

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM



Année 2015

Apport des dernières évolutions en spectrométrie de masse pour l'étude structurale des polysaccharides

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline :

section 31 - Chimie théorique, physique, analytique

section 64 - Biochimie et biologie moléculaire

Présentée

et soutenue publiquement par

David ROPARTZ

Le 5 MARS 2015, devant le jury ci-dessous

Président Charles TELLIER, Professeur d'Université, Université de Nantes – CNRS UMR6286

Rapporteurs Olivier LAPREVOTE, Professeur des Universités-Praticien, Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques - Université Paris Descartes

Sébastien FORT, Chargé de Recherche, Centre de Recherche sur les Macromolécules
Végétales CERMAV CNRS UPR5301

Examineurs Julia CHAMOT-ROOKE, Directeur de Recherche CNRS, Institut Pasteur

Mirjam CZJZEK, Directeur de recherche, CNRS UPMC Station Biologique de Roscoff
UR8227

Directeur de thèse : Marie-Christine RALET

Co-Directeur de thèse : Jérôme LEMOINE

Co-encadrante : Hélène ROGNIAUX

*A Aëlig,
A Emmanuelle,
A mes parents, ma sœur et mon frère.*

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord ma directrice de thèse Marie-Christine Ralet et mon co-directeur Jérôme Lemoine pour avoir suivi mon travail tout au long de ces quatre années. Je remercie tout particulièrement Hélène Rogniaux pour son encadrement de tous les jours, ses conseils, sa patience et sa "tremendous" implication tout au long de mon travail de thèse.

Je tiens à remercier Olivier Laprêvote et Sébastien Fort d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également Julia Chamot-Rooke, Mirjam Czjzek et Charles Tellier d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant ma thèse.

Tout particulièrement, je remercie Alexandre Giuliani du Synchrotron SOLEIL pour son accueil sur DISCO, pour ces fructueux proposals, ces longues journées/soirées/nuits de discussion, d'acquisitions et de traitement de données et pour avoir changé d'avis sur l'analyse des sucres. J'associe à ces remerciements Mathieu Réfrégiers et tout le personnel de SOLEIL que j'ai pu côtoyer. La qualité de l'accueil contribue grandement au succès des manips.

Je remercie Philippe Dugourd et Jérôme Lemoine ainsi que toutes leurs équipes et spécialement Quentin pour leur accueil à Lyon.

Je tiens également à remercier Mirjam Czjzek, Cécile Hervé et Murielle Jam ainsi que William Helbert et Maude Fer pour tous les défis scientifiques qu'ils ont su nous poser lors de nos collaboration.

Je remercie Charles Tellier et son équipe, tout spécialement David et Amélie pour notre collaboration.

Je veux également remercier les stagiaires que j'ai encadrés durant ma thèse, Yann, Mathieu et Djibril pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée par leur impressionnant travail.

Je remercie la société Bruker qui nous a accueillis à Brême sur le FT, pas découragé de casser des sucres avec un électron!

Je veux également remercier tous mes collègues avec qui j'ai pu travailler et échanger lors de ces dernières années à Nantes. De la masse d'abord, je remercie Audrey, Pierre, Dusan et Marija mais également tous les membres de la plate-forme BiBS et de l'équipe PVPP

Pour mes années pré-nantaise, je voudrais remercier Charles Pineau qui m'a mis devant mon premier spectro de masse il y a 11 ans et Pierre Guénot pour le temps qu'il a passé à nous transmettre sa passion le soir.

Je voudrais également remercier Christine Horlow qui m'a accueilli pour mon premier job à Versailles et tous les membres de la SGAP et spécialement Pierre et Richard.

Je n'oublie pas tous les copains qui ont su/pu/du me supporter durant ces longues années d'études.

Marco et Dherby de Mirabeau à nos jours, avec un paquet d'histoires à raconter, de flims, de clips, d'andouillettes, de Georges (Lucas et Abitbol),...

Ludo, Yoann et Johann, les apérhumistes séminaristes de la Bioch' de Rennes, pour ces soirées parisiennes, ces descentes de pistes suisses et ces virées en Europe. Prochaine destination?

Les handballeurs de France et de Navarre depuis 24 ans en passant par la sport'et, Bédée, Cesson, le CPB, Hazebrouck, Bouguenais et j'en passe....

Et toutes les personnes qui m'ont fait avancer et qui m'ont porté où j'en suis.

Enfin, je veux remercier ma famille.

Aëlig, mon petit bonhomme, qui me couvre de "câlins papa" et me fait découvrir chaque jour toutes les joies de la paternité.

Emmanuelle qui partage ma vie, les bons et les moins bons moments depuis 9 ans. Tu es formidable. Je te remercie pour ton soutien, ta patience et tes encouragements et pour m'avoir donné notre fils.

Enfin mes parents qui m'ont toujours poussé à faire ce que je voulais. Pour leur éducation, leur amour et tout ce qu'ils nous ont apporté à moi, ma sœur et mon frère. J'en profite pour remercier les expats Allemand et Canadien. Maud et Cédric, vous êtes loin mais je pense à vous.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	12
CONTEXTE ET OBJECTIF DE LA THESE	16
INTRODUCTION	19
1. Structures et fonctions des polysaccharides végétaux	20
1.1. Eléments constitutifs : les monosaccharides	20
1.1.1. Structure linéaire des monosaccharides	20
1.1.2. Cyclisation des monosaccharides	20
1.2. Polysaccharides	21
1.2.1. Structure	21
1.2.1.1. Squelette principal	21
1.2.1.2. Modifications	21
1.2.1.3. Ramifications	22
1.2.2. Introduction aux structures étudiées	22
1.2.2.1. Parois primaire et secondaire des végétaux terrestres	22
1.2.2.2. Parois des végétaux marins	23
1.2.3. Biosynthèse des polysaccharides	24
1.2.4. Fonctions biologiques et propriétés d'usage des polysaccharides des végétaux	24
1.2.4.1. Réserves énergétiques	24
1.2.4.2. Rôle dans la structure des cellules végétales	25
1.2.4.3. Mécanisme de défense et signalisation	26
1.2.4.4. Fonctions d'usage	27
2. Méthodes de caractérisation de la structure des polysaccharides	29
2.1. Caractérisation de la composition en ose et/ou des branchements des sous unités	29
2.2. Caractérisation de la structure fine des polysaccharides par RMN	29
2.3. Caractérisation de la structure fine des polysaccharides par spectrométrie de masse	30
2.3.1. Production des ions : source d'ionisation	30
2.3.2. Type d'ions produits	31
2.3.3. Analyseur / Gamme de masse	32

3. Travaux développés dans le cadre de la thèse.....	33
3.1. Utilisation des outils enzymatiques pour la déconstruction des polysaccharides et leur analyse structurale.....	33
3.2. Outils de séparation couplés à la spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale d'oligosaccharides en mélange et la résolution des isoformes.....	34
3.3. Exploration d'un nouveau mode de fragmentation pour la caractérisation de la structure fine des oligosaccharides, la photodissociation.....	35
3.3.1. Fragmentation des oligosaccharides et nomenclature.....	35
3.3.2. Méthodes de fragmentation.....	35
3.3.2.1. Dissociation activée par collision à basse énergie (IE-CAD).....	35
3.3.2.2. Dissociation activée par collision à haute énergie (HE-CAD).....	36
3.3.2.3. Réaction ion/électron.....	36
3.3.2.4. Réaction ion/photon.....	37

DECOUVERTE DE NOUVEAUX OUTILS ENZYMATIQUES POUR LA DECONSTRUCTION DES POLYSACCHARIDES ET LEUR ANALYSE STRUCTURALE

1. Contexte.....	40
2. Contraintes analytiques des techniques de criblage.....	41
3. Objectif du travail.....	42
4. Résumé des étapes du travail réalisé.....	43
5. Publication.....	44
6. Conclusions.....	57
7. Données supplémentaires.....	57

AMELIORATION DES METHODES SEPARATIVES POUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDES EN MELANGE ET LA RESOLUTION DES ISOMERES

Couplage CCM-MALDI pour la caractérisation de régioisomères obtenus par glycosyltransférase

1. Contexte.....	60
2. Couplage CCM-spectrométrie de masse.....	61
3. Optimisation de l'étape de dépôt de la matrice à la surface de la plaque CCM.....	62
3.1. Sélection de la matrice.....	62
3.2. Dépôt de la matrice.....	62
3.2.1. Trempage.....	63

3.2.2.Sublimation.....	63
3.2.3.Robot ImagePrep.....	63
3.2.4.Electronébulisation / Aérographe.....	64
4. Application de la méthode CCM-MALDI à deux études de suivi d'activité de transglycosylation.....	65
4.1. Caractérisation structurale des produits d'une enzyme de transglycosylation en fonction de la nature du groupement accepteur.....	65
4.2. Caractérisation de régio-isomères.....	67

Développements de la chromatographie IP-RP-UHPLC pour séparer et résoudre des mélanges complexes

1. Contexte.....	69
2. Séparation des oligosaccharides par chromatographie liquide.....	69
3. Chromatographie liquide en phase inverse avec appariement d'ions (IP-RP).....	71
4. Objectif du travail.....	73
5. Optimisation du système d'appariement d'ions.....	73
5.1. Sélection du contre-ion.....	73
5.2. Evaluation et optimisation.....	74
5.3. Application des conditions optimisées sur un mélange complexe et évaluation de la reproductibilité.....	74
6. Séparation chromatographique et identification des constituants des chaînes latérales du rhamnogalacturonane de type II.....	75
6.1. Etude des extraits 2.2 et 2.3 (chaîne A).....	76
6.1.1.Analyses MALDI TOF MS.....	76
6.1.2.Analyse LC-MS de l'extrait 2.3.....	77
6.2. Etude des extraits 1 et 2.1 (chaîne B).....	78
6.2.1.Analyses MALDI TOF MS.....	78
6.2.2.Analyse LC-MS de l'extrait 2.1.....	79
7. Conclusions.....	80

LA PHOTODISSOCIATION DANS L'UV EXTREME : EXPLORATION D'UN NOUVEAU MODE DE FRAGMENTATION POUR LA CARACTERISATION DE LA STRUCTURE FINE DES OLIGOSACCHARIDES

<u>Limitation de la spectrométrie de masse pour l'analyse structurale des oligosaccharides</u>	83
---	-----------

1. Contexte.....	83
2. Illustration	84
2.1. IE-CID en mode positif.....	84
2.2. LeCID en mode négatif.....	85

Résolution des isomères produits en mélange par la dégradation enzymatique d'un constituant des pectine, l'homogalacturonane

87

1. Contexte.....	87
2. Objectif du travail.....	87
3. Résumé du travail.....	89
4. Publication.....	90
5. Conclusion.....	103

Spécification de l'activité d'une nouvelle enzyme de dégradation d'un polysaccharide marin par la caractérisation structurale fine de ses produits de dégradation

104

1. Contexte.....	104
2. Objectif du travail.....	104
3. Résumé du travail.....	105
4. Publication.....	106
5. Conclusion.....	115

CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES A CE TRAVAIL

116

BIBLIOGRAPHIE

122

SYNTHESE DES REALISATIONS

131

ANNEXES

135

1- <u>Structure des oligosaccharides discutés dans le manuscrit</u>	136
2- <u>Données supplémentaires fournies avec la publication Ropartz, D et al. RCMS 2011, 25, 2059-2070</u>	145
3- <u>Données supplémentaires fournies avec la publication Ropartz, D et al. Analytica Chimica Acta 2014, 807, 84-95</u>	154
4- <u>Données supplémentaires fournies avec la publication Ropartz, D et al. Analytical Chemistry Acceptée le 13/12/2014</u>	159

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Enantiomères de l'Erythrose représentés sous forme de Fisher.....	20
Figure 2. Structure des monosaccharides dextrogyres potentiels représentés sous forme de Fisher. A/ Série des aldoses; B/ Série des cétooses.....	20
Figure 3. Forme cyclique du glucose selon : à gauche, la projection de Fischer qui ne permet pas de représenter l'anomérie ; à droite les formules de Haworth.....	20
Figure 4. Mutarotation est équilibre tautomérique pour l'exemple du glucose.....	20
Figure 5. Isomères naturels (α à gauche et β à droite) des homodimères de Glucose selon les formules de Haworth.....	21
Figure 6. Modifications communes des polysaccharides.....	21
Figure 7. Modèle de la structure de la pectine ^(2,3)	22
Figure 8. Modèle de la structure de la paroi primaire des végétaux.....	22
Figure 9. Biosynthèse des polysaccharides.....	24
Figure 10. Principe de l'ionisation MALDI.....	30
Figure 11. Principe de l'ionisation Electrospray.....	31
Figure 12. Spectre MALDI TOF MS d'un digestat de galactomannane d'arganier par une mannanase en ionisation positive.....	33
Figure 13. Nomenclature de Domon et Costello pour l'annotation des spectres MS/MS des oligosaccharides.....	35
Tableau 1. Récapitulatifs des méthodes d'interaction ion/électron pour la caractérisation structurale en spectrométrie de masse.....	37
Tableau 2. Récapitulatif des travaux utilisant la photodissociation dans l'UV et le VUV pour la caractérisation structurale des oligosaccharides.....	38
Figure 14. Plateforme complète de criblage d'activité enzymatique développée au laboratoire.....	57
Tableau 3. Résultats obtenus pour le crible de 96 polysaccharides incubé avec un lysat de <i>P. atlantica</i> pour trois méthodes de détection de la dégradation enzymatique.....	58

Figure 15. Principe de l'approche CCM MALDI.....	61
Figure 16. Analyse CCM-MALDI-MS après migration des trois standards commerciaux déposés en quatre points et application de la matrice avec le système ImagePrep.....	64
Figure 17. Chromatogrammes d'ions extraits pour les masses des trois standards commerciaux en fonction de l'intensité du laser et du nombre de couches de matrice appliquées.....	65
Figure 18. Réaction enzymatique théorique.....	66
Figure 19. Analyses CCM-MALDI-MS des trois isomères de transglycosylation.....	66
Figure 20. Analyses CCM-MALDI-MS/MS des trois isomères de transglycosylation.....	66
Figure 21. Structure des isomères du Lacto-N-fucopentaose.....	67
Figure 22. Analyse CCM-MALDI-MS/MS mélange LNFP1/LNFP2.....	67
Figure 23. Alignement des analyses CCM-MALDI-MS des standards (LNFP1 et LNFP2) des produits de l'enzyme sauvage PL (sauvage LNFP1) et des produits des deux mutants VLMW et P25.....	67
Figure 24. Mécanisme d'appariement d'ions des oligosaccharides anioniques sur des surfaces hydrophobes greffées C18.....	71
Figure 25. Principe de la séparation des oligosaccharides en chromatographie d'appariement d'ion.....	71
Figure 26. Spectre MALDI-TOF des molécules de référence pour l'étude de la compatibilité des solvants IPR avec la méthylestérification.....	73
Figure 27. Cinétique de déméthylestérification du standard d'acide galacturonique-trimethylester.....	73
Figure 28. UV à 232 nm de la séparation IP-RP-UHPLC en utilisant l'acetate et le formate comme contre-ion de la fraction SEC DP4 d'homogalacturonanes digéré par une lyase.....	74
Figure 29. UV à 232 nm de la séparation IP-RP-UHPLC de 15 injections de l'échantillon HGB69.....	74
Figure 30. Protocole d'extraction des constituants du rhamnogalacturonane de type 2.....	76
Figure 31. Réaction d'amination réductive des oses.....	76
Tableau 4. Structures de la chaîne A du RG2, identifiées par MALDI TOF MS dans les extraits 2.2 et 2.3.....	77

Figure 32. Chromatogramme d'ion de l'analyse IP-RP-UPLC-MS MS de la fraction 2.3 contenant la chaîne A du rhamnogalacturonane de type 2	77
Tableau 5. Liste des espèces identifiées par analyse IP-RP-UPLC MS dans l'extrait 2.3 et attribuées à la chaîne A du RG2	78
Tableau 6. Liste des espèces attribuées à des degrés de polymérisation supérieurs de la chaîne A du RG2 identifiées par analyse IP-RP-UPLC MS dans l'extrait 2.3	78
Tableau 7. Structures de la chaîne B du RG2 identifiées par MALDI TOF MS dans les extraits 1 et 2.1	79
Figure 33. Chromatogramme d'ion de l'analyse IP-RP-UPLC MS (mode positif en haut, mode négatif en bas) de la fraction 2.1 contenant la chaîne B du rhamnogalacturonanes de type 2	79
Figure 34. Structure potentielle de la chaîne B du rhamnogalacturonane de type 2 en fonction des espèces retrouvées en IP-RP-UPLC-MS en mode positif et négatif	80
Figure 35. Analyse ESI-MS/MS en mode positif de la fraction correspondant à l'isomère du DP5DM4 d'homogalacturonane	84
Figure 36. Analyse ESI-MS/MS en mode positif de la fraction correspondant à l'isomère A du DP5DM4 d'homogalacturonane marqué en extrémité réductrice par de l'oxygène ^{18}O	84
Tableau 8. Correction des annotations du spectre réalisées grâce au marquage ^{18}O	85
Figure 37. Spectre ESI-MS/MS de l'infusion en mode négatif des 2 isomères correspondant au DP5DM4 d'oligogalacturonane séparées en chromatographie liquide IP-RP-UHPLC et collectées	85
Figure 38. Spectre ESI-MS/MS de l'infusion en mode négatif des 2 isomères correspondant au DP5DM4 d'oligogalacturonane séparées en chromatographie liquide IP-RP-UHPLC, collectées et marquées à l' ^{18}O	85
Figure 39. Structure des deux isomères de DP5DM4 marquées à l' ^{18}O . Les fragments observés en ESI-MS/MS en mode négatif sont reportés sur ces structures	86
Figure 40. Spectre ESI-UPVD à 220 nm de l'infusion en mode positif du DP3DM3 et du DP4DM4 d'homogalacturonanes	88

LISTE DES ABBREVIATIONS

LISTE DES ABBREVIATIONS

ESI : Ionisation par électrospray

MALDI : Ionisation/désorption laser assistée par matrice

D : Dextrogyre

L : Levogyre

HG : Homogalacturonane

RGI : Rhamnogalacturonanes de type 1

RGII : Rhamnogalacturonanes de type 2

RMN : Résonance magnétique nucléaire

DNP : Polarisation dynamique nucléaire

MS : Spectrométrie de masse

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

TOF : Temps de vol

CAZy : Banque de données des enzymes actives sur les carbohydrates

GHs : Glycoside hydrolases

GTs : GlycosylTransferases

PLs : Polysaccharide Lyases

CEs : Carbohydrate Esterases

DP : Degré de polymérisation

CCM : Chromatographie sur couche mince

nr-ext : Extrémité non réductrice

r-ext Extrémité réductrice

FTICR : Spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier

IE-CAD : Dissociation assistée par collision à basse énergie

IE-CID : Dissociation induite par collision à basse énergie

HE-CAD : Dissociation assistée par collision à haute énergie

HE-CID : Dissociation induite par collision à haute énergie

EID : Dissociation induite par électron

ECD : Dissociation par capture d'électron

ETD : Dissociation par transfert d'électron

EDD : Dissociation par détachement d'électron

nETD : Dissociation par transfert d'électron en mode négatif

IRMPD : Dissociation multi photonique dans l'infrarouge

VUV : Ultra-violet lointain

PD : Photo-dissociation

VUVPD : photodissociation dans l'ultra-violet lointain

HPSEC : Chromatographie d'exclusion stérique haute performance

HPAEC : Chromatographie échangeuse d'anion haute performance

YAG : grenat d'yttrium-aluminium

DMA/DHB : matrice MALDI Diméthylaniline / acide 2,5-dihydroxybenzoïque

IP : Appariement d'ion

RP : Phase inverse

UHPLC : Chromatographie liquide ultra haute performance

QIT-TOF : Spectromètre de masse hybride quadripôle – trappe d'ion – temps de vol

Q-TOF : Spectromètre de masse hybride quadripôle – temps de vol

sDHB : matrice MALDI 90% acide 2,5-dihydroxybenzoïque / 10% acide 2-hydroxy-5-methoxybenzoïque

LNFP : Lacto-N-fucopentaose

HMOs : Oligosaccharides du lait humain

LNT : Lacto-N-tetraose

AEC : Chromatographie échangeuse d'anion

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

NP : Phase normale

HILIC : Chromatographie d'interaction hydrophile

PGC : Carbone Graphite poreux

TBA : tributylamine

HFIP : 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol

PTA : Pentylamine

HXA : Hexylamine

HA : Heptylamine

BEH : pontage hybride éthylène

DM : Degré de méthylation

RT : Temps de rétention

aEPD : Dissociation par photo-détachement d'électron activée

DPI : Photo-ionisation dissociative

IC : Conversion interne

IVR : Redistribution interne de vibration

EPD : Dissociation par photo-détachement d'électron

CONTEXTE ET OBJECTIF DE LA THESE

CONTEXTE ET OBJECTIF DE LA THESE

Les polysaccharides représentent les polymères naturels les plus abondants sur notre planète. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques chez les plantes, les algues, les animaux et les micro-organismes.

Leurs propriétés biologiques, comme leurs fonctionnalités d'usage, dépendent fortement de leurs structures et peuvent être impactées par des modifications chimiques subtiles. Être capable de caractériser finement ces structures est donc fondamental, à la fois pour mieux comprendre leur rôle biologique et pour mieux maîtriser leur utilisation dans diverses industries (agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique). Compte-tenu de la complexité, de l'hétérogénéité et de la taille des structures rencontrées dans la nature pour ces molécules, la plupart demeurent inconnues ou incomplètement résolues, et la question pose encore un véritable défi aux sciences analytiques.

La spectrométrie de masse, par sa précision, sa sensibilité, ses capacités d'analyse structurale et sa relative tolérance à la complexité moléculaire des échantillons est une méthode attirante pour aborder cette question. Les modes d'ionisation par électrospray (ESI) ou par ionisation désorption laser assisté par matrice (MALDI) sont largement utilisés pour déterminer les caractéristiques structurales des peptides et des protéines. L'application à l'analyse structurale des polysaccharides est cependant moins répandue. Elle est, de fait, rendue plus délicate pour différentes raisons, parmi lesquelles : i) une ionisation fortement dépendante de la nature chimique hétérogène des analytes ; ii) l'existence de nombreuses isoméries naturelles ; iii) la labilité de certains substituants, qui rend difficile leur localisation.

Dans ce contexte, le travail de thèse se propose d'évaluer l'apport, dans la résolution de la structure des polysaccharides, de quelques avancées instrumentales récentes en spectrométrie de masse et dans les techniques séparatives que l'on peut y coupler. Il s'articulera autour de trois grands thèmes :

- La découverte de nouveaux outils enzymatiques pour la déconstruction des polysaccharides et leur analyse structurale ;
- Le développement d'outils de séparation couplés à la spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale d'oligosaccharides en mélange et la résolution des isoformes ;
- L'exploration d'un nouveau mode de fragmentation, la photodissociation, pour la caractérisation de la structure fine des oligosaccharides.

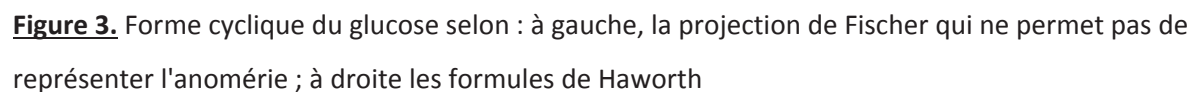
Le manuscrit se découpe en :

- Une introduction ;
- Une présentation des résultats divisée en :
 - Une partie I qui traite du criblage d'activité enzymatique ;
 - Une partie II qui concerne l'utilisation des techniques séparatives pour la résolution de mélanges très complexes ;
 - Une partie III qui présente l'apport de la photodissociation des oligosaccharides pour leur caractérisation structurale fine.
- Une conclusion et différentes perspectives à ce travail.

INTRODUCTION



A/ Série des aldoses; B/ Série des cétones.



INTRODUCTION

1. Structures et fonctions des polysaccharides végétaux

1.1. Eléments constitutifs : les monosaccharides

1.1.1. Structure linéaire des monosaccharides

Les polysaccharides sont des biopolymères hautement complexes et hétérogènes constitués de monosaccharides ou oses. Il existe un très grand nombre de monomères constitutifs. Ces monosaccharides sont des poly-hydroxy-aldéhydes (ou aldoses) et des poly-hydroxy-cétones (ou cétooses) possédant au minimum 3 atomes de carbone (appelés trioses). De plus, chaque monosaccharide peut être, en fonction de sa chiralité, Dextrogyre (D) ou Levogyre (L). Un exemple est présenté Figure 1 pour le cas des deux énantiomères de l'erythrose (monosaccharide de la série des aldoses présentant 4 carbones).

De plus, pour chaque énantiomère, il existe une série de molécules isomériques selon le nombre de carbones du monosaccharide (exemple de la série D-aldose Figure 2A et D-cétoose Figure 2B). Si l'on considère uniquement les hexoses (6 carbones) on obtient 24 isomères possibles (8 aldoses, 4 cétooses pour chaque série D et L).

1.1.2. Cyclisation des monosaccharides

Sous forme naturelle, dans les polysaccharides, l'ensemble de ces constituants monosaccharidiques se retrouvent sous forme hétérocyclique par hémiacétylation intramoléculaire. Pour un hexose donné, il existe une forme pyrane (hétérocycle à 6 éléments : 5 carbones, 1 oxygène) et furane (hétérocycle à 5 éléments : 4 carbones, 1 oxygène). Cette réaction d'hémiacétylation donne naissance à un nouveau carbone asymétrique (ou chiral) dans la molécule, qui crée une anomérie, notée α ou β , selon l'orientation de la fonction hydroxyle portée par le carbone anomérique et de la fonction CH_2OH terminale par rapport au plan du cycle. L'exemple présenté Figure 3 montre les quatre différentes formes cycliques du D-Glucose. Il existe donc hypothétiquement, pour un nombre de carbones donné, un nombre très important d'isomères. Si l'on prend l'exemple des hexoses, il existe 96 molécules isomériques potentielles. Cependant toutes ces formes ne sont pas présentes dans la nature. Au niveau du carbone anomérique, le cycle osidique s'ouvre et se referme naturellement provoquant des mutarotations (Figure 4). Des équilibres tautomériques existent entre les différentes formes qui conduisent à des prédominances de certaines espèces. Pour l'exemple du glucose, les formes furanes sont présentes naturellement à moins de 1% alors que l'on trouvera 65% de β -D-glucopyranose et 35 % de α -D- glucopyranose. De plus, ces différentes formes ne sont pas toutes synthétisables par les organismes.

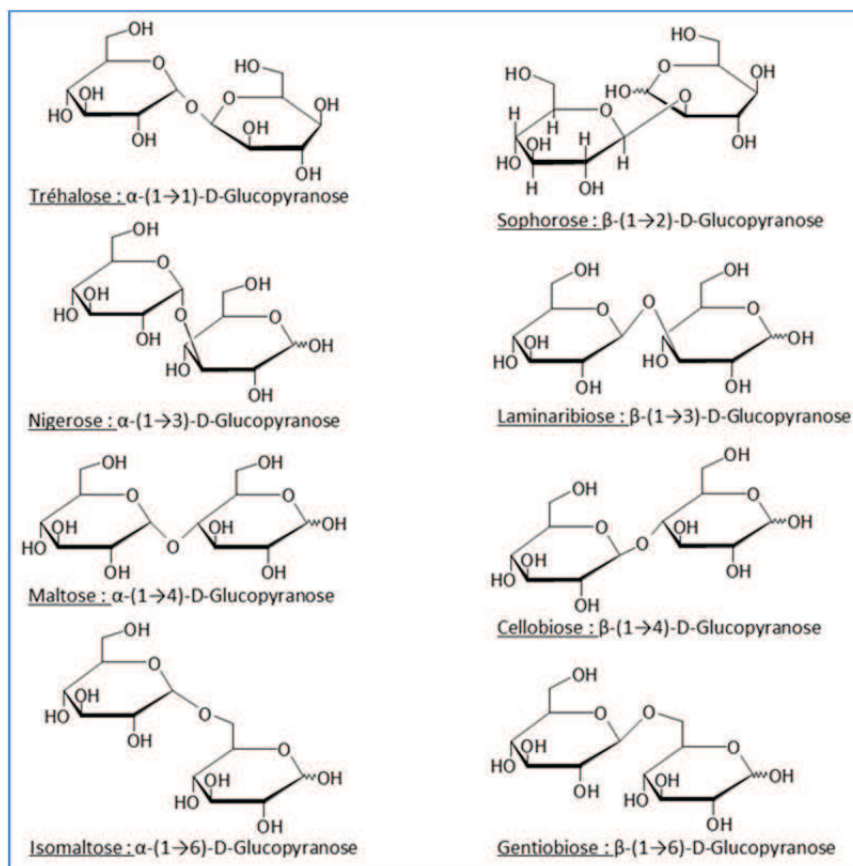


Figure 5. Isomères naturels (α à gauche et β à droite) des homodimères de glucose selon les formules de Haworth

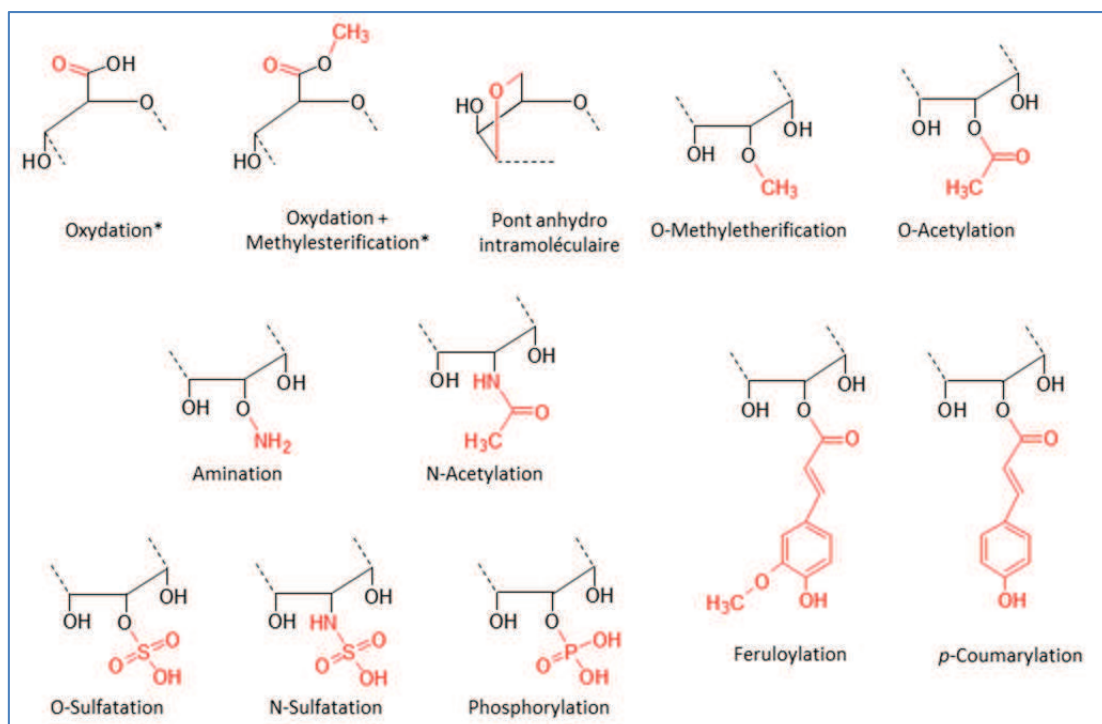


Figure 6. Modifications communes des polysaccharides

1.2. Polysaccharides

1.2.1. Structure

1.2.1.1. Squelette principal

Le squelette principal des polysaccharides est formé par un enchaînement de monosaccharides. Ces structures se forment par condensation entre le carbone anomérique d'un monomère et une fonction alcool (primaire ou secondaire) libre d'un second monomère. Cette réaction consiste en une déshydratation intramoléculaire qui forme une liaison osidique, bloquant ainsi la mutarotation ainsi que l'activité réductrice du monosaccharide impliqué en C1. Si l'on prend un exemple simple de disaccharides constitués exclusivement de glucose (homodimères), la présence de quatre fonctions alcools libres permet un grand nombre d'isomères de branchement. La Figure 5 présente les huit isomères naturels des dimères de glucose.

La diversité de la structure primaire des polysaccharides, liée aux différents types de monosaccharides (puisque la majeure partie d'entre eux sont des hétéropolymères) et démultipliée par le type de branchements potentiels, est donc très importante. Il existe ainsi 10^{12} configurations possibles pour un hexasaccharide réduit ⁽¹⁾.

1.2.1.2. Modifications

Les monosaccharides peuvent être fonctionnalisés naturellement par des modifications portées par les fonctions alcools non impliquées dans les liaisons osidiques (Figure 6).

Une des modifications les plus répandues est l'oxydation de la fonction alcool primaire en C₆ d'un hexose produisant un acide uronique. Cette fonction acide modifie les propriétés de charge du polysaccharide et impacte donc fortement ses fonctions. Chez les plantes, les α -acide-D-galacturonopyranoses sont les monomères constitutifs majeurs des trois sous-unités principales des pectines (homogalacturonanes (HG) et rhamnogalacturonanes de type 1 (RGI) et 2 (RGII)), qui représentent environ 35% du poids sec de la paroi des dicotylédones ⁽²⁾. Ce type de modification n'est pas limité aux plantes terrestres. Les α -acide-L-guluronopyranoses et β -acide-D-mannuronopyranoses sont les constituants des alginates dans les algues brunes. Les β -acide-D-glucuronopyranoses et α -acide-L-iduronopyranoses sont présents chez les algues vertes dans les ulvanes, et sont des constituants majeurs des glycosaminoglycanes constitutifs des matrices extracellulaires des tissus conjonctifs chez les mammifères. De nombreuses autres modifications chimiques sont décrites sur les polysaccharides : la méthylation, la O- et N-acetylation, la O et N-sulfatation, par exemple. Ces modifications sont intégrées par des enzymes spécifiques et ont un rôle crucial dans l'activité et les propriétés des polysaccharides.

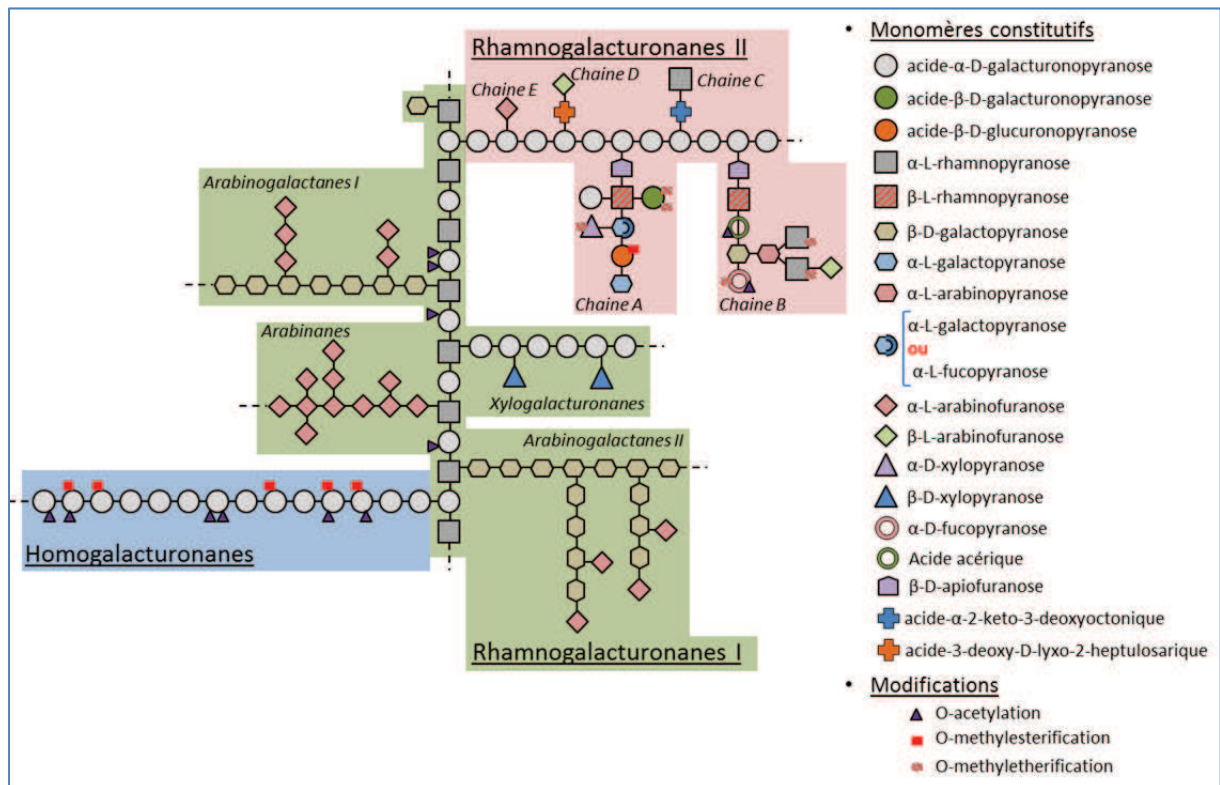


Figure 7. Modèle de la structure de la pectine ^(2,3)

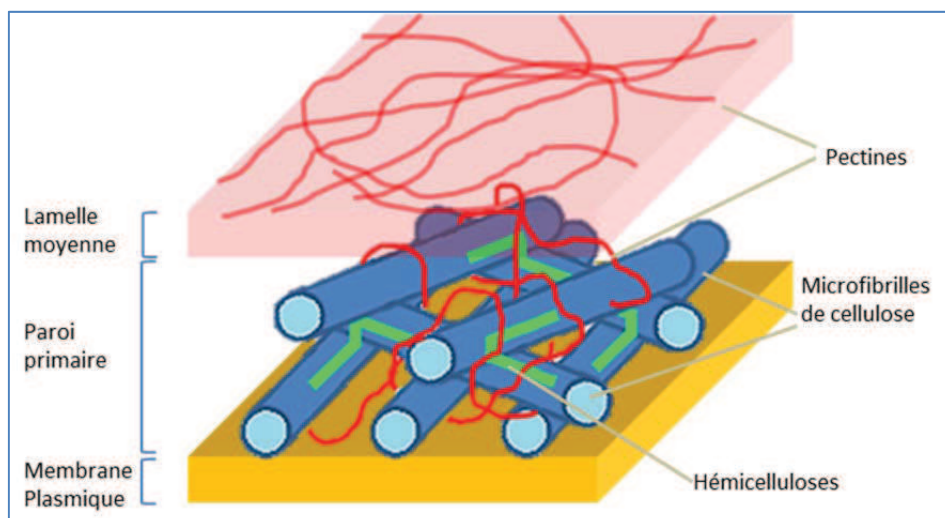


Figure 8. Modèle de la structure de la paroi primaire des végétaux

1.2.1.3. Ramifications

Une des particularités des polysaccharides, si on les compare notamment aux protéines ou aux acides nucléiques, est qu'ils sont rarement constitués de structures linéaires. Chaque fonction alcool libre peut être branchée à une structure polysaccharidique latérale. La pectine est un exemple de l'extrême complexité que l'on peut rencontrer dans les polysaccharides. Un modèle de représentation de cette macromolécule est présenté Figure 7 (ne sont pas indiqués sur ce schéma les différents types de branchements). Cette supramolécule est composée de plus de 15 monomères constitutifs différents pouvant être sujets à plusieurs types de modifications. Elle comprend une chaîne linéaire dite homogalacturonane composée d'un enchaînement d' α -acide-D-galacturonopyranose, mais aussi de deux autres domaines, les rhamnogalacturonanes de type 1 (RG1) et de type 2 (RG2). Ces domaines, constitués chacun d'une chaîne principale et de sous domaines latéraux spécifiques sont extrêmement hétérogènes.

1.2.2.Introduction aux structures étudiées

L'ensemble des structures discutées dans ce manuscrit est présenté en Annexe 1.

Les polysaccharides étudiés dans ce travail sont des constituants des parois cellulaires des organismes végétaux, terrestres ou marins. Ces différentes structures polysaccharidiques sont en interaction entre elles, des interactions variées et complexes, et avec le reste des constituants de la paroi : des macromolécules (enzymes, protéines de structure,...) mais également l'eau, les différents ions, *etc.* Les composants polysaccharidiques des parois sont classés en trois familles distinctes qui peuvent varier selon l'origine botanique : la cellulose, les hémicelluloses et la pectine.

1.2.2.1. Parois primaire et secondaire des végétaux terrestres

La paroi primaire (modèle présenté Figure 8) des végétaux terrestres est constituée de cellulose (15-40%), d'hémicelluloses (20-30%) et de pectines (30-50%) ⁽⁴⁾. Ces polysaccharides, en interaction avec les autres composants de la paroi, forment un réseau dense et complexe qui doit être capable de s'étendre. Leur rôle dans la structuration de la paroi pectocellulosique est discuté paragraphe 1.2.4.2.

La cellulose, polymère de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose, est un polysaccharide cristallin, insoluble dans la plupart des solvants et hygrophile. Les macromolécules de cellulose sont associées entre elles pour former des réseaux de microfibrilles. Ces réseaux s'associent eux même en macrofibrilles qui vont former des couches, constituants de base de la paroi cellulaire.

La seconde famille, les hémicelluloses, est beaucoup plus diversifiée. Ce sont des substances hydrophiles, qui assurent les liaisons entre les microfibrilles de cellulose. Les polysaccharides de cette

famille sont principalement constitués de xyloglucanes, hétéroxylanes et hétéromannanes ⁽⁵⁾. Les monosaccharides constitutifs sont le glucose, le xylose, l'arabinose, l'acide glucuronique, le mannose et le galactose. Ils peuvent porter de nombreuses modifications chimiques qui vont moduler leurs propriétés physico-chimiques.

Enfin, la pectine est une macromolécule polysaccharidique extrêmement complexe. Elle est constituée de trois domaines acides dits matriciels : les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes de type 1 (RGI) et de type 2 (RGII) ⁽⁶⁾. Les structures générales de ces polysaccharides constitutifs sont introduites paragraphe 1.2.1.3. Les homogalacturonanes sont composés exclusivement d' α -(1→4)-acide-D-galacturonopyranoses pouvant être méthylés et acétylés. Ces modifications jouent un rôle primordial dans la structuration de la paroi. Les rhamnogalacturonanes sont beaucoup plus complexes. Les RGI sont composés d'une chaîne linéaire principale d' α -(1→2)-[α -L-rhamnopyranose-(1→4)-acide-D-galacturonopyranose]. Ce polysaccharide peut également porter des modifications chimiques mais surtout, va présenter des chaînes latérales oligosaccharidiques hétérogènes composées d'arabinose, de galactose, de xylose et d'acide galacturonique. Enfin, les RG2 présentent une chaîne principale composée d' α -(1→4)-acide-D-galacturonopyranose qui porte des chaînes latérales hautement hétérogènes et elles-mêmes ramifiées et porteuses de modifications chimiques très importantes pour les végétaux. Ces structures hétérogènes sont impliquées dans de nombreux processus de l'organisme (décrites paragraphe 1.2.4).

La paroi secondaire des végétaux terrestres est composée des mêmes constituants que la paroi primaire dans des proportions différentes mais avec un réseau lignifié supplémentaire. Dans la paroi secondaire, les pectines sont en quantité très faible et la nature des hémicelluloses est différente. On la retrouve dans les cellules qui ne sont plus en croissance.

Pour les deux types de parois, la composition et la structure des polysaccharides varient suivant le stade de développement et l'origine botanique.

1.2.2.2. Parois des végétaux marins

La nature des polysaccharides des parois des végétaux marins et leur composition va varier de façon très importante en fonction du type d'algue ⁽⁷⁾. Cependant, une des caractéristiques communes à ces organismes concernant la composition de leurs parois est la présence de polysaccharides sulfatés dans la partie matricielle et même dans le groupe des hémicelluloses. Pour les algues vertes du groupe des *Chlorophyta*, des ulvanes sont présents dans la matrice de la paroi. Pour les algues rouges (*Rhodophyta*) ce sont les carraghénanes, et pour les algues brunes (*Phaeophyceae*) des fucoïdanes.

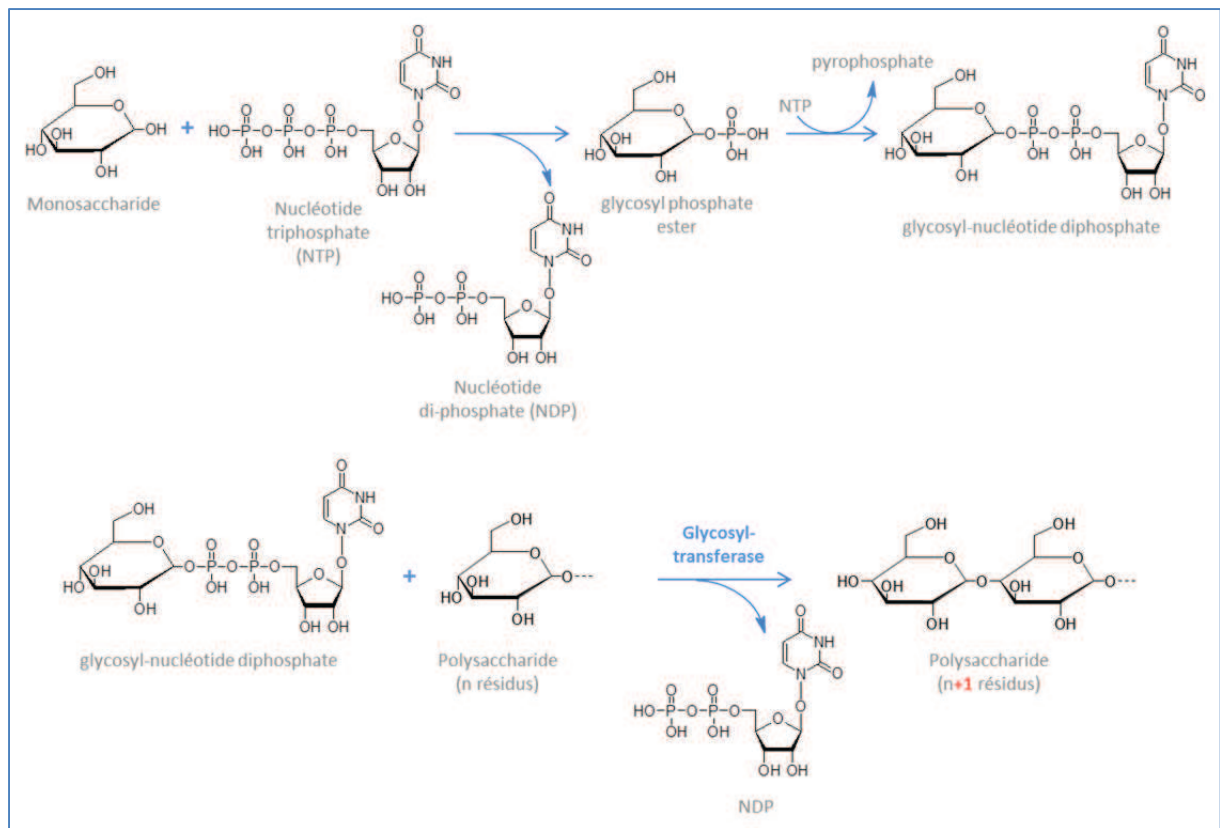


Figure 9. Biosynthèse des polysaccharides

Dans la partie hémicellulosique, des β -glucanes (*Rhodophyta*) et des xylofucoglucanes et xylofucoglucuronanes (*Phaeophyceae*) sont également sulfatés.

1.2.3. Biosynthèse des polysaccharides

La biosynthèse des polysaccharides présentant un grand nombre de branchements ou des fonctions complexes requiert l'intervention de nombreuses enzymes, de co-facteurs et de systèmes de contrôle qui permettent de réguler et de coordonner cette biosynthèse ⁽⁸⁾. Elle est déterminée par trois facteurs : la spécificité des enzymes, les amorces de la synthèse et la structure de la membrane cytoplasmique ⁽⁸⁾. Elle est initiée, la plupart du temps (comme présenté figure 9), par la formation d'un glycosyl-nucléotide diphosphate par la réaction d'un nucléotide triphosphate avec un glycosyl phosphate ester. Les glycosyl-transferases viennent ensuite greffer le glycosyl-nucléoside diphosphate sur un accepteur de nature osidique de longueur variable. Un ensemble d'enzymes de maturation interviennent ensuite et vont modifier les polysaccharides tout au long de leur cycle de vie en leur ajoutant ou en leur enlevant des fonctions chimiques (sulfatases, pectine méthylesterases, ...), en leur greffant d'autres sous-unités (transglycosidases, ...) ou en modifiant les sous-unités constitutives (invertases, épimérase, ...)

La majeure partie des polysaccharides est synthétisée au niveau de l'appareil de Golgi ⁽⁹⁾. Cet organelle complexe présente plusieurs compartiments (cis-, medial- et trans-) où sont localisées différentes enzymes spécifiques qui agissent en cascade. Pour l'exemple des plantes, les hémicelluloses et les pectines sont synthétisés par cette voie. Les polysaccharides "matriciaux" néo-synthétisés sont excrétés vers la matrice cellulaire et intégrés *via* la membrane cellulaire directement dans la paroi par des interactions physiques, des enzymes spécifiques ou des réactions de branchement ⁽¹⁰⁾. Il existe également d'autres voies de synthèse pour d'autres types de polysaccharides. La cellulose est directement synthétisée en réseaux de microfibrilles par des complexes protéiques de la membrane cellulaire, qui excrètent ces microfibrilles dans la paroi ⁽¹¹⁾.

1.2.4. Fonctions biologiques et propriétés d'usage des polysaccharides des végétaux

1.2.4.1. Réserves énergétiques

Les polysaccharides constituent les réserves nutritionnelles des organismes avec comme source principale le glucose ⁽¹²⁾.

Le type de structures que l'on retrouve le plus couramment est un homopolymère α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose, pouvant être ramifié à différents degrés en (1 $\rightarrow$ 6) par de nouvelles chaînes de α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose. Ce polymère est appelé amidon chez les espèces végétales (terrestres et marines). Il est stocké sous forme de granules dont la morphologie (taille et forme) est

caractéristique de l'origine botanique ⁽¹³⁾. Le polysaccharide est constitué de 2 structures distinctes : l'amylose, polymère légèrement ramifié formé par 60 à 6000 résidus glucose, et l'amylopectine, structure beaucoup plus étendue (6000 à 600000 sous unités) et présentant de longues ramifications toutes les 20 à 30 sous-unités de la chaîne principale. La dégradation de l'amidon est assurée par des phosphorylases pour produire de l' α -D-glucopyranosyl-1-phosphate à partir de l'extrémité non réductrice du polymère, en réaction avec du phosphate inorganique. Le rendement de dégradation est fonction de l'enzyme, mais aussi dépendant de la structure de l'amidon.

Les fructanes sont également utilisés pour le stockage de l'énergie. Le glucose est ainsi stocké sous forme furane. Chez des dicotylédones (chicorée, artichaut, pissenlit ou encore dahlia), les fructanes de type inuline (β -(1 $\rightarrow$ 2)-glucofuranose) sont présents en grande quantité dans les racines ou organes de réserve comme les tubercules ⁽¹⁴⁾. Chez les monocotylédones, les fructanes linéaires de type levanes (β -(2 $\rightarrow$ 6)-glucofuranose) sont prédominants dans certaines herbes grasses (*Dactylis glomerata*) ⁽¹⁵⁾.

Chez les algues vertes comme les *Chlorella* et les algues brunes comme les *Laminaria*, le polysaccharide de stockage est le laminarane (β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucopyranose), pouvant être substitué en C6 par des chaînes courtes de β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranose composées de 15 à 25 sous-unités.

1.2.4.2. Rôle dans la structure des cellules végétales

Au niveau des organismes végétaux, terrestres ou marins, les polysaccharides ont également un rôle structural en tant que composant majeur des parois. Ces parois sont impliquées dans le soutien de la plante mais également dans sa croissance. La structure des différents polysaccharides et leurs interactions permettent de concilier et de réguler deux phénomènes antagonistes ⁽¹⁶⁾.

La paroi doit en effet avoir une certaine rigidité pour résister aux forces exercées par la pression de turgescence et le poids du végétal. La cellulose, organisée en microfibrilles liées entre elles par des liaisons hydrogène inter-chaînes, possède une force de traction très importante. Un réseau d'hémicelluloses, principalement constitué de xyloglucanes, va renforcer cette rigidité. Les xyloglucanes vont interagir fortement avec la cellulose en établissant un grand nombre de liaisons hydrogène ⁽¹⁷⁾. Enfin, les pectines vont venir cimenter la structure formée entre cellulose et hémicelluloses par l'établissement d'une "matrice". Ce processus est dû aux charges portées par les polysaccharides constitutifs des pectines, principalement les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes de type II ⁽¹⁸⁻²¹⁾. Les chaînes d'homogalacturonanes vont se lier entre elles par complexation avec le cation divalent Ca^{2+} ⁽¹⁶⁾. Les chaînes de rhamnogalacturonanes II vont se lier covalamment par des doubles liaisons diester en utilisant le borate pour ponter deux résidus apiose

⁽¹⁹⁾. Les parties "neutres de la pectine" (arabinanes et arabinogalactanes des rhamnogalacturonanes de type I) assureraient les liaisons avec les hémicelluloses par des liaisons hydrogènes ⁽¹⁶⁾. Cette organisation complexe permet d'obtenir au final une structure pouvant être soumise à des contraintes mécaniques très élevées.

A l'inverse, la paroi cellulaire doit avoir une certaine extensibilité pour permettre à la plante de croître. La matrice complexe de la paroi doit donc être capable de s'étendre. La cellulose, synthétisée au niveau de la membrane cellulaire, doit pouvoir être "libérée" des deux autres types de polymères la rigidifiant. Les xyloglucanes, synthétisés directement dans l'appareil de Golgi, seraient excrétés de la cellule sous forme d'oligosaccharides et intégrés dans le polymère par des endotransglucosidases ⁽²²⁾. D'autres mécanismes pourraient être envisagés mais celui-ci permettrait à la fois d'allonger le polymère, mais également, par un mécanisme d'ouverture/fermeture, d'assurer la mobilité de la partie hémicellulosique de la paroi végétale. Pour les pectines, les interactions ioniques sont directement régulées par les modifications chimiques du polymère. Les fonctions acides des parties homogalacturonanes interagissent par l'intermédiaire d'un cation divalent (interactions ioniques), conduisant à la rigidification de la structure. Cependant, lors de leur synthèse, les homogalacturonanes sont hautement méthylestérifiés ce qui rend impossible les interactions avec les ions calcium. Le polymère est ensuite démethylestérifié sélectivement par des pectine-méthylesterases ⁽²³⁾. Ce processus permet de réguler la perméabilité de la paroi et affecte indirectement l'accessibilité des enzymes aux différents constituants ⁽¹⁷⁾. Chez les espèces marines, les polysaccharides de structure sont dépendants du type d'algue. Chez les algues rouges, les agars, les porphyranes et les carraghénanes sont décrits pour avoir un rôle structurant alors que pour le cas des algues brunes, ce sont les alginates et les ulvanes qui sont impliqués dans ce rôle. Les propriétés spécifiques de ces polysaccharides permettent de réguler la pression osmotique des organismes marins soumis à des environnements salins très variables ⁽²⁴⁾.

1.2.4.3. Mécanisme de défense et signalisation

Si les parois ont un rôle structurant dans la cellule végétale, elles sont également impliquées dans la réponse aux différents stress biotiques et abiotiques. Les agents pathogènes entrent dans les végétaux soit par les orifices naturels tels que les stomates, par des blessures ou bien en digérant les parois cellulaires ⁽²⁵⁻²⁶⁾. Ces pathogènes utilisent des enzymes afin de détruire cette barrière physique. Les pectines en sont une des premières cibles. Les endopolygalacturonases et endopectate-lyases sécrétées par le pathogène libèrent des oligogalacturonides qui sont une source de carbone pour l'agent pathogène, mais, sont également utilisés comme éliciteur dans la réaction de défense par la plante. Les oligosaccharides dérivés de chitine, chitosane, β -glucanes et

galacturonanes^(17,20,25-28) sont connus pour être utilisés comme éliciteurs. La réaction est dépendante de la structure et de la taille des molécules élicitrices. Par exemple, l'injection d'heptamères et d'octamères d'oligo-chitines induit une forte réaction chez le blé à des concentrations de l'ordre du nM alors que chez la tomate, c'est la forme tétramérique qui induit la plus forte réponse. A l'inverse, pour ces modèles végétaux, l'utilisation d'oligo-chitosanes qui ne diffèrent que par une N-acétylation ne montre aucune activité alors qu'ils induisent une réaction dans les cellules de soja et de persil⁽²⁹⁾.

Ce rôle de signalisation se retrouve également chez les espèces animales. La fixation des oligo-hyaluronanes sur les récepteurs de surface des cellules active différentes voies de signalisation. Cela conduit à la régulation des fonctions cellulaires, du développement des tissus, des processus d'inflammation et de cicatrisation. Leur effet est également documenté dans les mécanismes de progression tumorale et de métastase.

Une autre forme de défense médiée par les polysaccharides concerne, dans la cellule, le contrôle de la pression osmotique en réponse à un stress. L'accumulation de callose est ainsi utilisée par les plantes pour lutter contre les variations de températures ou la présence de métaux lourds⁽²⁹⁻³⁰⁾.

1.2.4.4. Fonctions d'usage

Les polysaccharides sont naturellement très abondants sur terre et dans les océans et constituent un matériel parfaitement renouvelable. Ils présentent une variabilité très importante de structures et de fonctionnalités physico-chimiques. Par conséquent, ils sont un vaste réservoir dans lequel l'industrie peut piocher pour de nombreuses applications⁽³¹⁻³⁵⁾ avec un enjeu économique significatif.

Le réseau EPNOE (**E**uropean **P**olysaccharide **N**etwork **o**f **E**xcellence) décrit en 2011, dans une revue consacrée aux challenges et aux opportunités dans la technologie et la recherche sur les polysaccharides⁽³¹⁾, trois grands axes d'applications pour ces biomolécules :

- Les matériaux biosourcés (bioplastiques, biofilms,...)
- Les applications alimentaires (agents de textures, gélifiants, additifs,...)
- Les applications santé (cicatrisation, anti-bactériens, anti-microbiens, encapsulation, antitumoraux, vaccins...)

Il faut ajouter à ces applications le rôle de ces composés comme alternative aux énergies fossiles.

Cependant, l'exploitation industrielle requiert à la fois de disposer d'une source non limitée de ces molécules, mais également que ces molécules soient parfaitement caractérisées et que l'on puisse contrôler et maîtriser la qualité structurale et fonctionnelle des produits exploités.

Une meilleure connaissance de ces structures est également essentielle pour mieux comprendre les fonctions biologiques des polysaccharides et maîtriser les mécanismes dynamiques qui conduisent à leur biosynthèse et à leur évolution *in planta*.

Cette caractérisation structurale reste difficile à réaliser avec les moyens analytiques actuels.

C'est dans l'objectif d'améliorer la réponse que peut apporter la spectrométrie de masse à ces problématiques que j'ai conduit ce travail de thèse.

2. Méthodes de caractérisation de la structure des polysaccharides

Il existe de nombreuses techniques analytiques utilisées pour la caractérisation des polysaccharides fournissant différents niveaux d'information structurale.

2.1. Caractérisation de la composition en ose et/ou des branchements des sous unités

Plusieurs techniques sont disponibles pour caractériser la composition osidique d'un échantillon ⁽³⁶⁾. Elles reposent sur l'utilisation d'une approche chromatographique liquide et/ou gaz après hydrolyse du polysaccharide et un dosage des acétates d'alditols ⁽³⁷⁻³⁸⁾. Cette caractérisation permet d'obtenir la représentativité de chaque monosaccharide par son temps de rétention spécifique, incluant la séparation des épimères. Un second niveau de caractérisation est l'étude des branchements inter-osidiques. Elle repose sur la perméthylation des polysaccharides suivie d'une hydrolyse totale et d'une peracétylation avant une analyse par chromatographie gazeuse couplée à une ionisation par impact électronique et une analyse par spectrométrie de masse. Toutes les fonctions hydroxyles à l'origine libres dans le polysaccharide sont ainsi méthylées alors que celles impliquées à l'origine dans la liaison osidique sont acétylées.

Ces approches physico-chimiques fournissent une vision des briques élémentaires moyennée à l'échelle du polysaccharide. Elles peuvent fournir des informations de départ mais sont insuffisante pour les besoins de caractérisation structurale.

2.2. Caractérisation de la structure fine des polysaccharides par RMN

La caractérisation structurale plus poussée des polysaccharides reste un challenge pour la chimie analytique en raison de la complexité et de l'hétérogénéité des structures. La RMN est une technique de choix utilisée depuis plusieurs dizaines d'années ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. Les informations très complètes fournies par RMN permettent d'identifier les sous-unités constitutives incluant la différenciation des épimères et des anomères, ainsi que l'enchaînement des sous-unités constitutives. Elle permet également d'obtenir des informations quantitatives. Cependant, l'approche présente plusieurs limitations dans son application aux polysaccharides naturels.

Les polysaccharides sont des biomolécules qui peuvent atteindre des tailles extrêmement importantes (la cellulose a une masse pouvant aller jusqu'à $2,5 \cdot 10^6$ Daltons). Or, la taille des molécules analysables par RMN est limitée. De plus, les polysaccharides présentent une grande polydispersité et une importante polymolécularité, dues à la distribution des différentes sous-unités osidiques le long du squelette et à la variabilité apportée par les modifications et branchements

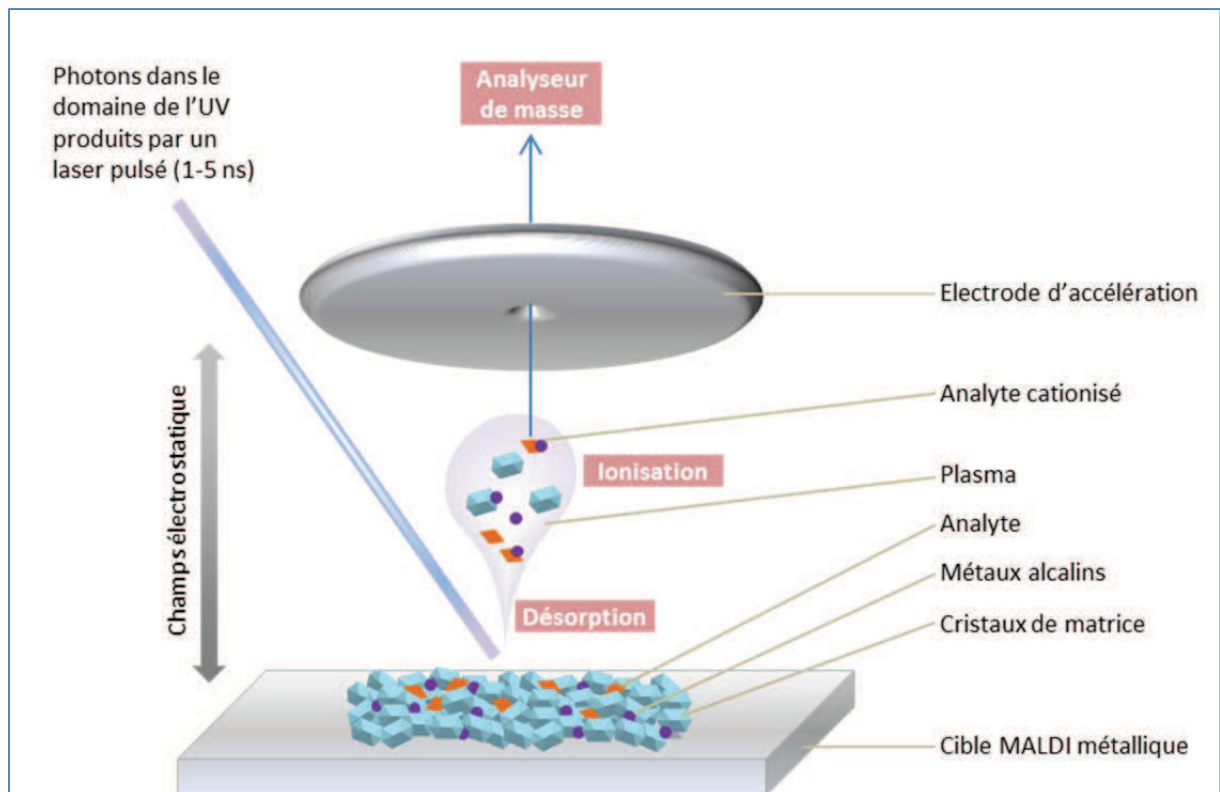


Figure 10. Principe de l'ionisation MALDI

latéraux le long du polymère. Ces caractéristiques vont induire une forte hétérogénéité moléculaire et les informations obtenues par analyse des polysaccharides en RMN seront donc une moyenne de l'ensemble des structures présentes dans l'échantillon. Pour obtenir l'information sur une structure unique, il faudrait être à même d'en purifier plusieurs centaines de μg qui sont nécessaires à l'approche de par sa sensibilité. Or, les polysaccharides naturels peuvent être très difficiles à purifier en quantité suffisante. Ces difficultés tendent à diminuer avec l'augmentation des champs magnétiques puisque la sensibilité et la résolution, en RMN, sont directement corrélées avec la puissance du champ magnétique utilisé. Une autre approche est en développement, la polarisation nucléaire dynamique (Dynamic Nuclear Polarization, DNP). Cette technique permettrait, à l'heure actuelle, d'augmenter la sensibilité d'un facteur 10^4 à 10^5 sur un temps d'acquisition équivalent. Cependant cette technologie est encore peu disponible et relativement chère : seuls quelques gros laboratoires de recherche en RMN en sont équipés. A notre connaissance, les échantillons complexes tels que les polysaccharides naturels ou les mélanges complexes d'oligosaccharides qui en sont issus, restent encore impossibles à résoudre par cette approche.

2.3. Caractérisation de la structure fine des polysaccharides par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui pourrait permettre de répondre à elle seule aux problématiques de caractérisation des polysaccharides. La technique fournit une information structurale riche par la précision de mesure et les possibilités de fragmentation (MS/MS). Elle est relativement tolérante aux mélanges et présente un niveau de sensibilité important (de l'ordre du ng). Ses performances sont d'ailleurs largement exploitées aujourd'hui dans plusieurs domaines de la biochimie (caractérisation des protéines, métabolomique, lipidomique, polymères).

2.3.1. Production des ions : source d'ionisation

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour la caractérisation des biomolécules s'est considérablement développée ces 25 dernières années depuis, notamment, l'introduction à la fin des années 80 de deux techniques d'ionisation/désorption dites "douces" qui ont permis à la spectrométrie de masse d'être compatible avec l'analyse de molécules fragiles, et/ou faiblement volatiles.

La première de ces techniques est l'ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI, Figure 10), introduite conjointement en 1989 par Karas et Hillenkamp⁽⁴¹⁾ et par Tanaka⁽⁴²⁾. Elle repose sur l'irradiation par un laser du mélange de l'échantillon avec une molécule (appelée matrice) possédant des propriétés d'absorption à la longueur d'onde du laser utilisé. Le mélange est déposé sur une surface conductrice et reçoit le faisceau pulsé du laser. La

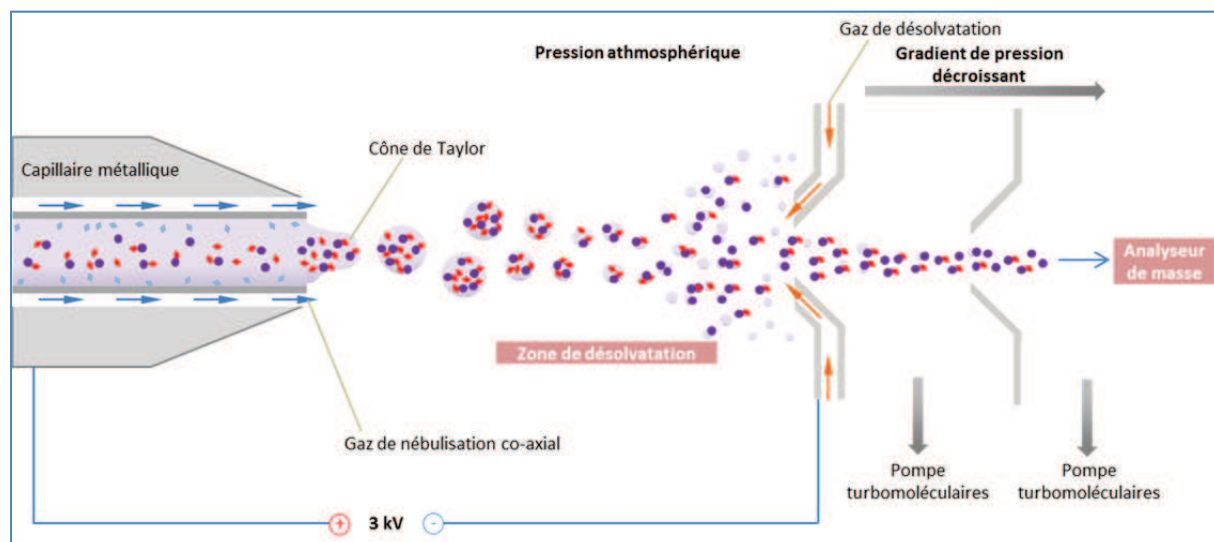


Figure 11. Principe de l'ionisation Electrospray

matrice relaxe son excès d'énergie en se désorbant du support. Il en résulte la formation d'un plasma, milieu dense dans lequel l'analyte se retrouve désorbé en phase gazeuse. Le rôle de cette matrice est à la fois d'absorber l'énergie très importante produite par le laser et de redistribuer une partie seulement de cette énergie à la molécule d'intérêt. La spectrométrie de masse MALDI présente plusieurs avantages. Elle est relativement tolérante aux sels, permet l'analyse de mélanges peu complexes en quelques secondes, et permet l'étude de composés peu solubles.

La seconde technique d'ionisation, l'électrospray (ElectroSpray Ionisation, ESI, Figure 11), a été publiée un an plus tard, en 1989, par Fenn et ses collaborateurs ⁽⁴³⁾. Le principe repose, dans une première étape, sur la nébulisation – dans un champ électrique de l'ordre de 3000V/cm et à pression atmosphérique – de l'analyte en solution, introduit par un capillaire métallique. Une polarisation du liquide se produit et des gouttelettes chargées sont émises à la pointe du capillaire. La désolvatation de ces gouttelettes se produit ensuite à la fois par une évaporation du solvant (gaz et chauffage de la source) et par des explosions coulombiennes spontanées des gouttelettes pour diminuer leur densité de charge.

2.3.2.Type d'ions produits

Contrairement à d'autres types de molécules (peptides, protéines), l'ionisation en mode positif des oses ne produit pas de protonation. Les ions observés résultent de la cationisation des polysaccharides par des métaux alcalins (sodium, potassium) naturellement présent dans les milieux d'analyse. Il est également possible d'observer des ions lithium ou des complexations par des métaux alcalino-terreux (magnésium, calcium) mais cela passe par un dopage des échantillons par les sels correspondants. Les rendements d'ionisation par cationisation sont beaucoup plus faibles que pour les mécanismes de protonation, les sensibilités atteintes sont donc généralement plus faibles (de l'ordre du µg/ml).

En mode négatif, les espèces formées sont des espèces déprotonées ($[M-H]^-$). Les oligosaccharides acides (acide carboxylique, sulfatés, phosphorylés) s'ionisent efficacement mais les oligosaccharides neutres sont plus difficiles à obtenir sous forme déprotonée, à cause de la faible acidité des fonctions hydroxyles. Une compétition entre ces formes déprotonées et des adduits formés avec des halogènes (chlore) peut également se produire.

Dans les deux modes d'ionisation (positif et négatif), les espèces formées à partir des oligosaccharides sont généralement monochargées.

2.3.3. Analyseur / Gamme de masse

Il existe aujourd'hui une grande variété d'analyseurs disponibles (quadripôles, trappes d'ions, orbitraps, tubes de vol). Tous peuvent être couplés à l'ESI ou au MALDI. Actuellement, il est possible d'atteindre des résolutions (>40000 pour les tubes de vol), des précisions de mesure (de l'ordre 1 ppm) et une sensibilité (en dessous de la femtomole pour les oligosaccharides) très importantes. De plus, il est techniquement possible d'analyser des molécules de masses très importantes ⁽⁴³⁻⁴⁴⁾. Aujourd'hui, la spectrométrie de masse permet par exemple de résoudre des complexes supra-moléculaires de protéines de plus de 500 000 Da (pour une revue, voir ⁽⁴⁵⁾). Cependant, ces caractérisations nécessitent un matériel relativement homogène alors que les polysaccharides naturels présentent une grande polydispersité et une grande polymolécularité.

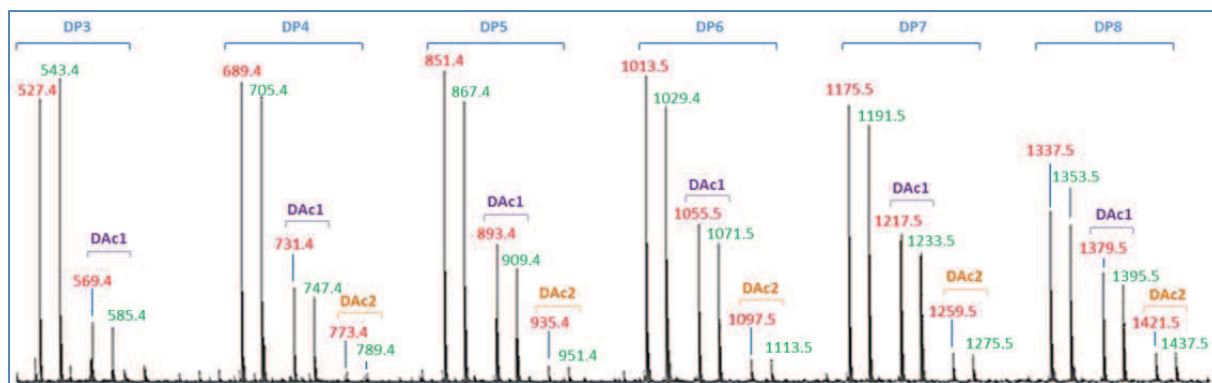


Figure 12. Spectre MALDI TOF MS d'un digestat de galactomannane d'arganier par une mannanase en ionisation positive. Les masses des ions $[M+Na]^+$ sont annotées en rouge, celle des ions $[M+K]^+$ sont annotées en vert. Les différents degrés de polymérisation sont indiqués en bleu au-dessus du spectre. Les formes monoacétylées sont indiquées en violet. Les formes diacétylées sont indiquées en orange.

3. Travaux développés dans le cadre de la thèse

3.1. Utilisation des outils enzymatiques pour la déconstruction des polysaccharides et leur analyse structurale

Une solution pour contourner les problèmes liés à la taille des polysaccharides est l'utilisation d'enzymes pour déconstruire le polymère en oligosaccharides représentatifs. Cette stratégie peut être rapprochée de celle utilisée pour les analyses protéomiques : des enzymes spécifiques permettent de découper la protéine en peptides protéotypiques et, en cumulant la spécificité de l'enzyme et la précision de mesure sur les peptides formés, permettent d'identifier la protéine par son empreinte spectrale spécifique.

De telles enzymes spécifiques existent également pour la digestion des polysaccharides. Le projet CAZy ⁽⁴⁶⁾ (<http://www.cazy.org/> consulté le 03/10/2014) répertorie les différentes enzymes actives sur les polysaccharides et/ou oligosaccharides en les classant selon leur activité : les familles de Glycoside Hydrolases (GHs), GlycosylTransferases (GTs), Polysaccharides Lyases (PLs) et Carbohydrate Esterases (CEs). Ces enzymes vont permettre de générer des oligosaccharides représentatifs du polysaccharide, et en associant ces pièces du "lego" en tenant compte de la spécificité de l'enzyme, il sera envisageable de reconstruire des éléments de structure du polymère.

Il existe aujourd'hui un nombre limité d'enzymes disponibles qui permettent d'explorer la diversité de structure des polysaccharides. Il est donc nécessaire de développer des outils de criblage permettant de découvrir de nouvelles activités. La spectrométrie de masse MALDI est une technique qui permet d'obtenir rapidement et simplement une information sur la dégradation d'un polysaccharide. En plus de valider la dégradation, elle permet, contrairement aux méthodes colorimétriques conventionnelles ⁽⁴⁷⁾, d'avoir accès à des informations concernant le degré de polymérisation et/ou la présence de modifications. L'exemple présenté Figure 12 montre le résultat de l'analyse MALDI du digestat d'un galactomannane par une mannanase. Cette analyse nous permet de déterminer que l'enzyme produit des oligosaccharides de degrés de polymérisation (DP) 3 à 8 (les adduits sodium $[M+Na]^+$ et potassium $[M+K]^+$ sont présents sur le spectre pour chaque espèce). Cette analyse permet également de mettre en évidence des formes acétylées pour tous les DP, et des formes diacétylées pour les DP à partir de 4. Cette observation indique le degré relatif d'acétylation du polymère et montre également que l'enzyme tolère la présence d'un certain nombre d'acétylations dans son site catalytique.

L'utilisation de la spectrométrie de masse comme outil pour appuyer la découverte et la caractérisation de nouvelles activités enzymatiques est développée dans la partie 1.

3.2. Outils de séparation couplés à la spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale d'oligosaccharides en mélange et la résolution des isoformes

Une première difficulté de l'analyse par spectrométrie de masse des oligosaccharides est liée à la présence possible de plusieurs isomères sous un même ion. En effet, ces structures ne sont pas différenciables par leurs masses et même après une étape de fragmentation MS/MS, le spectre généré est un spectre composite, mélange des fragments des différents isomères, qui sera difficilement interprétable. Il sera donc difficile, en se basant uniquement sur la spectrométrie de masse, de déterminer le nombre et l'identité précise des espèces présentes.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique séparative relativement simple à mettre en œuvre et souvent utilisée pour séparer les éventuels régioisomères formés dans des milieux réactionnels peu complexes. Cette technique, qui consiste à faire migrer les espèces de l'échantillon sur un support solide, peut être interfacée avec l'ionisation MALDI, permettant une mesure directe des produits séparés ⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾. Des développements qui illustrent le potentiel de ce couplage direct pour caractériser le mode d'action d'enzymes de transglycosylation sont présentés dans la partie 2.

Cependant, les capacités résolutives de la CCM sont limitées et insuffisantes pour explorer des mélanges complexes, comme ceux générés par la dégradation de polysaccharides naturels. En spectrométrie de masse, la complexité moléculaire de l'échantillon peut induire un phénomène de compétition d'ionisation entre les différentes espèces : les espèces observées seront les espèces majoritaires, ou celles qui s'ionisent préférentiellement. Ce dernier aspect est encore plus important dans le cas d'échantillons présentant une importante hétérogénéité chimique, qui peut moduler l'affinité des oligosaccharides pour les cations. Pour d'autres applications de la spectrométrie de masse sur des mélanges complexes (protéomique, métabolomique), il est commun d'utiliser une technique séparative pour échantillonner les différentes espèces avant leur ionisation et limiter ainsi le phénomène de compétition. En plus de permettre de simplifier les mélanges complexes et hétérogènes avant l'analyse, ces méthodes peuvent aussi aider, dans le cas des oligosaccharides, à différencier les isomères présents dans le mélange.

L'ionisation par électrospray, réalisée sur des échantillons en milieu liquide, est directement interfaçable avec la chromatographie liquide ⁽⁵⁰⁾. Les capacités séparatives de la chromatographie liquide sont aujourd'hui importantes, et rendent cette approche privilégiée dans les domaines d'application cités précédemment (métabolomique, protéomique). Dans nos travaux, nous avons développé une approche de chromatographie liquide performante pour séparer des oligosaccharides en mélanges complexes : ces travaux sont présentés dans la partie 2 du manuscrit.

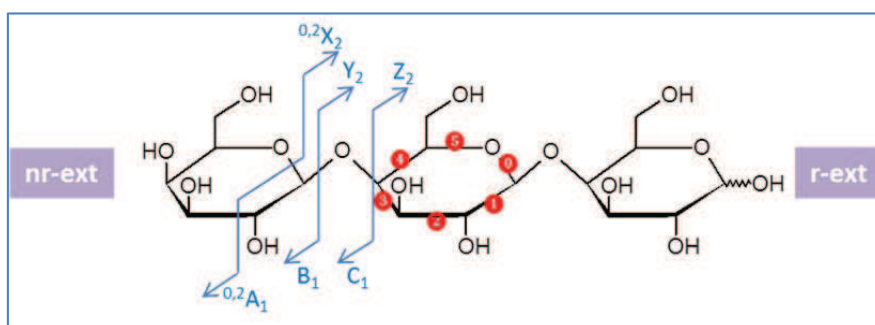


Figure 13. Nomenclature de Domon et Costello pour l'annotation des spectres MS/MS des oligosaccharides. Les types de fragments sont indiqués par les flèches bleues. La numérotation des liaisons du cycle est indiquée en rouge.

3.3. Exploration d'un nouveau mode de fragmentation pour la caractérisation de la structure fine des oligosaccharides : la photodissociation

Les informations uniquement basées sur la masse des composés restent limitées en termes de détermination structurale. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet de définir des caractéristiques beaucoup plus fines comme les types de branchements, la localisation des branchements latéraux et des modifications.

3.3.1. Fragmentation des oligosaccharides et nomenclature

En spectrométrie de masse, il existe deux types de fragments produits sur les oligosaccharides : les fragments intercycliques, qui correspondent au clivage de la liaison osidique et qui renseignent sur l'enchaînement des monosaccharides, et les fragments intracycliques, qui apportent des informations sur la nature des liaisons et sur le positionnement des ramifications et des modifications.

La nomenclature utilisée pour l'annotation de la fragmentation des oligosaccharides en spectrométrie de masse a été introduite par Domon et Costello en 1988⁽⁵¹⁾. Cette nomenclature (Figure 13) permet de différencier les fragments contenant l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide (nr-ext) (A, B et C) de ceux contenant l'extrémité réductrice (r-ext) (X, Y et Z). Les chiffres en indice après la lettre correspondante indiquent la localisation du fragment le long de la chaîne principale de l'oligosaccharide. Les chiffres en exposant indiqués avant les lettres A et X indiquent les liaisons rompues par fragmentation intracyclique (dans l'ordre indiqué en rouge sur la Figure 13).

3.3.2. Méthodes de fragmentation

La nature des fragments produits est dépendante de l'espèce isolée (type d'ion et mode d'ionisation) mais également fonction de la méthode de fragmentation utilisée. Une grande variété de spectromètres de masse commerciaux permet de faire de la MS/MS (TOF/TOF, quadripôle/TOF, trappe d'ion, FTICR,...). Dans ces appareils plusieurs modes de fragmentation sont disponibles.

3.3.2.1. Dissociation activée par collision à basse énergie (IE-CAD)

La IE-CAD (ou IE-CID, dissociation induite par collision à basse énergie) est la technique de fragmentation la plus couramment utilisée pour l'analyse structurale des oligosaccharides depuis plus de 30 ans⁽⁵²⁾. C'est l'approche disponible sur la plupart des spectromètres de masse commerciaux. Elle consiste en une excitation thermique lente des ions par collision avec des molécules de gaz après accélération par un potentiel électrique pour augmenter l'énergie cinétique

des ions. Ce potentiel est de l'ordre de quelques dizaines d'eV. Par collision, une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne ce qui produit une fragmentation de l'ion. Les fragments majoritairement produits par cette technique proviennent du clivage de la liaison osidique. S'ils renseignent sur la séquence osidique, ils sont généralement insuffisants pour la caractérisation complète de la structure des oligosaccharides.

3.3.2.2. Dissociation activée par collision à haute énergie (HE-CAD)

Une alternative beaucoup moins répandue pour la fragmentation des molécules et leur caractérisation structurale par spectrométrie de masse est la HE-CAD (ou HE-CID). Cette technique a été décrite pour l'analyse d'oligosaccharides avec des sources MALDI sur des instruments type secteur magnétique/TOF ⁽⁵³⁻⁵⁴⁾ ou de type TOF/TOF ⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾. Dans ce cas, le potentiel d'accélération appliqué aux ions est de l'ordre du keV. Cette technique, qui produit des fragmentations à haute énergie, permet d'obtenir plus de fragments intracycliques apportant des informations structurales importantes.

Cependant les approches CAD (basse et haute énergie) peuvent produire plusieurs types de fragments pouvant compliquer l'interprétation du spectre et même conduire à de fausses interprétations. Ces limitations sont mises en évidence et détaillées dans la partie 3 du manuscrit.

3.3.2.3. Réaction ion/électron

Une première alternative aux fragmentations par collision décrites précédemment est l'activation par réaction ion/électron. Dans cette approche, l'ion est bombardé par un faisceau d'électrons. Un électron est transféré sur l'ion d'intérêt pour former un ion radicalaire (espèce au nombre impair d'électron) qui va se dissocier. Plusieurs techniques ont été décrites pour l'activation des oligosaccharides en fonction du mode d'ionisation et de l'énergie des électrons utilisés pour le bombardement. La dissociation induite par électron (EID) ⁽⁵⁷⁾, La dissociation par capture d'électron (ECD) ⁽⁵⁸⁾ et la dissociation par transfert d'électron (ETD) ⁽⁵⁹⁾ ont été utilisées pour caractériser la structure d'oligosaccharides en mode positif ^(57,60-64). Contrairement à la dissociation des ions au nombre pair d'électrons en CAD, la fragmentation des ions radicalaires produit des spectres beaucoup plus informatifs. Ils contiennent de nombreux fragments intracycliques (A et X) qui fournissent des informations sur les types de branchement. Cependant, l'ECD et l'ETD sont limités à l'analyse des composés multichargés en mode positif. Ce type d'espèces est difficile à observer pour les oligosaccharides voire impossible pour des espèces acides. En mode négatif, l'EID ⁽⁶⁵⁾, et l'ETD négatif ⁽⁶⁶⁾ ont été appliqués à l'analyse des oligosaccharides ^(65,67-69), mais c'est surtout la dissociation par détachement d'électron (EDD) qui présente les résultats les plus convaincants comme cela a été

Tableau 1. Récapitulatifs des méthodes d'interaction ion/électron pour la caractérisation structurale en spectrométrie de masse

Nom	mécanisme	État de charge	Énergie des électrons
ECD	$[M+nH]^{n+} + e^-_{slow} \rightarrow [[M+nH]^{(n-1)+}]^*_{transient} \rightarrow \text{fragments}$	$n \geq 2$	$0\text{eV} < e^- < 2\text{eV}$
ETD	$[M+nH]^{n+} + A^{\cdot-} \rightarrow [[M+nH]^{(n-1)+}]^*_{transient} + A \rightarrow \text{fragments}$	$n \geq 2$	
EDD	$[M-nH]^{n-} + e^-_{fast} \rightarrow [[M+nH]^{(n+1)-}]^*_{transient} + 2e^- \rightarrow \text{fragments}$	$n \geq 2$	$19\text{eV} < e^-$
nETD	$[M-nH]^{n-} + B^{\cdot+} \rightarrow [[M+nH]^{(n+1)-}]^*_{transient} + B \rightarrow \text{fragments}$	$n \geq 2$	
EID	$[M+nH]^{n-} + e^-_{medium} \rightarrow [M+(n-1)H]^{\cdot+} + H^{\cdot} + e^- \rightarrow \text{fragments}$	$n \geq 1$	$10\text{eV} < e^- < 13\text{eV}$
	$[M-nH]^{n-} + e^-_{medium} \rightarrow [M-(n-1)H]^{\cdot-} + H^{\cdot} + e^- \rightarrow \text{fragments}$		

illustré sur des chito-oligosaccharides ⁽⁵⁷⁾, des glycosaminoglycanes ⁽⁷⁰⁻⁷⁸⁾ et des oligosaccharides sialylés ⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾. Le Tableau 1 présente les caractéristiques et le mécanisme de ces différentes approches.

Ces méthodes basées sur les interactions ion/électron offrent une alternative intéressante à la CAD mais elles génèrent des spectres de masse très complexes, avec des espèces provenant de plusieurs voies de fragmentation et de nombreuses pertes de molécules neutres (H₂O, MeOH, CO₂).

3.3.2.4. Réaction ion/photon

Une seconde alternative a été introduite plus récemment et repose sur l'utilisation des interactions ion/photon pour induire une dissociation. Cette méthode est particulièrement attractive puisqu'elle permet d'obtenir une information dépendante de la longueur d'onde utilisée, ce qui ajoute un degré de spécificité à la technique.

La dissociation multiphotonique dans le domaine de l'infra-rouge (IRMPD) provoque une excitation thermique lente des ions proche de la IE-CAD ⁽⁸¹⁻⁸²⁾. Dans la littérature, cette technique a été souvent comparée aux diverses réactions ion/électron ^(61,73-76,79-80) car elles peuvent être réalisées sur le même type d'appareil (FTICR). L'IRMPD montre cependant des résultats plutôt moins intéressants que les fragmentations électroniques pour la caractérisation structurale des oligosaccharides.

L'utilisation de photon dans l'ultra-violet (UV) semble une approche plus prometteuse. Cette application a été rapportée la première fois par le groupe de McIver ⁽⁸³⁾ en 1984. L'utilisation de lasers à 355 nm a été employée par le groupe de Brodbelt ⁽⁸⁴⁻⁸⁵⁾ pour la caractérisation d'oligosaccharides dérivatisés. Il est cependant nécessaire de brancher un chromophore car les oligosaccharides n'absorbent pas à cette longueur d'onde. L'utilisation des photons est d'autant plus intéressante si l'on travaille dans l'UV extrême (Vacuum UV, VUV : $\lambda < 200$ nm correspondant à une énergie > 6.20 eV). La photodissociation (PD) à 157 nm (7.9 eV) d'ions positifs a été étudiée par le groupe de Reilly sur des oligosaccharides dérivatisés ⁽⁸⁶⁾. Leur travail montre que le VUVPD produit des spectres très informatifs contenant de nombreux fragments intracycliques. La technique a été utilisée par cette même équipe, toujours à 157 nm, mais sans dérivatisation ⁽⁸⁷⁻⁸⁸⁾. En effet, il n'est pas nécessaire d'introduire un chromophore sur les molécules à analyser puisque les hétérocycles des monosaccharides absorbent l'énergie des photons à cette longueur d'onde. De plus, la photo-excitation dans le VUV produit un transfert rapide d'une énergie importante et l'activation des ions par l'absorption d'un seul photon (régime mono-photonique). Une approche ne nécessitant pas de dérivatisation a également été introduite par le groupe de Dugourd avec l'utilisation d'un laser dans le proche UV (220-240 nm) ⁽⁸⁹⁻⁹⁰⁾. Dans ce travail, l'activation est rendue possible par la présence

Tableau 2. Récapitulatif des travaux utilisant la photodissociation dans l'UV et le VUV pour la caractérisation structurale des oligosaccharides

λ (nm)	Énergie	Étude	Type d'oligosaccharides	type d'ion	polarité
355 nm	3.49 eV	Wilson 2008	N-Glycanes marqués avec un tag fluorescent	$[M+Na]^+$	+
		Ko 2011b	N-Glycanes marqués avec des chromophores	$[M+Na]^+$	
240 nm	5.17 eV	Racaud 2009	Disaccharide U-NGLuc(lyase)	$[M-H]^-$	-
220 nm	5.64 eV	Racaud 2010	Heparines sulfatées (lyase)	$[M-2H]^{2-}$	-
193 nm	6.42 eV	Ko 2011a	N-Glycanes sialylé	$[M-H]^-$ $[M-2H]^{2-}$	-
157 nm	7.90 eV	Devakumar 2005	Maltoheptaose / p-LNH avec et sans derivatisation par guanidination et Girard's T	$[M+Na]^+$	+
		Devakumar 2007	N-Glycanes perméthylés	$[M+Na]^+$	+
		Devakumar 2008	N-Glycanes perméthylés	$[M+Na]^+$	+

Equation de la conversion énergie de photon / longueur d'onde :

$$E(\text{eV}) = (h(\text{eV.s}) \times c(\text{m.s}^{-1}) / \lambda(\text{m}))$$

$$c = 2.99792458 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$$

$$h = 4.135667516 \cdot 10^{-15} \text{ eV.s}$$

d'une insaturation en extrémité non-réductrice de l'oligosaccharide. Il est possible d'obtenir cette caractéristique structurale sur des oligosaccharides naturels en digérant le polysaccharide à l'aide d'une lyase, mais il existe peu d'enzymes connues présentant ce type d'activité. L'ensemble des méthodes de photodissociation dans l'UV utilisées pour la caractérisation structurale des oligosaccharides sont décrites Tableau 2.

Lors de ce travail de thèse nous avons évalué l'apport des approches par VUVPD pour la caractérisation structurale de différents oligosaccharides, en accédant à une gamme de longueur d'onde encore inexplorée par l'intermédiaire du dispositif expérimental disponible sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL. Les résultats sont présentés dans le chapitre 3.

PARTIE 1

DECOUVERTE DE NOUVEAUX OUTILS ENZYMATIQUES POUR LA DECONSTRUCTION DES POLYSACCHARIDES ET LEUR ANALYSE STRUCTURALE

-

Mise en place d'une méthode basée
sur la spectrométrie de masse MALDI
pour cribler des activités enzymatiques à haut débit
sur une variété de substrats polysaccharidiques

DECOUVERTE DE NOUVEAUX OUTILS ENZYMATIQUES POUR LA DECONSTRUCTION DES POLYSACCHARIDES ET LEUR ANALYSE STRUCTURALE

1. Contexte

Les nombreux programmes de génomique effectués ces dernières années, ont conduit à la production massive de séquences de gènes. Cette production s'accélère encore avec les techniques de séquençage rapide. Cependant, on peut souligner que malgré la quantité de gènes séquencés, le rythme de la découverte de nouvelles enzymes de dépolymérisation des polysaccharides reste constant. Les nouvelles données de séquence permettent, par homologie de séquence, d'enrichir les familles existantes d'enzymes mais rarement la découverte de nouvelles activités.

Ces enzymes de dépolymérisation sont pourtant des outils incontournables pour aider à résoudre les structures des polysaccharides et explorer leur diversité chimique et structurale, en produisant des oligosaccharides spécifiques, qui sont une signature des polymères d'origine tout en étant plus faciles à appréhender au plan analytique que les polysaccharides. Ces enzymes sont aussi des moyens qui permettent de déstructurer les réseaux complexes dans lesquels les polysaccharides sont enchevêtrés sans impacter les fonctionnalités d'intérêt des biomolécules, dans les procédés de bio-raffinage par exemple.

Les enzymes de dépolymérisation sont classées dans la banque de données CAZy (<http://www.cazy.org/>, consulté le 13/10/2014) en fonction de la réaction qu'elles catalysent : on distingue les glycosides hydrolases (GHs, 178 classes d'enzymes : <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) et les polysaccharides lyases (PLs, 15 classes d'enzymes : <http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>).

Cependant, les types d'activités spécifiques disponibles commercialement sont nettement insuffisants pour élucider la complexité et la diversité structurale des polysaccharides naturels. La découverte de nouvelles enzymes ou de combinaisons d'enzymes apparaît donc indispensable. De nombreux micro-organismes (bactéries, champignons,...) disposent d'un arsenal d'activités enzymatiques qu'ils utilisent, notamment, pour la dégradation de la paroi, barrière physique protectrice des plantes. Ces organismes peuvent être aisément cultivés sur des milieux artificiels et constituent un réservoir intéressant dans la recherche de nouvelles enzymes.

Les travaux décrits dans ce chapitre se sont inscrits dans le cadre du projet ANR CrazyPolysaccharide (ANR CP2D, projet coordonné par William Helbert, CNRS UPMC Roscoff). L'objectif de ce projet était de mettre en place un outil de bio-prospection des nouvelles enzymes de dépolymérisation des

polysaccharides. L'approche devait permettre d'implémenter un criblage d'activité glycoside hydrolases et polysaccharide lyases, sans *a priori*, sur une collection de polysaccharides de structures connues et inconnues. La stratégie devait reposer sur la mise en place d'un test effectué à moyen débit, permettant de mettre en évidence la coupure des liaisons glycosidiques par des extraits de bactéries marines, ou par des protéines recombinantes, identifiées comme GH et PL putatives dans des génomes complets de bactéries marines.

2. Contraintes analytiques des techniques de criblage

Une technique analytique doit présenter plusieurs caractéristiques pour être utilisable pour le criblage de larges collections d'échantillons. La technique doit être robuste, reproductible et permettre un travail à un débit élevé. Le coût doit être minimal pour ne pas limiter le champ exploratoire. De plus si l'on recherche à cribler des activités enzymatiques faibles, elle doit être sensible et miniaturisée. Enfin, si l'objectif est de détecter les produits de dégradation sans *a priori*, la méthode doit être adaptée à l'hétérogénéité chimique des polysaccharides utilisés comme substrats.

Dion et ses collaborateurs ⁽⁹¹⁾ ont testé et comparé plusieurs méthodes permettant de cribler les produits de dégradation enzymatique des polysaccharides. Les premières méthodes testées, le dosage de sucres réducteurs et de détection de la double liaison (réservé à l'analyse de l'activité des lyases, 7% des catégories répertoriée sur projet CAZy ⁽⁴⁶⁾) reposent sur des approches colorimétriques, respectivement à 690 et 220 nm. Les conclusions des auteurs sont que ces méthodes sont facilement biaisées par la présence d'agents interférents. Pour l'analyse de l'activité de milieux bactériens bruts, elles ne sont donc pas utilisables. Les auteurs ont ensuite testé dans leur travail des approches basées sur des techniques séparatives. L'électrophorèse sur gel d'agarose est limitée à l'analyse d'une certaine classe de polysaccharides (les oligosaccharides chargés). La chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) et chromatographie d'échange d'anions haute performance (HPAEC) sont des méthodes très sensibles mais dont le débit d'analyse est faible. L'interprétation des résultats est longue et nécessite d'avoir des standards disponibles (puisque basée sur les temps de rétention). De plus, les phases mobiles et stationnaires sont dépendantes du type de structure analysée (taille pour l'HPSEC et nature chimique pour l'HPAEC).

La spectrométrie de masse est une technique qui répond parfaitement aux critères recherchés pour un outil de criblage. Elle est rapide, sensible et peu consommatrice d'échantillons. Contrairement aux approches chromatographiques, la technique permet de caractériser efficacement la variabilité chimique rencontrée chez les polysaccharides. De plus, comparée à l'ensemble des techniques évoquées précédemment pour le criblage, elle permet de fournir une réponse qualitative directement, sans l'utilisation de standard : la présence d'une dégradation enzymatique dans un

échantillon est mise en évidence par la mesure de la masse des oligosaccharides obtenus. Cette mesure permet aussi de révéler d'éventuelles modifications.

3. Objectif du travail

Notre contribution au projet ANR CrazyPolysaccharide était de mettre au point une méthode générique basée sur la spectrométrie de masse pour la caractérisation de mélanges d'oligosaccharides présentant des propriétés chimiques variées, dans des extraits bruts de bactéries marines incubées avec différents substrats.

Pour répondre au cahier des charges du projet, l'utilisation de l'ESI comme source d'ionisation paraissait peu adaptée pour le travail sur des milieux enzymatiques contenant des bactéries, des sels et/ou des tampons ⁽⁹²⁾. Il aurait été nécessaire de pratiquer, au préalable, des étapes d'élimination des contaminants, interférant fortement avec la technique. Une étape chromatographique ou de dessalage peut permettre de limiter ces problèmes, comme en témoigne la méthode OliQuIT qui combine la chromatographie liquide capillaire en phase normale et l'ESI-MS pour contrôler des mélanges d'oligosaccharides complexes provenant d'activités de GH ⁽⁹³⁾. Cependant, le débit d'analyse ne permettrait plus un criblage à haut débit. Le criblage des activités enzymatiques directement sur des milieux bruts nous a donc naturellement orientés vers l'utilisation de l'ionisation MALDI, plus tolérante aux contaminants. De plus, les dépôts du mélange échantillon/matrice sur la cible et la mesure de masse sont entièrement automatisables. Enfin, l'analyse peut être réalisée en quelques secondes. Un premier exemple d'application de la technique pour contrôler des activités enzymatiques de lipases a été décrit en 2001 par Kang et ses collaborateurs ⁽⁹⁴⁾. En ce qui concerne les enzymes de dégradation des polysaccharides, le groupe de Pauly a été le premier à proposer une méthode appelée OLIMP (OLigosaccharide Mass Profiling) pour obtenir des empreintes enzymatiques rapides de produits de dégradation de paroi cellulaire par spectrométrie de masse MALDI TOF ⁽⁹⁵⁾. Cependant, l'objectif de ce travail ne portait pas sur la découverte d'enzymes mais utilisait des enzymes d'activité connue pour comparer des plantes, de type sauvage, avec des mutants présentant des structures de paroi cellulaire altérées. Plusieurs travaux postérieurs ont également repris cette approche pour détecter des dégradations enzymatiques par le suivi des produits formés ⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾, également en travaillant sur des enzymes d'activité connue. Dans toutes ces études, les auteurs ont systématiquement procédé à des étapes de purification (par exemple avec l'utilisation de résines échangeuses d'ions) avant l'analyse MS. Dans le cadre du projet CrazyPolysaccharide, nous souhaitions limiter le recours à ces étapes de préparation qui, en plus d'alourdir le procédé analytique, nécessitent généralement une quantité de produit importante.

En spectrométrie de masse MALDI, en dehors du réglage de l'énergie du laser, des paramètres d'extraction, de transmission et de détection, les points cruciaux sur lesquels l'opérateur peut agir sont la nature de la matrice et les solvants utilisés pour sa dissolution. Cette matrice doit être :

- a. Adaptée à la longueur d'onde du laser utilisé.
- b. Co-cristallisable avec les échantillons à analyser donc soluble dans des solvants compatibles avec ceux du milieu analysé.
- c. Apte à produire l'ionisation de la classe de molécule d'intérêt (protéines, peptides, lipides acides nucléiques,...). Dans le cas des oligosaccharides, une matrice spécifique est souvent utilisée en fonction de la nature chimique (neutre, acide), d'éventuelles modifications,...
- d. Adaptée au mode d'ionisation utilisé puisqu'une analyse MALDI peut être réalisée en mode positif (détection des ions chargés positivement) ou en mode négatif (détection des ions chargés négativement).

Dans ce projet, nous avons optimisé la préparation de matrice utilisée en MALDI pour obtenir un signal de bonne qualité (intensité, précision) et reproductible avec les objectifs et contraintes suivantes :

- a. Avoir une matrice qui absorbe dans l'UV (contrainte liée à la configuration de notre instrument, équipé d'un laser UV).
- b. Pouvoir analyser les extraits bruts (milieux salins, tamponnés,...).
- c. Pouvoir analyser des composés chimiquement hétérogènes sans *a priori* en limitant au maximum le nombre de matrices à utiliser.
- d. Pouvoir obtenir, dans les deux modes d'ionisation, l'empreinte la plus représentative possible de l'échantillon.
- e. Permettre l'acquisition automatisée des résultats. En mode automatique, le faisceau laser se déplace sur le dépôt matrice/échantillon (disque d'environ 3.5 mm de diamètre) en quelques points aléatoires et en cumulant les mesures faites en ces différents points. Or, les molécules utilisées comme matrice MALDI peuvent former en séchant de gros cristaux ou de longues aiguilles provoquant une co-cristallisation matrice/échantillon hétérogène. Il est donc important de s'assurer que l'on trouvera un signal équivalent sur toute la surface du dépôt.

4. Résumé des étapes du travail réalisé

Le développement de notre méthode a reposé sur l'utilisation de l'Autoflex III de la société Bruker Daltonics. Ce spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF est équipé d'un laser YAG triplé à 355 nm.

Pour l'analyse des oligosaccharides, deux catégories de matrice sont décrites dans la littérature : les matrices dites cristallines ⁽⁹⁹⁻¹⁰⁰⁾ et les matrices ioniques liquides ⁽¹⁰¹⁾. Les deux types de matrices ont été évalués dans ce projet. Pour la première catégorie, nous avons étudié l'impact de la concentration, des solvants (nature et ratio) mais également, comme décrit dans la littérature ⁽¹⁰²⁾, l'utilisation d'additifs (alcalins ou acides). Pour les matrices ioniques liquides, nous avons à nouveau étudié l'impact de la concentration mais également la quantité de contre-ion utilisé.

La première étape du travail a été de tester l'ensemble de ces préparations manuellement sur des standards sélectionnés, couvrant une relative hétérogénéité chimique : des oligosaccharides neutres (galactomannanes, DP3 à 9), des oligosaccharides acides (galacturonanes DP4 à 10) et des oligosaccharides sulfatés (l-carraghénanes DP6). Une sélection de huit préparations de matrices a été retenue à partir de l'évaluation de plus d'une centaine de préparations.

Nous avons ensuite évalué ces matrices sur leur capacité à fournir un signal homogène sur le dépôt, une précision de mesure acceptable et une bonne intensité de signal. Nous avons pour cela conduit des expériences systématiques, avec des profils de tirs géométriques sur chaque dépôt, et effectué une analyse chimiométrique des mesures. Quatre matrices ont été retenues après cette étape.

Enfin, huit polysaccharides aux propriétés chimiques différentes ont été incubés avec deux extraits bactériens connus pour être actifs sur ces huit substrats. Dans ces conditions, la matrice DMA/DHB (DHB 100 mg/ml dans H₂O/ACN/DMA 49:49:2) s'est montrée meilleure que toutes les autres en termes de résultats. Elle permet d'obtenir un signal homogène sur des échantillons oligosaccharidiques très variés avec une précision de mesure importante à la fois en mode positif et en mode négatif.

5. Publication

Performance evaluation on a wide set of matrix-assisted laser desorption ionization matrices for the detection of oligosaccharides in a high-throughput mass spectrometric screening of carbohydrate depolymerizing enzymes. Ropartz, D.; Bodet, P.-E.; Przybylski, C.; Gonnet, F.; Daniel, R.; Fer, M.; Helbert, W.; Bertrand, D.; Rogniaux, H. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2011, 25, 2059-2070. DOI: 10.1002/rcm.5060

Afin de limiter le nombre de pages et faciliter la lecture, les données supplémentaires fournies avec cette publication sont placées en Annexe 2.

Rapid Commun. Mass Spectrom. **2011**, *25*, 2059–2070
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.5060

Performance evaluation on a wide set of matrix-assisted laser desorption ionization matrices for the detection of oligosaccharides in a high-throughput mass spectrometric screening of carbohydrate depolymerizing enzymes

David Ropartz^{1*}, Pierre-Edouard Bodet¹, Cédric Przybylski^{2,3}, Florence Gonnet^{2,3}, Régis Daniel^{2,3}, Maude Fer⁴, William Helbert⁴, Dominique Bertrand¹ and Hélène Rogniaux¹

¹INRA UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, Plate-Forme BIBS, F-44316 Nantes, France

²CNRS UMR 8587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France

³Université d'Evry-Val-d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France

⁴CNRS-UPMC UMR 7139 Végétaux Marins et Biomolécules, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France

Compared to other analytical methods, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) presents several unique advantages for the structural characterization of degradation products of carbohydrates. Our final goal is to implement this technique as a high-throughput platform, with the aim of exploring natural biodiversity to discover new carbohydrate depolymerizing enzymes. In this approach, a variety of carbohydrates will be used as enzymes substrates and MALDI-MS will be employed to monitor the oligosaccharides produced. One drawback of MALDI, however, is that the choice of the matrix is largely dependent on the chemical properties of the analyte. In this context, our objective in the present work was to find the smallest set of MALDI matrices able to detect chemically heterogeneous oligosaccharides. This was done through the performance evaluation of more than 40 MALDI matrices preparations. Homogeneity of analyte-matrix deposits was considered as a critical feature, especially since the final objective is to fully automate the analyses. Evaluation of the matrices was done by means of a rigorous statistical approach. Amongst all tested compounds, our work proposes the use of the DHB/DMA ionic matrix as the most generic matrix, for rapid detection of a variety of polysaccharides including neutral, anionic, methylated, sulfated, and acetylated compounds. The selected matrices were then used to screen crude bacterial incubation media for the detection of enzymatic degradation products. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Polysaccharides represent a major class of biological polymers. They are the most abundant biopolymers on earth and in the oceans and their role is vital in living organisms, either as structure or storage-related components. They are also essential for the end-use of plant productions in animal and human nutrition (as energy source, dietary fibres, and as texturing or gelling agents) or in biorefinery. In addition to the degree of polymerization (DP), other chemical and structural features of polysaccharides are key elements for their function and end-use. These include the nature of the osidic monomers, the linkage between the building blocks and the possible modifications by chemical substituents. Deciphering polysaccharides structures usually requires degradation – either chemically or enzymatically – of the large and complex polymers into ones with smaller DPs. Compared to chemical treatments, depolymerizing enzymes (glycoside hydrolases (GH) and polysaccharides lyases (PL))

offer a better specificity and do not induce unwanted modifications on polysaccharides. They could be useful tools to improve the conversion of the biomass in biorefinery processes, or to produce tailored oligosaccharides for pharmaceutical or chemical industries. The discovery of novel polysaccharide-active enzymes might therefore be of great interest, although the characterization of their activity through structural analysis of the degraded products remains a challenging task.

Recent developments in mass spectrometry (MS) have made this technique a powerful tool for oligosaccharides analysis. MS enables the monitoring of the degraded products of the enzymatic reaction whilst providing extensive structural information (e.g. polymerization degrees, modifications, bonding). In addition, with the sensitivity achieved on current instruments, very low amounts (i.e. typically, sub-picomolar amounts) of material are necessary. These features make MS-based methods particularly attractive to monitor products of polysaccharide-active enzymes compared to other reported analytical methods, such as high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC), high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC), or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.^[1,2]

* Correspondence to: D. Ropart, INRA UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, Plate-Forme BIBS, F-44316 Nantes, France.
E-mail: David.Ropartz@nantes.inra.fr

Both electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) can be used for mass analysis of many kinds of oligosaccharides. Yet, ESI-MS shows limitation for analysis of enzymatic reactions products due, first, to the interference of many buffers and salts with the ionization process and, second, to the production of several multiply charged species leading to a difficult interpretation of mass spectra. A chromatographic or desalting step can address these issues, as exemplified by the OliQuIT method which combines capillary normal-phase liquid chromatography and ESI-MS to monitor complex oligosaccharide mixtures derived from GH activities.^[3] Compared to ESI, MALDI-MS presents unique advantages: it shows a higher salt tolerance, spectral interpretation is easier due to the unique production of singly charged state ions, and the mass measurement is done within seconds. In addition, liquid handling robotics are available to mix the MALDI matrix with the sample and transfer this mixture onto the MALDI target plates, therefore enabling full automation of the pipeline. Hence, high-throughput platforms based on MALDI-MS can be implemented to screen for enzymatic activities among large collections of bio-resources, or to characterize enzyme-catalyzed reactions on wide collections of polysaccharides. A first application of this technique for monitoring enzymatic activity was described for lipase activities by Kang and co-workers^[4] in 2001.

Regarding polysaccharide-degrading enzymes, Lerouxel and co-workers^[5] were the first to propose a method called Oligosaccharide Mass Profiling (OLIMP) to obtain a fast degradation product fingerprinting of cell wall material by MALDI-time-of-flight (TOF)-MS. This work was mainly focused on the screening of wild-type and mutants altered on cell wall structures, using well-defined enzymes. Several studies then reported on the use of MALDI-MS to detect polysaccharide degradation by monitoring enzymatic reaction products, to address a variety of scientific issues.^[6–9] In almost all these studies, the authors proceeded through a clean-up step (e.g. with an ion-exchange resin) prior to MS analysis. This step is usually time- and material-consuming, and is not usually compatible with high-throughput procedures. Besides, the nature of the oligosaccharides released could be anticipated because of the known enzymatic specificity. Hence, to our knowledge, none of these works aimed at optimizing MALDI matrices for application of the method to a wide range of oligosaccharides.

In the present work, we have evaluated and compared the performance of about 40 MALDI matrices – including crystalline matrices, doped and mixed matrices, and ionic matrices – in order to find a generic matrix adapted to many chemically diverse oligosaccharides and displaying a good salt tolerance. Homogeneity and reproducibility of matrix-sample preparation were assessed by statistical analyses. These features are especially important to operate the method on wide collections of samples in a fully automated mode. Finally, we aimed to establish a high-throughput MALDI-MS based platform, capable of searching for new polysaccharide-degrading enzymes by screening the natural biodiversity, without any ‘a priori’. The choice of the matrix and the proof of concept of the whole method are established from a variety of polysaccharides (carrageenans, laminarans, alginates, manuronans, porphyranes and carboxymethylcellulose) incubated with raw bacterial extracts.

EXPERIMENTAL

Reagents

Sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), sodium acetate (NaCOOCH_3), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (mDHB), 6-aza-2-thiothymine (6ATT), 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA), harmaline (Har), nor-harmaline (Nor), harmine, harmaline, 1,1,3,3-tetramethylguanidine (TMG), pyridine (Pyr), 1-methylimidazole (Im), butylamine (B) and aniline (An) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Saint Quentin Fallavier, France). *N,N*-Dimethylaniline (DMA) was purchased from Fisher Scientific (Fisher Bioblock Scientific S.A., Illkirch, France). Acetonitrile (ACN), ethanol (EtOH), methanol (MeOH) and trifluoroacetic acid (TFA) used for sample preparation were all HPLC grade (Carlo-Erba). Water was of ultrapure quality, obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore).

MALDI matrices

All crystalline matrices, mixed matrices and β -carboline derivatives were prepared at several concentrations, in several solubilizing media (water or aqueous-organic solutions), and with several cationic (Na^+ or H^+) doping concentrations, as specified in Table 1. ACN, EtOH or MeOH hydro-organic solvents were used for matrix solutions, with the ratios (v/v) indicated in Table 1. Ionic matrices (IMs) were prepared as described in Table 2.

Briefly, the set of matrices which were retained for deeper investigation were prepared as follows: THAP (2 mg/mL in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1)), DHB/THAP (4 mg/mL, 1:1 mix, in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1)), sDHB (10 mg/mL (DHB/mDHB 9:1) in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (9:1)), harmaline and nor-harmaline (10 mg/mL in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1), DHB/DMA (DHB 100 mg/mL, in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{DMA}$ (1:1:0.02)), and HABA/TMG₂ essentially as described by Przybylski *et al.*,^[10] but replacing the final solvent by $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1).

Oligo- and polysaccharides

Purified oligosaccharides used as standards were kindly provided by the following partners: galactomannan digests (degree of polymerization (DP) from 3 to 9) from ‘Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles’ (EA 1069, Université de Limoges, France); galacturonan digests (DP from 4 to 10) arabinoxylans (DP 3 to 5) and xyloglucans from ‘Unité Biopolymères Interactions Assemblages’ (UR 1268, INRA, Nantes, France); iota carrageenan standards (DP 6, six sulfate groups) and polysaccharides samples used for method validation (see below) from ‘Marine Plants and Biomolecules’ laboratory (UMR CNRS-UPMC 7139, Roscoff, France).

A bacterial extract from *Pseudoalteromonas carrageenovora* was incubated with kappa/mu carrageenan (*n* [(4-*O*-sulfo-galactose) (1-4) (3,6 anhydro-galactose)] (1-3) *m* [(4-*O*-sulfo-galactose) (1-4) (6-*O*-sulfo-galactose)]), laminaran (*n* [glucose (1-3) (glucose (1-6) glucose)]), propylene glycol alginate (*n* [mannuronan] (1-4) *m* [6-*O*-1,2-propane-diol ester mannuronan]), mannuronan (*n* [mannuronan (1-4) mannuronan]). A bacterial extract from *Pseudoalteromonas atlantica* was incubated with iota/nu carrageenan (*n* [(4-*O*-sulfo-galactose) (1-4)

Table 1. Preparation of non-ionic matrices. Matrices were solubilized at the indicated concentrations, in aqueous-organic media. Organic solvents were either ACN, EtOH or MeOH; they were mixed with water at the various mentioned volume ratios. Na⁺ and H⁺ were added as cationic dopants (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ or NaCOOCH₃ were added at the given molar concentrations; TFA was added at the indicated volume ratio)

Matrices Name	Concentration (mg/mL)	Mixing ratio ^a	Solvent H ₂ O:organic phase volume ratios	Na ⁺ and H ⁺ cationic doping	
				Na ⁺ organic salt (mM)	TFA (%)
DHB HCCA SA THAP ^b MDHB	1 – 2 – 5 – 10 – 20	N.A.	1:0 – 3:1 – 1:1 – 1:3 1:9 – 5:5	5 – 10 – 20	0.1 – 1
DHB/HCCA DHB/THAP mDHB/THAP ^b DHB/6ATT ^b DHB/mDHB (sDHB)	2 – 4 – 10 – 20	3:1 – 1:1 – 1:3 13:6 9:1 – 1:1	1:0 – 3:1 – 1:1 – 1:3 1:9 – 5:5	5 – 10 – 20	0.1 – 1
harmane ^c nor-harmane ^c harmin ^c harmaline ^c	1 – 2 – 5 – 10 – 20	N.A.	1:0 – 3:1 – 1:1 – 1:3	N.A.	N.A.

^aThis is applicable for mixed matrices only.
^bSolubilization of these matrices could not be achieved in pure water.
^cCation doping was not done for these matrices since they were used only in negative ionization mode.

((2-*O*-sulfo-3,6 anhydro-galactose)] (1-3) *m* [(4-*O*-sulfo-galactose) (1-4) (2,6-*O*-disulfo-galactose)], porphyran (*n* [6-*O*-sulfo-galactose (1-3) 6-*O*-methyl-galactose]), xylan (*n* [xylose (1-4) xylose]), carboxymethylcellulose (*n* [2,3,6-*O*-tricarboxymethyl-glucose (1-4) 2,3,6-*O*-tricarboxymethyl-glucose]). Incubation was performed for 20 h and the reaction mixtures were then filtered through 10 kDa cut-off membranes in order to separate and recover low molecular weight oligosaccharides produced upon incubation.

Mass spectrometry

Mass measurements were performed on an Autoflex III MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam laser (355 nm, 200 Hz)

in positive or negative ionization mode, and with a linear or reflector detection.

Oligosaccharides samples (around 100 µg/mL) were mixed with the matrix solution in a 1:1 ratio (v/v) and the mixture (1 µL) was deposited on a polished steel MALDI target plate. In linear mode, the *m/z* range was set to 1000–20 000 and in reflector mode to 500–5000. Acquisition parameters (laser power, pulsed ion extraction, etc.) were optimized for each matrix. Calibration of the instrument was performed systematically, before any new series of analyses. Mass spectra were automatically processed with Flex Analysis 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) to export the mass list of ions: monoisotopic masses were exported after deisotoping using the SNAP algorithm (Bruker); only ions with a signal-to-noise (S/N) ratio above 6 were considered.

Table 2. Preparation of ionic matrices. All combinations of acidic compound concentration and basic compound amount were tested, in all indicated aqueous-organic media. Organic solvents were either ACN, EtOH or MeOH; they were mixed with water at the various mentioned volume ratios

Name	Ionic matrices		Solvent H ₂ O:organic phase volume ratios
	Mass concentration in acidic compound (mg/mL)	Volume concentration in basic compound (µL/mL)	
DHB/DMA DHB/An	1 – 5 – 10 – 20 – 50 – 100	1 – 5 – 10 – 20 – 30 – 50 – 100	
DHB/B DHB/Im DHB/Pyr	1 – 5 – 10 – 20	1 – 5 – 10 – 20 5 – 10 – 20	1:1 – 1:3
HABA/TMG ₂ ^a	79	82	1:1 – 0:1

^aOnly MeOH was used as organic phase for HABA/TMG₂.

Statistical analysis of MALDI-TOF MS data

Homogeneity of matrix-sample deposits

The homogeneity of sample-matrix deposits on the MALDI target plate was evaluated in positive ion mode using a mixture of galactomannans (DP 3 to 9), and in the negative mode using an iota carrageenan standard (DP 6, with up to 6 sulfate groups). For each combination of sample and matrix, the sample-matrix mixture was deposited once by three different operators. MALDI-TOF mass spectra (m/z mass range 500–2000, each spectrum representing 200 single laser shots) were recorded on 100 different positions on each of the three sample-matrix spots. Spectra were exported to Flex Analysis 3.0 software (Bruker) and pre-processed.

Mass lists reporting m/z (monoisotopic masses, after deisotoping with the SNAP algorithm, Bruker) and intensities of detected ions were then exported to MATLAB 7.0 software for statistical analysis and graphical representation. Expected peaks were sought on the spectra with a mass tolerance of $\pm 0.5 m/z$. For each laser shot position, the normalized intensities of detected ions were plotted as well as the averaged observed mass deviation (m/z errors have been calculated and are expressed in ppm). Normalization of ion intensity was done by dividing the intensity at one position by the average intensity of the same ion over the 100 shooting positions.

Evaluation of the ability of MALDI matrices to detect all expected species from standard oligosaccharides

Three oligosaccharides samples were used: galactomannans (DP 3 to 9) to assess the ability of matrices to detect neutral oligosaccharides in positive ion mode, galacturonans (DP 4 to 10) and iota carrageenan (DP 6, with up to 6 sulfate groups) to evaluate detection of acidic oligosaccharides and sulfated oligosaccharides, respectively, in negative ion mode.

One hundred sample-matrix deposits were done for each sample, manually repeated by two different operators and once automatically using a pipetting robot (MultiPROBE II, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). MALDI-TOF mass spectra were recorded in an automated mode by summing 1200 laser shots (random laser shots positions) for each of the 100 deposits. All spectra were then exported to Flex Analysis 3.0 software (Bruker) and pre-processed. Mass lists reporting m/z (monoisotopic masses, after deisotoping with the SNAP algorithm, Bruker) and intensity of detected ions were then exported to MATLAB 7.0 software for statistical measurements. We calculated, for a given ion, the number of times this ion was detected within the series of 200 spectra recorded for the manual deposits or 100 spectra recorded for automated deposits. This gave us an evaluation of the ability of the MALDI matrices to detect the expected species (polymerization degrees or sulfated species) from galactomannans, galacturonans and iota carrageenan. Then, the minimum number of MALDI measurement replicates needed to reach the lowest signal intensity variation was determined: the relative standard deviation (RSD) of ion intensity was calculated for each detected ion within the series of 200 spectra recorded for the manual deposits or 100 spectra recorded for automated deposits, then the average RSD was derived for the whole set of detected ions.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of MALDI matrices

This work firstly aimed to screen among nearly 40 MALDI matrices (Tables 1 and 2) the ones that are well adapted to detect various classes of oligosaccharides formed upon enzymatic reaction.

Being a reference matrix for MALDI analysis of oligosaccharides, DHB was kept as a benchmark throughout this study for comparison purposes. Yet, this matrix produces poorly reproducible spectra and intense matrix clusters are detected in the low m/z range of the mass spectrum leading to possible interferences with ions of interest. Developments have been reported to overcome these limitations, such as doping matrices with compatible cationic^[11–13] or anionic^[14] salts, and combining different matrices to take advantage of each one.^[15]

In order to evaluate the usefulness of cationic doping or mixed matrices, crystalline, pure matrices or mixtures of matrices have been used for sample deposition, with or without addition of Na^+ and H^+ cations (addition of NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCOOCH_3 and of TFA) (Table 1). Note that sodium was taken as cationic doping agent following the results obtained by Lewandowski and co-workers^[13] who showed that this cation was the best choice for detection of both acidic and neutral carbohydrates; TFA was included as it is the most widespread co-matrix in MALDI-MS for analyses of peptides and proteins. Galactomannan and galacturonan oligosaccharides were analyzed in positive ionization mode, as well as a more complex sample consisting of several arabinoxylans in mixture with a xyloglucan. MALDI-TOF mass spectra were recorded manually and a qualitative evaluation of spectral information (i.e. presence of expected ions) was carried out.

Yielding low signal intensity in all tested conditions, SA, HCCA and mDHB were found to be poor matrices for the analysis of neutral oligosaccharides. DHB/6ATT^[13] produced good results for galactomannans and galacturonans, but no signal was observed for the arabinoxylans in the analysis of the arabinoxylans-xyloglucan mixture. Therefore, this matrix was discarded for further experimentations to avoid limitation in the analysis of heterogeneous mixtures of oligosaccharides. On the other hand, THAP, DHB/THAP and sDHB produced an intense signal for all tested samples (data not shown) and were retained for further experimentations.

Doping experiments with cationic salts showed that, in some cases like with sDHB, doping of the matrix with 5 mM of NaH_2PO_4 decreased significantly the potassium adducts observed on galactomannan ions and resulted in a higher S/N ratio for sodium adducts. However, the same matrix preparation led to a complete loss of signal with galacturonans. Therefore, salt doping of matrices was no longer used in our study.

For acidic or sulfated oligosaccharides, the presence of negatively charged groups should favour a MS analysis in the negative ionization mode. However, ionic interactions may occur with inorganic cations (potassium, sodium, etc.) present in the sample, leading to poor ion detection. A desalting step allows this problem to be substantially overcome, but these steps are not compatible with a high-throughput analytical workflow. Nomani and co-workers^[16,17] showed the advantage of β -carboline like harmaline and derivatives for analysis of sulfated oligosaccharides in the negative ion mode. These matrices provided high sensitivity and high resolution, and

exhibited an excellent experimental reproducibility owing to the homogeneous crystallization of the analyte-matrix mixture over the entire sample surface area. Hence, we have investigated the performances of harmane, nor-harmane, harmaline and harmine with different preparation conditions (Table 1) to analyze galacturonans and iota carrageenans in the negative ion mode. As illustrated in Fig. 1, harmane and nor-harmane showed high-quality spectra, unlike harmaline and harmine (data not shown). Both harmane and nor-harmane were selected for further analyses in negative mode.

Ionic matrices (IMs) are formed by mixing a conventional acidic crystalline matrix with a basic compound. They were introduced recently by Armstrong and co-workers^[18] and were shown to exhibit more reproducible mass spectra due to a very homogeneous distribution of analyte in the sample-matrix deposit. Several papers reported on the use of IMs for specific oligosaccharides analyses, showing that these matrices provide high sensitivity in both positive and negative ionization modes, and that few clusters are formed by the matrix and interfering with low mass ions.^[10,19–24]

Thus, IMs could represent a substantial improvement for the implementation of a high-throughput platform dedicated to monitor a variety of oligosaccharides. In particular, as they are adapted to detection in both ionization modes, a single deposit can be used for both analyses thereby saving time and sample. Galactomannan and galacturonan oligosaccharides were investigated in positive and negative ion modes with six IM preparations (Table 2). DHB/Im and DHB/Pyr yielded good-quality mass spectra for m/z ions below 800, yet did not allow the detection of high mass compounds. Concerning DHB/B and DHB/An, abundant ions originating from a Schiff base derivation (producing a mass shift of 51 Da and 75 Da for DHB/B and DHB/An respectively) were observed on the mass spectra (data not

shown), splitting the signal into two chemical species. This effect was documented^[25] and was shown to depend on the nature of the oligosaccharide and on the degree of polymerization, thus making spectral interpretation more tedious when unknown oligosaccharides are to be analyzed. Only DHB/DMA and HABA/TMG₂ ionic matrices led to intense mass spectra on the entire mass range, and to a straightforward interpretation of mass data.

In conclusion, eight matrices were selected for further experimentations in automated mode: THAP, DHB/THAP, sDHB and DHB representing conventional, crystalline matrices (or mixed matrices); harmane and nor-harmane representing β -carboline derivatives to be used in negative ion mode; and, finally, DHB/DMA and HABA/TMG₂ as representative of IMs.

Evaluation of the selected matrices for their use in high-throughput, automated MALDI analysis

Signal homogeneity and mass accuracy

The morphology of the matrix crystal layer on the MALDI target plate plays an important role in signal detection in MALDI-MS: a homogeneous incorporation of the analyte within the matrix crystals will make detection of the analyte more even throughout the spot. This is especially important when acquisitions are to be performed in an automated mode, with randomized laser shots on the spot surface. As obvious from the pictures in Fig. 2, homogeneity of sample-matrix deposits significantly varies depending on the matrix preparation. The THAP matrix displayed a heterogeneous deposit and produced a very irregular signal with 'hot spots' of intense signal, and gaps with no signal. Homogeneity was slightly improved by mixing THAP with DHB, and, thus, THAP was discarded for further studies and the DHB/THAP matrix was kept instead. A graphical analysis of the signal

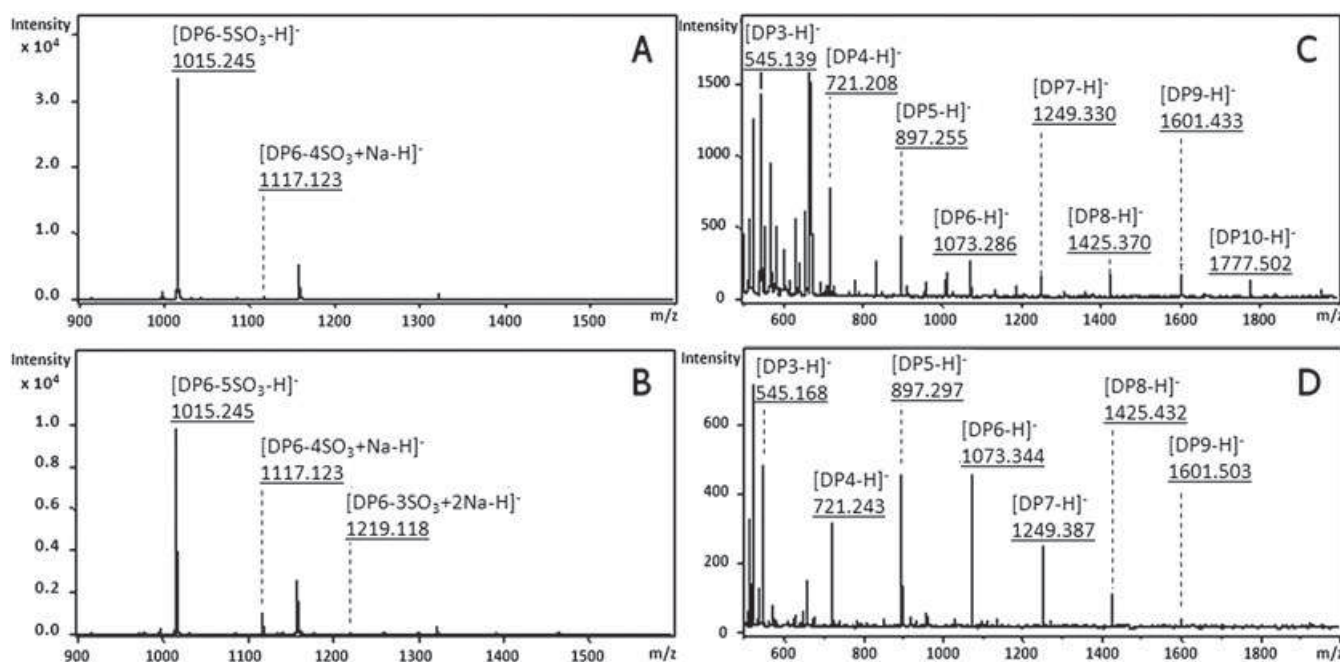


Figure 1. Negative reflector ion mode MALDI-MS spectra of iota carrageenans (A, B) and galacturonans (C, D) after preparation with harmane (2 mg/mL in H₂O/MeOH, 1:1, v/v) (A and C) and nor-harmane (2 mg/mL in H₂O/MeOH, 1:1, v/v) (B and D). The mass spectra were generated by averaging the signal of 1200 single laser shots.

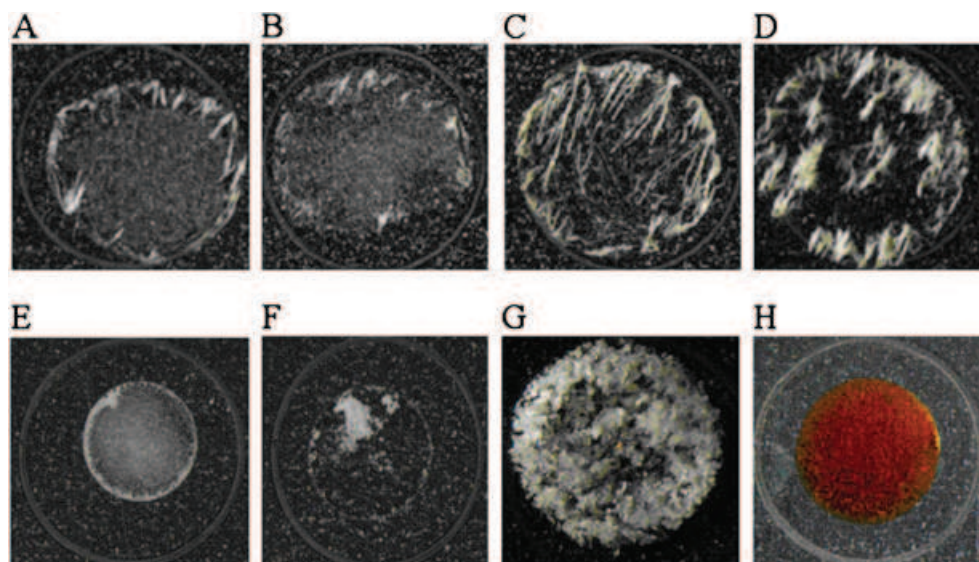


Figure 2. Photographs of typical DHB (A), sDHB (B), THAP (C), DHB/THAP (D), harmane (E), nor-harmane (F), DHB/DMA (G) and HABA/TMG₂ (H) deposits onto a polished steel MALDI target plate using the 'dried-droplet' method.

distribution over the spots surface was then carried out for the seven remaining matrices. A regular laser shooting was performed across the spots and a spectrum (200 laser shots) was recorded for each position coordinate. As exemplified in Fig. 3, shooting was done according to a cross pattern (50 positions in horizontal line and 50 in a vertical line) in the positive ion mode. A different shooting pattern was carried out in the negative ion mode because of the strong matter ablation phenomenon observed with β -carboline matrices. Therefore, laser shots were carried out according to a 'star' pattern (25 spectra recorded horizontally, 25 vertically and two times 25 spectra recorded crosswise, as shown in Fig. 4).

Graphical evaluation of signal homogeneity was assessed from analyses of galactomannans in positive mode: seven DPs were considered, ranging from 3 to 9. For negative ion mode, an iota carrageenan (DP 6) sample carrying up to six sulfate groups was studied.

Representative examples of signal repartitions obtained with DHB/THAP and DHB/DMA are given in Fig. 3 (see Supporting Information for other tested matrices). Additionally, accuracies of mass measurement depending on the matrix are plotted in Fig. 5. An oddly distributed signal with 'hot spots' showing high intensity and 'gaps' where no signal was detected was observed for DHB/THAP; the same was observed for DHB. These 'gaps' could cause false negatives in automatic fingerprinting analyses. For DHB/DMA (as well as for sDHB and HABA/TMG₂), signal repartition was more even over the sample-matrix deposit, consistent with the better crystallization observed after solvent evaporation. These three matrices also gave a good accuracy in mass measurement in agreement with previous results.^[10,21,22]

Concerning the negative ion mode, results obtained with nor-harmane and DHB/DMA are shown in Fig. 4 (results with other matrices are provided as Supporting Information). Nor-harmane displayed high heterogeneity with 'hot spots' and 'gaps'. This heterogeneity was not apparent from the macroscopic observation of the crystal layer (Fig. 2). Harmane exhibited a lower heterogeneity, whilst the best results in

terms of signal repartition were obtained, as for the positive mode, with the IMs DHB/DMA and HABA/TMG₂. Noticeably, mass accuracy is not as good as that measured in positive ion mode (from 70 ppm for nor-harmane to 120 ppm for HABA/TMG₂), the best accuracy being obtained for DHB/DMA (around 30 ppm) (Fig. 5).

Based on both the signal repartition across the sample-matrix deposits and the mass measurement accuracy, sDHB, DHB/DMA and HABA/TMG₂ were selected for positive mode analyses, and harmane, DHB/DMA and HABA/TMG₂ for negative mode analyses.

Evaluation of the number of deposit replicates needed to achieve a reliable fingerprint of samples

An important point for matrix validation was to ascertain that these matrices provided a reliable fingerprint of the analyzed samples, for polysaccharides of various chemical natures. It was also important to define how many deposits of a given sample-matrix combination were required to achieve a representative spectral signature, both qualitatively (e.g. detection of the widest number of polymerization or modification degrees on the mass spectrum) and quantitatively (lowest intensity variation between spectra for a given sample).

From the four matrices selected above, three (sDHB, DHB/DMA, HABA/TMG₂) were used to analyze galactomannans (DP 3 to 9) in positive mode, and three (harmane, DHB/DMA, HABA/TMG₂) to analyze galacturonans (DP 4 to 10) and iota carrageenans (DP 6, with up to 6 sulfate groups) in negative ion mode.

For each peak expected to be present in a given sample, the percentage of deposits in which the peak was successfully detected among 100 analyzed deposits was plotted (Fig. 6, see also Experimental section for further details). Note that the 100 deposits were either done manually (by two different operators) or with a pipetting robot, and that no significant difference was observed. Thus, only deposits done with the robot are considered here.

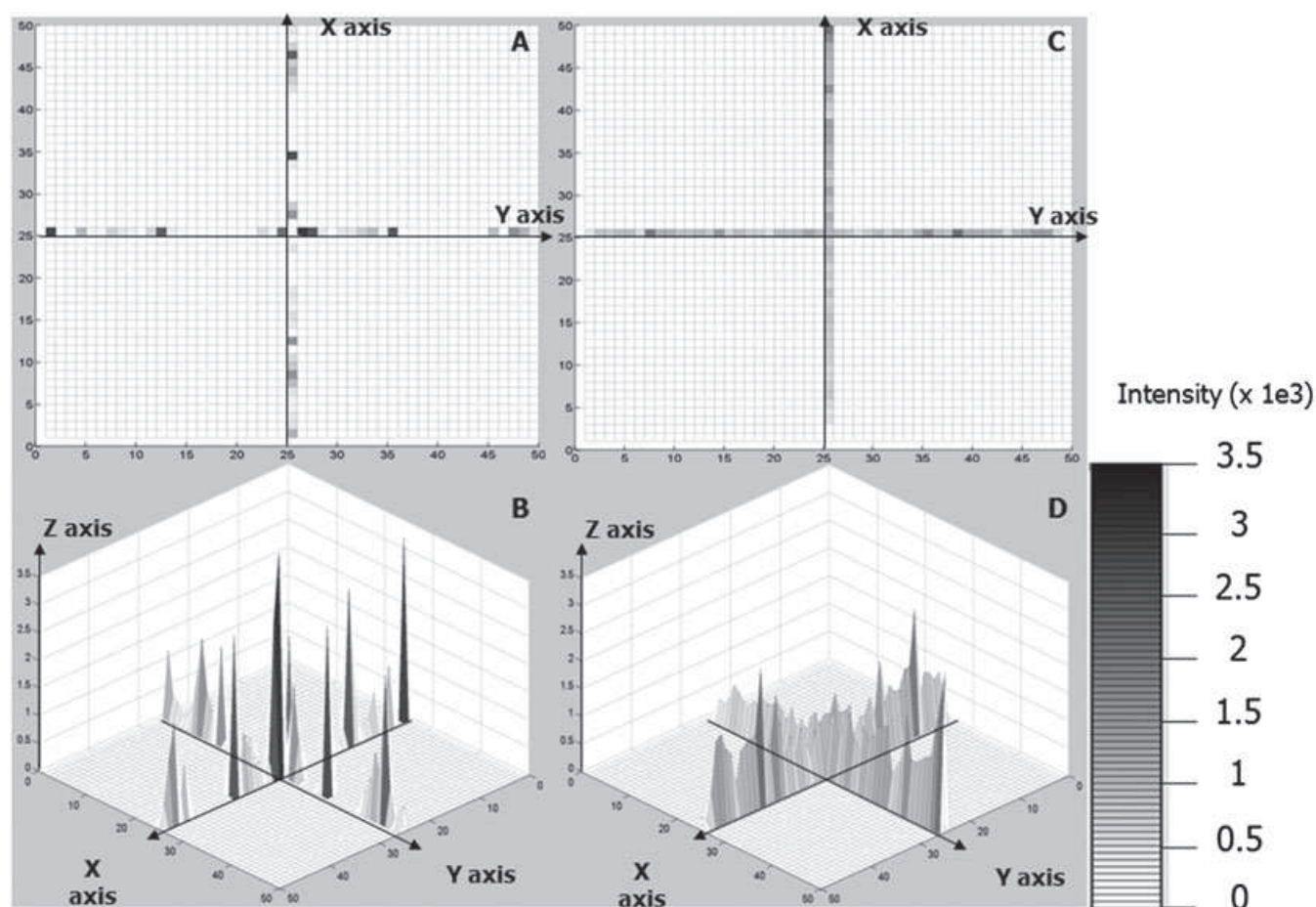


Figure 3. Signal distribution and intensity obtained for galactomannan in positive ion mode, with DHB/THAP mixed matrix (A and B) and DHB/DMA ionic matrix (C and D). The plots represent the peak intensities recorded across the MALDI spot, as a 2D (A and C panels) or a 3D view (B and D panels). The signal distribution is plotted from 100 mass spectra recorded at 100 different shooting positions: 50 positions along the Y axis, and 50 positions along the X axis. Intensity is displayed as a grey-gradation going from 0 (light grey) to $3.5 \cdot 10^3$ ion intensity (dark grey).

In positive ionization mode, all three matrices succeeded in detecting the expected ions (i.e. polymerization degrees of galactomannans) in almost all deposits (Fig. 6(A)). As shown, the DHB/DMA and HABA/TMG₂ matrices permitted detection of all expected peaks in all deposits. The mean relative standard deviation (RSD) of ions intensities was calculated for these two matrices, considering one deposit or a set of three deposits within the collection of 100 deposits. The RSD values were of 21% and 12% for DHB/DMA, considering one and three replicates, respectively, and of 25% and 15% for HABA/TMG₂ for one and three replicates, respectively. Thus, we can conclude that these two matrices perform similarly in positive ion mode and that they enable a reliable fingerprint to be obtained with an acceptable (<20%) signal intensity variability by averaging the signal recorded from three deposits replicates.

In negative ionization mode, the IMs (DHB/DMA and HABA/TMG₂) improved significantly the detection of both high DPs and high sulfated degrees, compared to harmane (Figs. 6(B) and 6(C)). None of these matrices, however, was able to detect the DP 10 of galacturonans in all 100 deposits, nor the fully sulfated DP 6 of iota carrageenan. We calculated the number of deposit replicates that should be done in order to observe – on the spectrum averaged over these replicates – all

expected peaks with a probability higher than 95%. We found that three replicates with DHB/DMA permitted all of the DPs of galacturonans or sulfated degrees of iota carrageenans to be observed with a probability of 99%. Similar results were obtained with HABA/TMG₂ matrix in the case of iota carrageenans. However, in our hands, HABA/TMG₂ seemed to be less adapted to the detection of galacturonans. The RSD values of signal intensities were higher in negative mode than in positive mode: by averaging three replicates, a RSD value of 37% was obtained for galacturonans, both for DHB/DMA and HABA/TMG₂.

Taking into consideration that the ability to detect a wide range of different kinds of oligosaccharides with low intensity variation is an essential criterion to confidently monitor enzymatic degradation, the use of DHB/DMA as MALDI matrix appears as the best compromise for both positive and negative ionization modes. The HABA/TMG₂ matrix offers another alternative for positive ionization mode, with similar features to that obtained with DHB/DMA. For both matrices and for both ionization modes, three replicates of sample-matrix deposits using DHB/DMA should allow a satisfying repeatability in terms of peak representation and intensities.

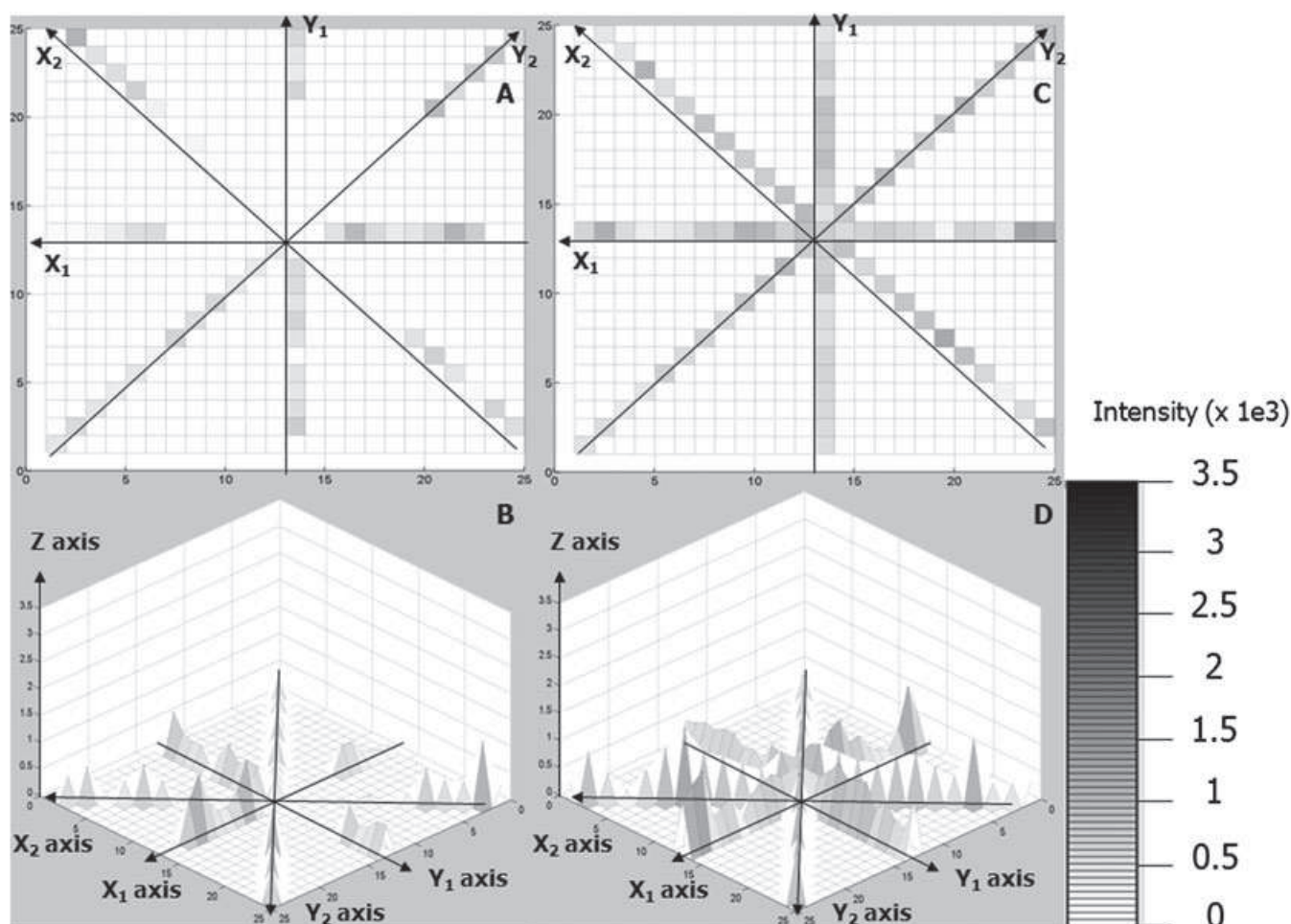


Figure 4. Signal distribution and intensity obtained for iota carrageenan in negative ion mode, with nor-harmane matrix (A and B) and DHB/DMA ionic matrix (C and D). The plots represent the peak intensities recorded across the MALDI spot, as a 2D (A and C panels) or a 3D view (B and D panels). The signal distribution is plotted from 100 mass spectra recorded at 100 different shooting positions: 25 positions along the Y axis, 25 positions along the X axis, and 25 positions along each diagonal. Intensity is displayed as a grey-gradation going from 0 (light grey) to $3.5 \cdot 10^3$ ion intensity (dark grey).

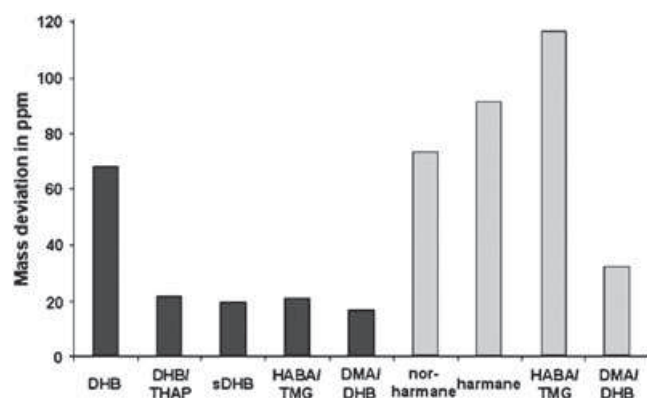


Figure 5. Mean errors in mass measurements expressed in ppm obtained with matrices studied for: the positive ion mode on the seven degrees of polymerization of galactomannans in dark grey with DHB, DHB/THAP, sDHB, HABA/TMG₂ and DHB/DMA; and for the negative ion mode on the six sulfatation degrees of iota carrageenan in light grey with nor-harmane, harmane, HABA/TMG₂ and DHB/DMA.

Application of the high-throughput MALDI method on crude digests of polysaccharides

In this last part of our work, our developed methodology was applied to monitor depolymerization of various polysaccharides upon incubation with marine bacteria extracts (Table 3), under high-throughput screening conditions. Fully automated analyses were performed in positive and/or negative modes using DHB/DMA, HABA/TMG₂, sDHB and harmane.

Two examples of MALDI-TOF mass spectra recorded with DHB/DMA and obtained from incubation of laminaran with *Pseudoalteromonas carrageenovora* crude bacterial extract and from porphyrans incubated with *Pseudoalteromonas atlantica* are shown in Figs. 7(A) and 7(B) (other examples are available as Supporting Information). Compared to incubation with heat shock inactivated bacterial extracts (foreground spectra in Fig. 7), additional ions were clearly observed on MALDI mass spectra, evidencing a depolymerization of laminarans and porphyrans after 20 h of incubation with active bacterial extracts (background spectra in Fig. 7). This result agrees with

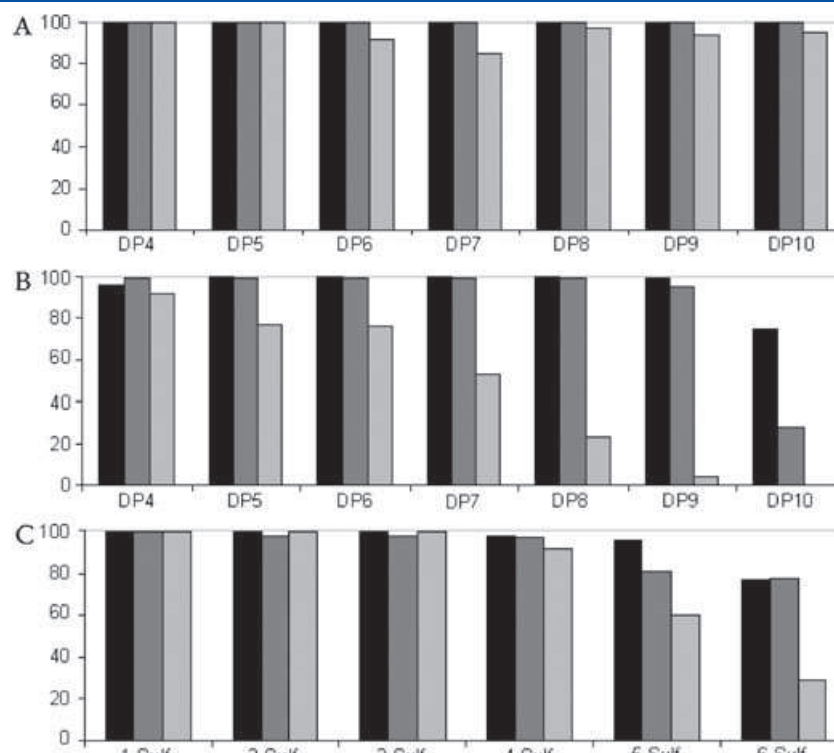


Figure 6. Left side: Number of each given peak detected among 100 spectra, acquired on pipetting robot deposits, recorded for: (A) galactomannans: analyses in positive ion mode with DHB/DMA (black), HABA/TMG₂ (dark grey), and sDHB (light grey); (B) and (C) galacturonans and DP6 iota carrageenans, respectively: analyses in negative ion mode with DHB/DMA (dark), HABA/TMG₂ (dark grey) and harmane (light grey).

other studies performed on the same samples by HPAEC and colorimetric assays. Noticeably, the structural information provided by MALDI-MS enabled identification of the depolymerization products as being the result of a GH activity. A good spectral quality was obtained in both positive and negative modes. In particular, a high S/N ratio was obtained from the crude bacterial extract, whilst no desalting step had been done. Interpretation of observed molecular species was rather simple, as essentially only $[M+Na]^+$ ions were detected in positive mode and $[M+(n-1)Na-nH]^-$ in negative mode. Finally, contribution from matrix oligomers was negligible and did

not interfere with the analyzed compounds. Besides, in the case of porphyran (Fig. 7(B)), the method allowed the detection of several sulfated degrees but also several degrees of methylation; for DP 6 and DP 4, fully sulfated and fully methylated species could be preserved upon MALDI analysis.

The capacity to probe depolymerization products from eight incubation media using sDHB, harmane, HABA/TMG₂ or DHB/DMA as matrices is summarized in Table 3. According to these results, DHB/DMA matrix appears as the best-suited matrix to monitor depolymerization from various terrestrial or marine sources of carbohydrates.

Table 3. Enzymatic depolymerization activities (indicated by a check mark) detected according to used MALDI matrices

Enzyme-polysaccharide incubation medium		MALDI detection of degraded products				
Bacterial extract	Polysaccharide	Ionization mode	Matrices			
			sDHB	harmane	HABA/TMG ₂	DHB/DMA
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	xylan	Positive	✓		✓	✓
	carboxymethylcellulose		✓			✓
	porphyran	Negative		✓	✓	✓
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	iota/nu carrageenan			✓	✓	✓
	laminaran	Positive	✓		✓	✓
	propylene glycol alginate		✓			✓
	mannuronan	Negative		✓	✓	✓
	kappa/mu carrageenan			✓	✓	✓

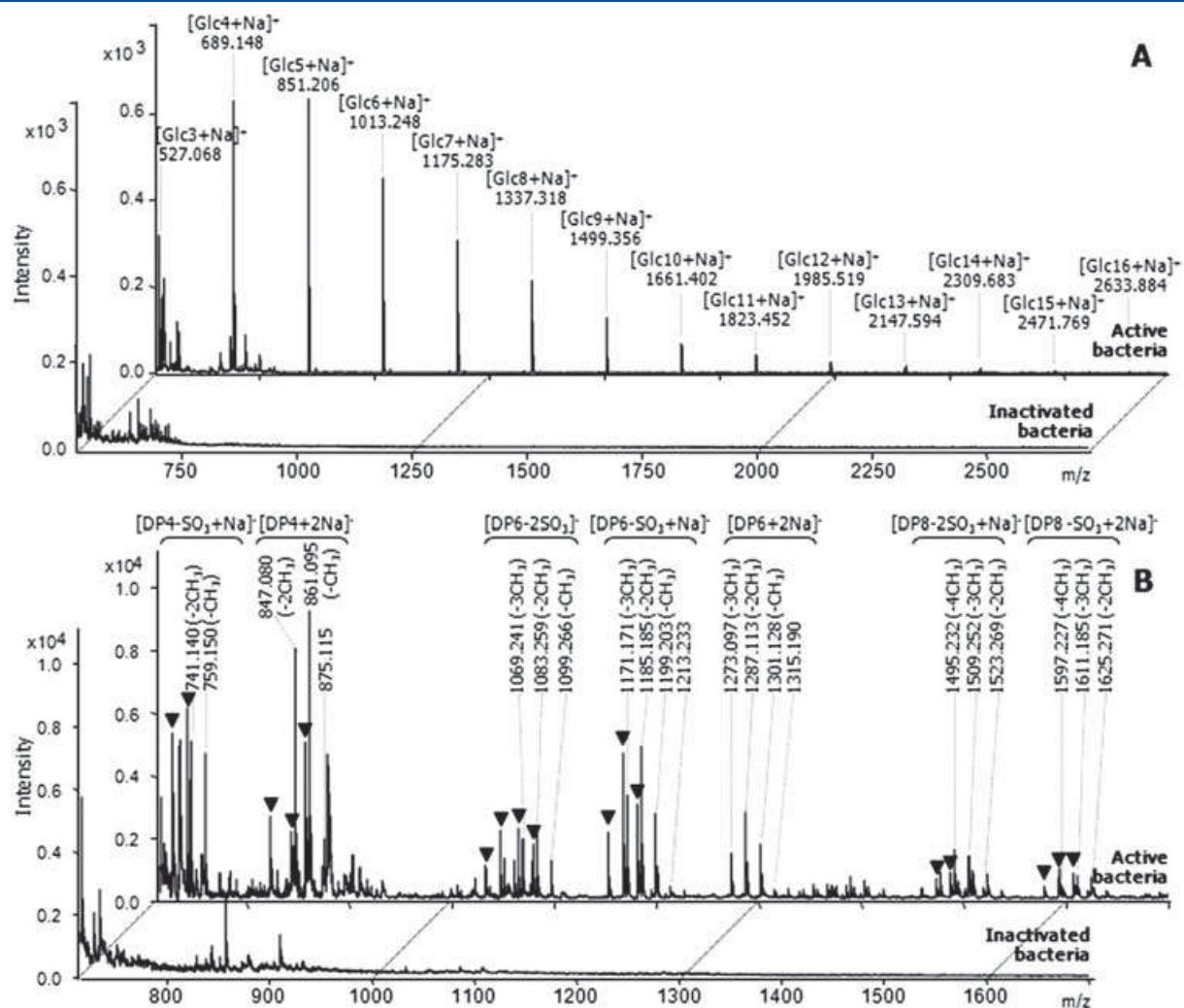


Figure 7. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DHB/DMA from a 20-h incubation of two polysaccharides with heat shock inactivated (foreground spectra) or fully active (background spectra) bacterial extracts. (A) Laminaran incubated with *Pseudoalteromonas carrageenovora* in positive ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions $[M+Na]^+$. Depolymerization products are annotated by number of glucose (Glc) subunits. (B) Porphyrans incubated with *Pseudoalteromonas atlantica* in negative ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions $[M-H]^-$. Depolymerization products are annotated by degree of polymerization (DP) of galactose. All depolymerized products were considered as totally sulfated and methylated to simplify the annotation, but each galactose can be unmodified or have lost sulfate groups ($-SO_3$) or methyl groups ($-CH_3$). Black triangles indicate a loss of water.

In addition, a broad range of modifications (sulfations, carboxymethylations, methylations) are preserved with this matrix during the MALDI process.

CONCLUSIONS

In this work, a panel of 40 MALDI matrix preparations were tested for their use in a fully automated pipeline aimed at monitoring enzymatic degradation of polysaccharides from crude bacterial media. Crystalline matrices, mixtures of crystalline matrices, salt doping, β -carboline derivatives as well as more recently introduced ionic matrices were evaluated. Our aim was to reach sample-matrix preparation conditions that could fit the broadest range of analyzed polysaccharide samples, and that would be adapted to

automated, medium- to high-throughput MALDI-MS analyses. For that aim, MALDI matrices were evaluated based on several features: the homogeneity of the signal distribution amongst the sample-matrix deposit, mass deviation, the reliability of the mass spectral representation of the sample, and, finally, the number of analytical replicates required to achieve a signal repeatability (variation of signal intensity). The use of chemiometric measurements enabled us to rigorously address all the above features. As a final result, we propose the DHB/DMA ionic matrix as being the most generic and efficient matrix for a rapid and automated detection of degradation of polysaccharides in complex mixtures. Notably, this can be done without requiring any time-consuming sample preparation such as desalting, and the same matrix can be used both in positive and negative ion modes. This matrix proved to be adaptable to many

chemically diverse polysaccharides. HABA/TMG₂ ionic matrix is an alternative with very close features in positive ion mode, yet this matrix yielded uneven results in negative mode, depending on the nature of the analyzed carbohydrates.

The MALDI method presented here should be efficient to screen large collections of samples in order to discover new enzymatic activities on polysaccharides. This concept is under application in our laboratory to screen marine bacteria collections (results of the screening will be the subject of a separate publication). Following the MALDI-MS screening, classical protein purification strategies will remain necessary to isolate the newly discovered polysaccharide-degrading enzymes. Yet, the implementation of the high-throughput MALDI method allows envisioning the functional screening of genomic or metagenomic banks, thus accelerating the availability of genes of interest.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR CP2D CRAZY Polysaccharides). The authors are very grateful to M.-C. Ralet (INRA UR BIA, F-Nantes) and V. Gloaguen (LCSN, F-Limoges) for providing us with various oligosaccharides, and to Laura Serianni and Cédric Ropartz for careful re-reading of the manuscript.

REFERENCES

- [1] C. Rigouin, C. Delbarre Ladrat, C. Sinquin, S. Collic-Jouault, M. Dion. Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 279.
- [2] M. Guibet, S. Colin, T. Barbeyron, S. Genicot, B. Kloareg, G. Michel, W. Helbert. Degradation of lambda-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* lambda-carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to kappa- and iota-carrageenases. *Biochem. J.* **2007**, *404*, 105.
- [3] G. Ridlova, J. C. Mortimer, S. L. Maslen, P. Dupree, E. Stephens. Oligosaccharide relative quantitation using isotope tagging and normal-phase liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 2723.
- [4] M. J. Kang, A. Tholey, E. Heinzle. Application of automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the measurement of enzyme activities. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1327.
- [5] O. Lerouxel, T. S. Choo, M. Seveno, B. Usadel, L. Faye, P. Lerouge, M. Pauly. Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.* **2002**, *4*, 1754.
- [6] D. Bungert, E. Heinzle, A. Tholey. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 167.
- [7] N. Obel, V. Erben, T. Schwarz, S. Kühnel, A. Fodor, M. Pauly. Microanalysis of plant cell wall polysaccharides. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 922.
- [8] Y. Westphal, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, H. Gruppen. MALDI-TOF MS and CE-LIF Fingerprinting of plant cell wall polysaccharide digests as a screening tool for arabidopsis cell wall mutants. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4644.
- [9] E. Leboeuf, P. Immerzeel, Y. Gibon, M. Steup, M. Pauly. High-throughput functional assessment of polysaccharide-active enzymes using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry as exemplified on plant cell wall polysaccharides. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 9.
- [10] C. Przybylski, F. Gonnet, D. Bonnaffe, Y. Hersant, H. Lortat-Jacob, R. Daniel. HABA-based ionic liquid matrices for UV-MALDI-MS analysis of heparin and heparan sulfate oligosaccharides. *Glycobiology* **2010**, *20*, 224.
- [11] J. Lemoine, B. Fournet, D. Despeyroux, K. R. Jennings, R. Rosenberg, E. de Hoffmann. Collision-induced dissociation of alkali metal cationized and permethylated oligosaccharides: Influence of the collision energy and of the collision gas for the assignment of linkage position. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 197.
- [12] G. E. Hofmeister, Z. Zhou, J. A. Leary. Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: tandem mass spectrometry and semiempirical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5964.
- [13] U. Lewandrowski, A. Resemann, A. Sickmann. Laser-induced dissociation/high-energy collision-induced dissociation fragmentation using MALDI-TOF/TOF-MS instrumentation for the analysis of neutral and acidic oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3274.
- [14] A. W. Wong, M. T. Cancilla, L. R. Voss, C. B. Lebrilla. Anion dopant for oligosaccharides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 205–211.
- [15] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, M. Grehl, B. Krebs. Matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476.
- [16] H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama, R. Erra-Balsells. β -Carboline alkaloids as matrices for UV-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in positive and negative ion modes. Analysis of proteins of high molecular mass, and of cyclic and acyclic oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 285.
- [17] H. Nonami, F. Wu, R. P. Thummel, Y. Fukuyama, H. Yamaoka, R. Erra-Balsells. Evaluation of pyridindoles, pyridylindoles and pyridylpyridindoles as matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2354.
- [18] D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. He, M. L. Gross. Ionic liquids as matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3679.
- [19] Y. Fukuyama, S. Nakaya, Y. Yamazaki, K. Tanaka. Ionic liquid matrices optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2171.
- [20] M. Mank, B. Stahl, G. Boehm. 2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrices for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2938.
- [21] S. I. Snovidia, V. C. Chen, H. Perreault. Use of a 2,5-dihydroxybenzoic acid/aniline MALDI matrix for improved detection and on-target derivatization of glycans: a preliminary report. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8561.
- [22] S. I. Snovidia, H. Perreault. A 2,5-dihydroxybenzoic acid/N,N-dimethylaniline matrix for the analysis of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3711.
- [23] B. Tissot, N. Gasiunas, A. K. Powell, Y. Ahmed, Z. L. Zhi, S. M. Haslam, H. R. Morris, J. E. Turnbull, J. T. Gallagher, A. Dell. Towards GAG glycomics: analysis of highly sulfated

- heparins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Glycobiology* **2007**, *17*, 972.
- [24] M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, A. Tholey. Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 141.
- [25] S. I. Snovida, J. M. Rak-Banville, H. Perreault. On the use of DHB/aniline and DHB/*N,N*-dimethylaniline matrices for improved detection of carbohydrates: automated identification of oligosaccharides and quantitative analysis of sialylated glycans by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1138.

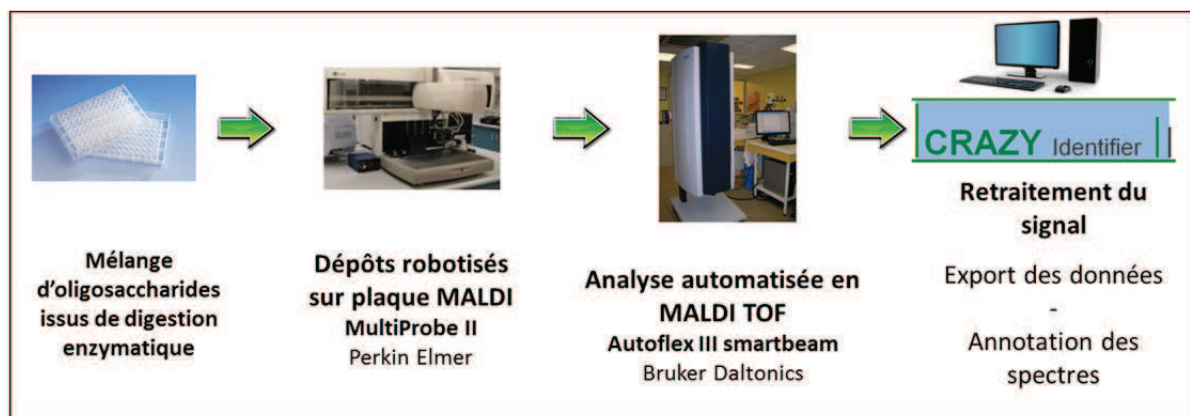


Figure 14. Plateforme complète de criblage d'activité enzymatique développée au laboratoire. Les échantillons sont incubés directement dans des microplaques 96 puits. Le dépôt matrice/échantillon est réalisé sur cible MALDI standard grâce à un robot. Les analyses sont réalisées en mode d'acquisition automatique en triplicat. Les données sont exportées vers le logiciel Crazy identifier, qui permet de visualiser rapidement les résultats et de proposer l'identification des produits détectés par interrogation d'une banque de données.

6. Conclusions

La méthode MALDI présentée ici est efficace pour cribler de larges collections d'échantillons afin de découvrir de nouvelles activités enzymatiques sur les polysaccharides. Cette approche est réalisable avec une seule matrice, ce qui permet de limiter considérablement le temps et les coûts d'analyse. Cette mise en œuvre du procédé de MALDI à haut débit permet d'envisager le criblage fonctionnel de banques génomiques ou métagénomiques, accélérant ainsi la recherche des gènes d'intérêt.

Lors de cette étude, nous avons également contribué au développement d'un logiciel CRAZY Identifier permettant de détecter, à partir des spectres acquis et à haut débit (800 spectres à la minute), la présence d'une activité enzymatique. Ce logiciel permet d'automatiser intégralement la chaîne d'identification présentée Figure 14, en fournissant, en sortie, une réponse sur la présence d'une activité de dégradation et en proposant une annotation des espèces mesurées.

7. Données supplémentaires

La méthode développée a été appliquée au criblage de la bactérie marine *P. atlantica* incubée avec 96 polysaccharides différents. Les résultats obtenus par criblage MALDI ont été comparés aux résultats de l'analyse par HPAEC et à une approche colorimétrique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Parmi les trois approches, c'est la méthode MALDI qui a permis de détecter le plus d'activités de dégradation pour *P. atlantica*. L'ensemble des dégradations retrouvées avec les 2 autres techniques l'ont été par l'approche de spectrométrie de masse (à l'exception de l'échantillon arabinogalactane Larc. qui présentait une contamination aux polyéthylèneglycol (PEG) rendant son analyse impossible par MALDI). Les points importants sont que:

- a. La complémentarité des modes positif et négatif est importante (la dégradation des glucomannanes konjac et des différents xylanes a été validée en mode positif uniquement, alors que pour les alginates et quelques carraghénanes, elle a été validée en mode négatif).
- b. Pour les valeurs où l'approche colorimétrique est ambiguë (valeurs en orange dans le Tableau 3) nous avons pu valider ou invalider la dégradation.
- c. Pour 10 polysaccharides, l'approche de colorimétrie a échoué à valider une dépolymérisation. Pour 8 d'entre eux, seule l'approche par MALDI TOF MS a permis de valider l'activité enzymatique, témoignant de la sensibilité de la méthode.

Tableau 3. Résultats obtenus pour le crible de 96 polysaccharides incubés avec un lysat de *P. atlantica* pour trois méthodes de détection de la dégradation enzymatique. Seuls les polysaccharides présentant une dégradation validée par au moins une technique sont présentés.

Polysaccharide	Colorimétrie	HPAEC	MALDI
Porphyranes (INRA)	1.08	●	●
Glucomannanes konjac	0.85	●	●
Xylanes (Palmaria)	0.8	●	●
ι-ν carraghénanes	0.69	●	●
CM-Cellulose	0.53	●	●
Rye Arabinoxylanes	0.45	●	●
Wheat Arabinoxylanes	0.44	●	●
ArabinoGalactanes Larc.	0.42	-	PEG
Xylan (Beechwood)	0.38	●	●
Oligo ι carraghénanes	0.35	●	●
Oligo agarose	0.29	-	●
Lichenanes	0.29	●	●
Oligo κ-carraghénanes	0.27	-	●
Amylose	0.26	-	●
Vv180p	0.22	-	-
Pa	0.19	●	●
Agarose	0.19	-	-
Galactanes	0.18	-	●
β-carraghénanes	0.17	-	-
Gomme arabique	0.17	-	-
RG I	-	●	●
Oligo λ carraghénanes	-	-	●
RG	-	●	●
oligo Ulvanes	-	-	●
Alginate de sodium	-	-	●
κ-μ carraghénane	-	-	●
Pullulanes	-	-	●
β -Mannanes	-	-	●
Inuline	-	-	●
β -Cyclodextrin	-	-	●

Note : pour l'approche par colorimétrie, les valeurs en vert indiquent une dégradation statistiquement significative, et en orange une dégradation statistiquement ambiguë. Pour l'ensemble des approches, les tirets rouges indiquent une dégradation non détectée. Spécifiquement pour les approches par HPAEC et MALDI TOF MS, les ronds verts indiquent une dégradation validée comme pour la colorimétrie et les ronds rouges indiquent une dégradation validée alors qu'elle n'avait pas été détectée en colorimétrie.

Finalement, le criblage nous a permis de mettre en évidence 23 activités prédites par les outils de génomique, ce qui représente environ 80% des activités prédites chez *P. atlantica*. Il a également permis de découvrir une nouvelle enzyme : une ulvane lyase, et une nouvelle activité non décrite : une methyl-porphyranease.

PARTIE 2

AMELIORATION DES METHODES SEPARATIVES POUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDES EN MELANGE ET LA RESOLUTION DES ISOMERES

-

Couplage CCM-MALDI pour la caractérisation
de régioisomères obtenus par glycosyltransférase

-

Développements de la chromatographie IP-RP-UHPLC
pour séparer et résoudre des mélanges complexes

AMELIORATION DES METHODES SEPARATIVES POUR LA CARACTERISATION STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDES EN MELANGE ET LA RESOLUTION DES ISOMERES

Comme nous l'avons présenté en Introduction, une des difficultés principales de l'étude des polysaccharides par spectrométrie de masse en mélange plus ou moins complexe est la présence d'isomères. Pour avoir une information précise sur la nature exacte des espèces en présence, il est donc nécessaire d'avoir recours à des outils de séparation en amont de la spectrométrie de masse. Nous nous sommes intéressés, dans cette partie, aux techniques séparatives directement interfaçables avec la spectrométrie de masse. Ces techniques séparatives doivent être adaptées aux types d'échantillons mais également à la nature de la source d'ionisation utilisée. En ionisation MALDI, qui est une technique de surface, nous avons cherché à développer une méthode pour la séparation des mélanges peu complexes mais présentant des isomères basée sur le couplage avec la chromatographie sur couche mince (CCM). En ionisation électrospray, nous avons travaillé sur l'utilisation de la chromatographie liquide pour échantillonner des mélanges à la fois très complexes et présentant un nombre important d'isomères.

Couplage CCM-MALDI pour la caractérisation de régioisomères obtenus par glycosyltransférase

1. Contexte

Les transglycosidases constituent des outils performants pour la synthèse d'oligosaccharides. Elles permettent de synthétiser des oligosaccharides d'accès difficile par voie chimique. La chromatographie sur couche mince (CCM) permet de vérifier rapidement le milieu réactionnel et le contrôle des synthèses réalisées.

La CCM est une méthode simple, rapide, robuste, peu coûteuse et adaptable à une grande variété de molécules. Elle peut ainsi être utilisée pour valider une réaction mais aussi pour aider à cribler des activités d'intérêt dans des extraits enzymatiques. La consommation de solvants est faible et le milieu réactionnel peut être étudié sans autre étape de purification. Toutefois, cette méthode ne fournit aucune information structurale précise sur les composés du milieu réactionnel, alors qu'il est essentiel de contrôler la structure des produits synthétisés, par exemple dans un objectif d'utilisation thérapeutique de ces composés.

La spectrométrie de masse peut être utilisée pour identifier les composés séparés en CCM, suivant deux approches "off line" : la première consiste à gratter la plaque de CCM et à extraire les analytes dans un solvant à partir du gel de silice⁽¹⁰³⁾ ; la seconde consiste à transposer les conditions CCM sur

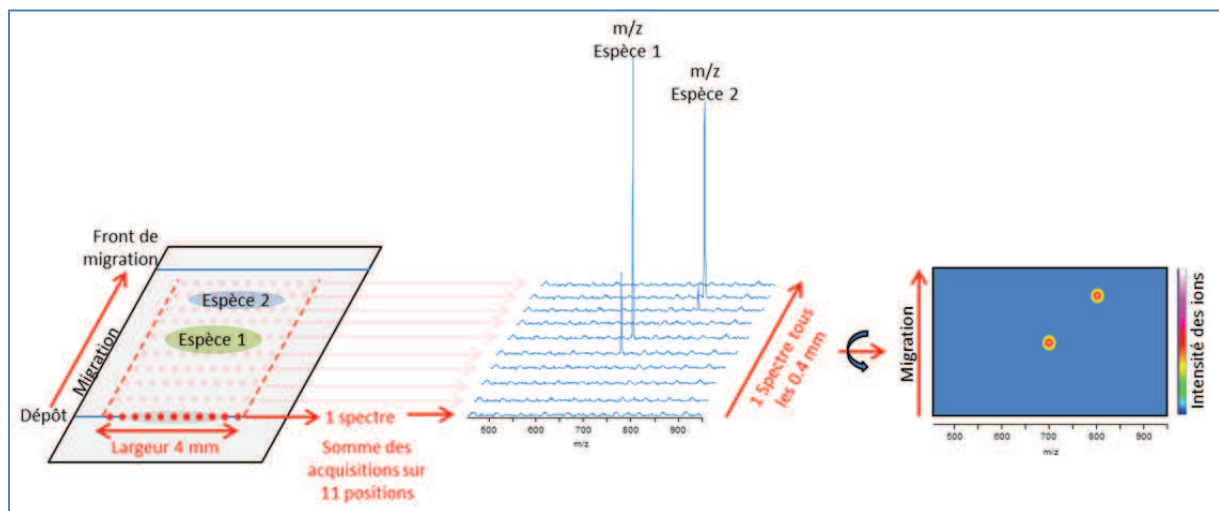


Figure 15. Principe de l'approche CCM MALDI

un système de chromatographie liquide préparative, avec l'inconvénient que les conditions de séparation vont devoir être réadaptées pour chaque milieu réactionnel. Une alternative intéressante est de réaliser un couplage direct avec la spectrométrie de masse MALDI, puisque cette technique est une technique d'analyse de surface.

2. Couplage CCM-spectrométrie de masse

Le processus de couplage direct de la CCM avec la spectrométrie de masse MALDI a été introduit par Gusev *et al.* ⁽⁴⁸⁾. Le principe de cette approche est présenté Figure 15. L'avantage est la détection directe, sans purification supplémentaire, des composés séparés sur la plaque CCM, avec toute l'information structurale et la sensibilité que fournit la spectrométrie de masse. L'utilisation de la CCM-MALDI a été décrite sur des petites protéines et des peptides ⁽⁴⁹⁾, sur des nucléotides ⁽¹⁰⁴⁾ et des composés de faible poids moléculaire ⁽¹⁰⁵⁾, et largement décrite sur des lipides ⁽¹⁰⁶⁻¹¹³⁾. La technique est beaucoup moins appliquée aux oligosaccharides. Dreisewerd *et al.* ⁽¹¹⁴⁾ ont utilisé la CCM haute performance directement couplée avec l'ionisation MALDI dans l'infrarouge (IR) et l'ultraviolet (UV) pour caractériser un mélange complexe d'oligosaccharides de lait. Leur étude montre que la sensibilité en UV est inférieure d'un ordre de grandeur à celle de l'IR. Cette différence est due au fait que les lasers IR provoquent l'ablation de la couche de silice, qui contient l'analyte, sur quelques micromètres alors que les lasers UV désorbent les molécules sur quelques dizaines de nanomètres ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁶⁾. L'utilisation des lasers UV a cependant été décrite avec succès par le groupe de Schiller ⁽¹¹⁷⁾ pour l'analyse en CCM-MALDI-MS des produits de l'hydrolyse acide de polysaccharides (dextranes, alginates, hyaluronanes et sulfate de chondroïtine) et d'oligo-glycosaminoglycanes disponibles commercialement. Dans ce travail, les auteurs cherchaient à suivre une dégradation non spécifique d'une structure connue, ce qu'ils ont pu réaliser en séparant et en identifiant les différents oligomères formés.

Dans le cas d'un suivi d'une réaction de synthèse enzymatique, il est nécessaire de caractériser plus finement le (ou les) régioisomère(s) produit(s) (séquence des monomères, type de liaison, localisation du monosaccharide ajouté) de manière à décrire précisément la spécificité de l'enzyme. Des couplages de la CCM avec la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ont été décrits sur des lipides et des phosphopeptides sur différentes configurations instrumentales (MALDI QIT-TOF ⁽¹⁰⁹⁾, MALDI-TOF ⁽¹¹⁸⁾ et MALDI Q-TOF ⁽¹¹⁹⁾).

Dans le travail qui suit, notre objectif était de développer une méthode couplée CCM-MALDI, automatisable, avec un niveau de sensibilité qui permette de réaliser des expériences de MS/MS et ainsi pouvoir caractériser des régioisomères. La première étape a consisté à mettre au point les conditions de dépôt de la matrice sur les plaques CCM. La méthode a ensuite été appliquée dans

deux études de suivi de synthèse enzymatique.

3. Optimisation de l'étape de dépôt de la matrice à la surface de la plaque CCM

3.1. Sélection de la matrice

La matrice ionique liquide DMA/DHB a été comparée à la DHB, utilisée dans le travail de Nimptsch⁽¹¹⁷⁾, et à la sDHB que nous avons retenue dans les travaux sur l'optimisation des matrices MALDI présentés dans le chapitre précédent.

La première étape a été de réaliser des acquisitions sur un mélange simple d'oligosaccharides commerciaux (Xylanes DP4 et 6 et Xyloglucanes DP7), déposés sur une plaque de silice standard (TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ 5 x 7.5 cm, Merck) sans l'étape de migration. Un µg de chaque espèce a été déposé. Les matrices ont été appliquées manuellement à la pipette à différentes concentrations. Nous avons évalué l'intensité du signal et la résolution. La sDHB, qui est décrite pour permettre une meilleure incorporation des molécules hydrophobes dans le réseau cristallin de matrice, n'a pas permis d'obtenir de résultats. Il est possible que la surface hydrophobe de la plaque CCM produise des partitions de phases, qui empêchent une incorporation efficace des analytes dans la matrice. Pour les deux autres matrices, en accord avec les observations de Nimptsch⁽¹¹⁷⁾, la concentration optimale d'utilisation est plus importante que sur cible conventionnelle : la DHB a montré les meilleurs résultats à 100 mg/ml, la DMA/DHB à 200 mg/ml. En termes de résolution, les deux matrices présentent des résultats assez similaires (entre 6000 et 9000). Par contre, pour les signaux correspondant à nos trois standards, l'intensité des ions est bien supérieure en utilisant la DMA/DHB (facteur 15 à 30 selon l'oligosaccharide). Nous avons donc poursuivi notre développement en utilisant la matrice DMA/DHB à 200 mg/ml.

3.2. Dépôt de la matrice

La méthode de dépôt de la matrice doit impérativement minimiser la diffusion des composés de façon à conserver la résolution de l'étape de séparation par CCM.

Dans la littérature, dans la majorité des cas, la séparation CCM est effectuée en double sur deux plaques distinctes. Sur la première plaque, les molécules séparées sont localisées par révélation sous lumière UV ou après une coloration spécifique⁽¹¹⁴⁾. Sur la seconde plaque CCM, la matrice est appliquée à la pipette sur la zone révélée par UV ou par coloration. Cette application de matrice à la pipette, que nous avons utilisée lors de nos expérimentations préliminaires sur des standards commerciaux, provoque une délocalisation des produits : ceux-ci étaient systématiquement localisés en périphérie du dépôt de matrice et non plus à leur position d'origine. Les solvants utilisés pour solubiliser la matrice sont également des éluants pour les oligosaccharides. En produisant la diffusion

des composés, ils altèrent la résolution chromatographique, ce qui diminue la sensibilité. Nous avons donc testé quatre autres méthodes d'application de la matrice.

3.2.1.Trempage

Dans leurs travaux, Nimptsch *et al.* ⁽¹¹⁷⁾ ont trempé directement la plaque de CCM dans la solution de matrice. Nous avons testé cette méthode sur nos standards commerciaux déposés à nouveau sans migration à différents endroits sur la plaque CCM. L'analyse des différents dépôts montre : i) un signal très hétérogène selon la localisation du dépôt ; ii) une résolution et une intensité du signal très faibles. L'observation de la surface de la plaque de CCM a montré la formation d'une couche hétérogène de matrice. Ce phénomène, dû peut être à l'utilisation de la matrice ionique liquide, rend cette approche incompatible dans notre cas.

3.2.2.Sublimation

Nous avons ensuite testé l'utilisation de la sublimation afin d'appliquer la matrice. Cette approche n'a jamais été utilisée pour une application CCM-MALDI mais elle est décrite par Kim *et al.* ⁽¹²⁰⁾ pour des analytes insolubles dans la matrice, et elle est également utilisée pour la préparation des tissus en imagerie MALDI (Hankin *et al.* ⁽¹²¹⁾). L'avantage est d'éliminer les problèmes de dispersion des analytes, tout en maintenant un niveau de signal satisfaisant. Le principe repose sur le chauffage d'une matrice solide au-dessus de son point de fusion pour passer directement en phase gazeuse. Cette matrice vaporisée est ensuite solidifiée par condensation sur la surface d'intérêt refroidie.

Nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats exploitables avec cette approche et cela peut être, à nouveau, imputé à la nature de la matrice DMA/DHB. Des tests menés sur la DHB seule, sur nos standards commerciaux déposés sans migration à différents endroits sur la plaque CCM, ont montré qu'avec une concentration de 60 mg/ml il était possible de détecter les espèces. Celles-ci sont localisées à l'endroit précis des dépôts, mais la faible intensité du signal (<1000) et surtout la faible résolution observée sur chacune des espèces (<2000) nous ont fait écarter cette méthode de dépôt par sublimation.

3.2.3.Robot ImagePrep

L'ImagePrep est un dispositif commercial utilisé pour l'imagerie MALDI qui permet de déposer la matrice sur une surface par nébulisation au travers d'une lamelle vibrante. Des résultats d'application de la matrice DMA/DHB par ce dispositif sur les standards commerciaux déposés sur la plaque CCM (et sans migration) ont montré des résultats encourageants en termes de signal. Nous avons donc poursuivi les essais en réalisant la migration des composés sur la plaque CCM.

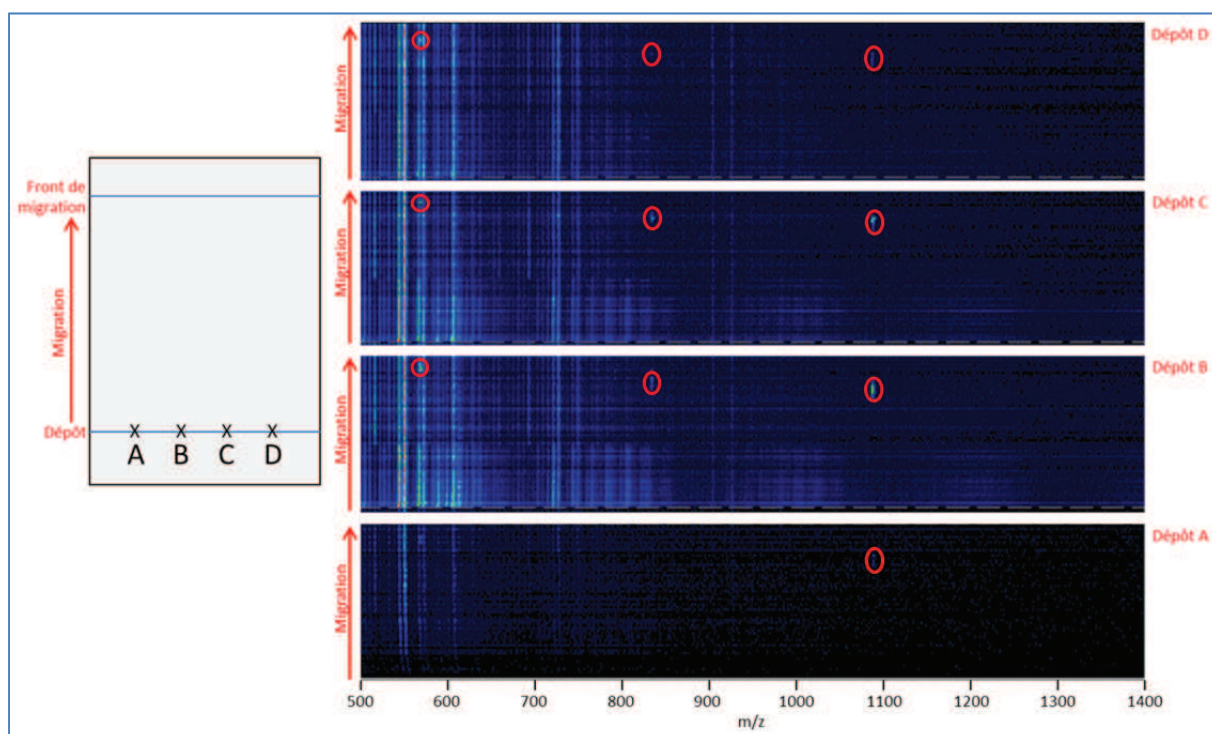


Figure 16. Analyse CCM-MALDI-MS après migration des trois standards commerciaux déposés en quatre points et application de la matrice avec le système ImagePrep. Un schéma de l'expérience réalisée est présenté à gauche. Les cartes de densité ionique correspondant à chaque dépôt sont présentées à droite : en abscisse, le rapport masse sur charge ; en ordonnée, la distance de migration sur la plaque CCM ; et enfin dans la troisième dimension, l'intensité colorimétrique, correspondant à l'intensité des ions. Les signaux correspondant aux standards commerciaux attendus sont entourés en rouge. Les autres signaux, correspondant aux clusters de matrice (entre 500 et 800 m/z) sont présents sur l'ensemble de la piste de migration.

Un mélange des trois standards commerciaux a été déposé sur quatre positions réparties uniformément à 1 cm du bord inférieur de la plaque CCM (notée A, B, C et D, sur la Figure 16). La plaque a ensuite été mise dans un solvant composé de 1-propanol/acétone/H₂O (45/30/25) pour faire migrer les analytes. Après séchage, la matrice DMA/DHB a été appliquée avec l'ImagePrep et la plaque analysée par MALDI TOF. Le résultat, présenté Figure 16, montre tout d'abord que la méthode permet de détecter les produits après migration. Cependant, une variation d'intensité importante en fonction de la piste est observée (espèces détectées sur les pistes B et C principalement). Cette variation peut s'expliquer par le principe d'utilisation de l'ImagePrep : cet appareil est conçu pour nébuliser la matrice sur la surface d'une lame de verre d'imagerie, dont la largeur est d'environ 2.5 cm. Les plaques CCM sur lesquelles nous travaillons faisant 5 cm de large, le spray de matrice n'est pas réparti de manière homogène sur toute la surface (et donc sur toutes les pistes) de la plaque CCM. Cette méthode n'a donc pas été conservée.

3.2.4. Electronébulisation / Aérographe

Ce procédé repose sur l'application de la matrice sous forme de micro-gouttelettes produites par électro-nébulisation via une interface électrospray. Cette méthode, décrite par Hensel *et al.* sur une grande surface ⁽¹²²⁾, améliore de manière significative l'homogénéité de la couche de cristaux et conduit à une meilleure reproductibilité spectrale. Nous avons construit un dispositif équivalent en utilisant un robot de distribution automatisé Fisnar (F4300N) que nous avons modifié en équipant son bras d'une tête électrospray (Thermo-Fisher), connectée à un pousse seringue (délivrant à 600 µl/heure), pour infuser la solution de matrice. La vitesse du bras du robot a été réglée à 5 mm/sec.

Lors de nos optimisations, une tension de 3 kV a été appliquée sur le capillaire. Pour obtenir visuellement un cône de Taylor (comme indiqué dans le travail de Hensel *et al.* ⁽¹²²⁾) le capillaire a été placé à une distance de 3 mm du support CCM. L'azote (à une pression de 0,5 bar) a été utilisé comme gaz de nébulisation dans ces premiers essais (sans ce gaz co-axial, la matrice remonte par capillarité sur les bords du capillaire). Les résultats ont révélé que cette étape provoquait une perte de résolution chromatographique. Il semble qu'à cette distance de 3mm, les gouttelettes qui sont déposées sur la plaque CCM soient trop grosses et produisent une diffusion des produits. Nous avons essayé d'augmenter la pression de gaz, mais cela a conduit à la formation de sillons dans la couche de matrice, qui semble dispersée par le jet de gaz avant d'avoir pu sécher. Nous avons donc augmenté la distance entre le capillaire électrospray et la plaque CCM, quitte à ne plus observer le cône de Taylor. Des plaques CCM ont été colorées avec un colorant alimentaire, dont la couleur change avec l'application de la matrice, et nous avons testé différentes distances. Nous avons ainsi

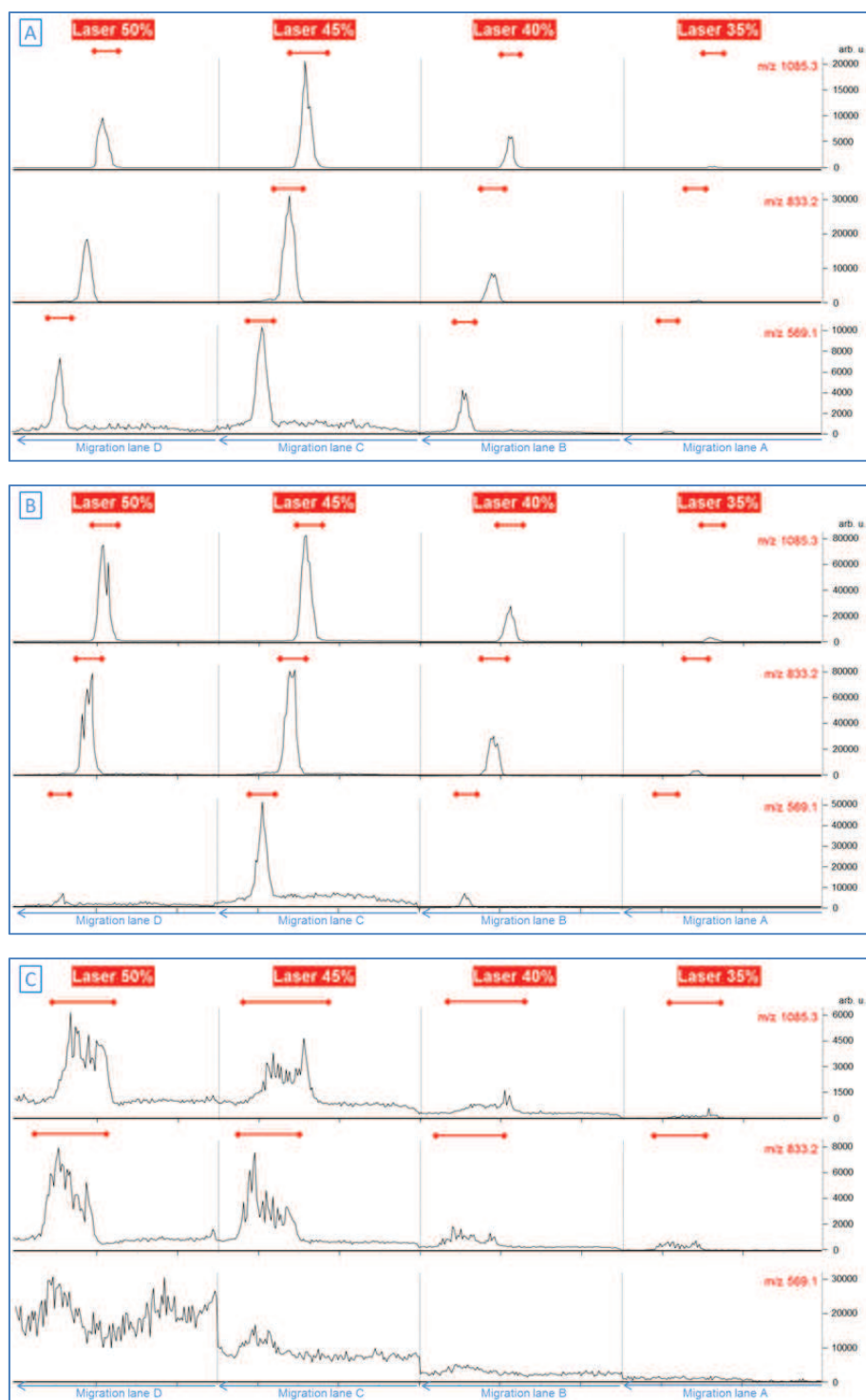


Figure 17. Chromatogrammes d'ions extraits pour les masses des trois standards commerciaux en fonction de l'intensité du laser et du nombre de couches de matrice appliquées. L'encart A présente les résultats obtenus pour deux passages de la tête électrospray, l'encart B pour trois passages et l'encart C pour 4 passages. Chaque encart correspond à une plaque CCM et sur chaque plaque, l'acquisition a été réalisée en ligne A à 35% de laser, en ligne B à 40%, en ligne C à 45% et en ligne D à 50%. La résolution chromatographique est symbolisée au-dessus de chaque espèce par un trait rouge.

déterminé visuellement qu'une distance de 30 mm (avec une pression de gaz de 1.5 bar) permettait d'obtenir une couche de matrice homogène sur les plaques.

Nous avons ensuite optimisé l'épaisseur de la couche de matrice déposée (nombre de cycles de dépôts avec le robot). Entre chaque couche déposée, un séchage de 15 minutes a été effectué. Une seule couche de matrice n'a pas permis d'observer un signal pour nos standards oligosaccharidiques.

Les résultats obtenus pour 2, 3 et 4 couches déposées sont présentés Figure 17. Ils montrent les chromatogrammes d'ions extraits pour chacun des trois standards commerciaux en fonction du nombre de couches de matrice (encarts A, B et C) et, dans chaque encart, pour différentes énergies du laser. Ces données montrent que le dépôt de 4 couches provoque une perte importante de la résolution chromatographique, en délocalisant les échantillons à la surface de la plaque CCM (largeur des pics chromatographiques schématisée par le trait rouge au-dessus de chaque chromatogramme), ce qui ne semble pas le cas lorsque l'on dépose 2 ou 3 couches de matrice. L'intensité des ions est plus importante après le dépôt de 3 couches (quatre fois supérieure pour le Xyloglucane DP7, trois fois pour le Xylane DP6 et cinq fois pour le Xylane DP4).

Comme nous n'observons pas de cône de Taylor à la distance de 30 mm fixée entre le capillaire électrospray et la plaque CCM, nous avons comparé les résultats obtenus avec et sans appliquer de voltage sur le capillaire. Les résultats sont similaires, ce qui suggère qu'à cette distance, le montage fonctionne comme un aérogaphe (et non un électrospray). Pour la suite de nos expérimentations, nous avons donc effectué trois passages successifs de la tête électrospray sur la plaque CCM, sans appliquer de tension sur le capillaire, pour distribuer la matrice DMA/DHB.

4. Application de la méthode CCM-MALDI à deux études de suivi d'activité de transglycosylation

4.1. Caractérisation structurale des produits d'une enzyme de transglycosylation en fonction de la nature du groupement accepteur

L'objectif de ce travail, mené en collaboration avec le Dr D. Velickovic (Université de Belgrade), était d'appliquer le dispositif de couplage CCM-MALDI optimisé ci-dessus pour étudier l'activité d'une invertase (E.C.3.2.1.26) extraite chez *Saccharomyces cerevisiae* sur différents accepteurs isoformes. Le but de leur travail est de trouver des enzymes qui permettent de réaliser des transglycosylation d'hydroxybenzyl alcool en utilisant le saccharose comme groupement donneur sans utiliser un dérivé nucléotidique ou un oligosaccharide comme donneur de sucre pour limiter les coûts de production. La réaction enzymatique, décrite Figure 18, a été réalisée en utilisant comme accepteur les différentes isoformes de l'alcool hydroxybenzylique (ortho, méta et para) branchés en

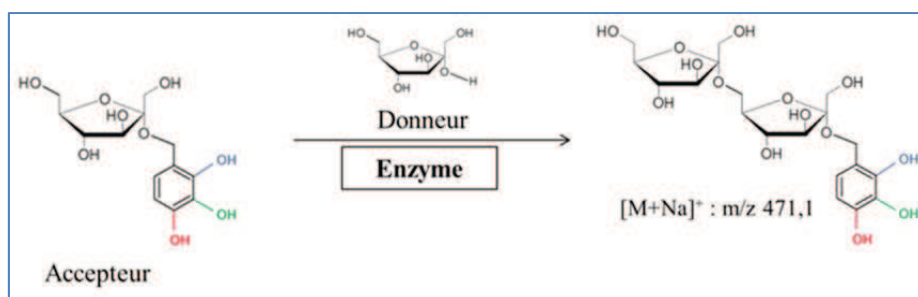


Figure 18. Réaction enzymatique théorique

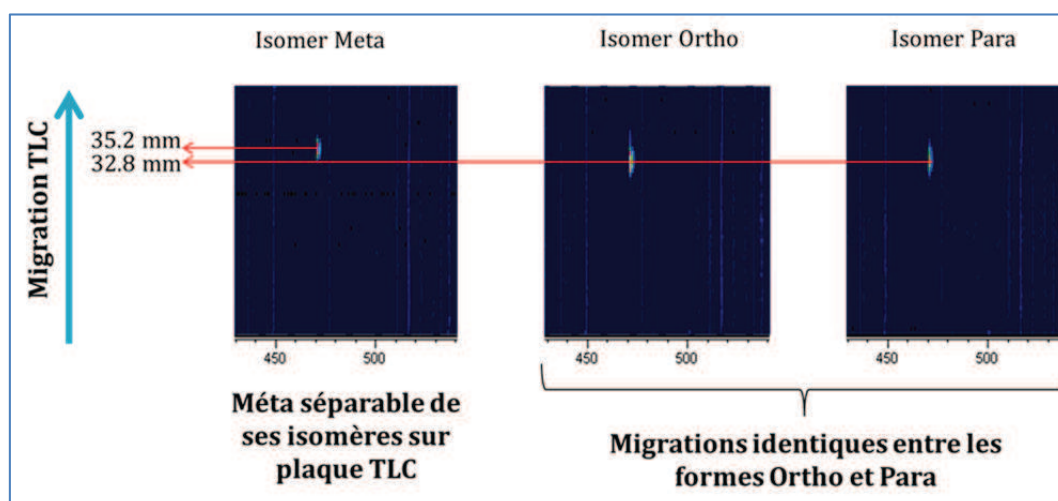


Figure 19. Analyses CCM-MALDI-MS des trois isomères de transglycosylation

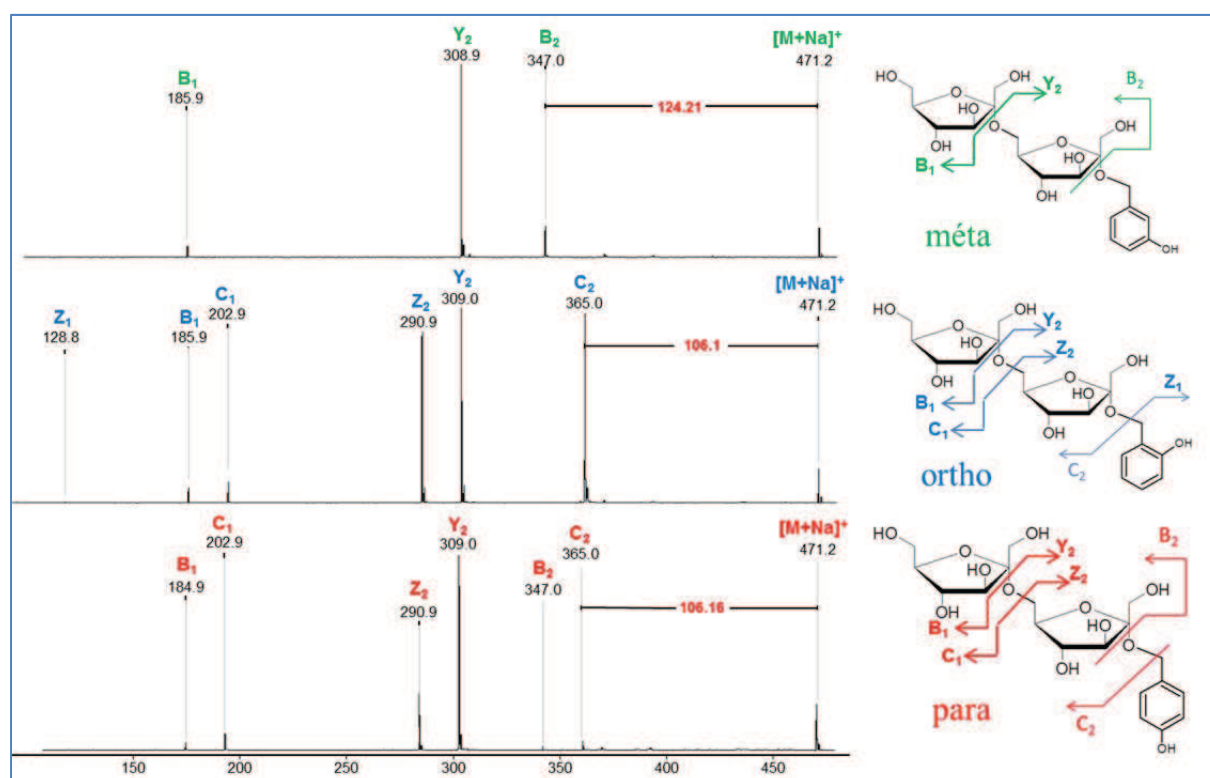


Figure 20. Analyses CCM-MALDI-MS/MS des trois isomères de transglycosylation

C2 d'un fructose.

La réalisation de CCM colorées à l'orcinol par nos partenaires a permis de révéler l'apparition d'un produit mais plusieurs questions restaient en suspens pour valider cette activité. Nos collaborateurs cherchaient à savoir si :

- a. Le produit apparu en CCM était bien le disaccharide recherché.
- b. Le fructose avait bien été branché sur la partie osidique de l'accepteur (et non sur la fonction alcool de l'acide hydroxybenzylique).
- c. Le branchement du fructose s'était bien produit en C6 de l'accepteur
- d. L'enzyme étudiée présentait une spécificité selon l'isomérisation de l'accepteur

La Figure 19 présente le résultat de l'analyse CCM-MALDI-MS pour les trois produits. Ces résultats nous ont permis de valider, pour les trois réactions, que la tâche qui apparaissait correspondait à la masse du disaccharide recherché. En se basant sur la migration CCM (migration à 35.2 mm) et la masse des composés, il est simple de différencier le produit issu de l'isomère méta. Cependant, les deux autres isomères formés à partir de formes ortho et para présentent un profil de migration identique (migration 32.8 mm).

La difficulté principale quand on cherche à réaliser des MS/MS en MALDI est d'obtenir une intensité suffisante pour les ions désorbés de la phase de silice même après plusieurs séries de tirs. En effet, l'acquisition est réalisée en deux étapes. D'abord, une empreinte massique en MS est acquise puis, après sélection des ions parents d'intérêt, une acquisition MS/MS est réalisée. Ce point est d'autant plus critique sur une plaque CCM où la proportion de molécules accessibles à l'ionisation est faible (notamment en utilisant un laser UV ⁽¹¹⁴⁾, comme décrit précédemment). Dans cette étude, où les échantillons étaient relativement "propres" sur un milieu réactionnel brute, nous avons diminué le nombre de tirs laser en MS pour préserver le spot CCM et nous avons réalisé l'acquisition MS/MS directement sur les mêmes positions.

Les résultats de l'analyse MS/MS (Figure 20) montrent tout d'abord que, pour les trois isomères, le fructose a bien été branché sur la partie osidique de l'accepteur (fragments à m/z 365 et/ou à m/z 347). Chacun des trois isomères fournit une empreinte MS/MS spécifique. Plus spécialement, les formes ortho et para, que nous n'avions pas pu différencier en CCM par leur profil de migration sont caractérisées en MS/MS par : i) la présence d'ions spécifiques (Z_1 pour l'ortho et B_2 pour le para) ; ii) par des rapports d'intensité spécifiques entre les ions en commun (C_2 et ratio Z_2/Y_2) à énergie de fragmentation identique.

Par rapport aux objectifs fixés, Nous n'avons cependant pas été en mesure de valider la localisation

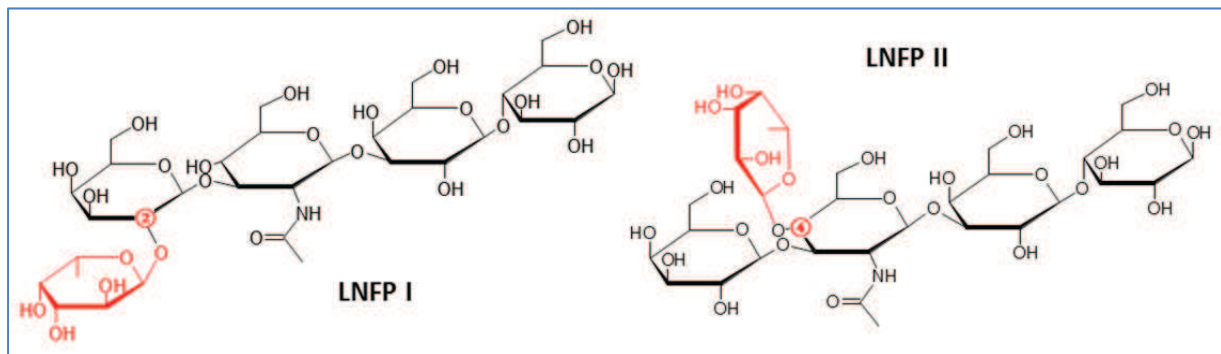


Figure 21. Structure des isomères du Lacto-N-fucopentaose

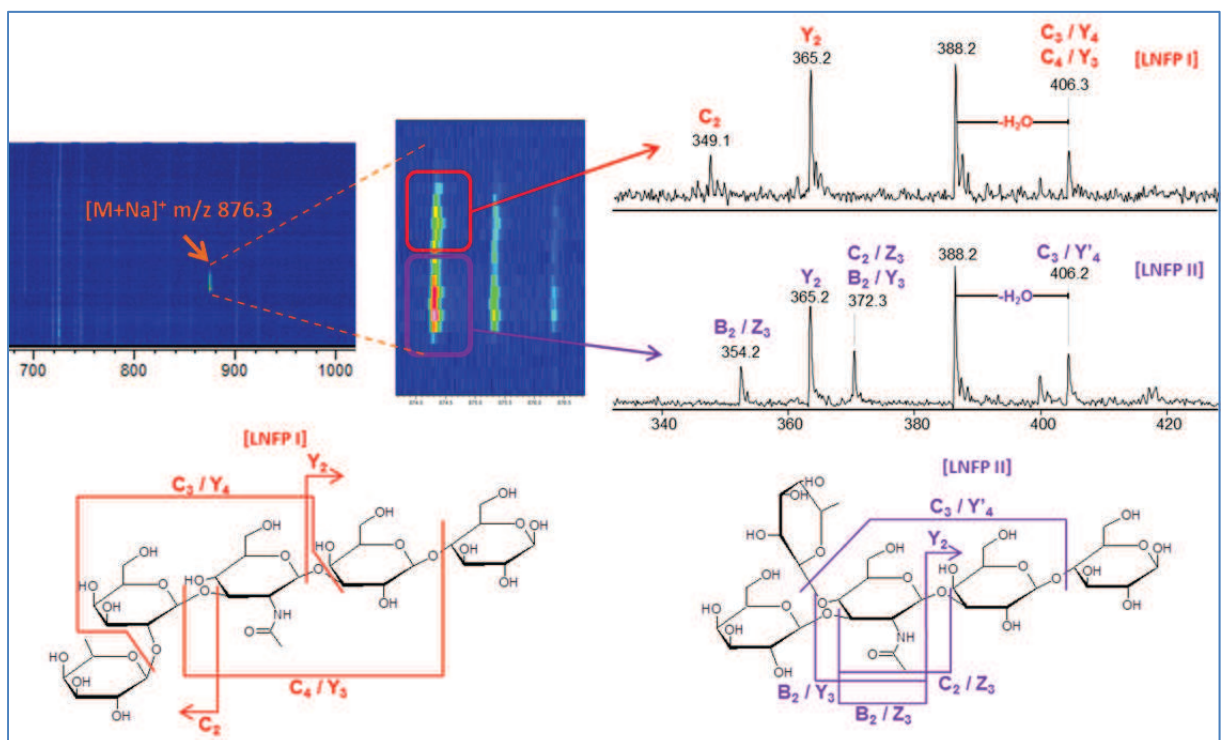


Figure 22. Analyse CCM-MALDI-MS/MS du mélange LNFP I/LNFP II

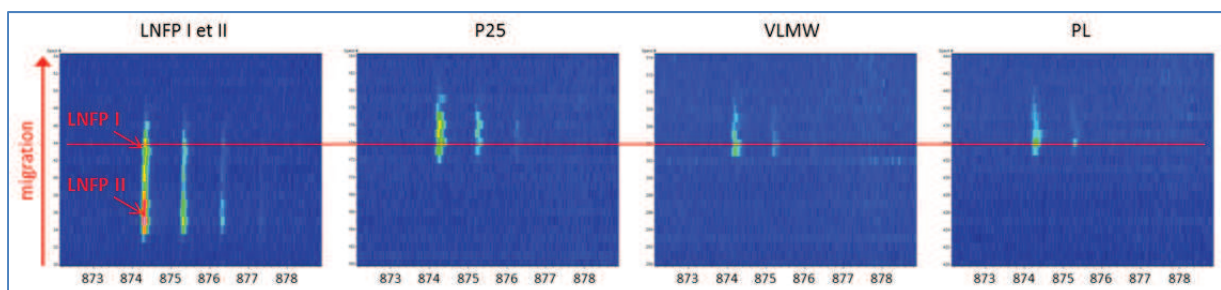


Figure 23. Alignement des analyses CCM-MALDI-MS des standards (LNFP I et LNFP II) des produits de l'enzyme sauvage PL (sauvage LNFP I) et des produits des deux mutants VLMW et P25

en C6 du fructose branché.

4.2. Caractérisation de régio-isomères

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe Ingénierie moléculaire et glycobiologie de l'Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines (UFIP) de l'Université de Nantes dirigée par le Professeur Charles Tellier. Cette équipe développe une stratégie originale d'ingénierie par évolution dirigée des glycosidases pour les transformer en transglycosidases. Leur objectif est de développer de nouveaux outils enzymatiques adaptés à la synthèse à grande échelle d'oligosaccharides d'intérêt thérapeutique.

Les régioisomères, appelés Lacto-N-fucopentaose (LNFP), auxquels nous nous sommes intéressés sont des oligosaccharides issus de lait humain (Human Milk Oligosaccharides, HMOs). Ces oligosaccharides sont décrits pour avoir des effets prébiotiques, antipathogènes et comme agissant directement sur le système immunitaire. Ils jouent également un rôle dans le développement post-natal du cerveau. Les LNFP peuvent être obtenus grâce à une transfucosydase à partir du Lacto-N-tetraose (LNT). Les LNFP I et les LNFP II (structures présentées Figure 21) sont disponibles commercialement. Ces deux molécules diffèrent par la localisation du Fucose : sur le C2 du Galactose en extrémité non réductrice pour le LNFP I; et en C4 du N-Acetyl-Glucosamine pour le LNFP II. Nous avons dans un premier temps cherché à valider notre méthode sur ces deux standards.

L'analyse CCM-MALDI-MS/MS présentée Figure 22 montre que la séparation des deux isomères du LNFP est relativement faible. Cependant, nous avons réussi à caractériser chacun d'entre eux par son spectre de fragmentation. La zone d'intérêt qui présente les fragments caractéristiques sur la Figure 22 (entre 340 et 420 Da, reporté sur les structures correspondantes) montre que l'espèce LNFP II a une migration légèrement plus faible que l'espèce LNFP I.

Nous avons ensuite comparé ces résultats avec les analyses CCM-MALDI-MS/MS des produits de réaction de trois enzymes (Figure 23) : PL, enzyme sauvage produisant le LNFP I, VLMW, enzyme mutante criblée comme produisant le LNFP I et un autre oligosaccharide en proportion faible, et P25, une autre enzyme mutante qui produit le LNFP I et un autre oligosaccharide présentant la même migration que pour P25 mais en proportion plus importante. La migration des espèces majoritaires produites par les trois enzymes montre la présence d'un spot correspondant à la migration du LNFP I et l'absence de LNFP II. Le LNFP I a été validée par la caractérisation MS/MS sur les plaques CCM. Pour l'espèce P25, une tâche est observée avec une migration légèrement supérieure au LNFP I. Nous avons cherché à caractériser ces espèces mais le spectre MS/MS produit est identique à celui obtenu pour LNFP I.

Notre interprétation est que : (i) soit la séparation des espèces n'est pas suffisante et la seconde espèce est masquée par la forme majoritaire (LNFP I), (ii) soit, la seconde espèce produit un spectre de fragmentation identique au LNFP. En effet, l'absence de fragments intracycliques dans les analyses MS/MS réalisées sur ces espèces limite l'information structurale qui peut être obtenue. Il n'a donc pas été possible de conclure sur la nature du second isomère présent dans les échantillons VLMW et P25.

Nous envisageons de poursuivre ces études en introduisant une perméthylation des molécules : cette réaction, qui remplace toutes les fonctions alcools des molécules par des fonctions méthylethers, réduit les liaisons hydrogènes qui stabilisent les sucres en phase gazeuse et est donc décrite pour favoriser leur fragmentation.

Développements de la chromatographie IP-RP-UHPLC pour séparer et résoudre des mélanges complexes

1. Contexte

Les mélanges obtenus après dégradation enzymatique des polysaccharides naturels sont généralement complexes. Ils contiennent un nombre important d'oligosaccharides de degrés de polymérisation variables, de structures variables, et présentant potentiellement de nombreux isomères. Si leur analyse directe par spectrométrie de masse est possible (voir introduction, chapitre 3, Figure 11), au-delà d'une certaine complexité, l'information obtenue est limitée : en plus de ne pas permettre la différenciation des isomères, seules les espèces majeures et/ou celles s'ionisant le mieux sont détectées car les processus d'ionisation sont compétitifs.

La chromatographie liquide est une approche naturelle des couplages avec les spectromètres de masse équipés d'une source électrospray. Elle permet de séparer les molécules en utilisant leurs propriétés physico-chimiques et de les présenter reconcentrées et échantillonnées au niveau de la source.

L'objectif de cette partie du travail était d'optimiser les étapes de séparation en chromatographie liquide en amont de la spectrométrie de masse pour décomplexifier les mélanges avant leur caractérisation structurale.

2. Séparation des oligosaccharides par chromatographie liquide

De nombreuses approches de chromatographie liquide peuvent être utilisées pour le fractionnement des oligosaccharides. Celles-ci comprennent la chromatographie d'échange anionique (AEC), la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), la chromatographie en phase normale (NP), la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), la séparation sur carbone poreux graphitisé (PGC) et la chromatographie en phase inverse (RP)⁽¹²³⁻¹²⁶⁾. Cependant, elles ne sont pas toutes équivalentes en termes de sélectivité, de robustesse, de résolution, ni en termes de compatibilité avec la spectrométrie de masse (les mélanges organiques aqueux et une concentration aussi faible que possible de sels non volatils sont préférés pour la phase mobile). L'AEC et la SEC sont disponibles dans des versions hautes performances (HPSEC et HPAEC). Cependant, ces deux approches nécessitent de maintenir une importante force ionique dans les solvants d'élution pour séparer des oligosaccharides (0.1 M CH₃COONa pour l'HPSEC⁽¹²⁷⁾, 1M CH₃COONa et 500 mM NaOH pour l'HPAEC⁽¹²⁸⁾) qui les rendent incompatibles pour un couplage LC-MS direct. Dans le cas de l'HPAEC, des membranes de dessalage en ligne peuvent être utilisées mais elles provoquent une dilution très importante de l'échantillon et, de plus, elles utilisent de l'acide sulfurique concentré (la

concentration est dépendante de la quantité de sels à éliminer dans les éluants) en contre flux à des débits importants (≈ 10 ml/min), ce qui produit une contamination chimique problématique. La NP est bien adaptée à la nature polaire des oligosaccharides ⁽¹²⁶⁾. Cependant, les solvants, notamment les sels dans la phase hydrophile, rendent son utilisation peu compatible pour un couplage direct avec l'ESI. D'autres types de phases exploitent les caractéristiques hydrophiles des oligosaccharides pour leur séparation. Parmi elles, la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) utilise des solvants qui sont compatibles avec l'ionisation par électrospray. Leijdekkers *et al.* ⁽¹²⁹⁾ ont montré les performances de l'HILIC pour la séparation d'oligosaccharides neutres et acides issus des parois végétales (homogalacturonanes, glucuronoxylanes). Les temps d'analyse sont relativement longs (60 minutes, sans compter la rééquilibration de système qui est une étape incontournable en HILIC) et, dans cette étude, la technique ne leur a pas permis de mettre en évidence la présence d'isomères. L'HILIC demeure cependant clairement une voie intéressante pour la séparation d'oligosaccharides avant la spectrométrie de masse. L'utilisation du PGC a été démontrée par Westphal *et al.* ⁽¹³⁰⁾ pour la séparation d'oligosaccharides. Cette séparation repose à la fois sur des interactions hydrophiles mais aussi sur une forme d'exclusion stérique. Cependant, Melmer *et al.* ⁽¹²⁵⁾, qui ont comparé plusieurs approches chromatographiques, soulignent dans leur étude des problèmes de reproductibilité et de répétabilité avec l'utilisation de cette phase. Finalement, la phase inverse (RP) apparaît comme une méthode de choix pour le couplage LC-MS. Les solvants utilisés sont parfaitement compatibles avec l'ionisation des composés. Elle est robuste, offre une large gamme de spécificités et de nombreuses phases stationnaires sont disponibles commercialement. Notamment, ce type de phase a été rapidement développé avec des faibles granulométries, pour être utilisée avec des systèmes UHPLC. Cependant la séparation RP repose sur les interactions hydrophobes des molécules avec la phase stationnaire. Elle semble donc peu adaptée à la séparation des oligosaccharides hydrophiles. Des alternatives ont été développées pour rendre compatible la sélectivité de la phase inverse avec la physico-chimie des oligosaccharides. Une première possibilité est de dériver les oligosaccharides pour permettre leur rétention sur une phase de type C₁₈. La dérivation consiste en une amination réductive des oligosaccharides qui ajoute un groupement hydrophobe en extrémité réductrice de l'oligosaccharide (2-AMAC ^(126,131), M4-AB ⁽¹²⁶⁾, ANTS ⁽¹³²⁾). Un avantage supplémentaire de cette approche est l'introduction d'un chromophore qui permet de suivre les oligosaccharides avec un détecteur UV. L'autre possibilité, qui permet de ne pas introduire de modification sur les oligosaccharides, est de jouer sur les phases mobiles utilisées en RP en introduisant un agent d'appariement d'ions qui va intervenir dans l'interaction de l'oligosaccharide avec la phase stationnaire. C'est cette dernière approche que nous avons particulièrement travaillée et qui est détaillée dans la suite.

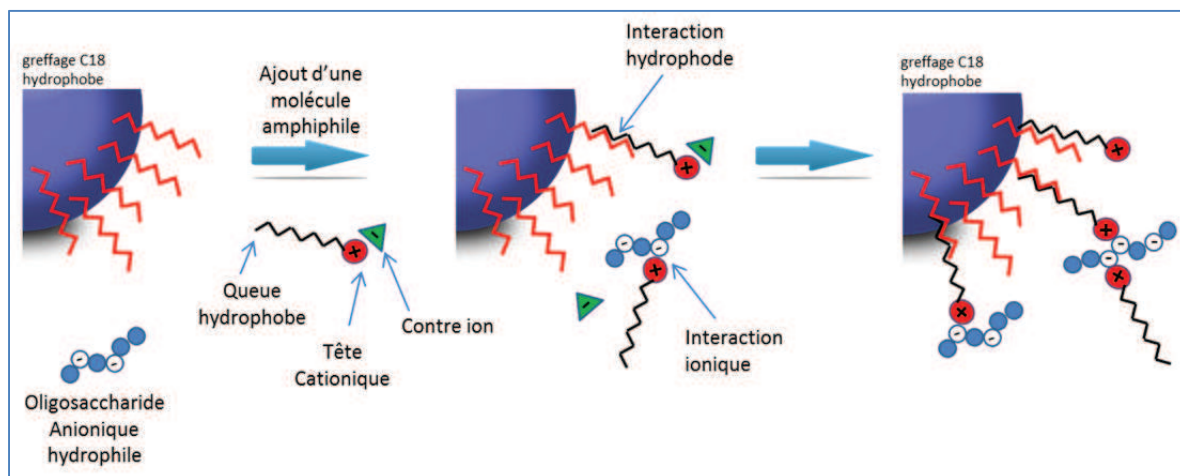


Figure 24. Mécanisme d'appariement d'ions des oligosaccharides anioniques sur des surfaces hydrophobes

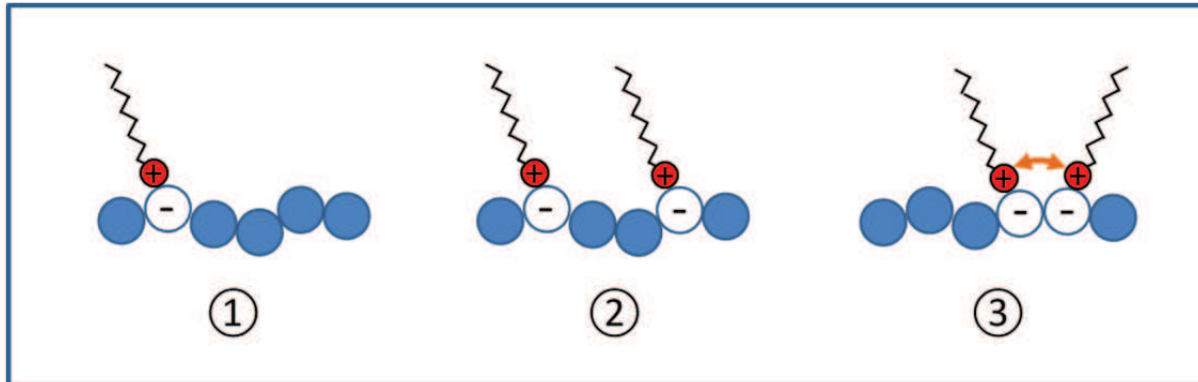


Figure 25. Principe de la séparation des oligosaccharides en chromatographie d'appariement d'ions

3. Chromatographie liquide en phase inverse avec appariement d'ions (IP-RP)

La chromatographie d'appariement d'ions repose sur l'utilisation, dans les phases mobiles, d'un agent "pontant" qui permet l'interaction entre deux structures présentant, par exemple, des hydrophobicités différentes : ici, la phase stationnaire d'un côté, et les oligosaccharides de l'autre. La molécule amphiphile utilisée comme agent pontant interagit, grâce à sa queue hydrophobe, avec le greffage C₁₈ de la colonne RP et, grâce à sa tête hydrophile chargée positivement, avec les fonctions acides de l'oligosaccharide.

Le principe de séparation basé sur l'appariement d'ions peut faire intervenir deux mécanismes ⁽¹³³⁾, dont les modèles sont représentés sur la Figure 24. Le premier repose sur la partition, et peut être expliqué par la formation de paires d'ions entre la tête cationique de l'agent pontant et les charges négatives de l'oligosaccharide acide. Les interactions hydrophobes vont ensuite permettre la séparation du complexe sur la phase stationnaire. Le second modèle repose sur l'adsorption. Les molécules amphiphiles viendraient tapisser l'intérieur de la colonne par interaction hydrophobe entre la queue de l'agent paire d'ion et le greffage C₁₈. Cette adsorption créerait un pseudo support d'échange d'ions qui interagirait avec l'oligosaccharide chargé négativement. Dans les deux cas, on peut attendre, avec cette technique, une rétention différente des composés en fonction du nombre de fonctions acides présentes sur la molécule et de leur positionnement, comme représenté sur la Figure 25. Sur cette Figure, la molécule ① ne possède qu'une seule fonction acide, elle ne sera donc capable de fixer par interaction électrostatique qu'un agent pontant. La molécule ② possédant deux fonctions acides sera capable de fixer deux agents pontants, ce qui, *in fine*, lui permettra d'être mieux retenue sur la phase stationnaire. La molécule ③ possède également deux charges, cependant, celle-ci sont rapprochées dans la structure. Elle sera donc capable de fixer deux agents pontant mais on peut envisager que, par un phénomène de répulsion entre les deux têtes cationiques des agents pontants, l'interaction sera moins forte que pour la molécule ②. La molécule ③ sera donc moins retenue laissant envisager la possibilité de séparer des isomères liés à la localisation des fonctions acides libres par cette méthode.

La chromatographie liquide en phase inverse avec appariement d'ions est fortement déployée depuis une dizaine d'années pour l'analyse des glycosaminoglycanes. Elle a été appliquée avec succès à l'étude des oligosaccharides dérivés d'héparine ^(124,134-139) et des chondroïtines sulfates ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴¹⁾. Quelques exemples ont été également publiés sur les carraghénanes ⁽¹⁴²⁻¹⁴³⁾. Dans ces exemples, La séparation des espèces est basée sur le degré de polymérisation mais aussi sur le nombre de groupements sulfate. Sur les héparines, molécules très acides (potentiellement trois sulfates et une fonction acide carboxylique par dimère), l'agent d'appariement d'ions le plus utilisé est le

tributylamine (TBA) en utilisant l'acétate d'ammonium comme contre-ion et tamponné à pH 7 avec de l'acide acétique ^(124,134-137). Doneanu *et al.* ⁽¹²⁴⁾ ont mené une étude sur l'optimisation de la technique pour la séparation d'oligo-héparines. Leur étude a été motivée par plusieurs limitations dans l'utilisation des amines aliphatiques tertiaires (TBA et tripropylamine). Ces limitations sont une sensibilité faible en spectrométrie de masse et une résolution chromatographique faible pour les degrés de polymérisation élevés. La suppression du signal en spectrométrie de masse est imputée aux agents d'appariement d'ions eux-mêmes qui, par la présence de trois chaînes aliphatiques sur l'agent pontant, augmentent de façon importante la masse des molécules ionisées et limitent leur détection. De plus, la présence de plusieurs chaînes aliphatiques peut produire des interactions supplémentaires entre agents pontants par l'intermédiaire des chaînes hydrophobes non impliquées dans l'interaction avec la phase stationnaire (interactions hydrophobes IPR/IPR). L'étude de Doneanu *et al.* ⁽¹²⁴⁾ a porté sur l'utilisation d'amines primaires. Les paramètres pris en compte dans cette étude sont la taille de la chaîne alkylée des amines, la concentration de l'agent d'appariement d'ions et l'utilisation d'un additif fluoré (HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) pour le contrôle du pH des solvants. L'étude montre que sur les oligo-héparines, en termes de séparation, le pentylamine (PTA) et l'hexylamine (HXA) présentent les meilleurs résultats en termes de capacité de pics. Au-delà (cas de l'octylamine) les résultats montrent une trop grande rétention des composés. La capacité de pics augmente avec la concentration en agent d'appariement d'ions jusqu'à un optimum d'environ 15 mM pour le PTA. La concentration de contre-ion utilisé influe de façon plus importante, avec un optimum retrouvé pour 100 mM d'HFIP. En termes de signal observé en spectrométrie de masse, les résultats en ce qui concerne l'agent d'appariement d'ion, le pH et la concentration du contre-ion sont relativement similaires, à l'exception du pentylamine qui permet d'obtenir une intensité de signal deux fois supérieure. Il faut noter cependant que les héparines sont des molécules hautement sulfatées, donc présentant un grand nombre de sites d'interaction potentiels. De plus, le pKa des fonctions sulfate étant très bas (≈ 1.8), l'interaction ionique avec la tête polaire est forte, surtout avec l'utilisation de l'HFIP qui permet d'assurer un pH très élevé (≈ 12). Il existe également, comme dans le travail du groupe de Gebler ⁽¹²⁴⁾, quelques travaux utilisant des amines primaires en chromatographie paire d'ions sur des molécules moins acides. Pour les chondroïtines sulfates (un sulfate et un acide carboxylique par dimère) l'agent d'appariement utilisé est l'hexylamine ⁽¹⁴¹⁾. Pour les kappa-carraghénanes (un sulfate par dimère), deux études ⁽¹⁴²⁻¹⁴³⁾ ont montré que l'utilisation de l'heptylamine (HA) était nécessaire pour obtenir une résolution suffisante sur des composés moins acides.

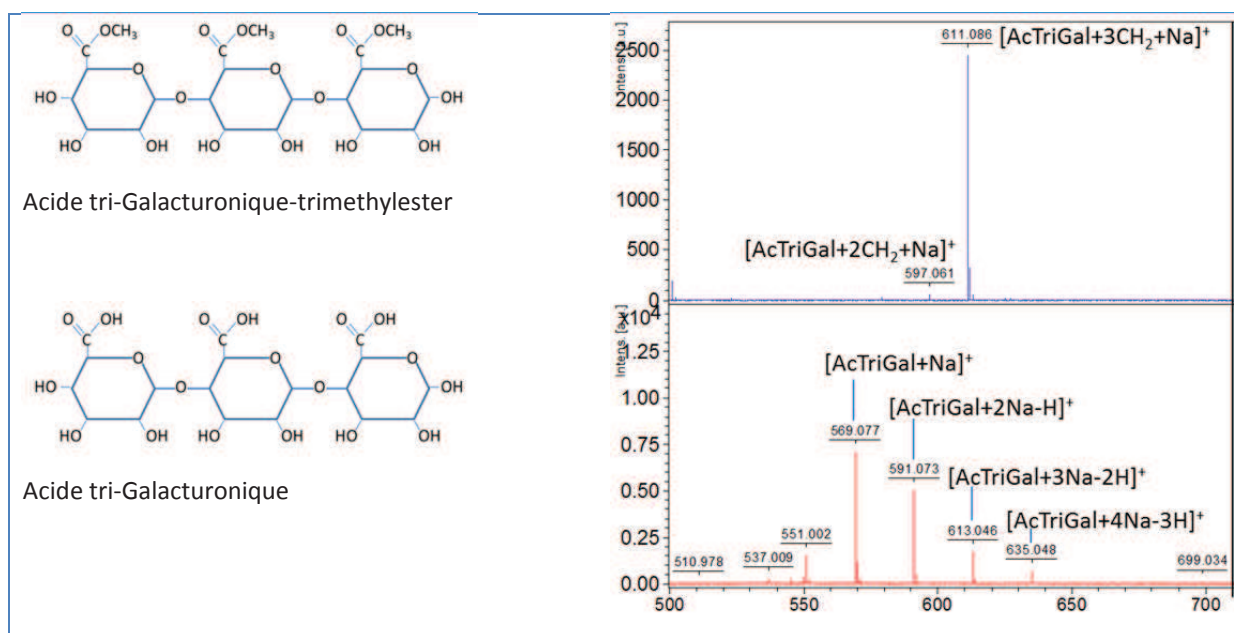


Figure 26. Spectre MALDI-TOF des molécules de référence pour l'étude de la compatibilité des solvants IPR avec la méthylestérification

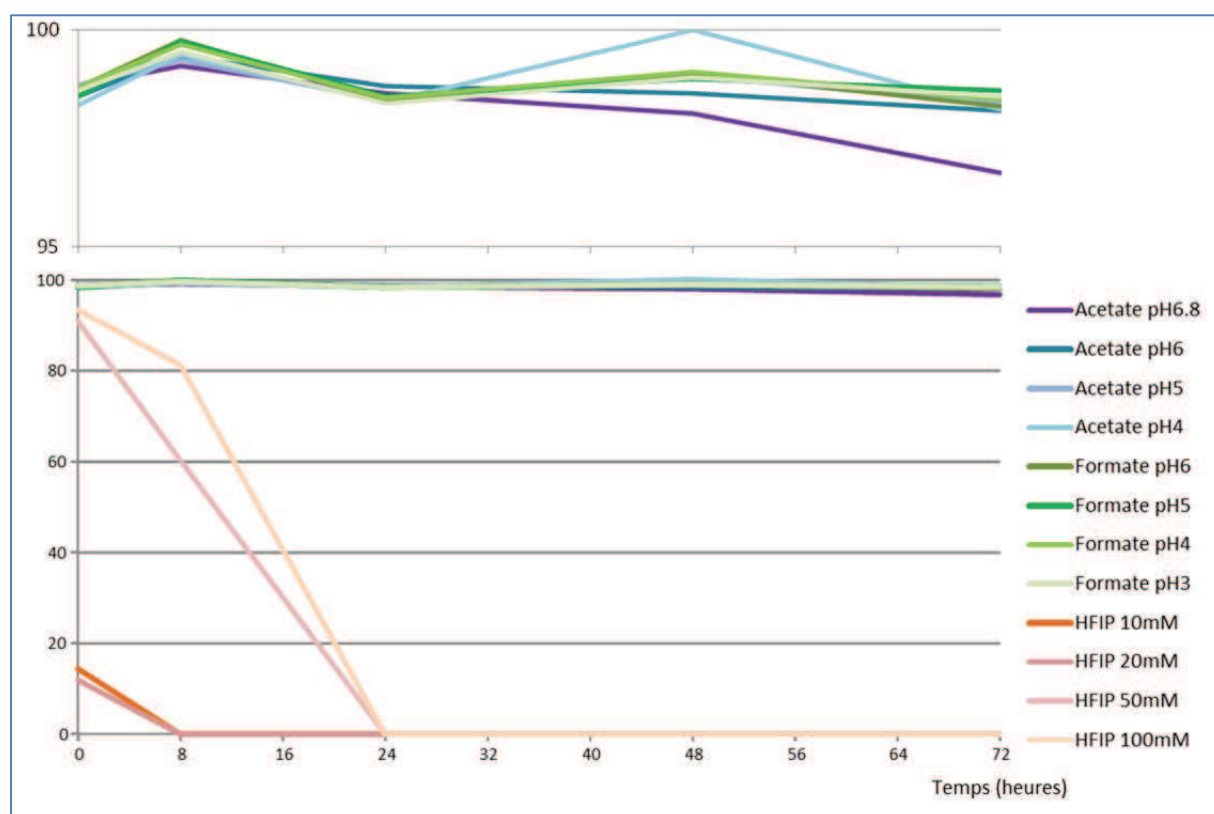


Figure 27. Cinétique de déméthylestérification du standard d'acide galacturonique-trimethylester. Le temps de solubilisation dans les différents tampons IP-RP (indiqués à droite sur la Figure) est représenté en abscisse. Le pourcentage indiqué en ordonnée correspond au rapport de l'intensité du pic trimethylestérifié sur la somme de tous les pics sur le spectre MALDI MS. Un agrandissement de la zone des ordonnées entre 95 et 100% est présenté dans l'encart supérieur de la Figure.

4. Objectif du travail

L'ensemble de ces travaux ont servi de base à l'optimisation qui visait à définir le système d'appariement d'ions (agent d'appariement d'ions, contre-ion, pH) pour la séparation d'oligosaccharides.

Notre étude a porté sur des mélanges plus ou moins complexes de molécules de type homogalacturonanes, présentant différents degrés de méthylation. La méthode a ensuite été utilisée pour la séparation de différents mélanges d'oligosaccharides pariétaux.

5. Optimisation du système d'appariement d'ions

5.1. Sélection du contre-ion

Un facteur important pris en compte dans le cadre de notre étude a été le maintien de l'intégrité des molécules. En effet, une caractéristique structurale majeure des homogalacturonanes est la présence d'estérifications sur le polysaccharide. Ces modifications impactant directement les propriétés du polymère, il était essentiel de les maintenir et de pouvoir en caractériser les motifs. Or, les méthylestérifications sont très sensibles au pH (elles sont hydrolysées au-dessus de pH 6.8). D'un autre côté, afin de maintenir une interaction ionique entre l'agent d'appariement d'ions et l'oligosaccharide, il faudra se situer au-dessus du pKa de la fonction acide carboxylique (≈ 3.5 pour l'acide-D-galacturonique).

Une molécule modèle a été synthétisée pour évaluer toutes les étapes de mise au point des paramètres chromatographiques : il s'agit de l'acide trigalacturonique modifié selon le protocole décrit par Van Alebeek *et al.* ⁽¹⁴⁴⁾. Le méthylestérification est quasiment totale comme le montrent les spectres MALDI MS du produit tri-méthylestérifié (m/z 611) et de l'acide trigalacturonique présentés Figure 26.

La molécule tri-méthylestérifiée a été placée en solution dans l'heptylamine (HA) en utilisant l'acide acétique, l'acide formique et l'HFIP comme contre-ions à différents pH. Une étude de stabilité a été réalisée sur 72h en prélevant les composés après 0, 8, 24, 48 et 72 heures, et en les analysant par MALDI MS. La Figure 27 montre le degré de méthylestérification en fonction du temps pour l'ensemble des expérimentations.

Pour toutes les concentrations testées, l'HFIP induit une déméthylestérification rapide. Son intérêt pour l'analyse des héparines, qui est de maintenir un pH élevé des solvants, produit dans notre cas la dégradation des molécules et son utilisation n'a donc pas été retenue. L'utilisation de l'acide acétique pour tamponner à pH 6.8 induit également une légère déméthylestérification. Une nouvelle analyse

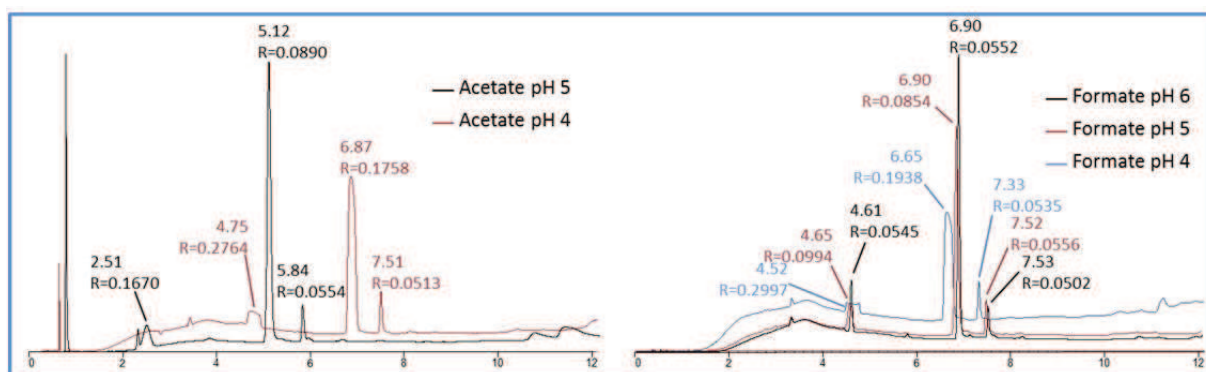


Figure 28. UV à 232 nm de la séparation IP-RP-UHPLC en utilisant l'acetate (chromatogramme de gauche, pH5 en noir, pH4 en bordeaux) et le formate (chromatogramme de droite, pH6 en noir, pH5 en bordeaux, pH4 en bleu) comme contre-ion de la fraction SEC DP4 d'homogalacturonanes digérés par une lyase (pour chaque espèce sont indiqués le temps de rétention du composé et la largeur du pic chromatographique à mi-hauteur (R)).

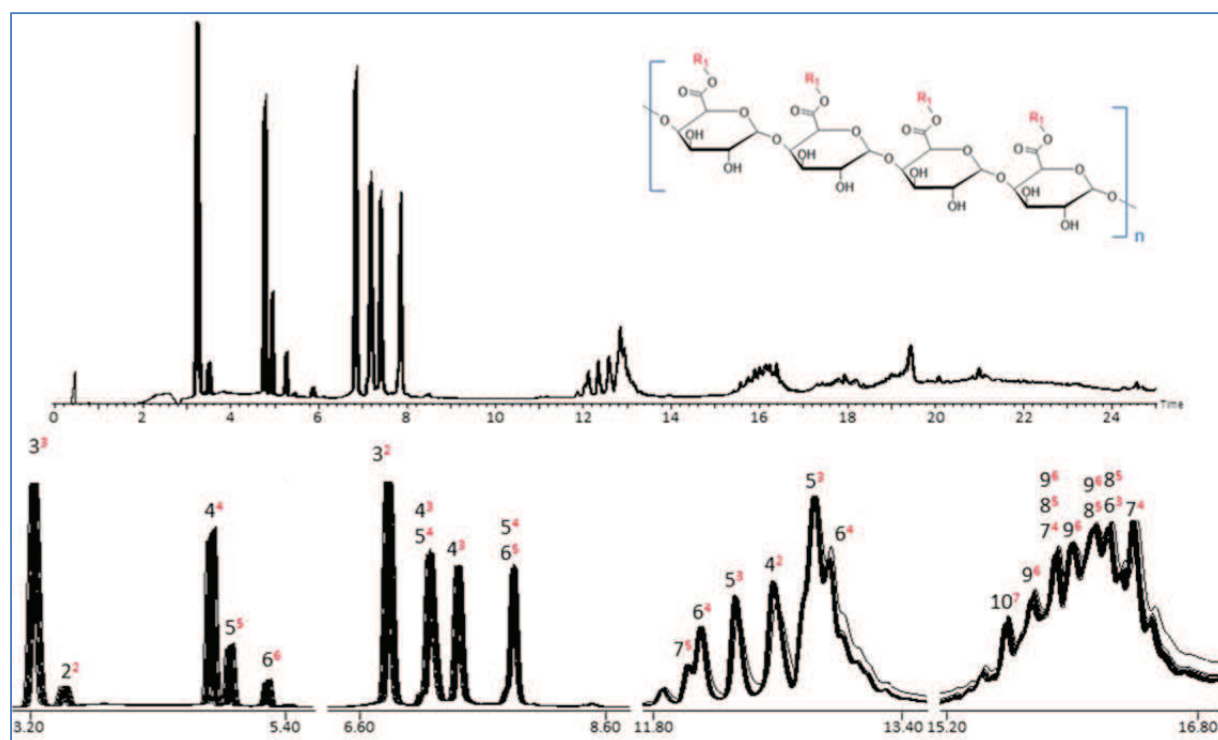


Figure 29. UV à 232 nm de la séparation IP-RP-UHPLC de 15 injections de l'échantillon HGB69. L'identité des espèces majoritaires de chaque pic chromatographique, validée en MS est indiquée : le degré de polymérisation en noir, le degré de méthylation en rouge et exposant. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : Solvant A : H₂O 100%, solvant B : MeOH 100%, solvant C : HA formate 20mM pH6 / H₂O ; débit 0.44ml.min⁻¹ ; Température de la colonne : 40°C ; Gradient (avec 25% de solvant C sur l'ensemble du gradient) : 0→10 min (2→25% B), 10→23.5 min (25→73% B), 23.5→27.5 (73% B), 27.5 →32.5 (conditions initiales).

après une semaine de l'échantillon a montré une dégradation plus prononcée. Nous avons donc conservé, pour les tests chromatographiques, l'acétate et le formate d'HA aux pH de 6, 5 et 4.

5.2. Evaluation et optimisation

Afin de poursuivre notre optimisation, nous avons d'abord travaillé sur un échantillon simple : une fraction de chromatographie d'exclusion stérique produite au laboratoire correspondant au DP4 d'un digestat d'homogalacturonanes, regroupant différents degrés de méthylestérification. Le travail a été réalisé sur une colonne Acquity UPLC BEH C₁₈ (100mm x 2.1 mm, 1.7 µm) au débit de 0.44 ml.min⁻¹. L'agent d'appariement d'ions (HA) a été utilisé à 20mM comme décrit dans le travail de Gao *et al.* ⁽¹⁴³⁾.

Les premiers essais en utilisant l'acétate à pH 6 ont montré une très faible rétention des composés. Nous n'avons donc pas conservé ce contre-ion. Pour les cinq autres contre-ions testés, les chromatogrammes UV sont présentés Figure 28.

Ces résultats montrent que, la variation du pH en utilisant l'acide acétique agit à la fois sur la résolution chromatographique (R) mais également sur le temps de rétention des composés. L'acide formique utilisé comme contre-ion modifie beaucoup moins, à pH équivalent, les temps de rétention des composés mais impacte fortement la résolution chromatographique. Ces analyses nous orientent donc vers l'utilisation de l'acide formique à pH 6 comme contre-ion, pour lequel des largeurs de pics à mi-hauteur d'environ 3 secondes sont obtenues. Il faut noter que dans le chromatogramme obtenu avec l'acide formique à pH 6, les espèces qui ont pu être facilement identifiées par couplage avec la spectrométrie de masse sont le DP4 avec 4 fonctions méthylesters (DP4DM4, RT=4.61) et deux isomères du DP4 avec 3 fonctions méthylesters (DP4DM3, RT=6.90 et RT=7.52). Ces essais confirment donc que l'IP-RP-UPLC, comme évoqué dans l'analyse de la Figure 25, est efficace pour séparer des isomères ayant le même nombre de fonctions acides.

5.3. Application des conditions optimisées sur un mélange complexe et évaluation de la reproductibilité

Un échantillon correspondant à un digestat total d'homogalacturonanes (HGB69, α-(1→4)-acide-D-galacturonopyranose (R₁= -H ou -CH₃) (R₂= -H ou -CO-CH₃)) par une lyase a été utilisé pour évaluer la reproductibilité de la séparation. La Figure 29 montre la superposition de la trace UV de 15 injections réalisées sur 24 heures, en utilisant l'HA formate 20 mM pH6.

Sur cette Figure sont annotées les différentes espèces majoritaires identifiées en LC-MS. L'écart type moyen mesuré pour les temps de rétention sur l'ensemble des espèces et sur les 15 injections est

inférieur à 1 seconde, ce qui nous a semblé suffisamment performant pour conserver ces conditions pour la suite du travail.

De plus, l'analyse de l'échantillon HGB69 total en LC MS montre que :

- a. Un grand nombre d'espèces a pu être séparé dans le mélange : environ une trentaine si l'on ne considère que les espèces majoritaires, ce qui constitue déjà un fractionnement efficace en amont de la MS.
- b. Que l'ordre d'élution se fait d'abord en fonction du degré d'acidité, c'est-à-dire du nombre de charges négatives de l'oligosaccharide interagissant avec la molécule d'appariement d'ions, ce qui est en accord avec les deux modèles mécanistiques proposés Figure 24.
- c. De manière plus surprenante, les molécules totalement méthylées, donc sans fonction acide libre, sont également retenues sur la colonne. Ce qui suggère que, soit la méthylestérification renforce assez le caractère hydrophobe des oligosaccharides pour permettre leur rétention sur la colonne, soit d'autres types d'interactions se créent.
- d. Dans chaque "sous-groupe" correspondant à un degré d'acidité donné, les différentes espèces sont efficacement séparées mais sans modèle prévisible. Le point le plus important est que dans tous ces "sous-groupes", plusieurs isomères sont séparés.

Ici encore, cet exemple démontre le potentiel de cette approche chromatographique RP-IP-UHPLC pour séparer efficacement différentes espèces, et notamment des isomères, et faciliter ainsi le travail ultérieur de caractérisation structurale par spectrométrie de masse.

Ce procédé de séparation a été utilisé pour préparer les échantillons d'homogalacturonanes qui ont été caractérisés par photofragmentation dans la partie 1 du chapitre 3. Il a également permis de caractériser la complexité moléculaire des échantillons de porphyranes également étudiés dans le chapitre 3 (partie 2). En plus de ces deux applications détaillées plus loin, la méthode a permis de travailler sur de nombreux échantillons acides. Un exemple est développé ci-après.

6. Séparation chromatographique et identification des constituants des chaînes latérales du rhamnogalacturonane de type II

Les rhamnogalacturonane de type II (RGII) sont des structures très complexes trouvées sur les pectines (Figure 7, Introduction). Ils sont composés d'un squelette court d'acides galacturoniques, décoré de 5 chaînes latérales nommées A à E. Cette structure a été relativement bien conservée au cours de l'évolution chez les plantes. Cependant, certaines différences structurelles ont été observées d'une plante à l'autre. Ces différences impactent l'hydrophobicité et la densité de charge des structures et ont un rôle physiologique chez la plante.

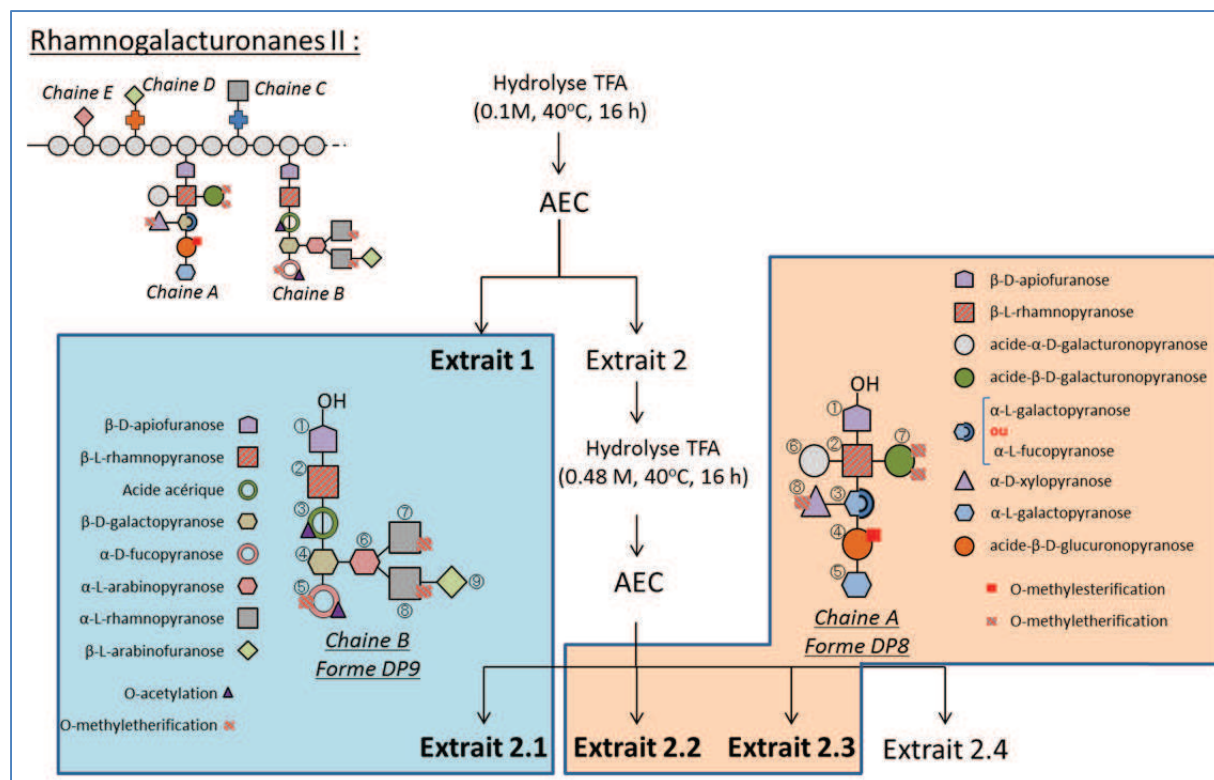


Figure 30. Protocole d'extraction des constituants du rhamnogalacturonane de type 2

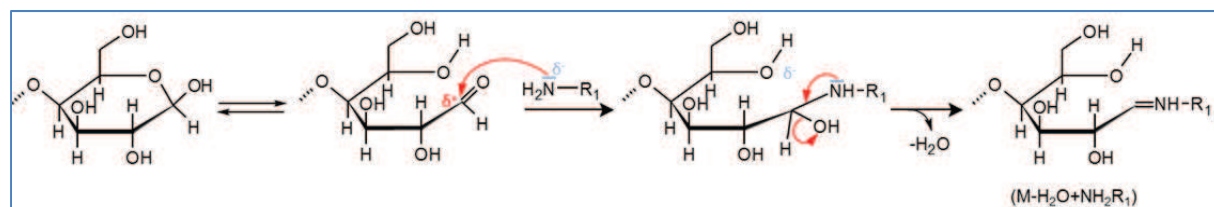


Figure 31. Réaction d'amination réductive des oses.

Dans la partie qui suit, je vais décrire l'étude structurale qui a été réalisée sur des RGII de vin (*Vitis vinifera*, Merlot). La structure du RGII et le protocole de fractionnement qui a été réalisé en amont de cette étude sont présentés Figure 30. Le RGII se caractérise par la présence de chaînes latérales spécifiques. Les 2 chaînes latérales principales, appelées A et B, sont décrites Figure 30. Ces chaînes se différencient par leur composition, et ont un impact sur la structure et les propriétés des parois cellulaires⁽¹⁴⁵⁾.

Une analyse de composition élémentaire a été réalisée sur les différents extraits et les résultats ont permis d'identifier la chaîne B dans les extraits 1 et 2.1, et la chaîne A dans les extraits 2.2 et 2.3.

Chacun de ces extraits a ensuite été étudié plus finement, d'abord par analyse MALDI TOF MS puis en LC-MS avec la méthode optimisée précédemment. Les résultats sont présentés et discutés par extrait.

6.1. Etude des extraits 2.2 et 2.3 (chaîne A)

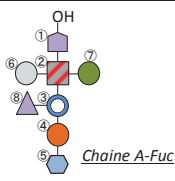
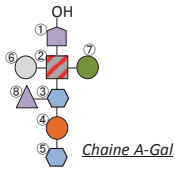
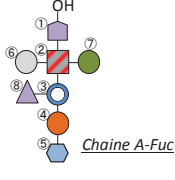
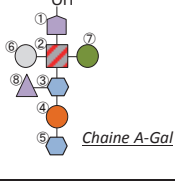
6.1.1. Analyses MALDI TOF MS

Nous nous sommes heurtés à deux difficultés lors de l'analyse par MS des extraits 2.2 et 2.3. La forme octasaccharide de la chaîne A, décrite pour la première fois par le groupe de Albersheim⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁷⁾ montre la présence en position ③ d'un résidu α -L-fucopyranose. Pabst *et al.*⁽¹⁴⁵⁾ ont récemment mis en évidence une seconde forme de la chaîne A du RGII, où le résidu en position ③ est oxydé pour former un α -L-galactopyranose. Cette modification présente un rôle physiologique chez différents mutants déficients en fucose⁽¹⁴⁵⁾. Or, la détection éventuelle de la chaîne A-Gal dans des échantillons contenant les deux formes de la chaîne A est problématique en analyse MS. La différence de masse entre un fucose et un galactose est de 15.995 (une oxydation). Cette différence de masse est très proche de celle entre un adduit sodium ($[M+Na]^+$) et un adduit potassium ($[M+K]^+$) de la même espèce ($\Delta m/z=15.974$). Or, lors d'une analyse MALDI d'oligosaccharides, plusieurs types d'adduits peuvent être présents.

Les méthylations de la chaîne A du RGII, évoquées par Séveno *et al.* en 2009⁽¹⁴⁸⁾ et démontrée par Pabst *et al.*⁽¹⁴⁵⁾, sont des méthyletherifications de l' α -D-xylopyranose et/ou de l'acide- β -D-galacturonopyranose et la méthylestérification de l'acide- β -D-glucuronopyranose. Il n'est pas possible de différencier en MALDI MS les formes méthylether des formes méthylester. Or ces modifications impactent fortement les propriétés physico-chimiques du RGII.

Une stratégie basée sur un traitement des échantillons à l'heptylamine suivi d'une analyse MALDI MS a d'abord été mise en place pour tâcher de répondre à ces deux points. Ce traitement produit une réaction d'amination réductive des oligosaccharides schématisée Figure 31.

Tableau 4. Structures des chaîne A du RGII, identifiées par MALDI TOF MS dans les extraits 2.2 et 2.3.

Extrait	Structures	Modifications		m/z observés [M+Na] ⁺
2.2	 Chaine A-Fuc	+ (2. )	majoritaire	1315.4
		+ (3. )		1329.4
		+ (4. )	minoritaire	1343.4
	 Chaine A-Gal	+ (2. )	majoritaire	1331.4
		+ (3. )	minoritaire	1345.4
2.3	 Chaine A-Fuc	+ ()	majoritaire	1301.3
		+ (2. )		1315.3
		+ (3. )	minoritaire	1329.3
	 Chaine A-Gal	+ ()		1317.3
		+ (2. )	minoritaire	1331.3
		+ (3. )	majoritaire	1345.3

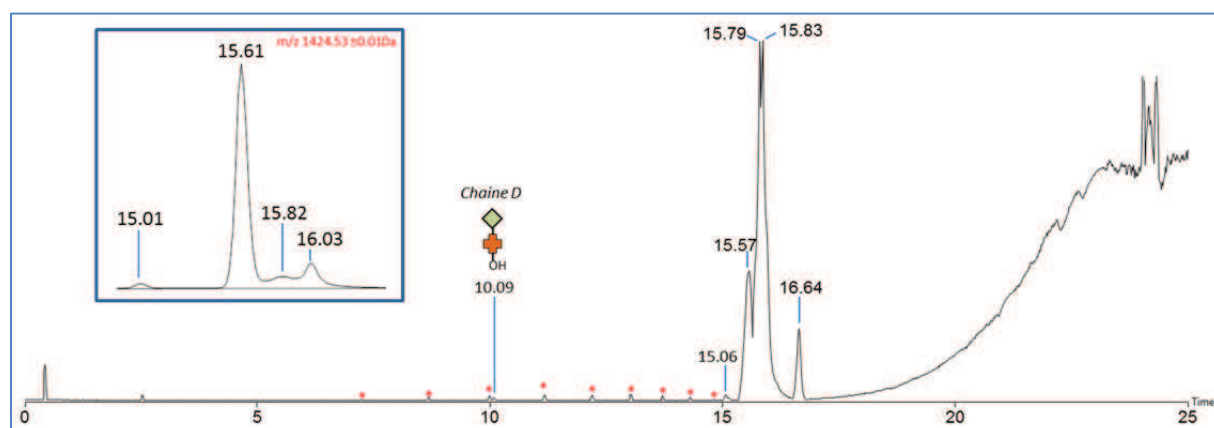


Figure 32. Chromatogramme d'ion de l'analyse IP-RP-UPLC-MS MS de la fraction 2.3 contenant la chaîne A du rhamnogalacturonane de type 2. L'encart montre le zoom de la zone d'intérêt entre 14.5 et 17 minutes. Les PEG, contaminants présents dans l'échantillon sont annotés par un astérisque rouge.

L'objectif est double :

- a. La présence de la fonction amine en extrémité réductrice de l'oligosaccharide permet de former une espèce protonée $[M-H_2O+NH_2R1+H]^+$. L'observation des deux espèces protonées avec une différence de 16 Da prouve la présence des deux chaînes (A-Fuc et A-Gal) dans les extraits 2.2 et 2.3 (et permet donc de lever l'ambiguïté liée à la présence de différents cations).
- b. Le traitement à l'heptylamine produit une augmentation du pH des extraits. Ce pH basique provoque une élimination des groupements méthylester mais conserve les groupements méthylether. L'ensemble des espèces présentes dans la fraction 2.2 (chaînes A-Fuc et A-Gal) perdent 14 Da, ce qui démontre que toutes ces espèces possèdent une méthylestérification. Pour le cas de la fraction 2.3, la structure de la chaîne A-Fuc ne semble pas impactée par le traitement basique, ce qui démontrerait la présence exclusive de méthyletherification sur cette chaîne. L'impact du traitement basique sur la chaîne A-Gal semble plus hétérogène, suggérant des profils de méthylation plus hétérogènes avec la coexistence de formes méthylestérifiées et des formes uniquement méthyletherifiées.

Les résultats de l'analyse MALDI TOF MS des extraits 2.2 et 2.3 (Figure 29) sont présentés dans le Tableau 4. Ces résultats montrent que :

- a. Les formes A-Fuc et A-Gal sont présentes dans les deux fractions étudiées.
- b. Aucune forme non méthylée n'a été détectée.
- c. La forme A-Fuc est majoritaire dans les deux fractions par rapport à la chaîne A-Gal.

Cependant, afin d'évaluer la réelle complexité des échantillons et de caractériser la nature des méthylations présentes nous avons étudié l'extrait 2.3, qui semble le plus complexe et le plus hétérogène, en utilisant la méthode de chromatographie liquide développée précédemment.

6.1.2. Analyse LC-MS de l'extrait 2.3

Le résultat de l'analyse IP-RP-UPLC-MS de la fraction 2.3 en mode positif-MS est présenté Figure 32. Il montre :

- a. La présence de pics larges entre 15 et 17 minutes. La largeur et l'asymétrie des pics observés révèlent une grande complexité dans l'échantillon. En effet, si l'on extrait de ce chromatogramme le chromatogramme d'ion d'une espèce particulière, par exemple, l'espèce correspondant à la chaîne A-Gal + 2 méthyles (m/z 1424.53 pour l'espèce $[M+IPRH]^+$, encart Figure 32), on s'aperçoit que la qualité de la séparation est satisfaisante puisque l'on voit que l'on sépare quatre espèces isomères.

Tableau 5. Liste des espèces identifiées par analyse IP-RP-UPLC MS dans l'extrait 2.3 et attribuées à la chaîne A du RGII.

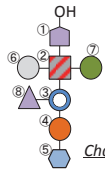
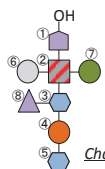
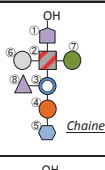
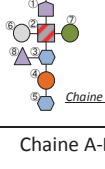
Structures	m/z observés [M+IPRH] ⁺	Modification(s)	Résidu perdu	Nombres d'espèces séparés
 Chaîne A-Fuc	1394.52	+ ()		3
	1408.53	+ (2. )		2
	1422.55	+ (3. )		1
	1232.47	+ ()	- (α-L-galactopyranose)	1
		+ (2. )	- (acide galacturonopyranose)	
	1246.48	+ (2. )	- (α-L-galactopyranose)	3
		+ (3. )	- (acide galacturonopyranose)	
	1260.50	+ (3. )	- (α-L-galactopyranose)	1
		+ (4. )	- (acide galacturonopyranose)	
 Chaîne A-Gal	1410.51	+ ()		3
	1424.53	+ (2. )		4
	1438.54	+ (3. )		3
	1452.56	+ (4. )		1
	1248.46	+ ()	- (α-L-galactopyranose)	3
		+ (2. )	- (acide galacturonopyranose)	
	1262.48	+ (2. )	- (α-L-galactopyranose)	4
		+ (3. )	- (acide galacturonopyranose)	
	1276.49	+ (3. )	- (α-L-galactopyranose)	3
		+ (4. )	- (acide galacturonopyranose)	

Tableau 6. Liste des espèces attribuées à des degrés de polymérisation supérieurs de la chaîne A du RGII identifiées par analyse IP-RP-UPLC MS dans l'extrait 2.3.

Structures	m/z observés [M+IPRH] ⁺	Modification(s)	Résidu en plus	Nombres d'espèces séparés
 Chaîne A-Fuc	1526.56	+ ()	+ Pentose	2
	1658.60	+ (2. )	+ 2.Pentose	1
	1790.64	+ (3. )	+ 3.Pentose	1
 Chaîne A-Gal	1542.54	+ ()	+ Pentose	2
	1586.58	+ (2. )	+ Hexose	1
Chaîne A-Fuc	1556.57	+ ()	+ Hexose	1
Chaîne A Gal		+ (2. )	+ Pentose	
Chaîne A-Fuc	1688.61	+ ()	+ Pentose + Hexose	1
Chaîne A Gal		+ (2. )	+ 2.Pentose	
Chaîne A-Fuc	1820.65	+ ()	+ 2.Pentose + Hexose	1
Chaîne A Gal		+ (2. )	+ 3.Pentose	
Chaîne A-Fuc	1952.69	+ ()	+ 3.Pentose + Hexose	1
Chaîne A Gal		+ (2. )	+ 4.Pentose	

- b. La présence inattendue dans cette fraction d'un composé produisant 3 ions à RT=10.09 (m/z 477.07, m/z 393.04 et m/z 570.23) attribué aux espèces $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ et $[M+IPRH]^+$ correspondants à la chaîne D du RGII.

L'ensemble des espèces identifiées dans cet échantillon correspondant à la chaîne A du RGII, déjà décrites ou de degré de polymérisation inférieur, est résumé Tableau 5. Ces résultats montrent que :

- a. L'extrait 2.3 est bien plus complexe que ne le montrait l'analyse MALDI MS.
- b. Pour un grand nombre d'espèces, des formes octasaccharidiques ont été séparées avec l'étape de chromatographie, ce qui peut montrer la présence de plusieurs isomères.
- c. La forme A-Gal est plus hétérogène que la forme A-Fuc. Elle présente plus d'espèces et pour chaque espèce, il y a plus d'isomères séparés. Le degré de méthylation est également plus important (présence de la forme totalement méthylée avec quatre méthylations).
- d. Plusieurs espèces correspondant à des heptasaccharides ont été identifiées. Il n'est pas possible de conclure sur la nature de ces structures à cause de l'isomérisation possible entre la délétion d'un Hexose sur une chaîne A-Fuc (potentiellement le α -L-Galactose terminal) et celle d'un acide Galactopyranosique (en position ⑥ ou ⑦) sur une chaîne A-Gal. Ces structures n'ont, à notre connaissance, jamais été décrites. Il conviendra de déterminer leur structure fine et de définir si elles sont le résultat du traitement de fractionnement ou si elles sont effectivement présentes naturellement.

De façon beaucoup plus surprenante, des espèces correspondants à la chaîne A du RGII avec des sous-unités osidiques supplémentaires ont été identifiées. Ces espèces sont résumées dans le Tableau 6. Ces espèces n'ont, à notre connaissance, jamais été décrites encore dans la littérature et une attention particulière devra être accordée afin de valider ces structures et, si possible déterminer les points de branchement des monosaccharides supplémentaires.

6.2. Etude des extraits 1 et 2.1 (chaîne B)

6.2.1. Analyses MALDI TOF MS

Dans la littérature, une variabilité de structure plus importante est décrite pour la chaîne B que pour la chaîne A. Différentes structures peuvent coexister dans la même plante et il a été récemment montré que leur proportion varie selon l'organe ainsi qu'au cours du développement⁽¹⁴⁵⁾. Des degrés de polymérisation de 6 à 9 ont été rapportés pour les chaînes B de RGII notamment dans le vin rouge^(145,149), ainsi que différentes modifications. Le α -D-fucopyranose est systématiquement décrit comme 2-O-méthyletherifié. Les deux α -L-rhamnopyranose peuvent être 3-O-méthyletherifiés⁽¹⁵⁰⁾. En ce qui concerne les acétylations, le fucose est rapporté comme pouvant être acétylé (sans l'information

Tableau 7. Structures de la chaîne B du RGII identifiées par MALDI TOF MS dans les extraits 1 et 2.1.

Extrait	Structures	Modifications	m/z observés [M+Na] ⁺
1	DP9	+ (■)	1333.5
		+ (■ + ▲)	1375.4
		+ (■ + 2.▲)	1417.5
	DP8	- (◇) + (▲)	1229.4
		+ (■ + ▲)	1243.4
		- (■ + ■ + ▲)	1229.4
2.1	DP9	+ (■)	1333.5
		+ (■ + ▲)	1375.4
		- (■) ou - (○)	1173.4
	DP8	- (◇) ou (-■ + ■) ou (-○ + ■)	1187.4
		(-◇ + ■) ou (-■ + 2.■) ou (-○ + 2.■)	1201.4
		(-◇ + ▲) ou (-■ + ■ + ▲) ou (-○ + ■ + ▲)	1229.4
		(-◇ + ■ + ▲) ou (-■ + 2.■ + ▲) ou (-○ + 2.■ + ▲)	1243.4
		- (■◇) ou (-◇ + ○) ou (-■ - ○ + ■)	1041.4
	DP7	(-■◇ + ■) ou (-◇ - ○ + ■) ou (-■ - ○ + 2.■)	1055.4
		(-■◇ + ■ + ▲) ou (-◇ - ○ + ■ + ▲) ou (-■ - ○ + 2.■ + ▲)	1097.4

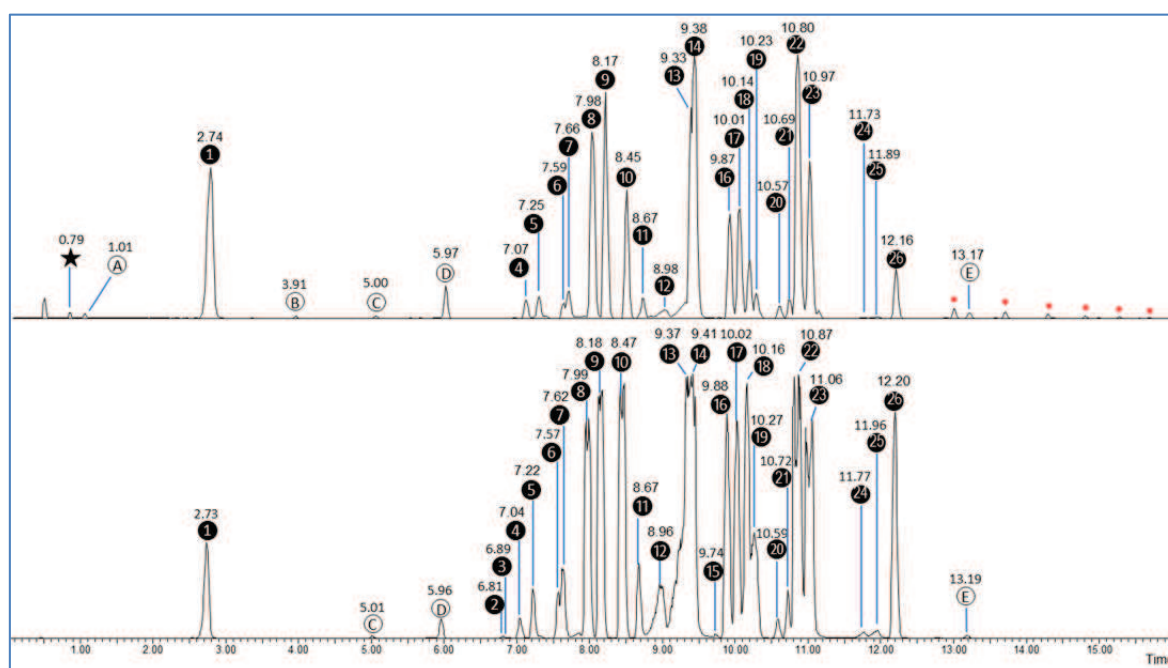


Figure 33. Chromatogramme d'ion de l'analyse IP-RP-UPLC MS (mode positif en haut, mode négatif en bas) de la fraction 2.1 contenant la chaîne B du rhamnagalacturonanes de type 2. Les PEG, contaminants présents dans l'échantillon sont annotés par un astérisque rouge. L'étoile indique la présence de contaminants non identifiés. Les différentes espèces sont indiquées par des chiffres pour les espèces identifiées par leurs masses, par des lettres pour les espèces non identifiées.

précise de la localisation de la modification) et l'acide acérique 3-O-acétylé.

Les résultats de l'analyse MALDI TOF MS des extraits 1 et 2.1 (Figure 30) sont présentés dans le Tableau 7. On voit d'emblée que l'hétérogénéité structurale est plus importante dans l'extrait 2.1. De plus, l'intensité des ions retrouvés dans cette fraction est beaucoup moins importante que pour l'extrait 1.

Dans l'extrait 1, nous avons retrouvé des signaux correspondants aux formes de la chaîne B du RGII décrites dans la littérature : le nonamère monoacétylé est le produit majoritaire ; des signaux plus faibles correspondant aux formes non et diacétylées, ainsi qu'aux formes octamères et heptamères monoacétylés sont également présents.

Dans l'échantillon 2.1 nous n'avons pas retrouvé la forme nonamérique di-acétylée. Les formes mono et non acétylées sont présentes en proportion relativement similaire si l'on se réfère à l'intensité des ions. Nous avons trouvé des formes octamériques (m/z 1173.4, m/z 1187.4 et m/z 1201.4) et heptamériques (m/z 1055.4 et m/z 1041.4) supplémentaires par rapport à l'extrait 1. Ces formes pourraient être attribuées à des produits de dégradation ou à des isomères non décrits (perte ou absence du 2-O-Me- α -D-fucopyranose). Nous avons également envisagé la présence de formes où le α -D-fucopyranose ne serait pas méthylé en se basant sur l'étude de Matsunaga *et al.* ⁽¹⁵⁰⁾, qui ont démontré que la méthylation pouvait être portée, chez certaines espèces de lycophytes et ptéridophytes, sur un des α -L-Rhamnopyranose.

Pour explorer plus en avant cette fraction, nous avons étudié l'extrait 2.1 en utilisant la méthode IP-RP-UPLC-MS.

6.2.2. Analyse LC-MS de l'extrait 2.1

Les chromatogrammes d'ions en mode positif et négatif de la fraction 2.1 sont présentés Figure 33. La chaîne B du RGII ne contenant qu'une seule fonction acide, portée par l'acide acérique, nous nous attendions à obtenir une séparation peu efficace. Les résultats obtenus montrent au contraire une séparation de nombreuses espèces réparties tout au long du chromatogramme. Deux hypothèses peuvent être évoquées : La première est que la nature des oligosaccharides, avec de multiples branchements, influencent de façon importante la rétention des espèces et l'interaction de la fonction acide avec l'agent de paire d'ions ; la seconde est que les monosaccharides constitutifs, hautement méthylés (méthyl-pentose (Rhamnose ou fucose), ou modifications telles que les méthylations ou les acétylations), permettent de mettre en œuvre d'autres processus de rétention, comme observé précédemment pour les homogalacturonanes totalement méthylés.

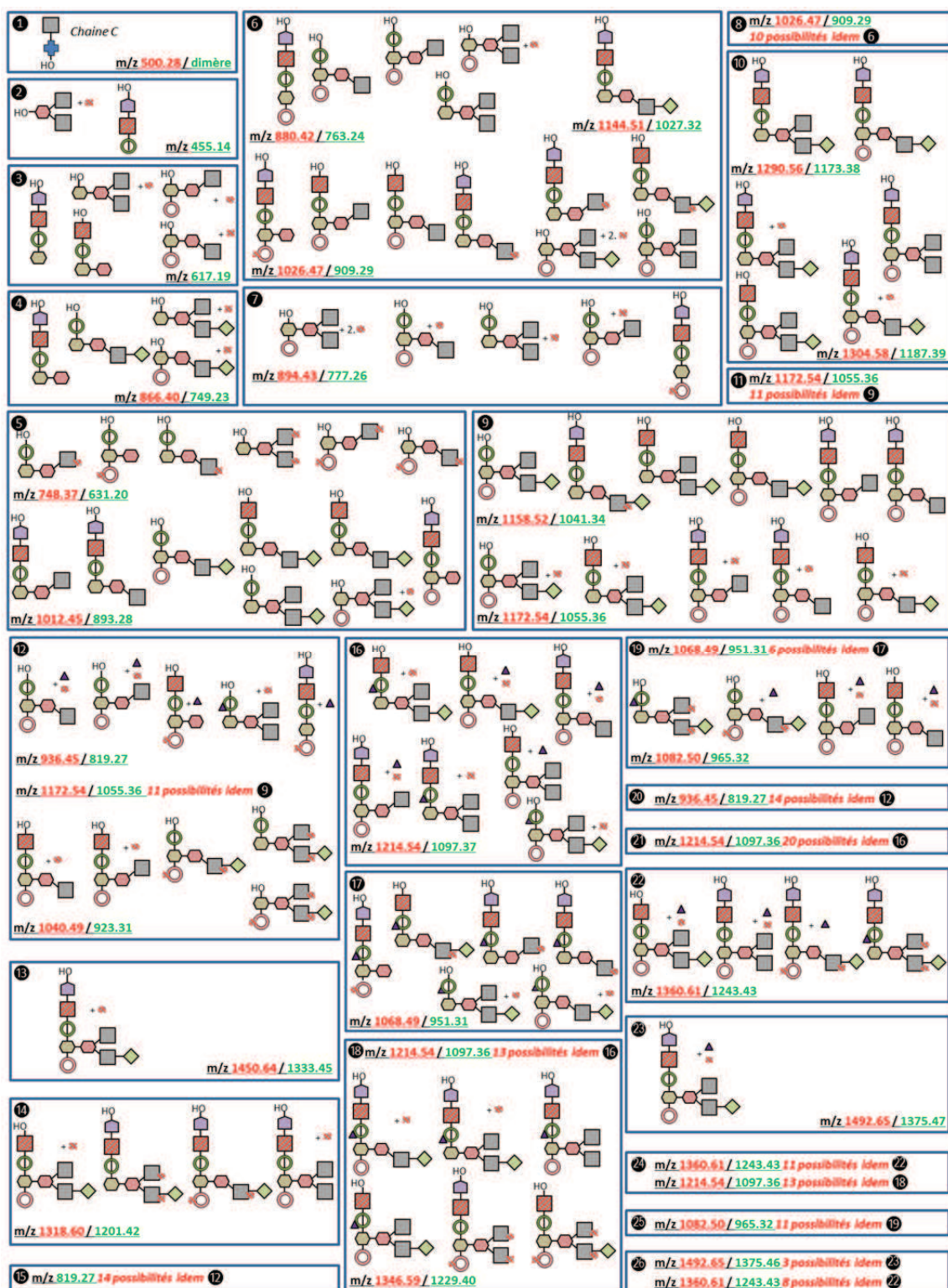


Figure 34. Structures potentielles de la chaîne B du rhamnogalacturonane de type 2 en fonction des espèces retrouvées en IP-RP-UPLC-MS en mode positif ($[M+IPRH]^+$, masse indiquée en rouge) et négatif ($[M-H]^-$, masse indiquée en vert). Chaque fraction est indiquée par un chiffre (de 1 à 26) correspondant aux fractions annotées sur les chromatogrammes d'ions (Figure 33). Les modifications (acétylation et méthylation) sont indiquées sur les structures uniquement s'il n'y a aucune ambiguïté de positionnement. Elles sont indiquées à droite des structures dans le cas contraire.

La première espèce identifiée (1) correspond à une autre chaîne du RGII, la chaîne C ($[M+Na]^+=407.124$, $[M+K]^+=423.93$ et $[M+IPRH]^+=500.277$), qui doit être co-éluee avec la chaîne B lors du fractionnement en AEC. Le reste des espèces visibles sur le chromatogramme éluent entre 1.01 et 13.19 minutes. La complexité de cet échantillon, révélée par ce chromatogramme, explique le faible signal relevé lors de l'analyse en MALDI MS de la même fraction. Sur l'ensemble des espèces identifiées, cinq (notées A à E) n'ont pas pu être attribuées. Le reste des espèces (notées 1 à 26) ont été attribuées à des produits et sous-produits de la chaîne B, allant du DP3 au DP9. L'ensemble des espèces détectées sur ces deux chromatogrammes sont résumées Figure 34. Les résultats montrent :

- a. L'absence de formes non méthylées sur les structures non dégradées (fractions 13 et 23)
- b. L'absence de formes diméthylées

Des espèces non reportées Figure 34 mais visibles après une extraction de masse ont été attribuées à des formes diacétylées en très faible quantité. Elles ont été retrouvées en intégrant spécifiquement la masse des composés (22) et (23), en incluant une fonction acétyl supplémentaire (+42.01). Logiquement, avec la présence déjà d'une méthylation sur l'ensemble de ces structures, on pourrait s'attendre à ne retrouver qu'une seule espèce pour les formes di-acétylées. Or pour chaque cas, 3 isomères sont séparés pour les molécules di-acétylées, ce qui indiquerait une isomérisation provenant de plusieurs localisations de l'acétylation sur la molécule.

Les perspectives concernant cette analyse sont maintenant de caractériser la structure fine de plusieurs espèces, afin de valider la structure de la chaîne B du RGII, et de comparer les fractions 1 et 2.1 pour déterminer si elles contiennent des formes différentes de la chaîne B.

7. Conclusions

L'ensemble des échantillons issus de RGII qui ont été analysés par cette approche IP-RP-UPLC-MS illustre la grande complexité des mélanges qui peuvent être produits par digestion enzymatique ou par dégradation chimique à partir de polysaccharides naturels d'origine végétale.

Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication : Buffetto, F.; Ropartz, D.; Zhang, X. J.; Gilbert, H. J.; Guillon, F.; Ralet, M.-C. *Annals of Botany* 2014, 114, 1327-1337 ⁽³⁾.

L'apport de l'étape de séparation par IP-RP-UHPLC semble évident si l'on compare les espèces qui ont pu être détectées sur les échantillons non séparés (Tableau 4 et 7), et après séparation pour les mêmes fractions (Tableau 5 et 6 et Figure 34).

Cependant, on voit bien aussi que la mesure de la masse pour ces structures complexes, hétérogènes et susceptibles de porter plusieurs modifications n'est pas suffisante pour arriver à une

détermination complète de la structure. Il apparaît donc nécessaire de coupler cette approche avec la spectrométrie de masse en tandem. C'est le sujet de la troisième partie de ce manuscrit.

PARTIE 3

LA PHOTODISSOCIATION DANS L'UV EXTREME : EXPLORATION D'UN NOUVEAU MODE DE FRAGMENTATION POUR LA CARACTERISATION DE LA STRUCTURE FINE DES OLIGOSACCHARIDES

Limitation de la spectrométrie de masse pour
l'analyse structurale des oligosaccharides

-

Résolution des isomères produits en mélange par la
dégradation enzymatique d'un constituant des
pectines, l'homogalacturonane

-

Spécification de l'activité d'une nouvelle enzyme de
dégradation d'un polysaccharide marin par la
caractérisation structurale fine de ses produits de
dégradation

LA PHOTODISSOCIATION DANS L'UV EXTREME : EXPLORATION D'UN NOUVEAU MODE DE FRAGMENTATION POUR LA CARACTERISATION DE LA STRUCTURE FINE DES OLIGOSACCHARIDES

Comme nous l'avons démontré dans la partie précédente sur l'exemple de la chaîne B du rhamnogalacturonane de type 2, La mesure de masse n'est pas suffisante. Même si nous disposons d'une grande précision de mesure sur les spectromètres de masse actuels et que nous sommes capables de coupler une technique séparative qui permet d'échantillonner de façon très résolutive les oligosaccharides en mélange complexe, une caractérisation structurale fine par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est souvent nécessaire. Cette étape est inévitable pour identifier précisément les espèces présentes et notamment pour résoudre des isoméries de branchement ainsi qu'identifier et localiser des modifications.

Limitation de la spectrométrie de masse pour l'analyse structurale des oligosaccharides

1. Contexte

La technique la plus communément utilisée pour la MS/MS est la Dissociation Induite par Collision à basse énergie (IE-CID). Cette technique est décrite brièvement en Introduction (paragraphe 3.3.2.1.). La IE-CID produit la rupture des liaisons les plus faibles dans une molécule. Pour le cas des oligosaccharides, les fragments majoritaires correspondent à la rupture des liaisons osidiques correspondants à des fragments B et C, et Y et Z selon la nomenclature de fragmentation de Domon et Costello décrite dans le paragraphe 3.3.1. du chapitre Introduction ⁽⁵¹⁾. Ces fragments permettent de déterminer l'enchaînement des monosaccharides mais ne fournissent pas les informations suffisantes pour obtenir la structure complète des oligosaccharides, puisqu'ils ne permettent pas d'obtenir les informations relatives aux types de branchements ni, souvent, au positionnement des modifications. Pour obtenir ces informations, il faut s'appuyer sur les fragments intracycliques (type A ou X). L'intérêt de ce type de fragments a été rapporté au début des années 90 pour la localisation des modifications des oligosaccharides ⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾. Malheureusement, ils sont difficiles à obtenir en IE-CID du fait qu'ils nécessitent de rompre deux liaisons à l'intérieur du cycle.

D'autres limitations à la technique de IE-CID pour l'analyse structurale d'oligosaccharides ont également été décrites dans la littérature. Des problèmes de réarrangement des résidus en phase gazeuse suite à l'activation peuvent conduire à une mauvaise interprétation des spectres de fragmentation ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁵⁾. Les fragments IE-CID dépendent de la molécule analysée et de ses fonctions chimiques, puisque la force d'une liaison est modifiée par les interactions liées aux différentes fonctions chimiques présentes (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, répulsions électrostatiques).

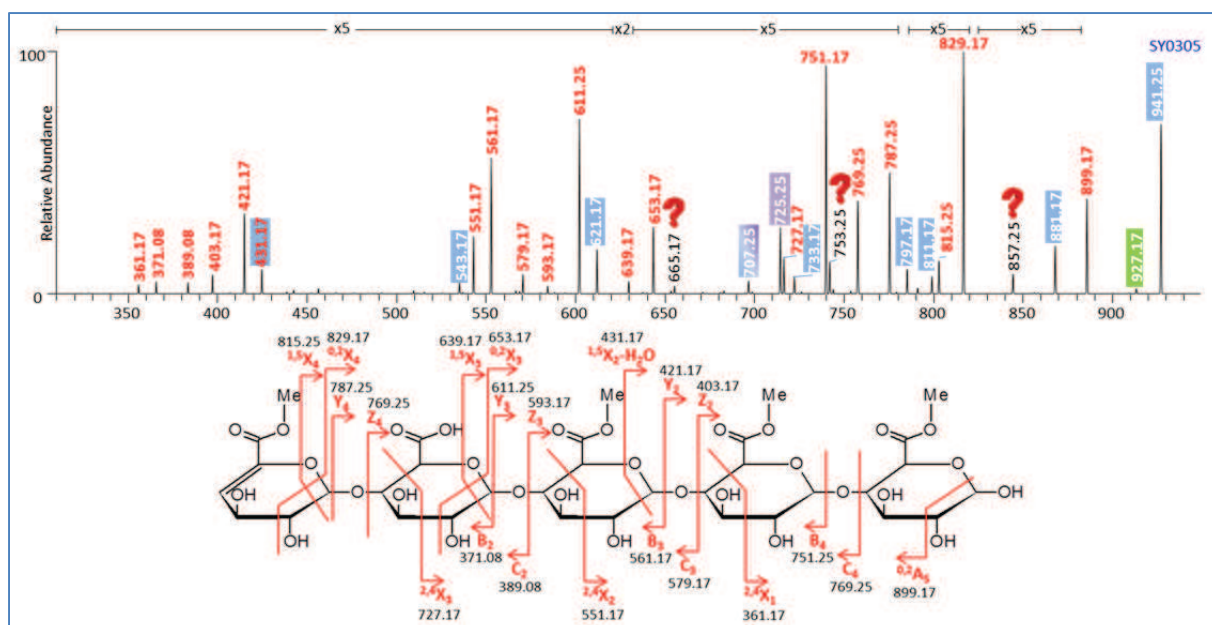


Figure 35. Analyse ESI-MS/MS en mode positif de la fraction correspondant à l'isomère majoritaire du DP5DM4 d'homogalacturonane fractionné en UHPLC. Les fragments identifiés sur la structure sont annotés en rouge. Les pertes d'eau sont surlignées en bleu, les pertes de méthanol en vert et les pertes de CO₂ en violet. Les fragments non identifiés sont indiqués par un point d'interrogation.

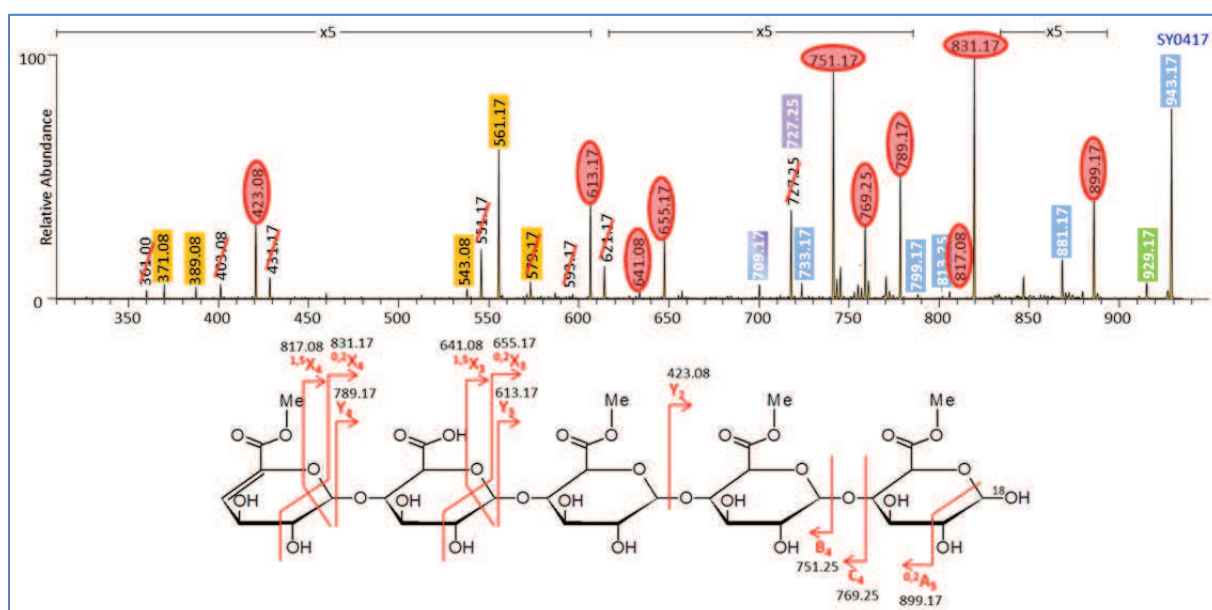


Figure 36. Analyse ESI-MS/MS en mode positif de la fraction correspondant à l'isomère majoritaire du DP5DM4 d'homogalacturonane marqué en extrémité réductrice par de l'oxygène 18. Les fragments précédemment identifiés validés, sont surlignés par une ellipse rouge et reportés sur la structure. Les fragments qui n'avaient pas été correctement assignés sont barrés en rouge sur le spectre. Les fragments pour lesquels on ne peut conclure sont surlignés en orange. Les pertes d'eau sont surlignées en bleu, les pertes de méthanol en vert et les pertes de CO₂ en violet.

2. Illustration

2.1. IE-CID en mode positif

Les Figures 35 et 36 permettent d'illustrer les problèmes que nous pouvons rencontrer avec cette technique dans nos applications. Dans ces exemples, nous avons cherché à valider la structure d'oligosaccharides simples. Ils ont été obtenus par digestion enzymatique d'homogalacturonanes d'agrumes par une lyase, ce qui permet d'introduire une asymétrie dans la molécule par la création d'une double liaison en extrémité non-réductrice. Les molécules auxquelles nous nous sommes intéressés sont des enchaînements d' α -(1 $\rightarrow$ 4)-acide-D-galacturonopyranose de degré de polymérisation 5, avec 4 fonctions méthylester (DP5DM4, $[M+Na]^+$ m/z 959.21, $[M-H]^-$ m/z 935.22). Cet oligosaccharide présente donc potentiellement cinq isomères liés au positionnement des groupes méthyle. L'échantillon total de digestion enzymatique a été fractionné par exclusion stérique. Cette approche permet de séparer les différents degrés de polymérisation (<6) mais ne sépare pas les molécules selon leur degré de méthylation. Nous avons analysé en IP-RP-UPLC-MS (méthode décrite au chapitre 2) la fraction correspondant aux différents DP5 (tous degrés de méthylation confondus). Cette analyse montre la présence de deux isomères majeurs pour le DP5DM4. Les espèces correspondantes ont été collectées et analysées séparément en infusion. L'analyse IE-CID en mode positif de la première espèce et la structure déduite sont présentées Figure 35.

L'analyse montre la présence de nombreux fragments qui contiennent l'extrémité réductrice (X, Y et Z) et l'extrémité non réductrice (A, B et C). De nombreux fragments intracycliques sont également présents (un fragment A et huit fragments X). On peut voir que les pertes de neutres ($-H_2O$, $-MeOH$ et $-CO_2$) sont nombreuses sur le spectre. Sur l'ensemble du spectre, seulement trois fragments n'ont pas pu être attribués à la structure. La structure proposée (les quatre méthylesters sont distribués sur les acides galacturoniques en position 1, 3, 4 et 5 depuis l'extrémité non réductrice) serait donc validée par la présence de 20 fragments (3 non attribués, 10 attribués à une perte de neutre pour un total de 33 fragments observés).

Afin de valider ces annotations, nous avons marqué l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide en utilisant de l'oxygène 18 (^{18}O) et procédé à l'analyse de l'échantillon marqué dans les mêmes conditions. L'introduction de ce marquage en extrémité réductrice provoque un déplacement de 2 Da pour les espèces contenant cette extrémité (fragments X, Y et Z). Le spectre MS/MS obtenu est présenté Figure 36.

La première observation concernant l'analyse de l'échantillon marqué est que de nombreux fragments, attribués précédemment à des fragments contenant l'extrémité réductrice, ne montrent

Tableau 8. Correction des annotations du spectre réalisées grâce au marquage ^{18}O (Ces propositions de correction ne prennent pas en compte la possibilité d'avoir également des pertes de neutre).

m/z	attribution erronée (Fig.23)	espèce possible
727.17	$^{2,4}\text{X}_3$	$^{0,2}\text{A}_5 / \text{Y}_4$
621.17	$^{1,5}\text{X}_3\text{-H}_2\text{O}$	$\text{B}_4 / ^{0,2}\text{X}_4$
593.17	Z_3	$^{0,2}\text{A}_5 / ^{0,2}\text{X}_3$
551.17	$^{2,4}\text{X}_2$	$^{0,2}\text{A}_5 / \text{Y}_3$
431.17	$^{1,5}\text{X}_3\text{-H}_2\text{O}$	$\text{B}_4 / ^{0,2}\text{X}_3$
403.08	Z_2	B_4 / Z_3 ou C_4 / Y_3
361.00	$^{2,4}\text{X}_1$	$^{0,2}\text{A}_5 / \text{Y}_2$ ou $^{0,2}\text{A}_4 / \text{Y}_3$

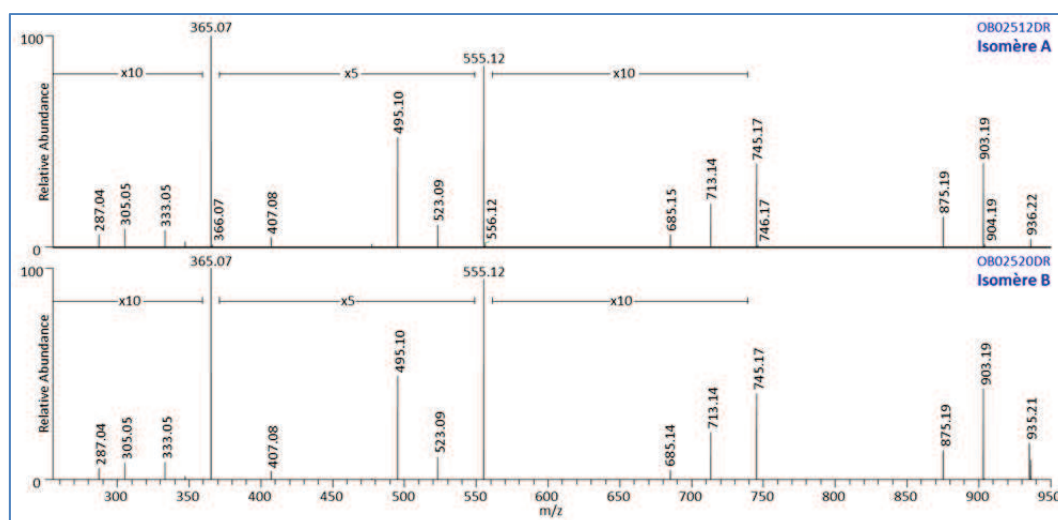


Figure 37. Spectre ESI-MS/MS de l'infusion en mode négatif des deux isomères correspondant au DP5DM4 d'oligogalacturonane séparés en chromatographie liquide IP-RP-UHPLC et collectés

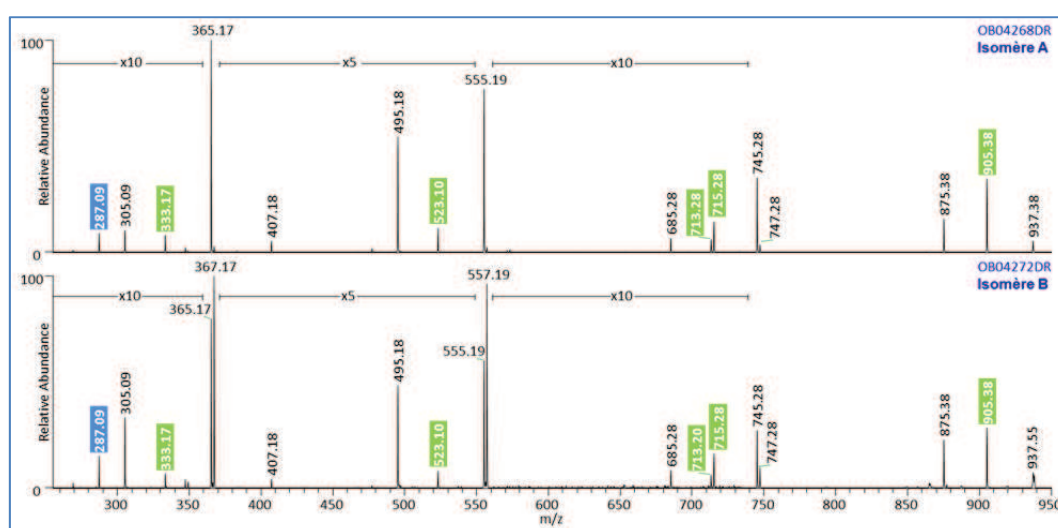


Figure 38. Spectre ESI-MS/MS de l'infusion en mode négatif des deux isomères correspondant au DP5DM4 d'oligogalacturonane séparés en chromatographie liquide IP-RP-UHPLC, collectés et marqués à l' ^{18}O

pas de déplacement de 2 Da. Il s'agit des fragments $^{2,4}\text{X}_3$ (m/z 727.17), $^{1,5}\text{X}_3\text{-H}_2\text{O}$ (m/z 621.17), Z_3 (m/z 593.17), $^{2,4}\text{X}_2$ (m/z 551.17), $^{1,5}\text{X}_3\text{-H}_2\text{O}$ (m/z 431.17), Z_2 (m/z 403.08) et $^{2,4}\text{X}_1$ (m/z 361.00). Ils avaient donc été mal annotés dans le spectre précédent (Figure 35). Ces fragments, ne pouvant être attribués à l'extrémité non-réductrice de la molécule sont en fait le témoin de doubles fragmentations. Les annotations corrigées sont présentées dans le Tableau 8.

L'occurrence de doubles fragmentations, si elle ne peut être ici prouvée que grâce au marquage avec ^{18}O pour les fragments contenant l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide, oblige à remettre également en question les annotations pour les fragments contenant l'extrémité non-réductrice (à l'exception de ceux présents sur l'oligosaccharide terminal). Il ne reste donc, sur les 33 fragments observés, que 10 fragments non ambigus pour caractériser cette structure. Dans cet exemple, la molécule conserve une asymétrie due à la présence d'une seule fonction acide carboxylique et ces 10 fragments restent suffisants pour localiser les quatre méthyles et définir la structure. Mais pour des structures plus complexes, les ambiguïtés d'annotation liées à l'occurrence de doubles fragmentations et les pertes de neutres constituent une vraie limite à l'utilisation de la technique de IE-CID.

2.2. IE-CID en mode négatif

Une possibilité, pour aider à la caractérisation structurale des oligosaccharides, est de réaliser la MS/MS en mode d'ionisation négative. En effet, l'utilisation du mode négatif pour l'étude de la structure des oligosaccharides neutres et des règles de fragmentations dans ce mode ont été proposées par Quemener⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁷⁾. Les deux isomères de DP5DM4 collectés en UHPLC ont donc été fragmentés en mode d'ionisation négatif. Les résultats sont présentés Figure 37.

L'analyse MS/MS des deux espèces, réalisée en utilisant une énergie de collision identique, montre la présence de fragments similaires avec simplement de légères variations d'intensité. La première conclusion serait de remettre en cause la séparation chromatographique des isomères et de conclure que ces deux structures sont identiques. Pourtant, après avoir marqué les deux espèces à ^{18}O comme précédemment, les deux spectres MS/MS correspondants sont différents, comme le montre la Figure 38.

Ce résultat démontre que, si les spectres MS/MS obtenus pour les oligosaccharides non marqués sont rigoureusement identiques, les fragments générés ne sont pas les mêmes entre les deux isomères. Grâce à la connaissance de la structure complète de ces deux isomères, nous avons pu annoter les différents fragments obtenus pour les molécules marquées à ^{18}O . Ces annotations sont présentées Figure 39. On voit que les fragments observés pour chacun des isomères sont fortement

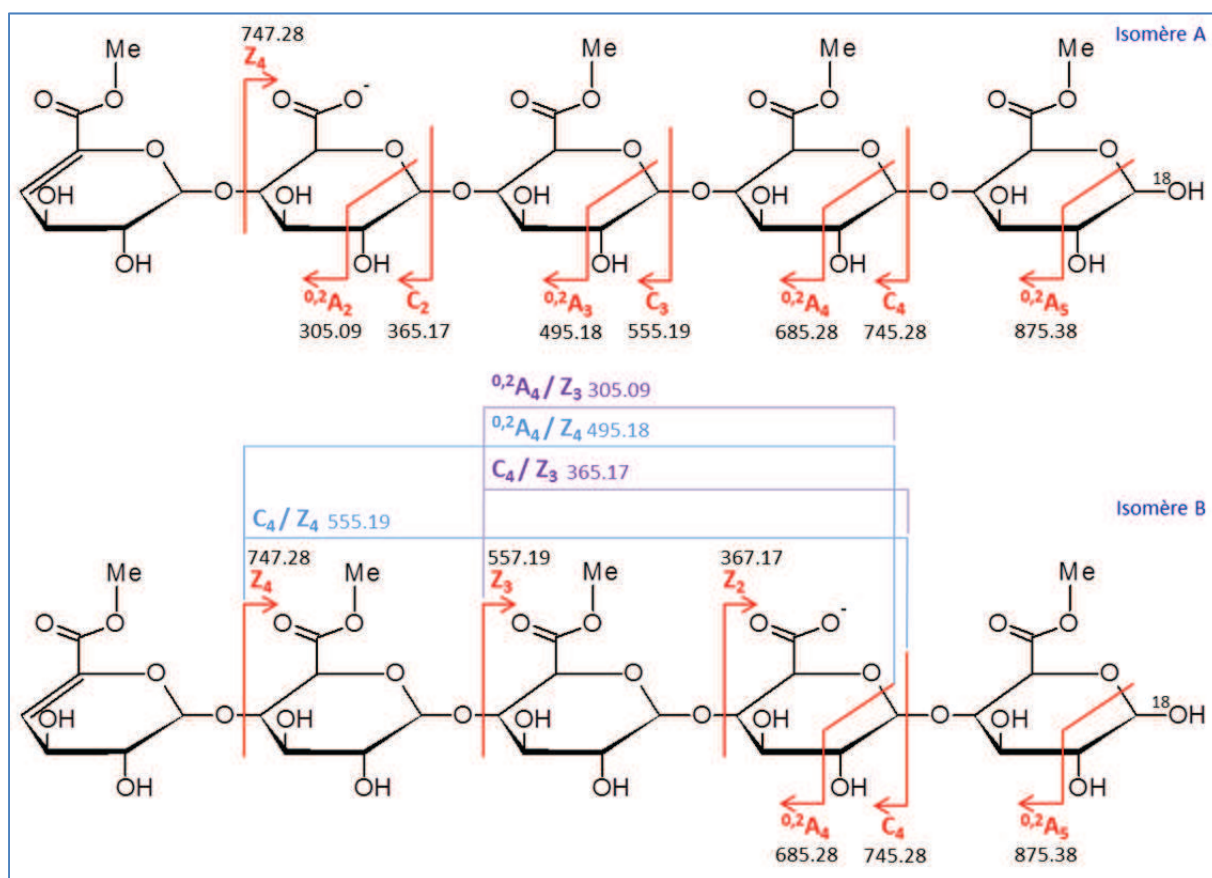


Figure 39. Structure des deux isomères de DP5DM4 marquées à ^{18}O . Les fragments observés en ESI-MS/MS en mode négatif sont reportés sur ces structures

déterminés par la localisation du groupement acide carboxylique libre (donc portant une charge négative) dans la molécule. Pour l'isomère A, on observe alors essentiellement des fragments C alors que pour l'isomère B, il s'agit principalement de fragments Z.

L'analyse de cet exemple illustre que pour les oligosaccharides acides chargés négativement, il est difficile d'établir des règles sur la fragmentation en mode négatif par IE-CID puisque le profil de fragmentation observé est directement lié à la localisation de la charge.

L'absence de principes prédictibles de fragmentation des oligosaccharides en IE-CID et les difficultés d'assignation des fragments peuvent conduire à des interprétations erronées et rendent délicate la résolution de structures inconnues par cette méthode. Nous nous sommes donc intéressés à des méthodes d'activation alternatives, et particulièrement à celles basées sur une photo-activation avec des photons de haute énergie. Notre idée était de mettre en œuvre des mécanismes de fragmentation différents et une activation de plus haute énergie, en espérant produire plus de fragments intracycliques, généralement moins ambigus que les fragments osidiques (car porteurs d'asymétrie), pour aider à déterminer finement les structures complexes auxquelles nous sommes confrontés. Nos travaux sont développés dans la suite, sur deux exemples applicatifs.

Résolution des isomères produits en mélange par la dégradation enzymatique d'un constituant des pectine, l'homogalacturonane

1. Contexte

Ce travail a été réalisé sur la ligne DISCO du synchrotron Soleil, dans le cadre du proposal 20110995 : "Characterization of different chemical classes of oligosaccharides isomers using photofragmentation in vacuum ultraviolet light".

Notre travail a été d'évaluer, sur des oligosaccharides issus de la digestion enzymatique de polysaccharides naturels, l'apport des méthodes émergentes d'activation des ions par réaction ion/photon pour obtenir des fragments permettant d'en caractériser finement et sans ambiguïté la structure.

Dans ses travaux de 2008, l'équipe de Reilly a démontré l'utilisation de la photodissociation pour la caractérisation structurale des oligosaccharides en comparant cette méthode au IE-CID et au HE-CID⁽⁸⁶⁾. Les différentes études du groupe⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ ont porté sur l'utilisation d'un laser à 157 nm (énergie des photons de 7.9 eV) pour la caractérisation de N-glycanes (provenant de lait humain, ou de l'action de la PNGase sur la ribonuclease B ou l'ovalbumine). Des tests ont également été réalisés sur le maltoheptaose dérivatisé par un chromophore. L'utilisation de ce chromophore est imposée par la technique, puisqu'il est nécessaire que la molécule que l'on cherche à photo-fragmenter absorbe à la longueur d'onde utilisée pour que les photons transfèrent de l'énergie à la molécule. Des études menées par le groupe de Dugourd⁽⁸⁹⁻⁹⁰⁾ ont décrit l'utilisation d'un laser accordable entre 220 et 240 nm pour produire des photo-fragments sur des petits oligosaccharides dérivés d'héparine (DP2 et DP4), possédant une double liaison en extrémité réductrice : dans ce cas, la double liaison dispense de la dérivatisation puisqu'elle permet à la molécule d'absorber l'énergie des photons à ces longueurs d'onde.

2. Objectif du travail

La première partie de ce travail a été d'évaluer la photo-fragmentation à 220 nm en utilisant le montage expérimental mis en place dans l'équipe de Dugourd. J'ai été accueilli dans son laboratoire pour mener ces expérimentations. Nous l'avons évalué sur des oligosaccharides produits par la digestion d'homogalacturonanes par une lyase : ce type d'enzyme produit, lors du clivage du polymère, la formation d'une double liaison en extrémité non réductrice de l'oligosaccharide (au contraire d'une hydrolase qui clive la liaison osidique en intégrant une molécule d'H₂O), ce qui permet d'envisager un travail à 220 nm sans dérivatisation.

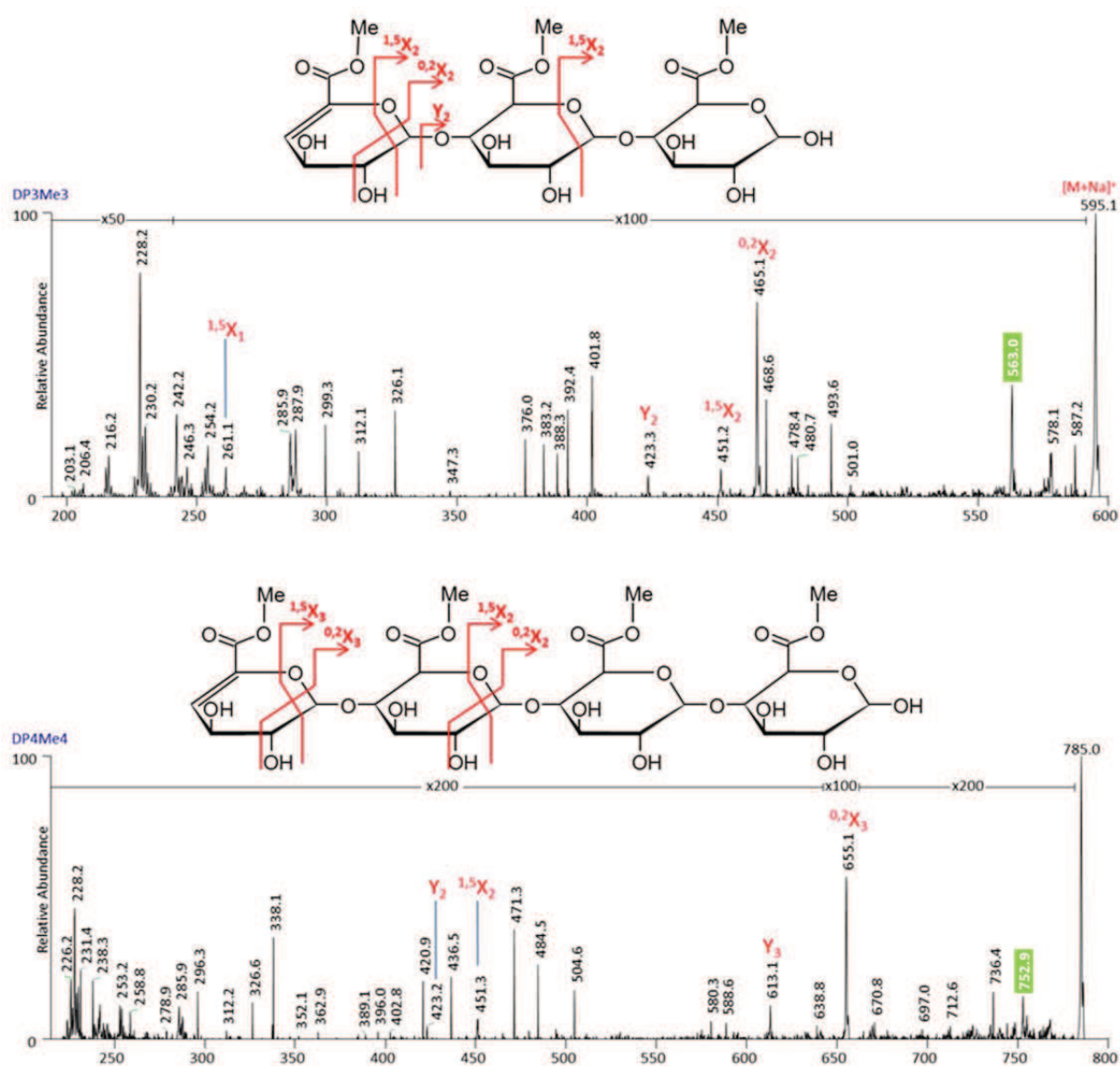


Figure 40. Spectre ESI-UVPD à 220 nm de l'infusion en mode positif du DP3DM3 et du DP4DM4 d'homogalacturonanes. Une perte de méthanol, indiquée en vert sur les spectres, est retrouvée sur chacune des molécules

Deux exemples de résultats de ces expérimentations sur des molécules simples (ne présentant aucune isomérisie) sont présentés Figure 40. Ils montrent tout d'abord la présence sur les spectres de nombreux pics correspondant à du bruit laser (masses non attribuées). Peu de fragments ont pu être attribués aux deux molécules. Les fragments attribués par photodissociation à 220 nm, majoritairement intracycliques, sont uniquement des fragments contenant l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide (X, Y et Z). Sur les oligosaccharides de faible DP (Figure 40, DP3DM3) ces fragments sont suffisants pour déterminer la structure des molécules. Sur des DP supérieurs (Figure 40, DP4DM4), des fragments sont également observés dans les hautes masses mais ne correspondent qu'au clivage des premiers monosaccharides en extrémité non réductrice (1 ou 2) et ne sont pas observés sur l'ensemble de la molécule. La nature des fragments observés et leur distribution sur le spectre de fragmentation pourraient être expliquées par la nature même du processus de photo-activation. L'absorption de l'énergie à 220 nm se fait par la double liaison en extrémité non réductrice. Pour relaxer l'excès d'énergie interne, la molécule va se fragmenter en rompant les liaisons proches du point d'absorption. On obtiendra donc les premiers fragments $^{1,5}X$ et $^{0,2}X$ qui encadrent l'oxygène du cycle hétéro-atomique où l'on trouve les liaisons covalentes intra-cycliques soumises aux tensions de cycle les plus importantes, et les premiers fragments Y et Z qui correspondent à la rupture de la liaison la plus faible de l'extrémité non réductrice, la première liaison osidique. Le processus de relaxation étant complet par ces voies de fragmentation, il sera généralement impossible de produire plus de fragments. Nous avons également essayé de réaliser des expériences d'activation des espèces ayant subi un photo-détachement d'électron ("activated EPD", aEPD). Cette technique nécessite de travailler en ionisation négative sur des espèces multichargées. Le principe est d'obtenir, par irradiation laser, une espèce radicalaire $[M-2H]^{+\bullet}$ par photodétachement d'un électron d'une espèce $[M-2H]^{2-}$, et de réactiver cette espèce par IE-CID. Un premier problème est que sur les oligogalacturonanes, les espèces multichargées sont difficiles à obtenir. Sur des DP élevés avec un degré de méthylation faible (DP7DM4 et DP8DM5), nous avons toutefois réussi à produire ces espèces. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir de spectre de fragmentation après réactivation de ces espèces radicalaires par IE-CID, soit parce que leur intensité était trop faible, en raison d'un faible rendement de photo-détachement d'électron à cette longueur d'onde, soit parce que ces espèces étaient trop instables. Ces résultats ont toutefois montré que la photodissociation favorisait, comme nous le recherchions, la production de fragments intracycliques.

En conclusion de leur étude préliminaire ⁽⁸⁶⁾, Reilly et ses collaborateurs suggèrent que l'efficacité de photo-fragmentation pourrait être accrue en améliorant la proportion de "rencontre" ion/photon, soit en travaillant avec des sources de photons plus puissantes (plus grand flux de photons), soit en augmentant le piégeage des ions dans l'espace sur le trajet du rayonnement. Effectivement, le

groupe de Reilly a estimé que seulement quelques pourcents des photons étaient utiles à l'activation dans la configuration de leur piège ionique.

Le rayonnement synchrotron constitue une alternative très intéressante aux lasers comme source de photons. Un dispositif expérimental est proposé sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL couplant ce rayonnement avec un piège ionique. Le flux de photons produit par le rayonnement synchrotron (en utilisant l'aimant de courbure disponible sur la ligne DISCO) est de l'ordre de $1 \cdot 10^{12}$ photons par seconde, soit environ 10^3 plus faible que celui produit par un laser excimer comme celui utilisé par Reilly⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ (de l'ordre de $1.6 \cdot 10^{15}$ photons produits par seconde). Cependant, l'énergie des photons peut être ajustée sur la ligne DISCO dans une gamme de beaucoup plus haute énergie (de 5 à 22 eV, correspondant à une gamme de longueur d'onde de 248 à 56 nm). Or, les sections efficaces d'absorption des photons sont considérablement plus élevées à 56 nm qu'à 157 nm (longueur d'onde utilisée dans les travaux de Reilly). On peut donc penser que l'efficacité de "rencontre" entre les photons et les ions sera plus efficace à ces longueurs d'onde du très bas UV, et compensera le flux de photons plus faible du rayonnement synchrotron.

3. Résumé du travail

Des oligo-homogalacturonanes hautement méthylés, libérés lors de la dégradation du polymère par une pectine-lyase, ont été séparés par IP-RP-UHPLC et les fractions ont été collectées et individuellement analysées par MS/MS en mode d'ionisation positif, en utilisant une photo-activation des ions dans le domaine de l'ultraviolet lointain (VUV). Chaque fraction a été marquée à ^{18}O pour valider systématiquement les interprétations proposées pour les fragments.

Un avantage du rayonnement synchrotron est que la longueur d'onde est accordable, ce qui nous a permis d'évaluer l'efficacité du processus d'activation et de fragmentation sur une large gamme d'énergie des photons, de 5 à 22 eV.

Dans un premier temps, nous avons investigué sur quelques molécules (DP3, DP4 et DP5) l'énergie photonique nécessaire pour provoquer la fragmentation. Des spectres optiques ont été réalisés entre 5 et 22 eV, en suivant l'intensité des fragments générés (normalisée par le flux de photons). Nous avons ainsi défini une longueur d'onde optimale à 18 eV : en dessous, les fragments générés sont absents ou beaucoup moins intenses, au-dessus, il n'y a pas de gain pour l'intensité des ions mais le bruit de fond généré par l'irradiation devient plus important.

L'activation dans le VUV à 18 eV a ensuite été utilisée pour analyser les différentes fractions chromatographiques contenant les oligo-homogalacturonanes. Ces structures présentent potentiellement un très grand nombre d'isomères découlant du positionnement des groupes

méthyles le long du squelette de l'acide galacturonique. La photo-fragmentation a été systématiquement comparée à la fragmentation induite par IE-CAD sur la trappe d'ions.

4. Publication

Deciphering the structure of isomeric oligosaccharides in a complex mixture by tandem mass spectrometry: Photon activation with vacuum ultra-violet brings unique information and enables definitive structure assignment. Ropartz, D.; Lemoine, J.; Giuliani, A.; Bittebière, Y.; Enjalbert, Q.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Ralet, M.-C.; Rogniaux, H. *Analytica Chimica Acta* 2014, 807, 84-95

Afin de limiter le nombre de pages et faciliter la lecture, les données supplémentaires fournies avec cette publication sont placées en Annexe 3.



Deciphering the structure of isomeric oligosaccharides in a complex mixture by tandem mass spectrometry: Photon activation with vacuum ultra-violet brings unique information and enables definitive structure assignment

David Ropartz^{a,*,1}, Jérôme Lemoine^b, Alexandre Giuliani^{c,d}, Yann Bittebière^a, Quentin Enjalbert^{b,e}, Rodolphe Antoine^e, Philippe Dugourd^e, Marie-Christine Ralet^a, Hélène Rogniaux^{a,1}

^a INRA, UR1268 Biopolymers Interactions Assemblies, F-44316 Nantes, France

^b Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, F-69622 Villeurbanne cedex, France

^c Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

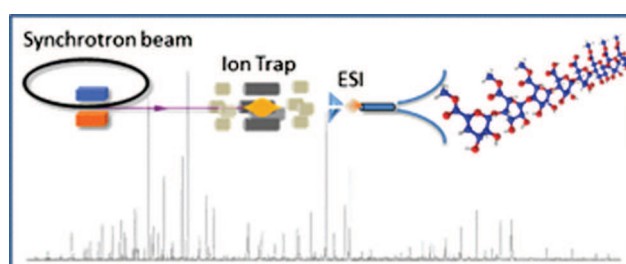
^d UAR 1008 CEPIA, INRA, F-44316 Nantes, France

^e Institut Lumière Matière, UMR5306, Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, F-69622 Villeurbanne cedex, France

HIGHLIGHTS

- A complex mixture of methylated oligogalacturonans was fractionated by IP-RP-UHPLC.
- Synchrotron-radiation in VUV range was used as an activation process for tandem MS.
- VUV activation brought rich structural information compared to LE-CAD.
- Resolution of more than 35 structures, including isomers, was successfully completed.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 August 2013

Received in revised form 8 November 2013

Accepted 8 November 2013

Available online 16 November 2013

Keywords:

Oligogalacturonans

Isomers

ABSTRACT

Carbohydrates have a wide variety of structures whose complexity and heterogeneity challenge the field of analytical chemistry. Tandem mass spectrometry, with its remarkable sensitivity and high information content, provides key advantages to addressing the structural elucidation of polysaccharides. Yet, classical fragmentation by collision-activated dissociation (CAD) in many cases fails to reach a comprehensive structural determination, especially when isomers have to be differentiated. In this work, for the first time, vacuum ultra-violet (VUV) synchrotron radiation is used as the activation process in tandem mass spectrometry of large oligosaccharides. Compared to low energy CAD (LE-CAD), photon activated dissociation brought more straightforward and valuable structural information. The outstanding feature

Abbreviations: VUV, vacuum ultra-violet; CAD, collision activated dissociation; LE, low-energy; HE, High-energy; DM, degree of methylation; MS, mass spectrometry; EID, electron induced dissociation; ETD, electron transfer dissociation; ECD, electron capture dissociation; EDD, electron detachment dissociation; UHPLC, ultra-high performance liquid chromatography; IP, ion pairing; RP, reverse-phase; PD, photo-dissociation; DPI, dissociative photoionization; HPAEC, high-performance anionic exchange chromatography; SEC, size exclusion chromatography; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; PGC, porous graphitized carbon; MALDI, matrix assisted laser desorption ionization; ESI, electrospray ionization; TOF, time of flight; IC, internal conversion; IVR, internal vibrational redistribution.

* Corresponding author at: INRA, Centre de recherche Angers-Nantes, UR1268 Biopolymers Interactions Assemblies, Rue de la Géraudière BP 71627, F-44 316 Nantes Cedex 3, France. Tel.: +33 2 40 67 50 34; fax: +33 2 40 67 50 25.

E-mail address: David.Ropartz@nantes.inra.fr (D. Ropartz).

¹ These authors contributed equally.

Vacuum ultra-violet synchrotron
photon activation
Tandem mass spectrometry
Structure

was that complete series of informative ions were produced, with only minor neutral losses. Moreover, systematic fragmentation rules could be drawn thus facilitating the definitive assignments of fragment identities. As a result, most of the structures present in a complex mixture of oligogalacturonans could be comprehensively resolved, including many isomers differing in the position of methyl groups along the galacturonic acid backbone.

Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biological carbohydrates play a crucial role in living organisms as structure or storage-related components, but also in signaling and recognition processes such as those involved in protein targeting and extracellular interactions [1,2]. These molecules also represent the most abundant biopolymers on earth and in the oceans, and have a wide variety of structures and properties. As such, they provide a vast reservoir of molecules of putative interest for several industries (e.g. anticoagulation and antitumor effects in the pharmaceutical industry, source of energy, dietary fibers, texturing and gelling agents in the cosmetics and food industries). Biological functions and end-uses of carbohydrates are strongly linked to their chemical structures, although, for many of them, these structures remain unknown or unexplored. If the glycosidic composition plays a major role, minor changes in linkage, branching as well as modifications of glycan residues might have a huge influence on the glycan properties.

Our work herein focused on pectins. These biopolymers account for about 30% of the composition of primary cell walls in terrestrial plants [3]. The degree of methylation (DM) and the distribution of the methyl groups along the galacturonan backbone contribute to distinct mechanical properties of the cell walls (e.g. cell expansion, intercellular adhesion, and porosity) and chemical properties (e.g. control of the cell wall ionic status) [4]. This backbone essentially consist of a linear chain of α -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-galacturonic acid (GalA) units, called homogalacturonan, that can be methyl esterified on their acidic functions. These features impact strongly on the pectin functionalities, such as the gelling properties or the ability to stabilize proteins, both of which are closely connected to the ionic binding capacities of pectins [5]. To better understand the structure/property relationships and tailor molecules with enhanced functionalities, a fine structural elucidation of pectins is needed, including the exact positioning of the methyl groups along the galacturonan backbone.

A variety of analytical methods have been applied for the structural characterization of polysaccharides. Among them, tandem mass spectrometry (MS/MS) remains at the forefront owing to its outstanding sensitivity and high information content. The most popular method for fragmentation is low energy collision activated dissociation (LE-CAD), a slow thermal excitation of ions produced by collision with gaseous molecules or rare gases. A series of fragment ions arising from cleavage of the glycosidic bonds is usually predominant in this process, such as Y and Z fragments, containing the reducing end, and B and C fragments, containing the non-reducing end (according to the nomenclature of Domon and Costello [6]). However, knowledge of B/C and Y/Z fragments is not always sufficient to comprehensively determine oligosaccharide structures, for instance, to pinpoint subtle modifications or provide information about branching and linkages. Additional product ions might be observed by multiple stages of MS/MS (so-called MSⁿ), albeit that the sensitivity drops at each step and might limit the practical use of this strategy. An alternative is offered by high energy CAD (HE-CAD, ca. 1000 eV). This method was described using MALDI instrumentation, either combining sector fields and orthogonal time-of-flight (TOF) [7,8] or TOF/TOF analyzers [9,10]. More cross-ring cleavages are observed, bringing valuable structural information on oligosaccharides.

However, both in LE- and HE-CAD, occurrence of rearrangement ions, neutral losses, and internal fragments originating from multiple possible pathways (e.g. B/Y internal cleavages) complicate the interpretation of mass spectra, thereby preventing this method, in some cases, from achieving unambiguous structure assignment. In spite of these limitations, LE-CAD was successfully employed to characterize methyl-esterified galacturonans, both from positive and negative ions [11,12]. Nevertheless, it is worth noting that, in these studies, the dissociation pathways were found to vary greatly with the number and distribution of methyl-esterified galacturonic acid residues and no clear rules could be drawn for spectra interpretation. The authors concluded that definitive structural determination was possible only in cases of low sample heterogeneity.

Ion/electron interactions can be used as alternative dissociation methods to CAD. These include EID (electron induced dissociation [13]), ETD (electron transfer dissociation [14]), and ECD (electron capture dissociation [15]). Use of ECD and ETD for glycans is exemplified in [16,17]. In contrast to the dissociation of even electron molecular ions, significantly different fragmentation behavior is observed under ECD and ETD conditions and leads to more informative spectra. They contain many cross-ring fragments (A and X fragments), and thus provide information on branching and linkages. However, these electron-based activation methods are limited to components able to form positively- and multiply-charged species, and therefore are not directly amenable to acidic compounds, like pectins. For negatively-charged or neutral compounds, electron detachment dissociation (EDD), EID and negative ETD have been applied to the analysis of chitoooligosaccharides [18], glycosaminoglycans (GAGs) [19–22] and sialylated oligosaccharides [23]. Although these electron-based methods offer interesting alternatives to CAD, they tend to produce highly complex spectra that are difficult to interpret for unknown structures, with fragments arising from many pathways and undergoing numerous neutral losses (H₂O, CO₂, and methanol, etc.).

An alternative technique was introduced more recently and employs ion/photon interactions as a way to induce dissociation. It is particularly attractive because of the potential for obtaining wavelength-dependent information, thus adding a degree of specificity. In the infra-red (IR) range, multi-photon dissociation may use 10.6 μ m photons resulting in a slow thermal excitation close to that undergone by ions in CAD [24,25]. However, the features of ultraviolet (UV) [26] are more promising and even more so is vacuum UV (VUV, $\lambda < 200$ nm) photoexcitation, which produces a fast and high energy deposition from a single-photon absorption [27–30]. Photodissociation (PD) at 157 nm (7.9 eV) of positive ions was thoroughly investigated by Reilly and co-workers, in particular for glycans after Girard's T derivatization [27]. These studies ubiquitously observed that VUV PD yields unique fragment distribution and highly informative spectra, including extensive cross-ring fragments. Electron photodetachment may arise from photon activation of negative ions, leading to the formation of odd electron species. The latter exhibit specific reactivity and produce distinct fragmentation patterns complementary to those obtained from the activation of even electron species. Interestingly, Dugourd and co-workers introduced a near-UV PD (220–240 nm) of deprotonated ions which does not require any derivatization [31,32]: the activation is promoted by the presence of a C=C double bond at the non-reducing end of

the glycans, a structural feature that can be specifically obtained through the digestion of a polysaccharide by a lyase.

In this work, we investigated the potential of VUV photon activation at higher energies than previously used for tandem mass spectrometry of positively-charged oligosaccharides. It is based on the coupling of a linear ion trap with a VUV beamline at a synchrotron radiation facility [33–35]. The tremendous advantage of this set up is the tunability of the synchrotron radiation, which enables us to probe photon activation over a wide range of energy, from 5 to 24 eV. The experimental setup was used to resolve the structures of isomeric oligosaccharides released during the degradation using a lyase of highly-methylated homogalacturonans originating from citrus fruit. A simplification of the mixture was made prior to MS analysis using ion-pairing reverse-phase UHPLC. As reported for other photoexcitation methods, the fragmentation behavior induced by the VUV synchrotron radiation was found to be complementary to that undergone in LE-CAD. High energy fragments were produced under VUV photon activation, corresponding to significant cross-ring cleavages. Spectral interpretation was found to be easier than in CAD due to the absence of neutral losses and internal cleavages. Altogether, the selectivity of IP-RP-UHPLC for oligogalacturonan separation coupled to the specificity of VUV synchrotron photon activation for the characterization of isolated molecules enabled us to achieve a definitive and comprehensive map for a large number of structures, including many isomers.

2. Experimental

2.1. Chemicals and oligosaccharides

Trigalacturonic acid, heptylamine 99% (HA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), glacial acetic acid, 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol 99.8% (HFIP) and H_2^{18}O were purchased from Sigma–Aldrich Co. (Saint Quentin Fallavier, France). Formic acid 98% was from Fluka. N,N-Dimethylaniline (DMA) was purchased from Fisher Scientific (Fisher Bioblock Scientific S.A., Illkirch, France). HPLC grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were purchased from Carlo-Erba. Ultrapure Water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore).

A fully-esterified trigalacturonic acid was synthesized following the Van Allebeck et al. protocol [36]. Purity and completion of esterification were controlled by mass spectrometry (the structure and spectra are provided in Fig. 1 in Supplementary data).

The complex mixture of oligogalacturonans was prepared by enzymatic degradation of a highly-methylated homogalacturonan (69% methylation) obtained from citrus fruit by a pectin-lyase, according to the method described in Ralet et al. [37].

2.2. Ion pairing-reversed phase chromatography separation (IP-RP-UHPLC)

Chromatographic separation was run on an Ultra High Performance Liquid Chromatography system (UHPLC, Acquity H-Class® Waters, Manchester, UK), mounted with a BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm, packed with 1.7 μm porosity particles) (Waters, Manchester, UK). The flow rate was of 0.441 mL min^{−1} and column was heated at 40 °C. A ternary gradient was used (A: pure water, B: pure methanol and C: 20 mM heptylammonium dissolved in water, and pH value adjusted to 6 by addition of formic acid), from 2% to 25% of solvent B in 10 min, then up to 73% at 23.5 min and maintained at 73% for 4 min. Percentage of solvent C was kept constant at 25%. Fractions were collected by time (6-second fractions) using a WFC III fraction collector (Waters, Manchester, UK).

2.3. Study of the stability of methylated trigalacturonic acid in IP-RP-UHPLC conditions

Fully-esterified trigalacturonic acid (DP3DM3) was dissolved at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in IP-UHPLC media, prepared as follows: 20 mM heptylammonium was dissolved in ultrapure aqueous solution; formate, acetate or HFIP were used to generate the ion pairing reagent. In the case of formate and acetate, formic acid and acetic acid were added to reach the pH values indicated in Table 1. In the case of HFIP, the molarity (not the pH) was adjusted. These preparations were diluted four fold in water.

2.4. ^{18}O -labeling

The reducing end of the oligosaccharides was ^{18}O -labeled by resuspending samples dried in a Speed-Vacuum concentrator system (at room temperature) with 50 μL of H_2^{18}O . Incubation was allowed for one week at room temperature in the dark. For ESI-MS experiment, ^{18}O -labeled sample solutions were diluted 4-fold in a solution of H_2^{16}O /MeOH (1:2) right before the analysis.

2.5. MALDI TOF mass spectrometry measurement

MALDI TOF experiments were performed on an Autoflex III MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam laser (355 nm, 200 Hz) in positive reflectron ion mode. Samples were deposited on a polished steel MALDI target plate with a matrix solution of DHB/DMA, prepared as described in Ropartz and co-workers [38].

2.6. ESI tandem mass spectrometry–LE-CAD measurements

Samples were introduced at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ into an LTQ Orbitrap VELOS system (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA). Measurements were made in positive and negative ion modes. Fragments were produced and measured in the linear trap. LE-CAD spectra (less than 100 eV) were recorded during 0.5 min. The collision energy was adapted for each oligosaccharide based on the signal/noise ratio observed for fragments. Data were processed using Xcalibur™ 2.2 Software.

2.7. ESI tandem mass spectrometry–VUV photon activation measurements

The coupling of the linear ion with an undulator-based synchrotron beamline was described in ref. [33]. Here, we report the implementation of an LTQ XL linear ion trap (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA) as a DISCO [35], endstation, a bending magnet-based beamline at the SOLEIL synchrotron radiation facility. The mass spectrometer was connected to the second stage differential pumping of the beamline [39]. A photon shutter, consisting of an aluminum cylindrical head mounted on a magnetic feed through and activated by a rotational electromotor, was used to allow irradiation during the MS/MS stages. In this work, the photon energy was tuned to 18 eV. Irradiation of isolated ions (isolation window of $\Delta m/z = 2$) was performed by setting the activation to 3000 ms with zero collision energy. The resulting fragmentation spectra were recorded during 2–10 min, depending on fragment intensity. Raw data were transformed in mzML format using MSConvert (<http://proteowizard.sourceforge.net/downloads.shtml>) and further processed using mMass 5.3.0 [40] to remove background peaks produced upon photon irradiation.

Table 1

Stability of methyl-esterified trigalacturonic acid under IP-RP-UHPLC conditions.

Solvent	Nature of the counter-ion	Adjusted pH	Molarity	% of demethylation by time (h) ^a					
				0	8	24	48	72	240
HA 20 mM	Acetate	6.8	/	0.9	/	1.5	2.6	4.1	4.6
		6	/	1.5	/	1.6	1.9	1.9	3.6
		5	/	1.3	/	1.6	1.1	1.7	1.8
		4	/	1.7	/	1.7	1.3	1.8	2.5
	Formate	6	/	1.3	/	1.7	1.2	2.1	1.9
		5	/	1.5	/	1.8	1.1	1.4	2.0
		4	/	1.4	/	1.6	0.9	1.6	2.2
		3	/	1.4	/	1.7	1.1	1.6	2.8
	HFIP	/	10 mM	86.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		/	20 mM	88.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		/	50 mM	9.1	46.7	100.0	100.0	100.0	100.0
		/	100 mM	6.6	24.6	100.0	100.0	100.0	100.0
		/	/	/	/	/	/	/	/
H ₂ O	/	/	/	1.3	/	2.8	3.2	2.6	2.4

Fully esterified trigalacturonic acid was prepared in 20 mM heptyl-ammonium with different counter-ions, as described in Section 2. Loss of methylation was evaluated from MALDI TOF mass spectra over a time period of 240 h.

^a Percentage of demethylation calculated by dividing the sum of all peak area for demethylated products (DP3DM_n, with $n=0, 1, 2$) by peak area of fully esterified trigalacturonic acid (DP3DM₃) (all cationized species were considered in both cases).

3. Results and discussion

The focus of this study is to resolve the structure of oligogalacturonans released by the enzymatic degradation of highly-methylated pectins extracted from the cell walls of citrus fruit. The enzymatic degradation medium consists of a complex mixture of oligogalacturonans with various degrees of polymerization (DP) and methylation (DM). In this mixture, our aim was to resolve the isomeric oligosaccharides differing in the position of the methyl groups along the galacturonan backbone, as these molecules can have strikingly distinct properties. Prior to MS analysis, the mixture was separated into several chromatographic fractions using ion-pairing reverse-phase UHPLC. Conditions for this separation were optimized to obtain the most efficient separation of oligogalacturonans over a wide range of DP and DM, whilst keeping the integrity of the esterified molecules.

Many liquid chromatographic techniques can be applied to glycan fractionation. These include anionic exchange chromatography (HPAEC), size exclusion chromatography (SEC), hydrophilic interaction chromatography (HILIC), reverse-phase chromatography (RP-UHPLC) and separation on porous graphitized carbon (PGC) [41–43]. However, not all are equivalent in terms of selectivity, robustness, availability of ultra-high performance stationary phases, nor in terms of compatibility with MS (aqueous organic mixtures and as low a concentration as possible of nonvolatile salts are preferred for the mobile phase). In addition, some are clearly not adapted to the fractionation of esterified compounds (e.g. mobile phases used in HPAEC have an elevated pH which induces the hydrolysis of ester groups). RP-UHPLC therefore appeared as a method of choice, as it is robust, offers a wide range of specificity, and many stationary phases are commercially-available. Furthermore, it is directly amenable to MS and as such, certainly the most popular on-line LC–MS system. Combined with the use of volatile ion-pairing reagents (IP-RP-UHPLC), it has been successfully applied to heparin-derived oligosaccharides [42,44–47], chondroitin sulfates [48,49], and carrageenans [50,51], with a separation based both on the DP as well as on the number of sulfate groups. These molecules, which can be considered as “super acidic” compounds, strongly interact with the IP reagents – typically amines with hydrophobic alkyl chains – thereby resulting in an effective separation of the compounds. Here, we applied IP-RP-UHPLC to separate oligogalacturonans. Due to their carboxylic groups, these molecules are expected to interact with the IP and thus be retained on the RP stationary phase, despite their hydrophilicity. Furthermore, we expect different retention

behaviors according to the different DM, as methyl esterification reduces the number of carboxylic groups able to interact with the IP. Therefore, a careful optimization of IP selection and mobile phase composition was mandatory in order to achieve a good separation whilst preventing the loss of labile ester bonds.

3.1. Optimization of IP agent selection and mobile phase composition for RP-UHPLC of oligogalacturonans

The principle of IP-RP-HPLC lies in docking hydrophilic structures, that exhibit polyanionic functions (such as acidic or sulfated oligosaccharides), onto the hydrophobic stationary phase using alkyl amines as “bridging” agents. In their study on heparins, Gebler and co-workers [42] obtained better results in terms of sensitivity in MS and chromatographic resolution with linear alkyl amines than with tri-alkyl amines. The highest peak capacity was observed for hexylamines and pentylamines, whilst the performance dropped with longer alkyl chains (octylamines). However, on less acidic compounds like κ -carrageenans, heptylamine (HA) performed well [50,51]. In our work, heptylammonium salts were investigated. The ammonium counter-ion of the as well as the pH influences the interaction with oligosaccharides. Acetate [46,47,52–54] formate [50,51] and more recently 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolate (HFIP) [42,55] were described as counter-ions for IP-HPLC and all three were tested in our study. In the case of formate and acetate, the pH was adjusted to obtain ionization of the carboxylic groups (i.e. pH above 3.3) whilst preventing the elimination of methyl groups which occurs under basic conditions; several pH values were tested (see Experimental section and Table 1). In the case of HFIP, several concentrations were prepared according to Doneanu et al. [42]. Influence of these parameters was evaluated on a simple model consisting of trigalacturonic acid (DP3), as well as its fully-esterified derived compound (DP3DM3). First, the stability of DP3DM3 diluted at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in all IP-UHPLC media was monitored over a 10-day period. The possible loss of methyl groups was controlled by MALDI MS. The results are summarized in Table 1. At 10 and 20 mM HFIP, an immediate loss of the methyl groups was observed, with the fully-methylated species (DP3DM3) representing less than 15% of the species detected on the spectrum at $T=0$. At higher concentrations in HFIP (50 and 100 mM), demethylation was delayed but the fully-methylated species had completely disappeared after a few hours. Thus, this counter-ion was discarded from any further study. Acetate and formate were found to be more appropriate with a minor extent of demethylation (<5%) observed for both media after

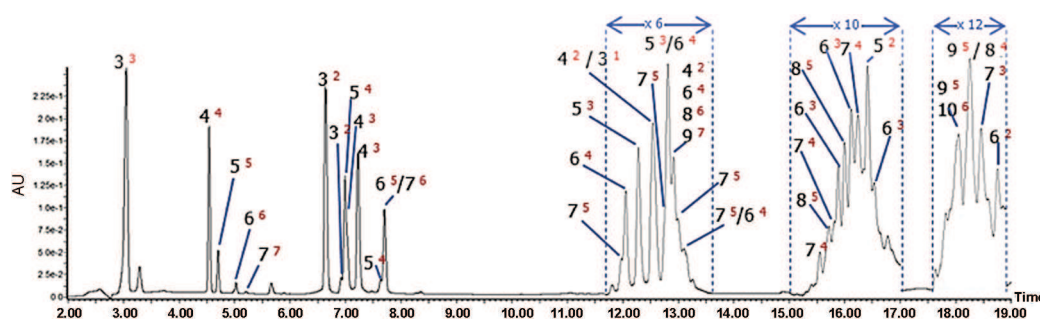


Fig. 1. RP-IP-UHPLC chromatogram obtained for a complex mixture of oligogalacturonans, produced by the enzymatic degradation of highly methylated (69%) homogalacturonan from citrus fruit (HGB69). The IP agent was 20 mM heptylammonium in a formate buffer at pH 6. Figure displays the UV trace at 232 nm. The chemical composition of eluted species was assessed by MALDI TOF MS. Large numbers in black give the degree of polymerization (DP). The small numbers in red give the degree of methylation (DM).

10 days. Additionally, as some drying steps are to be undergone for the reducing-end labeling of oligogalacturonans or for concentrating the samples, upon drying behavior of IP-UHPLC media prepared with acetate and formate was then investigated. Results (provided in Fig. 2 in Supplementary data) showed that freeze-drying led to the formation of both Schiff-base IP-derivatives from the DP3DM3 (thereby splitting the MS signal into several peaks of lower intensity), as well as significant demethylation. Drying in a speed-vacuum concentrator system showed striking differences between acetate- and formate-containing media. In the case of acetate, whatever the pH, Schiff-base IP-derivatives were observed, together with demethylated products for pH values above 5. Some contaminants were also detected in the case of formate for media prepared at pH 3, but were negligible for media prepared at other pH values. Most importantly, demethylation was not observed.

The next step was to evaluate the capacity of formate media to be used in combination with heptylammonium as the IP agent

for chromatographic separation of galacturonans in RP-UHPLC. A purified DP5 with several DMs was first used as a simple model [37]. The results showed that the chromatographic resolution was enhanced with higher pH values (see Fig. 3 in Supplementary data). Finally, these experiments led us to prepare 20 mM heptylammonium in a formate buffer with a pH adjusted to 6 as the IP agent for RP-UHPLC. A representative example of the chromatograms obtained for a complex mixture produced by the enzymatic degradation of highly-methylated (69%) homogalacturonans (HGB69) is shown in Fig. 1. Consistent with what was expected and with that reported earlier for sulfated species [42], oligogalacturonans elute according to their number of free carboxylic groups, prone to interact with the IP agent (the earlier species being the fully-methylated species). In all these groups, several DPs are efficiently separated. Interestingly, some isobaric species (i.e. same DP and DM) which might arise from structural isomers are also clearly separated.

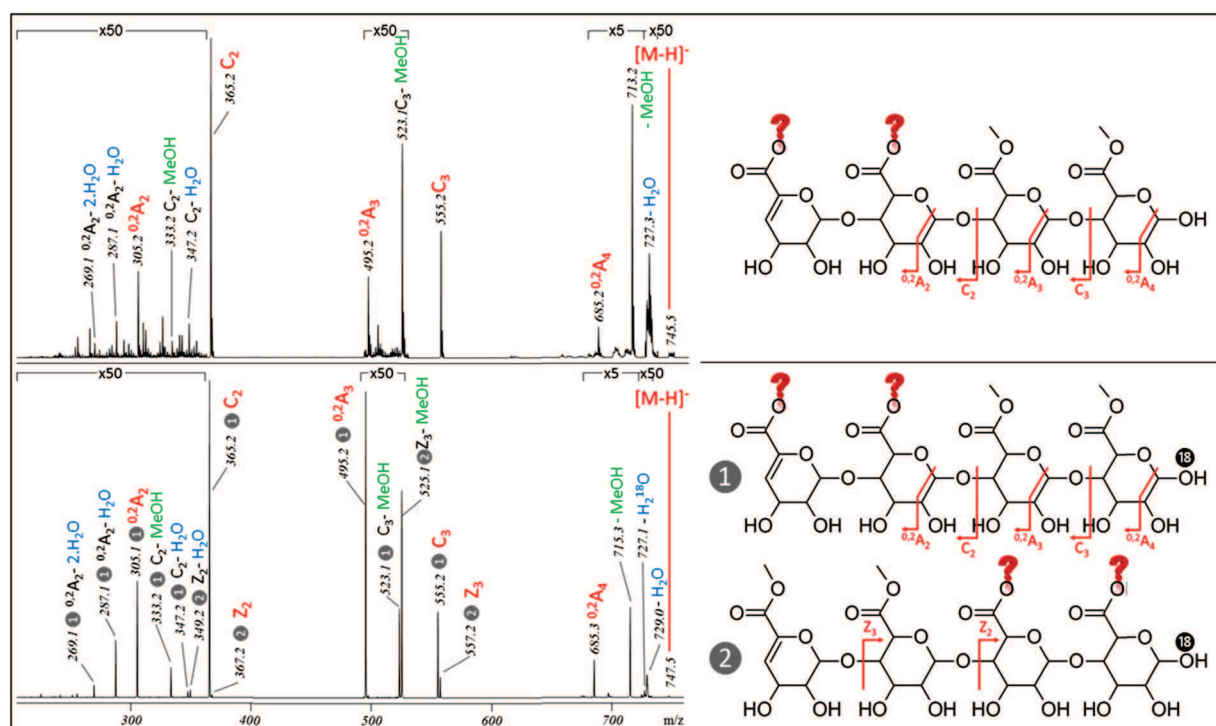


Fig. 2. LE-CAD fragmentation spectrum of a DP4DM3 oligogalacturonan, recorded in negative ion mode. Parent ion was isolated as $[M-H]^-$ species at m/z 745.4 for non-labeled compound (up spectrum) and at m/z 747.5 for ^{18}O -labeled compound (bottom spectrum). Two isomers (structures displayed on the right in both panels) could be partially resolved thanks to the labeling: positioning of two of the three methyl groups could be achieved, however, uncertainty remains for the third one (question marks in red). Water losses are highlighted in blue. Methanol losses are displayed in green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

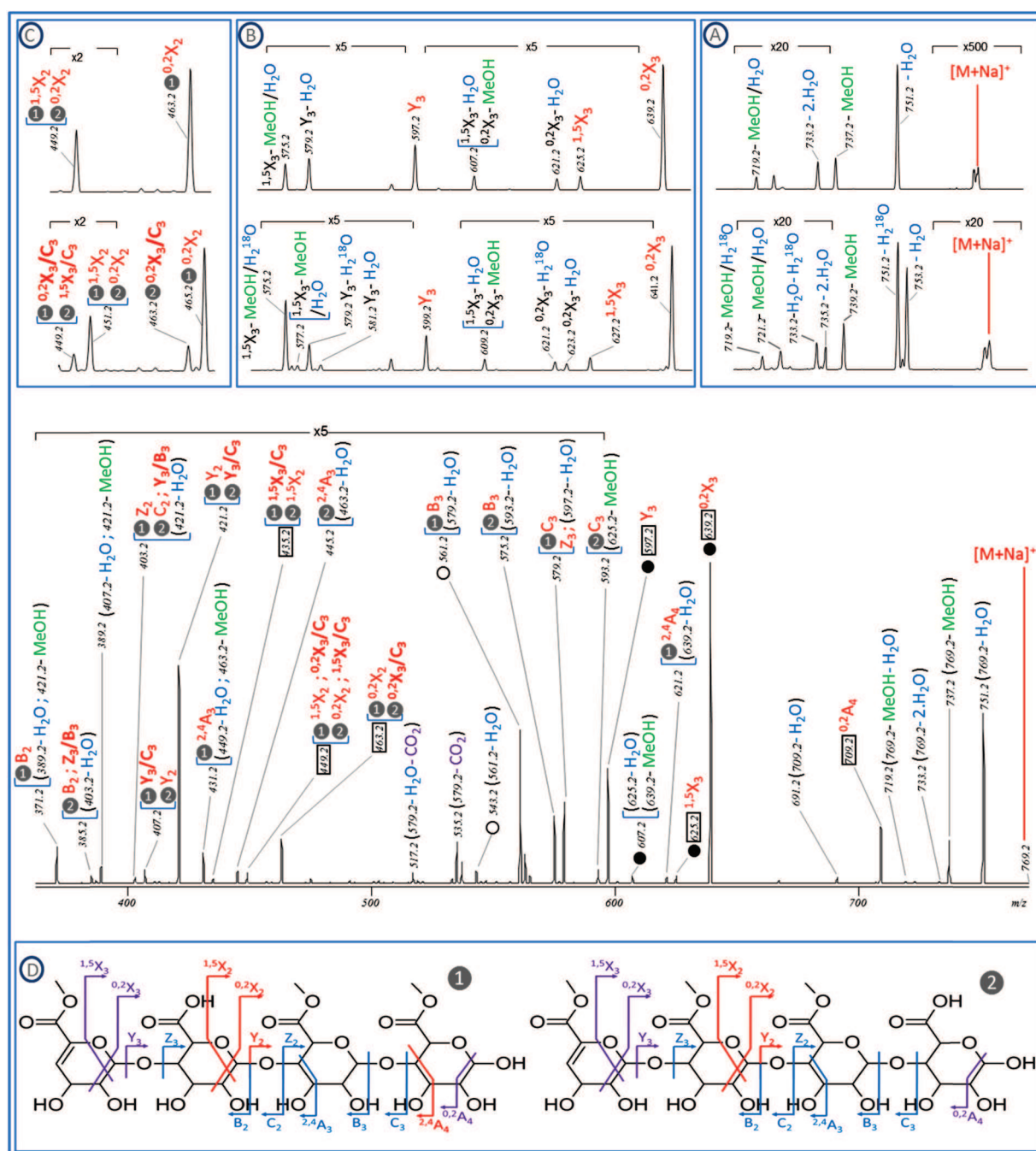


Fig. 3. LE-CAD fragmentation spectrum of a DP4DM3 oligogalacturonan, recorded in positive ion mode. The parent ion was isolated at m/z 769.2 as the $[M+Na]^+$ species. Two isomers were found within the same fraction. Structures (labeled 1 and 2) and annotated fragments are given in Inset D (in purple, fragments common to both isomers; in red: the discriminating fragments where the assignments did not shift upon ^{18}O -labeling, in blue: possible annotation of ambiguous fragments). Upper panels show the mass spectrum: masses marked with empty circles in the lower spectrum did not shift upon ^{18}O -labeling, whilst masses marked with full circles showed a complete shift upon ^{18}O -labeling. Ions that were unambiguously assigned to a single interpretation are in boxes framed. Neutral losses are highlighted (in blue for water losses, in green for methanol, and in purple for carbon dioxide). Double fragmentations are given in red and bold letters. Inset A: enlarged region of non-labeled (top) and ^{18}O -labeled (bottom) of the parent ion. Inset B: enlarged region of non-labeled (top) and ^{18}O -labeled (bottom) from unambiguously identified $1.5X_3$, $0.2X_3$ and Y_3 ions. Inset C: example, from the ^{18}O -labeling, showing the multiple interpretations for some ions as well as the occurrence of double fragmentation. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.2. Structural elucidation of RP-UHPLC separated oligogalacturonans

From the chromatographic peaks in Fig. 1, oligogalacturonan compositions were deduced from MALDI MS measurements performed on time-based collected fractions. In order to obtain a

comprehensive structure, a more thorough investigation of these fractions was attempted by LE-CAD MS/MS. Experiments were done in both negative and positive ESI modes. A labeling of the reducing end by heavy water ($H_2^{18}O$) was introduced as a means to confirm fragment identities, by comparing the LE-CAD spectra of the non-labeled and labeled compounds. However, in many cases

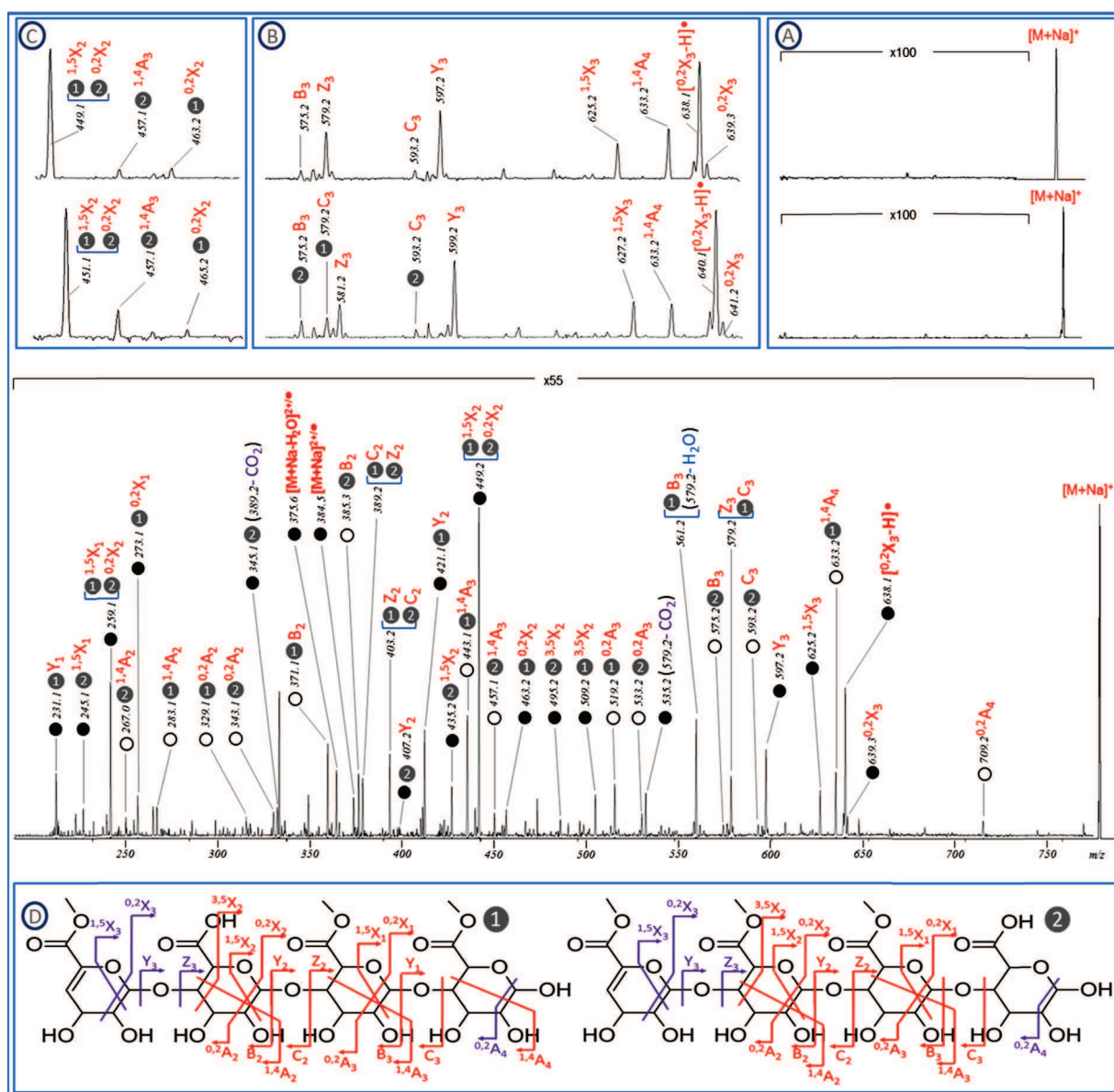


Fig. 4. VUV-PD fragmentation spectrum of a DP4DM3 oligogalacturan, recorded in positive ion mode. Parent ion was isolated at m/z 769.2 as $[M+Na]^+$ species. Structures of two isomers were completely resolved from this spectrum, including the definitive positioning of all methyl groups (see structures 1 and 2, inset D). Annotated fragments are displayed: in purple, fragments common to both isomers; in red: discriminating fragments where the assignments are unambiguous. Masses marked with empty circles in the lower spectrum did not shift upon ^{18}O -labeling, whilst masses marked with full circles showed a complete shift upon ^{18}O -labeling. Compared to Fig. 3 (LE-CAD in positive mode of the same species), no neutral losses are detected (see Insets A and B) in VUV-PD (note, however, a minor carbonate (in purple) and water (in blue) loss observed for three ions in the lower bottom spectrum); no double fragmentation could be proven either (inset C). In the insets: upper spectra are from the non-labeled compound while the bottom spectra were recorded for ^{18}O -labeled compound. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

uncertainty still remained about the possible isomeric structures obtained from the LE-CAD spectra in both positive and negative modes. For the negative ion mode, this is exemplified in Fig. 2, from a DP4DM3 oligogalacturan collected between 7.2 and 7.3 min in RP-UHPLC. The upper panel shows the LE-CAD spectrum of the non-labeled compound (parent ion isolated as the deprotonated $[M-H]^-$ species at m/z 745.2). Only a few fragment ions are detected, which were assigned as C and $^{0,2}A$ fragments and led us to propose a single partial structure in this fraction, as indicated in the inset. Only two methyl groups could be localized, the third being uncertain. However, when an ^{18}O labeling of the reducing end was performed (Fig. 2, lower panel), the interpretation of fragment

identities had to be revised. In fact, the presence of doublets at m/z 555.2/557.2 and m/z 365.2/367.2 indicated that the ions at 557.2 and 367.2 contain the reducing end (i.e. that they originate from the Z series). Thus, the m/z 555.2 and 365.2 fragments in the upper panel arise from a mixture of C and Z fragments. This result led us to consider that a second isomeric structure co-eluted within the same UHPLC fraction. This structure is again incompletely resolved where only two of the three methyl groups could be localized, as shown on the right-hand part of Fig. 2. Note that this mixture was impossible to assess from the non-labeled spectrum. Also, it is noteworthy that – in negative mode – all detected fragments contain the carboxylic acid group, as this group scavenges the negative charge.

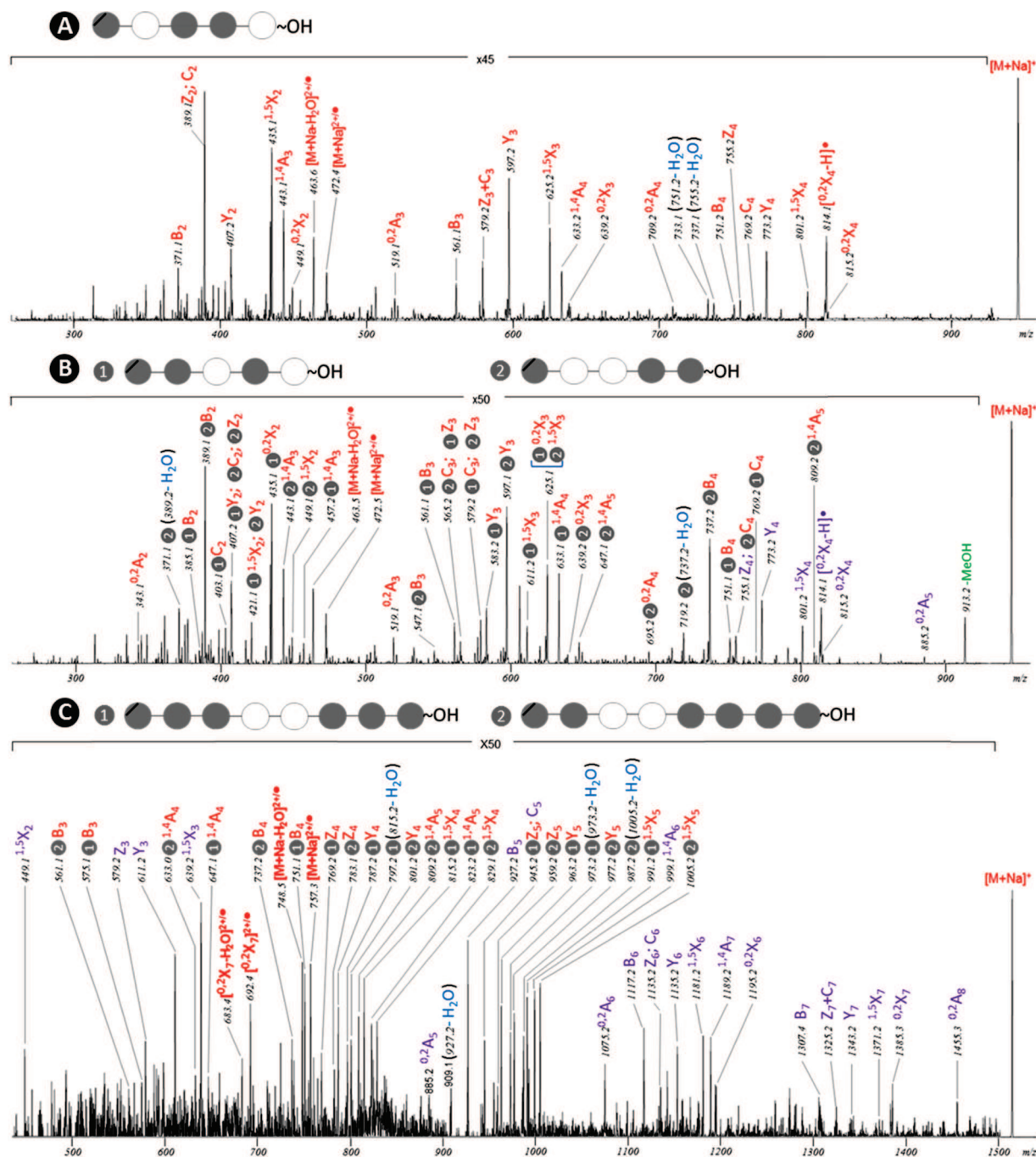


Fig. 5. Additional examples of VUV-PD fragmentation spectra recorded in positive ion mode for selected oligogalacturonans. Panels A and B demonstrate the possibility of this activation mode to discriminate efficiently between three isomers of DP5DM3. Note that in figure B, two of them are resolved as a mixture within the same IP-RP-UHPLC fraction. This is also exemplified in C, where two isomers were unambiguously characterized in the same fraction, but in this case for a higher degree of polymerization (DP8DM6). For the schematic representation, the full circles represent the methyl-esterified galacturonic acids, whereas the empty circles represent the free galacturonic acids.

The detected fragments can thus be strikingly different depending on the isomer (i.e. C ions for isomer 1, and Z ions for isomer 2). Thus, no “rule” can be drawn on the prevalence of one or the other series of ions, as this will depend on the isomer. In the positive ion mode, the picture is even more complicated. In Fig. 3 shows the fragments recorded in positive mode for the same DP4DM3 oligogalacturonan (parent ion isolated as the sodiated species at m/z 769.2). The signal recorded from the ^{18}O compound (parent isolated at m/z 771.2) is shown as the lower traces in the insets. In spite of a large number of fragments, only seven (the masses in

boxes on the bottom trace, Fig. 3) could be unambiguously assigned – mostly as Y and X ions – thanks to the asymmetry of the molecule resulting from the lyase activity which produces a double bond at the non-reducing end. Identity of X and Y ions was confirmed by the ^{18}O -labeled result as they undergo 2 Da shifts proving that they contain the reducing end. In contrast, assessment of other fragments was ambiguous for several reasons, some of which we highlight below. First, multiple and significant losses of water and methanol are observed on the parent ion as shown in inset A. Second, the doublets at m/z 751.2/753.2 and at m/z 733.2/735.2

Table 2
Complete characterization of IP-RP-UHPLC fractions by VUV-PD fragmentation MS.

Oligosaccharides	MW (theoretical, Da)	Putative isomers	Retention time	Validated structure
DP3DM3	570.1	1	2.99	
DP4DM4	760.2	1	4.47	
DP5DM5	950.2	1	4.64	
DP6DM6	1140.3	1	4.99	
DP7DM7	1330.3	1	5.15	
DP3DM2	556.1	3	6.60	
DP4DM3	746.2	4	6.99	
			7.20	
DP5DM4	936.2	5	6.93	
			7.62	
DP6DM5	1126.3	6	7.45	
			7.69	
DP7DM6	1316.3	7	7.69	
DP4DM2	732.2	6	12.50	
DP5DM3	922.2	10	12.24	
			12.76	
DP6DM4	1112.3	15	12.01	
			12.76	
			13.05	
DP7DM5	1302.3	21	11.94	
			12.69	
			12.95	
			13.10	
DP8DM6	1492.3	28	12.86	
DP6DM3	1098.2	20	16.06	
DP7DM4	1288.3	35	16.18	
DP8DM5	1478.3	56	15.93	
DP9DM6	1668.4	84	15.67	
			15.93	
				More than five isomers... not completely resolved

Completely resolved structures of oligogalacturonans eluted along the UHPLC gradient. As a schematic representation, full circles represent methyl-esterified galacturonic acids, empty circles represent free galacturonic acids.

(inset A, comparison of upper and lower traces) indicate that the ¹⁸O labeling can be lost upon fragmentation, thereby preventing assignment of a fragment as a reducing-end containing fragment, even though this fragment does not shift. Moreover, as shown in inset B, neutral losses not only occur on the parent ion but can also concern the fragments. This observation is exemplified by the water (H₂O and H₂¹⁸O) and methanol losses from the previously identified ^{1,5}X₃, ^{0,2}X₃ and Y₃ ions. Neutral losses might lead us to interpret one ion for another. Lastly, inset C clearly shows that multiple fragmentations occur. Indeed, the only possible interpretation of the ion at *m/z* 463.2 involves a double ^{0,2}X₃/C₃ fragmentation from an initial isomer, whereas the ion at *m/z* 449.2 comes from a

double ^{1,5}X₃/C₃ fragmentation from a second isomer. Occurrence of multiple fragmentations led us to reconsider the interpretation of three of the seven masses in framed ions, which were initially thought to be unambiguously determined. When analyzing larger molecules, the combinatorial increase of possible structures due to multiple fragmentations rapidly limits the use of CAD. From the mass spectrum in Fig. 3, two isomers could nevertheless be shown to exist, and both are consistent with the results in negative mode. It must be emphasized, however, that spectral interpretation required ¹⁸O labeling and that, even on this rather simple example, many of the fragments could lead to confusion in the interpretation and are useless in yielding a definitive structural determination of

isomeric oligogalacturonans. All this drove us to explore alternative fragmentation methods.

3.3. VUV photon activation of oligogalacturonans

Ion/photon interaction has attracted growing interest over the past decade as a fragmentation method in MS. Irradiation of positive ions has been extensively studied by Reilly and co-workers [27–29]. Electronic excited states of the cations, populated upon photoabsorption, may relax through dissociation channels (PD) producing informative fragment ions, complementary to those obtained under LE-CAD conditions. These experiments are generally performed using lasers and are restricted to the wavelengths delivered by these photon sources. However, it was reported that high energy photons lead to more efficient fragmentation [27]. From that standpoint, investigating shorter wavelengths is highly desirable. Synchrotron radiation is an attractive photon source owing to its high brilliance and tunability in the VUV. The DISCO beamline [35] at the SOLEIL synchrotron radiation facility offers an attractive set-up, in which an ion trap allows irradiation of isolated ions in the trap with tunable energetic photons in the VUV range. Thereby, it enables the selection of the most suitable photon energy for an efficient and informative fragmentation. In preliminary measurements, the IP-RP-UHPLC fractions, prepared as described previously, were probed in the 8–22 eV photon energy range in positive ion mode. Fragmentation efficiency was monitored by evaluating the signal-to-noise intensity for specific fragments: it was found that 18 eV photons produced the best fragmentation spectra (data not shown). This photon energy corresponds to a maximum in the photoabsorption cross-section of the ions [56]. Besides this, although doubly-charged ions are not always observed, this energy likely lies above the ionization threshold of the ions [57]. Therefore, two mechanisms may be suggested for the production of fragment ions. First, as proposed upon photon activation of anions in ref. [58], excitation of the resonant states of parent ions might happen even above the ionization threshold. Internal conversion (IC) and internal vibrational redistribution (IVR) then produce hot electronic ground states from which dissociation takes place. Second, for photon energies above the ionization threshold, the photoionization cross-section represents a large part of the photoabsorption cross-section [59]. Thus, absorption of a photon mainly produces an ion and a photoelectron. As described by Bari and co-workers for protonated peptides [56], above the ionization threshold, new fragmentation channels corresponding to a dissociative photoionization (DPI) process occur. Radical cations of wide internal energy distributions are produced, which rapidly dissociate with high fragmentation yields. Both IVR and DPI processes might take place in the current study and account for the observed fragments. For example, Fig. 4 shows the fragmentation spectrum obtained in positive mode for the previously described DP4DM3 oligogalacturonan. Non-labeled and ^{18}O -labeled compounds were fragmented in two distinct experiments. Parent ions at m/z 769.4 or m/z 771.4 (sodiated species of the non-labeled and ^{18}O -labeled compound, respectively) were isolated and irradiated for 3000 ms. Fragments enabled us to deduce the presence of the same two isomeric structures as previously found by LE-CAD (inset D in Fig. 4), though after a far easier spectral interpretation. This is due to several features that were observed on the photon-activation mass spectra (note that all these features were first established from a thorough study of well-known compounds, without any isomeric ambiguities; *data not shown*). First, in striking contrast to CAD, negligible losses of water and methanol were observed. This observation is ascertained both on the parent ion and the fragments (see inset A and B, respectively). Second, no evidence of multiple fragmentations was found, considerably limiting the number of possible assignments for any given ion (see inset C). The abundance of the fragment ions produced

upon photon-activation is more uniform over the spectrum than in LE-CAD, whether these fragments correspond to cross-ring cleavages (A and X) or glycosidic bond cleavages (Y/B, Z/C). Thus, the method does not appear to yield preferential cleavage sites. As a general rule, more cross-ring fragments were detected under photon irradiation than under low energy CAD conditions. For instance, $^{3,5}\text{X}_n$ and $^{1,5}\text{A}_n$ ions of both isomers were detected in VUV photon activation. An exceptional feature regarding spectral interpretation is that systematic series of $^{0,2}\text{X}/^{1,5}\text{X/Y}$ fragments were observed. This easily recognizable motif helped decipher the spectra and led to a straightforward and complete sequencing of the oligogalacturonans. Furthermore, it lowered the risk of incorrect assignment of fragment identities. Finally, it is worth noting that the three bold-marked ions in Fig. 4 correspond to odd-electron species $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$, $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, and $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}]^{+}$. Although these ions do not bring any additional structural information, they prove the occurrence of a DPI process. Three spectra of oligogalacturonans that were structurally resolved by photon activation are given in Fig. 5. They all further exemplify the aforementioned features. Therefore, to sum up, compared to LE-CAD fragmentation, dissociative photoionization tandem mass spectra were found to be much less complex whilst providing more valuable structural information.

Complete structural characterization of the oligogalacturonans in all IP-RP-UHPLC collected fractions was possible, including fractions exhibiting co-eluted isomeric structures. Comprehensive characterization of these UHPLC fractions is summarized in Table 2. To the best of our knowledge, this is by far the most complete description of the molecules released by the enzymatic treatment of a highly methylated homogalacturonan. Our exhaustive results therefore enabled us to draw some hypotheses regarding the cleavage specificity of the pectin lyase used for degradation. For instance, from Table 2, it is striking that all the structures that could be resolved bear a methyl group at their non-reducing end, suggesting a strong specificity of the enzyme to cleave at these positions. However, this requires confirmation. In fact, it cannot be excluded that the analytical process (IP-RP-UHPLC and/or VUV tandem MS) induces a bias in the isomers that are observed and structurally determined. Ongoing work in our lab aims at enlarging the scope of this study to other structures in order to assess how generic these fragmentation behaviors are.

4. Conclusion

To conclude, a complex mixture of more than 35 oligogalacturonans with various degrees of polymerization and methylation was investigated using both LE-CAD and photon activation in the VUV range. The oligogalacturonans were produced by enzymatic digestion of a large, highly methylated, homogalacturonan from citrus fruit. The many isomers present exhibited structural differences arising from distinct positioning of the methyl groups along the galacturonic acid backbone. Albeit subtle, these differences have a key influence on the properties and further usage of these molecules. The first step was the separation of the oligogalacturonans by reverse-phase chromatography with addition of an Ion Pairing reagent. Structures of oligogalacturonans collected along the chromatographic run were then tentatively resolved by LE-CAD. However, in spite of the combined use of positive and negative ion modes and reducing-end labeling, ambiguities remained regarding fragment identities. This prevented us from determining a definitive structure for most of the molecules investigated.

A strikingly different situation was found when the same molecules were subjected to 18 eV (68.9 nm) photon activation, based on an original experimental setup in which a linear ion trap spectrometer was coupled to a synchrotron radiation beamline.

Photons at 18 eV were found to provide the most abundant and diverse fragment ions, upon dissociative photoionization (DPI) of the cationized parent ion. However, internal conversion (IC) and internal vibrational redistribution (IVR) or other relaxation processes leading to a hot ground state of the parent ion cannot be ruled out. Fragments were more evenly distributed over the mass range than in LE-CAD, and unique fragment distributions were observed, in contrast to CAD, was the absence of both neutral losses and double cleavages, which therefore led to a much easier interpretation of the tandem mass spectra. A large amount of structural information could be deduced from the VUV photon activation spectra, which resulted in the complete and definitive structural characterization of all the oligogalacturonans investigated, including many isomers.

This work was performed on a non-conventional instrument involving a synchrotron radiation as photon beam. However, we can anticipate that similar findings would be obtained on more conventional platforms for photon activation tandem mass spectrometry, as long as the photon beam is in the VUV range.

Finally, to our knowledge, this study brings the most complete description of the molecular structures released by the enzymatic degradation of highly methylated pectins. We proved the presence of some striking motifs in all structurally resolved isomers, which enable new insights into the enzyme specificity.

Acknowledgements

Experiments were performed on the DISCO beamline at SOLEIL Synchrotron, France, (proposal number 20110995). We are grateful to the SOLEIL staff for smoothly running the facility.

This work was partially supported by the Agence Nationale de la Recherche Scientifique, France, under project number ANR-08-BLAN-0065.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaca.2013.11.018>.

References

- [1] K.A. Karlsson, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 309–350, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.58.1.309>.
- [2] A. Varki, *Glycobiology* 3 (1993) 97–130, <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/3.2.97>.
- [3] M.C. Ralet, J.F. Thibault, *Biomacromolecules* 3 (2002) 917–925, <http://dx.doi.org/10.1021/bm020055o>.
- [4] W.G.T. Willats, C. Orfila, G. Limberg, H.C. Buchholt, G. van Alebeek, A.G.J. Voragen, S.E. Marcus, T. Christensen, J.D. Mikkelsen, B.S. Murray, J.P. Knox, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 19404–19413, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M011242200>.
- [5] C.D. May, *Carbohydr. Polym.* 12 (1990) 79–99, [http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90105-2](http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(90)90105-2).
- [6] B. Domon, C.E. Costello, *Glycoconjug. J.* 5 (1988) 397–409, <http://dx.doi.org/10.1007/bf01049915>.
- [7] D.J. Harvey, T.J.P. Naven, B. Kuster, R.H. Bateman, M.R. Green, G. Critchley, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 1556–1561, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1290091517>.
- [8] D.J. Harvey, R.H. Bateman, M.R.J. Green, *Mass Spectrom.* 32 (1997) 167–187, doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199702)32:2<167::AID-JMS472>3.0.CO;2-Q.
- [9] Y. Mechref, M.V. Novotny, C. Krishnan, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4895–4903, <http://dx.doi.org/10.1021/ac0341968>.
- [10] U. Lewandrowski, A. Resemann, A. Sickmann, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3274–3283, <http://dx.doi.org/10.1021/ac048399n>.
- [11] R. Korner, G. Limberg, T. Christensen, J.D. Mikkelsen, P. Roepstorff, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1421–1427, <http://dx.doi.org/10.1021/ac981240o>.
- [12] B. Quemener, C. Desire, M. Lahaye, L. Debrauwer, L. Negroni, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 45–60, <http://dx.doi.org/10.1255/ejms.526>.
- [13] B.A. Budnik, K.F. Haselmann, Y.N. Elkin, V.I. Gorbach, R.A. Zubarev, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5994–6001, <http://dx.doi.org/10.1021/ac034477f>.
- [14] J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 9528–9533, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0402700101>.
- [15] R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3265–3266, <http://dx.doi.org/10.1021/ja973478k>.
- [16] C. Zhao, B. Xie, S.Y. Chan, C.E. Costello, P.B. O'Connor, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 138–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2007.10.022>.
- [17] L. Han, C. Costello, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 997–1013, <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-011-0117-9>.
- [18] B.A. Budnik, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 299–302, [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2614\(01\)00501-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2614(01)00501-2).
- [19] J.J. Wolff, I.J. Amster, L.L. Chi, R.J. Linhardt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 234–244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2006.09.020>.
- [20] J.J. Wolff, T.N. Laremore, H. Aslam, R.J. Linhardt, I.J. Amster, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1449–1458, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2008.06.024>.
- [21] J.J. Wolff, F.E. Leach, T.N. Laremore, D.A. Kaplan, M.L. Easterling, R.J. Linhardt, I.J. Amster, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3460–3466, <http://dx.doi.org/10.1021/ac100554a>.
- [22] J.J. Wolff, L.L. Chi, R.J. Linhardt, I.J. Amster, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2015–2022, <http://dx.doi.org/10.1021/ac061636x>.
- [23] J.T. Adamson, K. Hakansson, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 2162–2172, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2007.09.007>.
- [24] R.R. Seipert, E.D. Dodds, B.H. Clowers, S.M. Beecroft, J.B. German, C.B. Lebrilla, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3684–3692, <http://dx.doi.org/10.1021/ac800067y>.
- [25] R.R. Seipert, E.D. Dodds, C.B. Lebrilla, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 493–501, <http://dx.doi.org/10.1021/pr8007072>.
- [26] B.J. Ko, J.S. Brodbelt, *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 359–366, <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1901>.
- [27] J.P. Reilly, *Mass Spectrom. Rev.* 28 (2009) 425–447, <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20214>.
- [28] A. Devakumar, M.S. Thompson, J.P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2313–2320, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2058>.
- [29] A. Devakumar, Y. Mechref, P. Kang, M.V. Novotny, J.P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1452–1460, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2981>.
- [30] B.J. Ko, J.S. Brodbelt, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8192–8200, <http://dx.doi.org/10.1021/ac201751>.
- [31] A. Racaud, R. Antoine, L. Joly, N. Mesplet, P. Dugourd, J. Lemoine, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1645–1651, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.022>.
- [32] A. Racaud, A.R. Allouche, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, *Theochem. J. Mol. Struct.* 960 (2010) 51–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theochem.2010.08.024>.
- [33] A.R. Milosavljevic, C. Nicolas, J.F. Gil, F. Canon, M. Refregiers, L. Nahon, A. Giuliani, *J. Synchrotron Radiat.* 19 (2012) 174–178, <http://dx.doi.org/10.1107/S0909049512001057>.
- [34] C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, L. Nahon, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23 (2012) 274–281, <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-011-0285-7>.
- [35] A. Giuliani, F. Jamme, V. Rouam, F. Wien, J.L. Giorgetta, B. Lagarde, O. Chubar, S. Bac, I. Yao, S. Rey, C. Herbeaux, J.L. Marlat, D. Zerbib, F. Polack, M. Refregiers, *J. Synchrotron Radiat.* 16 (2009) 835–841, <http://dx.doi.org/10.1107/S0909049509034049>.
- [36] G.J.W.M. van Alebeek, O. Zabolotina, G. Beldman, H.A. Schols, A.G. Voragen, *J. Carbohydr. Polym.* 43 (2000) 39–46, [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00207-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00207-6).
- [37] M.C. Ralet, M.A.K. Williams, A. Tanhatan-Nasseri, D. Ropartz, B. Quémener, E. Bonnin, *Biomacromolecules* 13 (2012) 1615–1624, <http://dx.doi.org/10.1021/bm300329r>.
- [38] D. Ropartz, P.E. Bodet, C. Przybylski, F. Gonnet, R. Daniel, M. Fer, W. Helbert, D. Bertrand, H. Rogniaux, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2059–2070, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.5060>.
- [39] A. Giuliani, I. Yao, B. Lagarde, S. Rey, J.P. Duval, P. Rommeluere, F. Jamme, V. Rouam, F. Wein, C. De Oliveira, M. Ros, A. Lestrade, K. Desjardins, J.L. Giorgetta, O. Laprevote, C. Herbeaux, M. Refregiers, *J. Synchrotron Radiat.* 18 (2011) 546–549, <http://dx.doi.org/10.1107/S0909049511016517>.
- [40] T.H.J. Niedermeier, M. Strohal, *PLoS ONE* 7 (2012) 9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044913>.
- [41] M. Brokl, O. Hernandez-Hernandez, A.C. Soria, M.L. Sanz, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7697–7703, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.015>.
- [42] C.E. Doneanu, W.B. Chen, J.C. Gebler, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3485–3499, <http://dx.doi.org/10.1021/ac802770r>.
- [43] M. Melmer, T. Stangler, A. Premstaller, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 1218 (2010) 118–123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.122>.
- [44] A.M. Brustkern, L.F. Buhse, M. Nasr, A. Al-Hakim, D.A. Keire, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9865–9870, <http://dx.doi.org/10.1021/ac102301j>.
- [45] C.J. Jones, N. Membreno, C.K. Larive, *J. Chromatogr. A* 1217 (2009) 479–488, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.064>.
- [46] A.K. Korir, J.F.K. Lirntiaco, S.M. Gutierrez, C.K. Larive, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1297–1306, <http://dx.doi.org/10.1021/ac702235u>.
- [47] C. Thanawiroon, R. Linhardt, *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 215–223, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00779-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00779-9).
- [48] D. Ji, M. Roman, J. Zhou, J. Hildreth, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 659–669.
- [49] K. Solakyildirim, Z. Zhang, R.J. Linhardt, *Anal. Biochem.* 397 (2009) 24–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.031>.
- [50] A. Antonopoulos, P. Favetta, W. Helbert, M. Lafosse, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 1301–1309, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2004.03.002>.
- [51] Y. Gao, H.M. Chen, L.L. Xu, D.Y. Chen, X.J. Yan, *Chin. J. Anal. Chem.* 37 (2009) 1590–1595, [http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60143-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60143-7).
- [52] C. Thanawiroon, K.G. Rice, T. Toida, R.J. Linhardt, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 2608–2615, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304772200>.

- [53] B. Kuberan, M. Lech, L. Zhang, Z.L. Wu, D.L. Beeler, R.D. Rosenberg, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 8707–8718, <http://dx.doi.org/10.1021/ja0178867>.
- [54] L.A. Gennaro, D.J. Harvey, P. Vouros, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1528–1534, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1079>.
- [55] B. Yang, A. Weyers, J.Y. Baik, E. Sterner, S. Sharfstein, S.A. Mousa, F. Zhang, J.S. Dordick, R.J. Linhardt, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 59–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.003>.
- [56] S. Bari, O. Gonzalez-Magana, G. Reitsma, J. Werner, S. Schippers, R. Hoekstra, T. Schlatholter, *J. Chem. Phys.* 134 (2011) 9, <http://dx.doi.org/10.1063/1.3515301>.
- [57] A. Giuliani, A.R. Milosavljević, K. Hinsien, F. Canon, C. Nicolas, M. Réfrégiers, L. Nahon, *Angew. Chem.* 51 (2012) 9552–9556, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201204435>.
- [58] R. Antoine, P. Dugourd, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 16494–16509, <http://dx.doi.org/10.1039/C1CP21531K>.
- [59] J. Berkowitz, *Photoabsorption, Photoionization, and Photoelectron Spectroscopy*, Academic Press, Inc., New York, NY, 1979.

5. Conclusion

Plus de 35 structures d'oligogalacturonanes avec différents degrés de polymérisation et de méthylation ont été totalement élucidées après photo-activation à 18 eV, incluant de nombreux isomères (et ce uniquement à partir des données obtenues en mode d'ionisation positif). Pour la plupart, elles n'avaient pas pu être caractérisées par IE-CAD, en dépit de l'utilisation de la fragmentation des espèces en mode positif et négatif. Les caractéristiques les plus remarquables de la méthode d'activation par des photons dans le VUV est qu'elle permet d'obtenir de nombreux ions fragments, avec des séries systématiques (X, Y, Z) et (A et B) et une grande proportion de fragments intracycliques. A l'inverse du processus par IE-CAD, les pertes neutres et les doubles fragmentations (qui compliquaient l'interprétation des spectres MS/MS) sont absentes. L'occurrence systématique de séries de fragments corrélés facilite considérablement la lecture et l'interprétation des spectres, rendant possible un séquençage direct et simple des oligosaccharides.

Contrairement à ceux obtenus par des photons de plus basse énergie (laser à 220 nm), mais également à ceux obtenus en IE-CAD, les fragments sont uniformément répartis sur toute la gamme de m/z du spectre MS/MS, et des ions radicalaires ($[M+Na]^{+/\bullet}$) sont observés, provenant d'un détachement d'électron sur l'ion parent. Ces observations indiquent qu'à cette énergie de 18 eV, on se situe au-delà du potentiel d'ionisation de la molécule et que l'absorption des photons se réalise sur l'ensemble de la structure. Le mécanisme mis en œuvre correspond donc à une photo-ionisation dissociative (DPI). Toutefois, d'autres mécanismes comme la conversion interne (IC) et la redistribution interne de vibration (IVR), peuvent intervenir également dans le processus de relaxation.

L'étude structurale que nous avons conduite est la plus complète à ce jour sur des produits d'hydrolyse d'homogalacturonanes méthylés par une lyase. C'est aussi la première étude en VUV-PD sur des oligosaccharides naturels, avec un tel degré de complexité structurale dans les échantillons. Au-delà de l'intérêt analytique de l'étude, son exhaustivité a permis de mettre en évidence certaines spécificités dans le mode d'action de l'enzyme : par exemple, nous avons montré que l'acide galacturonique en extrémité non réductrice était systématiquement méthylé, suggérant l'importance de cette méthylation pour la fixation au site actif de la lyase.

Spécification de l'activité d'une nouvelle enzyme de dégradation d'un polysaccharide marin par la caractérisation structurale fine de ses produits de dégradation

1. Contexte

Ce travail a été réalisé sur la ligne DISCO du synchrotron Soleil dans le cadre du proposal 20120759 : "Unraveling isomeric structures of polysaccharides by VUVPD and VUVEPD experiments: towards an unambiguous and complete sequencing of isomers". Il a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Mirjam Czjzek du Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins de l'UMR 8227, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, Roscoff.

Les parois cellulaires des macro-algues rouges représentent une source importante de polysaccharides hautement sulfatés (les agarans et les carraghénanes)⁽¹⁵⁸⁾. Ces polysaccharides sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques et sont aussi un vaste réservoir de molécules d'intérêt pour plusieurs industries⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾. Cependant, le manque de connaissances structurales complètes sur ces polysaccharides empêche la pleine compréhension de leur rôle biologique et la production de structures bien contrôlées à partir de ces biopolymères, limitant leur exploitation dans des industries à forte valeur ajoutée (par exemple, les cosmétiques ou l'industrie pharmaceutique).

2. Objectif du travail

Les porphyranes sont une classe de polysaccharides hybrides hautement sulfatés qui font partie des agaranes. Ils sont constitués d'un squelette linéaire de résidus de galactose liés par une alternance de liaisons glycosidiques β -1,4 et α -1,3. Ils présentent de nombreuses modifications chimiques (sulfate-ester, méthylether ou acide pyruvique)⁽¹⁶³⁾ distribuées le long du squelette, qui influencent les fonctions biologiques et d'usage de ces polymères. L'élucidation structurale des porphyranes est à ce jour incomplète, et elle continue à présenter un défi pour les sciences analytiques. L'utilisation de la spectrométrie de masse MS/MS pour caractériser ce type de structures a été décrite dans quelques travaux. La grande difficulté vient de la labilité des modifications O-Sulfates : le groupe de Costello a ainsi rapporté que ces modifications pouvaient être perdues lors de la fragmentation IE-CAD⁽¹⁶⁴⁾, empêchant ainsi toute tentative de localisation. De plus, Kenny *et al.*⁽¹⁶⁵⁾ ont démontré que le groupement sulfate pouvait migrer sur la molécule dans les fragments produits en IE-CID en mode d'ionisation négatif dans une trappe d'ions, ce qui peut conduire à des interprétations erronées quant à la structure des molécules analysées.

Des enzymes de dégradation spécifiques de type β -agarases existent pour dégrader les porphyranes, mais leur activité se limite aux parties non sulfatées. La détermination de la structure des parties hautement modifiées des porphyranes a été longtemps limitée par l'absence d'enzymes

spécifiques capables de dégrader ces parties en blocs représentatifs. La découverte d'une β -porphyranase A a permis à Correc *et al.* ⁽¹⁶⁶⁾, en la combinant avec une β -agarase "classique", de décrire la structure d'oligo-porphyrane sulfatés de la macro-algue *Porphyra umbilicalis* en utilisant plusieurs étapes chromatographiques (SEC et HPAEC) et plusieurs séquences de RMN (¹H, COSY, HMQC, HMBC). L'analyse a montré que les oligosaccharides formés sont de type porphyran pur (α -(1→4)[α -L-galacturonopyranose-6-Sulfate-(1→3)- β -D-galactopyranose], noté (L6S-G)) et de type hybride avec des motifs porphyran et des motifs Agar (α -(1→4)[3,6-anhydro- α -L-galactopyranose-(1→3)- β -D-galactopyranose], noté (LA-G)) et peuvent porter des méthylations. La spécificité de clivage de l'enzyme entre deux motifs (L6S-G) a également été démontrée. Cependant, cette étude n'a pas permis de déterminer la structure précise des parties hybrides rencontrées pour les DP6 et 8. De plus, la localisation précise des groupes méthyles et sulfates le long du squelette n'a pas été possible. La polydispersité et la polymolécularité présumée des échantillons ont été les principales causes évoquées par les auteurs pour expliquer les limites de l'étude par RMN pour parvenir à une description structurale complète des oligo-porphyrane de degré de polymérisation supérieur à 4.

L'objectif de notre travail était donc, par la caractérisation structurale des oligosaccharides produit par dégradation enzymatique des porphyrane de *Porphyra umbilica*, d'apporter des connaissances structurales nouvelles sur le polysaccharide mais aussi de déterminer plus précisément les spécificités et le mode d'action de la β -porphyranase A.

3. Résumé du travail

Dans le travail décrit dans cette partie, nous avons utilisé l'activation d'ions par des photons VUV pour réexaminer les échantillons d'oligo-porphyrane étudiés par Correc *et al.* ⁽¹⁶⁶⁾. Nous avons utilisé la photo-ionisation dissociative décrite dans le paragraphe précédent produisant une fragmentation en mode d'ionisation positif, mais également le photo-détachement d'électron (EPD) en mode négatif sur des espèces multichargées. En effet, sur ces échantillons sulfatés, il est possible d'observer aisément des espèces multichargées et donc d'envisager cette approche.

Une première étape a été d'analyser les fractions d'exclusion stérique produites comme pour l'étude de Correc *et al.* ⁽¹⁶⁶⁾ par IP-RP-UHPLC-MS, afin de caractériser le degré de complexité des différents échantillons. Les résultats observés sont en accord avec les résultats de Correc *et al.* ⁽¹⁶⁶⁾ pour les DP 2 et 4. Les DP supérieurs montrent en revanche un niveau de complexité plus important que ce qui a été décrit par HPAEC et par RMN.

Compte-tenu des capacités que nous avons observées sur le dispositif DISCO en termes de résolution structurale lors des expérimentations sur les homogalacturonanes (possibilité d'élucider des isomères même en mélange dans une même fraction chromatographique), nous avons choisi d'analyser les fractions SEC d'oligo-porphyrans sans autre séparation ; ceci afin d'éviter de perdre des espèces minoritaires et aussi pour limiter le nombre d'étapes, compte-tenu de la fragilité des molécules et notamment, des sulfatations.

4. Publication

High-energy photon activation tandem mass spectrometry provides unprecedented insights into the structure of highly sulfated oligosaccharides extracted from macroalgal cell walls. Ropartz, D.; Giuliani, A.; Hervé, C.; Geairon, A.; Jam, M.; Czjzek, M.; Rogniaux, H. Analytical Chemistry, acceptée le 13/12/2014. (Publication Date (Web): December 13, 2014)

Afin de limiter le nombre de pages et faciliter la lecture, les données supplémentaires fournies avec cette publication sont placées en Annexe 4.

High-Energy Photon Activation Tandem Mass Spectrometry Provides Unprecedented Insights into the Structure of Highly Sulfated Oligosaccharides Extracted from Macroalgal Cell Walls

David Ropartz,^{†,⊥} Alexandre Giuliani,^{‡,§} Cécile Hervé,[#] Audrey Geairon,[†] Murielle Jam,[#] Mirjam Czjzek,[#] and Hélène Rogniaux^{*,†,⊥}

[†]INRA, UR1268 Biopolymers Interactions Assemblies F-44316 NANTES, France

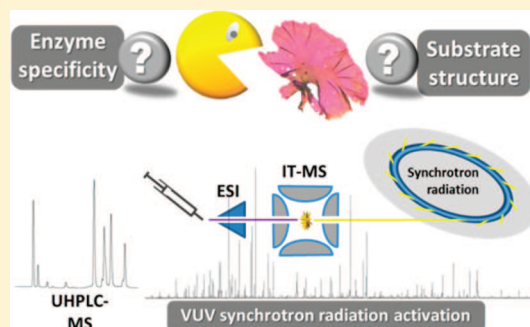
[‡]Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

[§]UAR 1008 CEPIA, INRA, F-44316 NANTES, France

[#]Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, CNRS, Integrative Biology of Marine Models, UMR 8227, Station Biologique, Place George Teissier, F29688 Roscoff Cedex, France

Supporting Information

ABSTRACT: Extreme ultraviolet photon activation tandem mass spectrometry (MS) at 69 nm (18 eV) was used to characterize mixtures of oligo-porphyrans, a class of highly sulfated oligosaccharides. Porphyrans, hybrid polymers whose structures are far from known, continue to provide a challenge for analytical method development. Activation by 18 eV photons led to a rich fragmentation of the oligo-porphyrans, with many cross-ring and glycosidic cleavages. In contrast to multistage MSn strategies such as activated electron photodetachment dissociation, a single step of irradiation by energetic UV of multiply charged anions led to a complete fragmentation of the oligo-porphyrans. In both ionization modes, the sulfate groups were retained on the backbone, which allowed the pattern of these modifications along the porphyrin backbone to be described in unprecedented detail. Many structures released by the enzymatic degradation of the porphyrin were completely resolved, including isomers. This work extends the existing knowledge of the structure of porphyrans. In addition, it provides a new demonstration of the potential of activation by high-energy photons for the structural analysis of oligosaccharides, even in unseparated mixtures, with a particular focus on sulfated compounds.



The cell walls of red macroalgae represent an important source of polysaccharides, most of which are sulfated galactans¹ called agarans and carrageenans. These polysaccharides are involved in many biological functions and also represent a vast reservoir of molecules of potentially high functional interest for several industries.^{2–4} However, many of these structures remain incompletely resolved. The lack of structural knowledge prevents the full understanding of their biological role and the production of well-controlled structures from these biopolymers, limiting their full exploitation in industries with high added value (e.g., cosmetics or pharmaceutical industries).

In particular, the exact structure of porphyrans, which are hybrid and highly sulfated agarans, is far from known. Porphyrans consist of a linear backbone of galactose residues linked by alternating β -1,4 and α -1,3 glycosidic bonds and exhibit numerous chemical modifications randomly distributed along the backbone, such as ester sulfate, methyl, or pyruvic acid acetal groups.^{5,6} Specific degrading enzymes are necessary tools for the characterization of the structures of polysaccharides. β -Agarases have been reported to study the nonsulfated part of agaran structures,⁵ but the structural elucidation of

porphyrans has long been hindered by the absence of specific enzymes able to degrade hybrid and highly modified parts of the polymers into representative building blocks.

However, by combining a β -agarase B⁷ with a newly discovered β -porphyranase A, Correc et al.⁸ recently reported the most complete structural description to date of a porphyrin from the red algae *Porphyra umbilicalis*. This porphyrin is composed of repeated, standard, sulfated units (α -L-Galp-6-sulfate (1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp (L6S-G)) together with agarose motifs (4-linked 3,6-anhydro- α -L-Galp(1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp (LA-G)). Several chromatographic steps (SEC and HPAEC-PAD) and NMR spectroscopy sequences (1H, COSY, HMQC, HMBC) were used, resulting in the complete characterization of the sulfated L6S-G oligomers of polymerization degrees 2 and 4 (i.e., DP2 and DP4). DP6 and DP8 were partially resolved by comparison with the observed NMR signals of DP4 and agarose polymer and were identified as hybrid (L6S-G)/

Received: September 25, 2014

Accepted: December 13, 2014



(LA-G) oligosaccharides, carrying a conserved (L6S-G) pattern at both extremities. This study has also unequivocally established that β -porphyranase A selectively cleaves the β -1,4 bond between two L6S-G moieties. However, the comprehensive determination of all structures released by the enzymatic degradation could not be achieved, especially for those of high DPs. Additionally, the localization of the agar moieties as well as the fine localization of the sulfate and methyl groups along the backbone was not completed.

The polydispersity and the presumed heterogeneity of the samples were the main causes of Correc et al.'s⁸ failure to achieve a complete structural description of larger porphyrans by NMR. Indeed, NMR requires high-purity samples. Tandem mass spectrometry (MS) is an attractive alternative approach due to its outstanding sensitivity, high information content, and relative tolerance to sample complexity. The most popular method for fragmentation in tandem MS is low-energy collision activated dissociation (LE-CAD), a slow thermal excitation of ions produced by collision with gaseous molecules. However, LE-CAD has a number of limitations for resolving the structures of oligosaccharides.^{9,10} First, it mainly produces the breakage of glycosidic bonds, which provides insufficient information to achieve complete structures. Second, and importantly, labile modifications are readily lost during LE-CAD, which prevents the localization of these modifications. The latter is especially limiting for the study of sulfated oligosaccharides.

Alternative activation methods in tandem MS have emerged in the past decade, including ion activation by photons. These methods have proved useful for the characterization of oligosaccharides by yielding rich fragmentation spectra, including many structurally valuable cross-ring cleavages.^{11–19} Several wavelengths have been investigated in these photo-dissociation (PD) studies. Above 200 nm, the photon activation requires the derivatization of the oligosaccharide with an appropriate chromophore (355 nm¹⁴), or the presence of a C=C double bond (220–240 nm¹⁵). Shorter wavelengths ($\lambda < 200$ nm) achievable with excimer lasers (193 nm,¹⁷ 157 nm^{11–13}), offer compelling strategies, since, owing to the optical absorption properties of carbohydrates, photon activation can be achieved without derivatization. Reilly and co-workers introduced a permethylation of the oligosaccharides as a way to improve the rate of fragmentation at 157 nm.^{12,13} In the conclusions of their pioneer studies,¹¹ they suggested that the efficiency of fragmentation could likely be improved if some more powerful light sources could be used or a better overlap between the photon beam and the ion beam. Recently, our group employed extreme energy photons produced in the vacuum UV range (VUV) by a synchrotron radiation to activate oligosaccharides in tandem MS.¹⁹ Although photon fluxes of synchrotron beamlines are lower than that produced from laser sources, higher photon energy leads to an increase in the photon absorption cross sections. Therefore, it can be expected that higher cross sections in the VUV might compensate for the lower photon fluxes from the synchrotron and lead to an efficient fragmentation. Consistent with this, Ropartz et al.¹⁹ reported an extensive fragmentation of acidic oligosaccharides, without derivatization, including the production of a large number of intracyclic fragments. This study permitted the definitive resolution of more than 30 unknown structures in a complex mixture resulting from the enzymatic digestion of pectin. Similar to what was observed at 193 nm on sialylated oligosaccharides,¹⁶ the mechanism maintained the labile

functions, thereby enabling differentiation of many isomers differing in their methyl-ester positioning.

In the present work, VUV photon activation tandem MS was used to reinvestigate the porphyran-derived samples studied by Correc et al. in depth.⁸ Similar to our previous work,¹⁹ fragmentation occurred in the positive mode following a dissociative photoionization (DPI) process. Electron-photo-detachment (EPD) was produced from negatively charged oligo-porphyrans, and an extensive fragmentation was obtained in a single step of activation. The fragmentation in positive and negative ionization modes was found to yield complementary structural information. More than 15 structures of oligo-porphyrans were completely resolved, ranging from DP2 to DP8. Importantly, agar moieties as well as sulfate and methyl groups were unequivocally positioned along the porphyran backbone. This deep structural study was preceded by a fingerprinting of the samples through UHPLC-MS, which permitted the assessment of their complexity and polydispersity.

EXPERIMENTAL SECTION

Porphyran Extraction and Enzymatic Degradation.

Porphyra umbilicalis was collected on-site in the bay of Morlaix, France, in February 2011. It is important to note that, during the winter period, some of the taxonomically very close species *Porphyra linearis*, which is not easily distinguishable, might have been collected as well. The extraction of porphyran and subsequent production of porphyro-oligosaccharides was undertaken as previously described in Correc et al.,⁸ except that no pretreatment by a β -agarases was applied.

Chemicals and Oligosaccharides. Heptylamine 99% (HA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), and H₂¹⁸O were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Saint Quentin Fallavier, France). Formic acid 98% was purchased from Fluka. HPLC-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were purchased from Carlo-Erba. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore).

¹⁸O Labeling. The reducing end of oligosaccharides was ¹⁸O-labeled by resuspending samples dried in a speed-vacuum concentrator system (at room temperature) with 50 μ L of H₂¹⁸O. Incubation was performed for 1 week at room temperature in the dark. For the ESI-MS experiments, ¹⁸O-labeled sample solutions were diluted 4-fold in a solution of H₂¹⁶O/MeOH (1:2) immediately before analysis.

Ion pairing-reversed phase chromatography separation (IP-RP-UHPLC). Chromatographic separation was performed on an ultraperformance liquid chromatographic system (UHPLC, Acquity H-Class Waters, Manchester, UK) mounted with a BEH C18 column (100 mm $\times$ 2.1 mm, packed with 1.7- μ m-porosity particles) (Waters, Manchester, UK). The flow rate was 0.44 mL/min, and the column was heated at 40 °C. A ternary gradient was performed (A: pure water, B: pure methanol and C: 20 mM heptylammonium dissolved in water; pH adjusted to 6 by formic acid), increasing from 2% to 25% of solvent B in 10 min, increasing to 73% at 23.5 min, and maintaining at 73% for 4 min. The percentage of solvent C was kept constant at 25%. The UHPLC system was directly coupled to the ESI-Z-Spray ion source of a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF Global, Waters, Manchester, UK). UHPLC-MS system control and data processing were performed using MassLynx software (Waters, Manchester, UK).

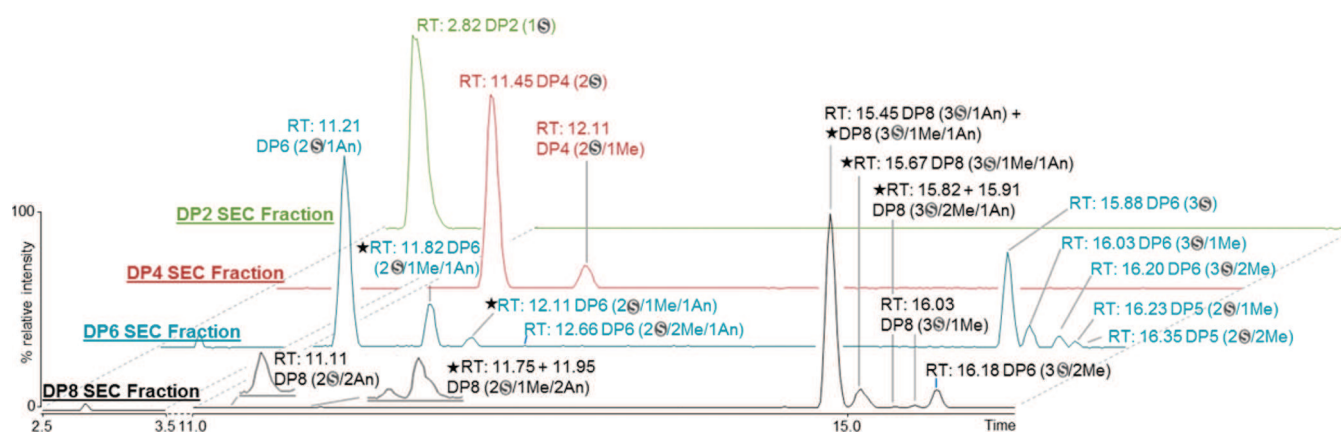


Figure 1. Base peak intensity (BPI) chromatogram of the SEC fraction analyzed by IP-RP-UHPLC-ESI-MS in positive ion mode. Degree of polymerization (DP) and number of modifications (white S in a black circle is for sulfation, Me for methylation, and An for anhydro-bridge) are indicated for each eluted species. Oligosaccharides annotated with ★ present a putative isomeric form based on the separation profile.

ESI Tandem Mass Spectrometry—VUV Photon Activation Measurements. The coupling of the linear ion with an undulator-based synchrotron beamline has been described in ref 20. Briefly, an LTQ XL linear ion trap (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA) is implemented as an endstation of DISCO,²¹ a bending-magnet-based beamline at the SOLEIL synchrotron radiation facility. The mass spectrometer was connected to the second-stage differential pumping of the beamline.²² A photon shutter, made of an aluminum cylindrical head mounted on a magnetic feedthrough and activated by a rotational electromotor, was used to allow irradiation during the MS/MS stages. In this work, the photon energy was tuned to 18 eV. Irradiation of isolated ions (isolation window of $\Delta m/z = 2$) was performed by setting the activation to 3000 ms with zero collision energy. The fragmentation spectra displayed in this manuscript correspond to the signal combined for 2 min. Note however that similar information was recovered after only a few seconds of recording (though with a higher signal-to-noise ratio). Raw data were transformed in mzML format using MSConvert (<http://proteowizard.sourceforge.net/downloads.shtml>) and further processed using mMass 5.3.0²³ to remove the background peaks produced upon photon irradiation.

RESULTS AND DISCUSSION

UHPLC and MS Characterization of SEC Fractions. Porphyrans from *P. umbilicalis* were subjected to hydrolysis with a β -porphyranase and then prepared essentially as described by Correc and co-workers.⁸ The resulting products were separated by size exclusion chromatography (SEC), and these fractions, similar to those studied by NMR, were submitted to reversed-phase UHPLC with a MS detection. Given the hydrophilic nature of the released compounds, an ion-pairing (IP) agent (heptylammonium) was added to the mobile phases of the chromatographic system. The IP molecule binds to negatively charged groups of the oligosaccharide through ionic interactions and, due to its carbon chain, ensures the binding of the oligosaccharide to the hydrophobic material of the column (further details are provided in Ropartz et al.¹⁹). Interestingly, it was reported that the IP molecule may act as a protecting agent for sulfated species, preventing the loss of the sulfate group upon electrospray ionization.^{24,25}

Ion chromatograms showing the MS base peak intensity (BPI) signal for each SEC fraction as recorded in positive mode are presented in Figure 1. The BPI chromatogram recorded for

the SEC fraction previously identified by NMR as a DP2, composed of L6S-G, confirmed the identity and the purity of the compound (one single peak, eluted at 2.82 min). In the SEC fraction corresponding to DP4, two distinct peaks are obtained with retention times (RT) of 11.45 and 12.11 min. The corresponding masses indicate that the first peak corresponds to the standard form L6S-G-L6S-G (measured at m/z 1172.57 as the $[M + 3IPR + H]^+$ ion and m/z 412.05 as the $[M - 2H]^-$ ion). The latter species corresponds to the methylated form of the same molecule (measured at m/z 1186.56 as the $[M + 3IPR + H]^+$ ion and m/z 419.06 as the $[M - 2H]^-$ ion). Again, the results for this simple fraction are in accordance with the NMR results.

When moving to the SEC fractions of higher DPs, the sensitivity and separation capacity of UHPLC-MS permitted the observation of many additional species compared to the study of Correc et al.⁸ In the DP6 fraction, a mixture of the nonmethylated and methylated forms of the hybrid hexasaccharide (L6S-G-LA-G-L6S-G) was found by NMR; methylation was located on the G residue at the nonreducing end (L6S-G6Me-LA-G-L6S-G). In the SEC fraction corresponding to DP8, a mixture of hybrid oligosaccharides was found by NMR, which are systematically terminated by L6S-G moieties at both the reducing and nonreducing ends. The internal parts were composed of LA-G and L6S-G moieties in a ratio of approximately two LA-G units per L6S-G moiety. Methylation was observed, with the methyl group most likely positioned on the nonreducing G unit (chemical shift at 3.41 ppm), although other NMR signals at 3.42–3.43 ppm suggested another, as-of-yet undetermined, position. Figure 1 shows a much more complex composition of these two SEC fractions, as revealed after UHPLC and MS analysis. The DP6 fraction contains at least three distinct series of molecules. The first series is composed of the major peak eluted at 11.21 min, which corresponds to the L6S-G-LA-G-L6S-G identified by NMR. This hexamer was detected as singly and doubly methylated species. Interestingly, two peaks were detected for the singly methylated species (at RT 11.82 and 12.11 min), indicating that different methylation positions exist and that these isomers can be distinguished by IP-RP-UHPLC. The second series of molecules corresponds to the fully sulfated hexamer (L6S-G)₃. Here as well, nonmethylated and singly and doubly methylated forms were observed (RT of 15.88, 16.03, and 16.20 min, respectively). Strikingly, these (L6S-G)₃ species have not been

observed by NMR. This observation suggests that β -porphyranase has less efficiency to further degrade oligosaccharides when they have six or fewer residues. The third series visible in the DP6 SEC fraction corresponds to DP5 (G-L6S-G-L6S-G), a series that was not detected by NMR and is here only detected with one or two methyl groups (at RT of 16.23 and 16.35 min, respectively). No other species with an odd number of residues was found in our analyses. We hypothesize that DP5 might be released by the degradation of a (L6S-G) motif of DP7 or DP9, which would form one extremity of the porphyran and could be degraded into DP5 and DP2 or DP4. The ion chromatogram at the bottom of Figure 1 (black trace) shows the peaks detected for the SEC fraction assigned to DP8. Here again, the eluted species can be sorted into three groups. The first group, in terms of elution time, is comprised of octamers that are half composed of sulfated moieties and half of agarose moieties. A nonmethylated species (RT: 11.11 min) and at least two monomethylated species (RT: 11.75 and 11.95 min) were separated. The intensity of the signal, although significant, is obviously very low for these species. The predominant oligosaccharides are DP8, exhibiting one agarose pattern (one anhydro bridge) and three sulfate groups. These structures are observed as nonmethylated (RT: 15.45 min), monomethylated (RT: 15.45 and 15.67 min), and doubly methylated (RT: 11.75 and 11.95 min). Similar to what was mentioned above, this proves that isomers arising from the distinct positioning of methylation occur and can be efficiently resolved by IP-RP-UHPLC. Finally, the third group of oligosaccharides corresponds to the methylation products (one and two methyl groups) of DP6. The retention times (16.03 and 16.25 min) are exactly the same as those observed for the DP6 SEC fraction (Figure 1, blue trace), suggesting similar structures in both cases. This might arise from a slight contamination of the DP8 fraction by the DP6 fraction.

From these analyses, it is possible to draw the following conclusion. As a general rule, the elution order of porphyran-derived oligosaccharides in IP-RP-UHPLC was found to be determined by the number of sulfate groups available for binding to the IP agent. However, although the methyl-etherification does not impact the number of negatively charged groups, species were also separated based on their degree of methylation: methylated species eluted later than their nonmethylated, less hydrophobic, counterparts. This suggests that the retention mechanism also accounts for the complete hydrophobic environment of the molecule. Altogether, these first LC-MS analyses revealed a greater complexity in the SEC fractions than could be expected from the NMR results.⁸ The observed complexity, especially the presence of putative isomers evidenced from their distinct retention times, led us to perform deeper and more comprehensive investigations of the structures by VUV photon activation tandem MS.

Fine Structural Investigation of SEC Fractions by Photon Activation MS. In a previous work,¹⁹ we evaluated the potential of VUV synchrotron radiation at 18 eV as an activation mean for the tandem MS of acidic oligogalacturonans. This high-energy photon activation technique produced many fragments, which were evenly distributed over the mass range. A large number of fragments arose from cross-ring cleavages and provided complete structural information, which led to identify a large number of unknown structures, including many isomers differing by the positioning of their labile methyl-ester groups. In this work, photons produced by a synchrotron radiation with energies ranging from 10 to 22 eV

(VUV range) were first probed for their ability to activate a L6S-G-L6S-G oligo-porphyran. The nomenclature further on employed for the annotation of fragment ions is the one introduced by Domon and Costello²⁶ and is depicted in Figure 2. Acquisitions were performed in both positive and negative

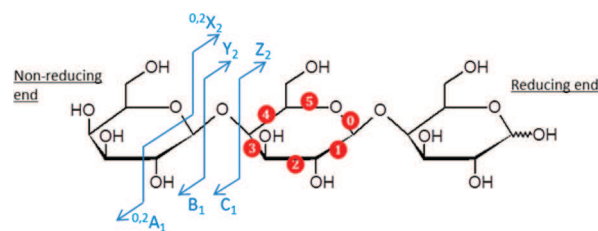


Figure 2. Convention for the fragmentation of oligosaccharides adapted from the nomenclature introduced by Domon and Costello.²⁶ The superscripts for the A and X fragments indicate the bonds of the cycle that are cleaved.

ionization modes. The fragmentation efficiency normalized to the photon flux was evaluated by monitoring the intensity measured for the fragments as a function of the photon energy. It was found that 18 eV photons produced the best fragmentation spectra for both ionization modes (Supporting Information Figures S1A and S1B). A detailed description of the fragmentation process of positively charged oligosaccharides following photon-irradiation in the VUV range was discussed in Ropartz et al.¹⁹ It was shown that, at 18 eV, the photon energy is above the ionization threshold of the oligosaccharides, and the main process leading to fragmentation in positive ion mode is dissociative photoionization (DPI),^{19,27} similar to what was reported previously for peptides and proteins.^{28,29} In negative ion mode, the detachment of an electron following irradiation in the VUV-range of doubly charged anions ($[M - 2H]^{2-}$) leads to the production of a charge-reduced species ($[M - 2H]^{\bullet-}$) that may undergo subsequent fragmentation. However, in some MS3 experiments involving two consecutive stages of UVPD activation, Brodbelt and co-workers¹⁶ noticed a significant difference between the fragments resulting from the UV reactivation of the $[M - 2H]^{\bullet-}$ ion compared to the fragments primarily produced from the $[M - 2H]^{2-}$ parent by UVPD. They concluded that there is no convincing support that the electron photodetachment is the dominant origin of the singly charged fragments observed upon UVPD. Several decay channels might thus exist, as also reported by Dugourd et al.,¹⁸ who suggested the existence of an internal conversion leading to the dissociation.

Synchrotron radiation at 18 eV was further used to characterize the fine structures of the oligo-porphyrans released after the digestion of the cell walls of *P. umbilicalis*. To avoid any possible loss of minor species upon collecting LC fractions, fractions obtained by SEC were analyzed directly, i.e. without any separation by LC. Labeling of the reducing end of the oligo-porphyrans by heavy water ($H_2^{18}O$) was used to confirm the fragment identities by comparing the spectra of nonlabeled and labeled compounds (fragments containing the reducing end undergo 2-Da shifts in the ^{18}O -labeled samples). More than 50 fragmentation spectra were recorded, accounting for the four SEC fractions, species detected, and ions observed in the two ionization modes. A representative example has been selected from the DP6 fraction and is discussed below.

The VUV photon activation of the hybrid DP6 corresponding to L6S-G-LA-G-L6S-G with one methyl group is given in

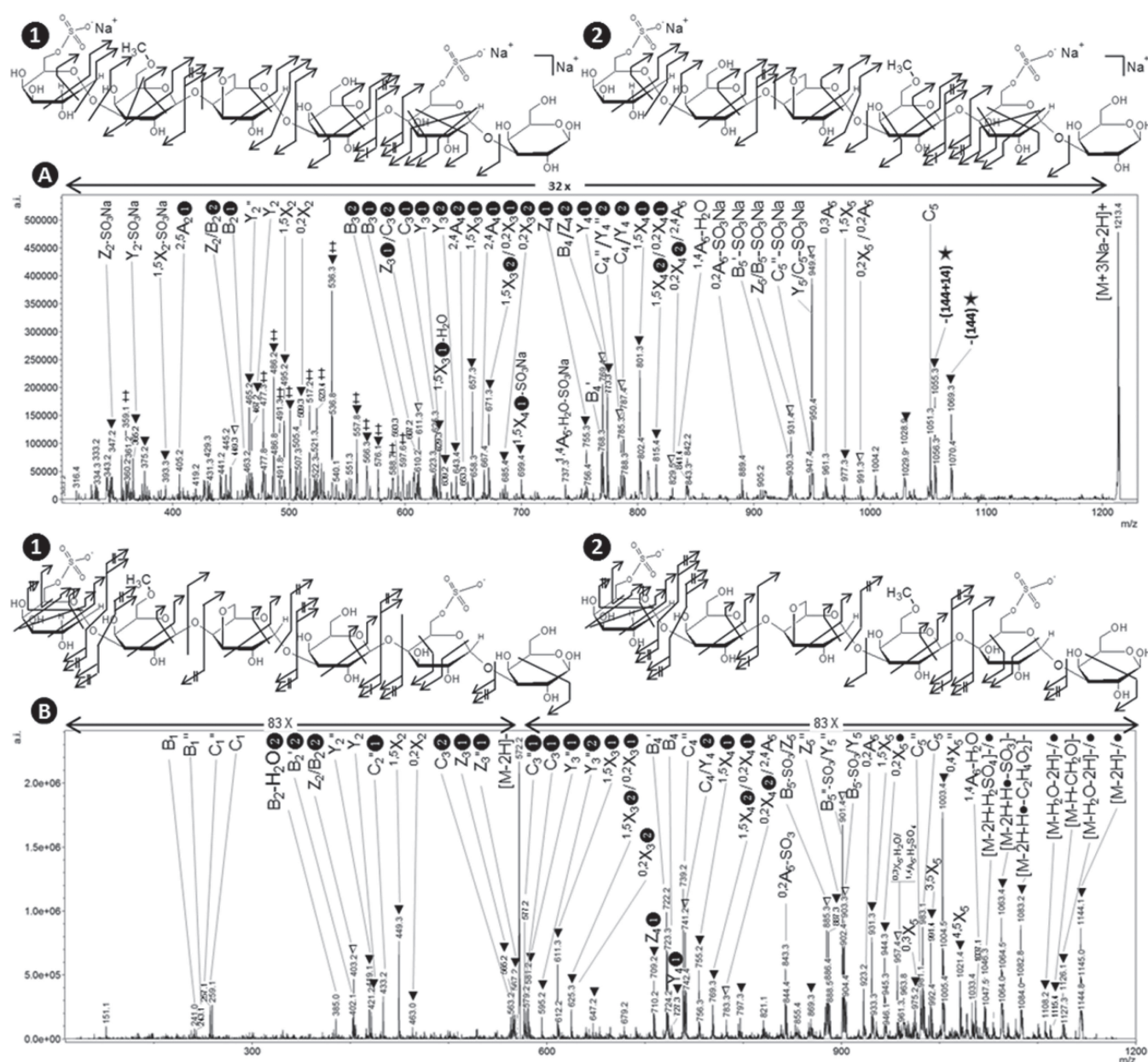


Figure 3. VUV-photon activation fragmentation spectrum recorded for the DP6 SEC fraction, recorded in positive ion mode (A) and negative ion mode (B). The parent ion of the L6S-G-LA-G-L6S-G oligo-porphyrans with one methyl group was isolated at m/z 1213.4 as the $[M + 3Na - 2H]^+$ species (positive mode), and at m/z 572.2 as the $[M - 2H]^-$ species (negative mode). Two isomers ((1): L6S-G6Me-LA-G-L6S-G6 and (2): L6S-G-LA-G6Me-L6S-G6) could be unequivocally differentiated from these spectra. Masses marked with $\blacktriangledown$ showed a complete shift upon ^{18}O -labeling, while masses marked with ∇ contain two fragments, one of which shifted and one of which did not shift upon ^{18}O -labeling. Several ions, indicated with $\ddagger$, correspond to doubly charged fragments. Ions indicated with $\star$ correspond to an internal rearrangement.

Figure 3 in positive and negative ion modes. Structures are displayed on top of the fragmentation spectra, depicting all identified fragments. Similar to the results obtained for oligo-galacturonans,¹⁹ oligo-porphyrans were dissociated into systematic series of X, Y, Z and A, B, C fragments, evenly distributed over the entire mass range, which permitted the complete characterization of the two isomeric structures in this sample. Interestingly, although minor loss of sulfate was observed in the fragmentation spectra, information on the localization of the sulfate groups along the backbone was unequivocally obtained, revealing that this localization occurred on the C6 of the galactose residues. Consistent with the two retention times that were observed in LC-MS (11.82 and 12.11 min, Figure 1), the

analysis of the DP6 SEC fraction by VUV photofragmentation indeed revealed the presence of two isomers for L6S-G-LA-G-L6S-G with one methyl group. These two isomers (labeled as (1) and (2) in Figure 3) differ by the positioning of the methyl group, which is located on either the nonreducing-end galactose or the galactose of the LA-G agar motif. The methylation could be unequivocally positioned on the C6 of the galactose units based on the intracyclic fragments $^{0,2}X_n$, $^{1,5}X_n$, and $^{2,4}A_n$. Two ions, labeled with a star in Figure 3A, correspond to losses of 144 Da and of 158 Da ($144 + CH_2$) from the parent ion. These losses arise from an internal rearrangement between the monosaccharide at the nonreducing end and the oxygen of the glycosidic bond linking the

monosaccharides 2 and 3 from the nonreducing end. This rearrangement leads to a loss of $C_6H_8O_4$ (144 Da) and, eventually, an additional CH_2 if a methyl group is carried by the nonreducing galactose residue ($C_7H_{12}O_4$, 158 Da). Thus, these ions provide direct proof of the presence of two isomers: one with a methylation on the nonreducing L6S-G (explaining the loss of 158 Da) and one without (loss of 144 Da). These losses can be used for the diagnosis of the methylation of the galactose at the nonreducing end, as further verified from two other structures (L6S-G-L6S-G and L6S-G6Me-L6S-G; see Supporting Information Figures S2.A and S3.A). Several ions, denoted as Y'', C'', B'', B', and Z'' in Figure 3, were detected in both ionization modes. These ions differ from their Y, C, B, and Z counterparts by the mass of one or two hydrogen atoms. As reported by Wolff and co-workers in the context of electron-based dissociation, these ions indicate a fragmentation mechanism involving radical intermediate species preceding the dissociation.^{30–32} Finally, and quite importantly, the spectrum in Figure 3B shows an ion at m/z 1144.1, which corresponds to the oxidized radical anion $[M - 2H]^{\bullet-}$. This ion indicates that an EPD mechanism occurs upon photon activation of the multiply charged parent anion, as described elsewhere.¹⁶

The results obtained from the study of the four SEC fractions are summarized in Supporting Information Table S1. As shown, a large number (16) of structures could be completely resolved. Consistent with the findings of Correc et al.,⁸ a conserved (L6S-G) pattern was found on both extremities for all these structures, and the methylation never occurred on the Gal residue at the reducing end. The structures remaining unresolved after photon activation analysis are mostly oligosaccharides with very low intensity. However, some of them could be deduced based on the measured masses combined with validated structures for related species. For example, in the case of L6S-G6Me-LA-G6Me-L6S-G, the positions for the methyl groups were extrapolated from the monomethyl-etherified structures. Table S1 highlights the necessity of combining fragmentation in both positive and negative ionization modes to yield a comprehensive characterization of isomers. For instance, in the case of DP8 with three sulfate groups, one methyl-etherification, and one anhydro-bridge, four isomers were completely determined. Whereas one isomer could be characterized in both positive and negative modes, the L6S-G-LA-G6Me-(L6S-G)₂ structure could only be evidenced in positive ion mode, and L6S-G-L6S-G6Me-LA-G-L6S-G and (L6S-G)₂-LA-G6Me-L6S-G could only be solved in negative ion mode. Furthermore, on the DP8 with three sulfate groups, two methyl groups, and one anhydro-bridge, different isomers were determined depending on the charge state of the parent ion, isolated in negative ion mode ($[M + Na - 3H]^{2-}$ or $[M - 3H]^{3-}$). We hypothesize that, in certain cases, the steric effect due to the methyl group may hinder the binding of the sodium on the sulfate groups nearby, explaining the selectivity of the charge state depending on the isomers. For example, L6S-G-LA-G6Me-L6S-G6Me-L6S-G and L6S-G6Me-L6S-G6Me-LA-G-L6S-G, which are highly modified at their reducing and nonreducing extremities, are detected with all sulfate groups being negatively charged. However, we were not able to further rationalize the observed charged species/isomer dependence.

Interestingly, the complete determination of the fine structure of these hybrid oligosaccharides allows the identification of some specificity constraints to the β -porphyranase

enzyme (Figure 4). Consistent with the findings of Correc et al.,⁸ the selective cleavage of the β -1,4 bound between L6S-G

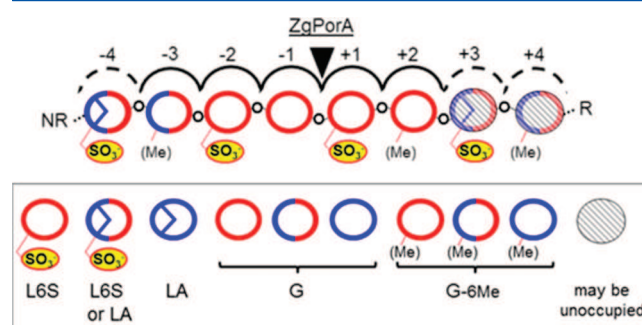


Figure 4. Schematic representation of the sub-binding site specificity of the catalytic cleft of the β -porphyranase A from *Z. galactanivorans*. Each sub-binding site of the enzyme binds to an individual sugar unit of the polymeric chain. Sub-binding sites are represented by semicircular lines above the scheme of a bound sugar chain and numbered according to convention.³³ The point of cleavage is indicated by a black arrow. Full black semicircular lines designate sub-binding sites with residues forming hydrogen bonds to the carbohydrate units as determined by the 3D structure (PDB idcode 3ILF), while the dashed lines indicate additional sugar units not necessarily having direct interaction with protein residues. The different symbols used for sugar units are explained in the box below. The carbohydrate units are colored in red when part of porphyrobiose units and blue when part of agarobiose units. The presence of both colors indicates that both units can be accommodated by the sub-binding site. The gray hatched positions are not necessarily occupied for cleavage to occur.

moieties by β -porphyranase was confirmed, as was the absence of Gal-methylation at the reducing ends, a position that seems to need to be unmethylated for the enzyme to proceed with cleavage (i.e., at sub-binding site -1 , Figure 4). The regular occurrence of the methyl-etherification of the galactose in porphyro or agar units at the nonreducing end indicates that the presence of a 6-O-methyl group is tolerated by the enzyme on the positive binding sites of the cleavage point (i.e., at sub-binding sites $+2$ and $+4$, Figure 4). Furthermore, the presence of two adjacent (L6S-G) repeating units neighbored by a methylated galactose on either the reducing or nonreducing sides indicates again that the enzyme prefers at least three nonmethylated (L6S-G) units in a row for hydrolysis to occur efficiently (i.e., at sub-binding sites -2 to $+1$, Figure 4). Among the insights gained into the β -porphyranase mode of action, the most striking is the apparent limitation of the enzyme to further degrade (L6S-G)₃ motifs. This is in contrast to the finding that purified porphyro-oligo-hexasaccharides and even porphyro-oligotetrasaccharides are hydrolyzed by this porphyranase,^{16,18} but seemingly with a much lower rate than longer oligosaccharides. Together, these results suggest that longer oligosaccharides than those needed to “fill” the enzymatic cleft are more efficiently hydrolyzed.

In addition, the comprehensive determination of all the structures released allows the elucidation of the fine structure of the parent polymer porphyran. First, several successive agar moieties (up to two) can occur in the sulfated part of the polymer. The methylation on the Gal residues follows regular patterns and is systematically and exclusively observed on the O6-hydroxyl group. This confirms earlier studies reporting that only the Gal-O6 positions are methylated in porphyrans,³⁴ while agars in general also feature Gal-O4 and LA-O2

methyations.³⁵ Importantly, the fine structure analysis performed here shows that these methyl-etherifications can occur on the Gal units of both agarobiose and porphyrobiose units. Although the porphyrin biosynthetic pathway in red algae is currently uncharacterized, the regular occurrence and position of the methyl-ether groups support the existence of dedicated enzymes yet to be discovered. These biosynthetic modifications, or combinations of modifications, are likely to alter the physical properties of the polymer, which in turn might relate to developmental regulations in ways not known to date. The capacity to trace subtle chemical modifications in porphyrans described here offers the possibility of investigating these variations among species, seasonal changes, or geographical zones in the future and to tentatively relate structural differences to distinct rheological properties, a feature of potential industrial value.

CONCLUSION

The resolving power and the sensitivity of UHPLC-MS together with the structural information provided by VUV photon activation based MS/MS led to an unprecedented description of the compounds released upon the hydrolysis of *P. umbilicalis* porphyrans with the β -porphyranase enzyme. An unexpected complexity was found in the products, and the structural characterization was more comprehensive and straightforward than that achieved with NMR. In particular, a more complete description of the methylation and sulfate patterns and of the positioning of the agar moieties was achieved. Interestingly, methylation on the agar moieties, which could only be hypothesized from the NMR results, was unequivocally demonstrated. The comprehensiveness of this study provided an unprecedented view of the structure of cell wall porphyrans and refined previous knowledge of the β -porphyranase mode of action.

Rich fragmentation spectra were obtained from the VUV-activation of oligo-porphyrans, with many cross-ring fragments and only minor losses of the labile functions such as sulfate groups. Several fragments were specifically produced from either positively charged or negatively charged species, leading to complementary structural information. In particular, the method was able to resolve numerous isomers. This study thus provides a new demonstration that the activation of ions with highly energetic photons is a valuable method for the determination of unknown structures of oligosaccharides by tandem MS, even when these structures are unseparated.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Efficiency of fragmentation normalized to the photon flux and plotted according to the photon energy, VUV-photon activation fragmentation spectrum, and summary of all the structures resolved in this study from the SEC fractions of the digested porphyrans from *P. umbilicalis*. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: helene.rognaux@nantes.inra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

[†]D.R. and H.R. contributed equally.

ACKNOWLEDGMENTS

Experiments were performed on the DISCO beamline at SOLEIL Synchrotron, France (proposal number 20120759). We are grateful to the SOLEIL staff for running the facility smoothly. This work was partially supported by the Agence Nationale de la Recherche Scientifique, France, under project number ANR-08-BLAN-0065.

REFERENCES

- (1) Hehemann, J. H.; Correc, G.; Thomas, F.; Bernard, T.; Barbeyron, T.; Jam, M.; Helbert, W.; Michel, G.; Czjzek, M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 30571–30584.
- (2) Pomin, V. H.; Mourao, P. A. S. *Glycobiology* **2008**, *18*, 1016–1027.
- (3) Inoue, N.; Yamano, N.; Sakata, K.; Nagao, K.; Hama, Y.; Yanagita, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 447–449.
- (4) Ishihara, K.; Oyamada, C.; Matsushima, R.; Murata, M.; Muraoka, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1824–1830.
- (5) Lahaye, M.; Yaphe, W.; Viet, M. T. P.; Rochas, C. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 249–265.
- (6) van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A. I.; Rollema, H. S.; Cerezo, A. S. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 73–92.
- (7) Jam, M.; Flament, D.; Allouch, J.; Potin, P.; Thion, L.; Kloareg, B.; Czjzek, M.; Helbert, W.; Michel, G.; Barbeyron, T. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 703–713.
- (8) Correc, G.; Hehemann, J. H.; Czjzek, M.; Helbert, W. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 277–283.
- (9) Harvey, D. J.; Mattu, T. S.; Wormald, M. R.; Royle, L.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 734–740.
- (10) Naggar, E. F.; Costello, C. E.; Zaia, J. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1534–1544.
- (11) Devakumar, A.; Thompson, M. S.; Reilly, J. P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2313–2320.
- (12) Devakumar, A.; Mechref, Y.; Kang, P.; Novotny, M. V.; Reilly, J. P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1452–1460.
- (13) Devakumar, A.; Mechref, Y.; Kang, P.; Novotny, M. V.; Reilly, J. P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1027–1040.
- (14) Wilson, J. J.; Brodbelt, J. S. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5186–5196.
- (15) Racaud, A.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Lemoine, J. r. m. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 2077–2084.
- (16) Ko, B. J.; Brodbelt, J. S. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8192–8200.
- (17) Ko, B. J.; Brodbelt, J. S. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46*, 359–366.
- (18) Enjalbert, Q.; Brunet, C.; Vernier, A.; Allouche, A.-R.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Lemoine, J.; Giuliani, A.; Nahon, L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 1271–1279.
- (19) Ropartz, D.; Lemoine, J.; Giuliani, A.; Bittebière, Y.; Enjalbert, Q.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Ralet, M.-C.; Rognaux, H. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *807*, 84–95.
- (20) Milosavljevic, A. R.; Nicolas, C.; Gil, J.-F.; Canon, F.; Refregiers, M.; Nahon, L.; Giuliani, A. *J. Synchrotron Radiat.* **2012**, *19*, 174–178.
- (21) Giuliani, A.; Jamme, F.; Rouam, V.; Wien, F.; Giorgetta, J.-L.; Lagarde, B.; Chubar, O.; Bac, S.; Yao, I.; Rey, S.; Herbeaux, C.; Marlats, J.-L.; Zerbib, D.; Polack, F.; Refregiers, M. *J. Synchrotron Radiat.* **2009**, *16*, 835–841.
- (22) Giuliani, A.; Yao, I.; Lagarde, B.; Rey, S.; Duval, J.-P.; Rommeluere, P.; Jamme, F.; Rouam, V.; Wein, F.; De Oliveira, C.; Ros, M.; Lestrade, A.; Desjardins, K.; Giorgetta, J.-L.; Laprevote, O.; Herbeaux, C.; Refregiers, M. *J. Synchrotron Radiat.* **2011**, *18*, 546–549.
- (23) Niedermeyer, T. H. J.; Strohm, M. *PLoS One* **2012**, *7*, 9.
- (24) Korir, A. K.; Lirintaco, J. F. K.; Gutierrez, S. M.; Larive, C. K. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1297–1306.
- (25) Doneanu, C. E.; Chen, W. B.; Gebler, J. C. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3485–3499.
- (26) Domon, B.; Costello, C. E. *Glycoconjugate J.* **1988**, *5*, 397–409.
- (27) Bari, S.; Gonzalez-Magana, O.; Reitsma, G.; Werner, J.; Schippers, S.; Hoekstra, R.; Schlatholter, T. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 9.

- (28) Canon, F.; Milosavljević, A. R.; van der Rest, G.; Réfrégiers, M.; Nahon, L.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Giuliani, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 8377–8381.
- (29) Giuliani, A.; Milosavljević, A. R.; Canon, F.; Nahon, L. *Mass Spectrom. Rev.* **Early View** (Online Version of Record published before inclusion in an issue).
- (30) Wolff, J. J.; Amster, I. J.; Chi, L. L.; Linhardt, R. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 234–244.
- (31) Wolff, J. J.; Laremore, T. N.; Busch, A. M.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 294–304.
- (32) Wolff, J. J.; Laremore, T. N.; Aslam, H.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1449–1458.
- (33) Davies, G. J.; Wilson, K. S.; Henrissat, B. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 557–559.
- (34) Rees, D. A.; Conway, E. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 411–416.
- (35) Lahaye, M.; Rochas, C. *Hydrologia* **1991**, *221*, 137–148.

5. Conclusion

Plus de 15 structures d'oligo-porphyrane ont été complètement résolues, de degrés de polymérisation DP2 à DP8. Ces analyses nous ont permis de caractériser intégralement la structure des molécules, incluant la localisation des parties agar, des sulfatations et des méthylations. Une forme totalement sulfatée (donc sans partie agar) a été mise en évidence pour le DP6, et des "contaminations" de la fraction DP6 par des DP5 et de la fraction DP8 par des DP6 ont pu être établies. Ce niveau de complexité moléculaire dans les fractions SEC explique la difficulté qu'ont rencontrée nos collaborateurs lors de leurs précédentes analyses par RMN ⁽¹⁶⁶⁾.

Ce travail étend les connaissances actuelles sur la structure de porphyrane. En outre, il offre une nouvelle démonstration du potentiel d'activation par photons de haute énergie pour l'analyse structurale des oligosaccharides, même dans des mélanges non séparés et complexes, avec ici un accent particulier sur une modification extrêmement labile qui pose de sérieuses limitations en MS/MS : la O-sulfatation. Cette autre étude a également permis d'examiner la généralité des caractéristiques que nous avons observées dans l'étude précédente : à savoir que l'activation en VUV produit des séries systématiques de fragments liés entre eux (X, Y, Z ou A, B, C), facilitant ainsi l'interprétation des spectres, et produit un nombre important de fragments intracycliques. Ici encore, aucun processus de double fragmentation n'a été observé.

CONCLUSION ET
PERSPECTIVES GENERALES
A CE TRAVAIL

CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES A CE TRAVAIL

Les glycosciences, thématique qui étudie la structure et la fonction des glucides ainsi que les enzymes et protéines impliquées dans la reconnaissance, la construction et la déconstruction des structures glycaniques, sont loin d'avoir atteint le même niveau de maturité - tant au niveau des connaissances que des applications potentielles - que la génomique et la protéomique.

Alors que les glucides jouent un rôle déterminant dans le fonctionnement de tous les êtres vivants et présentent un potentiel énorme d'applications en santé humaine, en nutrition, pour la production d'énergie ou pour le développement de nouveaux biomatériaux, leur étude peu développée. Les principales raisons sont liées à la diversité et à la complexité structurale des polysaccharides, ainsi qu'au manque d'outils (enzymatiques, analytiques, structuraux) pour étudier leurs structures et leurs fonctions.

Dans ce travail de thèse, nous avons comme objectif de faire progresser l'utilisation de la spectrométrie de masse pour permettre de lever quelques verrous analytiques qui limitent le développement des connaissances et des applications en glycosciences.

Un premier aspect primordial concerne les enzymes impliquées dans la dégradation, la modification et la biosynthèse des polysaccharides. Ces enzymes sont des outils extrêmement importants pour l'ensemble des applications potentielles des polysaccharides.

Les enzymes de dégradation sont utiles pour déstructurer les réseaux complexes dans lesquels les polysaccharides sont enchevêtrés sans impacter les fonctionnalités d'intérêt des biomolécules. Elles permettent d'obtenir des structures hautement spécifiques à la fois pour des applications en recherche et dans l'industrie. Ces enzymes sont également des outils fondamentaux dans la chaîne analytique que nous utilisons. Elles permettent non seulement de dépolymériser les polysaccharides en structures plus petites que nous sommes à même d'analyser par spectrométrie de masse, mais, de par leur spécificité et contrairement à des digestions chimiques, elles fournissent déjà un premier niveau de caractérisation du polymère. Une première partie de mon travail a consisté à utiliser la spectrométrie de masse pour découvrir des nouvelles enzymes de déconstruction de ces polymères.

Cette étude a permis de mettre en place une méthode complètement automatisée, basée sur la spectrométrie de masse MALDI MS, pour cribler de larges collections d'échantillons à la recherche d'activités de dégradation. Elle a contribué à découvrir une nouvelle enzyme de déconstruction des ulvanes, et à caractériser une nouvelle activité enzymatique non décrite sur des formes méthylées

des porphyranes. Cette approche, robuste et validée, devrait permettre d'enrichir rapidement et considérablement le nombre et la spécificité des enzymes disponibles. En ce qui concerne la spécificité des enzymes, plusieurs questions sur la nature de certains oligosaccharides formés demeurent en suspens et devront être complétées par une caractérisation structurale fine de ces produits de dégradation. En termes analytiques, cette étude a permis de comparer et d'évaluer de manière très systématique un grand nombre de préparations de matrices MALDI, pour leur capacité à détecter – avec une bonne sensibilité et dans les deux modes d'ionisation positif et négatif – des oligosaccharides chimiquement divers. Nous avons ainsi retenu la matrice ionique DMA/DHB, qui a par la suite été systématiquement employée pour les analyses MALDI MS d'oligosaccharides.

Les enzymes de biosynthèse ou de modification des oligosaccharides constituent, elles, des outils performants qui permettent de synthétiser ou de modifier des oligosaccharides d'accès difficile par voie chimique avec des rendements beaucoup plus importants. Les structures oligosaccharidiques produites sont principalement utilisées dans le domaine de la santé. L'intérêt majeur de ces outils enzymatiques est la spécificité à créer une isoforme donnée ou un mélange de certaines isoformes. L'approche couramment utilisée pour valider la formation d'un nouveau composé après action d'une enzyme est la CCM avec révélation colorimétrique. Cependant, les informations obtenues par cette révélation restent très limitées.

Mon travail a été, sur cette partie, de développer une approche permettant de fournir rapidement une information structurale sur des produits de synthèse permettant de caractériser le (ou les) isoforme(s) en présence. L'objectif a été de coupler directement la CCM qui est une chromatographie de surface avec l'ionisation MALDI. La mesure directe de la masse des composés sur la plaque de migration CCM est déjà une amélioration dans le processus analytique, puisqu'elle permet d'accélérer considérablement ce processus et d'en réduire les étapes. Cependant, pour la résolution des isomères, la spectrométrie de masse MS reste insuffisante. Notre objectif a donc été d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem qui ajoute un niveau de spécificité dans l'identification des produits formés et permet de discriminer les régiosélectivités des enzymes d'intérêt.

Dans ce travail, les efforts ont porté, au plan analytique, sur l'amélioration du procédé de dépôt de la matrice MALDI sur la plaque CCM, pour permettre une analyse efficace, automatisée et sensible directement depuis ce support. Notre étude nous a conduit à développer un robot de nébulisation de la matrice au laboratoire car les autres solutions envisagées ne répondaient pas à nos besoins. Cette méthode permet de déposer de fines gouttes de solution de matrice de manière contrôlée et extrêmement uniforme. On pourra noter que l'homogénéité de la nébulisation apporté par ce robot (fonctionnant en aérographe) font que, dorénavant, ce montage expérimental est également utilisé

au laboratoire pour préparer des coupes de tissus pour des analyses d'imagerie MALDI (application d'enzymes de dégradation⁽¹⁶⁷⁾ ou de standards utilisé pour la quantification relative⁽¹⁶⁷⁻¹⁶⁸⁾).

Notre travail sur les régioisomères a permis, dans le cadre d'une première collaboration, de démontrer la caractérisation des produits de transglycosylation sur trois accepteurs isomères en se basant sur les spectres MALDI-MS/MS. Les résultats permettent de valider le transfert du monosaccharide sur la partie osidique des accepteurs et de différencier chacune des espèces formées. Une seconde collaboration a montré, sur l'étude de régioisomères, la caractérisation de différentes espèces de Lacto-N-fucopentaose (LNFP I et LNFP II). L'étude des produits d'une nouvelle enzyme de transglycosylation a été réalisée et a montré la présence de deux isomères synthétisés. Le premier présente la distance de migration et le spectre MS/MS du LNFP I. Le second, avec une distance de migration différente, n'a pu être caractérisé finement en se basant sur les données MS/MS.

Nous envisageons de poursuivre ces études en introduisant une modification chimique des oligosaccharides pour favoriser leur fragmentation et ainsi être à même de caractériser plus finement les branchements des différentes sous-unités.

Le second point sur lequel nous avons travaillé pour contribuer au développement des glycosciences est d'apporter une réponse aux problèmes de la polymolécularité extrême des polysaccharides. Ces molécules, comme nous l'avons détaillé en Introduction, présentent à l'état naturel une complexité moléculaire considérable, avec de nombreux phénomènes d'isomérisation. Leur caractérisation fine est pourtant nécessaire pour mieux en appréhender les fonctions et en maîtriser les usages. En l'état actuel, les techniques analytiques sont insuffisantes pour rendre compte de la structure fine de ces molécules. Même si l'on dispose d'enzymes spécifiques pour dépolymériser les polysaccharides, la variabilité structurale des oligosaccharides produits peut rester extrêmement hétérogène (taille, branchement, modifications, ...). En outre, le nombre limité d'enzymes disponibles impose encore souvent d'avoir encore recours à des hydrolyses chimiques qui produisent des mélanges hautement complexes.

Une seconde partie de mon travail a consisté à développer une approche séparative en amont de la spectrométrie de masse, pour réduire la complexité des mélanges qui sont générés après dégradation des polysaccharides naturels. Surtout, cette étape de séparation avait comme objectif de contribuer à séparer au mieux, en amont de l'analyse, les nombreuses isomérisations de structure que nous rencontrons et qui sont le challenge principal posé aux analystes pour la caractérisation des

oligosaccharides. La chromatographie liquide couplée à l'ionisation Electrospray a notamment permis l'essor de domaines tels que la protéomique et la métabolomique. Pour la caractérisation des mélanges complexes d'oligosaccharides, nous nous sommes orientés vers la chromatographie d'appariement d'ions en phase inverse (IP-RP-UHPLC). Cette approche, directement couplée à la spectrométrie de masse, s'est révélée une étape fondamentale pour la caractérisation de mélanges complexes à très complexes, tels que ceux produits par dégradation des polysaccharides naturels.

L'optimisation a porté sur la sélection d'un agent d'appariement d'ions, pour rendre compatible cette chromatographie hydrophobe avec la nature polaire des composés oligosaccharidiques que nous étudions. Le formate d'heptylammonium à pH 6 a été retenu. L'étape d'IP-RP-UHPLC a permis de séparer efficacement les différentes espèces en amont de la spectrométrie de masse, y compris certaines formes isomères, et d'atteindre ainsi une sensibilité d'analyse très importante. Elle nous a permis de caractériser des structures encore inédites produites à partir des RGII de pectines, mais a aussi été employée avec succès dans les études structurales fines des homogalacturonanes méthylés et des porphyranes décrits dans le chapitre 3. L'objectif sera maintenant de développer une approche chromatographique plus sélective pour la séparation d'oligosaccharides neutres : des premiers essais (non présentés dans la thèse) ont été réalisés en utilisant la chromatographie HILIC.

Même si le développement des techniques séparatives permet de franchir un cap concernant les mélanges complexes d'oligosaccharides, l'exemple de la chaîne II du RGII traité dans le Chapitre 2 montre l'extrême complexité à laquelle nous pouvons faire face concernant l'isomérisation des oligosaccharides. Comme nous l'avons démontré dans la première partie du Chapitre 3, les techniques de fragmentations pour produire des spectres MS/MS dont nous disposons au laboratoire peuvent être insuffisantes pour la caractérisation structurale fine des oligosaccharides. Nous avons donc cherché à explorer des méthodes d'activation en MS/MS très peu employées à ce jour pour la caractérisation structurale des oligosaccharides naturels : celles basées sur l'activation ions/photons. L'originalité a été à la fois dans la complexité des échantillons étudiés, et dans la gamme d'énergie photonique utilisée, dans l'UV lointain. Les caractéristiques des spectres de fragmentation obtenus sont exceptionnelles, avec une information structurale considérablement plus riche qu'en IE-CID et une interprétation rendue plus simple par l'absence de fragments ambigus. Nos résultats ont fourni des informations structurales inédites sur des polysaccharides hautement méthylés et sur des polysaccharides hautement sulfatés, malgré la labilité de cette modification.

Nos dernières investigations ont montré que le temps nécessaire à l'activation des ions et à la production des photo-fragments pouvait être réduit et rendu compatible avec les temps d'élution des composés en UHPLC. Lors du dernier projet soumis au synchrotron SOLEIL, nous avons donc couplé directement notre chromatographe UHPLC sur la ligne DISCO. Les données, qui ne sont encore que partiellement traitées et n'ont pas été présentées dans le manuscrit, montrent déjà que l'information structurale est obtenue avec des temps d'irradiation et d'acquisition beaucoup plus courts que ceux employés dans les deux études développées dans ce manuscrit. Ce couplage direct LC-VUV-PD devrait rendre l'approche extrêmement attractive, dans un domaine plus large que celui des polysaccharides.

Une perspective concernant les travaux rapportés dans ce travail, concernant la caractérisation de régioisomères en mélange simple ou l'échantillonnage des mélanges complexes à très complexes, sera d'utiliser la mobilité ionique en phase gazeuse. Un spectromètre de masse a été acquis dans ce sens par le laboratoire fin 2013. Nous avons déjà réalisé des expérimentations préliminaires qui ont montré l'intérêt de la technique pour séparer des isomères avant la mesure de masse. Nous allons continuer à développer cette approche, à la fois comme méthode séparative mais aussi comme un élément d'information structurale supplémentaire, si nous sommes capables de relier les temps de mobilité ionique à la structure des composés en phase gazeuse : une collaboration avec une équipe de modélisateurs de l'Université de Nantes a été établie sur ce sujet.

Finalement, l'ensemble des résultats de thèse et les améliorations analytiques qui ont été portées dans mon travail ont permis de progresser dans l'utilisation de la spectrométrie de masse dans ce domaine analytique complexe qu'est la détermination structurale des polysaccharides. Ils ont aussi permis d'apporter des éléments d'information inédits, à la fois sur ces biopolymères et sur le mode d'action de leurs enzymes de dépolymérisation. Aujourd'hui moins répandue que la RMN dans la communauté des scientifiques travaillant sur les polysaccharides, la spectrométrie de masse a de nombreux atouts, les principaux étant certainement sa sensibilité et sa capacité à traiter des mélanges complexes. On voit à l'issue de ce travail que la spectrométrie de masse est capable d'aborder des questions structurales complexes, et d'y apporter des réponses non ambiguës.

A plus long terme, Le verrou important qui restera à lever pour déployer plus largement ces approches concerne le traitement des résultats, qui est encore largement manuel. Le développement d'outils informatiques pour l'interprétation des données et la capitalisation de ces données sous forme de bases de données seront des enjeux cruciaux pour démocratiser ces approches.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Laine, R. A. *Glycobiology* 1994, 4, 759-767
2. Willats, W. G. T.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, J. P. *Plant Mol.Biol.* 2001, 47, 9-27
3. Buffetto, F.; Ropartz, D.; Zhang, X. J.; Gilbert, H. J.; Guillon, F.; Ralet, M.-C. *Annals of Botany* 2014, 114, 1327-1337
4. Cosgrove, D. J.; Jarvis, M. C. *Front. Plant Sci.*, 2012, 3, 6
5. Pauly, M.; Gille, S.; Liu, L. F.; Mansoori, N.; de Souza, A.; Schultink, A.; Xiong, G. Y. *Planta*, 2013, 238, 627-642
6. Bonnin, E.; Garnier, C.; Ralet, M.-C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98, 519-532
7. Popper, Z. A.; Michel, G.; Herve, C.; Domozych, D. S.; Willats, W. G. T.; Tuohy, M. G.; Kloareg, B.; Stengel, D. B. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, 62, 567-588
8. Robbins, P. W.; Wright, A.; Dankert, M. *The Journal of general physiology* 1966, 49, 331-46
9. Oikawa, A.; Lund, C. H.; Sakuragi, Y.; Scheller, H. V. *Trends in Plant Science*, 2013, 18, 49-58
10. Cosgrove, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6, 850-861
11. Bashline, L.; Lei, L.; Li, S. D.; Gu, Y. *Mol. Plant.*, 2014, 7, 586-600
12. Robyt, J. F. *Polysaccharides: Energy Storage*. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> (<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0000700.html> consulté le 30/09/2014) [doi: 10.1038/npg.els.0000700]
13. Jane, J. L.; Kasemsuwan, T.; Leas, S.; Zobel, H.; Robyt, J. F. *Starch-Starke* 1994, 46, 121-129
14. Van Laere, A.; Van den Ende, W. *Plant Cell Environ.* 2002, 25, 803-813
15. Bonnett, G. D.; Sims, I. M.; Simpson, R. J.; Cairns, A. J. *New Phytol.* 1997, 136, 11-17
16. Peaucelle, A.; Braybrook, S.; Hofte, H. *Front. Plant Sci.* 2012, 3, 6
17. Hayashi, T.; Kaida, R. *Mol. Plant.*, 2011, 4, 17-24
18. Varki, A. *Glycobiology* 1993, 3, 97-130.
19. O'Neill, M. A.; Ishii, T.; Albersheim, P.; Darvill, A. G. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004, 55, 109-139
20. Caffall, K. H.; Mohnen, D. *Carbohydrate Research* 2009, 344, 1879-1900
21. Perez, S.; Rodriguez-Carvajal, M. A.; Doco, T. *Biochimie* 2003, 85, 109-121
22. Cosgrove, D. J. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 1999, 50, 391-417
23. Pelloux, J.; Rusterucci, C.; Mellerowicz, E. J. *Trends Plant Sci.* 2007, 12, 267-277
24. Pomin, V. H. *Glycoconjugate Journal* 2010, 27, 1-12
25. Mohnen, D.; Hahn, M. G. *Seminars in cell biology* 1993, 4, 93-102.
26. Cote, F.; Ham, K. S.; Hahn, M. G.; Bergmann, C. W. *Sub-cellular biochemistry* 1998, 29, 385-432
27. Shibuya, N.; Minami, E. *Physiol. Mol. Plant P.* 2001, 59, 223-233.

28. Ridley, B. L.; O'Neill, M. A.; Mohnen, D. *Phytochemistry* 2001, 57, 929-967
29. Kohle, H.; Jeblick, W.; Poten, F.; Blaschek, W.; Kauss, H. *Plant Physiol.* 1985, 77, 544-551
30. Piršelová, B.; Matušíková, I. *Acta Physiologiae Plantarum* 2013, 35, 635-644
31. Persin, Z.; Stana-Kleinschek, K.; Foster, T. J.; van Dam, J. E. G.; Boeriu, C. G.; Navard, P. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84, 22-32
32. Vera, J.; Castro, J.; Gonzalez, A.; Moenne, A. *Marine Drugs* 2011, 9, 2514-2525
33. Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. S. *Marine Drugs* 2011, 9, 196-223
34. Kumar, V.; Jain, S. M. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2014, 26, 679-692
35. Wijesekara, I.; Pangestuti, R.; Kim, S.-K. *Carbohydrate Polymers* 2011, 84, 14-21
36. Harazono, A.; Kobayashi, T.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Tada, M.; Hashii, N.; Ishii, A.; Arato, T.; Yanagihara, S.; Yagi, Y.; Koga, A.; Tsuda, Y.; Kimura, M.; Sakita, M.; Kitamura, S.; Yamaguchi, H.; Mimura, H.; Murata, Y.; Hamazume, Y.; Sato, T.; Natsuka, S.; Kakehi, K.; Kinoshita, M.; Watanabe, S.; Yamaguchi, T. *Biologicals* 2011, 39, 171-180
37. Hoebler, C.; Barry, J.-L.; David, A.; Delort-Laval, J. J. *Agric. Food Chem.* 1989, 37, 360-365.
38. Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R. J.; Stone, B. A. *Carbohydr. Res.* 1983, 113, 291-299
39. Duus, J. O.; Gotfredsen, C. H.; Bock, K. *Chemical Reviews* 2000, 100, 4589-4614
40. Battistel, M. D.; Azurmendi, H. F.; Yu, B.; Freedberg, D. I. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2014, 79, 48-68
41. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry* 1988, 60, 2299-2301
42. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988, 2, 151-153
43. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* 1989, 246, 64-71
44. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Analytical Chemistry* 1991, 63, A1193-A1202
45. Marcoux, J.; Robinson, C. V. *Structure* 2013, 21, 1541-1550
46. Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, D233-D238
47. Fer, M.; Prechoux, A.; Leroy, A.; Sassi, J. F.; Lahaye, M.; Boisset, C.; Nyvall-Collen, P.; Helbert, W. J. *Microbiol. Methods* 2012, 89, 222-229
48. Gusev, A. I.; Proctor, A.; Rabinovich, Y. I.; Hercules, D. M. *Analytical Chemistry* 1995, 67, 1805-1814.
49. Gusev, A. I.; Vasseur, O. J.; Proctor, A.; Sharkey, A. G.; Hercules, D. M. *Analytical Chemistry* 1995, 67, 4565-4570.
50. Arpino, P. *Mass Spectrom. Rev.* 1989, 8, 35-55.
51. Domon, B.; Costello, C. E. *Glycoconjugate Journal* 1988, 5, 397-409
52. Cody, R. B.; Burnier, R. C.; Freiser, B. S. *Analytical Chemistry* 1982, 54, 96-101

53. Harvey, D. J.; Naven, T. J. P.; Kuster, B.; Bateman, R. H.; Green, M. R.; Critchley, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 1556-1561
54. Harvey, D. J.; Bateman, R. H.; Green, M. R. *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 167-187
55. Mechref, Y.; Novotny, M. V.; Krishnan, C. *Analytical Chemistry* 2003, 75, 4895-4903
56. Lewandrowski, U.; Resemann, A.; Sickmann, A. *Analytical Chemistry* 2005, 77, 3274-3283
57. Budnik, B. A.; Haselmann, K. F.; Elkin, Y. N.; Gorbach, V. I.; Zubarev, R. A. *Analytical Chemistry* 2003, 75, 5994-6001
58. Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *Journal of the American Chemical Society* 1998, 120, 3265-3266
59. Syka, J. E. P.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101, 9528-9533
60. Adamson, J. T.; Hakansson, K. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 2901-2910
61. Zhao, C.; Xie, B.; Chan, S. Y.; Costello, C. E.; O'Connor, P. B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008, 19, 138-150
62. Liu, H. C.; Hakansson, K. *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, 305, 170-177
63. Huang, Y. Q.; Pu, Y.; Yu, X.; Costello, C. E.; Lin, C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2014, 25, 1451-1460
64. Han, L.; Costello, C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2011, 22, 997-1013
65. Wolff, J. J.; Laremore, T. N.; Aslam, H.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008, 19, 1449-1458
66. Coon, J. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Syka, J. E. P. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2005, 16, 880-882
67. Wolff, J. J.; Leach, F. E.; Laremore, T. N.; Kaplan, D. A.; Easterling, M. L.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Analytical Chemistry* 2010, 82, 3460-3466
68. Leach, F. E.; Wolff, J. J.; Xiao, Z. P.; Ly, M.; Laremore, T. N.; Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Venot, A.; Boons, G. J.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2011, 17, 167-176
69. Budnik, B. A.; Haselmann, K. F.; Zubarev, R. A. *Chem. Phys. Lett.* 2001, 342, 299-302
70. Wolff, J. J.; Amster, I. J.; Chi, L. L.; Linhardt, R. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2007, 18, 234-244
71. Wolff, J. J.; Chi, L. L.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 2015-2022
72. Leach, F. E.; Wolff, J. J.; Laremore, T. N.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Int. J. Mass Spectrom.* 2008, 276, 110-115
73. Wolff, J. J.; Laremore, T. N.; Busch, A. M.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008, 19, 294-304

74. Wolff, J. J.; Laremore, T. N.; Busch, A. M.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008, 19, 790-798
75. Bin Oh, H.; Leach, F. E.; Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Venot, A.; Boons, G. J.; Amster, I. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2011, 22, 582-590
76. Leach, F. E.; Xiao, Z.; Laremore, T. N.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, 308, 253-259
77. Leach, F. E.; Ly, M.; Laremore, T. N.; Wolff, J. J.; Perlow, J.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2012, 23, 1488-1497
78. Kailemia, M. J.; Park, M.; Kaplan, D. A.; Venot, A.; Boons, G. J.; Li, L. Y.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2014, 25, 258-268
79. Adamson, J. T.; Hakansson, K. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2007, 18, 2162-2172
80. Zhou, W.; Hakansson, K. *Electrophoresis* 2011, 32, 3526-3535
81. Seipert, R. R.; Dodds, E. D.; Clowers, B. H.; Beecroft, S. M.; German, J. B.; Lebrilla, C. B. *Analytical Chemistry* 2008, 80, 3684-3692.
82. Seipert, R. R.; Dodds, E. D.; Lebrilla, C. B. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 493-501.
83. Bowers, W. D.; Delbert, S. S.; Hunter, R. L.; McIver, R. T. *Journal of the American Chemical Society* 1984, 106, 7288-7289
84. Wilson, J. J.; Brodbelt, J. S. *Analytical Chemistry* 2008, 80, 5186-5196
85. Ko, B. J.; Brodbelt, J. S. *J. Mass Spectrom.* 2011, 46, 359-366
86. Devakumar, A.; Thompson, M. S.; Reilly, J. P. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005, 19, 2313-20
87. Devakumar, A.; Mechref, Y.; Kang, P.; Novotny, M. V.; Reilly, J. P. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 21, 1452-1460
88. Devakumar, A.; Mechref, Y.; Kang, P.; Novotny, M. V.; Reilly, J. P. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008, 19, 1027-1040
89. Racaud, A.; Antoine, R.; Joly, L.; Mesplet, N.; Dugourd, P.; Lemoine, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2009, 20, 1645-1651
90. Racaud, A.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Lemoine, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2010, 21, 2077-2084
91. Rigouin, C.; Ladrat, C. D.; Siquin, C.; Collic-Jouault, S.; Dion, M. *Carbohydrate Polymers* 2009, 76, 279-284
92. Keller, B. O.; Suj, J.; Young, A. B.; Whittall, R. M. *Analytica Chimica Acta* 2008, 627, 71-81
93. Ridlova, G.; Mortimer, J. C.; Maslen, S. L.; Dupree, P.; Stephens, E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, 22, 2723-2730

94. Kang, M. J.; Tholey, A.; Heinzle, E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, 15, 1327-1333
95. Lerouxel, O.; Choo, T. S.; Seveno, M.; Usadel, B.; Faye, L.; Lerouge, P.; Pauly, M. *Plant Physiol.* 2002, 130, 1754-1763.
96. Obel, N.; Erben, V.; Schwarz, T.; Kuhnel, S.; Fodor, A.; Pauly, M. *Mol. Plant.* 2009, 2, 922-932.
97. Westphal, Y.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J.; Gruppen, H. J. *Agric. Food Chem.* 2010, 58, 4644-4652.
98. Leboeuf, E.; Immerzeel, P.; Gibon, Y.; Steup, M.; Pauly, M. *Analytical Biochemistry* 2008, 373, 9-17.
99. Mohr, M. D.; Bornsen, K. O.; Widmer, H. M. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1995, 9, 809-814.
100. Nonami, H.; Tanaka, K.; Fukuyama, Y.; Erra-Balsells, R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1998, 12, 285-296
101. Mank, M.; Stahl, B.; Boehm, G. n. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 2938-2950.
102. Wong, A. W.; Cancilla, M. T.; Voss, L. R.; Lebrilla, C. B. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 205-211
103. St Hilaire, P. M.; Cipolla, L.; Tedebark, U.; Meldal, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 1475-1484
104. Isbell, D. T.; Gusev, A. I.; Taranenko, N. I.; Chen, C. H.; Hercules, D. M. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 365, 625-630
105. Santos, L. S.; Haddad, R.; Hoehr, N. F.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 2144-2147
106. Dreisewerd, K.; Muthing, J.; Rohlfing, A.; Meisen, I.; Vukelic, Z.; Peter-Katalinic, J.; Hillenkamp, F.; Berkenkamp, S. *Analytical Chemistry* 2005, 77, 4098-4107
107. Ivleva, V. B.; Sapp, L. M.; O'Connor, P. B.; Costello, C. E. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, 16, 1552-1560
108. Muthing, J.; Distler, U. *Mass Spectrom. Rev.* 2009, 29, 425-479.
109. Nakamura, K.; Suzuki, Y.; Goto-Inoue, N.; Yoshida-Noro, C.; Suzuki, A. *Analytical Chemistry* 2006, 78, 5736-5743
110. Souady, J.; Soltwisch, J.; Dreisewerd, K.; Haier, J.; Peter-Katalinic, J.; Muthing, J. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 9481-9492.
111. Fuchs, B.; Schiller, J.; Suss, R.; Schurenberg, M.; Suckau, D. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 827-834.
112. Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Taki, T.; Gonzalez, T. V.; Setou, M. J. *Chromatogr. A* 2009, 1216, 7096-7101.

113. Stubiger, G.; Pittenauer, E.; Belgacem, O.; Rehulka, P.; Widhalm, K.; Allmaier, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 2711-2723.
114. Dreisewerd, K.; Kolbl, S.; Peter-Katalinic, J.; Berkenkamp, S.; Pohlentz, G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, 17, 139-150.
115. Menzel, C.; Dreisewerd, K.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom.* 2001, 207, 73-96.
116. Dreisewerd, K. *Chem. Rev.* 2003, 103, 395-425.
117. Nimptsch, K.; Suss, R.; Riemer, T.; Nimptsch, A.; Schnabelrauch, M.; Schiller, J. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 3711-3715.
118. Wegener, J.; Zschornig, K.; Onischke, K.; Fuchs, B.; Schiller, J.; Muller, K. *Exp. Gerontol.* 2013, 48, 213-222.
119. Panchagnula, V.; Mikulskis, A.; Song, L.; Wang, Y.; Wang, M.; Knubovets, T.; Scrivener, E.; Golenko, E.; Krull, I. S.; Schulz, M.; Heinz Emil, H.; Patton, W. F. *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 112-123
120. Kim, S. H.; Shin, C. M.; Yoo, J. S. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1998, 12, 701-704
121. Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2007, 18, 1646-1652
122. Hensel, R. R.; King, R. C.; Owens, K. G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1997, 11, 1785-1793.
123. Brokl, M.; Hernandez-Hernandez, O.; Soria, A.C.; Sanz, M.L. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 7697-7703
124. Doneanu, C. E.; Chen, W. B.; Gebler, J. C. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 3485-3499
125. Melmer, M.; Stangler, T.; Premstaller, A.; Lindner, W. J. *J. Chromatogr. A* 2010, 1218, 118-123.
126. Charlwood, J.; Tolson, D.; Dwek, M.; Camilleri, P. *Analytical Biochemistry* 1999, 273, 261-277
127. Rasmussen, L. E.; Meyer, A. S. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 58, 762-769
128. Quemener, B.; Desire, C.; Lahaye, M.; Debrauwer, L.; Negroni, L. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2003, 9, 45-60.
129. Leijdekkers, A. G. M.; Sanders, M. G.; Schols, H. A.; Gruppen, H. J. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 9227-9235.
130. Westphal, Y.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J.; Gruppen, H. J. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 689-695.
131. Galeotti, F.; Volpi, N. *Analytical Chemistry* 2011, 83, 6770-6777
132. Gennaro, L. A.; Harvey, D. J.; Vouros, P. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003, 17, 1528-1534

133. Vailaya, A.; Horvath, C. J. *Chromatogr. A* 1998, 829, 1-27.
134. Kuberan, B.; Lech, M.; Zhang, L.; Wu, Z. L.; Beeler, D. L.; Rosenberg, R. D. *Journal of the American Chemical Society* 2002, 124, 8707-8718
135. Thanawiroon, C.; Linhardt, R. J. *J. Chromatogr. A* 2003, 1014, 215-223
136. Thanawiroon, C.; Rice, K. G.; Toida, T.; Linhardt, R. J. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279, 2608-2615
137. Korir, A. K.; Lirntiaco, J. F. K.; Gutierrez, S. M.; Larive, C. K. *Analytical Chemistry* 2008, 80, 1297-1306
138. Brustkern, A.M.; Buhse, L.F.; Nasr, M.; Al-Hakim, A.; Keire, D.A. *Analytical Chemistry* 2010, 82, 9865–9870
139. Jones, C.J.; Membreno, N.; Larive, C.K. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 479–488,
140. Ji, D.; Roman, M.; Zhou, J.; Hildreth, J. J. *AOAC Int.* 2007, 90, 659–669
141. Solakyildirim, K.; Zhang, Z.; Linhardt, R. J. *Analytical Biochemistry* 2009, 397, 24-28
142. Antonopoulos, A.; Favetta, P.; Helbert, W.; Lafosse, M. *Carbohydrate Research* 2004, 339, 1301-1309
143. Gao, Y.; Chen, H. M.; Xu, L. L.; Chen, D. Y.; Yan, X. J. *Chin. J. Anal. Chem.* 2009, 37, 1590-1595
144. van Alebeek, G. J. W. M.; Zabolina, O.; Beldman, G.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. *Carbohydrate Polymers* 2000, 43, 39-46
145. Pabst, M.; Fischl, R. M.; Brecker, L.; Morelle, W.; Fauland, A.; Kofeler, H.; Altmann, F.; Leonard, R. *Plant J.* 2013, 76, 61-72
146. Stevenson, T. T.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. *Carbohydrate Research* 1988, 182, 207-226.
147. Thomas, J. R.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. *Carbohydrate Research* 1989, 185, 261-277.
148. Seveno, M.; Voxeur, A.; Rihouey, C.; Wu, A. M.; Ishii, T.; Chevalier, C.; Ralet, M. C.; Driouich, A.; Marchant, A.; Lerouge, P. *Planta* 2009, 230, 947-957.
149. Glushka, J. N.; Terrell, M.; York, W. S.; O'Neill, M. A.; Gucwa, A.; Darvill, A. G.; Albersheim, P.; Prestegard, J. H. *Carbohydrate Research* 2003, 338, 341-352.
150. Matsunaga, T.; Ishii, T.; Matsumoto, S.; Higuchi, M.; Darvill, A.; Albersheim, P.; O'Neill, M. A. *Plant Physiol.* 2004, 134, 339-351.
151. Garozzo, D.; Giuffrida, M.; Impallomeni, G.; Ballistreri, A.; Montaudo, G. *Analytical Chemistry* 1990, 62, 279-286
152. Zhou, Z. R.; Ogden, S.; Leary, J. A. *J. Org. Chem.* 1990, 55, 5444-5446
153. Hofmeister, G. E.; Zhou, Z.; Leary, J. A. *Journal of the American Chemical Society* 1991, 113, 5964-5970
154. Harvey, D. J.; Mattu, T. S.; Wormald, M. R.; Royle, L.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Anal. Chem.* 2002, 74, 734-740

155. Wuhrer, M.; Deelder, A. M.; van der Burgt, Y. E. M. *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30, 664-680
156. Quemener, B.; Ordaz-Ortiz, J. J.; Saulnier, L. *Carbohydrate Research* 2006, 341, 1834-1847
157. Quemener, B.; Ralet, M. C. J. *Mass Spectrom.* 2004, 39, 1153-1160
158. Hehemann, J. H.; Correc, G.; Thomas, F.; Bernard, T.; Barbeyron, T.; Jam, M.; Helbert, W.; Michel, G.; Czjzek, M. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 30571-30584.
159. Pomin, V. H.; Mourao, P. A. S. *Glycobiology* 2008, 18, 1016-1027.
160. Inoue, N.; Yamano, N.; Sakata, K.; Nagao, K.; Hama, Y.; Ya-nagita, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, 73, 447-449.
161. Ishihara, K.; Oyamada, C.; Matsushima, R.; Murata, M.; Mu-raoka, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69, 1824-1830.
162. van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A. I.; Rollema, H. S.; Cerezo, A. S. *Trends in Food Science & Technology* 2002, 13, 73-92.
163. Lahaye, M.; Yaphe, W.; Viet, M. T. P.; Rochas, C. *Carbohydrate Research* 1989, 190, 249-265.
164. Naggar, E. F.; Costello, C. E.; Zaia, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2004, 15, 1534-1544
165. Kenny, D. T.; Issa, S. M. A.; Karlsson, N. G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2011, 25, 2611-2618.
166. Correc, G.; Hehemann, J. H.; Czjzek, M.; Helbert, W. *Carbohydrate Polymers* 2011, 83, 277-283.
167. Velickovic, D.; Ropartz, D.; Guillon, F.; Saulnier, L.; Rogniaux, H. J. *Exp. Bot.* 2014, 65, 2079-2091
168. Veličković, D.; Herdier, H.; Philippe, G.; Marion, D.; Rogniaux, H.; Bakan, B. *The Plant Journal* 2014, 80, 926-935

SYNTHESE DES REALISATIONS

SYNTHESE DES REALISATIONS

Publications :

- Ropartz, D.; Bodet, P.-E.; Przybylski, C.; Gonnet, F.; Daniel, R.; Fer, M.; Helbert, W.; Bertrand, D.; Rogniaux, H. Performance evaluation on a wide set of matrix-assisted laser desorption ionization matrices for the detection of oligosaccharides in a high-throughput mass spectrometric screening of carbohydrate depolymerizing enzymes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2011, 25, 2059-2070.
- Velickovic, D.; Ropartz, D.; Guillon, F.; Saulnier, L.; Rogniaux, H. New insights into the structural and spatial variability of cell-wall polysaccharides during wheat grain development, as revealed through MALDI mass spectrometry imaging. *Journal of Experimental Botany* 2014, 65, 2079-2091.
- Buffetto, F.; Ropartz, D.; Zhang, X. J.; Gilbert, H. J.; Guillon, F.; Ralet, M.-C. Recovery and fine structure variability of RGII sub-domains in wine (*Vitis vinifera* Merlot). *Annals of Botany* 2014, 114, 1327-1337.
- Ropartz, D.; Lemoine, J.; Giuliani, A.; Bittebière, Y.; Enjalbert, Q.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Ralet, M.-C.; Rogniaux, H. Deciphering the structure of isomeric oligosaccharides in a complex mixture by tandem mass spectrometry: Photon activation with vacuum ultra-violet brings unique information and enables definitive structure assignment. *Analytica Chimica Acta* 2014, 807, 84-95.
- Ropartz, D.; Giuliani, A.; Hervé, C.; Geairon, A.; Jam, M.; Czjzek, M.; Rogniaux, H. High-energy photon activation tandem mass spectrometry provides unprecedented insights into the structure of highly sulfated oligosaccharides extracted from macroalgal cell walls. *Analytical Chemistry*. Accepté le 13/12/14.

Communications orales :

- Ropartz, D.; Giuliani, A.; Ralet, M.-C.; Lemoine, J.; Rogniaux, H. Deciphering the structure of plant wall polysaccharides by emerging mass spectrometry techniques: an illustration. *Plant and Seaweed Polysaccharides Symposium (PSP 2012)*, 17 - 20 Juillet 2012, Nantes, France
- Ropartz, D.; Giuliani, A.; Ralet, M.-C.; Lemoine, J.; Rogniaux, H. Deciphering the structure of isomeric acidic oligosaccharides by IP-RP-UPLC and photo-dissociation in vacuum UV tandem MS. *Journée Jeunes Chercheurs BIA (JCC 2013)* 20 Juin 2013, Nantes, France
- Ropartz, D.; Giuliani, A.; Ralet, M.-C.; Lemoine, J.; Bittebière, Y.; Dugourd, P.; Ralet, M.-C.; Rogniaux, H. Deciphering the structure of oligosaccharides by a new tandem mass spectrometry method based on photo-activation in the VUV range. *EuPA 2013 Scientific*

Meeting, 14 – 17 octobre 2013, St Malo, France

- Ropartz, D.; Giuliani, A.; Ralet, M.-C.; Lemoine, J.; Rogniaux, H. Unraveling isomeric structures of oligosaccharides by VUVPD and VUVEPD experiments: Towards an unambiguous and complete sequencing of Isomers. 9th SOLEIL Users meeting, 23-24 Janvier 2014, St Aubin, France

Communications par affichage :

- Ropartz, D.; Bodet, P.-E.; Przybylski, C.; Fer, M.; Helbert, W.; Gonnet, F.; Daniel, R.; Bertrand, D.; Rogniaux, H. Implementation of a high throughput MALDI-MS platform for the discovery of carbohydrates depolymerising enzymes XVI European Carbohydrate Symposium (EuroCarb 16), 3 – 8 Juillet 2011, Sorrento, Italy
- Ropartz, D.; Bittebière, Y.; Daligault, F.; Tellier, C.; Rogniaux, H. Coupling Thin-Layer Chromatography to MALDI Mass Spectrometry: a straight and performant method for the analysis of regio-isomeric oligosaccharides. 26th International Carbohydrate Symposium (ICS 2012), 22 – 27 Juillet 2012, Madrid, Spain
- Ropartz, D.; Giuliani, A.; Enjalbert, Q.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Ralet, M.-C.; Lemoine, J.; Rogniaux, H. Deciphering the structure of isomeric acidic oligosaccharides by IPR-UPLC and photo-dissociation in vacuum UV (VUVPD) tandem mass spectrometry." 10th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM 2013), 21 – 24 Avril 2013, Prague, Czech Republic

Article de communication :

- Fait marquant du département CEPIA, Recherches et innovations 2014 : Au coeur de l'aliment : dans l'intimité de la matière : Casser des sucres avec de la lumière, pourquoi et comment? (<http://www.cepia.inra.fr/Toutes-les-actualites/actu-recherches-et-innovations-2014>)
- Actualité ligne DISCO (vulgarisation scientifique) 2014 : DISCO : Comment casser des sucres avec de la lumière, et dans quel but ? (<http://www.synchrotron-soleil.fr/Soleil/ToutesActualites/2014/DISCO-Ropartz>)
- Fait marquant directoriales SOLEIL 2014 : Comment fragmenter des ions avec de la lumière

Projets scientifiques portés :

- Proposal_20110995 (Synchrotron SOLEIL, France) : Characterization of different chemical classes of oligosaccharides isomers using photofragmentation in vacuum ultraviolet light

- Proposal_20120759 (Synchrotron SOLEIL, France): Unraveling isomeric structures of polysaccharides by VUVPD and VUVEPD experiments: towards an unambiguous and complete sequencing of isomers. En collaboration avec Station Biologique de Roscoff, Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins (LBI2M), UMR 8227, CNRS and Université Pierre et Marie Curie (UPMC)
- Proposal_ 20131110 (Synchrotron SOLEIL, France): Online coupling of an ultra-high performance liquid chromatography system (UHPLC) to the APEX end-station of the DISCO beamline. Application to the automated structural analysis of acidic oligosaccharides, fragmented through photo-activation in the VUV

Encadrement stagiaires :

- Yann Bittebière, 6 mois, 2012, Master 2 "Méthodes Spectroscopiques d'Analyses, Université de Rennes. "Développement d'une méthode d'analyse couplant la chromatographie couche mince et la spectrométrie de masse MALDI pour l'analyse de régio-isomères d'oligosaccharides."
- Mathieu Fanuel, 6 mois, 2013, Master 1 "Analyse, Molécules, Matériaux, Médicaments", Université de Nantes. "Application des techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse pour la caractérisation d'isomères d'oligosaccharides en mélange."
- Djibril War, 6 mois, 2014, Master 2 Analyse, Molécules, Matériaux, Médicaments, Université de Nantes. "Apport de la mobilité ionique à la résolution structurale d'isomères d'oligosaccharides."

Enseignements :

- Organisation et coordination du "WallTrac Training Event 6" (réseau ITN WallTrac, Grant Agreement Nr 263916). "Mass spectrometry and standard for Quality Management Systems." 21-23 May 2014. Enseignements assurés personnellement: 6h cours magistraux, 6 heures Travaux pratiques, 6h Travaux dirigés, 25 personnes anglophones.
- Enseignement de 4 H (en anglais) dans le cadre d'un échange Européen de doctorants : Formation "Glycoconjugués : à l'interface de la chimie et de la biologie" : Mass spectrometry for the analysis of polysaccharides, 22 Mars 2013, Université de Nantes.

ANNEXES

ANNEXE 1

-

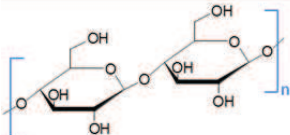
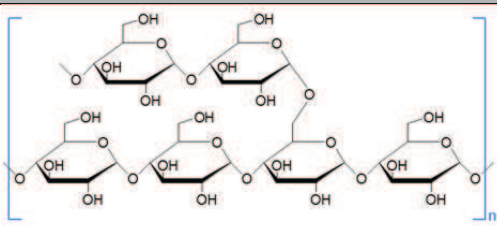
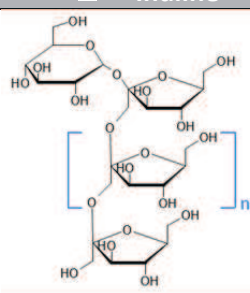
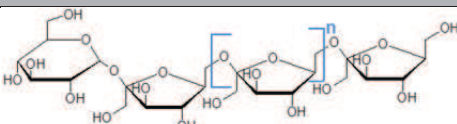
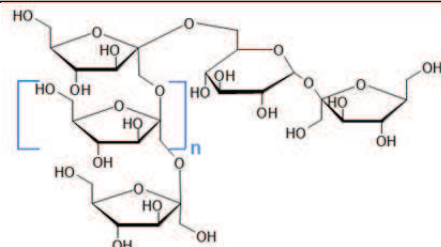
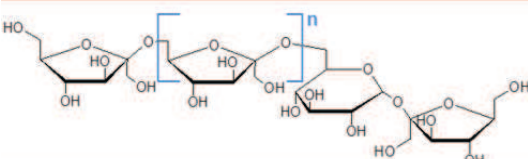
Structure des oligosaccharides discutés dans le
manuscrit

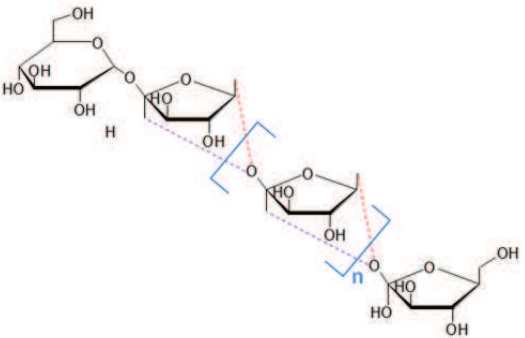
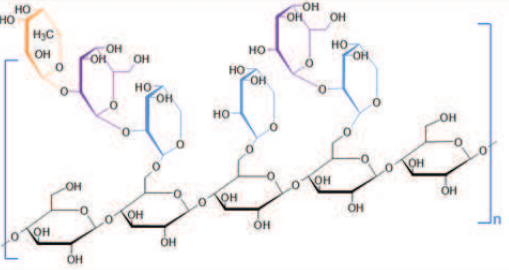
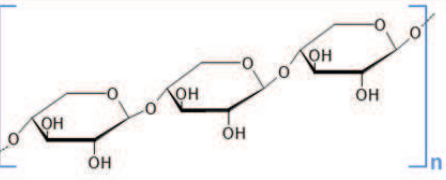
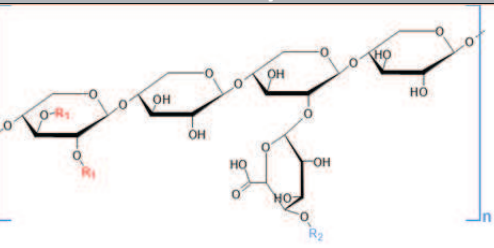
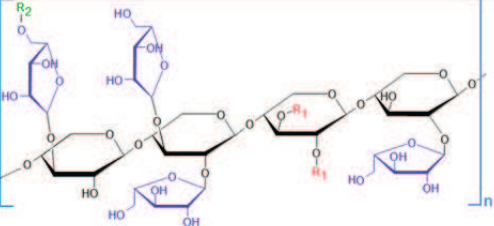
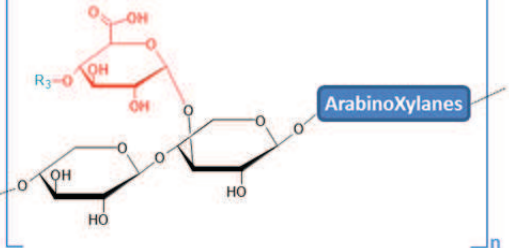
Structure des oligosaccharides discutés dans le manuscrit

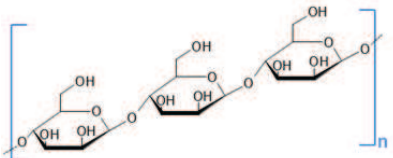
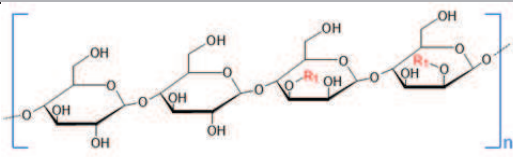
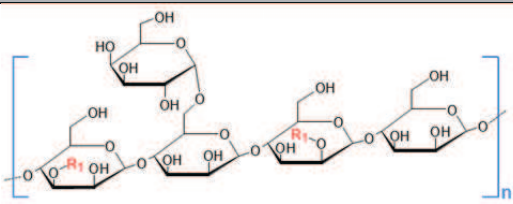
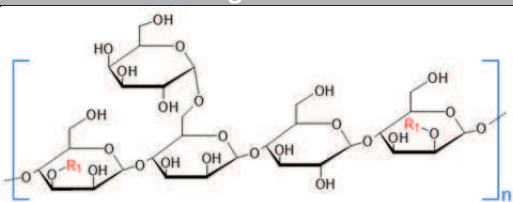
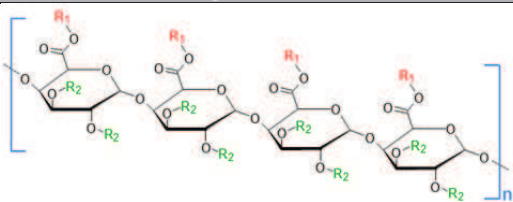
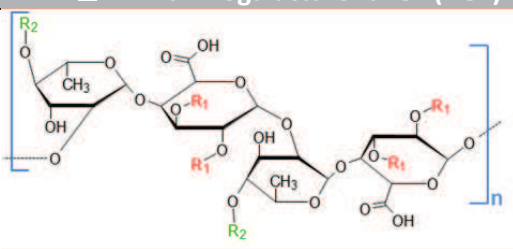
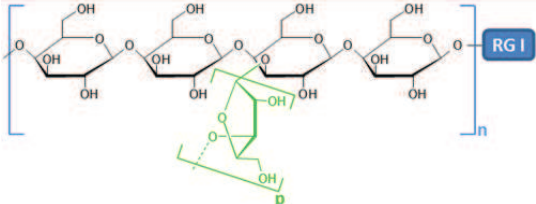
Famille de Polysaccharides

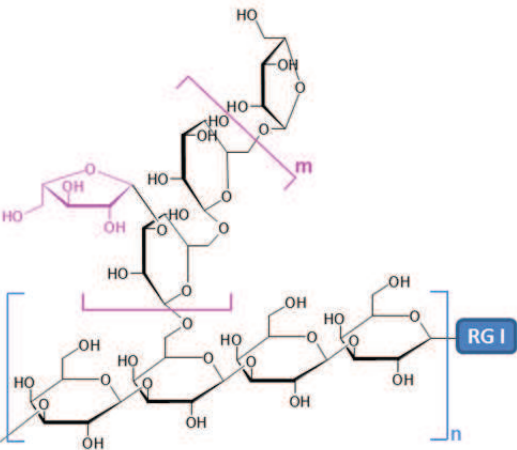
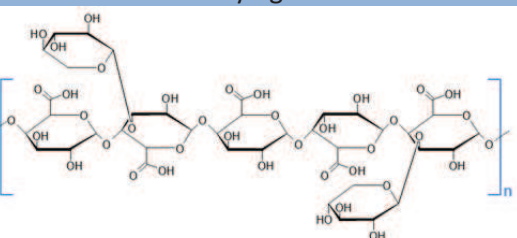
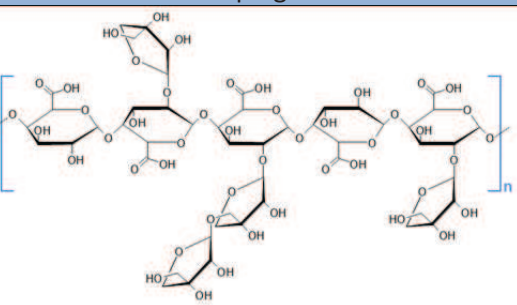
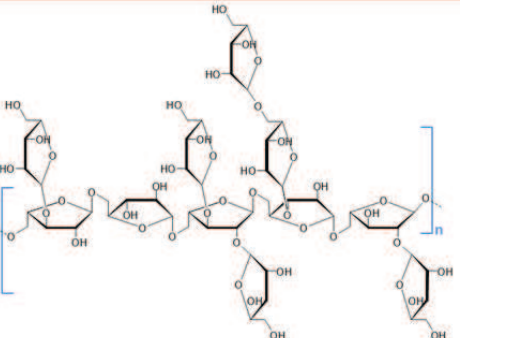
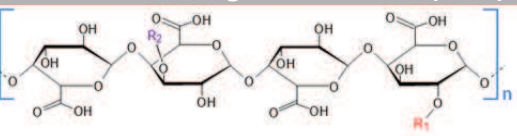
Polysaccharides

Chaînes latérales oligo- ou polysaccharidiques

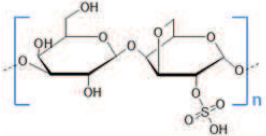
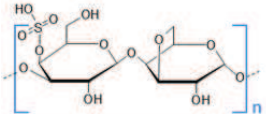
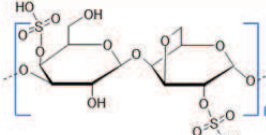
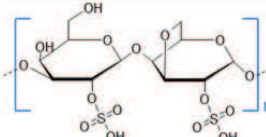
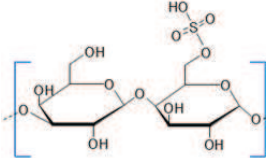
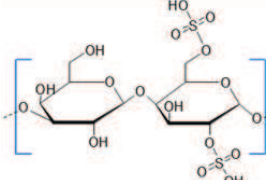
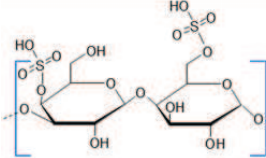
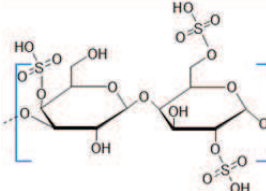
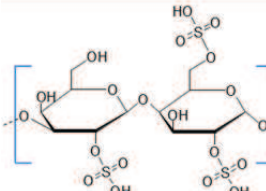
Cellulose :	
	- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose
Amidon :	
	- α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose + α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranose - Constitué : - d'amylose (légèrement ramifiée) - d'amylopectine (longues ramifications tous les 20-30 glucoses de la chaîne principale)
Fructanes	
Inuline	
	- [α -D-glucopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranose]- [β -(1 $\rightarrow$ 2)-D-fructofuranose] $_n$ - β -(1 $\rightarrow$ 2)-D-fructofuranose
lévane	
	- [α -D-glucopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranose]- [β -(2 $\rightarrow$ 6)-D-fructofuranose] $_n$ - β -(2 $\rightarrow$ 6)-D-fructofuranose
Néosérie type inuline	
	- [β -D-fructofuranose α -(2 $\rightarrow$ 1)-D-glucopyranose- β -(6 $\rightarrow$ 2)-D-fructofuranose]-[β -(1 $\rightarrow$ 2)- D-fructofuranose] $_n$ - β -(1 $\rightarrow$ 2)-D-fructofuranose
Néosérie type lévane	
	- [β -D-fructofuranose α -(2 $\rightarrow$ 1)-D-glucopyranose]- [β -(6 $\rightarrow$ 2)-D-fructofuranose] $_n$ - β -(6 $\rightarrow$ 2)-D-fructofuranose

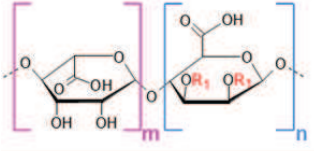
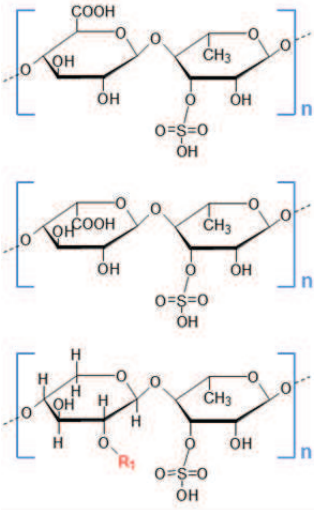
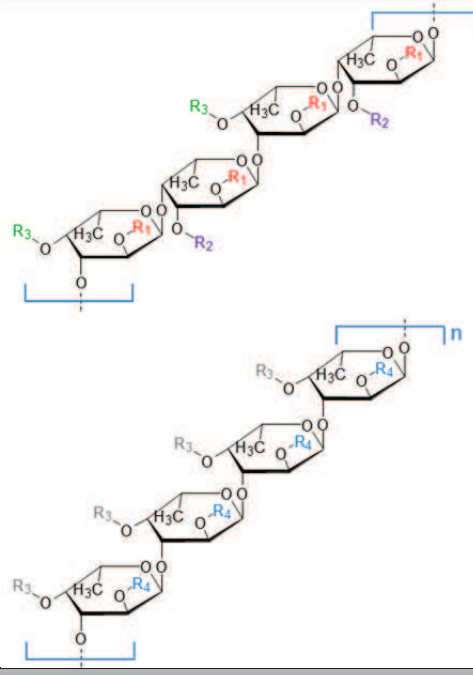
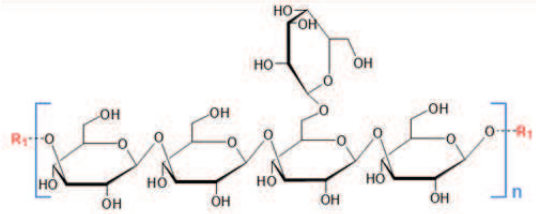
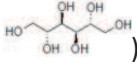
Graminane	
	- [α-D-glucopyranose-(1→2)-β-D-fructofuranose]-[β-(1→2 ou 6→2)-D-fructofuranose]_n-β-(1→2)-D-fructofuranose
Hemicelluloses	
Xyloglucane	
	- β-(1→4)-D-glucopyranose - Substitué par α (1→6)-D-xylopyranose lui-même pouvant être substitué par (β-(1→2)-D-galactopyranose pouvant être substitué par α-(1→2)-L-fucopyranose)
Xylane	
	- β-(1→4)-D-xylopyranose
Glucuronoxylane	
	- β-(1→4)-D-xylopyranose ($R_1 = -H$ ou $-CO-CH_3$) - Substitué en C2 par un α-(1→2)-D-acide glucuronique ($R_2 = -H$ ou $-CH_3$).
Arabinoxylane	
	- Chaîne linéaire : β-(1→4)-D-xylopyranose ($R_1 = -H$ ou $-CO-CH_3$) - Substitué en C2 et/ou C3 par un α-(1→2)-L-arabinofuranose ($R_2 = -H$ ou acide ferrulique ou acide p-coumarique)
Glucuronoarabinoxylane	
	- β-(1→4)-D-xylopyranose - substitué en C3 par un α-(1→3)-D-acide glucuronique ($R_2 = -H$ ou $-CH_3$).

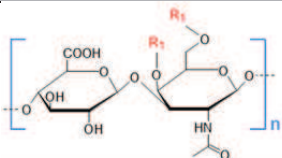
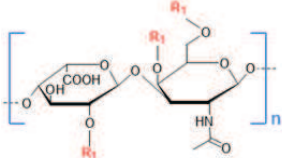
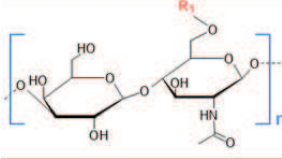
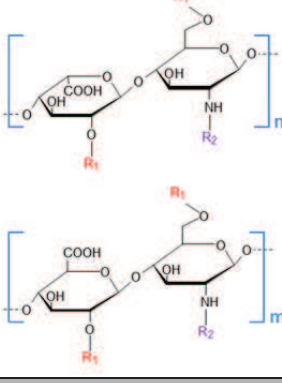
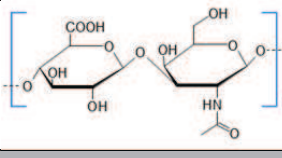
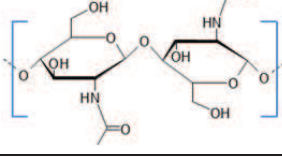
■ Mannane	
	- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannopyranose
■ Glucomannane	
	- β -(1 $\rightarrow$ 4)-[D-mannopyranose- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose] $_n$ (R_1 = -H ou -CO-CH ₃)
■ Galactomannane	
	- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannopyranose (R_1 = -H ou -CO-CH ₃) - Substitué par : α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactopyranose
■ Galactoglucomannane	
	- β -(1 $\rightarrow$ 4)-[D-mannopyranose (R_1 = -H ou -CO-CH ₃)- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose] $_n$ - Substitué par : α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactopyranose
Pectines	
■ Homogalacturonane	
	- α -(1 $\rightarrow$ 4)-acide-D-galacturonopyranose (R_1 = -H ou -CH ₃) (R_2 = -H ou -CO-CH ₃)
■ Rhamnogalacturonane I (RG I)	
	- α -(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-rhamnopyranose-(1 $\rightarrow$ 4)-acide-D-galacturonopyranose] $_n$ (R_1 = -H ou -CO-CH ₃) (R_2 = -H ou β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactopyranose ou arabinanes ou arabinogalactanes (type 1 et 2) ou xylogalacturonanes)
■ Arabinogalactane type 1	
	- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactopyranose - Substitué en C ₃ par des chaines courtes α -(1 $\rightarrow$ 3)-L-arabinofuranose

■ Arabinogalactane type 2	
	- β-(1$\rightarrow$3)-D-galactopyranose - Substitué en C₆ par des chaînes courtes β-(1$\rightarrow$6)-D-galactopyranose, terminé par un résidu α-(1$\rightarrow$6)-L-arabinofuranose et, pouvant être substitué en C₃ α-(1$\rightarrow$3)-L-arabinofuranose
■ Xylogalacturonane	
	- α-(1$\rightarrow$4)-acide-D-galacturonopyranose - Substitué en C₃ par des résidus β-(1$\rightarrow$3)-D-xylopyranose
■ Apiogalacturonane	
	- α-(1$\rightarrow$4)-acide-D-galacturonopyranose - Substitué en C₂ par des résidus β-D-apiofuranose ou des dimères β-(1$\rightarrow$3)-D-apiofuranose
■ Arabinane	
	- α-(1$\rightarrow$5)-L-arabinofuranose - substitué en C₂ et/ou en C₃ par des résidus α-(1$\rightarrow$2)-L-arabinofuranose et ou α-(1$\rightarrow$3)-L-arabinofuranose et/ou des dimères en C₃ α-(1$\rightarrow$3)-L-arabinofuranose.
■ Rhamnogalacturonane 2 (RG II)	
	- α-(1$\rightarrow$4)-acide-D-galacturonopyranose (R_1= Chaîne A ou B) (R_2= Chaîne C, D ou E)

■ Chaîne A (liée en position 2)	
■ Chaîne B (liée en position 2)	
■ Chaîne C (liée en position 3)	
	- Acide- α -2-keto-3-deoxyoctonique-(4 $\rightarrow$ 1)- α -L-rhamnopyranose
■ Chaîne D (liée en position 3)	
	- Acide-3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique-(4 $\rightarrow$ 1)- β -L-arabinofuranose
■ Chaîne E (liée en position 3)	
	- α -L-arabinofuranose
Agaranes (Algues rouges)	
■ Agar	
	- α -(1 $\rightarrow$ 4)-[3,6-anhydro- α -L-galactopyranose-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-galactopyranose] $_n$ (R_1 = -H ou -CH ₃)
■ Porphyrane	
	- α -(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-galacturonic acid 6-sulfate-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-galactopyranose] $_n$ (R_1 = -H ou -CH ₃)
Carraghénanes (Algues rouges)	
■ β -carraghénane	
	α -(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-galactopyranose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anhydro- α -D-galactopyranose] $_n$

■ α-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-(1→4)-3,6-anhydro-α-D-galactopyranose-2-sulfate]_n
■ κ-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-4-sulfate-(1→4)-3,6-anhydro-α-D-galactopyranose]_n
■ ι-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-4-sulfate-(1→4)-3,6-anhydro-α-D-galactopyranose-2-sulfate]_n
■ θ-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-2-sulfate-(1→4)-3,6-anhydro-α-D-galactopyranose-2-sulfate]_n
■ γ-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-(1→4)-α-D-galactopyranose-6-sulfate]_n
■ δ-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-(1→4)-α-D-galactopyranose-2,6-disulfate]_n
■ μ-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-4-sulfate-(1→4)-α-D-galactopyranose-6-sulfate]_n
■ ν-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-4-sulfate-(1→4)-α-D-galactopyranose-2,6-disulfate]_n
■ λ-carraghénane 	- α-(1→3)-[β-D-galactopyranose-2-sulfate-(1→4)-α-D-galactopyranose-2,6-disulfate]_n

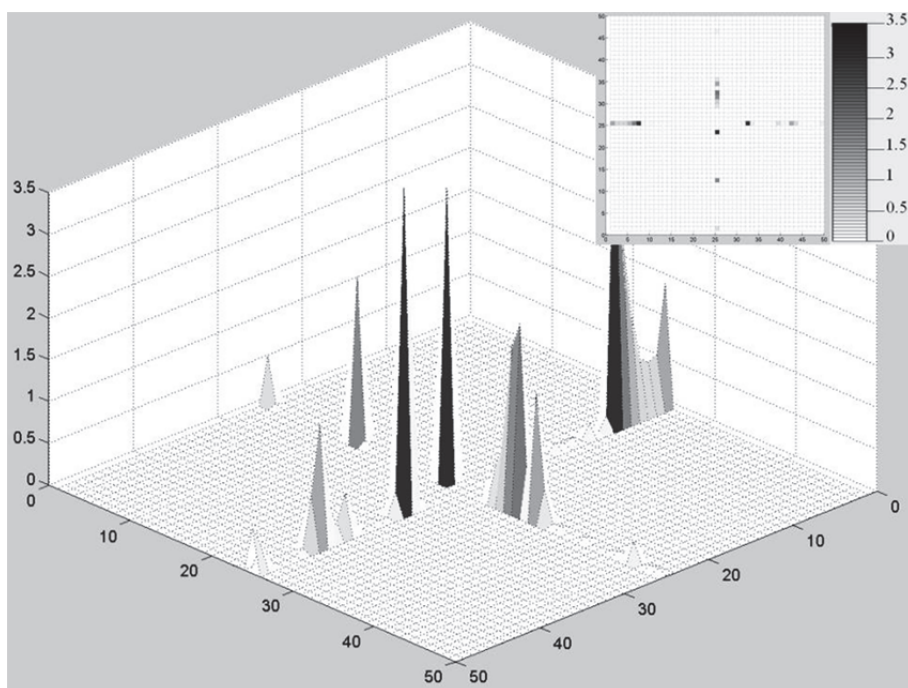
Alginate (Algues brunes)	
	- α-(1$\rightarrow$4)[α-acide-L-guluronopyranose]$_m$-[β-(1$\rightarrow$4)-acide -D-mannuronopyranose]$_n$ (R_1= -H ou -CO-CH₃) - Formé de bloc GG, MM ou d'alternance GM
Ulvanes (Algues VERTES)	
	mélange de 3 motifs : - α-(1$\rightarrow$4)-[β-acide-D-glucuronopyranose-(1$\rightarrow$4)-α-L-rhamnopyranose-3-sulfate]$_n$ - α-(1$\rightarrow$4)-[α-acide-L-iduronopyranose-(1$\rightarrow$4)-α-L-rhamnopyranose-3-sulfate]$_n$ - α-(1$\rightarrow$4)-[β-D-xylopyranose-(1$\rightarrow$4)-α-L-rhamnopyranose-3-sulfate]$_n$ (R_1=-H ou -SO₃H)
Fucoïdanes (Algues brunes)	
	- 2 Chaines linéaires distinctes : -α-(1$\rightarrow$3)-[α-L-fucopyranose-(1$\rightarrow$4)-α-L-fucopyranose]$_n$ (R_1=-H ou -SO₃H (hautement sulfaté)), (R_2=-H ou -SO₃H (faiblement sulfaté)), (R_3=-H ou -SO₃H ou (α-L-fucopyranose-(1$\rightarrow$4)-α-L-fucopyranose-(1$\rightarrow$3)-α-L-fucopyranose-(1$\rightarrow$-)) - α-(1$\rightarrow$3)-L-fucopyranose (R_4=-H ou -SO₃H ou α-L-fucopyranose-(1$\rightarrow$2) ou α-acide-L-glucuronique-(1$\rightarrow$2)) (R_5=-H ou -SO₃H)
Laminarane	
	- β-(1$\rightarrow$3)-D-glucopyranose (R_1= β-D-glucopyranose ou mannitol : ) - Substitué en C₆ par des chaines courtes β-(1$\rightarrow$6)-D-glucopyranose.

Glycosaminoglycanes	
■ Chondroïtine-sulfate	
	β -(1 $\rightarrow$ 4)-[β -acide-D-glucuronopyranose-(1 $\rightarrow$ 3)-N-actetyl- β -D-galactosamine- X -sulfate] $_n$ (X =4 ou 6) (R_1 = -H ou -SO ₃ H)
■ Dermatine sulfate	
	β -(1 $\rightarrow$ 4)-[α -acide-L-iduronopyranose- X ₁ -sulfate-(1 $\rightarrow$ 3)-N-actetyl- β -D-galactosamine- X ₂ -sulfate] $_n$ (X ₁ =2) (X ₂ =4 ou 6) (R_1 = -H ou -SO ₃ H)
■ Keratane sulfate	
	β -(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)-N-actetyl- β -D-glucosamine- X -sulfate] $_n$ (X =6) (R_1 = -H ou -SO ₃ H)
■ Heparane sulfate	
	2 motifs possibles : β -(1 $\rightarrow$ 4)-[α -acide-L-iduronopyranose- X ₁ -sulfate-(1 $\rightarrow$ 4)-(N-sulfate ou N-acetyl)- β -D-glucosamine- X ₂ -sulfate] $_n$ β -(1 $\rightarrow$ 4)-[α -acide-L-glucuronopyranose- X ₁ -sulfate-(1 $\rightarrow$ 4)-(N-sulfate ou N-acetyl)- β -D-glucosamine- X ₂ -sulfate] $_m$ (X ₁ =6) (X ₂ =6) (R_1 = -H ou -SO ₃ H) (R_2 = -H ou -SO ₃ H)
■ Acide hyaluronique	
	β -(1 $\rightarrow$ 4)-[β -acide-D-glucuronopyranose-(1 $\rightarrow$ 3)-N-actetyl- β -D-galactosamine] $_n$
■ Chitine	
	β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-actetyl-D-glucosamine - De-acétylé sur un des 2 oses $\rightarrow$ chitosane

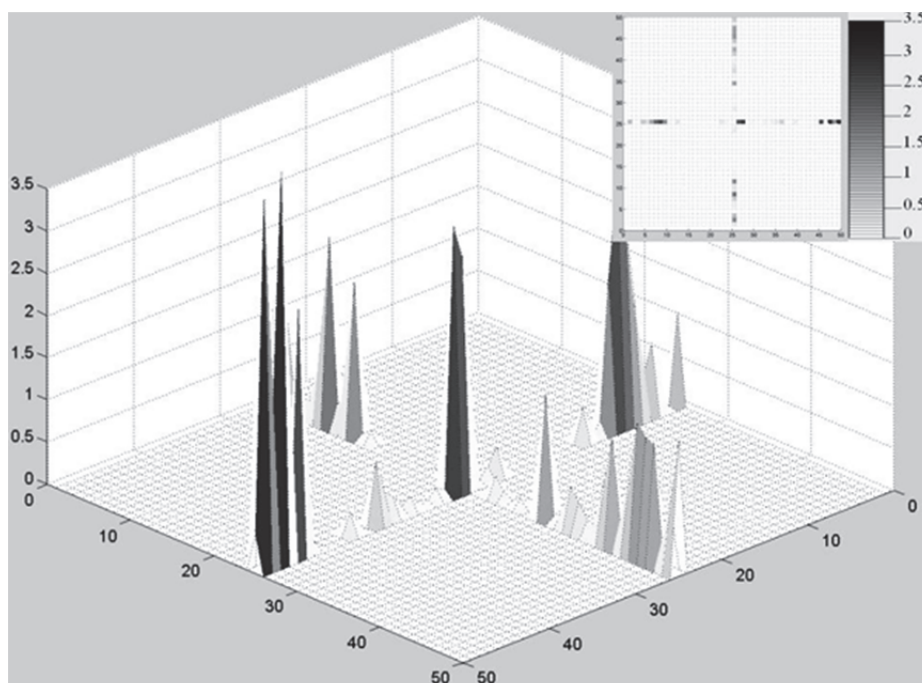
ANNEXE 2

-

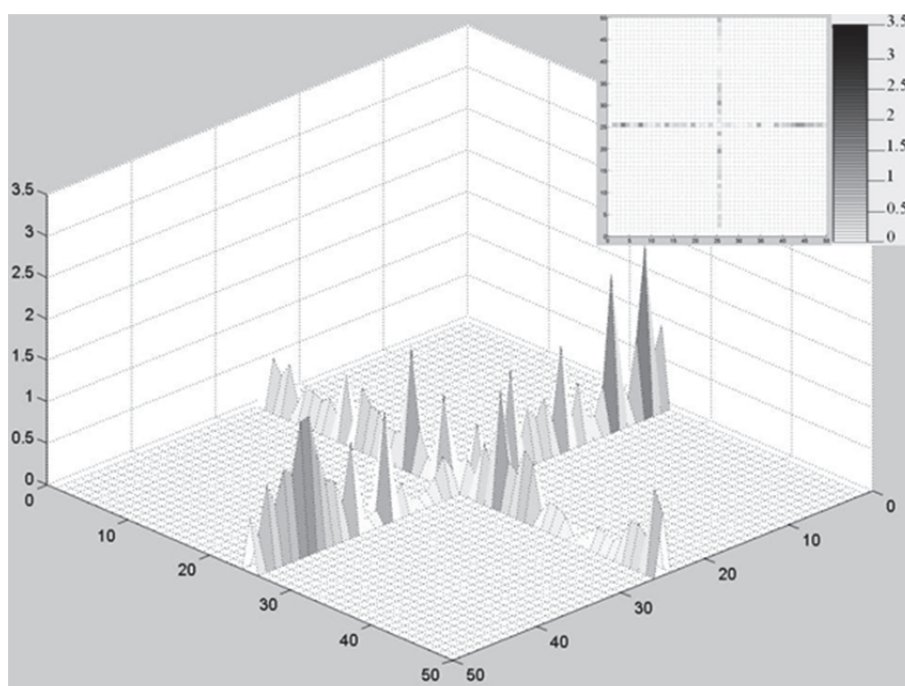
Données supplémentaires fournies avec la publication
Ropartz, D et al. RCMS 2011, 25, 2059-2070



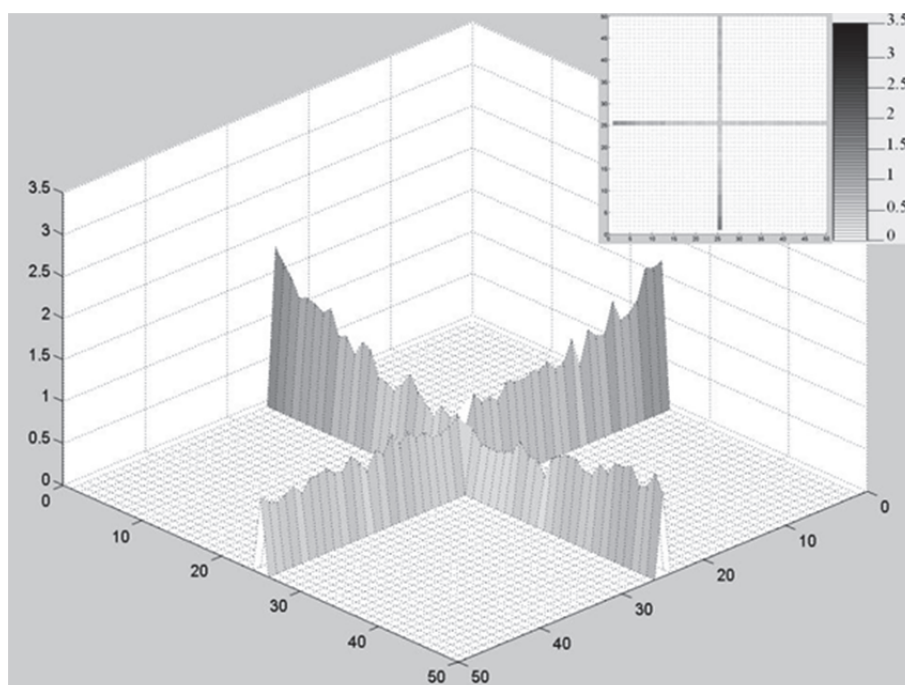
Supplementary data 1. Representation of galactomannans positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with DHB as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



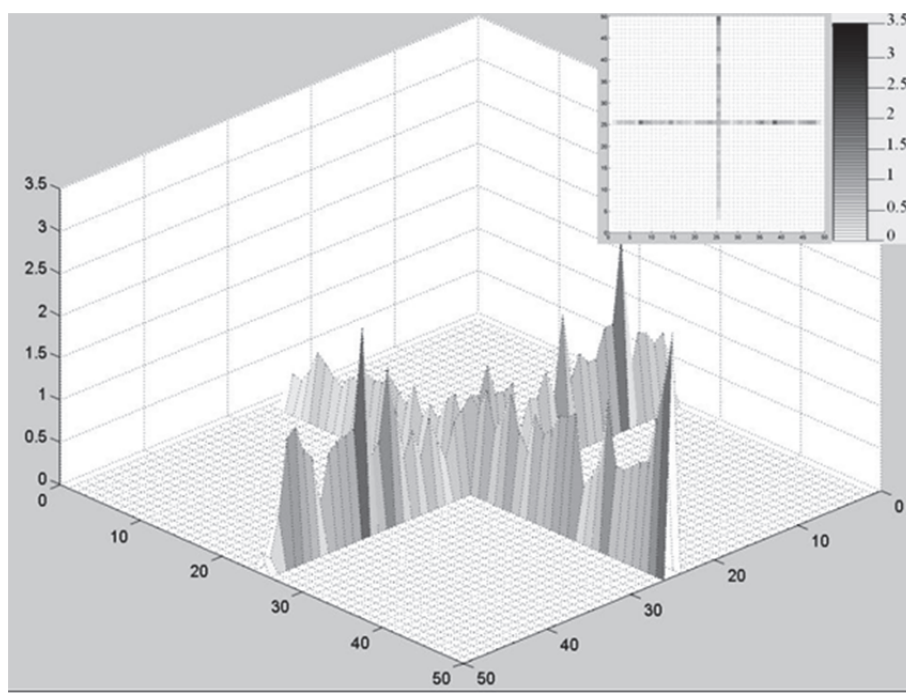
Supplementary data 2. Representation of galactomannans positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with DHB/THAP mixture as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



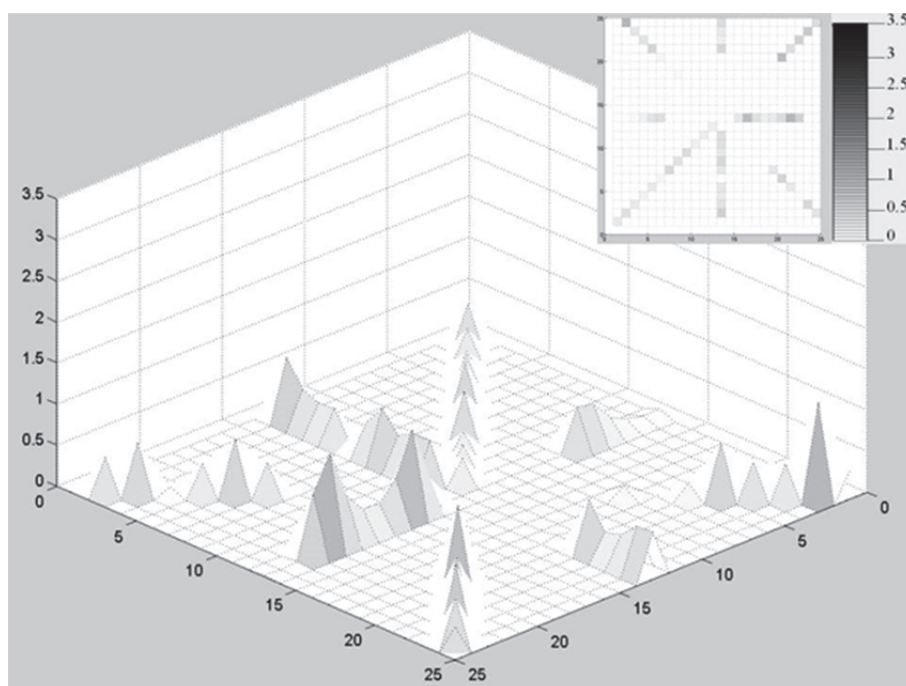
Supplementary data 3. Representation of galactomannans positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with sDHB as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



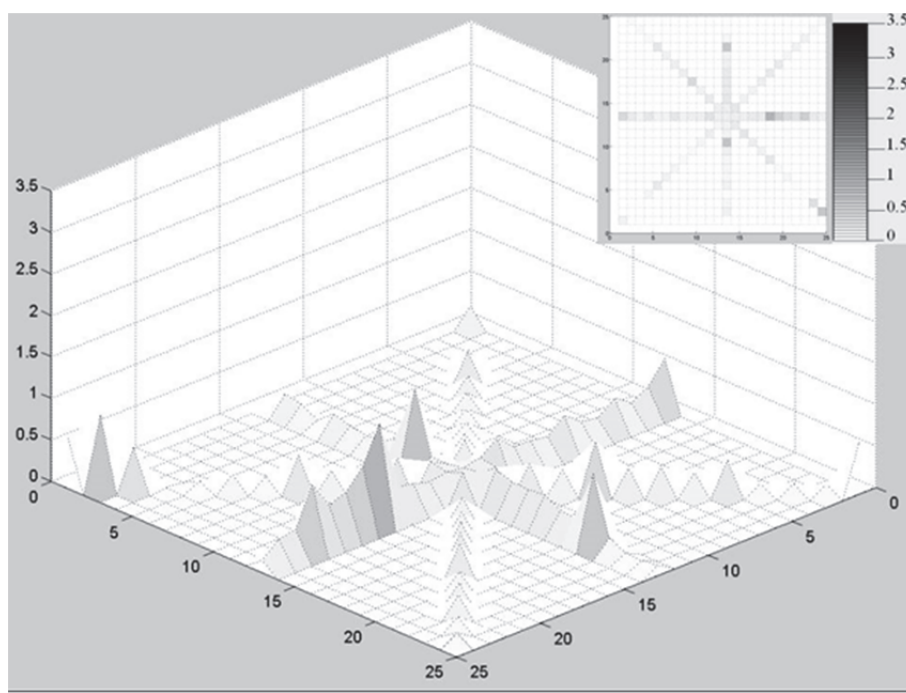
Supplementary data 4. Representation of galactomannans positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with HABA/TMG as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



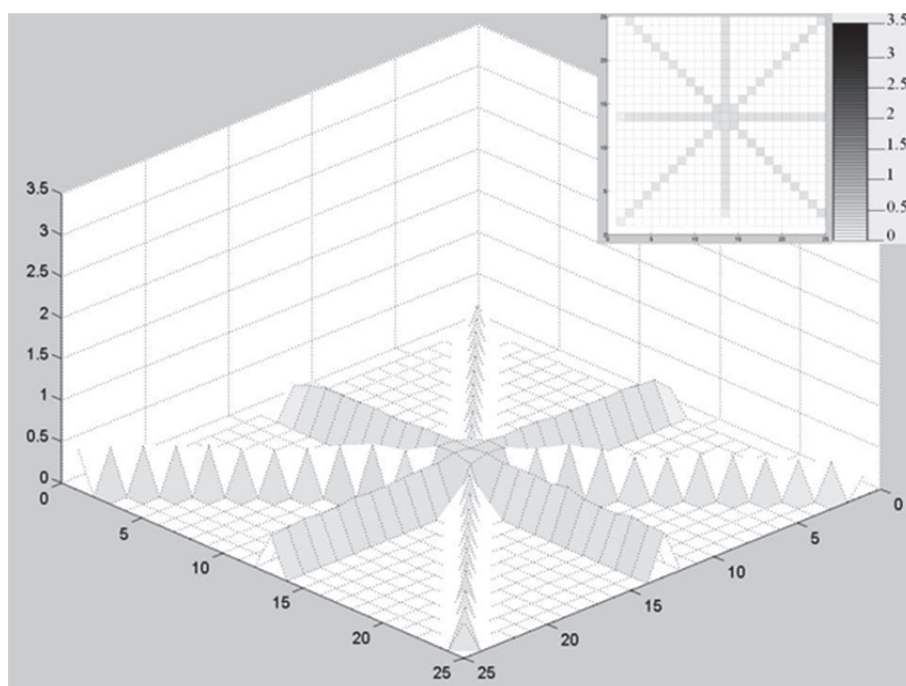
Supplementary data 5. Representation of galactomannans positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with DMA/DHB mixture as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



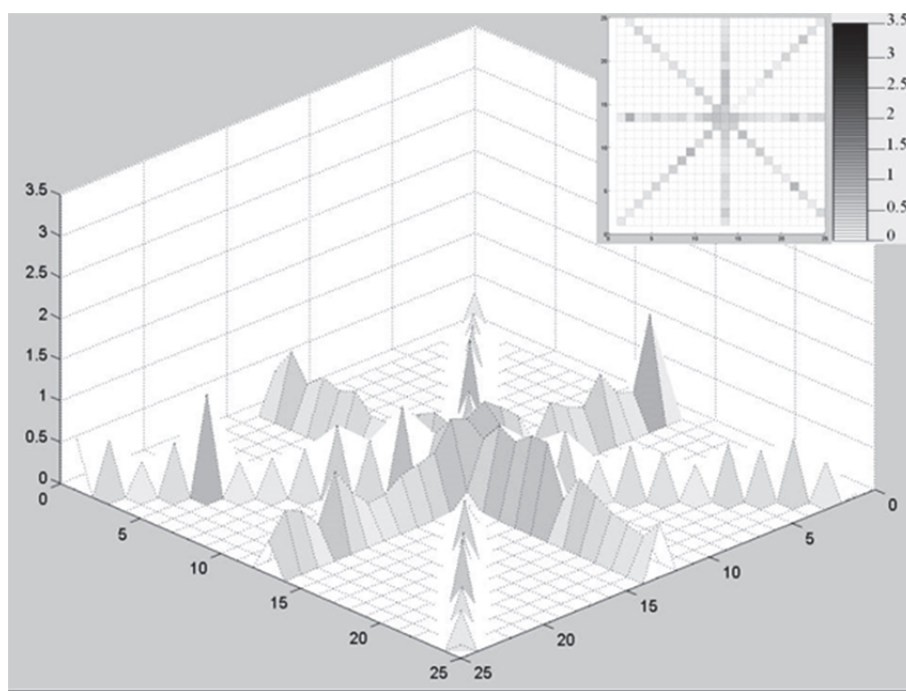
Supplementary data 6. Representation of iota carrageenan negative ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with nor-harmane mixture. In the right top corner, an overview of signal repartition.



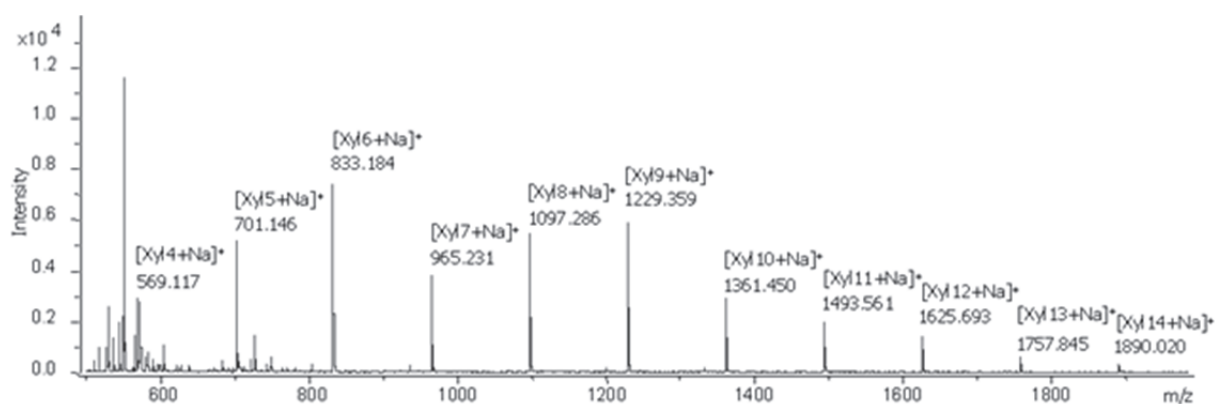
Supplementary data 7. Representation of iota carrageenan positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with harmane as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



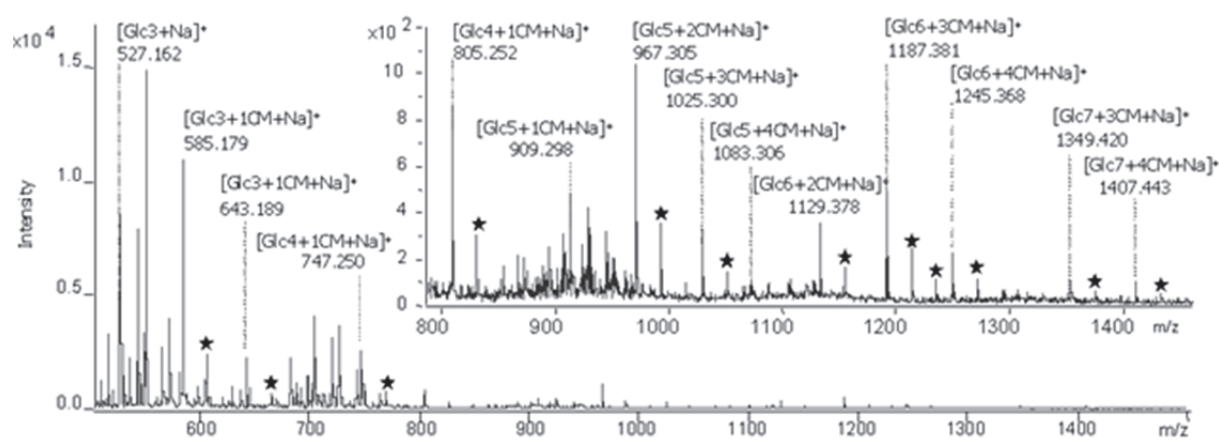
Supplementary data 8. Representation of iota carrageenan positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with HABA/TMG as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



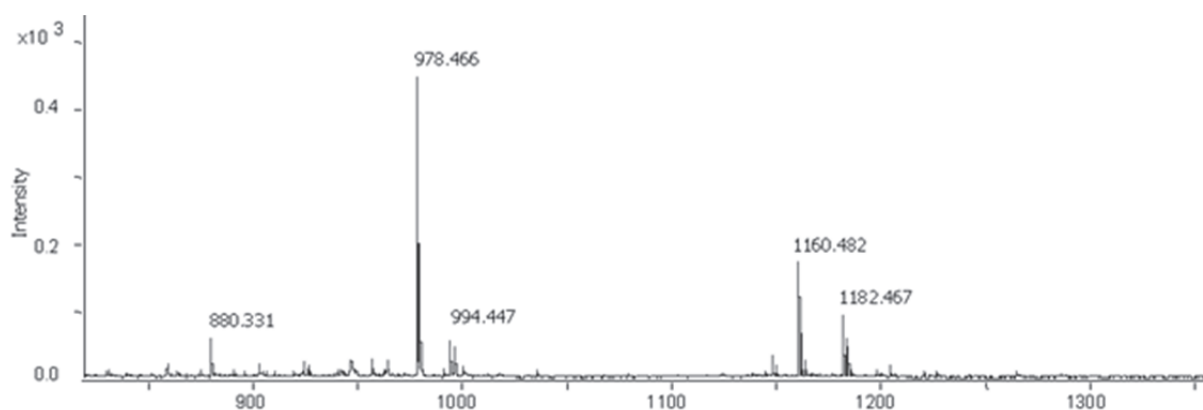
Supplementary data 9. Representation of iota carrageenan positive ion signal repartition obtained with 100 positions on a spot with DMA/DHB as matrix. In the right top corner, an overview of signal repartition.



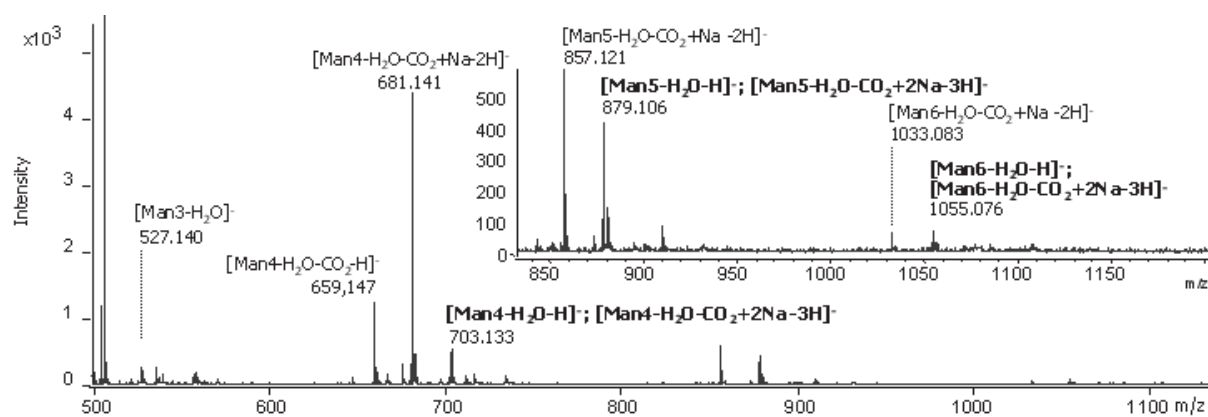
Supplementary data 10. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DMA/DHB as matrix from xylan incubated with *Alteromonas atlantica* crude bacterial extract in positive ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions $[M+Na]^+$. Depolymerization products are annotated by number of xylose (Xyl) subunit.



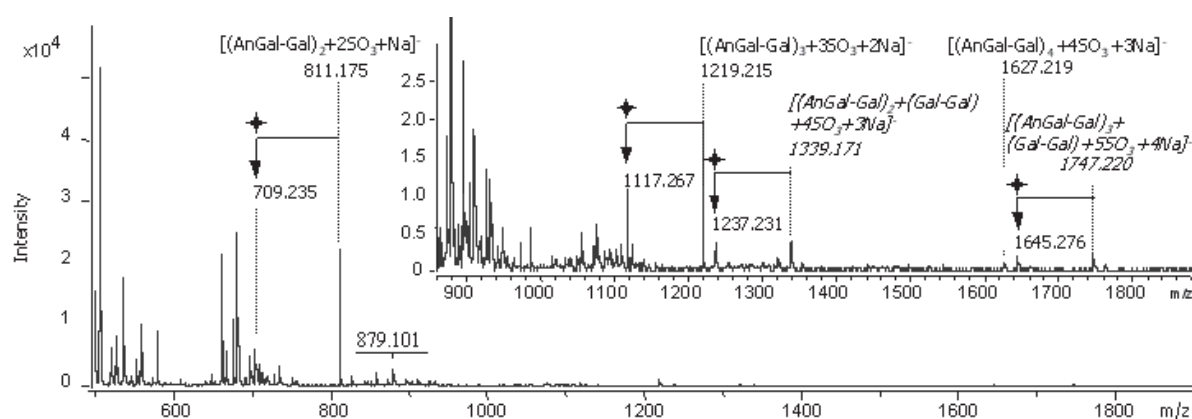
Supplementary data 11. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DMA/DHB as matrix from Carboxymethylcellulose incubated with *Alteromonas atlantica* crude bacterial extract in positive ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions $[M+Na]^+$. Depolymerization products are annotated by number of glucose (Glc) subunit and number of carboxymethyl groups (CM). Sodium adducts on the annotated species were indicated by a black star.



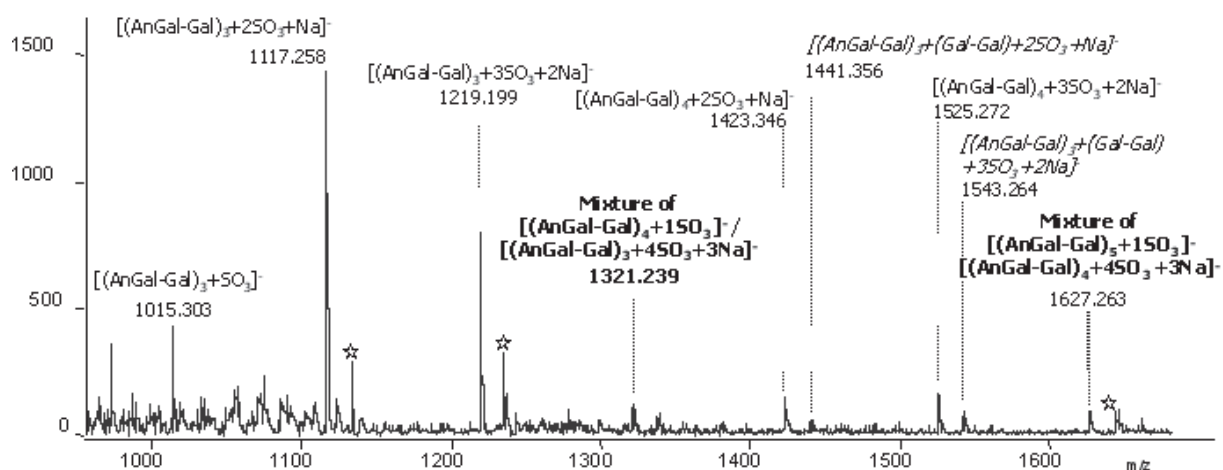
Supplementary data 12. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DMA/DHB as matrix from propylene glycol alginate incubated with *Pseudoalteromonas carrageenovora* crude bacterial extract in positive ion mode. Although the structure of the observed ions could not be resolved, they clearly originate from the degradation of propylene glycol.



Supplementary data 13. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DMA/DHB as matrix from Mannuronan incubated with *Pseudoalteromonas carrageenovora* crude bacterial extract in negative ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions [M-H]⁻. Annotation in bold correspond to m/z that can be attributed at two different molecular species.



Supplementary data 14. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DMA/DHB as matrix from kappa/mu carrageenan incubated with *Pseudoalteromonas carrageenovora* crude bacterial extract in negative ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions [M-H]⁻ of fully sulphated species. Black cross correspond to a loss of sulphate groups (-SO₃Na)



Supplementary data 15. Representative MALDI-TOF mass spectra obtained with DMA/DHB as matrix from iota/nu carrageenan incubated with *Alteromonas atlantica* crude bacterial extract in negative ion mode. All annotated species were pseudomolecular ions $[M-H]^-$. Black star correspond to potassium adducts. Bold annotation correspond to mixture of two molecular species which cannot be distinguished by the resolving power of MALDI mass spectrometer.

ANNEXE 3

-

Données supplémentaires fournies avec la publication
Ropartz, D et al. *Analytica Chimica Acta*
2014, 807, 84-95

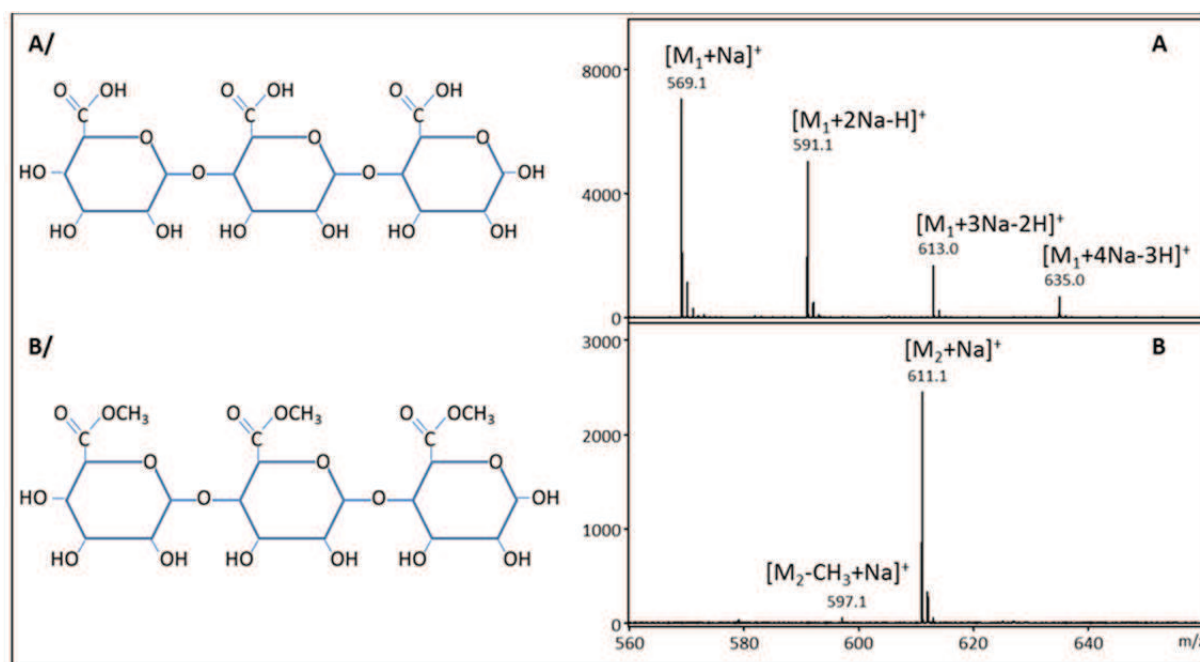
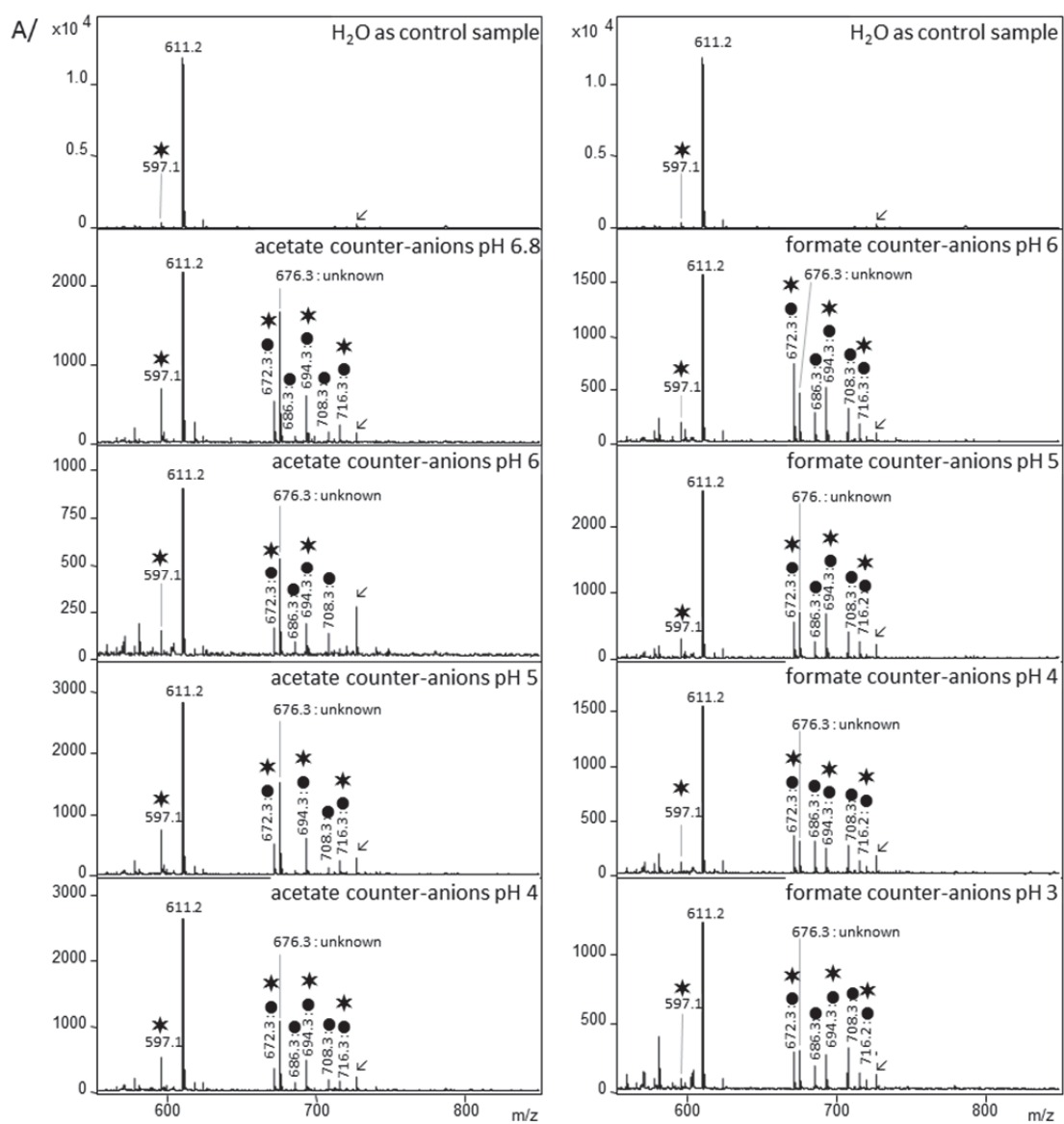


Figure 1, supplementary. Synthesis of a fully methylated oligogalacturonan used as a standard compound. Structure and related MALDI TOF mass spectra of (A) trigalacturonic acid (M1) used as starting material, and (B) trigalacturonic acid submitted to esterification (M2) according to the protocol of van Allebeck et al. 30. As shown, a complete esterification was achieved corresponding to the replacement of 3 $-OH$ groups by 3 $-CH_3$ groups, producing a mass shift of 42 Da on the sodiated species of trigalacturonic acid, from m/z 569.08 (spectrum B) to m/z 611.09 (spectrum A).



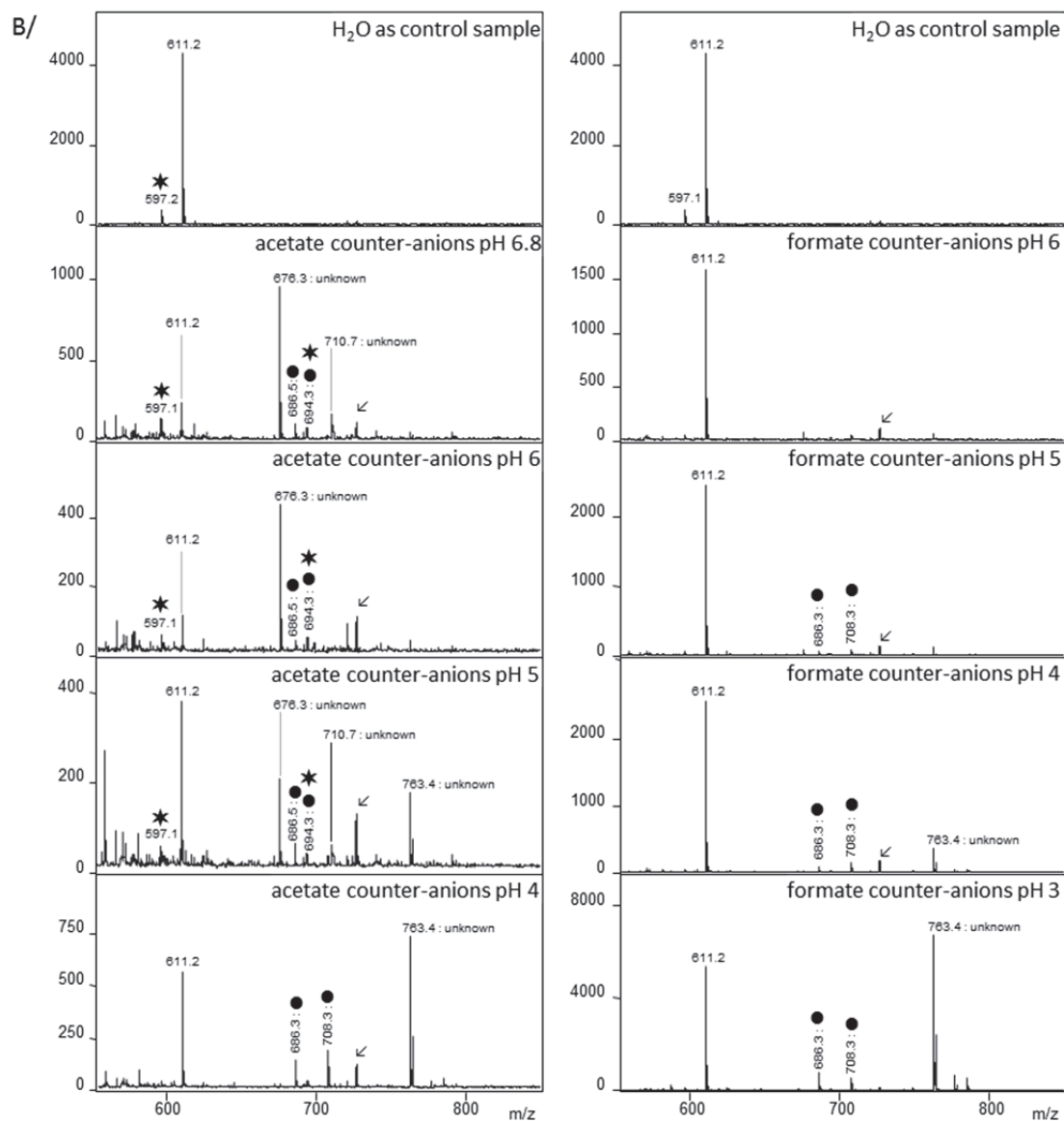


Figure 2, supplementary. Behavior of esterified trigalacturonic acid in IP-HPLC media upon drying. IP-HPLC media were prepared with 20mM heptylammonium, and either acetate or formate as counter-anions. MALDI TOF mass spectra for the fully esterified trigalacturonic acid are displayed (DP3DM3, detected as sodiated species at m/z 611.2). DP3DM3 was diluted in formate or acetate containing IP-HPLC media, and further subjected to: (A) freeze-drying, or (B) drying in a Speed-Vacuum concentrator system, and resuspended. Demethylated products are marked with a star. Ions marked with full circles correspond to Schiff-base derivatives formed with heptylammonium. The peak indicated with an arrow corresponds to a MALDI matrix cluster.

(A) Freeze-drying in IP-HPLC corresponding media and resuspended in pure water;

(B) Drying in IP-HPLC corresponding media and resuspended in pure water.

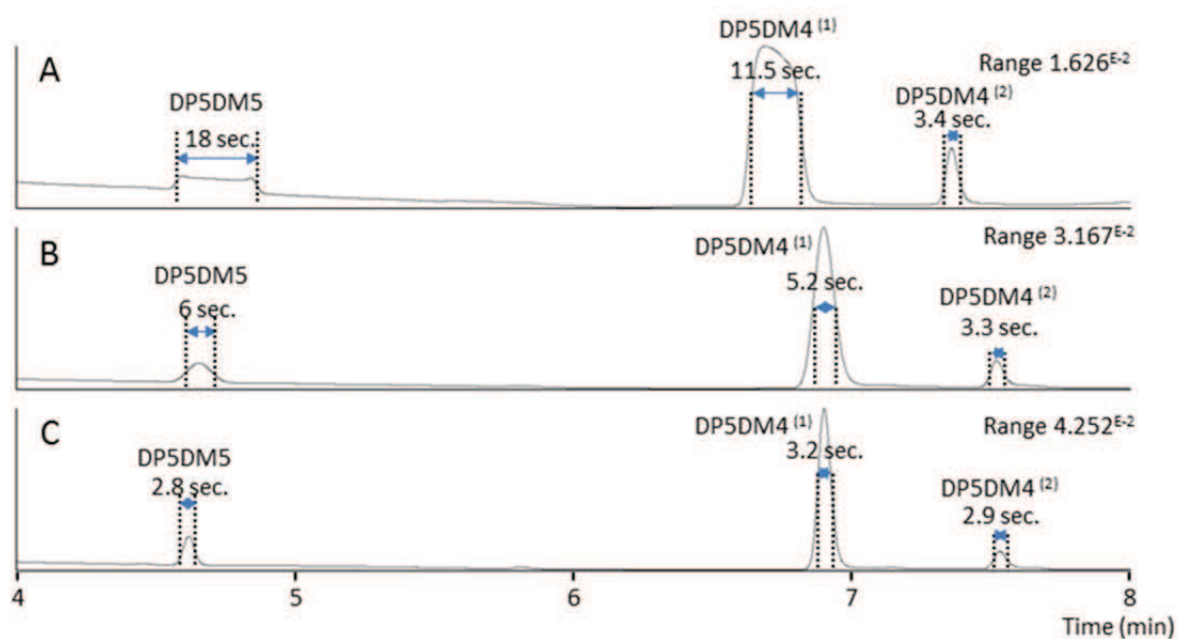


Figure 3, supplementary. Capacity of 20mM heptylammonium in formate buffer to be used as an efficient IP agent for RP-UPLC separation of oligogalacturonans. UV traces at 232 nm of a purified DP5 exhibiting several DM (DM5 and two isomers of DM4). Peak widths (in sec) at mean height are indicated depending on pH (A: pH4; B: pH5; C: pH6). The best peak resolution – therefore the higher number of theoretical plates – was obtained for pH adjusted to 6. Note that at higher pH, demethylation of oligogalacturonans occurs.

ANNEXE 4

-

Données supplémentaires fournies avec la publication
Ropartz, D et al. Analytical Chemistry
Acceptée le 13/12/2014

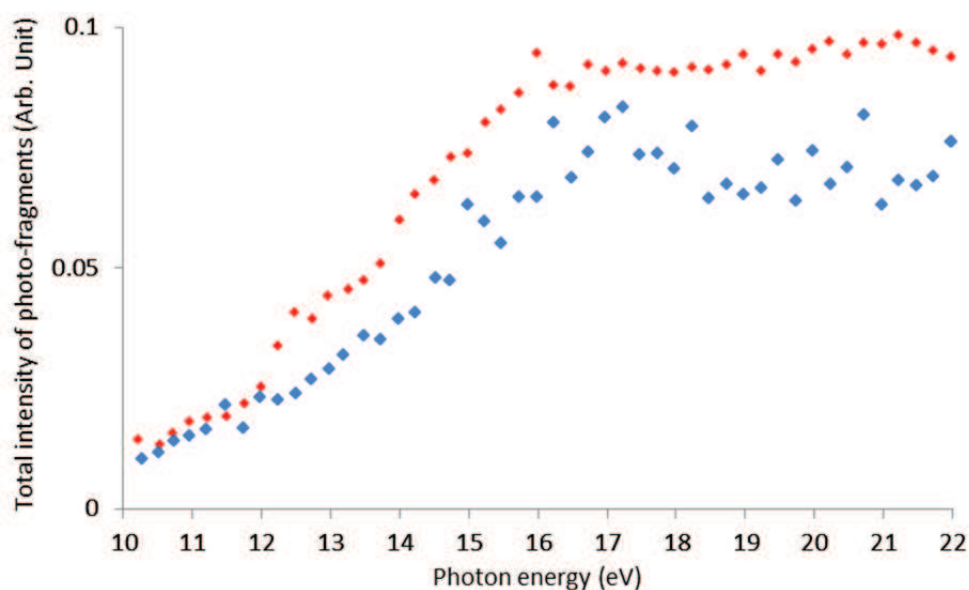


Figure S1A. Efficiency of fragmentation normalized to the photon flux and plotted according to the photon energy. All fragments were considered. Photon energy ranged from 10 to 22 eV. Fragments were produced from the activation of the L6S-G-L6S-G oligo-porphyrin. Blue: fragments measured from the $[M - 2H]^{2-}$ anion. Red: fragments measured from the $[M + 3Na - 2H]^+$ cation.

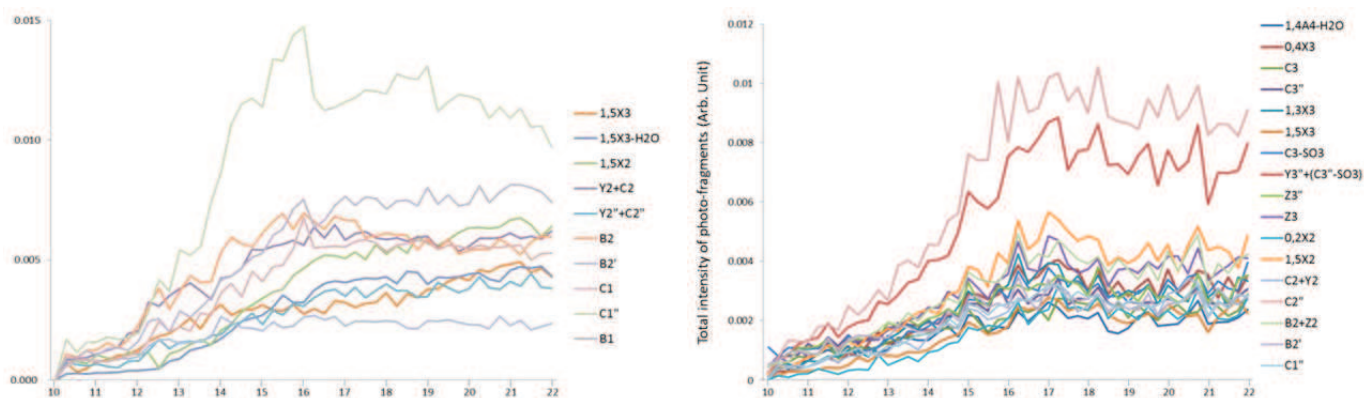
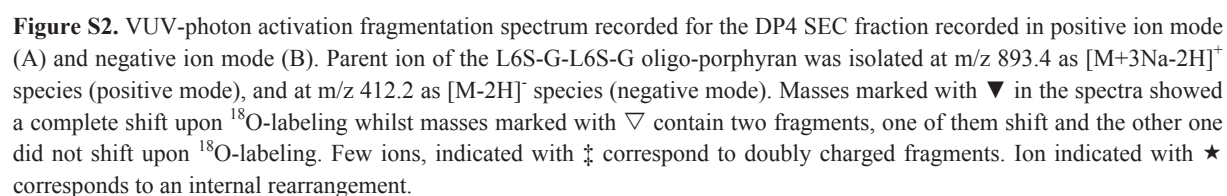


Figure S1B. Efficiency of fragmentation normalized to the photon flux, measured for some specific fragments and plotted according to the photon energy. Photon energy ranged from 10 to 22 eV. Fragments were produced from the activation of the L6S-G-L6S-G oligo-porphyrin. Left: ten fragments detected in positive ion mode from the $[M + 3Na - 2H]^+$ cation. Right: seventeen fragments obtained in negative ion mode from the $[M - 2H]^{2-}$ anion.



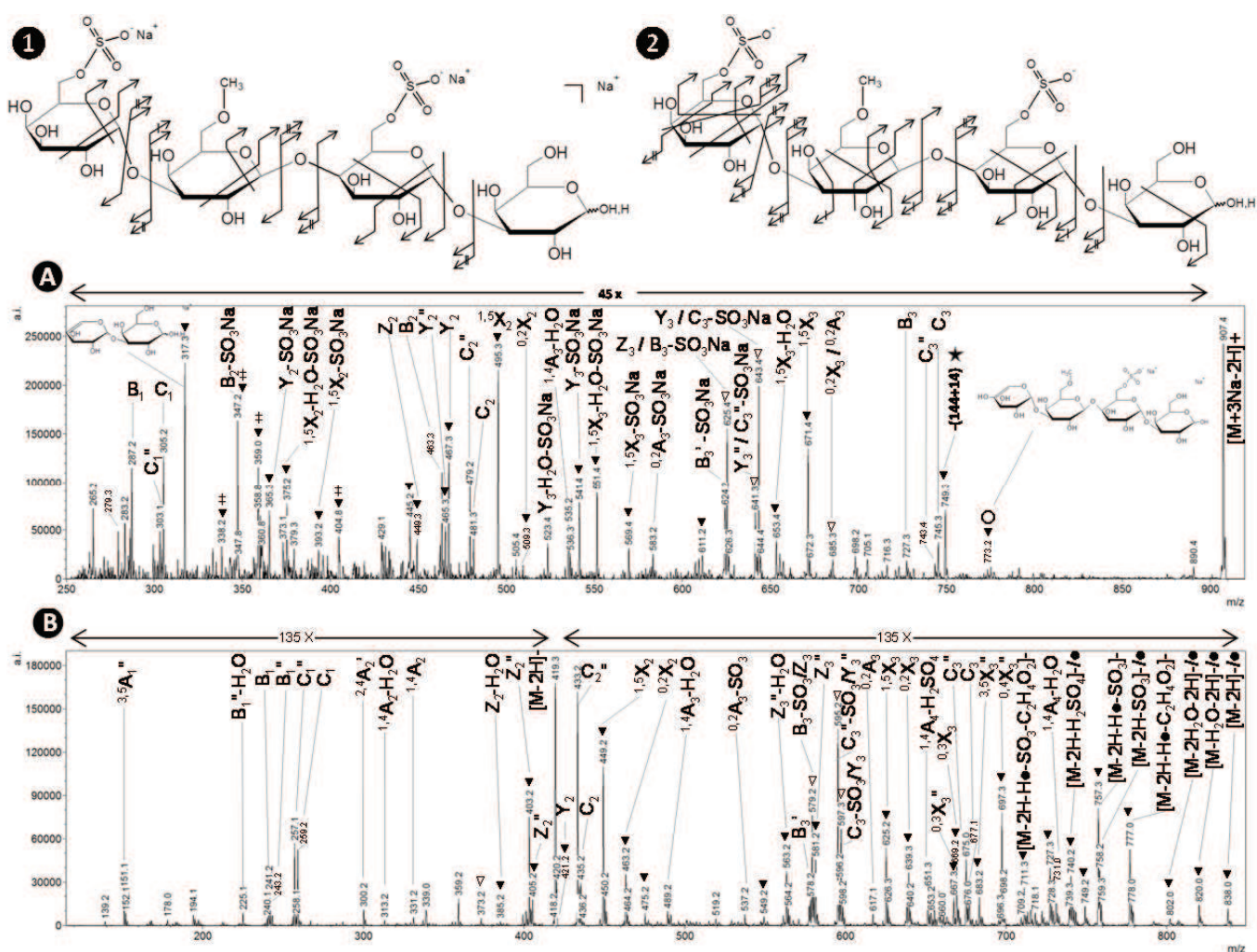


Table S1. Summary of all the structures resolved in this study from the SEC fractions of the digested porphyrans from *P. umbilicalis*. Structural information was retrieved from IP-RP-UHPLC-MS and VUV-activation tandem MS experiments. In some cases, lacking information was deduced from the other, validated, structures. Selected ion precursors for tandem MS are indicated.

SEC Fraction	Species	IP-RP-UHPLC Retention time	VUVPD validated Structure	Deducted structure	Ionization mode	Isolated species
DP2	DP2(1S/0Me/0An)	2.86 min.			+	[M+2Na-H] ⁺
DP4	DP4(1S/0Me/0An)	11.45 min.			+/-	[M+3Na-2H] ⁺ [M-2H] ²⁻
	DP4(1S/1Me/0An)	12.11 min.			+/-	[M+3Na-2H] ⁺ [M-2H] ²⁻
DP6	DP6(2S/0Me/1An)	11.21 min.			+/-	[M+3Na-2H] ⁺ [M-2H] ⁻
	DP6(2S/1Me/1An)	11.82 / 12.11 min.			+/-	[M+3Na-2H] ⁺ [M-2H] ²⁻
	DP6(2S/2Me/1An)	12.66 min.	Low intensity – No structure validated			
	DP6(3S/0Me/0An)	15.88 min.			+/-	[M+4Na-3H] ⁺ [M-3H] ³⁻ / [M+Na-3H] ²⁻
	DP6(3S/1Me/0An)	16.03 min.	Low intensity – No structure identified			
	DP6(3S/2Me/0An)	16.20 min.	Low intensity – No structure validated			
	DP5(2S/1Me/0An)	16.23 min.	Low intensity – No structure identified			
	DP5(2S/2Me/0An)	16.35 min.	Low intensity – No structure identified			
DP8	DP8(3S/0Me/1An)	15.45 min.			+/-	[M+4Na-3H] ⁺ [M+Na-3H] ²⁻
					+/-	[M+4Na-3H] ⁺ [M-3H] ³⁻
	DP8(3S/1Me/1An)	15.45 / 15.67 min.			+/-	[M+4Na-3H] ⁺ [M-3H] ³⁻ / [M+Na-3H] ²⁻
					+	[M+4Na-3H] ⁺
					-	[M-3H] ³⁻
					-	[M-3H] ³⁻
					+/-	[M+4Na-3H] ⁺ [M+Na-3H] ²⁻
	DP8(3S/2Me/1An)	15.82 / 15.91 min.			-	[M+Na-3H] ²⁻
					-	[M+Na-3H] ²⁻
					-	[M-3H] ³⁻
					-	[M-3H] ³⁻
					-	[M-3H] ³⁻
	DP8(2S/1Me/2An)	11.75 / 11.95 min.	Low intensity – No structure identified			
	DP8(2S/2Me/2An)	12.63 / 12.88 min.	Low intensity – No structure identified			
	DP6(3S/1Me/0An)	16.03 / 16.18 min.	Low intensity – No structure identified			
	DP6(3S/2Me/0An)	16.20 min.	Low intensity – No structure validated			

APPORT DES DERNIERES EVOLUTIONS EN SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE STRUCTURALE DES POLYSACCHARIDES

Résumé :

Les glycosciences étudient la structure et la fonction des glucides ainsi que les enzymes et protéines impliquées dans les processus biologiques mettant en œuvre des structures glycaniques. Peu développées en comparaison à d'autres domaines de la biologie, ces connaissances sont pourtant essentielles pour comprendre le fonctionnement des êtres vivants mais également pour mieux valoriser les glucides dans diverses industries. Le développement des glycosciences est étroitement lié à celui de méthodes analytiques permettant d'étudier la structure et la fonction des glucides.

L'objectif principal de cette thèse a donc été d'évaluer l'apport d'avancées instrumentales récentes en spectrométrie de masse et dans les techniques séparatives couplées, pour déterminer la structure de polysaccharides naturels complexes. Le travail a d'abord porté sur la découverte de nouveaux outils enzymatiques pour la déconstruction des polysaccharides. Le second thème a été de développer des outils de séparation couplés à la spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale d'oligosaccharides en mélange et la résolution des isoformes. Enfin, nous avons exploré un nouveau mode de fragmentation, la photodissociation, pour la caractérisation de la structure fine des oligosaccharides.

L'ensemble des résultats et les améliorations analytiques qui ont été portées dans mon travail ont permis de progresser dans l'utilisation de la spectrométrie de masse dans ce domaine complexe qu'est la détermination structurale des polysaccharides. Ils ont aussi permis d'apporter des éléments d'information inédits, à la fois sur ces biopolymères et sur le mode d'action de leurs enzymes de dépolymérisation.

mots-clés :

Glycosciences

Polysaccharides

Spectrométrie de masse

Mélanges complexes

Structure

Enzymes

Photoactivation

Techniques séparatives

CONTRIBUTION OF RECENT DEVELOPMENTS IN MASS SPECTROMETRY FOR THE STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDES

Abstract :

Glycosciences are dedicated to the study of the structure and function of carbohydrates as well as enzymes and proteins of biological processes involving glycan structures. Still scarcely developed, especially compared to other fields of biology, this knowledge is nevertheless essential in order to understand the functioning of living cells, as well as to allow a better use of carbohydrates in various industries. Development of glycosciences is closely linked to that of analytical methods for studying the structure and function of carbohydrates.

The main objective of this thesis was thus to evaluate the contribution of recent instrumental advances in mass spectrometry and separation techniques coupled to determine the structure of complex natural polysaccharides. The work initially focused on the discovery of new enzymatic tools for the deconstruction of the polysaccharides. The second theme was to develop separation tools coupled with mass spectrometry for the structural characterization of oligosaccharides mixture and to resolve isoforms. Finally, we explored a new mode of fragmentation, called photodissociation, to characterize the fine structure of oligosaccharides.

All the results and the analytical improvements which were brought by my work led to progress in the use of mass spectrometry in the complex field of the structural determination of polysaccharides. They also brought unprecedented information both on these biopolymers and on the mode of action of their depolymerizing enzymes.

Key words :

Glycosciences

Polysaccharides

Mass spectrometry

Complex mixtures

Structure

Enzymes

Photoactivation

Separation Technics