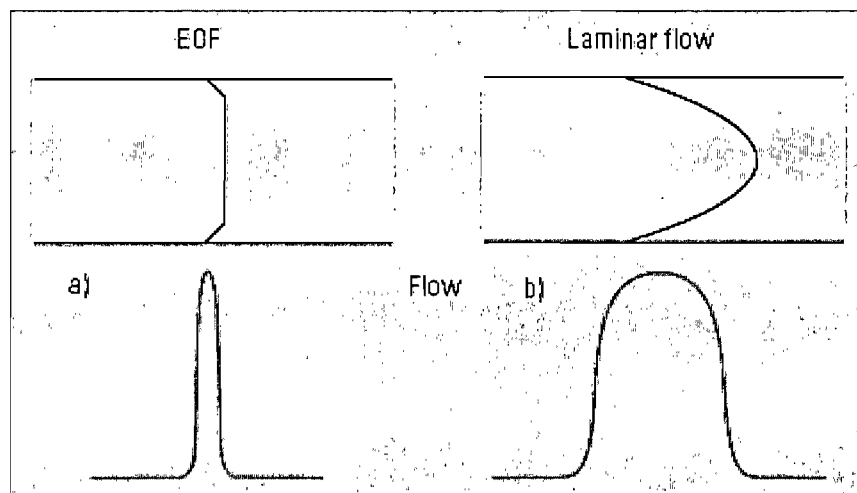


Figure 2.3 Schéma de l'ordre de migration des ions en électrophorèse capillaire [8]

Les pics obtenus en électrophorèse capillaire sont souvent très effilés. Cela est possible puisque d'une part, l'EOF donne lieu à un profil du débit relativement plat (figure 2.3(a)), contrairement au débit laminaire obtenu en chromatographie liquide (figure 2.3(b)). De plus, l'absence de phase stationnaire en CE élimine l'effet d'élargissement des pics lié à la diffusion d'Eddy (chemins multiples). Ainsi la capacité de la CE à produire des pics fins permet d'augmenter le nombre de plateaux théoriques ainsi que la résolution.



**Figure 2.4** Profil du débit et du chromatogramme obtenu en (a) électrophorèse capillaire et (b) chromatographique liquide [8]

De plus amples détails sur la théorie ainsi que les différentes techniques en électrophorèse capillaire peuvent être retrouvés dans les références suivantes [8-10].

Deux points principaux ont donc motivé le choix d'utiliser l'électrophorèse capillaire pour la séparation des chitooligosaccharides :

1. L'électrophorèse est une technique très efficace permettant de séparer avec un grand pouvoir de résolution des analytes similaires
2. La séparation par degré et profil de déacétylation sera dictée par les légères différences de  $pK_a$  des groupements amine des différents DDA.

L'absence de groupements ionisables et de chromophores exige la plupart du temps la dérivation des oligosaccharides afin de les analyser par électrophorèse capillaire. Dans le cas des oligosaccharides de chitine et chitosane, il est possible de les détecter à basse longueur d'onde (193 nm), via la fonction acétyle. Quelques groupes travaillant sur de plus longues chaînes de chitosane utilisent la détection UV [11, 12]. Par contre, cela signifie que plus le degré de déacétylation augmente, plus il sera difficile de détecter les molécules à faible concentration. Par ailleurs, les chitosanes peuvent s'ioniser via leur fonction amine, ce dont la chitine complètement acétylée ne peut bénéficier. Sans dérivation, la séparation par degré de polymérisation est compromise puisque d'une part, la chitine est neutre et le chitosane aura un

rapport  $q/m$  constant peu importe la longueur de la chaîne (tels que les acides nucléiques). La dérivation des oligosaccharides devient alors presque inévitable.

Il est possible d'analyser des oligosaccharides et hydrates de carbone sous leur forme native en utilisant des tampons très basiques (à pH 9-10); permettant ainsi de déprotonner les fonctions hydroxyles des sucres. Par contre, l'utilisation de tampons à haut pH n'est pas souhaitée dans notre cas puisque d'une part les sels inorganiques requis pour atteindre ces pH ne sont pas compatibles avec la spectrométrie de masse et d'autre part, la charge attribuée par les hydroxyles conduit au même rapport  $q/m$  pour chaque espèce de DDA différents. Encore une fois, la dérivation offre la possibilité d'utiliser une plus grande variété de tampon tant au niveau du pH utilisé que du sel.

À ce jour, peu de littérature traite de l'analyse des oligosaccharides de chitosane par électrophorèse capillaire. Les principales utilisent la détection par fluorescence en dérivant la molécule avec la 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS) [13, 14]. Par ailleurs, diverses études [15-17] témoignent de l'efficacité de l'électrophorèse à séparer différents types d'oligosaccharides. La présente recherche vise principalement à utiliser les forces de la technique CE pour séparer les différents DDA des chitooligosaccharides et possiblement aussi les différents isomères positionnels de chaque DDA.

Deux méthodes de détection ont donc été utilisées de pair avec la CE lors de cette étude, soit la fluorescence induite par laser et la spectrométrie de masse. Chaque méthode possède des avantages motivant leur utilisation et permet d'obtenir une information liée à l'objectif du projet.

### *2.1.1 Détection par fluorescence induite par laser*

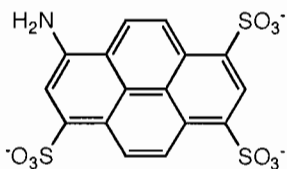
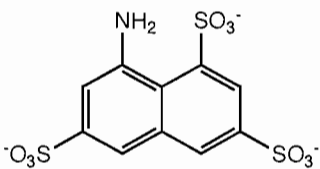
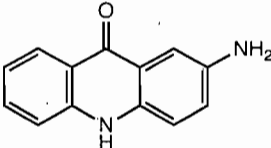
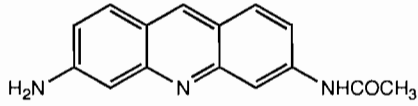
La détection par absorbance (UV) est la méthode la plus courante en chimie analytique. Par contre, les oligosaccharides n'absorbent pas ou très peu dans l'UV-Vis, ce qui complique leur détection. Des techniques telles que la détection par UV

indirecte et la dérivation sont des solutions possibles afin de remédier à ce problème. La détection par UV indirecte est une méthode très peu sensible, où l'absence d'absorption de l'analyte est observée par rapport à un chromophore contenu dans la solution tampon. La technique de dérivation pour sa part consiste à ajouter un chromophore ou un fluorophore à la molécule permettant ainsi la détection de cette dernière par absorbance et fluorescence respectivement. La détection par fluorescence induite par laser (LIF) est une technique beaucoup plus sensible que la détection par absorbance avec des limites de détection de 2 à 3 ordres de grandeur plus bas. De plus, la détection par LIF est une méthode très spécifique; en effet, seuls les analytes possédant à la fois les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées pourront être détectés. L'absence de groupements chromophores et fluorophores sur les oligosaccharides nécessite donc qu'ils soient dérivés afin d'être détectés tant par UV-Vis que par fluorescence. Puisque la détection par LIF est une technique plus sensible et sélective que l'UV-Vis, la dérivation choisie pour les COS en sera une avec un fluorophore. La dérivation est fréquemment utilisée en électrophorèse capillaire pour améliorer la détection des différents analytes [18, 19].

Rappelons que la majorité des oligosaccharides ne peuvent être ionisés à l'état natif. Or la présence de charge est importante pour la séparation en CE en solution libre. Il est donc avantageux de choisir un agent de dérivation qui permettra aux oligosaccharides d'être ionisés. Plusieurs agents de dérivation sont disponibles pour remplir le double rôle de fluorophore et donneur de charge indispensable pour l'analyse des oligosaccharides. Les principaux fluorophores [18, 20] sont répertoriés dans le tableau 2.1 suivant.

Le fluorophore utilisé pour l'étude des chitines et chitosanes est le 1-aminopyrène-3,6,8-trisulfonate (APTS) et a été précédemment choisi par Marie-Ève Beaudoin [13] du même groupe de recherche. La charge instituée et la limite de détection basse de la détection par LIF sont les principales raisons qui ont motivé ce choix. De plus, la méthode de dérivation avec les chitines avait déjà été développée et prouvée son efficacité [14].

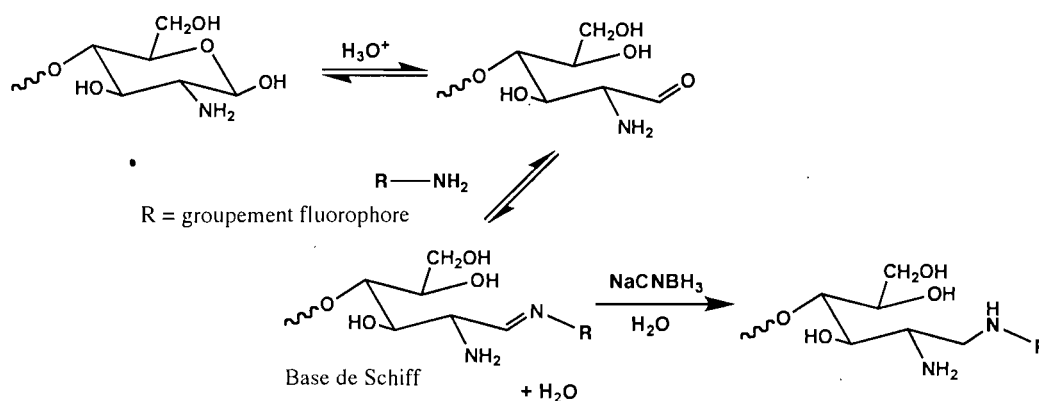
**Tableau 2.1** Principaux agents de dérivation pour l'analyse des oligosaccharides

NOM & STRUCTURE	CHARGE	FLUO.	MS	RÉF.
<p><b>APTS</b></p>  <p>8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate</p>	-3	$\lambda_{\text{ex},1}=455\text{nm}$ $\lambda_{\text{ex},2}=488\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=512\text{nm}$	ESI MALDI	[13, 14, 17, 21]
<p><b>ANTS</b></p>  <p>8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonate</p>	-3	$\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=515\text{nm}$	ESI MALDI	[22- 24]
<p><b>2-AMAC</b></p>  <p>2-aminoacridone</p>	0	$\lambda_{\text{ex}}=428\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=525\text{nm}$	n/a	[25, 26]
<p><b>AA-Ac</b></p>  <p>3-acétamido-6-aminoacridine</p>	0	$\lambda_{\text{ex},1}=382\text{nm}$ $\lambda_{\text{ex},2}=445\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=520\text{nm}$	ESI MALDI	[27, 28]



## RÉACTION DE DÉRIVATION

La méthode de dérivation des oligosaccharides de chitine et chitosane par l'APTS a été développée lors d'études précédentes [13]. Ce fluorophore est couramment utilisé pour l'étude de hydrates de carbone [14, 16, 29-31], car il permet non seulement la détection par fluorescence mais donne une charge triplement négative aux saccharides qui autrement seraient neutres. Les saccharides sont le plus souvent dérivés par réaction de réduction d'amine à l'extrémité réductrice de la chaîne par réduction de l'amine via la formation d'une base de Schiff, tel que décrite dans la figure 2.5. Quoique cette réaction est la plus courante, il existe d'autres voies synthétiques pour attacher un fluorophore ou chromophore au sucre [32].



**Figure 2.5** Réaction de dérivation des chitooligosaccharides par réduction de l'amine

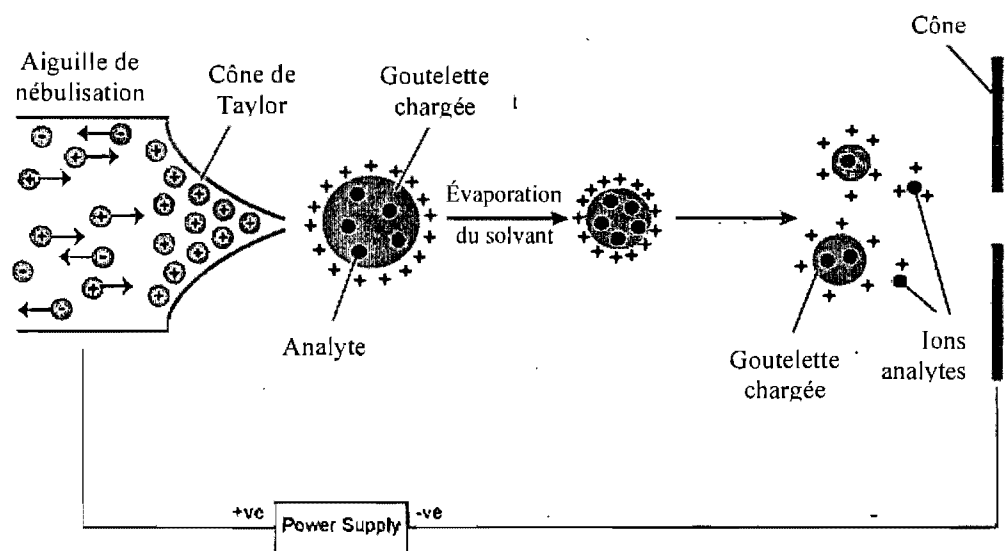
En plus de procurer une détection par fluorescence, certains auteurs ont remarqué que la dérivation avec l'APTS améliorait l'efficacité de l'ionisation des molécules en spectrométrie de masse [16, 21, 29, 31, 33].

### 2.1.2 Détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) connaît actuellement un essor rapide et la technique ne cesse de dépasser ses limites tant au niveau de la sensibilité que de la précision. Il existe une variété de méthodes d'ionisation et d'analyseurs de masse. Le choix de la méthode d'ionisation et de l'analyseur de masse se fait respectivement selon la capacité aux molécules de s'ioniser et au type d'information recherchée.

L'analyse d'oligosaccharides peut s'effectuer avec plusieurs combinaisons différentes de sources d'ionisation et d'analyseurs de masse. Les deux méthodes d'ionisation les plus souvent rencontrées dans ce cas-ci sont la nébulisation électrostatique (ESI) et la désorption laser avec matrice (MALDI) [34]. Les molécules sont analysées soit à l'état natif ou dérivé selon leur possibilité d'ionisation. A priori, le choix de l'analyseur de masse n'est pas limité par quelques contraintes que ce soit. Le plus souvent le choix de l'analyseur de masse est déterminé par l'équipement disponible. L'analyseur couplé à la CE utilisé dans cette recherche est un simple quadripôle. Il sera discuté de façon plus détaillée dans la section 2.2.1.

La nébulisation électrostatique (ESI) est la méthode d'ionisation utilisée dans cette étude. De plus, c'est une méthode d'ionisation douce qui dans notre cas ne fragmente pas la molécule lors de l'ionisation. La molécule intacte et entière peut donc être identifiée. L'ESI s'applique à un grand éventail de molécules qui doivent par ailleurs détenir une fonction facilement ionisable. Dans le cas des chitines et chitosanes, la présence d'un atome d'azote rend l'ionisation par ESI aisée.



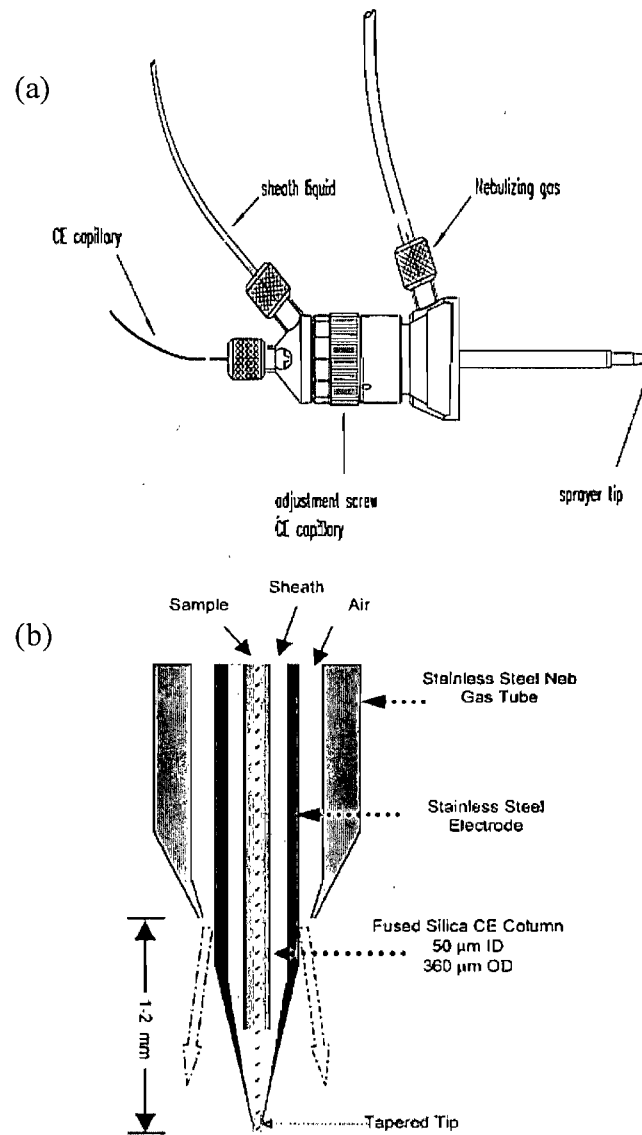
**Figure 2.6** Schéma du processus d'ionisation par nébulisation électrostatique [35]

La figure 2.6 illustre le processus d'ionisation de l'ESI. Une décharge électrique est appliquée sur l'aiguille de nébulisation et le liquide sortant de l'aiguille forme une plume (cône de Taylor) de gouttelettes chargées. Le solvant s'évapore dans

la source formant graduellement de plus petites gouttelettes jusqu'à l'obtention d'ions des analytes. Les ions obtenus en phase gazeuse sont alors accélérés vers l'analyseur de masse.

C'est avec l'avènement de cette technique d'ionisation que le couplage de l'électrophorèse à la spectrométrie de masse (CE-MS) est devenu plus populaire. À priori, ces deux techniques semblent parfaitement complémentaires puisque l'ESI est surtout efficace avec des molécules possédant des groupements ionisables et l'électrophorèse utilise la charge des molécules pour les séparer dans un champ électrique. Par contre, d'un point de vue pratique la CE-MS n'est pas une mince affaire bien que plusieurs groupes de recherche utilisent cette technique. L'aspect le plus rebutant du couplage de ces deux méthodes découle des tampons typiquement utilisés pour l'électrophorèse. Ces derniers sont souvent des sels de phosphates ou de borates, non-volatils. Ceux-ci précipitent dans la source de l'appareil et provoquent alors une suppression de signal en MS. Il faudra donc remplacer ces tampons pour des sels volatils comme l'acétate d'ammonium ou formate d'ammonium. Par contre, ces sels sont moins souvent utilisés en CE, car leur pouvoir de séparation est très faible due principalement à leur faible conductivité.

L'analyse par CE-MS des hydrates de carbone utilise principalement une interface ESI coaxiale [15] tel qu'illustré à la figure 2.7. En effet, le débit issu du capillaire étant de l'ordre du nL/min, il est trop faible pour assurer une bonne nébulisation; un liquide d'appoint composé en grande proportion de solvant organique est donc ajouté. Ce dernier jouera un double rôle, en plus d'assurer une bonne nébulisation et désolvatation, il complète le circuit électrique de l'électrophorèse capillaire. En effet, l'utilisation d'une bonne proportion d'un solvant organique dans la composition du liquide d'appoint aide la vaporisation du tampon aqueux utilisé pour la séparation CE. De plus, la tension de surface du solvant organique favorise la stabilisation du « spray ».



**Figure 2.7** Schéma de (a) l'interface ESI coaxiale [36] et (b) vue rapprochée de la pointe de l'aiguille [37]

## 2.2 Chromatographie liquide

La chromatographie liquide (LC) est une technique très répandue surtout grâce à sa facilité d'utilisation et son large domaine d'application. Malgré tout, l'analyse d'oligosaccharides tels que la chitine et le chitosane n'est pas chose courante. On retrouve dans la littérature beaucoup de références à la séparation et l'étude des glykans provenant de glyco-protéines, mais peu sur l'analyse d'oligosaccharides seuls. Les chitooligosaccharides sont linéaires alors que les sucres provenant de glyco-protéines possèdent souvent des embranchements et plusieurs variétés de sucres pouvant aider à la séparation chromatographique. Les stratégies de séparation seront donc différentes pour l'analyse de ces deux types d'oligosaccharides.

Puisque la présence d'une charge n'est pas nécessaire pour obtenir une bonne séparation en LC, la dérivation des chitines et chitosanes n'est pas impérative comme pour la CE. Cela présente un avantage, car l'étape de dérivation est souvent longue et pénible et peut introduire des produits secondaires qui compliquent les résultats. L'analyse des oligosaccharides dans leur état natif est possible grâce d'une part à un grand éventail de colonnes disponibles et au couplage aisé à la spectrométrie de masse. La chromatographie liquide couplée à la détection par spectrométrie de masse (LC-MS) nous permettra donc d'analyser directement les produits de déacétylation de la chitine.

La multitude de colonnes analytiques disponibles sur le marché permet l'application de la LC à plusieurs domaines différents. En effet, on compte plusieurs types de phases stationnaires tant polaires que non-polaires. Les manufacturiers améliorent constamment leurs colonnes et de nouvelles phases stationnaires font régulièrement leur apparition. Puisque les oligosaccharides et hydrates de carbone sont des molécules à caractère polaire, la séparation sur  $C_{18}$  n'est pas possible sans dérivation. Le plus souvent la colonne choisie sera polaire ou possèdera des caractéristiques spécifiques à former de bonnes interactions avec les oligosaccharides [38]. Afin d'analyser les oligosaccharides à l'état natif, Liu *et al.* [39] ont utilisé une

colonne dont la phase stationnaire est greffée de cyclodextrine et arrivent ainsi à séparer des produits de digestion de dextrose et cellulose. Pour leur part, Robinson *et al.* [40] se sont tourné vers une colonne de carbone graphite poreux pour séparer des oligosaccharides extraits de souches de blé selon la longueur de la chaîne. Koizumi [41] a aussi séparé selon le degré de polymérisation des chitooligosaccharides. Par contre, ces colonnes peu conventionnelles sont disponibles à un coût beaucoup plus élevé qu'une colonne plus populaire ( $C_{18}$ ,  $C_8$ , CN,  $NH_2$ ,...). Depuis quelques années, la chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) compte de plus en plus d'adeptes. Cette technique d'élution permet d'obtenir une sélectivité différente de la chromatographie en phase inverse et normale tout en offrant la possibilité d'utiliser des colonnes polaires populaires.

#### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A INTERACTIONS HYDROPHILES

Le nom de « chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) » a été instauré par J. Alpert en 1990 [42] ; ces termes réfèrent à une technique chromatographique où les analytes sont retenus sur une phase stationnaire hydrophile alors que la phase mobile est composée principalement d'un solvant organique. Deux caractéristiques majeures servent à définir ce mode d'élution [43] soit :

1. l'eau est le solvant possédant le plus grand pouvoir d'élution
2. la séparation est basée sur un mécanisme de partage

Ce sont ces caractéristiques qui discriminent la chromatographie HILIC de la chromatographie d'adsorption.

Les mécanismes impliqués dans la séparation en HILIC ne sont pas connus avec certitude. Par ailleurs, les hypothèses courantes impliquent toutes la présence d'une fine couche aqueuse adsorbée à la surface de la phase stationnaire; cette dernière étant polaire. Un phénomène de partition apparaît au niveau de la couche aqueuse. Cette couche d'eau permet alors une meilleure rétention des molécules polaires.

L'application de cette méthode à l'analyse d'oligosaccharides semble logique vue le fort caractère hydrophile de ces derniers. En effet, dès son avènement avec les recherches d'Alpert, la chromatographie HILIC a été appliquée aux hydrates de carbone [42, 44]. Bien que les résultats de cette technique d'élution aient été publiés depuis 10 ans, ce n'est que ces dernières années que l'intérêt pour la chromatographie HILIC connaît une recrudescence. En effet, l'intérêt croissant a engendré l'apparition de colonnes spécifiques à l'élution HILIC. Ces dernières telle que la colonne ZIC<sup>®</sup>-HILIC de SeQuant possèdent une phase stationnaire greffée d'un zwitterion favorisant ainsi la formation de la couche aqueuse et les interactions ioniques avec l'analyte. Les colonnes précédemment utilisées étaient principalement des colonnes de silice, amine ou encore de polymères adsorbés [45].

L'intérêt pour la chromatographie HILIC est sans aucun doute lié aux avancements dans le domaine de la spectrométrie de masse. En effet, l'utilisation d'une grande proportion de solvant organique en HILIC est avantageuse lorsque le chromatographe est couplé à un spectromètre de masse, car elle facilite la désolvation des ions. Anciennement, dans le cas de l'analyse des hydrates de carbone, la détection était limitée aux techniques d'indice de réfraction et l'UV, des techniques peu sensibles [45].

La séparation des oligosaccharides de chitosanes par chromatographie HILIC reposera sur les différences d'interactions et d'hydrophilicité des molécules selon le nombre et possiblement la position des groupements amines. Les groupements OH des oligosaccharides contribueront aussi à la rétention des analytes sur la phase stationnaire. Par contre, ils ne représenteront pas un facteur déterminant qui permettra de différencier les différents DDA puisque tous les chitooligosaccharides ont le même nombre de groupements OH retrouvés aux mêmes positions sur la chaîne du saccharide, peu importe la séquence. En effet, les COS se différencient par leurs groupements amines ou amine-N-acétylés.

### 2.2.1 *Détection par spectrométrie de masse*

Le couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide est une technique robuste et couramment utilisée dans plusieurs domaines. Dans le cadre de cette recherche, la nébulisation électrostatique sera la seule méthode d'ionisation utilisée. Tel que mentionné plus tôt (section 2.1.2) cette méthode d'ionisation s'applique bien aux COS.

Le type d'information recherché déterminera le type d'analyseur à utiliser. Dans cette étude, l'analyse des produits de déacétylation de la chitine consiste d'abord à séparer et identifier les différents DDA. Pour cela un analyseur tel qu'un simple quadripôle permet amplement d'obtenir l'information nécessaire, soit la masse correspondant au DDA observé. L'analyseur à simple quadripôle permet l'analyse de molécules de masse allant de 10 à 4000 m/z, une résolution des masses de 1000 et une précision de  $\pm 0.1-0.2$  m/z [46]. Cette précision et cet intervalle de masse sont suffisants pour l'analyse routinière des COS.

Par ailleurs, afin de confirmer la corrélation entre une masse observée et une formule moléculaire, un analyseur de masse à haute résolution est nécessaire. Le temps d'envol (TOF) est le type d'analyseur le plus fréquemment utilisée à cette fin. Tel que le nom le stipule, le TOF sépare les ions de façon temporelle, soit selon leur vitesse d'envol dans le tube de l'analyseur. Avec l'utilisation d'une calibration interne, l'exactitude sur la masse atteinte se situe à moins de 5 ppm. De plus, le TOF peut atteindre des résolutions de masses de l'ordre de  $10^6$  permettant ainsi l'observation de patrons isotopiques. C'est à l'aide de ces deux paramètres que la corrélation entre une masse observée et une formule moléculaire est établie.

Puisque la plupart des oligosaccharides ne possèdent pas de groupements ionisables, ils requièrent une dérivation avant de pouvoir être analysés par MS. Par contre, dans le cas des chitines et chitosanes la présence des atomes d'azote permet l'ionisation des molécules en MS. La dérivation des molécules n'est donc pas essentielle à son analyse.



### 2.2.2 Détection par spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est une méthode qui consiste à fragmenter un ion choisi, ci-après appelé ion précurseur. La procédure consiste à sélectionner un ion par la première analyse MS puis fragmenter ce dernier par dissociation activée par collision (CID), pour finalement faire l'analyse MS des fragments obtenus. Cette méthode permet alors d'aider à élucider la structure des molécules ou identifier avec certitude la présence d'un ion précurseur. Pour faire la MS/MS, l'analyseur de masse doit pouvoir faire plusieurs analyses consécutives, soit de manière cyclique comme la trappe ionique (IT) et l'orbitrap ou alors en couplant plusieurs analyseurs de masse ensemble comme le triple quadripôle (QQQ) et le Q-TOF (quadripôle et temps d'envol).

Dans un deuxième temps, cette recherche consiste à déterminer le patron de déacétylation de l'enzyme; donc si certaines positions sur la chaîne de l'oligosaccharide sont plus sujettes que d'autres à être déacétylées. Les oligosaccharides devront donc être séquencés afin de connaître la composition exacte de chaque DDA. Pour ce faire, la trappe ionique sera l'analyseur de masse utilisé.

Selon l'énergie de collision appliquée, la fragmentation de l'oligosaccharide se fera soit aux liaisons glycosidiques ou en travers du cycle (« cross-ring »). On observe typiquement le premier type de fragmentation à basse énergie de CID et la deuxième aux plus hautes énergies de CID [47].

Morelle et Michalski [48] ont séquencé des oligosaccharides provenant de glycoprotéine par ESI-QTOF. Les oligosaccharides détachés de la protéine ont été dérivés avec la benzylamine afin de faciliter leur ionisation. De plus, grâce à la présence de la benzylamine, les profils de fragmentation sont principalement de type Y, c'est-à-dire comprenant l'extrémité réductrice. Le même groupe a aussi analysé des glycans de glycoprotéine par ESI-IT [47]. L'utilisation de la trappe ionique leur a

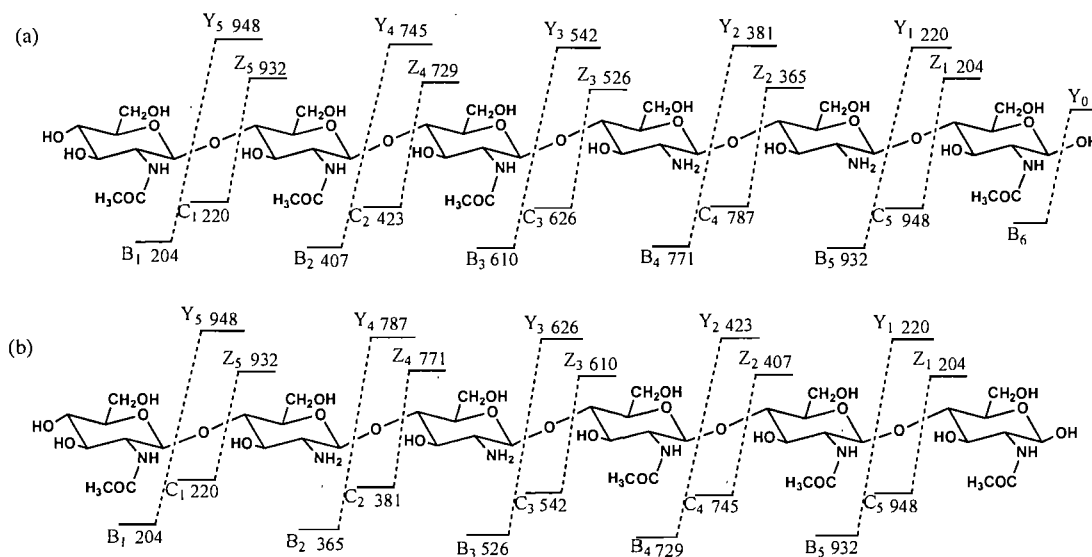
permis d'effectuer des expériences de MS<sup>n</sup> afin de provoquer la fragmentation des cycles et ainsi élucider la structure des embranchements des glycans.

Les fragments obtenus lors du séquençage des oligosaccharides sont identifiés selon la nomenclature établie par Domon et Costello [49]. Selon cette nomenclature, les fragments X, Y, Z surviennent quand la charge se situe sur l'extrémité réductrice, conséquemment les fragments A, B et C sont obtenus lorsque la charge se situe sur l'extrémité non-réductrice. Les fragments X et A correspondent à des fragments issus de bris des cycles glycosidiques (cross-ring) et ne sont pas représentés dans la figure 2.8 puisqu'ils sont moins souvent observés.

Le séquençage des oligosaccharides non-dérivés a été étudié par quelques groupes [49-51]. Ces études visaient surtout à élucider les voies de fragmentation des oligosaccharides. Tous les auteurs ont observé une perte d'eau par rapport à l'ion précurseur. Ils s'entendent pour affirmer que cette perte se produit à l'extrémité réductrice du sucre et donne lieu aux fragments Y<sub>0</sub> et B<sub>n</sub> (n étant le nombre total de résidus de la chaîne) tel qu'indiqué sur la figure 2.8 (a). Domon et Costello [49] ont répertorié les fragmentations observées par FAB-MS (Fast Atom Bombardment-MS). Ils ont remarqué qu'en mode positif tous les types de fragments étaient observables sauf les fragments A, rarement présents. Les fragments issus de bris de liaisons glycosidiques sont plus communément observés. Cette observation est corroborée par les récents résultats de Pasanen *et al.* [50]. Ces derniers ont identifié principalement des fragments B et Y issus d'ions précurseurs de type [M+H]<sup>+</sup>. De plus, cette équipe a étudié l'effet de l'ion précurseur sur la fragmentation conséquente.

Même si les COS sont facilement ionisés, leur séquençage requiert une dérivation au préalable afin d'identifier l'extrémité réductrice. En effet, même si la molécule n'est pas symétrique, il n'est pas possible de distinguer lors de la fragmentation l'extrémité réductrice de celle non-réductrice. La figure 2.8 illustre tous les fragments observables pour deux isomères de A<sub>4</sub>D<sub>2</sub>. Sans dérivation, il est difficile de déterminer à partir de quelle extrémité (réductrice ou non-réductrice)

l'oligosaccharide sera séquencé puisqu'il n'est pas possible de savoir à quelle extrémité la charge est retenue. En effet, les fragments Z et B ainsi que la paire Y et C auront les mêmes masses pour une séquence donnée et son inverse.



**Figure 2.8** Schéma de la fragmentation de 2 isomères de A<sub>4</sub>D<sub>2</sub> (a) AAADDA (b) ADDAAA

Le groupe de Peter [28, 52] a séquencé des COS préalablement dérivés avec 2-AMAC et AA-AC. Grâce à la dérivation, le séquençage est facilité non seulement pour identifier l'extrémité réductrice, mais aussi en provoquant la formation de fragments de type Y ou Z principalement. En effet, l'agent de dérivation retient préférentiellement la charge lors de l'ionisation. Le groupe a ainsi été capable de séquencer plusieurs COS de différentes longueurs et compositions.

Toutes les techniques présentées seront donc utilisées dans cette étude afin de caractériser les chitoooligosaccharides produits par déacétylation enzymatique.

### **3 PARTIE EXPÉRIMENTALE**

*« Actually, on-line CE-MS of carbohydrates is still quite challenging (...) »*

*- Campa, C. et al., Electrophoresis, 27 (11), 2006*

### 3.1 Produits chimiques

L'eau utilisée pour les analyses en électrophorèse capillaire a été purifiée à l'aide d'un système de filtration Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA). L'hydroxyde de sodium et l'acide citrique ont été achetés chez BDH (Toronto, ON, Canada). Le  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , l'histidine monohydraté  $\cdot\text{HCl}$ , le THF, le méthanol (grade HPLC), l'isopropanol, la phénylhydrazine (98%) et l'acétate d'éthyle proviennent de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). L'acétonitrile et l'eau de grade HPLC proviennent de Chromosolv, une branche de Sigma-Aldrich. Le sel de sodium du 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS) et l'acide formique viennent de chez Fluka (Oakville, ON, Canada). L'acide chlorhydrique provient de EM Science (Darmstadt, Allemagne) et l'acide acétique d'Anachemia (Montréal, QC, Canada). Les hexasaccharides de chitine et chitosane proviennent de Seikagaku America (distribué par MJS BioLynx, Brockville, ON, Canada). L'acétate d'ammonium a été acheté chez Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).

### 3.2 Réactions de dérivation et réaction de déacétylation enzymatique

#### 3.2.1 Réaction de dérivation avec la 8-aminopyrène trisulfonate

La réaction de dérivation est effectuée telle que décrite par Beaudoin *et al.* [13] avec quelques modifications. La solution est chauffée pendant 3 h à 75 °C. Afin de tester quelques paramètres, l'APTS est préparé soit dans 15% d'acide acétique ou 25% acide citrique et le  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  est préparé dans l'eau ou le THF.

#### 3.2.2 Réaction de dérivation avec la phénylhydrazine

La procédure de dérivation des standards d'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) et chitosane ( $D_6$ ) est modifiée de Lattova et Perreault [53, 54]. Environ 1 à 2 mg de l'oligosaccharide sont mis en suspension dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau et 10  $\mu\text{L}$  de phénylhydrazine (PHZ) sont ensuite additionnés. Le mélange est ensuite chauffé dans un bloc chauffant à une température de 75-80 °C pendant 3 heures. Pendant le chauffage, l'échantillon est régulièrement mélangé sur le vortex. L'échantillon est ensuite dilué à un volume total de 100  $\mu\text{L}$  dans l'eau. La solution est ensuite extraite 3

fois avec 50  $\mu\text{L}$  d'acétate d'éthyle. L'échantillon est dilué à environ 0,1 mg/mL avant l'analyse.

Dans le cas de l'hexasaccharide de chitine dérivé avec la PHZ ( $A_6$ -PHZ) qui sera utilisé comme substrat de départ d'une réaction enzymatique, la réaction de dérivation a été recommencée jusqu'à ce qu'il ne reste plus de chitine ( $A_6$ ). La présence de ce dernier est vérifiée par spectrométrie de masse. Le substrat ( $A_6$ -PHZ) ainsi dérivé est ensuite dilué à une concentration finale de 5 mg/mL et soumis au groupe de C. Dupont (INRS-Institut Armand Frappier) afin d'effectuer la réaction de déacétylation enzymatique.

### 3.2.3 Réaction de déacétylation enzymatique du substrat natif et dérivé

L'enzyme déacétylase *Axe A* et la réaction de déacétylation ont été préparées selon Nisole *et al.* [7]. La réaction de déacétylation est effectuée sur les substrats d'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) ou  $A_6$ -APTS en utilisant l'enzyme provenant du surnageant de culture cellulaire, donc à l'état non purifiée. La réaction enzymatique est effectuée par Audrey Nisole<sup>†</sup> à l'INRS-IAF. Les échantillons ensuite soumis contiennent l'équivalent de 1 mg/mL du substrat de départ, 1 mM chlorure de cobalt, 50 mM de tampon phosphate pH 6 et 30 % (v/v) de surnageant de culture cellulaire de l'enzyme. Ces échantillons sont utilisés tel quel pour la réaction de dérivation; dans le cas de la réaction de déacétylation sur l' $A_6$ -APTS, l'échantillon est dilué 40X dans l'eau avant d'être analysé par CE-LIF. Pour les analyses LC-MS, les échantillons sont dilués 10X dans l'eau avant d'être analysés.

La réaction de déacétylation d' $A_6$ -PHZ a été effectuée par Claude Dupont en utilisant l'enzyme *Axe A* purifiée. L'échantillon soumis contient l'équivalent de 1,8 mg/mL de substrat de départ, 15  $\mu\text{g/mL}$  d'enzyme, 26,6 mM de tampon phosphate pH 6, 0,7 mM  $\text{CoCl}_2$  et 114 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . L'échantillon est dilué 10X dans l'eau avant d'être analysés par LC-MS.

---

<sup>†</sup> Audrey Nisole: Stagiaire post-doctorale du groupe J. Pelletier au Département de chimie de l'Université de Montréal.

Le rendement de déacétylation de la réaction enzymatique a été évalué par HPLC-UV à l'INRS-Armand Frappier par A. Nisole.

### **3.3 Instrumentation et méthodes**

#### *3.3.1 Analyses MS des hexasaccharides chitine et chitosane*

Les standards d'hexasaccharides de chitine ( $A_6$ ) et chitosane ( $D_6$ ) ont été analysés par injection directe en utilisant un système *LC-MSD TOF* d'Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) équipé d'une source ESI (nébulisation électrostatique) et d'un analyseur de masse à temps d'envol (TOF). Les éluants sont 0,1 % acide formique dans l'eau et 0,1 % acide formique dans l'acétonitrile (50:50). L'acquisition est faite en mode ion positif.

#### *3.3.2 Analyses CE-LIF des produits de déacétylation d' $A_6$ dérivés et d' $A_6$ -APTS*

Le système d'électrophorèse capillaire utilisé est un *P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System* de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Le capillaire de silice fondue (PolyMicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) utilisé possède une longueur totale de 60 cm et 50 cm au détecteur; le diamètre interne est de 50  $\mu\text{m}$ . Le détecteur est un laser d'ions d'argon de 3 mW de Beckman Coulter ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre de longueur d'onde d'émission de 520 nm pour la détection. Avant chaque analyse, le capillaire est nettoyé successivement avec du NaOH 0,1 M, de l'eau Milli-Q et le tampon utilisé pour la séparation. L'injection hydrodynamique est effectuée pendant 10 secondes à 0,5 psi (correspondant à un volume d'injection de 1 nL). La séparation est effectuée en appliquant un voltage de 25 kV pendant 30 minutes. Plusieurs tampons différents ont été testés et sont spécifiés à la figure correspondante.

Les analyses MS des produits dérivés ont été effectués successivement sur un ESI-Q et ESI-TOF tous deux d'Agilent Technologies. L'éluant utilisé est un mélange (1:1) méthanol/eau.

### 3.3.3 Analyses CE-MS des produits de déacétylation d'A<sub>6</sub>

Le système d'électrophorèse capillaire utilisé est un *Agilent Technologies Capillary Electrophoresis System* couplé à un spectromètre de masse *Agilent Technologies MSD 1100 Series* muni d'un simple quadripôle et d'un nébuliseur électrostatique co-axial compatible avec le CE. Le capillaire de silice fondue (PolyMicro Technologies) a une longueur totale de 90 cm, soit la longueur jusqu'au MS et une longueur au détecteur UV de 20 cm; le diamètre interne est de 50 µm. Avant chaque analyse, le capillaire est nettoyé successivement avec du NaOH 0,1 M, de l'eau Milli-Q et le tampon utilisé pour la séparation. L'injection hydrodynamique est effectuée pendant 5 secondes à 50 mbar (correspondant à un volume d'injection de 0,5 nL). La séparation est effectuée en appliquant un voltage de 25 kV pendant 30 minutes. Le débit du liquide d'appoint est de 4 µL/min en utilisant un réducteur de débit sur une pompe isocratique (Agilent Technologies). L'acquisition est effectuée en mode scan ion positif de 200 à 1500 m/z. Le tampon utilisé est préparé à partir de l'acétate d'ammonium et l'acide acétique afin d'obtenir une concentration de 10 mM d'acétate d'ammonium à pH 3,5. La solution de liquide d'appoint est un mélange de méthanol-eau (50:50) ou isopropanol-eau (75:25) contenant 0,2 % acide acétique.

### 3.3.4 Analyses LC-MS des produits de déacétylation d'A<sub>6</sub>

Les analyses par LC-MS ont été effectuées sur le système *Agilent Technologies 1100 Series*. Le spectromètre de masse est équipé d'un nébuliseur électrostatique avec l'application de 4000V sur le capillaire. L'analyseur de masse est un simple quadripôle (Q) et sauf indications contraires, l'acquisition est effectuée en mode scan positif dont les ions d'intérêt sont ensuite extraits. Les éluants sont 0,1 % d'acide formique dans l'eau et de l'acétonitrile. Différents gradients ont été testés et sont décrits avec les résultats.

Deux colonnes ont été utilisées pour la séparation des oligosaccharides de chitosane toujours avec l'objectif de séparer les différents produits de déacétylation. Les deux colonnes viennent de *Phenomenex* (Madrid, CA, USA). La première colonne utilisée est une colonne cyano, Luna CN, 4,6 × 150 mm et dont la dimension



des particules est de 3  $\mu\text{m}$  de diamètre. La deuxième colonne est une colonne amine, Luna  $\text{NH}_2$ ,  $4,6 \times 150$  mm dont les particules possèdent 5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le débit utilisé pour les deux colonnes est de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### 3.3.5 Analyses MS/MS des standards

Les analyses MS/MS de  $\text{D}_6$  et  $\text{D}_6\text{-PHZ}$  sont effectuées par injection directe sur un spectromètre de masse équipé d'un analyseur de masse de type trappe ionique (ESI-IT) *Thermo Finnigan LCQ Advantage* (Waltham, MA, USA) avec une énergie de collision normalisée<sup>‡</sup> de 40 %. Les éluants sont 0,1 % acide formique dans l'eau et 0,1 % acide formique dans l'acétonitrile (50:50).

Les analyses MS/MS d' $\text{A}_6$  et  $\text{A}_6\text{-PHZ}$ , des substrats éventuels, sont effectuées par injection directe sur un spectromètre de masse dont l'analyseur de masse est un triple quadripôle (ESI-QqQ) *Finnigan TSQ Quantum Ultra* (de Thermo Scientific) avec une énergie de collision de 15 V. Les éluants sont 0,1 % acide formique dans l'eau et 0,1 % acide formique dans l'acétonitrile (50:50).

Les analyses MS/MS ont été effectuées sur deux instruments différents, car les solutions de chitine ( $\text{A}_6$  et  $\text{A}_6\text{-PHZ}$ ) requéraient une plus grande sensibilité à cause de la concentration de la solution.

---

<sup>‡</sup> L'énergie de collision normalisée (ECN) est la mesure du voltage RF normalisée par rapport à l'ion précurseur. On peut calculer l'amplitude de la résonance du voltage RF tel que : 
$$\text{Amplitude} = \frac{\text{ECN}(\%)}{30\%} \times [M \times a + b]$$
 où M est la masse de l'ion précurseur (u), a et b représentent respectivement la pente (V/u) et l'ordonnée à l'origine (V) de l'amplitude de résonance. Pour les masses regardées, 493,5 pour  $\text{D}_6$  et 538,5 pour  $\text{D}_6\text{-PHZ}$ , les amplitudes trouvées sont de respectivement 1,1 V et 1,2 V.

### 3.3.6 Analyses LC-MS/MS des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>

Les analyses par LC-MS/MS sont effectuées sur un système HPLC *Gilson* (Middleton, WN, USA) couplé au spectromètre de masse ESI-IT. La colonne utilisée est la Luna CN de Phenomenex décrite plus tôt. Les éluants sont 0,1 % d'acide formique dans l'eau et de l'acétonitrile. Le gradient utilisé est 60 à 35 % ACN en 7 minutes, puis de 35 à 30 % ACN en 2 minutes, suivi d'un plateau de 2 minutes à 30 % ACN, puis retour aux conditions initiales en 1 minute (60 % ACN).

Les analyses MS/MS sont effectuées en utilisant comme ion précurseur l'ion le plus intense selon les DDA des COS, c'est-à-dire le simplement chargé pour le A<sub>6</sub> et A<sub>5</sub>D<sub>1</sub> et le doublement chargé pour les autres espèces (A<sub>4</sub>D<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, A<sub>2</sub>D<sub>4</sub> et A<sub>1</sub>D<sub>5</sub>). Toutes ces analyses sont effectuées en mode ion positif en utilisant une énergie de collision normalisée de 40 %.

### 3.3.7 Analyses LC-MS des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-PHZ

L'instrumentation et la méthode décrite précédemment pour l'analyse LC-MS/MS des produits de déacétylation de A<sub>6</sub> ont été utilisées pour l'analyse des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-PHZ. De plus, une colonne Gemini C<sub>18</sub> de Phenomenex des dimensions de 4,6 × 150 mm et de particules de 5 µm de diamètre a été utilisée. Les éluants sont 0,1 % d'acide formique dans l'eau et de l'acétonitrile. L'acquisition est effectuée en mode scan positif dont les ions d'intérêt sont ensuite extraits. Le gradient utilisé est 5 % ACN pendant 5 minutes, puis de 5 à 40 % ACN en 25 minutes, suivi d'un plateau de 5 minutes à 40% ACN et enfin un retour aux conditions initiales en 5 minutes.

## 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

*« Come on, don't you guys have some gizmo to track this thing? That blue light with the buzzers and bells or that mass-spectro-detecto-whatever-you-call-it thingy? »*

*- Detective Frank Tripp (CSI: Miami)*

#### 4.1 Identification MS des hexasaccharides de chitine et chitosane

L'identification des standards d'oligosaccharides de chitine et chitosane est effectuée avec un analyseur de masse de type temps d'envol (TOF). Ce dernier possède une meilleure résolution de la masse que le simple quadripôle et permet donc de consolider la corrélation de la masse à la molécule à l'aide des patrons isotopiques. Des solutions standards d'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) et chitosane ( $D_6$ ) ont tout d'abord été analysées par injection directe afin de s'assurer que les molécules à l'état natif s'ionisaient bien en ESI. Comme le montre la figure 4.1, plusieurs ions simplement et doublement chargés sont observables ainsi que des adduits de sodium dans le cas de la chitine.

L'observation des patrons isotopiques des ions quasi-moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M+2H]^{2+}$  permet de confirmer la corrélation entre les masses observées, respectivement 1237,49 m/z et 619,25 m/z de la molécule d'hexamère de chitine. En effet, l'ion simplement chargé montre des pics séparés par une unité de m/z et une séparation de  $\frac{1}{2}$  m/z dans le cas de l'ion doublement chargé. Conséquemment, la masse observée à 619,25 m/z est bien l'ion doublement chargé de l'ion 1237,49 m/z qui lui-même est un ion simplement chargé dont la masse correspond exactement à celle d' $A_6$  (hexasaccharide de chitine, voir section 1.3 pour la nomenclature). Le même exercice est effectué pour les adduits de sodium ainsi que pour le  $D_6$ .

Dans le cadre de cette recherche, les produits de déacétylations de l'hexasaccharide de chitosane sont étudiés. Les masses moléculaires ainsi que les rapports masse sur charge (m/z) des principaux ions quasi-moléculaires observés pour les différentes espèces attendues sont répertoriés dans le tableau 4.1.

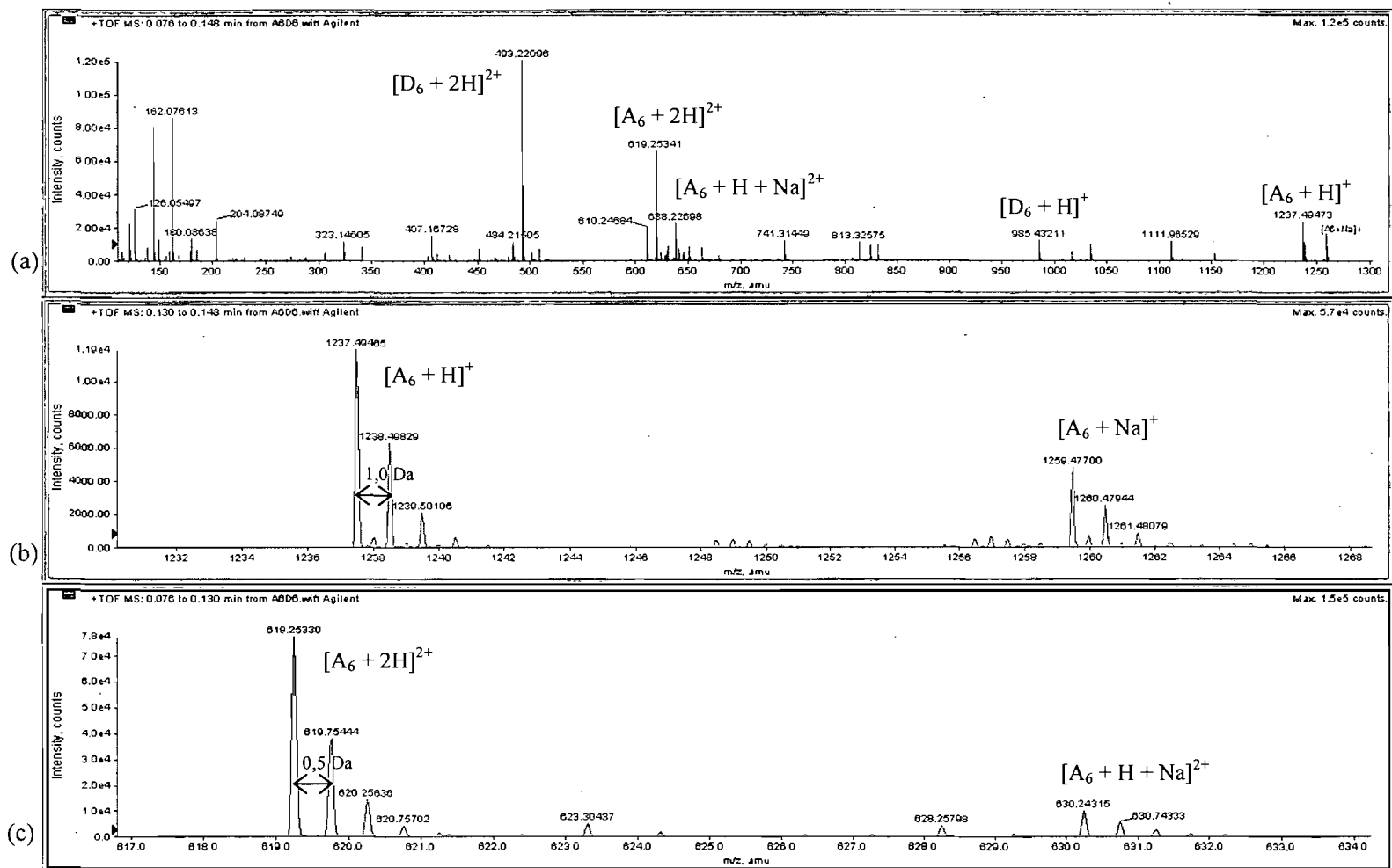


Figure 4.1 Spectre de masse par TOF de (a) l'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) et chitosane ( $D_6$ ) (b)  $[M+H]^+$  et  $[M+Na]^+$  de  $A_6$  (c)  $[M+2H]^{2+}$  et  $[M+H+Na]^{2+}$  de  $A_6$

**Tableau 4.1** Masses moléculaires et valeurs m/z des ions quasi-moléculaires des produits théoriques de déacétylation de l'hexamère de chitine

Espèce	Masse mono-isotopique (g/mol)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)	[M+2H] <sup>2+</sup> (m/z)
A <sub>6</sub>	1236,49	1237,50	1259,48	619,25
A <sub>5</sub> D <sub>1</sub>	1194,48	1195,50	1217,47	598,25
A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	1152,47	1153,48	1175,45	577,24
A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	1110,46	1111,46	1133,44	556,23
A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	1068,44	1169,46	1091,43	535,23
A <sub>1</sub> D <sub>5</sub>	1026,43	1027,46	1049,42	514,23
D <sub>6</sub>	984,42	985,44	1007,41	493,22

En tenant compte des conditions d'analyse, ce sont les ions doublement chargés qui ont la plus grande intensité. Tout comme pour les standards, les patrons isotopiques ont été analysés afin de confirmer la corrélation entre la masse observée et la molécule.

Les chitooligosaccharides ont ensuite été étudiés par électrophorèse capillaire. Il est généralement admis que les pK<sub>a</sub> sont influencés par leur environnement chimique immédiat. Dans ce cas, l'hypothèse émise stipule que la présence de structures secondaires et de ponts hydrogènes contribueront à faire varier légèrement le pK<sub>a</sub> des groupements amines selon le degré de déacétylation des COS. Puisque la séparation en CE est déterminée par le ratio q/r, les petites différences de pK<sub>a</sub> entre les chitooligosaccharides de différents DDA devraient permettre de séparer les différents produits de déacétylation et peut être même les isomères positionnels.

Dans le cadre de cette recherche, l'électrophorèse capillaire sera utilisée de concert avec deux détecteurs différents, soit la fluorescence induite par laser (LIF) et la spectrométrie de masse (MS). Tout d'abord, les molécules seront préalablement dérivées avec l'APTS afin de permettre la détection par LIF. Ensuite, les molécules à leur état natif seront analysées en utilisant la MS.

## 4.2 CE-LIF des produits dérivés de déacétylation enzymatique

Des études précédentes ont permis de développer une méthode CE utilisant la détection par fluorescence induite par laser [13]. La sensibilité du LIF a été l'un des facteurs déterminants dans le choix de la méthode de détection. Les molécules sont donc dérivées avec l'APTS, un fluorophore fréquemment utilisé pour l'étude d'oligosaccharides, tel que décrit plus tôt. En plus d'émettre de la fluorescence, cette molécule possède trois sites ionisables (groupements sulfonates) permettant de charger négativement les molécules de chitine qui autrement seraient neutres.

Deux approches ont été utilisées pour étudier les produits de déacétylation par fluorescence. La première approche consiste tout simplement à dériver les produits de déacétylation enzymatique. La deuxième procédure utilise comme substrat de départ l'oligosaccharide dérivé avec l'APTS avec lequel on effectue ensuite la réaction enzymatique de déacétylation.

### 4.2.1 Réaction de dérivation

Quelques paramètres de la réaction de dérivation ont été testés afin de minimiser les produits secondaires et optimiser le rendement de la réaction.

#### EFFET DU CATALYSEUR ACIDE

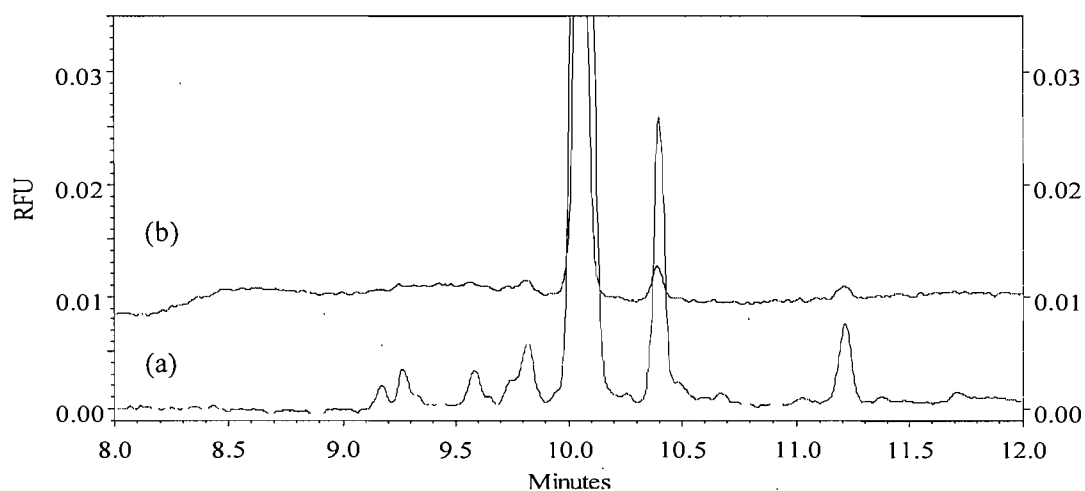
Plusieurs petits pics à proximité de celui d'intérêt sont souvent observés après la dérivation des standards de chitine et chitosane. Ces produits secondaires pourraient provenir soit d'impuretés contenues dans le standard ou de réactions secondaires lors de la réaction de dérivation. Afin de vérifier si l'utilisation de l'acide acétique provoquait une ré-acétylation du chitosane, deux acides ont été testés comme catalyseur de la réaction de dérivation (tableau 4.2). Du même coup, le rendement de la réaction entre les deux catalyseurs acides pourra être évaluée. Evangelista *et al.* [55] ont obtenu de meilleurs résultats (en comparant l'aire sous le pic) lorsque le monosaccharide N-acetylglucosamine est dérivé en milieu d'acide citrique par rapport à l'acide acétique.

**Tableau 4.2** Influence du catalyseur acide pour la réaction de dérivation de l'oligosaccharide avec l'APTS

	Aire sous le pic	% Impureté *
A <sub>6</sub> -APTS catalysé par acide acétique	136870	5,22
A <sub>6</sub> -APTS catalysé par acide citrique	21181	4,98
D <sub>6</sub> -APTS catalysé par acide acétique	107588	---
D <sub>6</sub> -APTS catalysé par acide citrique	139873	---

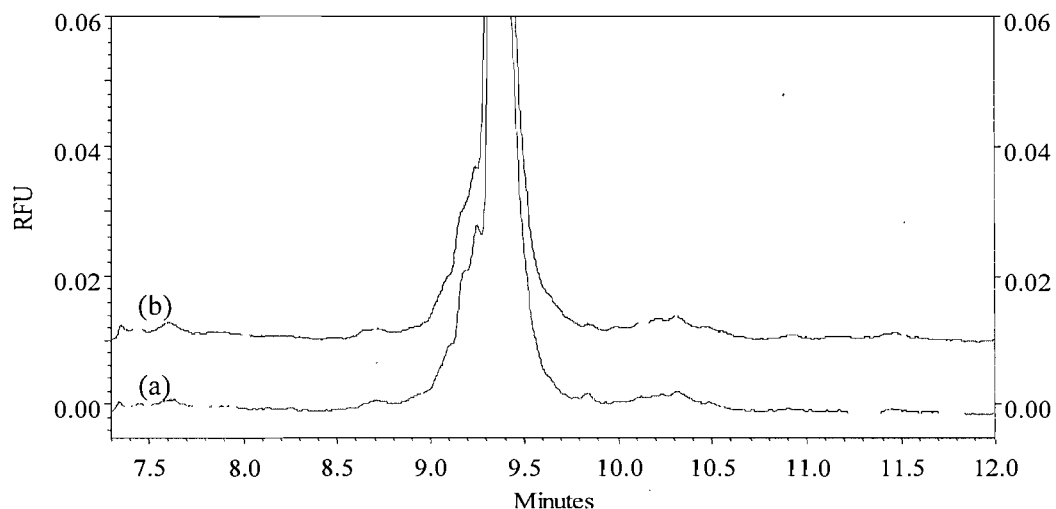
\* l'impureté est celle retrouvée dans l'électrophérogramme de l'A<sub>6</sub>-APTS à 10,4 min

Dans notre cas, l'utilisation de l'acide citrique donne un meilleur rendement de réaction pour l'hexamère de chitosane, D<sub>6</sub>, mais pas dans le cas de l'hexamère de chitine, A<sub>6</sub> (tableau 4.2). En comparant le signal à la base du pic, on remarque pour l'A<sub>6</sub> qu'il semble y avoir moins de produits secondaires avec l'acide citrique qu'avec l'acide acétique (figure 4.2). Par contre, cette observation doit être interprétée avec précaution, car il se peut qu'on voit moins de produits secondaires seulement parce que la réaction est moins efficace. En effet, l'impureté à 10,4 minutes représente dans les deux cas 5 % en impureté.



**Figure 4.2** Électrophérogramme de l'hexamère de chitine (A<sub>6</sub>) dérivé avec APTS en milieu (a) acide acétique (b) acide citrique



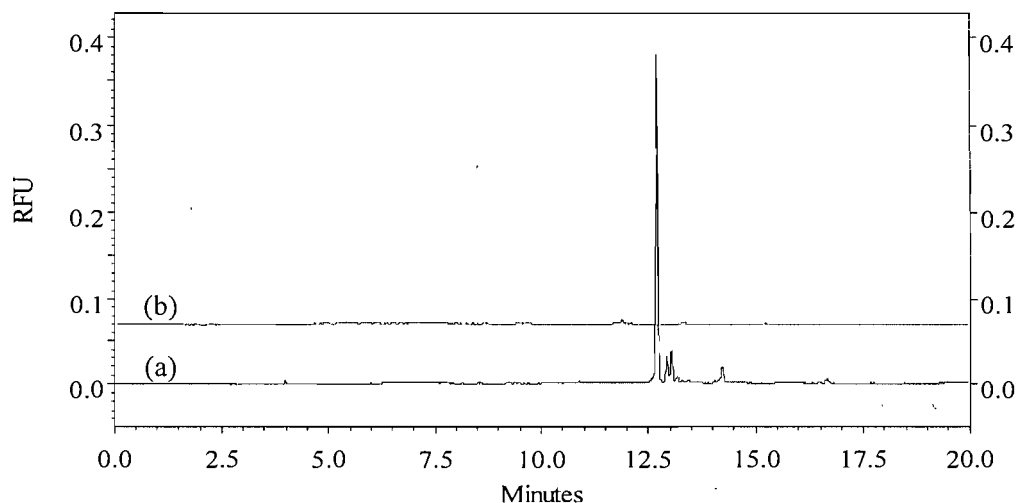


**Figure 4.3** Électrophérogramme de l'hexamère de chitosane ( $D_6$ ) dérivé avec l'APTS en milieu (a) acide acétique (b) acide citrique

En somme, l'amélioration de la dérivation pour  $D_6$  en utilisant de l'acide citrique est plutôt marginale, si l'on considère que l'aire du pic n'a augmenté que de 30 % (tableau 4.2). De plus, aucun produit de ré-acétylation n'a été observé dans l'électrophérogramme (figure 4.3) lorsque l'acide acétique a été utilisé. L'acide acétique est donc conservé dans la procédure de dérivation avec l'APTS.

#### EFFET DU SOLVANT DE L'AGENT REDUCTEUR

Puisque la solution de l'agent réducteur ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) représente la moitié du volume total de la réaction, le THF a été utilisé afin d'améliorer la volatilité du milieu réactionnel. Ce solvant est fréquemment utilisé pour effectuer la réaction de dérivation et aussi par les groupes faisant des analyses par MS des produits dérivés avec l'APTS [16, 33]. Guttman *et al.* [56] ont observé une amélioration d'un facteur de 5 lorsqu'ils utilisent le THF au lieu du DMSO comme solvant pour l'agent réducteur. Par ailleurs, tel que le démontre la figure 4.4 suivante, il semble que la réaction n'ait pas lieu lorsqu'on remplace l'eau par le THF. Il se peut que dans ce cas, la chitine ne soit tout simplement pas soluble dans le THF et cela empêche donc la réaction d'avoir lieu.

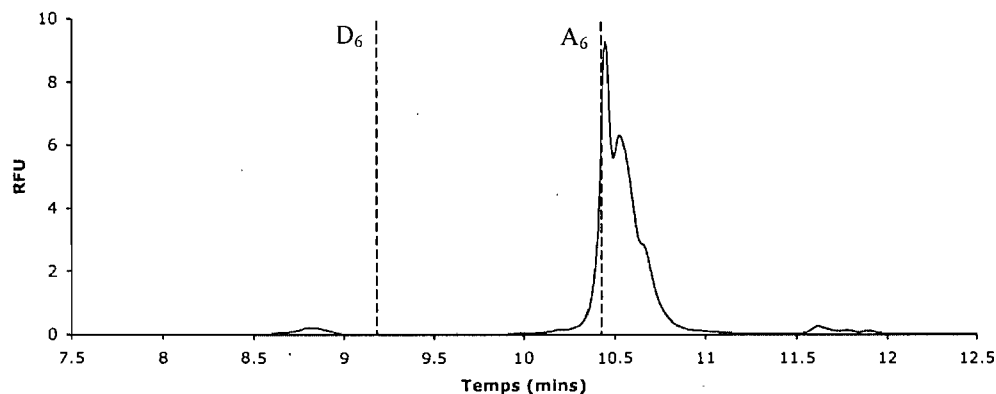


**Figure 4.4** Électrophérogrammes de la réaction de dérivation avec l'APTS de  $A_6$  en milieu (a) aqueux (b) THF

#### 4.2.2 Choix du tampon de séparation en CE-LIF

Le tampon borate est celui qui a été utilisé dans les études initiales [13] sur les oligosaccharides de chitine et chitosane. Ce tampon a été choisi non seulement pour son utilisation courante en électrophorèse capillaire, mais aussi parce qu'il permet de créer des complexes qui permettent de donner une charge aux oligosaccharides neutres.

L'électrophérogramme de la figure 4.5 montre la séparation dans le tampon borate (80 mM, pH 8,45) des produits de déacétylation du substrat dérivé avec l'APTS. Le pic obtenu est large et semble être trois pics superposés. De plus, les pics obtenus ne se situent pas dans la fenêtre de migration prévue. Les produits de déacétylation auraient dû migrer entre l'espèce complètement acétylée (l'hexamère de chitine,  $A_6$ ) et celle complètement déacétylée (l'hexamère de chitosane,  $D_6$ ), dont les temps de migrations sont indiqués par des pointillés afin de ne pas encombrer la figure. Or la multiplicité du pic tombe hors de la fenêtre de temps attendue.

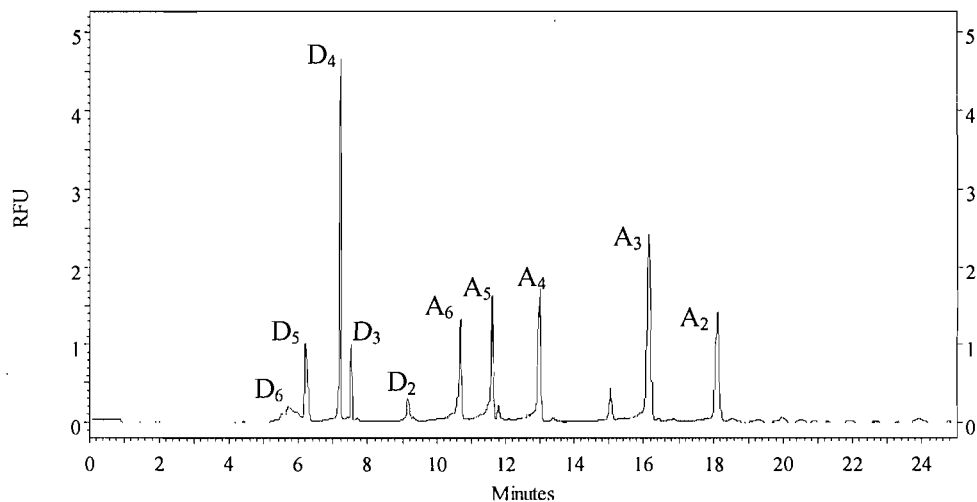


**Figure 4.5** Électrophérogramme des produits de déacétylation du substrat A<sub>6</sub>-APTS analysé avec un tampon borate 80 mM, pH 8,45; 25kV

\*La fenêtre d'élution attendue pour les produits de déacétylation est indiquée par les lignes pointillées.

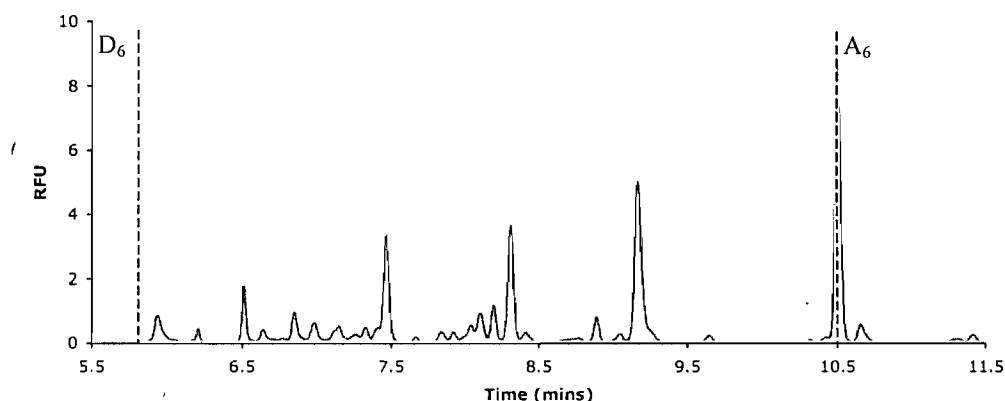
Puisque les résultats obtenus avec le tampon borate sont différents de ceux qui sont attendus et qu'une identification par spectrométrie de masse est nécessaire afin d'identifier correctement les pics observés, les analyses avec ce tampon ont été mises de côté au profit d'un tampon d'histidine. En effet, les tampons borates ne sont pas compatibles avec la MS puisqu'ils forment des dépôts de sel dans la source. Il est donc préférable d'utiliser des sels organiques, donc volatils. C'est dans cette ligne de pensée que l'histidine a été choisie comme tampon de séparation et de plus, un des groupements amines possède un  $pK_a$  de 6 permettant de préparer des tampons autour de ce pH. Par ailleurs, ce pH se situe aussi près du  $pK_a$  du chitosane.

Les paramètres de séparation de la méthode CE-LIF avec le tampon d'histidine, soit la concentration d'histidine, le pH utilisé et le voltage appliqué ont été optimisés par deux étudiants stagiaires : Cleavens Boulay et Alain César [57, 58]. Les conditions expérimentales optimales ont été établies à partir de la séparation des standards de chitine et de chitosane du dimère à l'hexamère présentée à la figure 4.6. Ces mêmes paramètres ont ensuite été appliqués à l'analyse des produits de déacétylation dérivés.



**Figure 4.6** Électrophérogramme des standards de chitine et chitosane analysé avec un tampon histidine 90 mM, pH 6,5; 25kV

Avec le tampon d'histidine (90 mM, pH 6,5), la séparation des mêmes produits de déacétylation du substrat dérivé présenté à la figure 4.5 donne plusieurs pics migrant dans la fenêtre de temps délimitée par A<sub>6</sub> et D<sub>6</sub> (figure 4.7). Tous les pics observés sont bien résolus les uns des autres. La présence de plusieurs petits pics entre les plus intenses serait attribuée aux différents isomères positionnels des produits de déacétylation alors que les plus intenses seraient l'espèce la plus abondante d'un degré de déacétylation donné. Par contre, on ne peut affirmer avec certitude que les pics observés correspondent aux produits de déacétylation puisqu'il n'existe pas de standards de ces molécules. L'utilisation de la spectrométrie de masse devient donc un outil intéressant pour l'identification de ces pics. D'ailleurs, le tampon d'histidine a entre autres été choisi pour sa compatibilité avec la spectrométrie de masse.

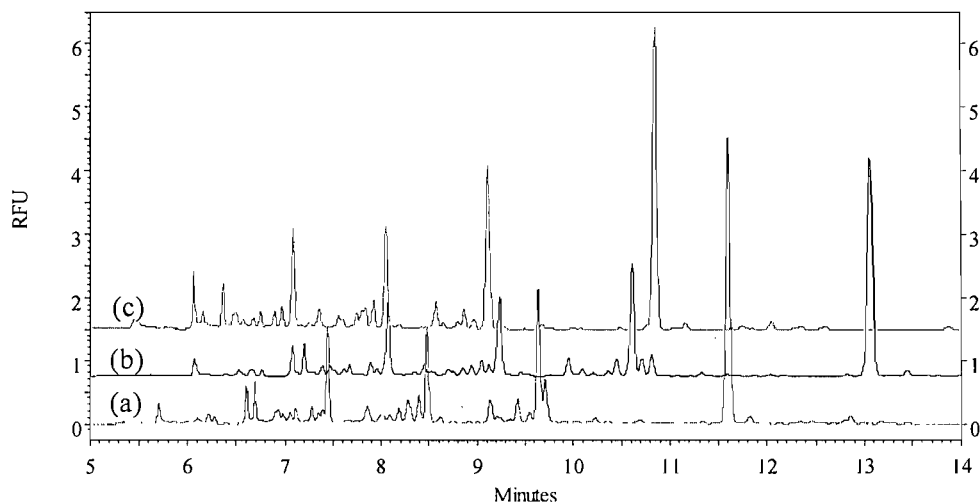


**Figure 4.7** Électrophérogrammes des produits de déacétylation du substrat A<sub>6</sub>-APTS  
tampon histidine 90 mM, pH 6,5; 25kV

\*La fenêtre d'élution attendue pour les produits de déacétylation est indiquée par les lignes pointillées.

Puisque les analyses précédant l'utilisation d'un tampon d'histidine ont toutes été faites en utilisant un tampon à haut pH, il est difficile de dire si la séparation obtenue est due seulement au pH utilisé ou à la présence d'interactions avec l'histidine. D'autres analyses utilisant différents tampons à pH 6,5 ont donc été effectuées tout en gardant l'idée d'utiliser un tampon compatible avec la spectrométrie de masse. Deux autres tampons ont donc été testés, soit la triéthanolamine et l'imidazole. La triéthanolamine est un tampon compatible avec la MS possédant un pK<sub>a</sub> de 7,8. L'imidazole pour sa part possède une structure similaire à l'histidine moins la portion peptidique. Dans l'éventualité où les COS dérivés possèdent une certaine interaction avec l'histidine, le tampon imidazole permettra d'indiquer si cette interaction provient de la chaîne latérale de l'acide aminé.

Les résultats présentés à la figure 4.8 montrent une séparation similaire avec les trois tampons utilisés. Cela signifie que le pH est le facteur dominant de la séparation. En effet, le pK<sub>a</sub> des amines pour une molécule de chitosane complètement déacétylée est estimé à 6,5. En utilisant un tampon à ce pH, la protonation des amines selon le DDA se fera dans différentes proportions selon le pK<sub>a</sub> distinct de chaque DDA.



**Figure 4.8** Électrophérogrammes des produits de déacétylation dérivés dans des tampons de 80mM à pH 6,5, 25kV (a) d’histidine (b) d’imidazole (c) de triéthanolamine

Les tampons d’acétate d’ammonium et de formate d’ammonium possèdent chacun deux  $pK_a$  soit un pour l’ion ammonium et respectivement pour les ions acétate et formate; mais c’est à leur pH acide qu’ils sont le plus souvent utilisés. Bien que Kabel *et al.* [17] ont utilisé ce tampon à pH 2,4 pour la séparation d’oligosaccharides dérivés avec APTS, ils doivent donc appliquer une polarité inverse pour faire migrer les ions négatifs. Or dans notre cas, la présence des groupements amines protonnés à ce pH empêche leur migration en polarité inverse [13].

#### 4.2.3 Comparaison des approches pour la dérivation avec l’APTS

La réaction de dérivation a été effectuée soit avant la réaction enzymatique ou après, soit en utilisant l’A<sub>6</sub>-APTS comme substrat de départ ou l’A<sub>6</sub> « natif » (non-dérivé). Une des inquiétudes par rapport à l’approche utilisant le substrat dérivé est de savoir si l’enzyme reconnaîtrait quand même la chitine malgré le fluorophore. Il semble que la réaction de déacétylation ait fonctionné puisque d’une part plusieurs pics ont été observés (figure 4.10) et d’autre part, le pourcentage de déacétylation a été évalué à 67,2 % par HPLC (tableau 4.3).

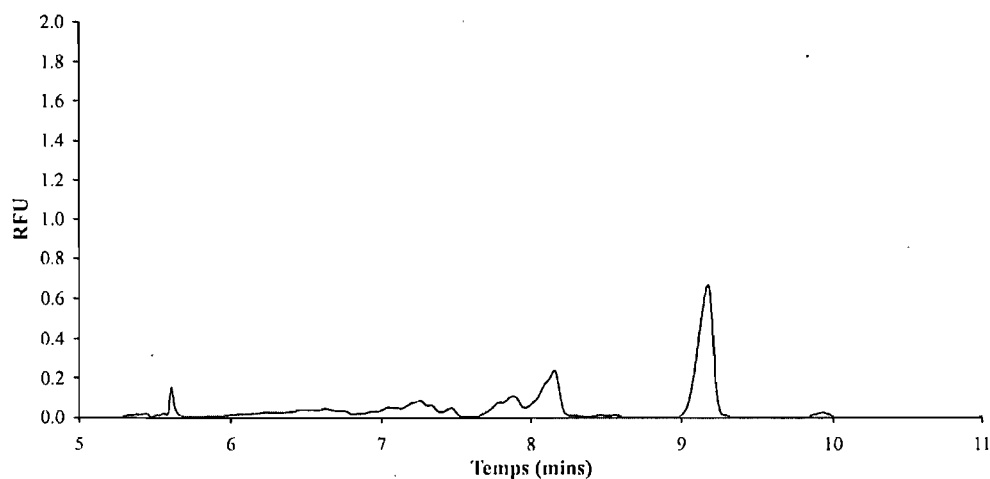
**Tableau 4.3** Rendement de la réaction enzymatique de déacétylation selon le substrat

Substrat	[ <i>Axe A</i> ] <sub>SN</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	Pourcentage de déacétylation (%) <sup>b</sup>
A <sub>6</sub>	24	24
A <sub>6</sub> -APTS	24	67

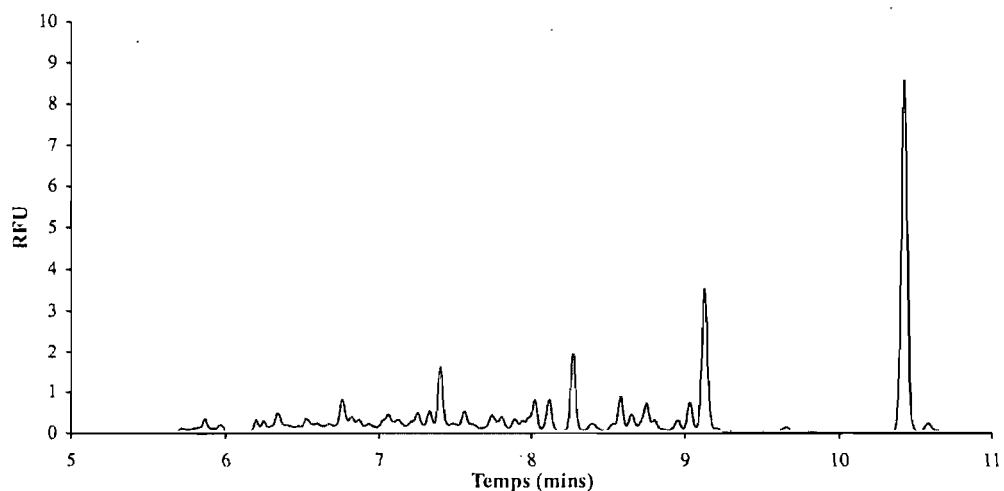
<sup>a</sup> [*Axe A*]<sub>SN</sub> : concentration d'*Axe A* dans le surnageant de culture

<sup>b</sup> Quantification par HPLC faite à l'INRS-Armand Frappier; calculé selon la concentration d'acide acétique libérée

Tel que le montre les électrophérogrammes des figures 4.9 et 4.10, lorsque les produits de déacétylation sont dérivés après la réaction enzymatique (figure 4.9), les pics obtenus sont beaucoup moins intenses et moins bien définis. Par contre, lorsque le substrat de départ est dérivé avec l'APTS et ensuite soumis à la réaction de déacétylation enzymatique l'intensité des pics est grandement accrue (figure 4.10).



**Figure 4.9** Électrophérogramme de la dérivation des produits de déacétylation du substrat A<sub>6</sub> dans le tampon 80mM Histidine pH 6.5, 25kV



**Figure 4.10** Électrophérogrammes des produits de déacétylation du substrat dérivé, A<sub>6</sub>-APTS dans le tampon 80mM Histidine pH 6.5, 25kV

L'utilisation du substrat dérivé permet non seulement d'avoir une meilleure détection et séparation des analytes, mais a aussi l'avantage de minimiser la présence de produits secondaires provenant de la réaction avec l'APTS. En effet, la réaction de dérivation est effectuée directement sur l'échantillon soumis qui contient entre autres l'enzyme et le milieu de culture cellulaire desquels plusieurs autres molécules pourraient réagir avec l'APTS. De plus, selon les expérimentations de M-E Beaudoin [13] et de Guttman *et al.* [59], la réaction de dérivation est moins efficace sur les chitosanes par rapport aux chitines. Sachant que la dérivation s'effectue préférentiellement sur ces derniers, il est possible que l'on ne puisse pas détecter les COS de plus grand DDA, c'est-à-dire les COS plus près du chitosane (complètement déacétylé), surtout s'ils se retrouvent en petite quantité dans l'échantillon. Enfin, même si la présence du fluorophore ne semble pas empêcher la réaction de déacétylation enzymatique, il est envisageable qu'elle ait une influence sur celle-ci vu le grand écart de rendement de déacétylation (tableau 4.3).

#### 4.2.4 Analyse MS des produits dérivés avec l'APTS

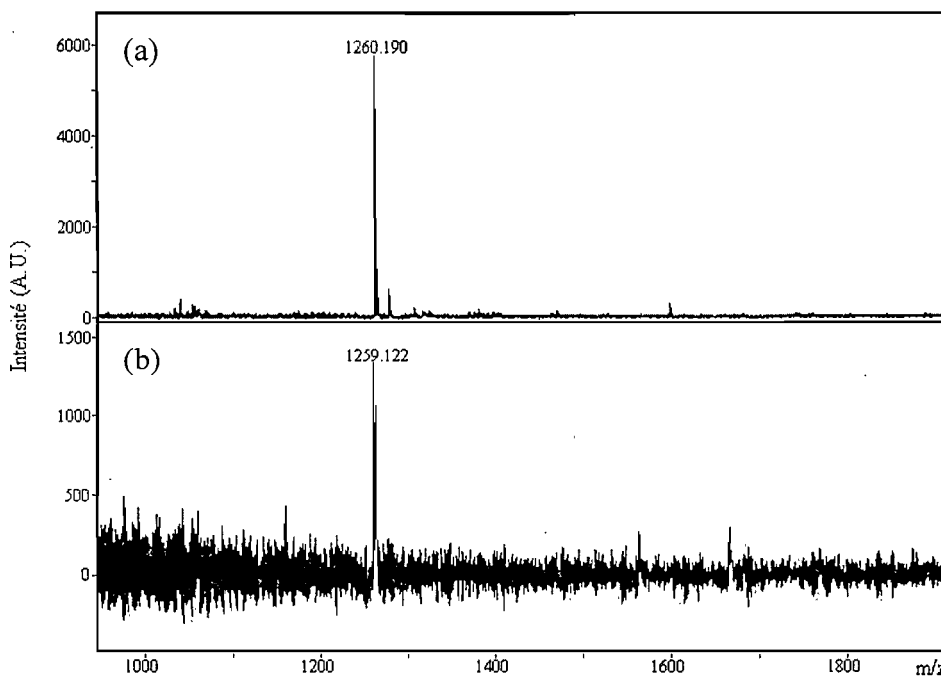
L'analyse par CE-LIF permet d'obtenir une grande résolution des différents produits de déacétylation. Par contre, sans standards, l'assignation exacte des différents pics n'est pas possible. En effet, s'il est raisonnable de penser que les différents produits de déacétylation migreront entre les espèces complètement



acétylée ( $A_6$ ) et déacétylée ( $D_6$ ), cela ne peut être affirmé hors de tout doute. L'utilisation de la spectrométrie de masse permettra donc d'identifier les différents pics observés.

L'analyse d'oligosaccharides dérivés avec l'APTS a déjà été accomplie avec succès par divers groupes de recherche. Monsarrat *et al.* [33] ont séparé par CE-MS des mannooligosaccharides dérivés dont l'ion quasimoléculaire le plus intense observé est l'espèce  $[M-2H]^{2-}$ . Pour leur part, Joucla *et al.* [16] ont aussi séparé par CE-MS une série de glucooligosaccharides dérivés. Ces derniers ont été identifiés par leur ions  $[M-3H]^{3-}$ ,  $[M-2H]^{2-}$  et/ou  $[M-H]^{-}$  selon le DP. Enfin, Suzuki *et al.* [31] ont observé l'ion par MALDI-TOF de différents oligosaccharides. Les masses attendues pour les standards  $A_6$  et  $D_6$  dérivés avec l'APTS sont présentées dans le tableau 4.4.

Des analyses MALDI-TOF ont été effectuées précédemment par M-E Beaudoin sur l'hexasaccharide de chitine dérivé avec APTS ( $A_6$ -APTS) [60]. Les analyses en mode négatif n'étaient pas concluantes, car aucun ion correspondant à  $A_6$ -APTS n'a été observé. Seule la masse du substrat a été observée ( $[M+Na]^+$ , 1259 m/z), même après purification par collection de fraction par CE (figure 4.11(b)) en mode positif. L'hypothèse émise pour expliquer cette observation était que l'ionisation provoque une hydrolyse du lien entre l'oligosaccharide et le fluorophore.



**Figure 4.11** Spectre de masse de l' $A_6$ -APTS par MALDI-TOF en mode réflectron positif (a) sans aucune purification, post-réaction et (b) après collection de fraction (matrice : sDHB préparée dans eau: acétonitrile 3:7 (v/v) et traitée avec une résine) [60]

Dans l'éventualité où le fluorophore est clivé lors de l'ionisation, l'utilisation d'une méthode d'ionisation plus « douce » tel que l'ESI permettrait de contourner ce problème. L' $A_6$ -APTS a donc été analysé directement sur le spectromètre de masse ESI-Q. Aucune des masses attendues pour l' $A_6$ -APTS (tableau 4.4) n'est retrouvée dans le spectre obtenu (figure 4.12). Par ailleurs, la masse 227,2 m/z pourrait correspondre à l'APTS et dans un tel cas, l'excès cause peut-être la suppression des ions des molécules étudiées. Afin de s'assurer que cette masse correspond bien à un ion doublement chargé, le patron isotopique est requis. La même analyse a donc été effectuée sur un analyseur TOF, puisque celui-ci permet d'avoir une résolution adéquate des isotopes. Le spectre de masse obtenu par ESI-TOF (figure 4.13) n'est pas similaire à celui obtenu par ESI-Q. Non seulement la masse 227,2 m/z n'est pas présente, mais un ion de 212 m/z est observé et ne correspond à aucune masse attendue.

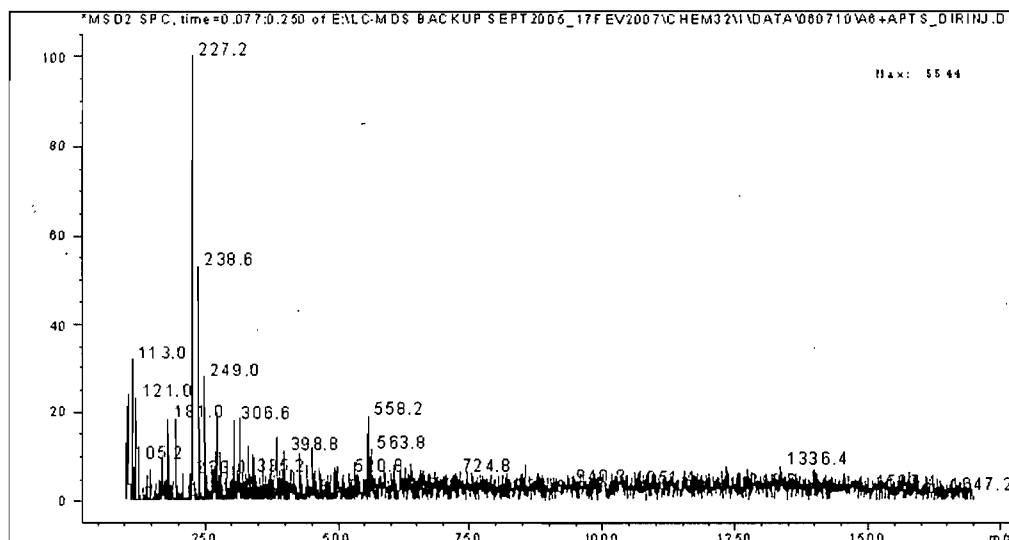


Figure 4.12 Spectre MS (ESI-Q) de A<sub>6</sub>-APTS en mode négatif

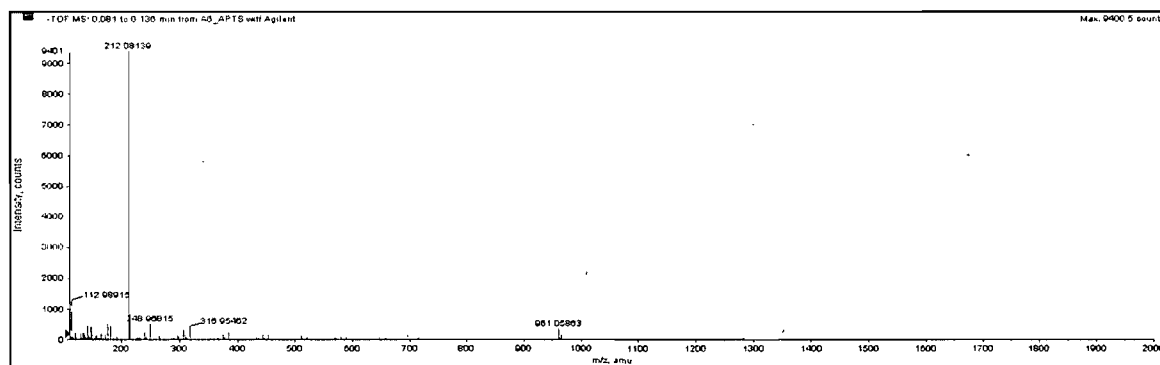


Figure 4.13 Spectre de masse (ESI-TOF) de A<sub>6</sub>-APTS en mode ion négatif

Il est aussi possible que les sels utilisés pour la réaction de dérivation ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) provoque une suppression d'ion. Une extraction sur une petite cartouche  $\text{C}_{18}$  (« zip-tip ») a été effectuée afin de retirer ces sels, mais l'analyse est restée sans succès. Suite à ces analyses, les COS dérivés n'ont donc toujours pas été observés par spectrométrie de masse.

### 4.3 CE-MS des produits natifs de déacétylation enzymatique

La détection par spectrométrie de masse permet à la fois d'avoir une bonne sensibilité et fournit des informations spectrales permettant d'identifier les analytes. En effet, les spectres de masse obtenus pour chaque pic permettront de déterminer la nature de l'analyte en termes de degrés de déacétylation et polymérisation, ce qu'il est impossible de faire par CE-LIF sans standards.

Tel que spécifié précédemment, l'ionisation des molécules dérivées avec l'APTS n'a toujours pas été observée. L'analyse des molécules non-dérivées (donc natives) a donc été choisie pour expérimenter la technique CE-MS. Les oligosaccharides à l'état natif ne peuvent être séparés selon leur DP par électrophorèse en solution libre puisque ces molécules sont polymériques et donc leur rapport  $q/m$  reste constant peu importe la longueur de la chaîne. Par contre, la séparation des différents produits de déacétylation devrait être possible, puisque leur masse et leur charge différent.

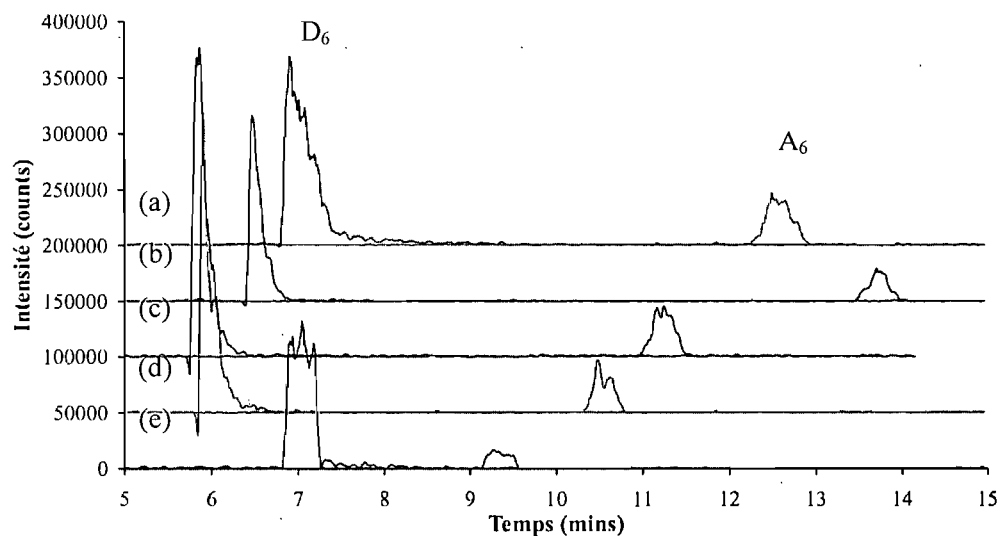
#### 4.3.1 Choix du tampon de séparation en CE-MS

L'acétate d'ammonium est l'électrolyte du tampon utilisé pour les analyses CE-MS, car c'est un sel volatil qui est aussi utilisé en LC-MS. De plus, puisque les oligosaccharides seront étudiés sous leur forme native, afin de protonner les amines des COS il est préférable utiliser un pH inférieur à 6,5. À cet effet, l'acétate d'ammonium possède un pouvoir tampon des pH 4 à 6.

#### PH DU TAMPON

Tel que stipulé par la théorie en l'électrophorèse capillaire, le flux électro-osmotique augmente avec le pH; ce qui est aussi observé dans ce cas-ci (figure 4.14). La figure 4.14 est l'électrophérogramme d'ions extraits (EIE), soit la superposition des électrophérogrammes reconstruits à partir de l'extraction des ions aux  $m/z$  correspondant aux ions  $[M + 2H]^{2+}$  de chaque DDA (voir tableau 4.1 pour les valeurs de  $m/z$ ). Nous voulons sélectionner le pH qui permet la plus grande résolution entre les standards  $A_6$  et  $D_6$ , puisque les produits de déacétylation devraient migrer entre

ces deux espèces. À tous les pH testés, l'ordre d'élution est D<sub>6</sub> puis A<sub>6</sub>; cela est facilement rationalisé sachant que les amines sont complètement ou partiellement protonnées à ces pHs. Tel qu'illustré à la figure 4.14 et les valeurs calculées du nombre de plateaux théorique du tableau 4.5, c'est à pH 3,5 que l'on obtient les meilleures performances de séparation. C'est donc à ce pH que les analyses suivantes ont été effectuées.



**Figure 4.14** EIE superposés des standards D<sub>6</sub> (493,2 m/z) et A<sub>6</sub> (619 m/z) analysés dans des tampons d'ammonium acétate 10 mM à (a) pH 3 (b) pH 3,5 (c) pH 4 (d) pH 5 (e) pH 6,7

**Tableau 4.4** Nombre de plateaux théoriques<sup>a</sup> selon le pH du tampon de séparation

pH	N <sub>D6</sub>	N <sub>A6</sub>
3,0	6050	12800
3,5	10300	41000
4,1	9670	17300
4,9	19300	21100
6,7	5460	9810

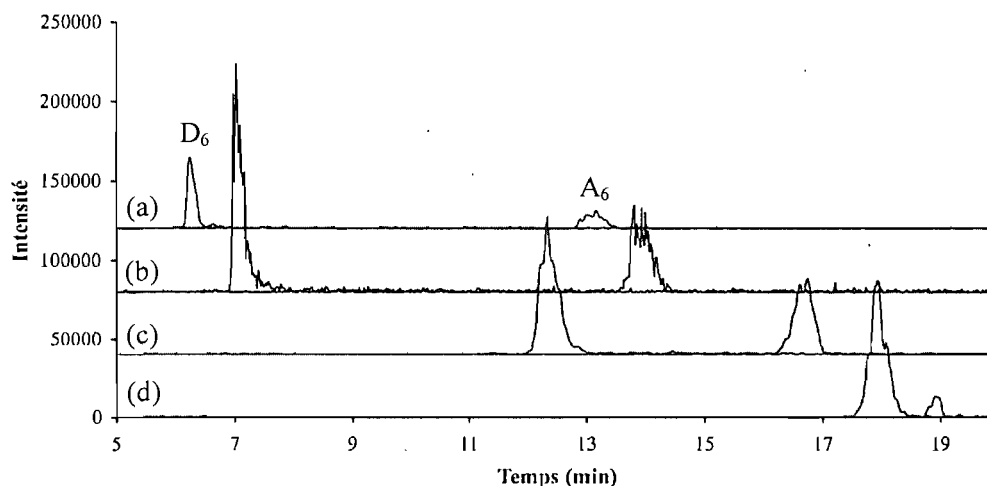
<sup>a</sup> N est calculé selon la formule suivante :  $N = 5,54 \times \left( \frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$

où  $w_{1/2}$  est déterminé à mi-hauteur à l'aide des tangentes issues de la base du pic

## CONCENTRATION DU TAMPON

Le flux électroosmotique varie de façon inversement proportionnelle à la concentration du tampon. Également, plus la concentration du tampon augmente plus l'effet Joule prend de l'ampleur se traduisant en une diminution de l'efficacité de la séparation des pics. La chaleur dégagée par le courant généré en CE est appelé l'effet Joule et influence l'élargissement des pics. Le choix de la concentration du tampon doit donc tenir compte de ces deux aspects. La figure 4.15 illustre la séparation des standards  $D_6$  et  $A_6$  à différentes concentrations pour une solution tampon d'acétate d'ammonium à pH 3,5. Aux concentrations supérieures à 10 mM, beaucoup de résolution est perdue. On constate que l'influence de la force ionique est plus importante pour le  $D_6$  que pour  $A_6$ . En effet, le temps de migration de  $D_6$  triple entre les analyses dans un tampon de 5 mM à 50 mM, cela correspond donc à une diminution d'un facteur de 3 de sa vitesse de migration. Dans le cas d' $A_6$ , ce phénomène est beaucoup moins prononcé avec une différence d'un facteur de 1,5 pour les temps de migration.  $A_6$  ne peut être protonné et sa vitesse de migration est principalement influencée par le flux électrophorétique. Dans le cas de  $D_6$ , il est protonné à pH 3,5 et sa vitesse de migration est le résultat d'une combinaison de plusieurs facteurs en plus du EOF. Il est possible qu'un pairage d'ion entre les groupements amines protonnés de  $D_6$  et les ions acétates du tampon se crée, influençant ainsi le rayon hydraté de la molécule et donc sa vitesse de migration.

L'électrophérogramme de la séparation avec 10 mM d'acétate d'ammonium semble être plus bruyant qu'aux autres concentrations (figure 4.15b). Il est possible que lors de cette analyse la plume du nébuliseur (« spray ») ait été moins stable par rapport aux autres analyses. Cela peut être causé par différents facteurs dont un débit irrégulier de la pompe du liquide d'appoint. Aucune optimisation de ces paramètres n'ont été faites dû aux contraintes de disponibilité du spectromètre de masse.



**Figure 4.15** EIE superposés des standards D<sub>6</sub> (493,2 m/z) et A<sub>6</sub> (619,2 m/z); tampons acétate d'ammonium, pH 3,5 à (a) 5 mM (b) 10 mM (c) 20 mM (d) 50 mM

Les différences en terme de résolution entre les tampons à 5 ou 10 mM sont peu significatives (tableau 4.6). Par contre, l'intensité des pics à 10 mM est beaucoup plus importante qu'à 5 mM; cela n'est pas seulement dû à une erreur lors de l'injection, car chaque analyse a été répétée en triplicata, donnant toujours le même résultat. Dans ce cas, il est possible que la concentration de la solution tampon influence le rendement d'ionisation des molécules, menant à une intensité moindre par rapport aux autres concentrations. Une concentration de 10 mM a donc été choisie pour la suite des analyses et présente le meilleur compromis entre la résolution et N.

**Tableau 4.5** Paramètres de comparaison pour le choix de la concentration

Concentration du tampon (mM)	Courant (CE) (μA)	Résolution	N <sub>D6</sub>	N <sub>A6</sub>
5	6,3	17	9560	8350
10	7,0	17	12100	9690
20	12,5	10	14400	8370
50	29,0	1,7	17000	41700

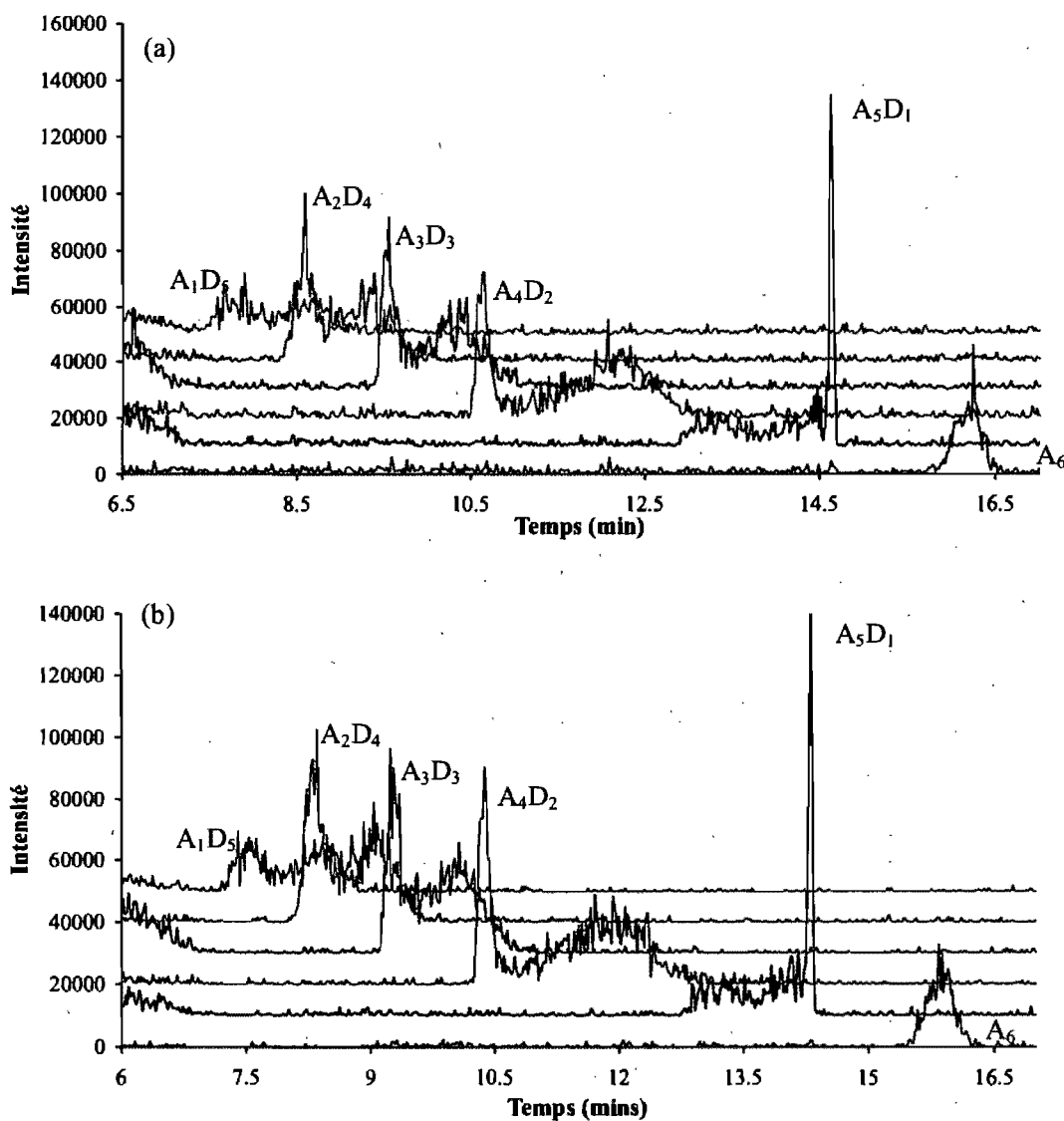
### 4.3.2 *Choix du liquide d'appoint*

Tel que stipulé précédemment, le rôle du liquide d'appoint est d'une part de compléter le circuit du CE et d'autre part de faciliter la nébulisation et l'ionisation des analytes. À priori, le liquide d'appoint n'influence donc pas la séparation, mais certains auteurs ont remarqué l'effet d'une frontière ionique mobile [61].

Dans ce cas, l'effet recherché concerne plutôt l'intensité du signal et la stabilisation de la plume de nébulisation (« spray »). Le méthanol et l'isopropanol (IPA) sont deux solvants couramment utilisés en solution avec de l'eau comme liquide d'appoint en CE-MS. Puisque le liquide lui-même est conducteur, aucun sel n'a été ajouté. Par contre, 0,2 % d'acide acétique a été ajouté afin d'aider l'ionisation des analytes (figure 4.16).

En examinant les électrophérogrammes présentés à la figure 4.16, l'intensité des pics n'est que marginalement différente. De plus, il semble y avoir autant de bruit de fond dans chacun des électrophérogrammes. Malheureusement, le courant du capillaire du MS ne peut pas être enregistré lors des analyses, mais celui-ci était aussi instable avec l'utilisation de l'un ou l'autre des liquides d'appoint. Par contre, l'instabilité du courant du capillaire MS ne provient pas nécessairement du liquide d'appoint utilisé mais aussi de la position physique du capillaire de séparation CE par rapport à l'aiguille du nébuliseur (schéma de figure 2.7). L'allure des électrophérogrammes sera discutée dans la section suivante.





**Figure 4.16** EIE superposés des produits de déacétylation, analysé dans un tampon d'ammonium acétate 10 mM pH 3,5 et avec un liquide d'appoint ayant 0,2% acide acétique dans (a) MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), (b) IPA/H<sub>2</sub>O (3:1)

#### 4.3.3 Ordre de migration et séparation

L'ordre d'élution observé pour les oligosaccharides non-dérivés est tel que prévue par la théorie, soit du DDA le plus élevé au plus bas. Dans ce cas, plus il y a de groupements amines, plus le COS sera chargé positivement donc son temps de migration en tenant compte de l'application d'un voltage positif sera court. De plus, les produits de déacétylation possédant le plus de résidus GlcN possèdent aussi les masses moléculaires les plus petites entraînant ainsi un ratio  $q/m$  plus grand.

Par contre, hormis le substrat de départ, A<sub>6</sub>, les produits de déacétylation ne sont pas totalement séparés à la base (figure 4.16). En effet, pour chacune des espèces un pic plus effilé suivi d'une partie plus évasée est observé. Encore une fois, la partie où l'analyte semble migrer de façon diffuse serait due à la présence des isomères positionnels, admettant que l'enzyme n'est pas spécifique lors de la réaction de déacétylation. Le pic de plus grande intensité observé dans ce cas-ci rappelle le pic de plus grande intensité observé à intervalle plus ou moins régulier lors de la séparation CE-LIF des produits de déacétylation dérivés avec APTS (figure 4.7).

En somme, l'utilisation du substrat A<sub>6</sub>-APTS permet d'obtenir les meilleures séparations en utilisant un tampon d'histidine. Les multiples pics ainsi observés supposent donc que l'enzyme *Axe A* ne fait aucune discrimination entre le substrat natif et dérivé. Pour leur part, les analyses CE-MS confirment la présence des différents DDA produits par l'enzyme. Bien que la méthode CE-MS présente des résultats préliminaires intéressants, cette technique a été mise de côté au profit de la LC-MS. Tel que mentionné précédemment, les résultats obtenus présentent beaucoup de bruit dû au couplage du spectromètre de masse à l'électrophorèse capillaire. De plus, puisque les dérivés APTS des COS n'ont pas été vu par MS, dérivés avec lesquels la meilleure séparation est obtenue. Le développement de méthode ainsi que l'étude des produits de déacétylation de la chitine ont donc été poursuivis par LC-MS.

La chromatographie liquide possède un large domaine d'application. Dans le cadre de cette recherche, la chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC) sera utilisée afin de séparer les différents COS. Ce qui distingue les différents degrés de déacétylation est leur nombre respectif d'unités de GlcNAc et GlcN sur la molécule. Les différences de rétention sur les différentes phases stationnaires se feront donc au niveau de ces fonctionnalités. Vu le caractère hydrophile des analytes, les techniques plus courantes de chromatographie en phase inverse ne peuvent être appliquées à moins de dériver les molécules. Dans ce cas, la dérivation des COS n'est pas essentielle puisque d'une part, il est possible d'obtenir une séparation des analytes par

HILIC et d'autre part, les COS natifs s'ionisent facilement par ESI. Par contre, la dérivation est désirée pour le séquençage des COS puisque qu'elle en facilite l'interprétation en étiquetant l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.

Dans un premier temps, la LC sera couplée à la MS, permettant ainsi d'identifier les différentes espèces déacétylées. Ensuite, la spectrométrie de masse en tandem sera utilisée afin d'identifier les isomères des différents DDA.

#### **4.4 LC-MS des produits de déacétylation enzymatique**

##### *4.4.1 Développement de méthode LC-MS*

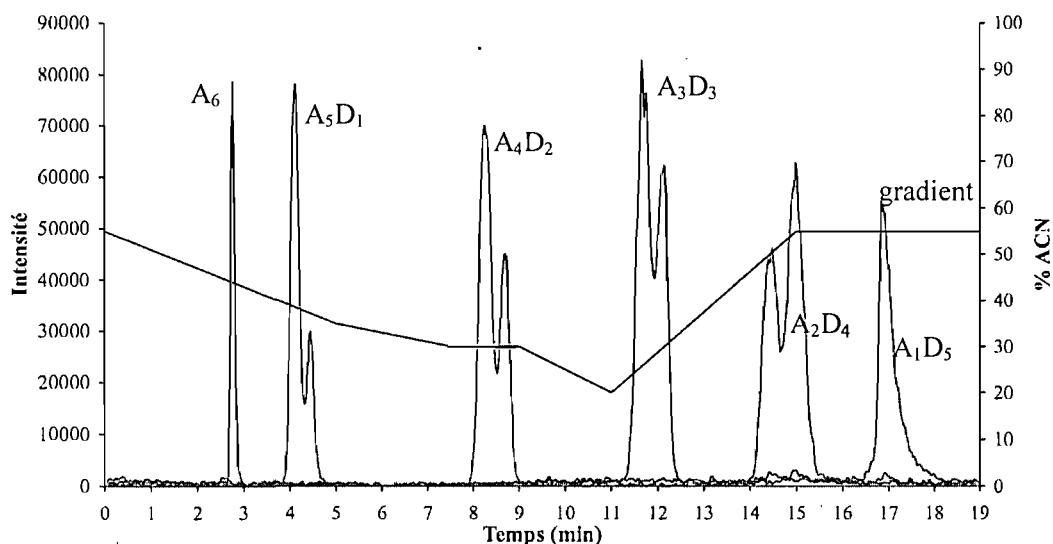
Deux colonnes de phase stationnaire différente ont été testées, soit l'une ayant une phase stationnaire greffées de groupements cyano et l'autre d'amino. Ces deux colonnes peuvent être utilisées dans les modes d'élution de phase inverse, normale et HILIC. Le mode HILIC est le mode d'élution retenu puisqu'il est le seul à permettre une rétention et une séparation des analytes de COS. Tant pour la colonne amine que la colonne cyano, c'est la fine couche d'eau à la surface de la phase stationnaire qui permet la rétention des analytes [43]. L'ordre d'élution des analytes sera plutôt déterminé par la nature des interactions entre l'analyte et les fonctionnalités de la phase stationnaire.

Tous les chromatogrammes présentés, sauf indication contraire sont des chromatogrammes d'ion extraits (EIC), soit la superposition des chromatogrammes reconstruits à partir de l'extraction des masses aux  $m/z$  correspondant aux ions  $[M + 2H]^{2+}$  de chaque DDA (voir tableau 4.1 pour les valeurs de  $m/z$ ).

#### SÉPARATION AVEC LA COLONNE CYANO

L'ordre d'élution observé avec la colonne cyano montre une rétention croissante avec le DDA, c'est-à-dire avec le nombre d'unités GlcN (figure 4.17). Le gradient HILIC utilise le caractère hydrophile des molécules pour augmenter leur rétention. L'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) étant la molécule la plus hydrophobe, il semble logique selon ce raisonnement qu' $A_6$  élue le premier. Ensuite, comme la

chimie du chitosane le prédit, plus l'oligosaccharide est déacétylé, plus il est hydrophile et donc retenu. Le D<sub>6</sub> n'est pas représenté sur ce chromatogramme puisqu'il ne semble pas avoir été produit par l'enzyme, mais celui-ci serait détecté après A<sub>1</sub>D<sub>5</sub> s'il était présent. De plus, plusieurs pics obtenus semblent dédoublés. Puisque la présence de ces pics n'est pas due à une surcharge de la colonne, la multiplicité des pics serait donc expliquée par la présence des isomères positionnels pour un DDA donné. En effet, ces derniers possèdent le même nombre de résidus GlcN, mais à des positions différentes le long de la chaîne de l'oligosaccharide. Il en résulte donc des caractéristiques moléculaires similaires, mais pas identiques. La rétention des différents isomères serait donc influencée non seulement par le nombre de groupements amines, mais aussi par leur position sur la chaîne du sucre.

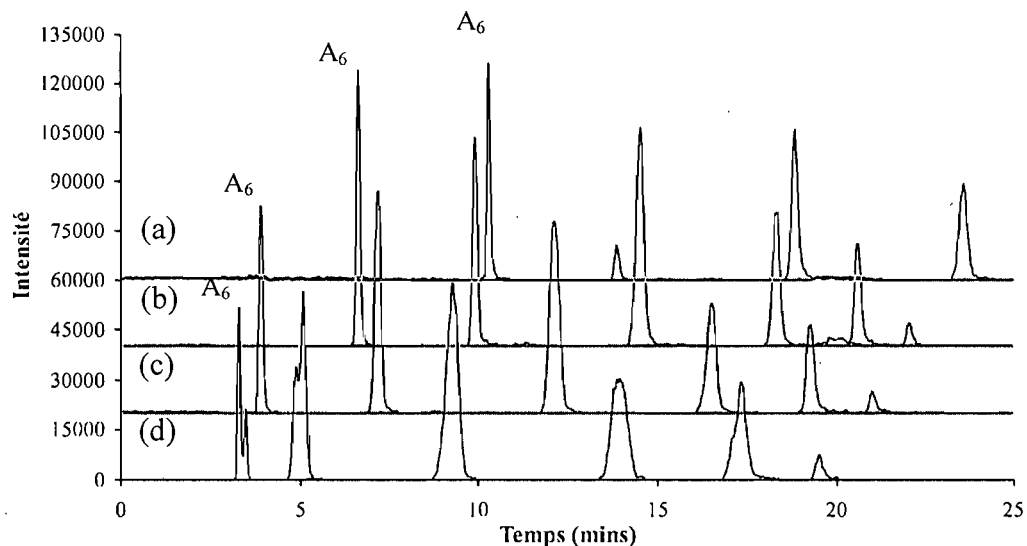


**Figure 4.17** EIC des produits de déacétylation de l'enzyme sauvage *Axe A*  
(gradient HILIC, colonne cyano)

Pour tous les pics dédoublés des différents produits de déacétylation, on observe un pic plus intense que l'autre. Il est raisonnable de penser qu'il existerait donc un type d'isomère par DDA présent de façon plus importante que d'autre; il y aurait donc possibilité de sélectivité chez l'enzyme.

Différents gradients ont été testés afin de déterminer la meilleure séparation. La figure 4.18 rassemble les différents chromatogrammes correspondant aux

différents gradients testés. Leur nomenclature (x-y %) indique respectivement le pourcentage de départ et de fin en acétonitrile. Le gradient diminue en pourcentage d'ACN de x à y en 18 minutes, atteint un plateau de 4 minutes à y % puis retourne aux conditions initiales en 1 minutes pour une durée de 2 minutes. Si l'on s'attarde uniquement à l'élution des différents produits de déacétylation selon le gradient d'élution, on remarque d'une part que les temps de rétention augmentent plus le pourcentage en acétonitrile de départ est élevé. Le temps de rétention diminue rapidement lorsque le pourcentage d'ACN est diminué de 90 à 80 à 70. Le temps de rétention de  $A_6$  ne change pas beaucoup entre 70 et 60 % ACN; en effet, son temps de rétention est près du temps mort lorsque le gradient commence à 60 % ACN et donc il n'y a que très peu de rétention de l'oligosaccharide complètement acétylé sur la colonne.



**Figure 4.18.** EICs des produits de déacétylation selon les différents gradients

(a) 90-30% (b) 80-10% (c) 70-10% (d) 60-10% sur 18 minutes

Bien que la résolution entre les pics diminue avec la diminution de la plage du gradient, la résolution est tout de même acceptable pour le gradient 60-10 %. Le tableau 4.7 présente les résolutions pour le premier couple de pic et le dernier, soit les deux paires de pics consécutifs les plus proches. La résolution diminue de plus de la moitié entre les gradients 90-30 et 60-10 % pour le couple  $A_6$ - $A_5D_1$ . Par contre, la

résolution entre les pics est tout de même acceptable ( $R > 1,5$ ). Dans le cas de la paire  $A_2D_4$  et  $A_1D_5$ , la résolution ne change pas beaucoup avec les différents gradients. Un gradient plus lent serait requis pour séparer plus efficacement ces pics. Il est aussi possible que leur caractère hydrophile ne soit pas assez différent pour les séparer davantage l'un de l'autre. Par ailleurs, ces deux pics sont tout de même séparés à la base, ce qui est important pour une éventuelle quantification.

**Tableau 4.6** Comparaison de la résolution selon le gradient

<b>Gradient</b>	<b>Résolution entre <math>A_6</math> et <math>A_5D_1</math></b>	<b>Résolution entre <math>A_2D_4</math> et <math>A_1D_5</math></b>
90-30 %	14,5	N/D
80-10 %	13,8	4,31
70-10 %	11,0	4,49
60-10 %	6,03	4,66

L'allure quelque peu différente pour l'analyse des produits de déacétylation avec le gradient de 60-10% (figure 4.18 (d)) particulièrement pour  $A_6$  est probablement due à l'âge de l'échantillon et les analyses effectuées sur une période de quelques semaines.

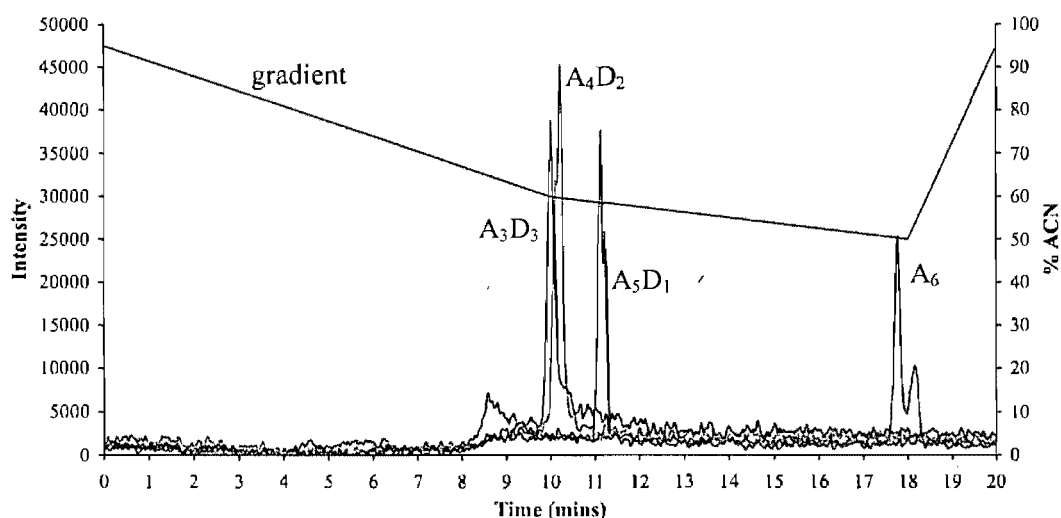
Le choix du gradient réside non seulement de la résolution entre les pics, mais aussi du temps total d'analyse. Un gradient modifié de 60-10 % (voir la section 3.3.6) est donc utilisé pour les analyses LC-MS/MS.

#### SÉPARATION AVEC LA COLONNE AMINE

Les résultats préliminaires sur la colonne amine montrent un ordre d'élution inverse de celui obtenu avec la colonne cyano. C'est-à-dire que l'espèce avec le plus de groupement acétyle est la plus retenue sur la colonne, soit  $A_6$ . De plus, le bruit de fond est beaucoup plus élevé sur cette colonne que sur la colonne cyano. On remarque aussi que la séparation entre  $A_6$  (espèce complètement acétylée) et les produits de déacétylation (contenant 1 ou plus groupement GlcN) est très importante. Alors que les produits de déacétylation sont plus rapprochés l'un de l'autre. Cette

séparation n'est pas maximisée, car la colonne analytique contient une impureté provenant de la manufacture de la colonne qui crée une suppression d'ion au niveau de la détection par MS. Un dédoublement des pics est toujours observé pour le  $A_5D_1$  alors que la multiplicité n'est pas observée pour les autres produits de déacétylation.

Les espèces  $A_2D_4$  et  $A_1D_5$  ne sont pas montrées sur ce chromatogramme parce que l'intensité de leur pic est trop peu intense pour être significative. De plus, ces deux espèces peuvent avoir co-éluées avec l' $A_3D_3$ . Il se peut que d'une part les deux espèces soient masquées par le bruit de fond et un effet de suppression d'ion issu de la co-élution des différents COS. Considérant que le temps mort de la colonne se situe aux alentours de 3 minutes, on peut affirmer que les différents produits de déacétylation sont retenus sur la colonne mais simplement non-résolus.



**Figure 4.19** EIC des produits de déacétylation de l'enzyme sauvage *Axe A*  
(gradient HILIC sur la colonne amine)

Les pics dédoublés pour le substrat  $A_6$  est probablement dû à une séparation des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du sucre. Ce phénomène est observé par Alpert *et al.* [44] pour les sucres dont l'extrémité réductrice est un GlcNAc ou un autre résidu contenant une amide. Selon ces derniers, un GlcNAc à l'extrémité réductrice crée une bonne région de contact avec la phase stationnaire favorisant la séparation des anomères. Lorsque le pH de l'éluant est en deça de 3, la mutarotation des anomères est lente et c'est pour cela qu'il devient alors possible de les séparer. Selon les mêmes auteurs, l'addition

d'une quantité d'ammonium permettrait d'accélérer la vitesse de la mutarotation et donc d'éviter le dédoublement des pics. Par contre, nous n'avons pas encore confirmé si le même phénomène se produisait pour A<sub>6</sub>. Il est possible que les dédoublements observés avec la colonne cyano soient le résultats du même phénomène; ce sujet sera abordé dans la section 6.1.

La méthode de séparation sur cette colonne laisse place à beaucoup d'amélioration. Par contre, il est clair qu'il est possible d'obtenir une sélectivité complètement différente par chromatographie HILIC en utilisant différentes phases stationnaires.

#### MÉCANISMES DE SÉPARATION

La colonne cyano semble retenir les analytes principalement par leurs fonctions amine. En effet, l'ordre d'élution des produits de déacétylation est du plus petit au plus grand DDA, soit la molécule ayant le moins d'unités de GlcN est moins retenue que celle qui en possède plus. En termes d'hydrophilicité, cela veut dire que l'ordre d'élution est du plus hydrophobe au plus hydrophile.

La colonne amine pour sa part, semble retenir les molécules principalement par leurs fonctions N-acétyle. L'ordre d'élution des produits de déacétylation sur cette colonne est l'inverse de celle sur la colonne CN, soit du DDA le plus élevé au plus bas. Dans ce cas c'est plutôt l'espèce possédant le plus d'unités GlcNAc qui est le plus retenu. Par contre, la séparation des différents DDA n'est pas aussi régulière que la séparation observée avec la colonne CN. Il est raisonnable de croire que les interactions par ponts hydrogène entre les groupements amines de la colonne et les groupements acétyles des COS soient les principaux responsables de la rétention.

Bien que la chromatographie HILIC favorise la rétention des composés polaires et hydrophiles, le mécanisme de rétention est complexe et implique plusieurs types différents d'interactions. Si d'une part, les analytes éluent selon un ordre d'hydrophilicité sur la colonne cyano, le mécanisme de partage est prédominant sur les autres. Dans ce scénario, les molécules les plus hydrophiles passent plus de temps



dans la mince couche d'eau adsorbée à la surface de la phase stationnaire. Dans le cas de la colonne amine, l'ordre est inversé et les interactions par ponts H qui semblent dominer. En effet, le pH de l'éluant se situe autour de 4, pH auquel les amines de la phase stationnaire seront protonées. Le caractère légèrement électronégatif de l'oxygène de la fonction acétyle interagit avec les amines protonées de la phase stationnaire, permettant aux COS ayant plus de groupement GlcNAc d'être retenus plus longtemps sur la colonne. Bien que la mince couche d'eau n'est pas le caractère le plus influent sur le mécanisme de rétention, elle permet tout de même la rétention des espèces les plus hydrophiles qui autrement ne seraient pas du tout retenus.

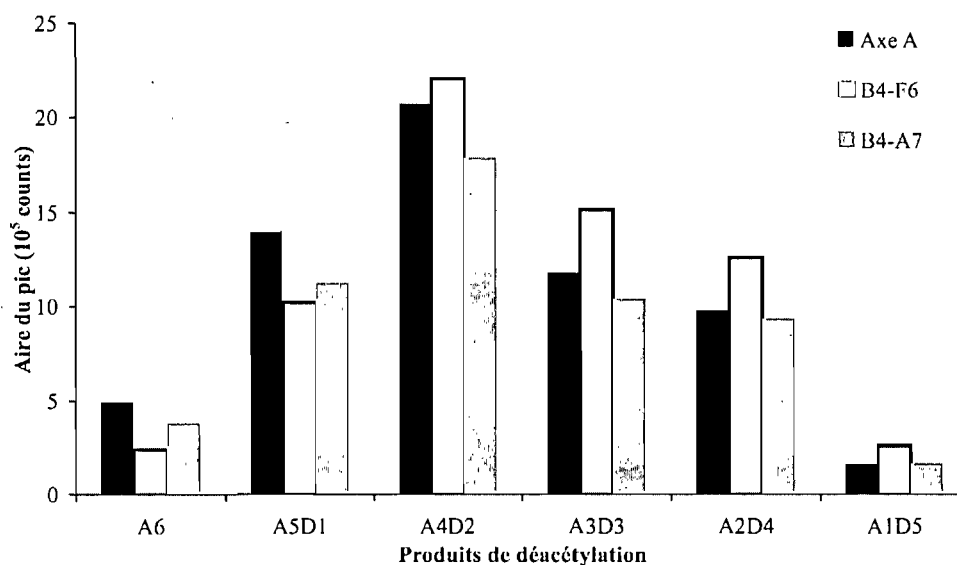
#### 4.4.2 Comparaison des variants d'enzyme

Afin de comparer l'efficacité de chaque mutant, la quantité de chaque produit de désacétylation est comparée. Pour cela, l'aire sous le pic de chaque DDA est comparée entre les différentes enzymes. Il faut par ailleurs souligner que l'on ne peut comparer les aires sous les pics d'une espèce à l'autre. En effet, tel que l'illustre la figure 4.1 (a), à concentration égale, le chitosane s'ionise plus facilement que la chitine et ainsi l'intensité obtenue pour le chitosane est plus grande que pour la chitine. L'aire des pics ne peut donc pas être comparée entre chaque espèce puisque le rendement de leur ionisation n'est pas le même. Le graphique de la figure 4.20 illustre la quantité (en valeur d'aire sous le pic) de chaque DDA selon les différents clones d'*Axe A*. En observant ce graphique, on peut affirmer que l'enzyme B4-F6 produit le plus de chitoooligosaccharide de chaque degré sauf pour A<sub>5</sub>D<sub>1</sub>. Il est donc raisonnable de conclure que cette enzyme produit la plus grande désacétylation. En effet, même en considérant la concentration en enzyme par rapport au pourcentage de désacétylation présenté dans le tableau 4.8, on constate que les enzymes mutantes permettent une plus grande désacétylation qu'*Axe A*. De plus, l'enzyme sauvage, *Axe A* est l'enzyme dont on retrouve le plus de substrat de départ et donc possède le rendement de désacétylation le plus bas.

**Tableau 4.7** Rendement de la réaction enzymatique de déacétylation selon l'enzyme

Enzyme	Conc. d'enzyme (µg/mL)	Pourcentage de déacétylation (%) <sup>a</sup>
<i>Axe A</i>	24	24
B4-F6	46	63
B4-A7	33	52

<sup>a</sup> Déterminé par HPLC-UV à l'INRS-IAF par A. Nisole



**Figure 4.20** Comparaison de la production de produits de déacétylation de l'enzyme *Axe A* et des clones B4-F6 et B4-A7

À la lumière de ces résultats, on peut donc affirmer qu'une enzyme produit plus d'un tel DDA de chitosane que l'autre. Puisque la comparaison entre les différentes espèces de DDA différents ne peut être tenu en compte, il est difficile de tirer des conclusions sur l'efficacité de chaque enzyme.

#### 4.5 Analyses MS/MS des standards

Les standards A<sub>6</sub> et D<sub>6</sub> non-dérivés et dérivés avec la phénylhydrazine ont été analysés par MS/MS afin d'étudier leur fragmentation. Cela permettra ensuite de mieux rationaliser les fragmentations des produits de déacétylation dans le but de séquencer ces derniers et identifier le nombre d'isomères produits.

#### 4.5.1 *Analyses MS/MS des oligosaccharides non-dérivés*

L'analyse par MS/MS des standards A<sub>6</sub> et D<sub>6</sub> permettra de déterminer si la fragmentation des oligosaccharides est différente selon sa composition (résidus GlcNAc versus GlcN). Si l'on observe le spectre MS/MS de A<sub>6</sub> (figure 4.21), les fragments les plus intenses sont de type B ou Z versus les fragments C ou Y (voir figure 2.8 pour la nomenclature de la fragmentation MS/MS). Chaque fragment est séparé l'un de l'autre par 203 m/z, soit la masse d'un résidu GlcNAc. Si l'on se réfère à la figure 2.8 on remarque que pour un résidu GlcNAc, une masse de 203 m/z est observée pour la perte de ce résidu à l'intérieur de la chaîne de l'oligosaccharide. Par contre, si le résidu GlcNAc se situe à l'extrémité de la chaîne, ce dernier aura une masse de 204 m/z à cause de l'hydrogène supplémentaire provenant de l'extrémité de la chaîne. Cette différence de masse est aussi observée si une unité GlcN se retrouve à l'extrémité de la chaîne. Dans le cas de D<sub>6</sub> (figure 4.22), les fragments observés sont mixtes. Dans le cas des plus petits fragments, seuls ceux de type B ou Z sont observés. Puis pour les fragments de 4 résidus et plus, tous les types de fragments sont obtenus avec une intensité plus importante pour les fragments C ou Y. Cette fois, les fragments sont séparés entre eux par une différence de 161 m/z, soit la masse d'un résidu (GlcN).

A6\_msms2 #2-5 RT: 0.02-0.08 AV: 4 NL: 2.32E6  
T: +p ESI Full ms2 1237.600@cid20.00 [50.000-1500.000]

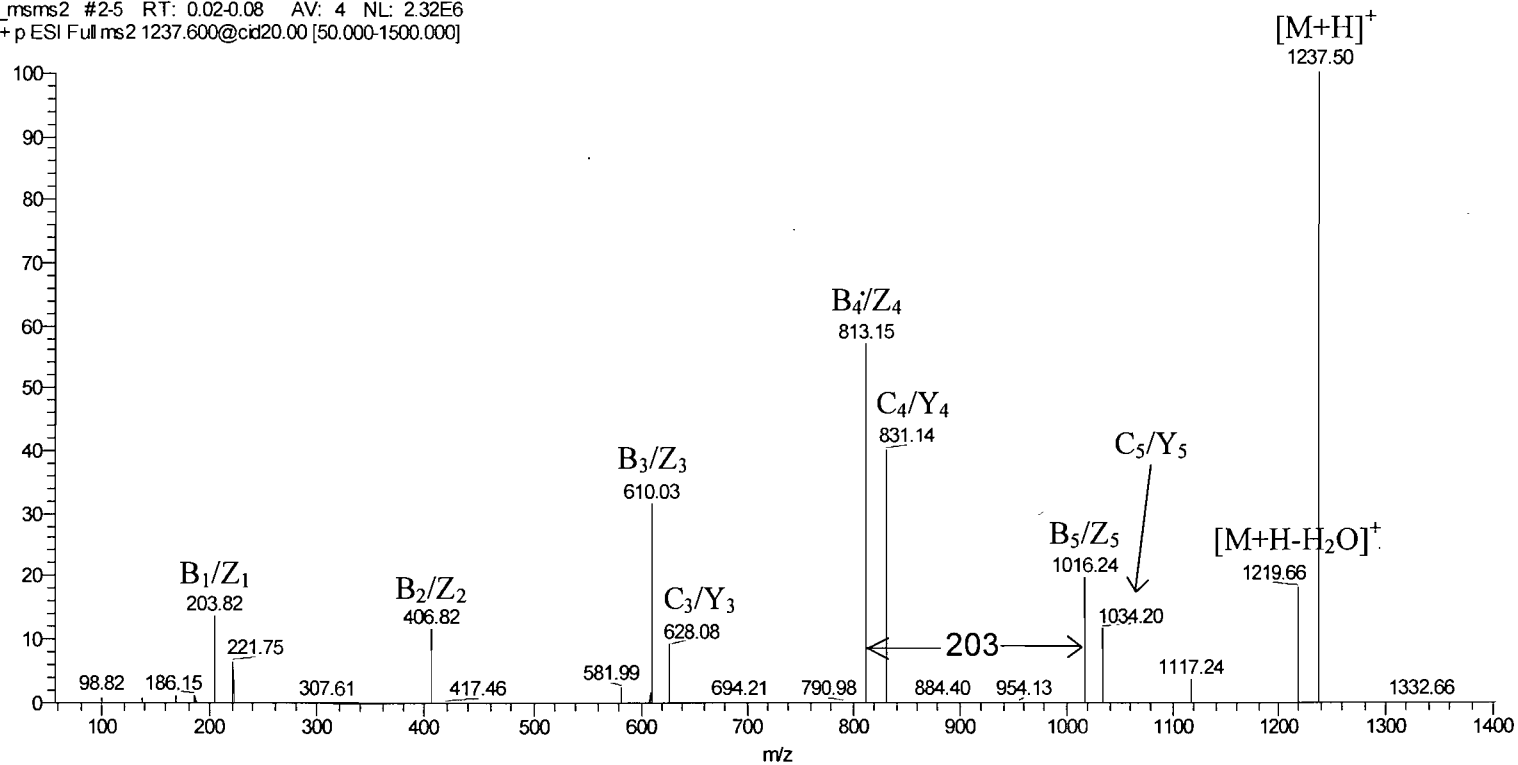


Figure 4.21 Spectre MS/MS de A<sub>6</sub>

MSMS\_D6 #4561 RT: 1.15-1.31 AV: 17 SB: 38 0.090.61.159-1 98 NL: 3.34E6  
T: +c ESIFull.ms2 493 50@40.00 [135.00-2000.00]

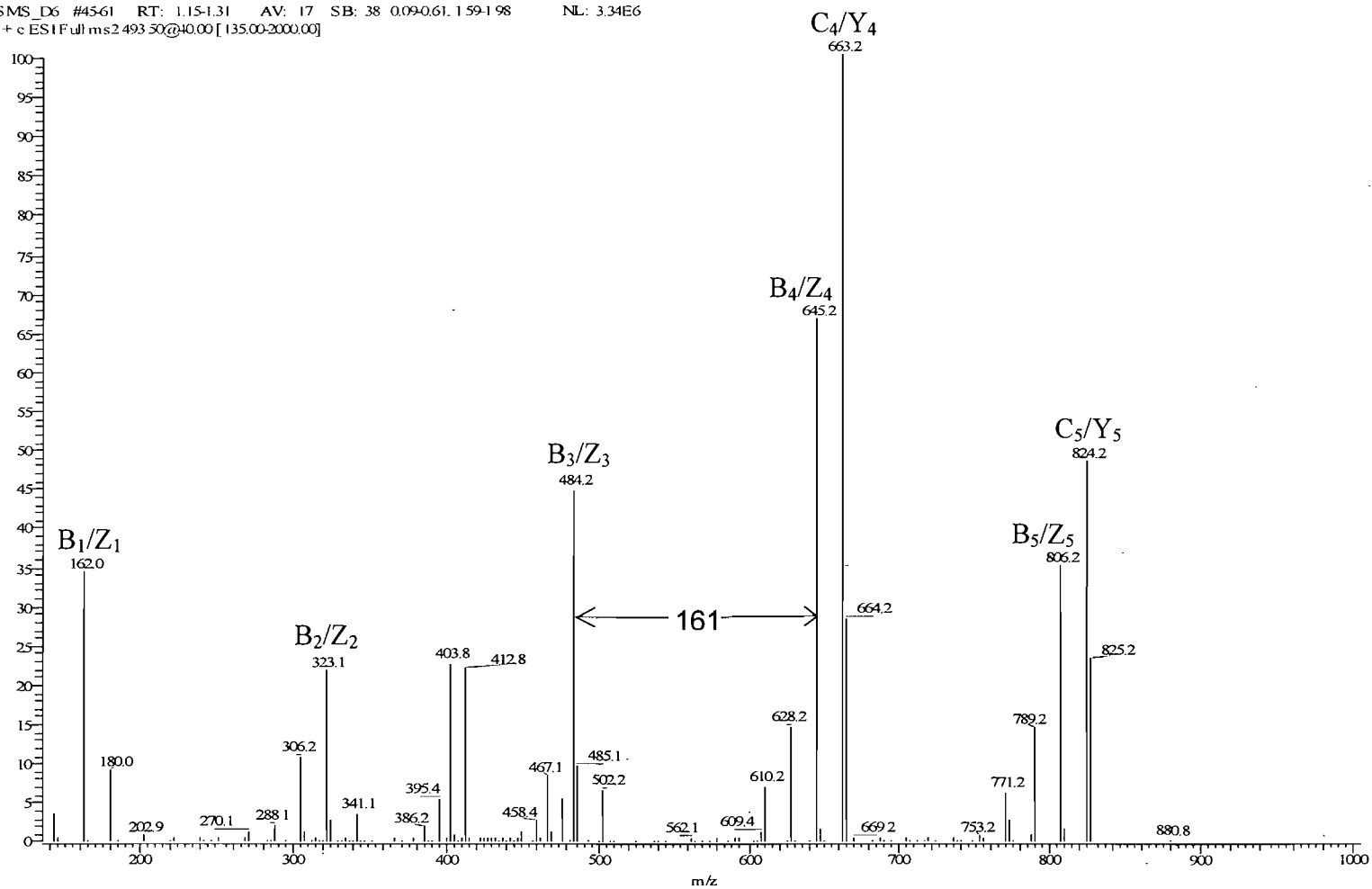
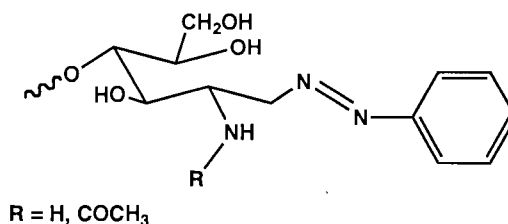


Figure 4.22 Spectre MS/MS de D<sub>6</sub>

La différence majeure dans la fragmentation de l'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) par rapport à l'hexasaccharide de chitosane ( $D_6$ ) réside dans la perte d'eau à l'extrémité réductrice. Dans le cas de  $A_6$ , cette hydrolyse est plus favorisée que dans le cas de  $D_6$ . Les fragmentations trans-cycliques ne sont pas investiguées puisqu'elles requièrent habituellement de plus grandes énergies de collision pour avoir lieu.

#### 4.5.2 Analyses MS/MS des oligosaccharides dérivés avec la PHZ

Les standards  $A_6$  et  $D_6$  sont dérivés avec la phénylhydrazine, dans ce cas, la PHZ est liée à l'oligosaccharide tel qu'illustrée à la figure 4.23. Contrairement à la dérivation avec l'APTS, il n'y a pas d'étape de réduction de l'imine et une double liaison est obtenue. Tel que mentionné précédemment, l'avantage d'étudier l'oligosaccharide dérivé est que celui-ci permet de retenir préférentiellement la charge à l'extrémité réductrice et ainsi restreindre les fragments obtenus à ceux de type Y ou Z. Par contre, l'exercice ne semble pas du tout avoir fonctionné pour l' $A_6$ -PHZ. En effet, tel que l'illustre la figure 4.24, seul le fragment  $Y_1$  est observé alors que tous les autres fragments présents seraient de type B. Dans le cas de  $D_6$ -PHZ, la fragmentation obtenue (figure 4.25) ressemble à celle de l'oligosaccharide non dérivé (figure 4.22) ; soit des fragments Z et Y pour des fragments de 4 résidus et plus et des fragments B pour les fragments ayant de 1 à 3 résidus 1 à 3. Les fragments  $Z_1$  à  $Z_3$  sont aussi présents mais de très faible intensité. Pour les deux oligosaccharides, la séparation entre les fragments doit toujours être de respectivement 203 m/z et 161 m/z pour  $A_6$ -PHZ et  $D_6$ -PHZ. Seule la valeur de chaque fragment sera différente de 90 m/z par rapport à la molécule non-dérivée.



**Figure 4.23** Extrémité réductrice de l'oligosaccharide dérivé avec la phénylhydrazine (PHZ)

A6\_PHZ\_MSMS\_b #4-6 RT: 0.06-0.10 AV: 3 NL: 1.42E5  
T: +p ESI Full ms2 1327.860@cid20.00 [50.000-1500.000]

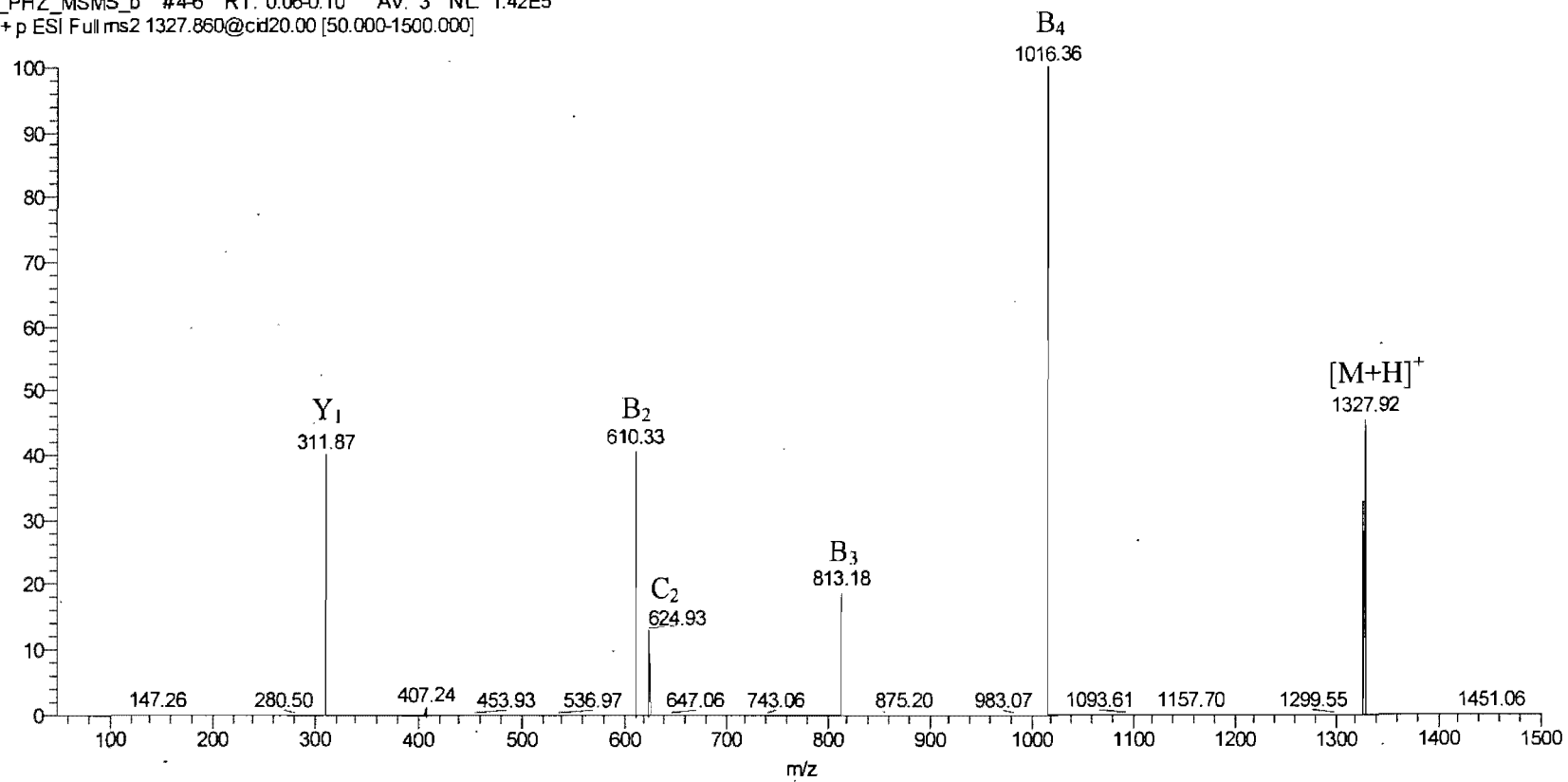


Figure 4.24 Spectre MS/MS de A<sub>6</sub>-PHZ

MSMS\_D6PHZ\_2 #4648 RT: 1.18-1.23 AV: 3 SB: 37 0.09-0.61, 1.58-1.96 NL: 7.63E4  
T: + c ES1 Full ms2 538.50@40.00 [145.00-2000.00]

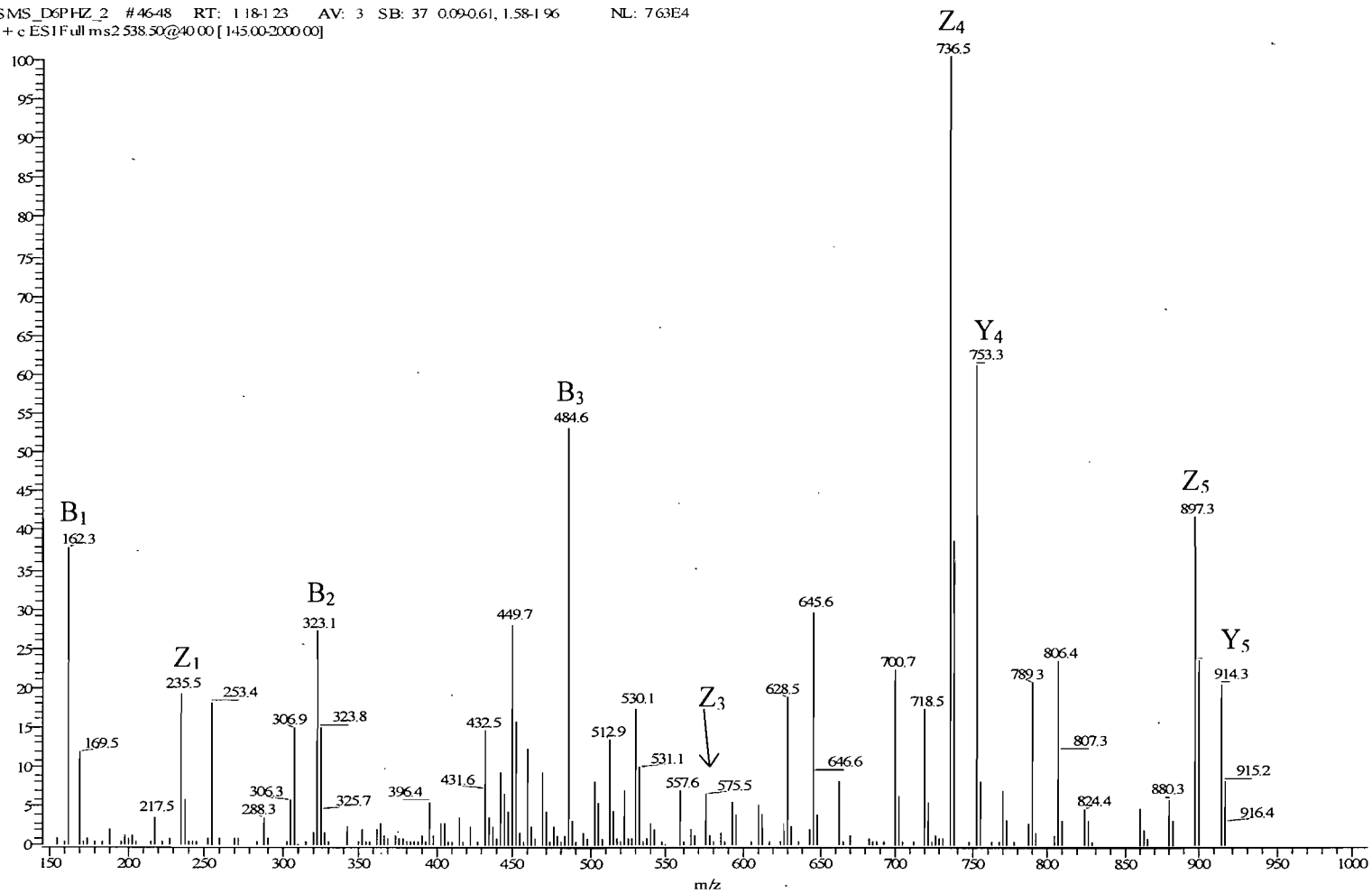


Figure 4.25 Spectre MS/MS de D<sub>6</sub>-PHZ



Dans ce cas, il est possible que la phénylhydrazine ne soit pas un ionophore assez important pour retenir la charge par rapport aux autres azotes présents sur la chaîne de sucre. Il faudrait donc un agent de dérivation qui soit ionisé de façon plus préférentielle que le sucre lui-même.

Une expérience impliquant l'utilisation du substrat d'hexamère de chitine dérivé avec la phénylhydrazine ( $A_6$ -PHZ) a tout de même été effectuée puisque la préparation et la purification de ce dérivé sont simples et rapides. Par contre, la dérivation des produits de déacétylation (donc après la réaction enzymatique de déacétylation) n'a pas été effectuée ; tel que démontré plus tôt avec les analyses par CE-LIF (figure 4.10) les rendements de dérivation sont peu satisfaisants et la présence d'enzyme et d'autres éléments de la matrice biologique peuvent donner lieu à plusieurs produits secondaires.

#### ***4.6 LC-MS/MS des produits de déacétylation enzymatique***

##### *4.6.1 Séquençage des chito-oligosaccharides*

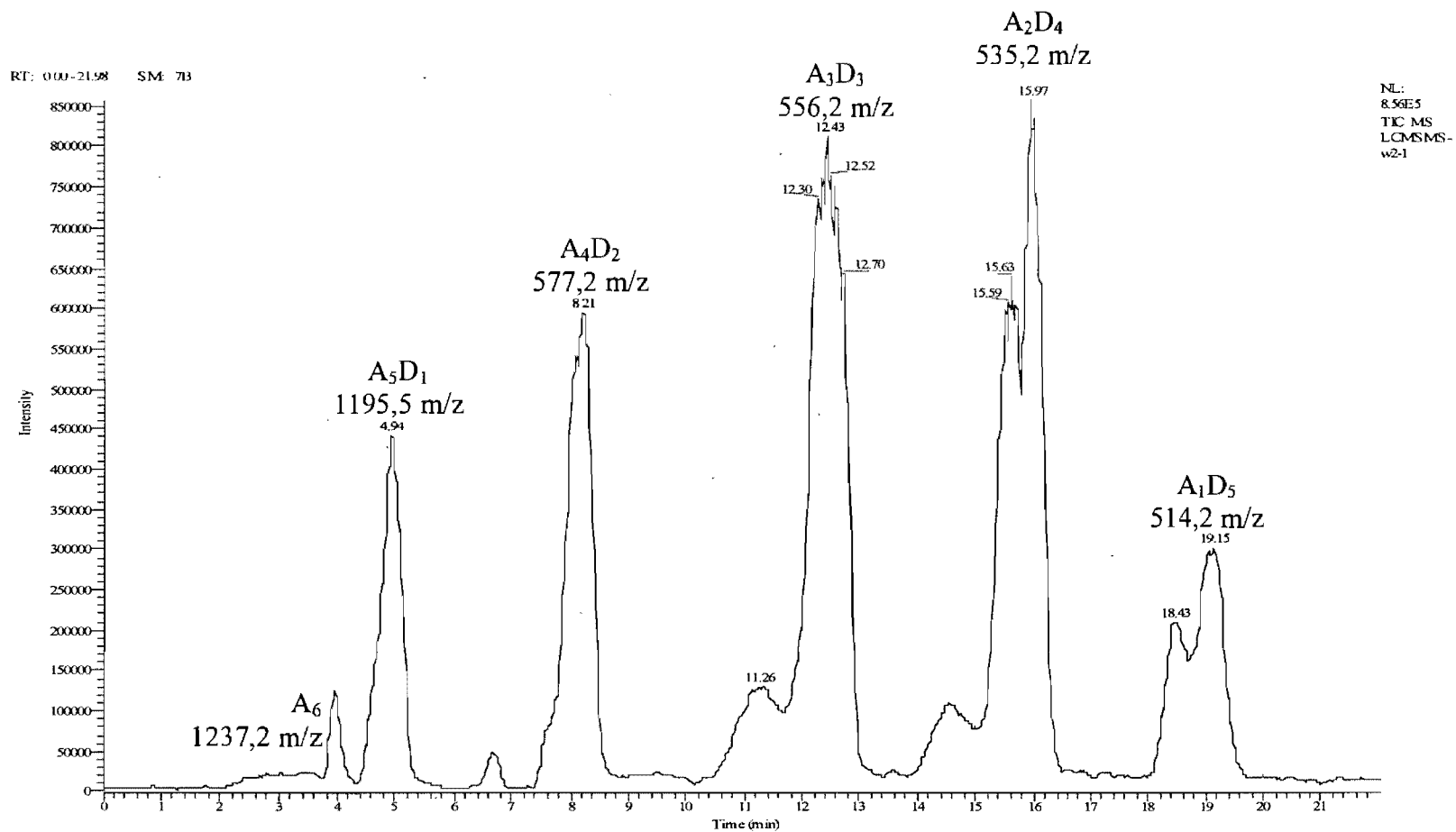
Les analyses MS/MS sont effectuées sur les COS non dérivés en utilisant la méthode développée par LC-MS avec la colonne cyano. Le passage de la méthode LC-MS à la MS/MS permet d'une part de confirmer si le dédoublement des pics observé est bel et bien dû aux isomères positionnels et d'autre part d'identifier lesdits isomères. L'avantage d'utiliser une méthode LC-MS/MS au lieu de faire simplement une analyse MS/MS est que la séparation LC permet d'isoler chaque DDA. Ainsi les analyses MS/MS de chaque DDA peut être faite dans une même analyse LC, évitant ainsi de faire plusieurs injections pour chaque espèce.

Le spectre MS/MS de chaque espèce est obtenu en utilisant l'ion quasi-moléculaire le plus intense comme ion précurseur. Dans le cas des DDA plus grand que 1, l'ion le plus intense et presque exclusivement observé est l'ion  $[M+2H]^{2+}$ . L'avantage dans ce cas est que l'analyse MS/MS est effectué sur la presque totalité de l'analyte en question. Par contre, dans le cas de  $A_6$  et  $A_5D_1$ , l'ion le plus intense est  $[M+H]^+$ , mais  $[M+2H]^{2+}$  est aussi présent et d'intensité presque égale au premier.

Dans ce cas, seulement la moitié de la quantité d'analyte présente est soumise à l'analyse MS/MS. Cela peut poser un problème de sensibilité si l'échantillon est très dilué ou si la quantification par MS/MS est requise. Puisque pour la présente recherche, l'analyse n'est que qualitative cette situation n'est pas problématique.

Ensuite, les spectres MS/MS sont analysés en observant une section du pic à la fois afin de confirmer si la multiplicité des pics est dû aux différents isomères positionnels. Puisque ces pics ne sont pas séparés à la base ( $R < 1,5$ ; figure 4.26), la même séquence peut être retrouvée dans les différents spectres MS/MS, mais en considérant l'intensité relative des différentes masses observées, on peut conclure quelle séquence s'y retrouve de façon prédominante. L'allure du chromatogramme de la figure 4.26 diffère de ceux présentés précédemment puisqu'ils ont été effectués sur deux instruments différents, soit respectivement LC-MS (IT) et LC-MS (Q).

Tel que mentionné précédemment, lorsque l'on séquence des oligosaccharides non-dérivés, l'extrémité non-réductrice ne peut être différencié de l'extrémité réductrice. Une perte d'eau à l'extrémité réductrice est fréquemment observée [49, 50] et peut être diagnostique dans l'identification de la séquence des COS. De plus, la fragmentation d'ions précurseurs protonnés,  $[M+H]^+$  donne lieu principalement à des fragments B et Y par le bris les liaisons glycosidiques [50]. Par ailleurs, cela ne confirme pas hors de tout doute que la fragmentation se produit selon une séquence de fragments B.



**Figure 4.26** Chromatogramme LC-MS/MS des produits de déacétylation de *Axe A*  
(colonne cyano Luna CN 150 x 4,6 mm, spectromètre de masse électrospray - trappe ionique (ESI-IT))

Par ailleurs, afin d'alléger la discussion, seuls les ions les plus intenses seront considérés lors du séquençage des COS. De plus, l'observation d'ions correspondant aux fragments B ou Z de la séquence inverse sera seulement considérée comme étant des fragments B. D'une part, il est raisonnable de considérer ces fragments B issus d'une perte d'eau initiale à l'extrémité réductrice. D'autre part, les fragments C/Y sont présents, mais à beaucoup plus faible intensité tel que l'illustre le spectre MS/MS de  $A_6$  (figure 4.21). Donc, ils ne seront considérés que si leur intensité est suffisamment importante et qu'ils mènent à une séquence différente de celles déjà trouvées.

Les figures 4.27 à 4.29 illustrent les différents spectres MS/MS recueillis à différents intervalles de temps pour l'oligosaccharide  $A_4D_2$ , soit le pic éluant de 7,5 à 8,5 minutes dans la figure 4.26. Rappelons-nous que l'acquisition est faite en mode positif et donc tous les ions d'intérêts observés sont des ions  $[M + H]^+$ . Seuls les ions les plus intenses sont considérés dans chaque spectre. Plusieurs fragments assez intenses se retrouvent dans plus d'un spectre puisque les isomères positionnels ne sont pas séparés par chromatographie. L'ion 466,5 m/z se retrouve dans chaque spectre et n'a pas été considéré puisqu'il est l'ion doublement chargé de l'ion 933 m/z. Ainsi les différents fragments sont identifiés sur le spectre menant à leur séquence proposée respective.

La figure 4.27 présente plus en détail le séquençage d'un oligosaccharide. L'ion précurseur choisi pour ce DDA est l'ion doublement chargé 577,2 m/z, donnant lieu à l'ion quasi-moléculaire de 1153,2 m/z ( $[M + H]^+$ ). Tous les ions utilisés pour le séquençage sont des fragments B issu d'une perte d'eau à l'extrémité réductrice. Dans ce cas, l'ion à 932 m/z provient de l'ion moléculaire,  $[M + H]^+ = 1153,2$  m/z ayant perdu une molécule d'eau ( $1153,2$  m/z - 18 = 1135 m/z) suivi d'une perte d'une unité GlcNAc (A), soit  $1135$  m/z - 203 = 932 m/z. Une fois que ce fragment  $B_5$  a été correctement identifié, des différences de soit 203 pour une unité GlcNAc (A) ou 161 pour une unité GlcN (D) sont recherchées afin de reconstruire la séquence de l'oligosaccharide. Les séquences correspondant à chaque fragment B identifié sont indiquées au-dessus de celui-ci.

LCMSMS-v2-1 #303-306 RT: 7.51-7.59 AV: 4. NL: 9 69E3  
T: + c ESI Full ms2 577.30@40.00 [ 155.00-2000.00]

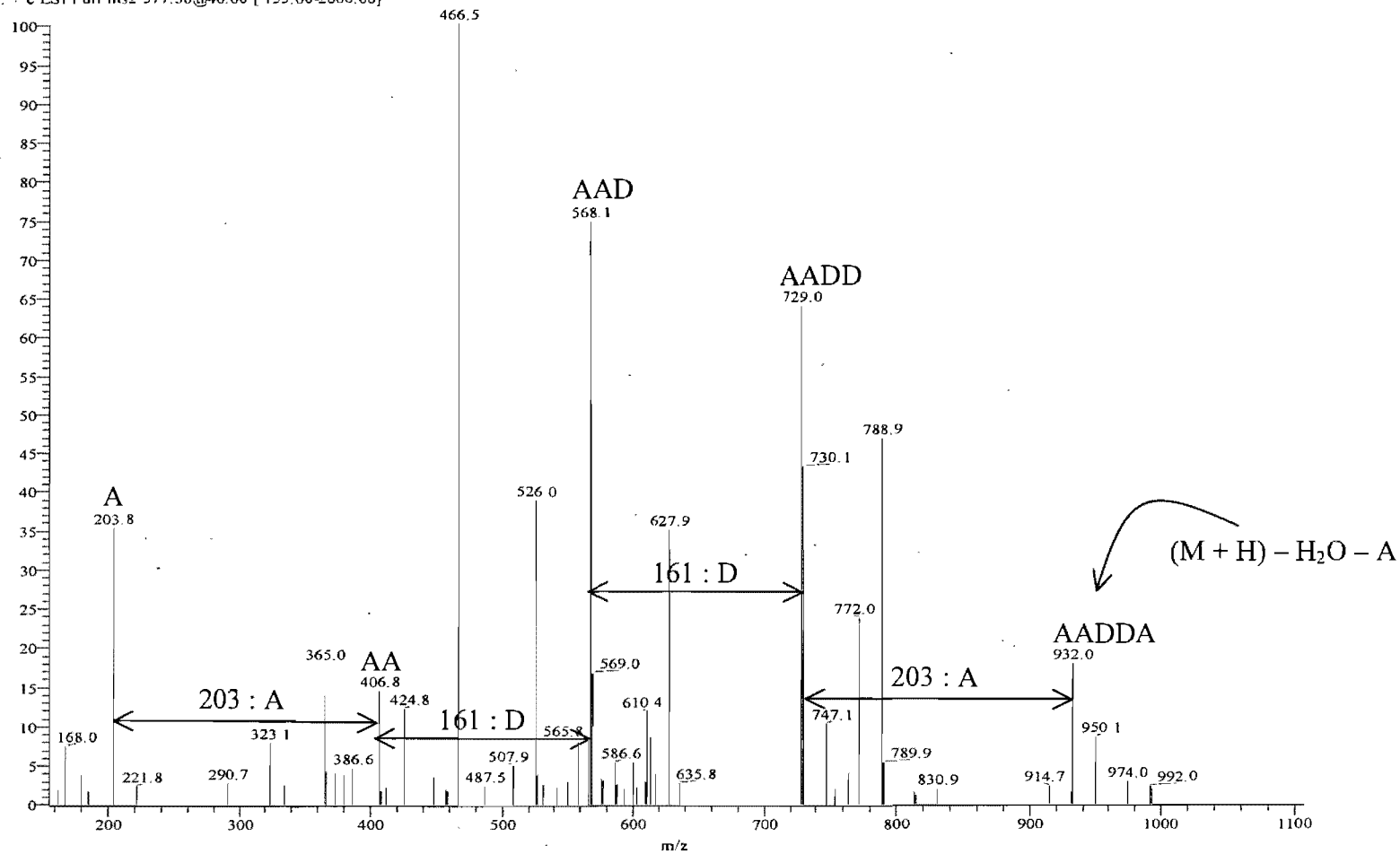
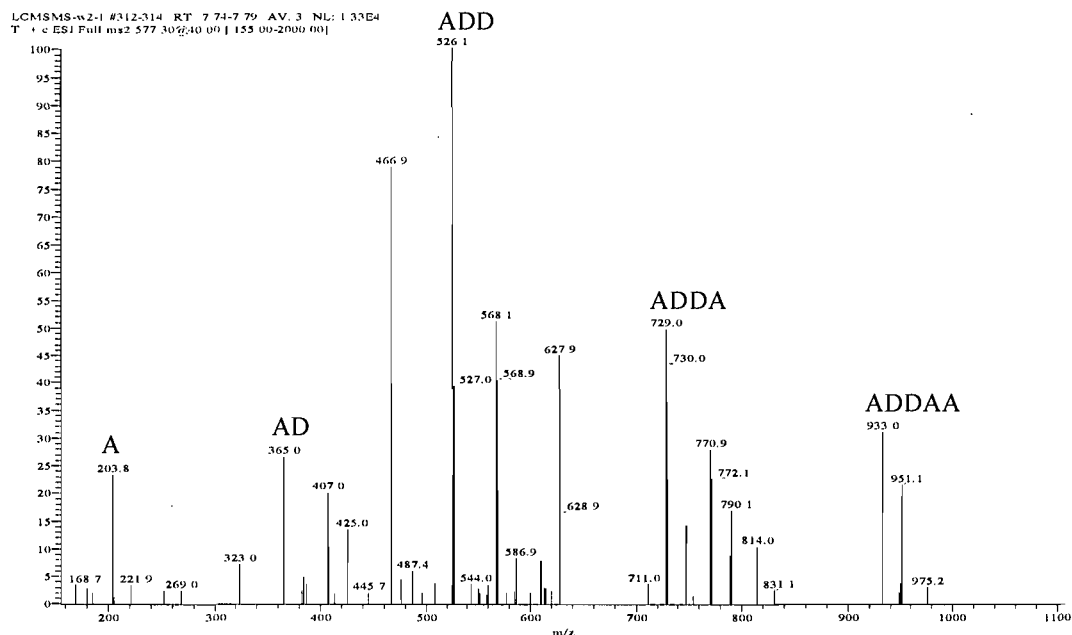
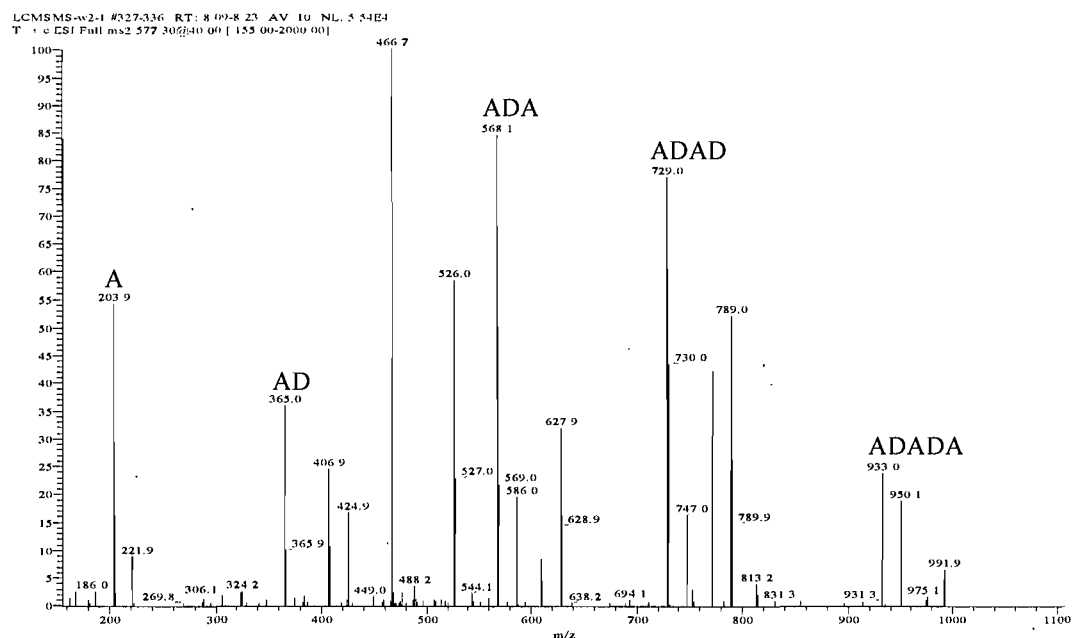


Figure 4.27 Spectre MS/MS de  $A_4D_2$  à 7,51-7,59 min. du pic, issu de l'ion précurseur 577,2 m/z



**Figure 4.28** Spectre MS/MS de  $A_4D_2$  à 7,74-7,79 min. du pic, issu de l'ion précurseur 577,2 m/z



**Figure 4.29** Spectre MS/MS de  $A_4D_2$  à 8,09-8,23 min. du pic, issu de l'ion précurseur 577,2 m/z

Avec les considérations énoncées ci-haut, différents isomères ont donc été identifiés en analysant les spectres MS/MS pour chaque pic et épaulement en suivant toujours la même procédure décrite. Les résultats obtenus pour les produits de déacétylation de l'enzyme sauvage (*Axe A*) sont rassemblés dans le tableau 4.9.

**Tableau 4.8** Séquençage des produits de déacétylation de  $A_6$  obtenus de l'enzyme *Axe A*

	<b>Temps de rétention (min)</b>	<b>Séquence(s)</b>
$A_6$	3,85-4,07	AAAAAA
$A_5D_1$	4,50-4,61	AAADAA
	4,90-4,99	AADAAA
$A_4D_2$	7,51-7,59	AADDAA
	7,74-7,79	ADDAAA
	8,09-8,21	ADADAA
$A_3D_3$	11,00-11,49	ADDDA
		ADDADA
	12,14-12,34	DDDDAAA
	12,57-12,80	DDADAA DDAADA
$A_2D_4$	14,22-14,81	DDADDA
	15,38-15,69	DDDDAA DDDADA
	15,83-16,16	ADDDDA
$A_1D_5$	18,25-18,54	DDDADD
	19,00-19,28	DDDDDA

Il est possible que selon la concentration de chaque COS, certaines séquences ne soient pas détectées. Les séquences identifiées sont donc celles qui sont retrouvées en plus grande importance dans l'échantillon. Selon les résultats obtenus, on voit que malgré la multitude d'isomères possibles, ils ne sont pas tous produits par l'enzyme. Cela est une indication que l'enzyme possède une certaine sélectivité lors du processus de déacétylation. De plus, ce n'est pas avant un DDA de 2, soit l'espèce  $A_4D_2$  que l'on obtient des COS ayant un résidu de glucosamine à une extrémité. Rappelons-nous que les séquences proposées des différents COS ont été identifiées à partir des fragments B provenant d'une perte d'eau. Or en procédant de cette manière, l'identification des séquences ayant un résidu GlcNAc est légèrement favorisé

puisque la perte d'eau à l'extrémité réductrice pour un résidu GlcN est moins importante.

Le même exercice a été effectué pour les deux enzymes mutantes, B4-F6 et B4-A7. Les séquences d'oligosaccharides trouvées sont répertoriées dans les tableaux 4.10 et 4.11.

**Tableau 4.9** Séquençage des produits de déacétylation de A<sub>6</sub> obtenus de l'enzyme B4-F6

	<b>Temps de rétention (min)</b>	<b>Séquence(s)</b>		
<b>A<sub>6</sub></b>	3,87-4,10	AAAAAA		
<b>A<sub>5</sub>D<sub>1</sub></b>	4,67	AAADAA AADAAA		
	5,21	AAAADA		
	7,62-7,86	8,30-8,39	ADDAAA ADADAA AADDAA AADADA ADAADA	
8,64-8,81			11,49-12,01	ADDDAA ADDADA DDDAAA
				12,44-12,69
	12,94-13,05	DADDAA		
<b>A<sub>2</sub>D<sub>4</sub></b>	14,53-15,03	DDADDA DDDDAA		
	15,56-15,71	DDDADA DADDDA		
	15,99-16,18	ADDDDA		
<b>A<sub>1</sub>D<sub>5</sub></b>	18,29-18,42	DDDADD DDDDAD		



**Tableau 4.10** Séquençage des produits de déacétylation de A<sub>6</sub> obtenus de l'enzyme B4-A7

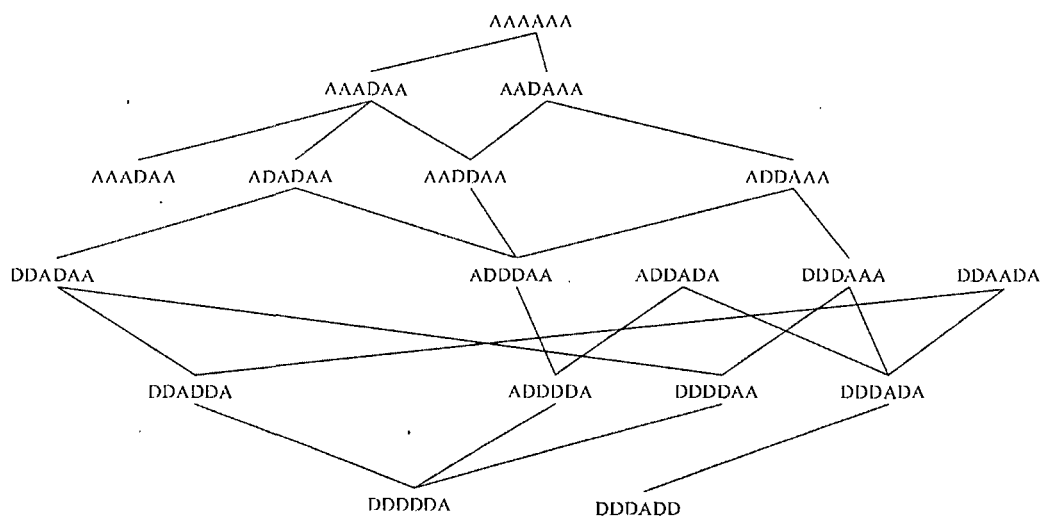
	<b>Temps de rétention (min)</b>	<b>Séquence(s)</b>
<b>A<sub>6</sub></b>	3,92	AAAAAA
<b>A<sub>5</sub>D<sub>1</sub></b>	4,82-5,07	AAAADA AAADAA AADAAA
<b>A<sub>4</sub>D<sub>2</sub></b>	7,93-8,01  8,11-8,16	ADDAAA ADADAA AADDAA AADADA ADAADA
<b>A<sub>3</sub>D<sub>3</sub></b>	12,01-12,44  12,57-12,69	DDDAAA ADADDA ADDADA ADDDAA DDAADA DDAADA
<b>A<sub>2</sub>D<sub>4</sub></b>	15,78  16,12-16,18	DDADDA DDDDAA DDDADA ADDDDA
<b>A<sub>1</sub>D<sub>5</sub></b>	18,96-19,20	DDDDDA DDDADD

Il serait avantageux d'optimiser la méthode MS/MS afin de « contrôler » la fragmentation. Il est possible dans une certaine mesure de favoriser plus ou moins de fragmentation en variant les énergies de collision. Une telle optimisation de la méthode MS/MS devra donc être effectuée dans la suite de ce projet.

#### 4.6.2 Caractérisation des profils de déacétylation selon chaque clone

L'élucidation du mécanisme d'action de déacétylation de l'enzyme permettra de diriger les prochaines évolutions de celle-ci. À l'aide des COS séquencés, il sera possible de tracer un profil de déacétylation selon chaque clone. Par exemple, si l'on considère que l'enzyme déacétyle le substrat un groupement acétyl à la fois, chaque produit de déacétylation provient nécessairement de l'espèce d'un DDA plus petit. Par exemple, chaque  $A_3D_3$  est obtenu à partir d'un  $A_4D_2$ . La sélectivité de l'enzyme pourra donc être investiguée afin de déterminer si celle-ci déacétyle à des positions préférentielle. Une corrélation entre les profils de déacétylation et les pourcentages de déacétylation de chaque clone pourra ensuite être établi créant ainsi un critère de plus lors de la sélection du clone le plus efficace et de la mutation de celui-ci.

Les figures 4.30 à 4.32 illustrent respectivement les chemins hypothétiques empruntés lors de la déacétylation de la chitine de l'enzyme *Axe A*, B4-F6 et B4-A7. Les profils tracés confirment que chaque produit de déacétylation provient d'un DDA inférieur, sauf dans le cas de DDAADA de l'enzyme *Axe A* (figure 4.30). Dans ce cas, il est possible que l'espèce de départ soit complètement transformé en une espèce de DDA plus élevée et donc n'a pas été préalablement identifié. Ce genre de profil pourrait donc être utilisé afin de retracer la provenance des différents DDA obtenus.



**Figure 4.30** Profil proposé de déacétylation de  $A_6$  par l'enzyme *Axe A*

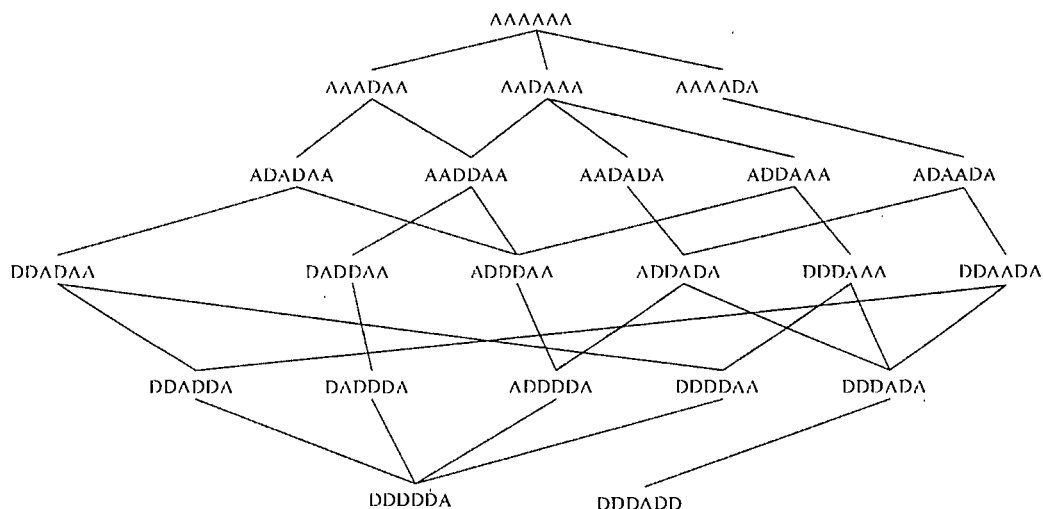


Figure 4.31 Profil proposé de déacétylation de  $A_6$  par l'enzyme B4-F6

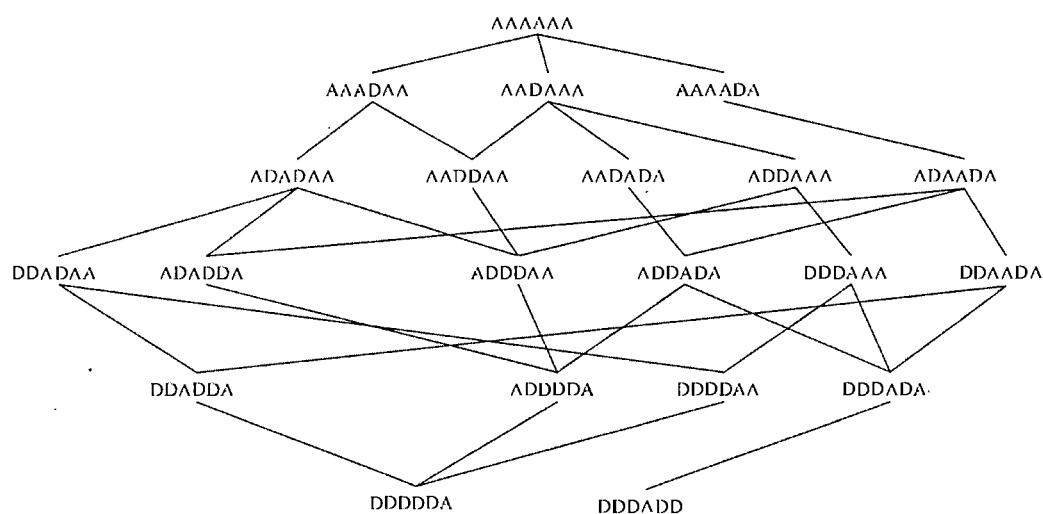


Figure 4.32 Profil proposé de déacétylation de  $A_6$  par l'enzyme B4-A7

#### 4.7 LC-MS des produits de déacétylation de $A_6$ -PHZ

Contrairement aux analyses CE-LIF le substrat de départ est dérivé avec la phénylhydrazine pour les analyses LC-MS. Pour les mêmes raisons soulevées lors des analyses CE-LIF de produits dérivés, il est préférable d'effectuer la réaction de déacétylation enzymatique sur un substrat dérivé que de faire la réaction de dérivation sur les produits de déacétylation. Dans ce cas, la présence de produits secondaires est

minimisée et l'intensité des produits de déacétylation est augmentée. Tous comme pour le substrat A<sub>6</sub>-APTS, la présence de la phénylhydrazine ne semble pas avoir inhibé la réaction de déacétylation puisque le pourcentage de déacétylation a été évalué à ~ 20% (tableau 4.12).

**Tableau 4.11** Rendement de la réaction enzymatique de déacétylation du substrat A<sub>6</sub>-PHZ avec l'enzyme *Axe A*

Réaction	Conc. d'enzyme (µg/mL)	Pourcentage de déacétylation (%)
1	15,7	18,2
2	15,7	20,4
Contrôle <sup>a</sup>	15,7	1,78

<sup>a</sup> Le contrôle contient toutes les composantes de la réaction sauf l'enzyme

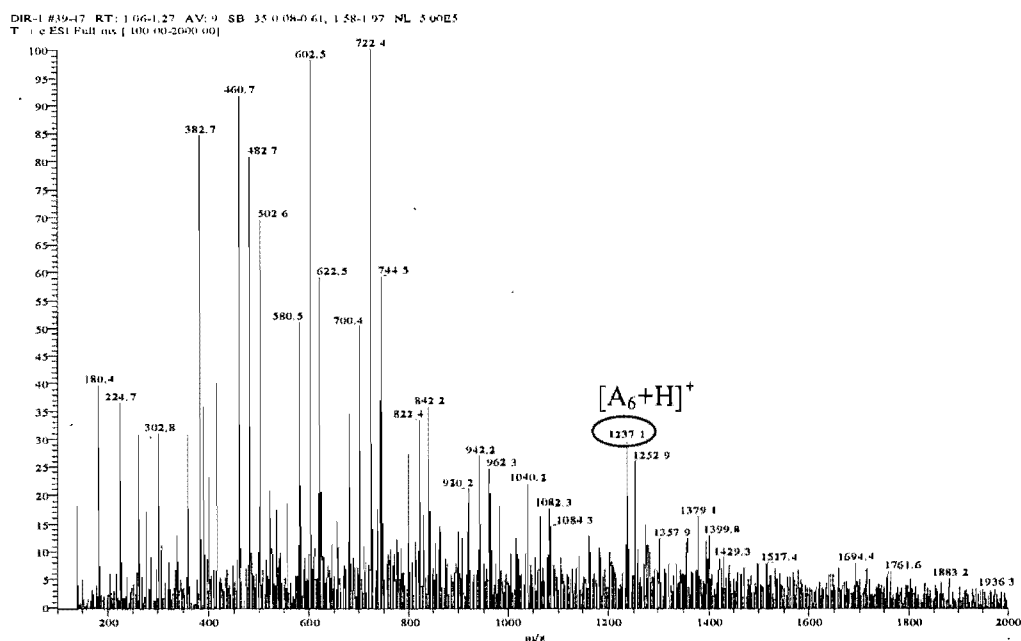
Tel que mentionné précédemment, la dérivation vise à simplifier le séquençage des COS en permettant d'étiqueter leur extrémité réductrice. Par ailleurs, la présence de l'agent réducteur change la polarité et l'hydrophilicité de l'oligosaccharide et donc son comportement chromatographique. Il faudra tenir compte de cet aspect lors de l'analyse LC-MS/MS.

#### 4.7.1 Analyses MS par injection directe des produits de déacétylation dérivés avec la PHZ

Les produits de déacétylation du substrat dérivé ont été analysés par injection directe dans le spectromètre de masse (ESI-IT) afin de vérifier la présence et l'ionisation des COS. Les masses prévues des produits de déacétylation sont répertoriées dans le tableau 4.13 suivant. Le spectre de masse obtenu (figure 4.33) ne montre aucune des masses attendues. Par contre, la masse 1237,1 m/z correspond à la masse du substrat non dérivé (A<sub>6</sub>). Il est possible d'une part qu'il restait une petite quantité de substrat qui n'aurait pas été dérivé ou encore, le chromophore/ionophore a été clivé lors de la réaction enzymatique ou dans la source du spectromètre. L'analyse MS du substrat de départ ne montre pas de perte de la PHZ, excluant un clivage dans la source.

**Tableau 4.12** Masses attendues pour les produits de déacétylation dérivés avec la phénylhydrazine

Espèce	Masse mono-isotopique (g/mol)	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M+2H]^{2+}$ (m/z)
A <sub>6</sub> -PHZ	1326,17	1327,18	664,09
A <sub>5</sub> D <sub>1</sub> -PHZ	1284,16	1285,17	643,09
A <sub>4</sub> D <sub>2</sub> -PHZ	1242,15	1243,16	622,08
A <sub>3</sub> D <sub>3</sub> -PHZ	1200,14	1201,15	601,08
A <sub>2</sub> D <sub>4</sub> -PHZ	1158,13	1159,13	580,07
A <sub>1</sub> D <sub>5</sub> -PHZ	1116,12	1117,12	559,07



**Figure 4.33** Spectre MS (ESI-IT) des produits de déacétylation du substrat A<sub>6</sub>-PHZ

Par ailleurs, l'échantillon contient beaucoup d'interférents à nos ions d'intérêts, tel que des sels et l'enzyme. Donc lors de l'analyse par injection directe, puisqu'il n'y a pas de séparation chromatographique, tous ce qui est contenu dans l'échantillon a la possibilité d'être ionisé et analysé par le spectromètre de masse en même temps. L'ionisation préférentielle de tout autres composés crée de la suppression d'ion. Une séparation chromatographique est donc requise avant l'analyse MS afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse.

#### 4.7.2 Analyses LC-MS des produits de déacétylation dérivés avec la PHZ

Les COS dérivés avec la phénylhydrazine sont moins polaires et hydrophiles que leur équivalent non-dérivé. Il est donc peu probable que la même méthode HILIC développée précédemment sépare de façon adéquate les oligosaccharides dérivés. Puisque la PHZ confère un caractère moins polaire aux COS, la rétention prévue pour ces analytes est très courte voire correspondante au temps mort. La méthode HILIC n'a pas permis d'identifier les oligosaccharides dérivés. En effet, aucun pic correspondant à l'un ou l'autre des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-PHZ n'a été repéré. Par contre, des signaux assez intenses pour les produits de déacétylation non-dérivés sont observés. Dans ce cas, les produits de déacétylation proviennent soit d'une part de traces du substrat non-dérivé ou encore de la phénylhydrazine qui a été clivée par la réaction enzymatique.

Une analyse par chromatographie sur phase inverse a aussi été testée selon les gradients utilisés par Lattova et Perrault [62], sans résultat concluant. Encore une fois, aucun produit de déacétylation dérivé avec la phénylhydrazine n'a donc pu être identifié, ni même observé. Des pics correspondant aux COS non-dérivés sont aussi présents et d'intensité comparable à celle observée par HILIC.

Il est possible que la déacétylation observée soit uniquement due à la présence de substrat non-dérivé restant dans le mélange réactionnel de dérivation. Par contre, différentes séparations chromatographiques devraient être essayées soit en utilisant un gradient ou une phase stationnaire différente afin de déterminer si les COS dérivés avec la PHZ ont empêché la réaction enzymatique. De plus, il est aussi possible que la phénylhydrazine ne soit pas un ionophore approprié pour ce type de réaction, malgré son utilité en glycoprotéomique [53, 62].

## 5 COMPARAISON DES MÉTHODES ANALYTIQUES

*« Trinity : Neo... nobody has ever done this before*

*Neo : That's why it's going to work »*

*- The Matrix (1999)*

Toutes les techniques utilisées et décrites dans les chapitres précédents ont permis de séparer les différents produits de déacétylation enzymatique de la chitine. La discussion suivante vise à souligner les forces et les faiblesses des méthodes utilisées par rapport au but à atteindre.

### **5.1 *Reproductibilité et effet de matrice***

Si l'on compare strictement la technique de chromatographie liquide à l'électrophorèse capillaire, la reproductibilité des temps de rétention en LC est de loin supérieure à celle de la CE. Plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences observées. Pour sa part, la chromatographie liquide bénéficie d'une technologie de pointe pour toutes ses composantes. En LC, le mouvement de l'éluant est régi par une pompe qui délivre un débit constant et assure ainsi une bonne reproductibilité du temps de rétention. Par contre, en CE le mouvement des analytes dépend du flux électroosmotique qui lui-même dépend de différents paramètres physiques pouvant varier d'une analyse à l'autre. En effet, la composition exacte du tampon (concentration et pH) ainsi que la présence de composés de la matrice de l'échantillon sont des facteurs influençant la force ionique et la viscosité du milieu et conséquemment l'EOF et le temps de migration des analytes.

Le tableau 5.1 compare la reproductibilité des temps de rétention de  $A_4D_2$  selon la technique utilisée. Le coefficient de variation (CV) est calculé pour le temps de rétention de chaque espèce du même échantillon analysé selon la méthode décrite au tableau 5.1. Le CV obtenu en électrophorèse capillaire est presque le double du CV calculé pour la chromatographie liquide. Dans le cas de la séparation CE-LIF puisque l'identification des pics n'est pas confirmée, le pic désigné comme  $A_4D_2$  est le 2<sup>ème</sup> plus intense à gauche de  $A_6$  (figure 5.4). Le composé  $A_4D_2$  a été choisi pour comparer la reproductibilité des deux méthodes, car il est situé au milieu de l'analyse. Dans le cas de l'électrophorèse capillaire, la variabilité sur le temps de migration varie selon que celui-ci se situe avant ou après le flux électroosmotique (EOF). En effet, les analytes migrant après l'EOF sont plus influencés par le flux électroosmotique et leur



temps de migration varie plus. Dans ce cas-ci, le phénomène est plus évident lorsque les temps de migration sont comparés d'une injection à l'autre (tableau 5.2) et moins si l'on compare les analyses sur plusieurs jours différents (tableau 5.3).

**Tableau 5.1** Reproductibilité du temps de rétention de A<sub>4</sub>D<sub>2</sub> selon la technique

Technique	Paramètres expérimentaux	CV t <sub>r, A<sub>4</sub>D<sub>2</sub></sub> (%) <sup>a</sup>
CE-LIF	80 mM Histidine, pH 6,5 50 µm d.i., L <sub>1</sub> 60 cm, L <sub>d</sub> 50 cm 25 kV	6,2
LC-MS	0,1% Acide formique/ACN Luna CN, 3µ, 4,6 x 150 mm Gradient HILIC, 0,5 mL/min	3,7

<sup>a</sup> n = 7 pour le CV calculé en CE-LIF et n = 6 pour le CV calculé en LC-MS

**Tableau 5.2** Reproductibilité des temps de migration en CE-LIF pour des injections répétées pour tous les produits de déacétylation

# injection	Temps de migration (min)					
	A <sub>6</sub>	A <sub>5</sub> D <sub>1</sub>	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> D <sub>5</sub>
1	11.9	9.4	8.1	7.1	6.2	5.5
2	10.5	8.5	7.4	6.6	5.8	5.2
3	10.4	8.4	7.3	6.5	5.7	5.1
Moyenne	10.9	8.7	7.6	6.7	5.9	5.3
Écart type	0.85	0.54	0.41	0.32	0.26	0.21
CV (%)	7.8	6.2	5.4	4.7	4.5	4.0

**Tableau 5.3** Reproductibilité quotidienne des temps de migration en CE-LIF pour les produits de déacétylation principaux

Date d'inj.	Temps de migration (min)					
	A <sub>6</sub>	A <sub>5</sub> D <sub>1</sub>	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> D <sub>5</sub>
2007/01/10	11.4	9.7	8.6	7.6	6.9	5.9
2007/07/19	11.9	9.4	8.1	7.1	6.2	5.5
	10.5	8.5	7.4	6.6	5.8	5.2
	10.4	8.4	7.3	6.5	5.7	5.1
2007/07/31	11.6	9.6	8.5	7.4	6.7	5.7
2007/08/09	10.1	8.9	8.0	7.2	6.6	5.7
2007/10/23	10.4	9.1	8.3	7.4	6.8	5.9
Moyenne	10.9	9.1	8.0	7.1	6.4	5.6
Écart type	0.72	0.52	0.50	0.44	0.49	0.33
CV (%)	6.6	5.7	6.2	6.1	7.7	5.9

Le tampon utilisé pour la méthode CE-LIF est de nature peu conventionnelle pour une méthode d'électrophorèse capillaire. La nature du tampon affecte entre autres le comportement électroosmotique. Les analyses dans le tampon histidine montrent des temps de migrations variant plus lors des premières injections par rapport aux injections subséquentes lors de l'utilisation d'un nouveau capillaire. Il est possible qu'il y ait une interaction entre les silanols libres de la paroi du capillaire et le tampon et/ou l'analyte. La paroi intérieure du capillaire est donc légèrement modifiée lors de l'analyse. Donc ce n'est qu'après quelques injections qu'une bonne reproductibilité des analyses est assurée. Il faut admettre que les tampons inorganiques tel que le phosphate de sodium donnent de meilleures reproductibilités en CE, jusqu'à  $< 1\%$  CV.

Dans le cas de la chromatographie, la reproductibilité des temps de rétention a été calculée selon chaque injection (« *run-to-run* », tableau 5.4), la journée d'analyse (« *day-to-day* », tableau 5.5) et le lot de la réaction enzymatique (« *batch-to-batch* », tableau 5.6). En LC, la variabilité du temps de rétention est habituellement assez basse. Les reproductibilités « *run-to-run* » et « *day-to-day* » ont des CV se situant tous sous 5 %. Par ailleurs, la reproductibilité « *batch-to-batch* » montre des CV plus élevés jusqu'à 7,30 %. Puisque chaque réaction enzymatique ne donne pas exactement les mêmes quantités de produits de déacétylation, il en résulte que la forme des pics varie plus d'une fois à l'autre dépendamment de la composition de l'échantillon. Lorsque le pic est plus évasé, le temps de rétention, évalué à l'apex paraîtra varier de façon plus importante.

D'autre part, on peut aussi parler de reproductibilité dans le profil des pics observés, tant au niveau de la symétrie de pics que dans la distribution de la multiplicité. Une variabilité de ces profils de pics pour un même échantillon est observée tant en chromatographie liquide qu'en électrophorèse capillaire.

En chromatographie liquide, le profil des pics est d'abord clairement dédoublé (figure 5.1). Ce dédoublement devient de moins en moins significatif, voire absent

plus l'écart entre l'analyse et la date de la réaction enzymatique devient grand (figure 5.2 et 5.3). La forme des pics varie selon le moment de l'analyse. Il est possible qu'il y ait dégradation de l'échantillon; bien que ces derniers soient conservés au congélateur, l'enzyme y est toujours présente. Cette dernière est désactivée par l'ajout d'acide sulfurique à la fin de la réaction de déacétylation, mais peut rester active à des températures de  $-20^{\circ}\text{C}$  et plus. De plus, l'échantillon est constamment gelé et dégelé afin de préparer de nouvelles dilutions pour les analyses LC-MS. Dans ces conditions, il est fort possible d'observer de la dégradation des produits de déacétylation.

**Tableau 5.4** Reproductibilité des temps de rétention en LC-MS pour des injections répétées pour tous les produits de déacétylation\*

# injection	Temps de rétention (min)				
	$A_6$	$A_5D_1$	$A_5D_1$	$A_4D_2$	$A_4D_2$
1	3.30	4.41	5.10	7.78	8.91
2	3.29	4.41	5.09	7.80	8.88
3	3.30	4.43	5.10	7.81	8.89
4	3.30	4.40	5.08	7.75	8.88
<b>Moyenne</b>	3.30	4.41	5.09	7.79	8.89
<b>Écart-type</b>	0.001	0.010	0.008	0.029	0.016
<b>CV (%)</b>	0.030	0.236	0.164	0.375	0.181

\*Produits de déacétylation obtenus de l'enzyme sauvage *Axe A*;  
réaction du 29 novembre 2007

**Tableau 5.5** Reproductibilité des temps de rétention en LC-MS d'un jour à l'autre pour tous les produits de déacétylation\*

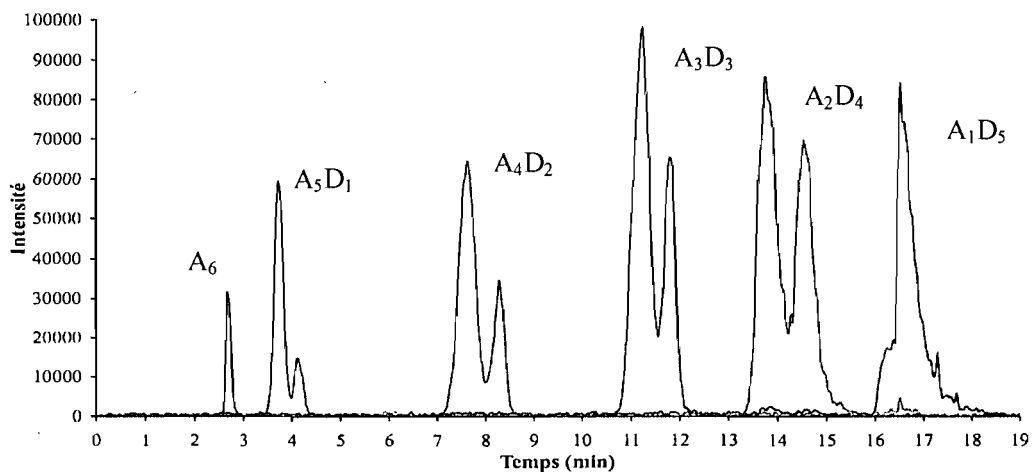
Date d'inj.	Temps de rétention (min)											
	A <sub>6</sub>	A <sub>5</sub> D <sub>1</sub>	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> D <sub>5</sub>						
2006/06/23	2.69	3.73	4.12	7.63	8.30	11.23	11.81	13.77	14.56	16.56		
2006/06/28	2.80	3.94	4.33	7.91	8.79	11.38	12.16	13.90	15.09	16.25	16.87	
2006/09/20	2.71	3.88		7.83		11.67		15.00		17.62		
<b>Moyenne</b>	2.73	3.85	4.23	7.79	8.54	11.43	11.98	14.23	14.83	16.81	16.87	
<b>Écart-type</b>	0.055	0.104	0.151	0.144	0.346	0.223	0.247	0.673	0.375	0.723	N/A	
<b>CV (%)</b>	2.03	2.70	3.58	1.85	4.06	1.95	2.06	4.73	2.53	4.30		

\*Produits de déacétylation obtenus de l'enzyme clone B4-F6; réaction du 20 juin 2006

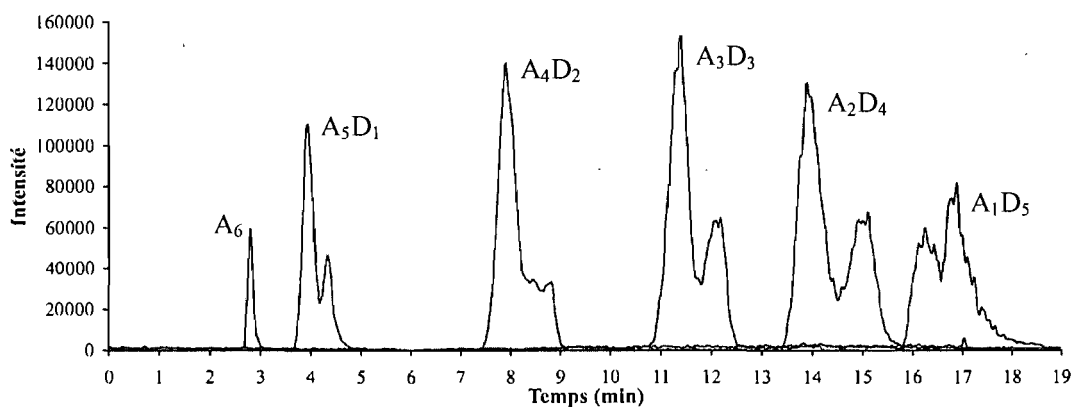
**Tableau 5.6** Reproductibilité d'une réaction à l'autre des temps de rétention en LC-MS pour tous les produits de déacétylation\*

Date de la rxn enzymatique	Temps de rétention (min)					
	A <sub>6</sub>	A <sub>5</sub> D <sub>1</sub>	A <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> D <sub>5</sub>
2006/05/10	3.09	4.46	8.69	11.9	14.8	17.2
2006/06/20	2.71	3.88	7.83	11.7	15.0	17.6
2006/07/20	3.07	4.11	8.05	11.8	15.3	18.9
<b>Moyenne</b>	2.96	4.15	8.19	11.8	15.0	17.9
<b>Écart-type</b>	0.216	0.291	0.445	0.106	0.273	0.855
<b>CV (%)</b>	7.30	7.02	5.43	0.90	1.81	4.78

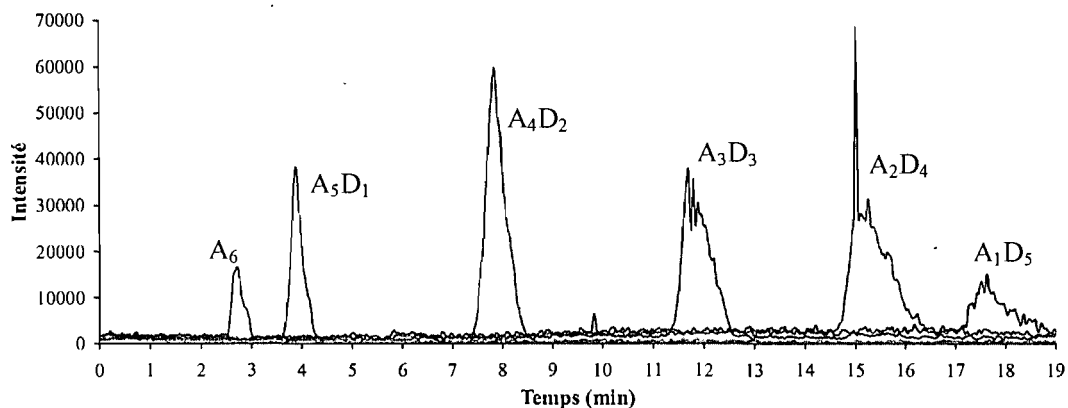
\*Produits de déacétylation obtenus de l'enzyme clone B4-F6



**Figure 5.1** EIC des produits de déacétylation obtenus de l'enzyme clone B4F6 (réaction du 20 juin 2006); analysé le 23 juin 2006



**Figure 5.2** EIC des produits de déacétylation obtenus de l'enzyme clone B4F6 (réaction du 20 juin 2006); analysé le 28 juin 2006

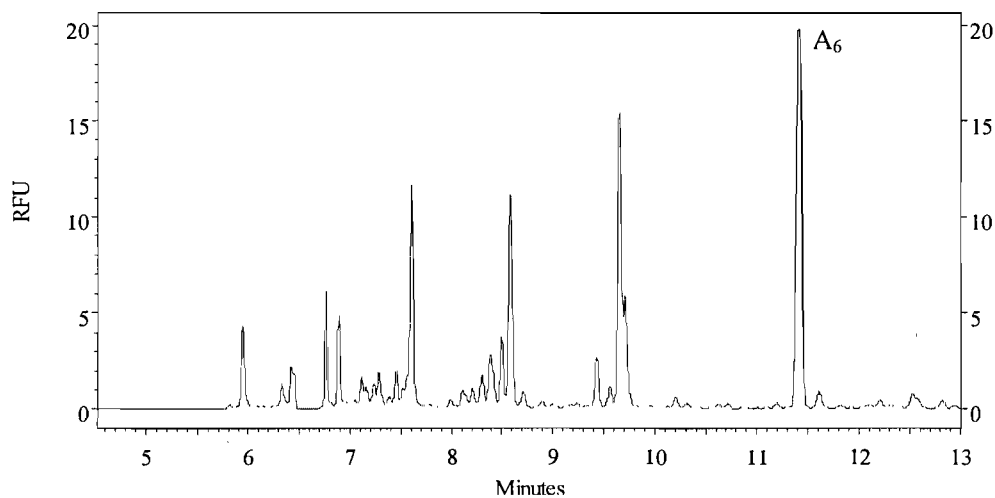


**Figure 5.3** EIC des produits de déacétylation obtenus de l'enzyme clone B4F6 (réaction du 20 juin 2006); analysé le 20 septembre 2006

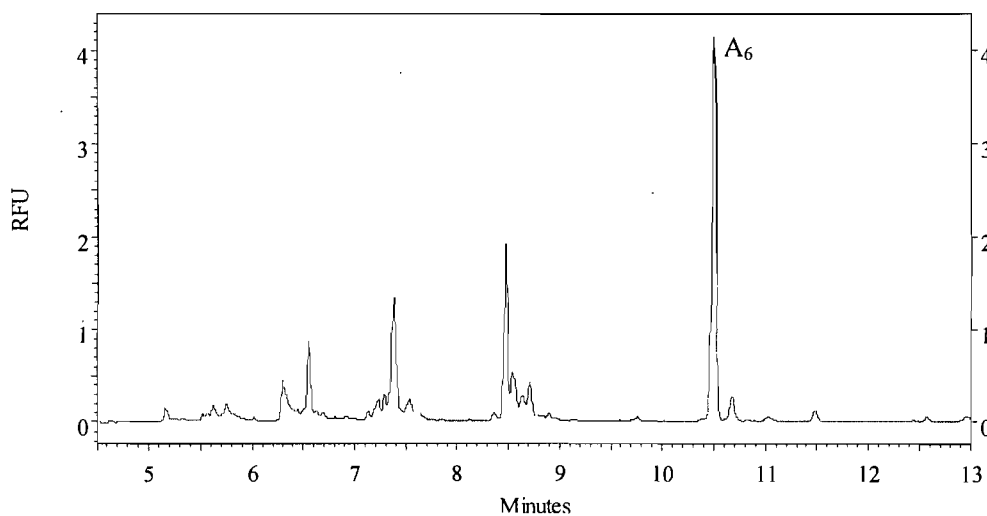
La présence de la matrice biologique aurait donc avantage à être retirée afin de permettre un meilleur stockage des échantillons. L'utilisation d'un filtre moléculaire serait un moyen simple et rapide d'éliminer la présence de l'enzyme. L'extraction liquide-liquide est à proscrire puisque les oligosaccharides et l'enzyme sont solubles dans des milieux aqueux. Par ailleurs, la présence de cette matrice n'affecte pas la séparation chromatographique. Elle peut par contre introduire un bruit de fond plus élevé. Dans ce cas, la présence de sels n'est pas assez importante pour créer une suppression de signal, mais un dépôt de sel se forme dans la source d'ionisation du spectromètre de masse après plusieurs injections. Par ailleurs, la reconstruction des chromatogrammes par l'extraction des masses (EIC) des produits attendus permet de réduire considérablement le bruit de fond par rapport au chromatogramme enregistré pour le balayage total des ions (TIC). Pour sa part, l'enzyme ne produit pas de suppression d'ion puisqu'elle est séparée par chromatographie des produits de déacétylation. La matrice n'influence donc que très peu l'analyse chromatographique bien qu'aucune étape de purification n'est appliquée. De plus, la dilution des échantillons d'un facteur 10 aide à diminuer l'effet de la matrice sur le processus chromatographique.

En électrophorèse capillaire, le profil des pics reste assez semblable à chaque analyse. Par contre, le rapport des intensités change d'une fois à l'autre, mais les pics les plus intenses ont des temps de migrations assez reproductibles (tableau 5.6). Les électrophérogrammes des figures 5.4 à 5.6 sont tous des séparations des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-APTS de la même réaction enzymatique dans les mêmes conditions de séparation. Plusieurs plus petits pics se retrouvent entre les pics les plus intenses, et sont attribués aux différents isomères positionnels possibles. La distribution et l'intensité de ces plus petits pics varient d'une analyse à l'autre. Encore une fois, il est possible qu'il y ait une certaine dégradation de l'échantillon avec le temps, visible par la variabilité des plus petits pics.

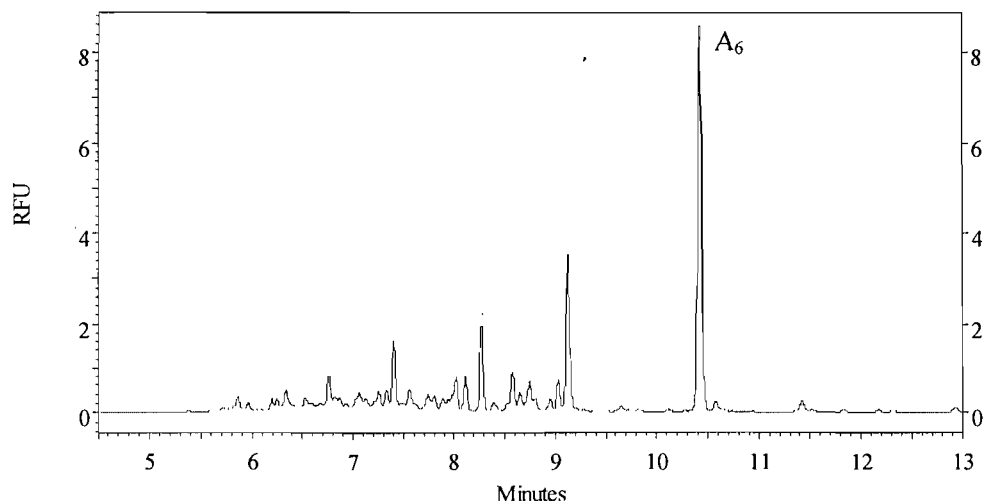
Les conditions d'analyses incluant la composition de l'échantillon (solvant, sels, etc.) influencent la séparation obtenue en électrophorèse capillaire. Cette technique est plus sensible aux plus petits changements de ces différentes conditions. La matrice de l'échantillon a donc de plus grande chance d'influencer la séparation qu'en LC. Par ailleurs, aucune observation porte à croire que la matrice joue un rôle néfaste sur la séparation des produits de déacétylation. La matrice peut par contre contribuer à la variabilité des temps de migration et la dégradation de l'échantillon.



**Figure 5.4** Électrophérogramme (CE-LIF) des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-APTS (tampons 80 mM histidine, pH 6,5) analysé le 10 janvier 2007



**Figure 5.5** Électrophérogramme (CE-LIF) des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-APTS (tampons 80 mM histidine, pH 6,5) analysé le 19 juillet 2007



**Figure 5.6** Électrophérogramme (CE-LIF) des produits de déacétylation de A<sub>6</sub>-APTS (tampons 80 mM histidine, pH 6,5) analysé le 23 octobre 2007

## 5.2 Efficacité et application à l'analyse des oligosaccharides

La méthode permettant de séparer le plus efficacement les différents isomères des différents DDA est sans contredit la CE-LIF (figure 4.7). Les épaulements larges observés en CE-MS (figure 4.16) et LC-MS (figure 4.17) apparaissent en CE-LIF comme plusieurs plus petits pics de faible intensité. Par contre, l'identification exacte des pics observés n'est pas confirmée puisque les analyses MS ne sont pas concluantes et que les standards ayant une séquence spécifique de GlcN et GlcNAc ne sont pas disponibles. Toutes les analyses effectuées sur les COS non-dérivés, tant par CE-MS que LC-MS ont démontré des résolutions beaucoup moins bonnes et souvent des pics avec des épaulements. La présence des épaulements suggère d'importantes similarités des différents isomères et de petits caractères distinctifs. Il est possible que la dérivation des COS représente un moyen de discriminer les différents isomères en CE. La protonation des groupements GlcN permet de varier la charge totale de la molécule par rapport à la charge apportée par le fluorophore (ou autre agent de dérivation). Ce phénomène serait donc le principal responsable des différences de mobilité.



Si l'on compare les électrophérogrammes obtenus par CE-MS pour la séparation des produits de déacétylations (figure 4.16) aux chromatogrammes en LC-MS (figure 4.17), tous deux montrent un dédoublement des pics. En CE-MS, l'allure des pics est moins bien définie à cause de l'instabilité du signal en MS. Par contre, chaque produit de déacétylation est représenté par un pic plus intense suivi d'un pic très évasé tout comme en LC-MS. D'autre part, les pics dédoublés observés en LC-MS sont mieux définis et plus étroits qu'en CE-MS. De plus, la résolution entre les différents produits de déacétylation est meilleure en LC-MS qu'en CE-MS où certains pics se chevauchent. Donc, dans le cas de l'analyse des produits de déacétylation non-dérivé, la LC-MS semble être une méthode plus efficace que la CE-MS.

### **5.3 Couplage à la spectrométrie de masse**

Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse est une technique courante et bien développée de nos jours. Son utilisation est simple puisque le couplage a été perfectionné depuis quelques années. Par contre, la CE-MS n'est toujours pas une méthode éprouvée. En effet, bien que certaines compagnies fournissent des pièces usinées vouées au couplage avec le spectromètre de masse, plusieurs groupes ont encore recours à des montages « maison » ou modifiés d'une interface commerciale [17, 63-65]. Cela est parfois nécessaire afin de satisfaire toutes les exigences de la technique CE-MS. Lors de ce projet, le couplage a été effectué en utilisant l'interface ESI du manufacturier (Agilent Technologies) prévue à cet effet.

La plus grande difficulté rencontrée lors du couplage du CE au MS est la stabilisation de la plume du nébulisateur (« spray »). Ce dernier dépend de plusieurs facteurs soit, la position du capillaire à la sortie de l'aiguille de l'interface et le débit et la composition du liquide d'appoint dont le débit à la sortie de l'aiguille est relativement bas (de l'ordre du  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). À ces débits, il est difficile d'observer à l'œil nu l'allure du « spray », la stabilité de ce dernier est donc évaluée par la stabilité du courant du capillaire du MS lors de l'analyse. Or, lors des analyses, ce courant fluctuait constamment; ce qui s'est traduit en bruit de fond sur les électrophérogrammes obtenus. L'ajustement de la position du capillaire à la sortie de

l'aiguille de nébulisation doit être rigoureusement vérifiée avant chaque utilisation afin de s'assurer d'avoir le meilleur signal. Cela rend la technique assez laborieuse et affecte la reproductibilité de la méthode.

Par ailleurs, c'est la première fois que ce type de couplage est effectué dans ce groupe ainsi que dans l'entourage immédiat de l'université. La technique est donc complètement nouvelle et requiert beaucoup de familiarisation au niveau instrumental. De plus, aucun spectromètre de masse n'est attribué à ce groupe et donc le MS utilisé pour le couplage est partagé avec plusieurs autres utilisateurs. Cette situation rend l'accès à cette technique d'autant plus difficile puisque l'optimisation de la méthode prend beaucoup de temps et que l'appareil ne peut être monopolisé que sur une courte période de temps.

#### **5.4 *Facilité d'utilisation***

Dans la perspective de développer une méthode de criblage, il est nécessaire que cette dernière soit facile d'utilisation et fiable. La chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire jouissent tous deux de systèmes informatisés et automatisés au niveau de l'injection. Il est donc tout aussi facile d'utiliser l'une ou l'autre des deux techniques. Chacune des méthodes de séparation requiert un temps et une attention équivalents en termes de préparation des échantillons, des tampons ou éluants et d'entretien de l'instrument. La seule différence distincte entre l'utilisation d'un système LC versus CE est lors du couplage à la MS et donc la qualité des données obtenues. De ce point de vue, la méthode LC-MS est la technique la plus appropriée pour la suite de ce projet.

### **5.5 Possibilité de quantification**

La quantification des produits de déacétylation est un moyen rapide et efficace de comparer l'efficacité des enzymes les unes aux autres. Dans ce cas, la quantification rencontre un obstacle majeur, soit l'obtention de standards. Sans ces derniers, il n'est pas possible de construire une courbe d'étalonnage. Par contre, puisque la concentration exacte de chaque espèce n'est pas requise, il est possible d'évaluer de façon relative la concentration de chaque produit de déacétylation. En effet, en comparant l'intensité de chaque pour chaque espèce, il est possible de déterminer la concentration relative entre chaque degré de déacétylation. Par contre, dans ce cas, il est impératif de s'assurer d'avoir une réponse au détecteur égale pour chaque produit de déacétylation.

Or pour la méthode CE-LIF, une étape de dérivation est requise. Tel que démontré plus tôt, le rendement de la réaction n'est pas connu et semble être différent pour l'hexasaccharide de chitine et chitosane (tableau 4.2). Il est donc possible que de façon analogue le rendement de la réaction varie selon le degré de déacétylation. L'intensité du pic de chaque espèce ne peut donc pas être comparée l'un à l'autre puisque la dérivation se fait de façon préférentielle. Par contre, la déacétylation du substrat dérivé ne rencontre pas ce problème puisque les produits obtenus possèdent déjà le fluorophore. Leur aires ou hauteurs de pics peuvent donc être comparées les unes aux autres.

Tel que soulevé précédemment, l'ionisation des chitines et chitosanes par ESI est différente. L'intensité des pics ne peut donc pas être comparé entre les différents produits de déacétylation. L'utilisation d'un agent de dérivation retenant principalement la charge lors de l'ionisation permettrait alors d'avoir une ionisation égale pour tous les produits de déacétylation.

## 6 CONCLUSION

*« Everybody learns from science, it all depends on how you use the knowledge. »*

*- Gil Grissom (CSI)*

## 6.1 Conclusion

Les chitooligosaccharides (COS) sont obtenus par la déacétylation d'oligosaccharides de chitine et utilisés dans plusieurs domaines différents dont le domaine de la pharmaceutique. Le pourcentage de déacétylation des COS influence ses propriétés physico-chimiques. Le procédé actuellement utilisé pour transformer les oligosaccharides de chitine en chitosane en est un chimique assez polluant et non-sélectif. Une alternative à ce procédé est d'utiliser une enzyme déacétylase permettant ainsi d'introduire une sélectivité au niveau de la déacétylation en plus d'être moins nocif pour l'environnement ce qui rejoint la philosophie de la chimie verte. Notre groupe travaille donc en collaboration avec des équipes en biochimie travaillant sur une évolution de l'enzyme déacétylase, *Axe A*. Il s'agit donc pour nous de développer une méthode rapide et efficace pour identifier les produits de déacétylation de la chitine permettra d'orienter les prochaines mutations de l'enzyme.

La déacétylation d'un substrat d'hexasaccharide de chitine ( $A_6$ ) par l'enzyme *Axe A* peut donner lieu à un total de 63 produits de différents degrés de déacétylation (DDA). Il est difficile d'imaginer une méthode analytique qui permettra de séparer efficacement un tel nombre d'isomères bien que des techniques comme l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide possèdent des pouvoirs de résolution élevés. La littérature rapporte peu de méthodes séparant efficacement des isomères d'oligosaccharides. Gonçalves *et al.* [66] ont pour leur part réussi à séparer des isomères de disaccharides sulfatés. Prévoyant une séparation chromatographique insuffisante pour isoler chaque isomère, il est possible d'utiliser la spectrométrie de masse comme deuxième dimension de séparation. En effet, il est possible à partir de la MS d'obtenir plus d'information sur chaque isomère et donc les distinguer les uns des autres. Différents auteurs ont réussi à discerner des isomères de disaccharides [67], de monosaccharides [68] et de COS [28, 52] par MS/MS. C'est dans cet optique que ce projet a donc été abordé.

L'hexasaccharide de chitine dérivé avec l'APTS ( $A_6$ -APTS) a été utilisé comme substrat pour la réaction enzymatique de déacétylation puisque le rendement de

dérivation des produits de déacétylation des COS dépend de la composition en GlcN. Cela a permis de réduire la présence de produits secondaire et augmenter l'intensité des pics obtenus. La méthode CE-LIF utilisant un tampon histidine à pH 6,5 permet de séparer à l'intérieur de 12 minutes plusieurs isomères positionnels. Sans standards, il n'est pas possible d'assigner chaque pic à un chitooligosaccharide donné. On ne peut affirmer avec certitude si la vingtaine de pics correspondent aux seuls isomères produits par l'enzyme ou s'il existe plus de COS dont leur concentration est trop petite pour être détectée. Donc aucune conclusion certaine ne peut être faite sur l'efficacité de l'enzyme si ce n'est d'affirmer que plusieurs produits différents sont formés. Le tampon histidine est peu habituel pour l'électrophorèse capillaire, mais il a été sélectionné pour être compatible avec la spectrométrie de masse.

Le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS) a donc été l'alternative envisagée pour identifier les pics obtenus par CE-LIF. Malheureusement, les COS dérivés avec l'APTS ne semblent pas ioniser sous les conditions utilisées bien qu'il est possible de trouver dans la littérature des exemples d'oligosaccharides dérivés avec le même fluorophore analysés par ESI-MS [16, 17, 21, 33]. Il a été difficile de déterminer la raison exacte pour laquelle l'ionisation des oligosaccharides de chitine et chitosane n'a pu se faire. Une des raisons soulevées est la présence de sels provenant de la réaction de dérivatisation retrouvés dans l'échantillon qui engendreraient de la suppression d'ions. Par contre, une extraction sur  $C_{18}$  a infirmé cette hypothèse. De plus, tous les auteurs cités précédemment utilisent une procédure de dérivatisation semblable à la nôtre et seul Gennaro *et al.* [21] procèdent à une étape de purification afin de retirer les sels et l'APTS en excès avant les analyses CE-MS. Tous les autres auteurs ne font qu'une simple dilution de l'échantillon dans l'eau avant l'analyse. À la suite des différentes tentatives de purification, les essais d'analyses MS sur les produits dérivés avec l'APTS ont donc été abandonnés.

Puisque les chitooligosaccharides non-dérivés sont facilement ionisés par nébulisation électrostatique (ESI), l'analyse CE-MS de ces derniers a été effectuée afin d'étudier la faisabilité de la technique. Les électrophérogrammes obtenus

montrent des pics moins bien définis qu'en CE-LIF, mais dont chaque degré de déacétylation possède un pic plus intense suivi d'un pic plus élargi associé aux isomères positionnels.

La CE-MS permet de donner des résultats intéressants, mais selon notre expérience, la technique s'est avérée peu robuste. Le problème principal rencontré était de stabiliser la plume du nébuliseur (*spray*) afin d'obtenir un signal stable en MS. Un accès plus facile et prolongé avec le spectromètre de masse nous permettrait de procéder à des études plus rigoureuses sur le développement de cette technique et certainement régler ce problème. La multiplication des publications sur différentes méthodes utilisant la CE-MS depuis ces dernières années [69] prouvent que cette méthode peut être robuste si les bons outils sont utilisés. Cette technique est utilisée de façon quasi-routinière dans divers domaines tel que la bioanalyse [70] et la chimie médico-légale [71].

Pour sa part, la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a permis d'identifier les produits de déacétylation selon leur masse et selon leur DDA. La méthode a été développée sur une colonne cyano selon les principes de séparation de la chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC). Ce mode d'élution utilise une grande proportion de solvant organique versus l'éluant aqueux afin de créer une mince couche aqueuse adsorbée à la surface de la phase stationnaire polaire de la colonne. Cela permet ainsi une meilleure rétention des analytes hydrophiles comme les chitooligosaccharides. Un peu à l'image des résultats obtenus en CE-MS pour les produits de déacétylation non-dérivés, les pics obtenus par LC-MS étaient dédoublés et assez larges. Le dédoublement des pics a été associé encore une fois à la présence d'isomères positionnels. Par contre, on rapporte dans littérature la séparation des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  des sucres par chromatographie liquide, que ce soit par HILIC sur une colonne amine [44] ou par phase inversée sur des colonnes de carbone graphite ou amide [72] donnant donc lieu à des pics dédoublés. Ces deux auteurs proposent d'utiliser des ions ammonium soit provenant du sel ou de la base afin d'accélérer la mutarotation et ainsi

éliminer le dédoublement des pics. Par ailleurs, cet aspect chromatographique a été exploité afin de quantifier de façon relative les COS  $\alpha$  et  $\beta$  produits par une chitinase donnée en utilisant une colonne amidé [73]. Pour notre part, ce sont plutôt les isomères positionnels des différents DDA que nous voulons caractériser et identifier. Il sera donc important de vérifier que le dédoublement des pics sur la colonne cyano n'est pas dû à ce même effet en ajoutant de l'ammonium à nos éluants.

Dans cette même optique, afin de déterminer si le dédoublement des pics était bel et bien associé à la présence d'isomères positionnels, les mêmes produits de déacétylation ont été analysés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La MS/MS a permis de séquencer les différents chitooligosaccharides déjà séparés selon leur DDA afin d'identifier les différents isomères positionnels présents. Les résultats obtenus ont démontré que l'enzyme ne produisait que quelques isomères sur la soixantaine possible. Par contre, le séquençage des oligosaccharides non-dérivé a été compliqué par l'impossibilité de distinguer l'extrémité réductrice de celle non-réductrice. Les séquences présentées ont donc été établies à partir des fragments B<sub>6</sub>, sachant que ce fragment provenait d'une perte d'eau à l'extrémité réductrice de la chaîne glycosidique. Pour pallier à problème, les oligosaccharides sont dérivés.

La dérivation des oligosaccharides permet alors d'étiqueter leur extrémité réductrice et ainsi faciliter le séquençage. Imitant la stratégie utilisée pour produire des chitooligosaccharides dérivés avec l'APTS, le substrat a été dérivé avec la phénylhydrazine (A<sub>6</sub>-PHZ). La phénylhydrazine avait pour double rôle de marquer l'extrémité réductrice des COS et de retenir la charge afin de créer exclusivement des fragments de types Y et Z en MS/MS. Malheureusement, il n'a pas été possible d'identifier les produits de déacétylation dérivés. Habel *et al.* [28] ont pour leur part réussi à quantifier et séquencer un mélange de COS produits par l'enzyme « family 18 chitinase » par MALDI-IT (MALDI couplé à une trappe ionique) et en dérivant les COS avec l'AA-Ac (tableau 2.1). Ils ont ainsi prouvé que cette enzyme hydrolyse la chitine de façon préférentielle les liaisons -A-D- ou -A-A-. Par contre, ces analyses



ne comportent pas de séparation chromatographique ce qui multiplie considérablement le nombre d'analyses MS devant être effectué et diminue la sensibilité de la méthode.

Somme toute, la LC-MS semble un choix judicieux pour l'étude des COS. En effet, différents groupes utilisent cette technique pour étudier les produits obtenus de différentes chitinases [73-75].

## **6.2 Travaux futurs**

Les différentes méthodes utilisées pour identifier les produits de déacétylation sont toutes complémentaires. Par ailleurs, l'objectif final est d'établir une seule méthode permettant d'identifier rapidement les produits de déacétylation obtenus par réaction enzymatique afin d'orienter les mutations futures de l'enzyme. Toutes les forces soulignées des différentes méthodes développées sont des indications de la voie à suivre.

De toutes les expérimentations effectuées, la dérivation semble un élément incontournable pour l'étude des oligosaccharides que ce soit pour permettre la détection ou pour faciliter le séquençage. De plus, c'est avec les COS dérivés que la meilleure résolution a été observée en CE. Pour sa part, la spectrométrie de masse est un outil incontournable, puisqu'elle permet d'identifier les différents produits de déacétylation sans avoir recours à des standards. Dans le cas de la CE-MS, bien que certains auteurs étudient les saccharides non-dérivés, la dérivation reste une pratique courante [15]. Pour l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem, un agent de dérivation devra être un ionophore assez important pour retenir la charge plus facilement que les groupements amines du chitosane. La 3-acétamido-6-amioacridine utilisée par Haebel *et al.* [28] serait un agent de dérivation à essayer. Ce fluorophore a été utilisé pour l'étude des chitoooligosaccharides et a permis un séquençage efficace et une quantification des différents produits obtenus. L'analyse MS pourrait être couplée à une étape de séparation par chromatographie liquide en utilisant une

méthode HILIC ou sur phase inversée ou encore par électrophorèse capillaire en utilisant un tampon à bas pH afin de protoner les groupements amines.

Les analyses CE-LIF utilisant les oligosaccharides dérivés avec l'APTS ont donné les meilleures résolutions. Par contre, l'ionisation par nébulisation électrostatique des COS-APTS n'a pas pu être réalisée pour transférer la méthode développée par CE-LIF à la CE-MS. L'utilisation de la 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonate (ANTS) pourrait être aussi une alternative à l'APTS [22, 24]. Vu sa ressemblance à l'APTS, il est raisonnable de croire que la séparation avec la méthode CE-LIF développée donnera les mêmes résultats. Bien que l'ionisation risque d'être semblable à celle des COS-APTS, la dérivatisation avec ANTS apporterait peut être une synergie différente plus propice à l'ionisation en ESI. Si les sels de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  sont responsables d'un phénomène de suppression d'ion, les COS pourraient être dérivés sans réduction de l'amine comme c'était le cas pour la dérivatisation avec la phénylhydrazine (section 4.2.2).

En CE, le phénomène de variation du temps de migration selon le nombre d'injection avec la méthode d'analyse CE-LIF a été observé pour le tampon d'histidine, mais peu documenté dans la littérature. Par contre, ce phénomène a aussi été observé par M-E Beaudoin pour des tampons de morpholine et d'éthanolamine [60]. Afin de mieux comprendre le comportement et la séparation observée avec le tampon histidine, il serait nécessaire de faire des tests de reproductibilité à partir d'un capillaire neuf. D'une part comparer la variation des temps de migration selon le nombre d'injections dans le tampon histidine et comparer ces variations à celles obtenues avec un tampon plus typique de la CE tel qu'un tampon phosphate au même pH. Il sera ainsi possible de déterminer si la variabilité provient du tampon utilisé. De plus, afin de déterminer si la variabilité provient d'une modification de la paroi du capillaire, un test de reproductibilité semblable au précédent devrait être effectué. Pour ce faire, il faudra effectuer le même nombre d'injections avec un blanc que ce qui a été requis pour obtenir une bonne reproductibilité avec un échantillon dans le tampon histidine. Ainsi, on pourra déterminer si l'injection de l'échantillon provoque

une modification de la paroi du capillaire requise pour assurer une bonne reproductibilité des analyses. De plus, un standard interne pourrait être utilisé afin de normaliser les variations de temps de migration.

Afin d'éviter la production de standard de différents DDA, il serait aussi possible à l'aide d'un programme tel que Simul 5.0™ de simuler la séparation et donc le temps de migration d'une analyse en CE. Cela permettrait ainsi d'identifier les différents pics vus par CE-LIF. Par contre, le programme requiert que l'on connaisse le flux électroosmotique ainsi que la charge de chaque analyte. Ces différents paramètres ne sont pas connus et devront donc être déterminés expérimentalement. Le groupe de Philip Britz-McKibbin à l'Université McMaster utilise déjà ce programme de concert avec la CE afin de les aider à identifier des métabolites inconnus [76].

Au niveau de la chromatographie liquide, la méthode développée sur la colonne amine laisse place à amélioration. Selon la disponibilité des colonnes, une phase stationnaire spécialement dédiée à la chromatographie HILIC pourrait être intéressante. D'autre part, tel que mentionné plus tôt, l'analyse de chitooligosaccharides dérivés semble inévitable. Dans un tel cas, une nouvelle méthode LC devrait sans doute être développée en conséquence de l'ionophore choisi.

Enfin, une nouvelle technique comme l'électrochromatographie capillaire (CEC) allie la versatilité des phases stationnaires de la LC au pouvoir de résolution de la CE peut aussi être une alternative intéressante à explorer. Cette technique, tel que la CE est aussi compatible à la spectrométrie de masse. Cette technique a déjà été appliquée à l'étude d'oligosaccharide neutres [77-79]. Ces auteurs ont utilisé des colonnes monolithiques dont la surface est recouverte de groupement amine ou cyano. Dans ce cas, ils ont remarqué une rétention des analytes selon leur hydrophilicité, se rapprochant du type de séparation obtenue par chromatographie HILIC.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

1. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
2. Keisuke, K., *Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans*. Marine Biotechnology, 2006. **8**(3): p. 203-226.
3. Senel, S. and S.J. McClure, *Potential applications of chitosan in veterinary medicine*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(10): p. 1467-1480.
4. Buschmann, P.M. *Chaire de recherche du Canada en Génie tissulaire du cartilage: Recherche*. 2006 [cited; Available from: <http://www.polymtl.ca/tissue/fr/recherche/index.php>].
5. Dodane, V. and V.D. Vilivalam, *Pharmaceutical applications of chitosan*. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**(6): p. 246-253.
6. Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos and V. Bouriotis, *Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology*. Trends in Biotechnology, 2000. **18**(7): p. 305-312.
7. Nisole, A., F.-X. Lussier, K.L. Morley, F. Shareck, R.J. Kazlauskas, C. Dupont and J.N. Pelletier, *Extracellular production of Streptomyces lividans acetyl xylan esterase A in Escherichia coli for rapid detection of activity*. Protein Expression and Purification, 2006. **46**(2): p. 274-284.
8. Heiger, D., *An introduction High performance capillary electrophoresis*. 2000: Agilent Technologies. 135.
9. Harris, D.C., *26-5 Capillary electrophoresis*, in *Quantitative Chemical Analysis Seventh edition*, W.H.F.a. Company, Editor. 2007: New York. p. 603-620.
10. Skoog, D.A., J.F. Holler and T.A. Nieman, *Capillary Electrophoresis and Electrochromatography*, in *Principles of Instrumental Analysis Fifth edition*. 1998, Saunders College Publishing. p. 778-795.
11. Ban, E., O.-K. Choi, J.-C. Ryu and Y.S. Yoo, *Capillary electrophoresis of high-molecular chitosan: The natural carbohydrate biopolymer*. Electrophoresis, 2001. **22**(11): p. 2217-2221.
12. Fu, X., L. Huang, M. Zhai, W. Li and H. Liu, *Analysis of natural carbohydrate biopolymer-high molecular chitosan and carboxymethyl chitosan by capillary zone electrophoresis*. Carbohydrate Polymers, 2007. **68**(3): p. 511-516.
13. Beaudoin, M.E., J. Gauthier, I. Boucher and K.C. Waldron, *Capillary electrophoresis separation of a mixture of chitin and chitosan oligosaccharides derivatized using a modified fluorophore conjugation procedure*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(12): p. 1390-1398.
14. Wang, C.-Y. and Y.-Z. Hsieh, *Analysis of chitin oligosaccharides by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence*. Journal of Chromatography A, 2002. **979**(1-2): p. 431-438.
15. Campa, C., A. Coslovi, A. Flamigni and M. Rossi, *Overview on advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates: A tabulated review*. Electrophoresis, 2006. **27**(11): p. 2027-2050.

16. Joucla, G., T. Brando, M. Remaud-Simeon, P. Monsan and G. Puzo, *Capillary electrophoresis analysis of glucooligosaccharide regioisomers*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(6): p. 861-869.
17. Kabel, M.A., W.H. Heijnis, E.J. Bakx, R. Kuijpers, A.G.J. Voragen and H.A. Schols, *Capillary electrophoresis fingerprinting, quantification and mass-identification of various 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-derivatized oligomers derived from plant polysaccharides*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1137**(1): p. 119-126.
18. Underberg, W.J.M. and J.C.M. Waterval, *Derivatization trends in capillary electrophoresis: An update*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(22-23): p. 3922-3933.
19. Waterval, J.C.M., H. Lingeman, A. Bult and W.J.M. Underberg, *Derivatization trends in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(18): p. 4029-4045.
20. Lamari, F.N., R. Kuhn and N.K. Karamanos, *Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis*. *Journal of Chromatography B*, 2003. **793**(1): p. 15-36.
21. Gennaro, L.A., O. Salas-Solano and S. Ma, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins*. *Analytical Biochemistry*, 2006. **355**(2): p. 249-258.
22. Che, F.-Y., J.-F. Song, R. Zeng, K.-Y. Wang and Q.-C. Xia, *Analysis of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis-electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **858**(2): p. 229-238.
23. Gennaro, L.A., J. Delaney, P. Vouros, D.J. Harvey and B. Domon, *Capillary electrophoresis/electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of negatively charged derivatized and underivatized glycans*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002. **16**(3): p. 192-200.
24. Larsson, M., R. Sundberg and S. Folestad, *On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **934**(1-2): p. 75-85.
25. Militopoulou, M., F.N. Lamari, A. Hjerpe and N.K. Karamanos, *Determination of twelve heparin- and heparan sulfate-derived disaccharides as 2-aminoacridone derivatives by capillary zone electrophoresis using ultraviolet and laser-induced fluorescence detection*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(7-8): p. 1104-1109.
26. Zinellu, A., S. Pisanu, E. Zinellu, A.J. Lepedda, G.M. Cherchj, S. Sotgia, C. Carru, L. Deiana and M. Formato, *A novel LIF-CE method for the separation of hyaluronan- and chondroitin sulfate-derived disaccharides: Application to structural and quantitative analyses of human plasma low- and high-charged chondroitin sulfate isomers*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(14): p. 2439-2447.
27. Charlwood, J., H. Birrell, A. Gribble, V. Burdes, D. Tolson and P. Camilleri, *A probe for the versatile analysis and characterization of N-linked oligosaccharides*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(7): p. 1453-1461.
28. Haebel, S., S. Bahrke and M.G. Peter, *Quantitative sequencing of complex mixtures of heterochitooligosaccharides by vMALDI-linear ion trap mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(15): p. 5557-5566.

29. Chen, F.T.A. and R.A. Evangelista, *Analysis of mono- and oligosaccharide isomers derivatized with 9-Aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence*. Analytical Biochemistry, 1995. **230**(2): p. 273-280.
30. Evangelista, R.A., M.-S. Liu and F.-T.A. Chen, *Characterization of 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(13): p. 2239-2245.
31. Suzuki, H., O. Muller, A. Guttman and B.L. Karger, *Analysis of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): p. 4554-4559.
32. Gao, X., J. Yang, F. Huang, X. Wu, L. Li and C. Sun, *Progresses of derivatization techniques for analyses of carbohydrates*. Analytical Letters, 2003. **36**(7): p. 1281 - 1310.
33. Monsarrat, B., T. Brando, P. Condouret, J. Nigou and G. Puzo, *Characterization of manno oligosaccharide caps in mycobacterial lipoarabinomannan by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry*. Glycobiology, 1999. **9**(4): p. 335-342.
34. Zaia, J., *Mass spectrometry of oligosaccharides*. Mass Spectrometry Reviews, 2004. **23**(3): p. 161-227.
35. Gates, D.P. *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry 2005* [cited; Available from: <http://www.bris.ac.uk/nerclmsf/techniques/hplcms.html>].
36. Anonyme, *Agilent Capillary Electrophoresis System User's Guide*. 2000: Agilent Technologies. 270.
37. Liu, C.C., J.-F. Alary, P. Vollmerhaus and M. Kadkhodayan, *Design, optimisation, and evaluation of a sheath flow interface for automated capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2005. **26**(7-8): p. 1366-1375.
38. Wuhler, M., A.M. Deelder and C.H. Hokke, *Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2005. **825**(2): p. 124-133.
39. Liu, Y., S. Uргаonkar, J.G. Verkade and D.W. Armstrong, *Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2005. **1079**(1-2): p. 146-152.
40. Robinson, S., E. Bergstrom, M. Seymour and J. Thomas-Oates, *Screening of underivatized oligosaccharides extracted from the stems of triticum aestivum using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(6): p. 2437-2445.
41. Koizumi, K., *High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns*. Journal of Chromatography A, 1996. **720**(1-2): p. 119-126.
42. Alpert, A.J., *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*. Journal of Chromatography A, 1990. **499**: p. 177-196.

43. Hemstrom, P. and K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(12): p. 1784-1821.
44. Alpert, A.J., M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly and R. Orlando, *Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates*. Journal of Chromatography A, 1994. **676**(1): p. 191-202.
45. Churms, S.C., *Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction*. Journal of Chromatography A, 1996. **720**(1-2): p. 75-91.
46. Thibault, P., *Notes de cours, CHM6140*. 2006, Montréal: Université de Montréal.
47. Morelle, W., A. Page and J.-C. Michalski, *Electrospray ionization ion trap mass spectrometry for structural characterization of oligosaccharides derivatized with 2-aminobenzamide*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(9): p. 1145-1158.
48. Morelle, W. and J.C. Michalski, *Sequencing of oligosaccharides derivatized with benzylamine using electrospray ionization-quadrupole time of flight-tandem mass spectrometry*. Electrophoresis, 2004. **25**(14): p. 2144-2155.
49. Domon, B. and C.E. Costello, *A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates*. Glycoconjugate Journal, 1988. **5**(4): p. 397-409.
50. Pasanen, S., J. Janis and P. Vainiotalo, *Cello-, malto- and xylooligosaccharide fragmentation by collision-induced dissociation using QIT and FT-ICR mass spectrometry: A systematic study*. International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **263**(1): p. 22-29.
51. Harvey, D.J., R.H. Bateman and M.R. Green, *High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(2): p. 167-187.
52. Bahrke, S., J.M. Einarsson, J. Gislason, S. Haebel, M.C. Letzel, J. Peter-Katalinic and M.G. Peter, *Sequence analysis of chitoooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsource decay mass spectrometry*. Biomacromolecules, 2002. **3**(4): p. 696-704.
53. Lattova, E. and H. Perreault, *Labelling saccharides with phenylhydrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2003. **793**(1): p. 167-179.
54. Lattova, E., S. Snovida, H. Perreault and O. Krokhin, *Influence of the labeling group on ionization and fragmentation of carbohydrates in mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(5): p. 683-696.
55. Evangelista, R.A., A. Guttman and F.-T.A. Chen, *Acid-catalyzed reductive amination of aldoses with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate*. Electrophoresis, 1996. **17**(2): p. 347-351.
56. Guttman, A., F.-T.A. Chen, R.A. Evangelista and N. Cooke, *High-resolution capillary gel electrophoresis of reducing oligosaccharides labeled with 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate*. Analytical Biochemistry, 1996. **233**(2): p. 234-242.



57. Boulay, C., *Développement d'une méthode de séparation d'un mélange de chitine et de chitosane par électrophorèse capillaire et détection par fluorescence induite par laser dans le tampon histidine*, Rapport de stage, 2006, Université de Montréal, Montréal, 28.
58. César, A., *Étude des paramètres de séparation CE-LIF pour l'analyse d'oligosaccharides de chitosanes produits par déacétylation enzymatique*, Rapport de stage, 2006, Université de Montréal, Montréal, 28.
59. Guttman, A., *Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1997. **763**(1-2): p. 271-277.
60. Beaudoin, M.E., *Développement de méthodes de séparation des oligosaccharides de chitine et de chitosane par électrophorèse capillaire*, Mémoire de maîtrise, 2005, Université de Montréal, Chimie, Montreal, 116.
61. Foret, F., T.J. Thompson, P. Vouros, B.L. Karger, P. Gebauer and P. Bocek, *Liquid sheath effects on the separation of proteins in capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(24): p. 4450-4458.
62. Lattova, E. and H. Perreault, *Profiling of N-linked oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2003. **1016**(1): p. 71-87.
63. Klampfl, C.W., *Review coupling of capillary electrochromatography to mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1044**(1-2): p. 131-144.
64. Kindt, E.K., S. Kurzyniec, S.-C. Wang, G. Kilby and D.T. Rossi, *Quantitative bioanalysis of enantiomeric drugs using capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **31**(5): p. 893-904.
65. Hau, J. and M. Roberts, *Advantages of pressurization in capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(18): p. 3977-3984.
66. Goncalves, A.G., D.R.B. Ducatti, R.G. Paranha, M. Eugenia, R. Duarte and M.D. Nosedá, *Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation*. Carbohydrate Research, 2005. **340**(13): p. 2123-2134.
67. Behr, J.R., Y. Matsumoto, F.M. White and R. Sasisekharan, *Quantification of isomers from a mixture of twelve heparin and heparan sulfate disaccharides using tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(18): p. 2553-2562.
68. Berman, E.S.F., K.S. Kulp, M.G. Knize, L. Wu, E.J. Nelson, D.O. Nelson and K.J. Wu, *Distinguishing monosaccharide stereo- and structural isomers with TOF-SIMS and multivariate statistical analysis*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(18): p. 6497-6503.
69. Schmitt-Kopplin, P. and M. Englmann, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003-2004*. Electrophoresis, 2005. **26**(7-8): p. 1209-1220.
70. Servais, A.C., J. Crommen and M. Fillet, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry, an attractive tool for drug bioanalysis and biomarker discovery*. Electrophoresis, 2006. **27**(13): p. 2616-2629.

71. Tagliaro, F. and F. Bortolotti, *Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2001-2004)*. Electrophoresis, 2006. **27**(1): p. 231-243.
72. Fan, J.Q., A. Kondo, I. Kato and Y.C. Lee, *High-performance liquid chromatography of glycopeptides and oligosaccharides on graphitized carbon columns*. Analytical Biochemistry, 1994. **219**(2): p. 224-229.
73. Aronson, N.N., B.A. Halloran, M.F. Alexyev, L. Amable, J.D. Madura, L. Pasupulati, C. Worth and P. Van Roey, *Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of Serratia marcescens chitinase A*. Biochemical Journal, 2003. **376**: p. 87-95.
74. Hekmat, O., K. Tokuyasu and S.G. Withers, *Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a Deuteromycete, Colletotrichum lindemuthianum: an investigation using steady-state kinetic analysis and MS*. Biochemical Journal, 2003. **374**: p. 369-380.
75. Kumar, A.B.V., M.C. Varadara, L.R. Gowda and R.N. Tharanathan, *Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against Bacillus cereus and Escherichia coli*. Biochemical Journal, 2005. **391**: p. 167-175.
76. Lee, R., A.S. Ptolemy, L. Niewczas and P. Britz-McKibbin, *Integrative metabolomics for characterizing unknown low-abundance metabolites by capillary electrophoresis-mass spectrometry with computer simulations*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(2): p. 403-415.
77. Allen, D. and Z. El Rassi, *Capillary electrochromatography with monolithic silica columns III. Preparation of hydrophilic silica monoliths having surface-bound cyano groups: chromatographic characterization and application to the separation of carbohydrates, nucleosides, nucleic acid bases and other neutral polar species*. Journal of Chromatography A, 2004. **1029**(1-2): p. 239-247.
78. Que, A.H. and M.V. Novotny, *Separation of neutral saccharide mixtures with capillary electrochromatography using hydrophilic monolithic columns*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(20): p. 5184-5191.
79. Que, A.H. and M.V. Novotny, *Structural characterization of neutral oligosaccharide mixtures through a combination of capillary electrochromatography and ion trap tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **375**(5): p. 599-608.