

Thèse de Doctorat de l'Université d'Evry-Val d'Essonne

Ecole Doctorale des Génomes Aux Organismes

Spécialité : Chimie Analytique Bio-organique

présentée par

Soraya FERMAS

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Evry-Val d'Essonne

**APPORT DU COUPLAGE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE
A LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE DE
COMPLEXES PROTEINES / OLIGOSACCHARIDES**

Thèse soutenue le 21 novembre 2007 devant le jury composé de :

M. Eric FOREST

Mme Liliane GATTEGNO

Mme Florence GONNET

M. Régis DANIEL

Mme Jeanine TORTAJADA

Mme Anne VARENNE

Rapporteur

Rapporteur

Directrice de thèse

Examineur

Examineur

Examineur

543
-087
FER
-app

HPN121839168
H-90925
THE 431

Thèse de Doctorat de l'Université d'Evry-Val d'Essonne

Ecole Doctorale des Génomes Aux Organismes

Spécialité : Chimie Analytique Bio-organique

présentée par

Soraya FERMAS

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Evry-Val d'Essonne

APPORT DU COUPLAGE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE
A LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE DE
COMPLEXES PROTEINES / OLIGOSACCHARIDES

Thèse soutenue le 21 novembre 2007 devant le jury composé de :

M. Eric FOREST	Rapporteur
Mme Liliane GATTEGNO	Rapporteur
Mme Florence GONNET	Directrice de thèse
M. Régis DANIEL	Examinateur
Mme Jeanine TORTAJADA	Examinateur
Mme Anne VARENNE	Examinateur

A ma famille

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mme Jeanine Tortajada, Directrice du Laboratoire Analyse et Modélisation pour la biologie et l'Environnement à l'Université d'Evry Val d'Essonne, pour m'avoir si bien accueillie.

Je remercie très sincèrement Mme Liliane Gattegno, Professeur à l'Université Paris XIII, et M. Eric Forest, Directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie Mme Anne Varenne, Maître de conférences à l'ENSCP, pour l'immense aide qu'elle m'a apportée en répondant aux mille questions que je lui ai posées, et pour avoir accepté de faire partie mon jury. Je remercie également M. Pierre Gareil, Professeur à l'ENSCP, pour son soutien et l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Ce travail de thèse a été co-encadré par Florence Gonnet, Maître de conférences à l'Université d'Evry Val d'Essonne, et Régis Daniel, Chargé de recherche au CNRS. Je les remercie m'avoir donné l'occasion de réaliser cette thèse et pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée lors de la rédaction de ce manuscrit. Je n'oublie pas le soutien qu'ils m'ont donné en apportant généreusement kouign-amann, chocolats et autres confiseries réconfortantes.

Je remercie également tous les membres (et ex-membres) du LAMBE qui me font regretter le fait de quitter une si bonne ambiance : Bernard, Cédric, Delphine, Frédéric, Jean-Yves, Kitty, Magali, Manue, Pierre, Riccardo, Sophie, Violette et William. Je remercie « l'équipe du midi », grâce à eux les déjeuners au Resto U avaient presque l'air comestible. Je remercie également l'équipe enseignante qui a rendu si facile mon monitorat. Je n'oublie pas les anciens thésards, Sébastien G. et Peran, que je pardonne de m'avoir abandonnée. Je remercie les relecteurs non-officiels de cette thèse, surtout Sébastien B., pour leur générosité. Magali, je te remercie d'avoir été une amie et de m'avoir fait paraître moins râleuse.

Je remercie mes amis et ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté pendant les moments difficiles.

Je remercie particulièrement celui qui m'a apporté bien plus encore.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : INTERACTIONS ENTRE PROTEINES ET POLYSACCHARIDES	5
I IMPORTANCE BIOLOGIQUE DES SACCHARIDES	5
I-1 LES GLYCOSAMINOGLYCANES	5
I-1.1 Structures et localisations.....	5
I-1.2 Fonctions biologiques.....	7
I-1.3 Pathologies associées.....	8
I-2 INTERACTION DE L'HEPARINE AVEC DES PROTEINES CIBLES	9
I-2.1 Interaction antithrombine / héparine	11
I-2.2 Interaction chimiokines / héparine.....	15
II METHODES D'ANALYSE DES POLYSACCHARIDES ET DE LEURS INTERACTIONS AVEC DES PROTEINES	23
II-1 ANALYSES DE POLYSACCHARIDES.....	23
II-1.1 Les méthodes séparatives	24
II-1.2 Les méthodes d'analyses structurales.....	26
II-2 ANALYSE DES INTERACTIONS PROTEINES / SACCHARIDES	26
II-2.1 Les méthodes d'analyses.....	27
II-2.2 L'électrophorèse capillaire	34
II-2.3 La spectrométrie de masse	43
II-3 COUPLAGE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	49
II-3.1 Interfaces de couplage pour les sources electrospray	49
II-3.2 Les autres sources d'ionisation couplées à l'électrophorèse capillaire.....	51
II-3.3 Quelques domaines d'applications du couplage CE-ESIMS.....	52
CHAPITRE 2 : MISE AU POINT DU COUPLAGE CE-MS EN ANALYSE FRONTALE PAR L'ETUDE DE L'INTERACTION ANTITHROMBINE / HEPARINE	57

TABLE DES MATIERES

I	INTRODUCTION.....	57
II	ÉTUDES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES COMPLEXES ANTITHROMBINE / HEPARINE	58
II-1	DETERMINATION DES CONDITIONS DE SEPARATION ELECTROPHORETIQUE	58
II-1.1	Mesure des mobilités électrophorétiques des partenaires de l'interaction	58
II-1.2	Analyses des complexes antithrombine / héparine par électrophorèse capillaire de zone 62	
II-1.3	Analyses par électrophorèse capillaire frontale	66
II-2	MESURE DES CONSTANTES DE DISSOCIATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE FRONTALE.....	67
III	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 71	
III-1	ANALYSE DE L'ANTITHROMBINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	71
III-2	ANALYSE DES INTERACTIONS ANTITHROMBINE / HEPARINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	73
IV	COUPLAGE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE AU SPECTROMETRE DE MASSE	74
IV-1	AJUSTEMENTS DES CONDITIONS D'ANALYSE POUR LE COUPLAGE CE-MS.....	74
IV-2	CHOIX DU MODE D'INJECTION EN CE-MS	75
IV-3	ANALYSE DE L'ANTITHROMBINE PAR FACCE-MS.....	77
IV-4	ANALYSE DES COMPLEXES ANTITHROMBINE / HEPARINE PAR CE-MS	78
IV-4.1	Détection du complexe antithrombine / pentasaccharide d'héparine.....	78
IV-4.2	Complexes antithrombine / héparines de bas poids moléculaires	80
IV-5	DETECTION DES LIGANDS GLUCIDIQUES PAR CE-MS	82
IV-5.1	Pentasaccharide d'héparine.....	82
IV-5.2	Héparines de bas poids moléculaires.....	85
V	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	87

CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'OLIGOMERISATION DE CHIMIOKINES EN PRESENCE D'OLIGOSACCHARIDES SULFATES PAR ACE-MS 91

I	INTRODUCTION.....	91
II	OLIGOMERISATION DE SDF-1 α	92
II-1	MISE AU POINT DES CONDITIONS ELECTROPHORETIQUES	93
II-1.1	Analyses de SDF-1 par électrophorèse capillaire	93

TABLE DES MATIERES

II-1.2	Analyses de SDF-1 par électrophorèse capillaire d'affinité	94
II-2	ANALYSES DE SDF-1 PAR CE-MS.....	98
II-2.1	Détection des protéines par CE-MS.....	98
II-2.2	Analyses de SDF-1 α par ACE-MS	99
II-2.3	Analyses de SDF-1 (3/6) par ACE-MS.....	106
III	OLIGOMERISATION DE MCP-1	107
III-1	ÉTUDES PRELIMINAIRES DE MCP-1 PAR ACE.....	107
III-2	ANALYSES DE MCP-1 PAR CE-MS	109
III-2.1	Détection de MCP-1	109
III-2.2	Analyses de MCP-1 par ACE-MS	110
IV	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	114
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES		119
MATERIEL ET METHODES.....		125
I	MATERIEL	125
I-1	INSTRUMENTATION	125
I-2	PRODUITS.....	126
I-2.1	Protéines.....	126
I-2.2	Oligosaccharides	128
II	METHODES DE CALCULS DE CONSTANTES DE DISSOCIATION	131
II-1	CALCULS DE K_d PAR ACE	131
II-2	METHODES DE CALCUL PAR FACCE.....	132
II-2.1	Calcul de K_d	132
II-2.2	Calcul du nombre moyen de ligands liés	133
III	PREPARATION DES CAPILLAIRES DE SEPARATION	134
III-1	ACTIVATION D'UN CAPILLAIRE DE SILICE VIERGE	134
III-2	MODIFICATIONS DU CAPILLAIRE DE SEPARATION POUR L'ANALYSE DE PROTEINES BASIQUES PAR CE-MS	135
III-2.1	GREFFAGE D'HYDROXYPROPYLCELLULOSE	135
III-2.2	TAPISSAGE DE POLY (ETHYLENE OXYDE).....	137
ANNEXES.....		141

TABLE DES MATIERES

I	INTERACTION ANTITHROMBINE / PENTAH PAR ACE	141
II	INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH B PAR ACE.....	142
III	INTERACTION ANTITHROMBINE / PENTAH PAR FACCE.....	143
IV	INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH A PAR FACCE.....	144
V	INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH B PAR FACCE.....	145
VI	INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH C PAR FACCE	146
VII	PUBLICATIONS	147
COMMUNICATIONS.....		165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		167
TABLES DES ILLUSTRATIONS		183
ABREVIATIONS		187
RESUME		189

INTRODUCTION GENERALE

La compréhension des interactions entre protéines et polysaccharides est aujourd'hui un des axes majeurs de la glycobiologie. Ces interactions gouvernent de nombreux processus physiologiques, tels que la signalisation et la reconnaissance cellulaires. Mais, elles peuvent aussi parfois intervenir lors de processus pathologiques tels que les infections virales ou bactériennes ainsi que certains processus cancéreux. Il apparait essentiel, d'un point de vue fondamental et pour des applications thérapeutiques, de chercher à comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ces interactions. La détermination de l'origine de ces activités biologiques demande une connaissance parfaite de la relation structure-activité de ces complexes protéines / polysaccharides. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les séquences liantes des deux partenaires du complexe et de caractériser les éventuels effets conformationnels résultant de la liaison du polysaccharide, ces effets pouvant moduler l'activité de la protéine cible.

De nombreuses méthodes d'analyse ont été développées afin de déterminer les séquences liantes sur les protéines. Les méthodes les plus courantes et les plus performantes sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la mutagenèse dirigée.

En ce qui concerne les polysaccharides, l'identification des sites d'interaction est plus ardue. Leur purification et leur analyse structurale sont difficiles à réaliser puisqu'ils sont souvent extraits sous formes de mélanges hétérogènes en taille et en structure. Le développement de méthodologies analytiques adaptées à l'analyse des polysaccharides s'avère important.

Dans le but de développer une stratégie de « ligand-fishing », *i.e.* identifier les ligands d'une protéine d'intérêt à partir de mélanges hétérogènes, nous nous sommes intéressés au couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS).

L'électrophorèse capillaire est une méthode séparative rapide et résolutive permettant d'analyser des échantillons de pureté moyenne. L'électrophorèse capillaire d'affinité peut également permettre de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction, comme la constante de dissociation.

La spectrométrie de masse est une puissante méthode d'analyse structurale de polysaccharides mais également d'analyse d'interactions non covalentes entre biomolécules.

Ce manuscrit se compose d'un premier chapitre de synthèse bibliographique, suivi de deux chapitres indépendants détaillant les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse.

Le premier chapitre intitulé « Interactions entre protéines et polysaccharides » correspond à une synthèse de données bibliographiques divisée en deux sections. La première est dédiée à l'importance biologique des glycosaminoglycanes. Elle décrit les principaux rôles joués par ces polysaccharides dans l'organisme en particulier vis-à-vis des protéines étudiées au cours de cette thèse : l'antithrombine et les chimiokines SDF-1 et MCP-1. La seconde décrit tout d'abord les différentes méthodes d'analyse des polysaccharides, puis les méthodes d'analyses des interactions protéine / ligand et enfin les techniques développées au cours de ce travail, *i.e.* l'électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse electrospray et leur couplage.

Le deuxième chapitre concerne la mise au point du couplage de l'électrophorèse capillaire frontale à la spectrométrie masse. Après avoir caractérisé le complexe modèle antithrombine / héparine par électrophorèse capillaire frontale, le couplage à la spectrométrie de masse a été envisagé par deux approches. La première consiste à maintenir les interactions non covalentes afin de déterminer la stoechiométrie du complexe et d'estimer la taille du ligand lié. La seconde consiste à dissocier le complexe afin d'identifier plus précisément ce ligand en l'analysant par spectrométrie de masse. La méthodologie développée vise à simplifier l'analyse des interactions protéines / polysaccharides, assurant l'isolement et la caractérisation de ligands spécifiques à une protéine donnée en une seule étape.

Le troisième chapitre concerne l'étude du rôle des oligosaccharides dans la formation d'oligomères de chimiokines. De nombreuses hypothèses concernant l'oligomérisation de chimiokines en présence d'héparine ont été émises. Nous avons voulu apporter une preuve expérimentale de cette oligomérisation, déterminer la stoechiométrie des complexes formés et la taille des fragments d'héparines mis en jeu. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé la séparation électrophorétique de ces protéines basiques au moyen de capillaires modifiés afin de supprimer toute adsorption. Puis dans un second temps, nous avons mis au point la détection des oligomères par couplage de l'électrophorèse capillaire d'affinité à la spectrométrie de masse.

CHAPITRE 1

INTERACTIONS

PROTEINES / POLYSACCHARIDES

CHAPITRE 1 : INTERACTIONS ENTRE PROTEINES ET POLYSACCHARIDES

I IMPORTANCE BIOLOGIQUE DES SACCHARIDES

Les saccharides, ou glucides, font partie des constituants essentiels des êtres vivants. Ils sont principalement connus pour leurs rôles dans le stockage (ex : glycogène et amidon) et la production d'énergie cellulaire (ex : glycolyse et cycle de Krebs). Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des polysaccharides acides connus pour leurs rôles structuraux et interviennent également dans de nombreux processus biologiques.

Les GAG possèdent de nombreux rôles physiologiques, et pour cette raison, la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de l'activité biologique de ces polysaccharides s'avère essentielle d'un point de vue thérapeutique. Complexes de par leur hétérogénéité structurale, la purification et l'analyse des GAG constituent de réels défis en glycobiologie.

La première section de cette partie correspond à une description générale des structures et fonctions des différents GAG connus. La seconde section s'intéressera plus particulièrement au mode d'action d'un GAG particulier, l'héparine, au travers d'interactions avec des protéines cibles : l'antithrombine et les chimiokines.

I-1 LES GLYCOSAMINOGLYCANES

I-1.1 Structures et localisations

Les GAG sont des polysaccharides non ramifiés, constituants importants du tissu conjonctif^a. L'unité de base de ces polymères est un disaccharide composé d'une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) et d'un autre ose (galactose, acide iduronique ou acide

^a Tissu conjonctif = tissu dont les cellules sont séparées par de la matrice extracellulaire, contrairement aux épithéliums où les cellules sont jointives.

glucuronique). Ils sont tous fortement hydrophiles et présentent de nombreuses charges négatives (groupements SO_3^- et/ou CO_2^-). A ce jour, six types ont été identifiés (Figure 1) :

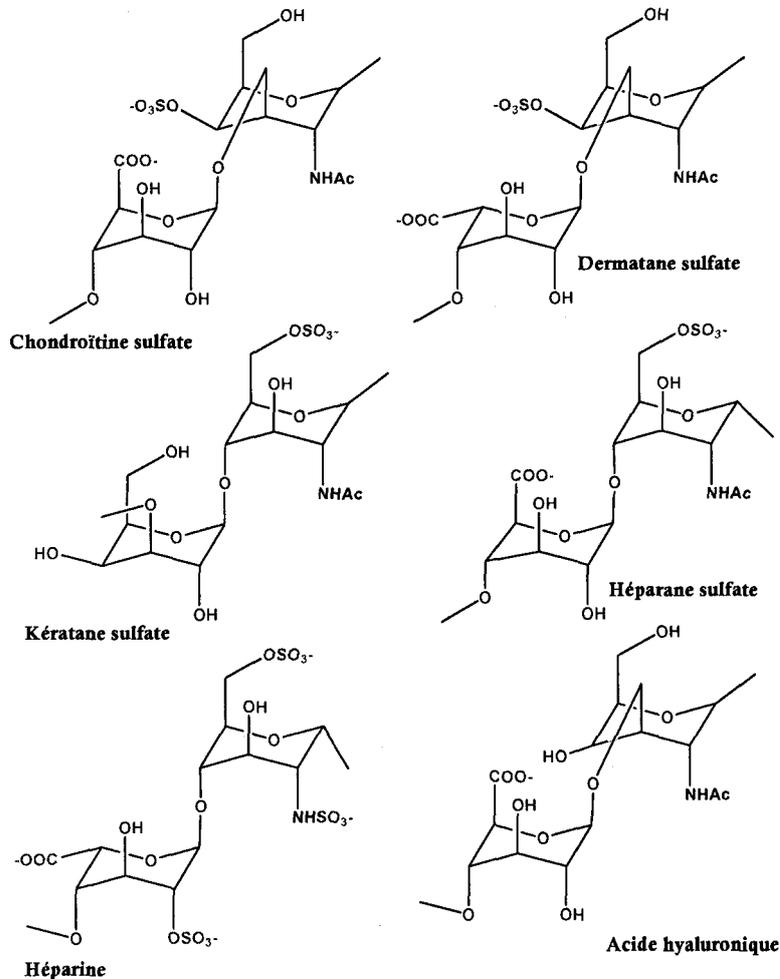


Figure 1 : Unités disaccharidiques de base des glycosaminoglycans

- le chondroïtine sulfate, présent dans le cartilage, les os et les valves cardiaques, est composé par une N-acétylgalactosamine liée à un acide glucuronique en β (1-3) et β (1-4);
- le dermatane sulfate, présent dans la peau, mais aussi dans les vaisseaux sanguins, les valves cardiaques et les poumons, est composé par un acide iduronique lié à une N-acétylgalactosamine en β (1-3) et β (1-4) ;
- le kératane sulfate, présent soit dans la cornée et les érythrocytes (type I), soit dans les cartilages et les os (type II), est composé par un galactose lié à un autre ose en β (1-3) et β (1-4) ;

- l'héparine, sécrétée par les granulocytes basophiles lors de la réponse immunitaire, est composée par un acide glucuronique lié à une glucosamine en α (1-4) et β (1-4) ;
- l'héparane sulfate constitue l'un des motifs des GAG présents à la surface des cellules, il est plus acétylé et moins sulfaté que l'héparine ;
- l'acide hyaluronique, présent dans les articulations ainsi que dans l'humeur vitreuse^b, est le seul GAG naturel à ne pas être sulfaté, il est composé par un acide glucuronique lié à une N-acétylgalactosamine en β (1-3) et β (1-4).

Certains de leurs rôles sont l'hydratation et la résistance aux chocs, par répulsions électrostatiques, des tissus dans lesquels ils sont localisés. A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG naturels connus sont présents sous la forme de protéoglycanes^c présents à la surface des cellules.

I-1.2 Fonctions biologiques

Les rôles les plus connus des GAG sont de nature structurale, mais ils interviennent également lors de phénomènes tels que la signalisation et la reconnaissance cellulaires.

La fonction principale des chondroïtines sulfates est de protéger le cartilage des articulations contre les réactions enzymatiques et contre les dommages dus aux radicaux libres. De part leur hydrophilie, ils maintiennent la pression osmotique au niveau des articulations et hydratent le cartilage. Ils sont également connus pour jouer un rôle important dans la division cellulaire et le développement des neurones. [1]

Le dermatane sulfate joue un rôle dans la reconnaissance cellulaire, certaines infections parasitaires (les protéoglycanes sont les cibles des virus de la Dengue, de l'herpès, des sporocytes de la malaria...), la cicatrisation (présent dans le derme, il active croissance cellulaire et réactions immunitaires) et présente également des activités anticoagulantes (il catalyse l'inhibition de la thrombine).[2]

Le kératane sulfate de type I assure la transparence de la cornée en maintenant un taux d'hydratation élevé.[3]

^b Humeur vitreuse = substance transparente gélatineuse qui remplit la majeure partie de l'œil.

^c Protéoglycane = combinaison d'une protéine et d'un GAG.

L'héparine connue pour ses propriétés anticoagulantes (cf. I-2.1.b page 11), interviendrait également dans l'angiogenèse, dans la formation de métastases tumorales (elle inhibe l'agrégation des plaquettes sur les cellules cancéreuses favorisant ainsi leur destruction par le système immunitaire) et l'invasion virale (elle inhiberait la fixation et l'endocytose de certains virus).[4]

L'héparane sulfate intervient également dans de nombreux processus physiopathologiques tels que l'adhésion cellulaire, la régulation et la croissance cellulaire.[4, 5]

L'acide hyaluronique protège les articulations en augmentant la viscosité de la synovie^d et l'élasticité du cartilage. Il est médicalement utilisé pour le traitement de l'ostéoarthrite du genou, lors de traitements suivant une opération de la cataracte et dans certains produits de soins dermatologiques. Des études en cours suggèrent l'utilisation de l'acide hyaluronique en temps que marqueur dans le cancer de la prostate et le cancer du sein puisque sa concentration apparaît souvent liée au caractère malin de ces tumeurs.[6]

I-1.3 Pathologies associées

Les pathologies liées aux polysaccharides peuvent être dues à des dysfonctionnements de leur catabolisme^e ou de leur anabolisme^f. D'autres anomalies peuvent apparaître lors de l'interaction avec des protéines cibles. Un exemple de pathologie sera décrit ici pour chaque mode de dysfonctionnement.

Les pathologies résultant d'anomalies cataboliques des GAG les plus connues sont les mucopolysaccharidoses. Ce sont des maladies génétiques dégénératives, à transmissions récessives, liées à des déficits enzymatiques. Ces enzymes n'assurent plus leur rôle qui est de dégrader les GAG, elles sont donc responsables de leur accumulation dans certains tissus. Cette accumulation a pour conséquence l'altération de processus cellulaires physiologiques. Les symptômes nombreux et variés peuvent associer des troubles neurologiques à des dysmorphies physiques.[7]

L'ostéoarthrite, ou arthrose, est une pathologie résultant d'un défaut de synthèse d'acide hyaluronique et de chondroïtine sulfate dans les articulations. C'est une maladie chronique dégénérative qui touche les articulations de plus de 900000 personnes dans le monde chaque année. La surface du cartilage à l'extrémité des os se fissure et finit par disparaître du fait de

^d Synovie = liquide visqueux dont le rôle est de lubrifier les articulations

^e Catabolisme = ensemble des réactions de dégradations moléculaires de l'organisme.

^f Anabolisme = ensemble des réactions de synthèse moléculaires de l'organisme.

l'altération des chondrocytes ; parallèlement la prolifération d'ostéophytes (excroissances osseuses) gêne les mouvements articulaires. L'altération du cartilage est la conséquence de la perte de viscosité et d'élasticité de la synovie, dont le composant principal est l'acide hyaluronique. La production locale de cytokines lors de la réaction inflammatoire détruit progressivement les composants de la synovie et inhibe leur biosynthèse. L'injection dans l'articulation touchée de polysaccharides (acide hyaluronique et chondroïtine sulfate) associée à des anti-inflammatoires est actuellement le traitement le plus utilisé. De nouvelles approches thérapeutiques, telle que la stimulation de la synthèse de ces polysaccharides, sont toujours à l'étude.[8, 9]

Enfin, les pathologies les plus récemment décrites impliquent l'interaction de protéines avec des GAG. La maladie d'Alzheimer représente actuellement plus de la moitié des cas de démences et son évolution est croissante. Les principaux symptômes de la maladie sont l'amnésie, la perte des repères spatio-temporels et des troubles du langage. La cause physiologique de ces troubles est liée à une détérioration progressive du tissu cérébral par trois types de lésions : la formation de plaques séniles (accumulation extracellulaire anormale de la protéine β -amyloïde), les dégénérescences neurofibrillaires (accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée) et la dégénérescence des neurones du cortex cérébral. En 1988, Snow *et al.* mettent en évidence la présence de protéoglycanes d'héparanes sulfates dans ces lésions.[10] Il faudra attendre une quinzaine d'années pour comprendre les rôles joués par ces héparanes sulfates : une protection de la protéine β -Amyloïde face à sa protéolyse et l'activation de la phosphorylation de la protéine Tau.[11, 12] La présence de ces protéoglycanes favoriserait ainsi la formation de lésions.

Hormis les traitements symptomatiques, il n'existe actuellement pas de traitements pour arrêter l'évolution de ces maladies encore mal connues.

I-2 INTERACTION DE L'HEPARINE AVEC DES PROTEINES CIBLES

Actuellement, les GAG qui possèdent le plus grand intérêt thérapeutique sont l'héparine et l'héparane sulfate. La détermination des mécanismes d'action de ces GAG a souvent montré l'implication d'interactions avec des protéines cibles.[13-15]

La structure des héparanes sulfates diffère de celle des héparines par une organisation particulière en domaines sulfatés et/ou acétylés.[4, 16, 17] L'agencement de ces différents

domaines (Figure 2) apparaît essentiel à la détermination de sites d'interaction spécifiques avec des protéines cibles. La diversité structurale des héparanes sulfates suggère un nombre tout aussi important de fonctions biologiques.

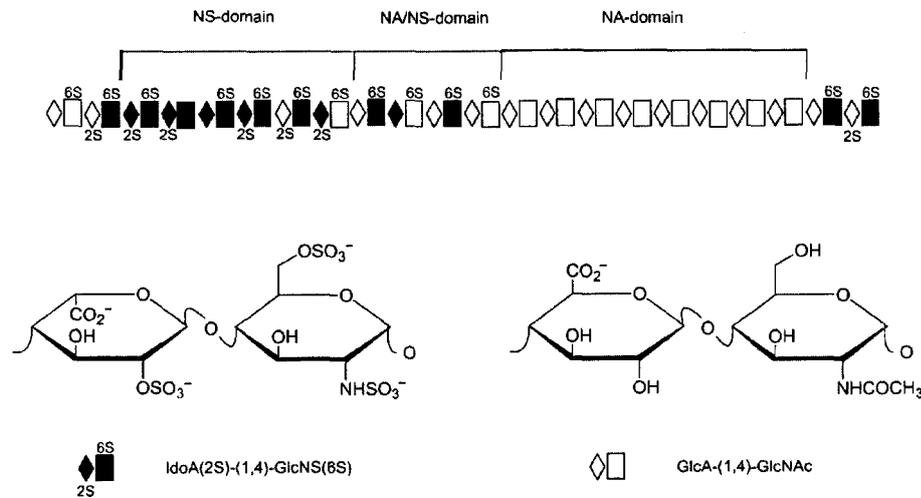


Figure 2 : Structure en domaines des héparanes sulfates

NA = domaine peu sulfaté : GlcA= acide glucuronique et GlcNAc = glucosamine N-acétyle
 NS= domaine très sulfaté : GlcNS= glucosamine N-sulfate et IdoA = acide iduronique
 D'après[4]

Les exemples d'interaction protéine / GAG sont nombreux, mais seuls les deux cas qui ont fait l'objet d'études au cours de cette thèse seront décrits dans la partie suivante.

Nous avons tout d'abord choisi d'utiliser l'interaction antithrombine / héparine afin de valider notre première approche analytique (cf. Chapitre 2). Ce complexe joue un rôle important dans le processus de coagulation, et c'est l'un des mieux caractérisé du point de vue structural, thermodynamique mais aussi biologique.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à des interactions mises en évidence plus récemment, les interactions chimiokines / héparine, en particulier par l'étude des protéines SDF-1 et MCP-1. Ces complexes jouent des rôles, entre autres, dans l'inflammation et certains processus cancéreux. De nombreuses hypothèses concernant un mode d'action sous forme d'oligomères de protéines restent à valider (cf. Chapitre 3).

I-2.1 Interaction antithrombine / héparine

I-2.1.a Fonctions de l'antithrombine

L'antithrombine est une glycoprotéine[18] plasmatique sécrétée par les hépatocytes dont le déficit est à l'origine de thromboses⁸. Cette protéine, qui fait partie de la superfamille des serpinés (serin protease inhibitor)[19], joue un rôle important dans les dernières étapes de la cascade de la coagulation en inhibant de nombreuses protéases à sérine, telles que la thrombine et les facteurs IXa, Xa, XIa, et XIIa. Les mécanismes d'inhibition sont bien connus et sont pour certains favorisés en présence d'héparine. L'antithrombine, utilisée en thérapeutique en temps qu'anticoagulant, devient en 2006 le premier médicament transgénique (extrait de lait de chèvre) commercialisé sous le nom d'ATryn® (GTC Biotherapeutics).

Isoformes majoritaires	Masses molaires (g.mol ⁻¹)	Point isoélectrique
α	57863	5,18
β	55657	5,32

Tableau 1 : Propriétés de l'antithrombine humaine.

D'après [20, 21]

L'antithrombine, comme la plupart des glycoprotéines, possède plusieurs isoformes (Tableau 1) du fait de l'hétérogénéité de glycosylation.[22, 23] Les isoformes α possèdent 4 chainons glucidiques sur les asparagines 96, 135, 155 et 192. Les isoformes β ne possèdent que 3 chainons puisqu'ils ne sont pas glycosylés sur l'asparagine 135.[20, 24] Les isoformes β sont minoritaires dans le plasma et ont une plus forte affinité pour l'héparine.[25]

I-2.1.b Mécanisme d'action de l'héparine sur l'antithrombine

En 1936, soit 20 ans après sa découverte, l'héparine est utilisée pour la première fois chez l'homme en tant qu'anticoagulant. L'effet anticoagulant de l'héparine en présence d'antithrombine reste une notion purement empirique jusque dans les années 70. En 1979, Rosenberg isole par chromatographie d'affinité des fractions hépariniques de forte affinité pour

⁸ Thrombose = formation d'un caillot obturant un vaisseau sanguin.

l'antithrombine ($K_d < 1.10^{-7}$ M) et observe parmi elles la présence d'une séquence commune de 4 saccharides qui pourrait être à l'origine de cette activité anticoagulante.[26]

Séquence active de l'héparine

La compréhension du mécanisme d'action de l'héparine, GAG hétérogène en taille et en structure, vis-à-vis de l'antithrombine passait d'abord par la détermination de la séquence active. Les premières déterminations structurales ont porté sur l'analyse d'un octasaccharide de haute affinité pour l'antithrombine.[27, 28] Choay *et al.* montrent en 1983 que le site minimal d'interaction catalysant l'activité de l'antithrombine est en fait un pentasaccharide (Figure 3) dont ils réaliseront la synthèse chimique, et que le degré de sulfatation a son importance.[29]

La synthèse chimique en 60 étapes du pentasaccharide reste difficile à transposer à l'échelle industrielle alors que la préparation de fractions d'héparine de bas poids moléculaires, obtenues par fractionnement chromatographique du polymère naturel, n'est pas limitée. Mais les atouts d'une molécule si spécifique, sans effets secondaires, motivent les recherches sur le pentasaccharide. La méthylation du groupement hydroxyle anomérique a par exemple facilité la purification et augmenté la durée de vie (demi-vie de 17h) du fondaparinux qui sera commercialisé en 2002 sous le nom d'Arixtra® par les laboratoires Sanofi-Synthelabo et Organon. Des agents analogues sont encore à l'étude, la méthylation d'autres groupements hydroxyle a conduit à l'idraparinux plus stable (demi-vie de 120h) et plus facile à synthétiser et purifier.[30]

Sites de liaison de l'antithrombine à l'héparine

Parallèlement, la localisation des résidus de l'antithrombine impliqués dans l'interaction avec l'héparine ont été étudiés par mutagenèse dirigée (cf. II-2.1.d page 33). La liaison entre les résidus basiques (lysine et arginine) de l'antithrombine et les groupements sulfate de l'héparine est de nature électrostatique. Les résidus majoritairement basiques de l'antithrombine 114 à 154 (comprenant les lysines 114 et 125, l'arginine 129[31], l'arginine 132 et la lysine 133[32] ainsi que l'arginine 154) forment le site de liaison principal des oligosaccharides sulfatés. Deux autres sites comportant les résidus lysine 11, arginine 13 et 24[33] et arginine 46 et 47[34] jouent également des rôles importants dans cette interaction.[35]

Les Figure 3 et Figure 4 représentent les différents sites de liaison du pentasaccharide d'héparine à deux domaines de l'antithrombine.[30, 36]

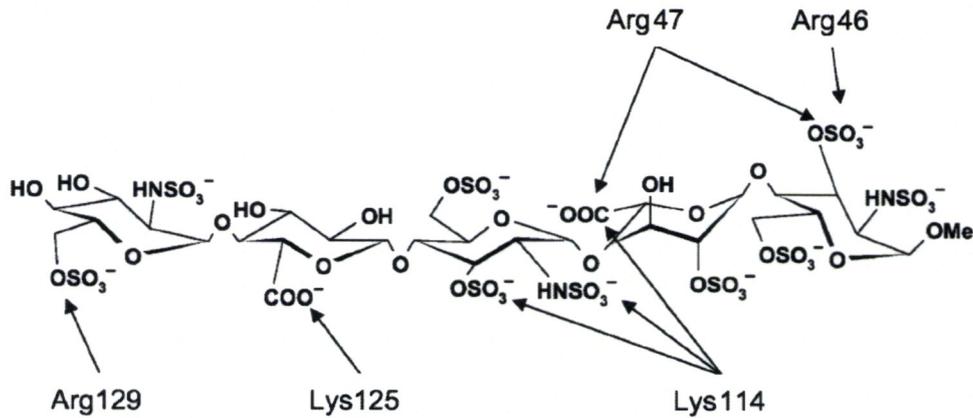


Figure 3 : Structure du pentasaccharide d'héparine et sites de liaison à l'antithrombine

D'après[30]

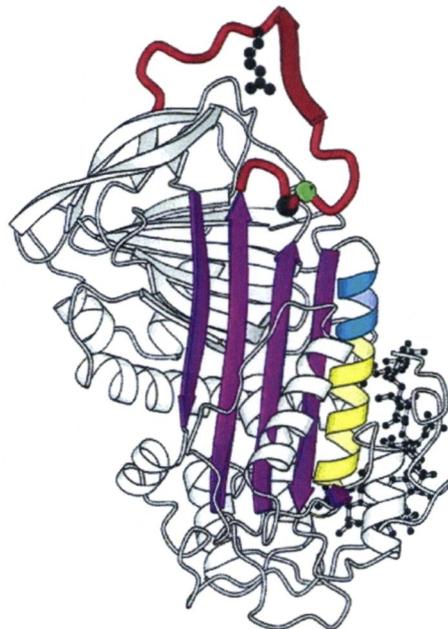


Figure 4 : Structure du complexe antithrombine / pentasaccharide d'héparine

Les modifications conformationnelles résultant de la liaison de l'héparine sont symbolisées par les résidus colorés. Le centre réactif correspondant aux résidus en interaction avec les protéinases à serine est représenté en rouge. D'après [36]

Conformation de l'antithrombine

L'antithrombine circule dans le plasma sous deux conformations : la forme active majoritaire et la forme latente qui ne représente que 3% de l'antithrombine totale.[37] Dans le plasma, formes latente et active s'associent sous la forme d'un dimère inactif. Ce dimère

représente 10% de la quantité totale en antithrombine à 37°C et 100% à 41°C, ce qui explique la recrudescence des thromboses lors de fortes fièvres.[38]

La résolution par cristallographie de la structure de ces deux conformères a montré que la conformation de l'antithrombine active favorisait la liaison au pentasaccharide contrairement à l'antithrombine latente.[39] La formation de ce complexe non covalent antithrombine / pentasaccharide entraîne une modification conformationnelle de l'antithrombine à l'origine de l'accroissement de son potentiel d'inhibition : le centre réactif (boucle formé de résidus interagissant avec les protéinases, en rouge dans la Figure 4) enfoui au cœur de la protéine inactive est alors extériorisé.[40] L'étude des isoformes de l'antithrombine a montré que la présence d'un chaînon sur l'asparagine 135 (isoforme α) pouvait nuire à l'activation de l'antithrombine par l'héparine. En effet, la gêne stérique occasionnée perturbe le changement de conformation de l'antithrombine.[41]

Inhibition du facteur Xa et de la thrombine

L'étude cinétique de formation du complexe antithrombine / héparine a mis en évidence deux étapes dont la seconde serait cinétiquement déterminante.[42] La première étape correspond à la formation du complexe, et la seconde correspond à un changement de conformation de l'antithrombine. Cette même étude a également montré que le pentasaccharide activait l'inhibition du facteur Xa (270 fois) mais pas celle de la thrombine (1,7 fois), alors que l'utilisation d'une héparine de 26 unités avait un effet plus important sur la thrombine (inhibition multipliée par 580 pour le facteur Xa et par 4300 pour la thrombine).

La liaison de l'héparine à l'antithrombine entraîne un changement de conformation catalysant l'inhibition du facteur Xa. En revanche, cela ne suffit pas à inhiber la thrombine. En effet, la formation d'un complexe ternaire (Figure 5) dans lequel l'héparine se lierait également à la thrombine pour la « présenter » à l'antithrombine s'avère nécessaire.

L'inhibition de la thrombine reste un défi pour l'industrie pharmaceutique. De nombreuses études ont montré que la formation de ce complexe ternaire antithrombine/thrombine/héparine nécessitait des oligosaccharides d'héparine constitués d'au moins 15 unités. Afin d'éviter les effets secondaires, l'une des stratégies testée repose sur la synthèse d'un chaînon oligosaccharidique neutre reliant le pentasaccharide à une séquence héparinique ligand de la thrombine.[43, 44]

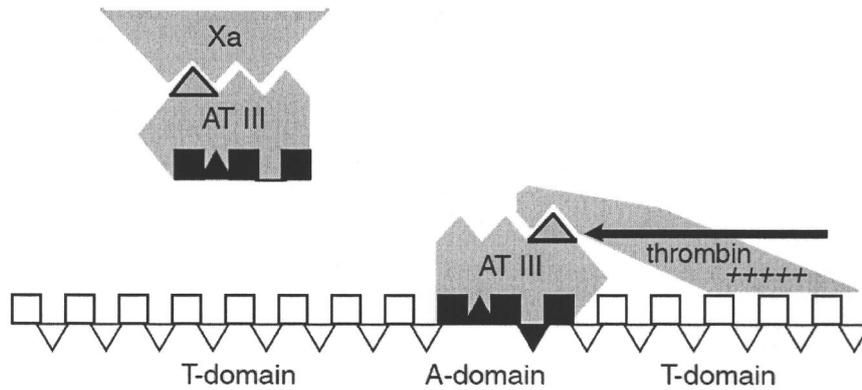


Figure 5 : Inhibition du facteur Xa et de la thrombine par l'antithrombine et l'héparine

AT III = antithrombine, Xa = facteur Xa, A-domain = pentasaccharide d'héparine spécifique de la liaison à l'antithrombine, T-domain = site de liaison de la thrombine à l'héparine, Δ = changement de conformation de l'antithrombine résultant de sa liaison au pentasaccharide. +++++ = résidus aminés basiques. D'après[43].

I-2.2 Interaction chimiokines / héparine

I-2.2.a La superfamille des chimiokines

Les chimiokines, ou cytokines^h chimio-attractives, constituent le plus grand groupe de la superfamille des cytokines. Ces petites protéines, de 8 à 12 kg.mol⁻¹, interagissent avec des récepteurs cellulaires à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines Gⁱ. Actuellement, plus de 50 chimiokines et près de 20 récepteurs ont été identifiés.

Ces protéines ont été classées en quatre sous-familles en fonction de l'enchaînement des premiers résidus cystéine conservés à l'extrémité N-terminale. Ce classement résulte d'une mise en évidence de la relation structure / fonction liée au positionnement de ces résidus cystéine.[45] On distingue deux sous-familles majoritaires : CXC (α) qui possède deux résidus cystéine (C) séparés par un résidu aminé quelconque (X) et CC (β) qui possèdent deux cystéines contigües. Les deux autres familles identifiées plus récemment sont la famille C et la famille CX₃C.[46]

^h Cytokines = protéines et peptides sécrétés par des cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, ayant pour rôle la médiation cellulaire.

ⁱ Protéines G = protéines capables d'induire ou d'inhiber des réactions biochimiques dans la cellule.

Leurs fonctions physiologiques sont diverses et leur spécificité d'action sur un type de cellules donné est principalement liée à la localisation de leurs récepteurs. La première fonction mise en évidence est celle du recrutement de cellules (chimiotactisme), principalement les lymphocytes lors d'une réaction inflammatoire. Les chimiokines sont également connues pour avoir des effets activateur ou inhibiteur de l'angiogenèse^j et de l'hématopoïèse^k. En fait, deux grands types de chimiokines se distinguent : les chimiokines inflammatoires et les chimiokines homéostatiques^l. Les chimiokines inflammatoires sont secrétées par différents types de cellules en réponse à l'intrusion dans l'organisme d'un agent pathogène (bactérie ou virus). Les chimiokines homéostatiques, présentes dans le système lymphatique, contrôlent la maturation, la différenciation et l'activation des lymphocytes.[47] Ces protéines agissent également, directement ou par l'intermédiaire de leurs récepteurs, lors de certains processus pathologiques tels que la sclérose multiple, certaines maladies auto-immunes, l'asthme, l'athérosclérose[48], les infections virales[49] et certains processus métastatiques.

I-2.2.b Interactions avec les glycosaminoglycanes

Les progrès réalisés dans la caractérisation structurale des chimiokines et la détermination de leurs rôles ainsi que leurs récepteurs ont fait d'elles, pendant un certain temps, des cibles thérapeutiques pour réguler les inflammations pathologiques. Cette idée a rapidement été abandonnée puisque de nombreuses études montraient des discordances entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. A cela s'ajoutait la faible durée de vie des chimiokines injectées dans l'organisme ainsi que les nombreux effets secondaires dû au fait qu'une protéine peut avoir des effets différents en fonction de la localisation des récepteurs auxquels elle se lie.[48, 50]

Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence la liaison de chimiokines à des GAG purifiés puis sur des protéoglycanes à la surface de cellules endothéliales^m. Une nouvelle voie d'étude s'est alors ouverte sur l'analyse des interactions entre chimiokines et GAG. La liaison entre ces protéines pour la plupart basiques et des polysaccharides acides semblait au premier abord peu spécifique. Mais l'observation de liaisons de chimiokines acides (MIP-1 α (CCL3) et MIP-1 β (CCL4)) à des GAG, par chromatographie d'exclusion stérique, a permis de contredire

^j Angiogenèse = formation de nouveaux vaisseaux sanguins

^k Hématopoïèse = ensemble des mécanismes qui assurent le renouvellement des cellules sanguines

^l Homéostasie = capacité à conserver l'équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures

^m Cellules endothéliales = couche de cellules constitutives des vaisseaux en contact avec le sang.

cette hypothèse.[51] Cette spécificité s'est avérée dépendre du type de chimiokines mais également de la catégorie des glycosaminoglycanes testés.[52]

La liaison des chimiokines aux GAG s'avère indispensable pour l'accomplissement de certains processus cellulaires tels que le recrutement cellulaire, la création de gradients de chimiokines, *i.e.* la concentration des chimiokines au foyer de l'inflammation[53], la protection des chimiokines contre l'action des protéases[54] et la présentation des chimiokines à leurs récepteurs[52]. La figure suivante (Figure 6) présente une illustration de recrutement des leucocytes : les GAG en surface des cellules endothéliales immobilisent le leucocyte circulant dans le sang, les chimiokines liées à ces mêmes GAG sont ensuite présentées à leur récepteur leucocytaire et induisent un étalement de la cellule, cette dernière traverse enfin l'épithéliumⁿ vers le tissu siège de l'inflammation.

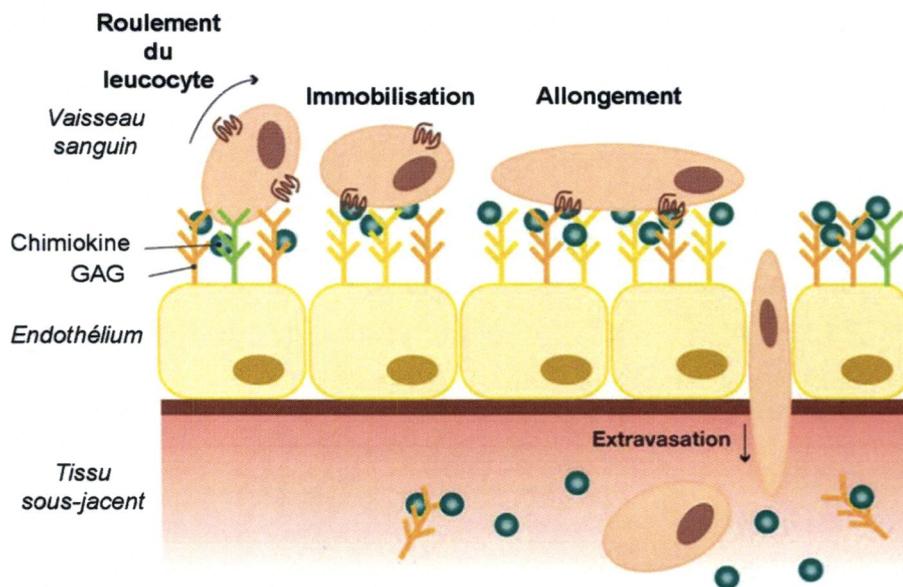


Figure 6 : Migration des leucocytes du sang vers les tissus (diapédèse)

D'après[55]

I-2.2.c Oligomérisation des chimiokines et de leurs récepteurs

La liaison des chimiokines aux GAG n'est pas le seul phénomène à promouvoir leurs actions.[56] Les chimiokines inflammatoires sont stockées dans des granules lymphocytaires puis sécrétées sous forme de macrocomplexes avec des héparanes sulfates. L'affinité des chimiokines pour les GAG est parfois augmentée par leur oligomérisation[57, 58] à quelques exceptions près,

ⁿ Epithélium = tissu dont les cellules sont liées par des jonctions intercellulaires.

comme pour l'interleukin-8[59]. Différents modes d'associations entre protéines ont été envisagés par la combinaison de données obtenues par cristallographie et RMN sur les oligomères de chimiokines (dimères ou tétramères) et par modélisation des complexes avec des GAG.[55, 60] Les données structurales expérimentales sur la formation d'oligomères en présence d'oligosaccharide n'ont pu être obtenues par cristallographie que pour un disaccharide dans le cas de les chimiokines RANTES / CCL5[61] et SDF-1 α / CXCL12[62]. Cette limitation résulte de la précipitation des chimiokines favorisée par de fortes concentrations et des masses élevées d'oligosaccharides sulfatés.[48]

Comme la plupart des récepteurs membranaires couplés à des protéines G, les récepteurs de chimiokines peuvent aussi former des oligomères.[63] La dimérisation des récepteurs est induite par la fixation d'une chimiokine sur un seul récepteur, le second récepteur ne pouvant plus recevoir de substrat est tout de même activé.[64] Ce phénomène semble permettre le maintien d'un signal biochimique suffisant malgré une faible concentration en chimiokines.[65] La formation d'homo-dimères (deux récepteurs identiques) ou hétéro-dimères (deux récepteurs différents) modulerait le signal biochimique.[66]

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la liaison de deux chimiokines, SDF-1 α / CXCL12 et MCP-1 /CCL2, à l'héparine, ainsi qu'à leur oligomérisation. Un court résumé sur les données bibliographiques structurales est présenté ici.

I-2.2.d Stromal-cell Derived Factor-1 α

La chimiokine Stromal-cell Derived Factor-1 possède de nombreux isoformes, le plus abondant étant SDF-1 α / CXCL12 constitué de 68 acides aminés (Séquence : Figure 7). Cette protéine appartient à la famille CXC intervenant principalement dans différentes étapes de l'hématopoïèse, de l'angiogenèse et du recrutement de leucocytes[67]. Du point de vue pathologique, SDF-1 α est connue pour intervenir dans certains processus métastatiques et lors de l'infection par le VIH-1. Dans ce dernier cas, le récepteur CXCR4 joue le rôle du corécepteur du virus facilitant sa liaison aux lymphocytes T, alors que la fixation de SDF-1 α sur CXCR4 inhibe la liaison du virus et empêche sa réplication.[68]

KPVSLSYRCP CRFFESHVAR ANV**KHLKILN** TPNCALQIVA **RLKNNNRQVC**
 IDPKLKWIQE YLEKALNK

Figure 7 : Séquence de SDF-1 α humaine

En italique : résidus marquant l'appartenance à la famille CXC,
 En gras : résidus basiques susceptibles d'interagir avec des GAG. D'après [69, 70]

La structure de SDF-1 α est bien connue, son site de liaison au récepteur CXCR4 est constitué des 8 résidus N-terminaux. [68, 71] En ce qui concerne son site de liaison aux GAG, un site de structure [BBXB]^o reconnu comme étant un site de liaison à l'héparine a été identifié par mutagenèse dirigée : [Lys24 - His25 - Leu26 - Lys27]. [69] Il semblerait que d'autres résidus participent également à cette liaison, mais de façon moins déterminante. [70] L'analyse RMN a permis de confirmer ces sites de liaison de SDF-1 α à l'héparine. [72] A partir de la structure modélisée de SDF-1 α , la recherche de l'oligomère théorique le plus stable indiquait une stœchiométrie de deux protéines centrées sur un fragment d'héparine (Figure 8). L'oligosaccharide jouant dans ce cas le rôle d'un lien entre les deux protéines.

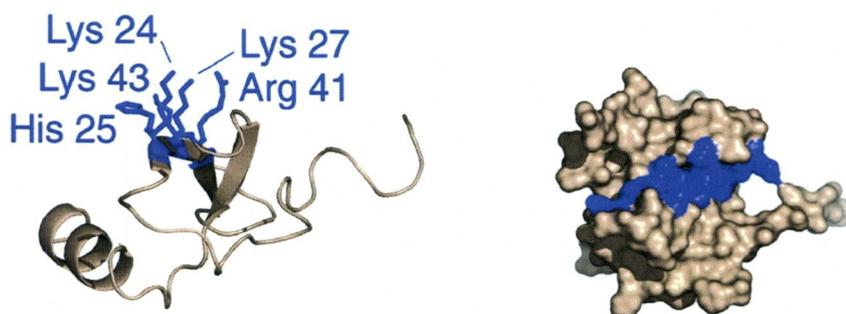


Figure 8 : Modélisation de l'interaction SDF-1 α / héparine

Les zones bleues correspondent aux résidus basiques de la protéine susceptibles d'interagir avec l'héparine.
 A gauche : structure de la chaîne protéique, à droite : surface moléculaire du dimère. D'après [55]

Expérimentalement, cette structure a pu être observée par cristallographie avec un disaccharide d'héparine [62], les interactions avec des oligosaccharides plus longs n'ayant pu être observé du fait de la précipitation. Les données thermodynamiques indiquent des valeurs de constantes de dissociation des dimères de SDF-1 α de l'ordre de 1 mM, cette valeur est divisée par 10 en présence de contre-ions de type phosphate ou de disaccharide d'héparine. [72]

^o B correspond à un acide aminé basique (lysine, arginine ou histidine) et X à un acide aminé quelconque

I-2.2.e Monocyte Chemoattractant Protein-1

La chimiokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1 / CCL2) est constituée de 76 acides aminés (Séquence : Figure 9) appartenant à la famille CC intervenant dans les réactions inflammatoires (Figure 6 page 17), mais également dans certaines pathologies du système nerveux central.[73]

QPDAINAPVT *CC*YNFTN**RKI** SVQ**R**LASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAK**E**
ICADPKQ**K**WV QDSMD**H**LDKQ TQTPKT

Figure 9 : Séquence de MCP-1 humaine

En italique : résidus marquant l'appartenance à la famille CC,
En gras : résidus basiques susceptibles d'interagir avec des GAG. D'après[74, 75]

Les sites de liaison principaux de MCP-1 aux GAG ont été identifiés par mutagenèse dirigée comme étant les résidus [Lys58, His66] [74] et les résidus [Arg18, Lys19, Arg24, Lys49][75]. Cette chimiokine forme généralement des dimères en solution et la présence d'héparine semble, d'après une analyse réalisée par spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes (Figure 10), favoriser cette dimérisation.[76, 77]

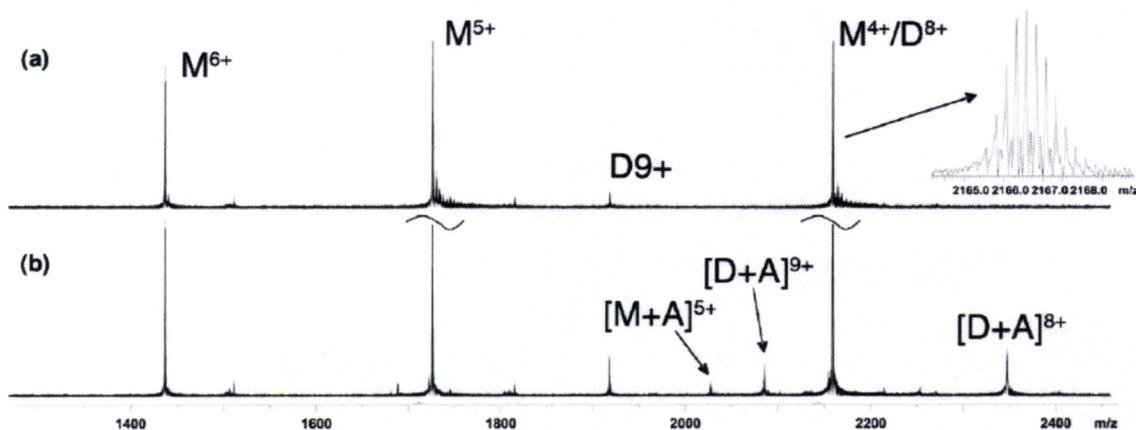


Figure 10 : Spectres de masse FTICR de MCP-1 en conditions non dénaturantes

(a) 5µM MCP-1 dans 100mM acétate ammonium pH 6,8.

(b) incubation avec 200 µM de pentasaccharide d'héparine puis filtration.

M = monomère, D= dimère et A = arixtra, pentasaccharide d'héparine. D'après [77]

D'autres analyses par ultracentrifugation analytique et modélisation indiquent que l'héparine pourrait induire un regroupement en tétramères ou en octamères. La modélisation de la structure des dimères indique que les sites de fixation des GAG sont différents des sites d'interaction entre les deux protéines (Figure 11a) contrairement à SDF-1α (cf. Figure 8 page 19).

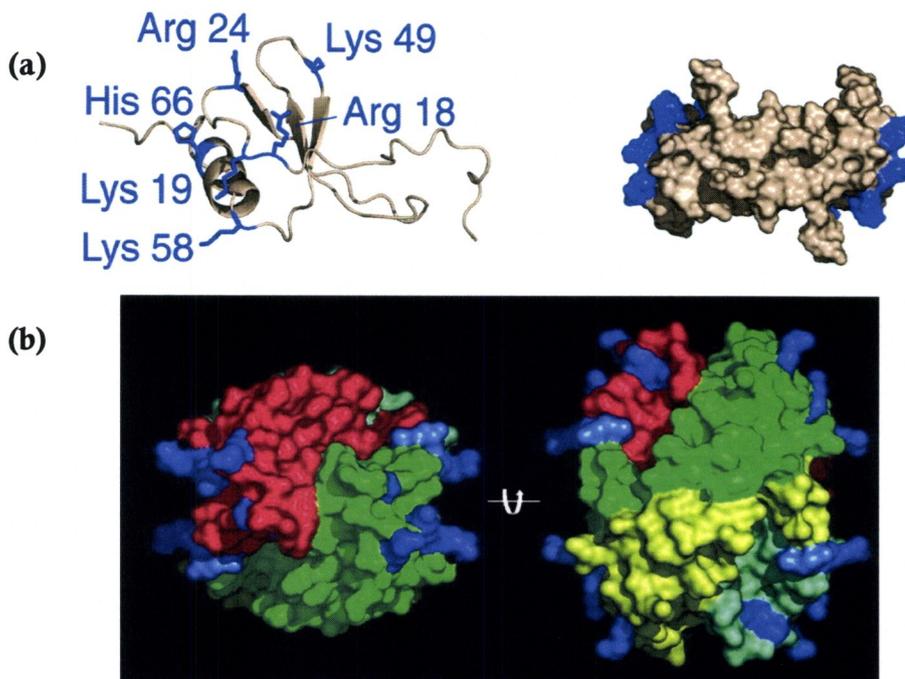


Figure 11 : Modélisation de l'interaction MCP-1 / héparine

(a) : formation d'un dimère. A gauche : structure de la chaîne protéique, à droite : surface moléculaire
 (b) : formation d'un tétramère. (Rotations de 90°) Les zones bleues correspondent aux résidus basiques de la protéine susceptibles d'interagir avec l'héparine. D'après [55, 75]

La fixation d'un GAG sur MCP-1 pourrait être à l'origine d'une modification conformationnelle de la protéine favorisant sa dimérisation. La modélisation de la structure des tétramères indique la présence d'une zone continue de résidus basiques encerclant les quatre protéines et correspondant probablement au site de fixation de GAG (Figure 11b).[55, 75] Pour le moment, aucune observation expérimentale de ce tétramère n'a pu être réalisée.

II METHODES D'ANALYSE DES POLYSACCHARIDES ET DE LEURS INTERACTIONS AVEC DES PROTEINES

II-1 ANALYSES DE POLYSACCHARIDES

A la différence des acides nucléiques et des protéines, il n'existe pas de codage cellulaire pour la biosynthèse des polysaccharides. Les mammifères peuvent synthétiser plus d'une dizaine d'oses dont la structure varie par la présence et la position différente de nombreux groupements fonctionnels (hydroxyle, sulfate, amine, acide, acétyle...) augmentant d'autant le nombre d'isomères possibles. La liaison de deux oses peut être réalisée à différents endroits du cycle osidique (liaisons 1-3 ou 1-4) et ce avec deux anoméries^p possibles (α ou β). Si l'on considère un oligomère de quatre unités, la combinaison des 4 nucléotides de l'ADN peut donner 256 oligomères différents (4^4), celle des 20 acides aminés donne environ 16000 peptides différents, pour un oligosaccharide plus de 15 millions d'arrangements sont possibles. La Figure 12 décrit la variation du nombre d'isomères possibles en fonction du nombre de monomères pour des peptides et des oligosaccharides formés à partir de D-hexoses.[78]

Récemment, les progrès en synthèse chimique d'oligosaccharides ont permis, par la préparation d'échantillons homogènes de séquence connue, une compréhension plus aisée des activités de ces sucres. Contrairement à l'analyse du génome et du protéome, le développement de méthodes automatisées pour le séquençage ou la synthèse de polysaccharides est récent. En 2003, le groupe du Dr Seeberger a mis au point un automate réalisant la synthèse d'un dodécasaccharide de séquence connue en seulement 16 heures.[79] Cette même équipe a ainsi pu synthétiser en deux mois un vaccin efficace contre la malaria alors que les méthodes conventionnelles requièrent au moins 10 mois.

^p Anomères = isomères qui diffèrent par la configuration du premier carbone du cycle osidique.

Table III. Oligosaccharide isomers from D-hexoses, including branched forms

Oligosaccharide size	Hexose set	isomers
Monosaccharide	1	2
Disaccharide	2	256
Trisaccharide	3	38 016
Tetrasaccharide	4	7 602 176
Pentasaccharide	5	2 633 600 000
Hexasaccharide	6	1 053 045 031 000

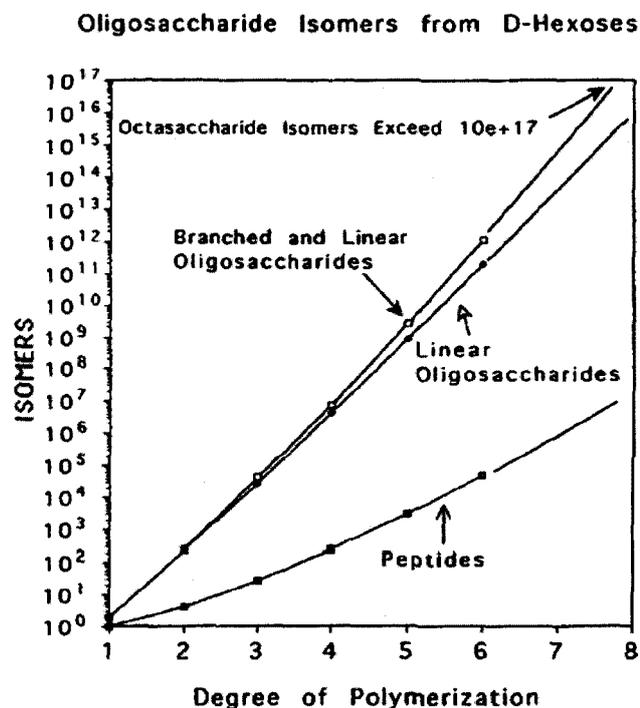


Figure 12 : Nombre d'isomères possibles en fonction du nombre de monomères
D'après[78]

La valorisation pharmaceutique des polysaccharides d'origine animale (ex : héparine) ou végétale reste rare puisqu'elle nécessite le développement de nouvelles méthodologies analytiques adaptées à des échantillons aussi complexes.

II-1.1 Les méthodes séparatives

Les polysaccharides sont souvent extraits sous forme de mélanges hétérogènes. Par conséquent, leur analyse structurale nécessite en amont une séparation des différents chaînons par chromatographie ou électrophorèse.[80]

II-1.1.a Les méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques ont été les premières utilisées pour assurer une purification et une séparation de ces échantillons très hétérogènes.

La chromatographie d'exclusion stérique reste la méthode préparative la plus utilisée, elle permet une bonne estimation des masses moléculaires apparentes, mais ne sépare pas les stéréoisomères. Différentes méthodes de chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont également été développées. La chromatographie par échange d'anions (phase greffée NH_4^+) permet d'exploiter la différence d'acidité des polysaccharides sulfatés. La chromatographie de partage permet quant à elle une séparation en fonction des polarités.

La formation de paires d'ions, séparées par HPLC en phase inverse (phase stationnaire hydrophobe), a par exemple permis de séparer des disaccharides issus d'un mélange d'acide hyaluronique et de sulfate de chondroïtines.[81] Ces mêmes disaccharides, sulfatés ou non, ont également été séparés en une étape par HPLC en phase normale (phase stationnaire hydrophile) puis détectés après dérivation par un fluorophore.[82]

II-1.1.b Les méthodes électrophorétiques

Les méthodes électrophorétiques, souvent complémentaires des méthodes chromatographiques, ont été employées plus récemment. [83]

La méthode la plus ancienne datant des années 70 consiste à séparer les GAG sur des bandes d'acétate de cellulose. L'électrolyte le plus courant pour ce type de séparations est l'acétate de barium.[84] L'ajout d'additifs, tels que l'acide chlorhydrique[85] ou l'éthanol[86], pour réaliser des précipitations séquentielles en fonction des degrés de sulfatation, est également employé. Par la suite, les bandes de nitrocellulose ont permis d'améliorer la séparation et la quantification de GAG.[87]

Des gels d'électrophorèse d'agarose[88] et de polyacrylamide[89, 90] ont également été adaptés à la séparation et quantification de mélanges de GAG. L'avantage de ces dernières techniques réside dans la possibilité de récupérer les saccharides préfractionnés afin de les séparer ensuite avec plus de précision (HPLC, CE) ou de les analyser par MS.

Plus récemment, l'électrophorèse capillaire (CE) est apparue plus intéressante que la chromatographie ou les gels pour la séparation des polysaccharides (*cf.* § II-2.2.c page 39). Les principaux avantages sont la diminution des durées de séparation et des quantités employées.

II-1.1.c Détection des saccharides

Les polysaccharides naturels ne possèdent aucun chromophore ou fluorophore. La détection directe est néanmoins réalisable dans certains cas, notamment sur des oligosaccharides issus d'une dépolymérisation enzymatique (au moyen d'heparinase) : l'insaturation formée est alors détectable à 220 nm.[91] Les groupements fonctionnels présents (hydroxyles, amines et carboxyles) peuvent donner lieu à de nombreuses procédures de dérivation.[92] L'extrémité réductrice peut être couplée à des fluorophores par exemple par une réaction d'amination.[93] Sur les gels, la coloration au bleu Alcian spécifique des fonctions acide ionisées au pH utilisé (COOH et SO₃H à pH 2,3 ; SO₃H seul à pH 1,3) permet une détection des polysaccharides sulfatés jusqu'au µg. La combinaison de la coloration au bleu Alcian avec une coloration argentique permet d'atteindre une sensibilité comparable à la fluorimétrie de l'ordre du ng.[94]

II-1.2 Les méthodes d'analyses structurales

En raison de leur flexibilité, les polysaccharides sont de très mauvais candidats à l'analyse cristallographique par diffraction aux rayons X. Leur taille moléculaire ainsi que leur hétérogénéité structurale est un frein à l'utilisation de la RMN qui reste pourtant la méthode d'analyse structurale d'oligosaccharides la plus puissante. L'analyse par MS, devenue plus résolutive et plus sensible, s'adapte à l'analyse structurale des polysaccharides quelle que soient leur charge ou leur taille. La disponibilité d'une base de données pour l'analyse de polysaccharides par spectrométrie de masse, comme il en existe pour les protéines, serait un atout considérable en termes d'automatisation et de rapidité d'analyse.

II-2 ANALYSE DES INTERACTIONS PROTEINES / SACCHARIDES

Les nombreuses méthodes d'analyse des interactions protéines / ligands (Tableau 2) ne sont pas toutes applicables à l'analyse d'interactions protéines / saccharides. En effet, les limitations structurales liées à l'analyse des sucres restent présentes. La plupart des méthodes consistent à analyser la protéine et les modifications conformationnelles entraînées par sa liaison au saccharide. Dans cette partie, seules les méthodes utilisées pour l'étude d'interactions protéine / saccharides seront abordées.

	Pré-requis	Durée de l'analyse	Quantités nécessaires	Echantillon pures	Kd mol.L ⁻¹
Infrarouge à transformée de Fourier	/	Heures	μM - μL	oui	/
Fluorescence	greffage d'un chromophore	Heures	μM - mL	oui	10 ⁻⁶ à 10 ⁻¹¹
Dichroïsme circulaire	/	Heures	μM - mL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁷
Résonance plasmonique de surface	greffage du récepteur	Minutes	ng - μL	récepteur : oui ligands : non	10 ⁻³ à 10 ⁻¹³
Puces à sucre	greffage du récepteur	Minutes	/	récepteur : oui ligands : non	/
Calorimétrie	/	Heures	mg - mL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁹
RMN	/	Heures-jours	mM - mL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁹
Dialyse	/	Minutes-heures	μM - μL	oui	10 ⁻¹ à 10 ⁻¹³
Chromatographie d'exclusion stérique	/	Minutes	mM - mL	non	10 ⁻⁴ à 10 ⁻¹³
Chromatographie d'affinité	greffage du récepteur	Minutes	mM - mL	récepteur : oui ligands : non	/
Ultracentrifugation analytique	/	Heures	μg - μL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁹
Cristallographie	réalisation du cristal	Semaines	mg	oui	/
Modélisation	données structurales	Jours	/	/	/
Electrophorèse capillaire	/	Minutes	μM - nL	non en CZE oui en FACE	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁷
Spectrométrie de masse	/	Minutes	μM - μL	oui	/

Tableau 2 : Caractéristiques techniques des méthodes d'analyse d'interactions protéines / ligands.

D'après[95, 96]

II-2.1 Les méthodes d'analyses

II-2.1.a Spectroscopies

Fluorescence

Une molécule fluorescente, ou fluorophore, possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (excitation) et de la restituer (émission) à une longueur d'onde spécifique. Les protéines possèdent une fluorescence intrinsèque lorsqu'elles possèdent des résidus tryptophane.

Il est également possible de greffer des fluorophores (fluorescéine, rhodamine...) pour pallier l'absence de tryptophane ou tout simplement augmenter la sensibilité de la détection. En présence d'un ligand, la fluorescence de la protéine sera modifiée.

Une molécule de petite taille (ligand) en solution possède un grand degré de liberté. Lorsqu'on lui soumet un rayonnement lumineux polarisé, la lumière réémise est alors dépolarisée. Par contre, si cette petite molécule se lie à une protéine, ses mouvements sont ralentis et la lumière réémise est moins dépolarisée. La différence entre ces deux états, directement liée à la concentration en protéine, est corrélable au nombre de protéines liées ainsi qu'aux constantes d'interaction.

La polarisation de fluorescence (Figure 13) est une méthode analytique très employée pour l'analyse d'interactions en solution de protéines et d'acides nucléiques. Les rares études d'interactions protéines / saccharides réalisées par polarisation de fluorescence concernent l'étude de lectines.[97-101]

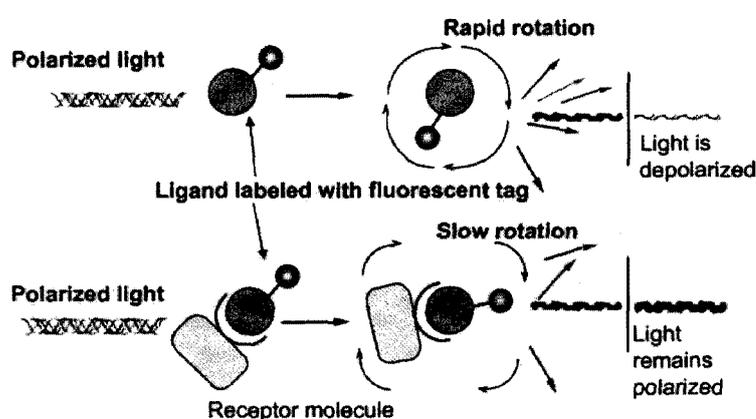


Figure 13 : Principe de l'étude d'interaction récepteur / ligand par polarisation de fluorescence

D'après[97]

Pour cette méthode, le greffage du fluorophore se fera de préférence sur la molécule de plus petite taille, donc sur l'oligosaccharide, par exemple : greffage de fluorescéine par réduction de fonctions amides. L'échantillon saccharidique doit nécessairement être homogène et sa modification chimique ne doit pas gêner l'interaction avec la protéine.

Dichroïsme circulaire

Toute onde lumineuse possède deux composantes circulaires de polarisation : gauche et droite. Une molécule optiquement active présente un dichroïsme circulaire, elle absorbe différemment une onde lumineuse circulaire polarisée droite ou gauche. L'absorbance mesurée dépend de la longueur d'onde lumineuse et est caractéristique du composé étudié. Cette méthode

renseigne sur les structures secondaires (hélices α , feuillets β) et conformations (interactions, dénaturations) des protéines analysées. Les données structurales restent pauvres comparées à la RMN et à la cristallographie. Les tampons les plus courants en biochimie (phosphates, sulfates, acétates...) absorbent également les ondes lumineuses et peuvent être sources d'absorptions parasites.

Lors de la formation d'un complexe non covalent, l'absorbance mesurée sera modifiée du fait d'un changement conformationnel de la protéine.[102] Cette méthode est couramment utilisée pour la détermination de paramètres thermodynamiques tels que les constante et vitesse d'interaction de complexes protéine / saccharide (ex : interaction antithrombine / héparine[42, 103]). Les avantages de cette méthode résident principalement dans sa rapidité de mise en œuvre et la facilité d'interprétation des résultats, de plus, plusieurs conditions opératoires (pH, température...) peuvent être étudiées en peu de temps.[104]

Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est basée sur la mesure de la variation des propriétés optiques d'une surface d'or, sur laquelle est greffée la molécule à étudier en présence de ligands spécifiques. Dans le cas d'interactions protéines / oligosaccharides, le greffage le plus fréquent est celui l'oligosaccharide (ex : interaction SDF-1 α / héparine[70]). La cinétique d'interaction est étudiée en temps réel.[105]

La difficulté principale de la méthode réside dans la réalisation d'un greffage uniforme de la molécule sur le film métallique. La présence d'une gêne stérique entre molécules greffées ainsi que la fixation de ces dernières sous différentes conformations peuvent entraîner des artefacts de mesure. Les quantités d'échantillon nécessaires à l'analyse sont très faibles, de l'ordre de quelques femtomoles.[106] La SPR peut être couplée à des méthodes d'analyse structurale telle que la MS.[107] Une récente amélioration de la SPR montre qu'elle peut également être couplée à une méthode de mesure par diffusion de lumière.[108]

Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) reste la méthode d'analyse structurale de complexes protéine / sacharides la plus puissante. Classiquement utilisée pour déterminer des structures primaires de composés organiques, cette méthode peut dans certaines conditions donner des renseignements sur les structures tertiaires. L'analyse d'interactions reste difficile car la complexité de l'interprétation des données obtenues, ainsi que la durée d'analyse augmentent avec la taille des molécules étudiées. Généralement les sites d'interaction sont déterminés par la

modification des signaux de la protéine lors de l'ajout de ligands (ex : interaction SDF-1 α / héparine[62]), mais l'observation des signaux de petits oligosaccharides est également réalisable (ex : interaction peptide de lectine / disaccharides[109]). En plus des structures, la RMN permet parfois de quantifier les interactions, mais une limitation apparaît pour des complexes de stoechiométries différentes de 1/1 et possédant un caractère symétrique.

Cristallographie aux rayons X

A partir d'une solution saturée en analytes purs, le solvant est évaporé sous des conditions strictes de température et de pression. Cette étape de cristallogenèse qui peut durer plusieurs jours pour des protéines donne naissance à un cristal. L'état cristallin est caractérisé par un arrangement périodique des atomes et molécules. La diffraction par rayons X permet ensuite une détermination précise des structures moléculaires figées. Il existe tout de même des limitations dues à la présence de zones flexibles, comme les sucres des glycoprotéines par exemple.

En ce qui concerne l'interaction entre protéines et saccharides, la littérature reporte principalement des études réalisées sur des petits oligosaccharides. Deux méthodes de cristallisation peuvent être envisagées :

- cristallisation du mélange pré-incubé (ex : interaction lectine / chitine[110])
- cristallisation de la protéine puis dépôt du cristal dans une goutte d'oligosaccharide (ex : interaction SDF-1 α / héparine[62]).

II-2.1.b Calorimétrie

Le dosage calorimétrique isotherme est une méthode quantitative permettant la mesure de constantes d'interaction, d'enthalpie d'échange et le calcul de stoechiométrie. L'appareillage est constitué de 2 cellules métalliques à forte conduction thermique (en or par exemple) placée dans une enceinte adiabatique. Une des cellules sert de référence, les ligands sont injectés dans l'autre cellule qui contient le récepteur. La mesure des différences de température entre les deux cellules renseigne sur les enthalpies de réaction. Dans le cas d'une réaction exothermique par exemple, la température de la cellule augmentera avec la concentration en ligand.

La courbe de dosage obtenue représente la variation de chaleur en fonction du temps ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) et de la concentration en ligand. La Figure 14 est extraite d'une étude concernant l'interaction d'une lectine avec un disaccharide : le lactulose.[111]

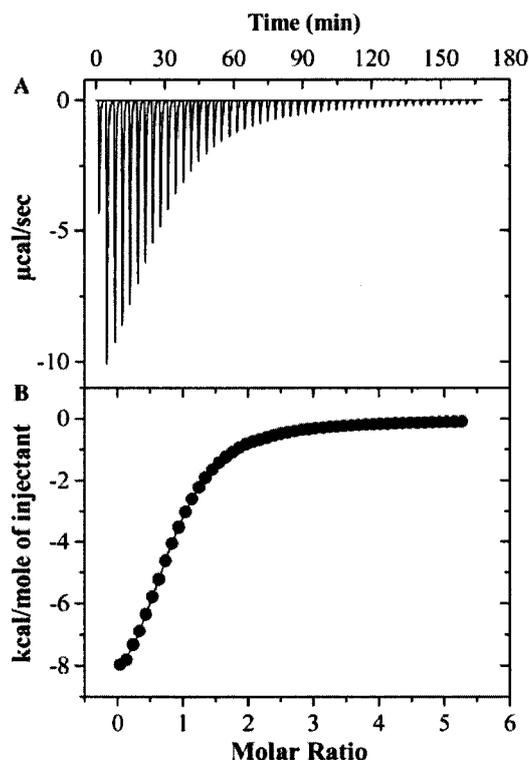


Figure 14 : Dosage calorimétrique de l'interaction lectine / lactulose

A : variation de la chaleur dégagée par seconde, B : variation de la chaleur dégagée par mole de ligand.

D'après[111]

La Figure 14A correspond à la mesure de chaleur dégagée lors de 50 ajouts successifs de lactulose ($5 \mu\text{L}$ à 10 mM) à intervalle de 200 sec dans la cellule contenant $0,3 \text{ mM}$ de lectine. La courbe de dosage située dans la Figure 14B est obtenue en divisant l'ordonnée des 50 mesures précédentes par la quantité de lactulose introduite. La linéarisation de cette courbe a permis la détermination des données thermodynamiques d'interaction ainsi que le nombre de sites de liaisons.

II-2.1.c Méthodes hydrodynamiques

Dialyse à l'équilibre

L'appareillage est constitué de deux chambres séparées par une membrane poreuse empêchant le transfert de la protéine mais pas celui de l'oligosaccharide. Une quantité connue d'oligosaccharide est placée dans l'une des chambres, la protéine est placée dans la seconde chambre. L'oligosaccharide traverse alors la membrane : une partie se lie à la protéine, l'autre partie permet d'équilibrer la concentration en oligosaccharides non liés dans les deux chambres.

L'interaction mise en jeu est ensuite quantifiée par la mesure de la concentration d'oligosaccharides non liés. Les méthodes de quantification des oligosaccharides nécessitent un marquage préalable de ces molécules par un chromophore (dosages spectrophotométriques) ou des radioéléments (ex : ^3H Lactose[112]). Cette méthode longue à mettre en œuvre est aujourd'hui peu utilisée.

Chromatographie d'affinité

Le schéma le plus courant, et aussi le plus commercialisé, correspond au greffage de l'oligosaccharide sur la colonne (ex : colonnes greffées par de l'héparine). Le mélange de protéines à étudier est ensuite injecté, et seules les protéines ayant de l'affinité pour la colonne, donc pour le saccharide, sont retenues. L'élution est ensuite réalisée par des concentrations croissantes en sels ou en solvant organique en fonction du type d'interactions mises en jeu, électrostatiques ou hydrophobes. Cette technique est très utilisée pour la purification de protéines.[113]

Très souvent associée à des expériences de mutagenèse dirigée (cf.§II-2.1.d page 33), la chromatographie d'affinité permet alors l'identification précise des résidus d'acides aminés mis en jeu et les constantes d'interaction entre protéines et oligosaccharides (ex : interaction MCP / héparine[74]).

Ultracentrifugation analytique

L'analyse des interaction protéines / saccharides (ex : interaction lysozyme / chitine[114]) peut être réalisée par ultracentrifugation suivant deux méthodes complémentaires : l'une basée sur la vitesse de sédimentation et l'autre sur la sédimentation à l'équilibre.[115, 116]

L'ultracentrifugation par vitesse de sédimentation est la méthode la plus courante. Elle est sensible à la masse et au volume hydrodynamique de la macromolécule à étudier. Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de sédimentation d'une molécule en fonction de sa conformation (libre ou liée), en réponse à une force centrifuge de 40000 à 60000 rpm. Les principales informations qu'elle apporte concernent l'homogénéité (en masse et en conformation) des échantillons, la formation d'agrégats et d'interactions fortes avec des ligands. Dans certains cas, cette méthode permet de mesurer des coefficients de diffusion et des masses moléculaires.

La sédimentation à l'équilibre n'est sensible qu'à la masse de la molécule. Cette méthode est très longue à mettre en œuvre : plusieurs jours sont nécessaires (contre quelques heures pour

la vitesse de sédimentation). Elle permet d'estimer des masses moléculaires et la détermination de stoechiométries.

II-2.1.d Mutagenèse dirigée

L'objectif principal de la mutagenèse dirigée est d'identifier les résidus aminés de la protéine jouant un rôle dans sa liaison aux saccharides. La structure de la protéine doit être connue. Les résidus basiques (lysine, arginine, histidine), généralement situés en surface de la protéine sont remplacés par des résidus neutres (une sérine par exemple). La limitation principale de cette méthode est que la structure tridimensionnelle du mutant doit être la même que celle de la protéine. Les interactions avec les oligosaccharides sont ensuite étudiées avec les différents mutants par différentes méthodes, la plus courante étant la chromatographie d'affinité (ex : interaction MCP / héparine[74]).

II-2.1.e Puces à sucre

Des oligosaccharides synthétiques, parfois naturels, de séquence connue et homogène sont greffés sur une plaque mesurant quelques millimètres.[117] Un mélange de protéines est alors mis au contact de la puce, des séquences de lavage éliminent les éléments non liés. Les protéines liées sont ensuite analysées après élution par fluorimétrie ou MS. Cette technologie d'abord utilisée pour l'analyse d'interactions avec les acides nucléiques, apparaît très intéressante pour les saccharides.[118] Les limitations principales, qui sont les mêmes que pour la SPR, concernent la difficulté de greffage des ligands.

II-2.1.f Modélisation moléculaire

Des modèles sont construits à partir de structures prédéterminées par cristallographie (fichiers PDB de la base de données protéiques, ex : interaction SDF-1 α / héparine[70]) ou par homologie avec des molécules de structures proches. Les conformations les plus stables sont calculées par minimisation de l'énergie du complexe. Dans l'absolu et pour des molécules connues, cette méthode ne possède pas de limitation. Dans la pratique, la durée des calculs dépend des capacités informatiques : puissance des stations de calculs, amélioration des logiciels et des bases de données.

II-2.2 L'électrophorèse capillaire

Cette méthode séparative sera décrite plus en détail puisqu'elle a fait l'objet de développements analytiques au cours de cette thèse. Les principes théoriques seront rappelés brièvement suivis d'un exposé non exhaustif des différents modes d'analyses possibles.

II-2.2.a Généralités

L'électrophorèse capillaire (CE) est une méthode séparative qui repose sur la séparation de molécules au sein d'un micro-capillaire soumis à un champ électrique. Les principaux avantages de la CE sont la faible consommation d'échantillons et de solvants, l'efficacité, la rapidité d'analyse et la possibilité d'automatisation.

Mobilité des espèces séparées

La vitesse de migration (v_M) d'une molécule chargée dans un capillaire de séparation est fonction de sa mobilité apparente (μ_{app}) et du champ électrique appliqué (E), selon la relation :

$$v_M = \mu_{app} \cdot E = \mu_{app} \cdot \frac{V}{L}$$

v_M = vitesse de migration en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, μ_{app} = mobilité apparente en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,
 E = champ électrique en $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$, V = tension en volts et L = longueur totale du capillaire en cm.

La mobilité apparente (μ_{app}) d'une molécule chargée possède une composante électrophorétique (μ_{ep}) et une composante électro-osmotique (μ_{eo}) :

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$$

avec $\mu_{eo} = \frac{l \cdot L}{V \cdot t_{eo}}$ et $\mu_{ep} = \frac{l \cdot L}{V \cdot t_{ep}}$

μ_i = mobilités en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, l = longueur utile du capillaire en cm (distance entrée – détecteur),
 L = longueur totale du capillaire en cm, V = tension en V, t_i = temps de migration en s.

La composante électrophorétique dépend du volume hydrodynamique et de la charge apparente de la molécule. La composante électro-osmotique est liée à la nature du capillaire (silice vierge ou greffée, téflon, pyrex, etc) et aux caractéristiques physico-chimiques de

l'électrolyte (viscosité, pH, force ionique, *etc.*).[119] La paroi de silice est tapissée de groupements silanols déprotonés à pH supérieur à 5. Les cations de l'électrolyte viennent se placer à la surface de la silice et forment une double couche diffuse. A l'application du champ électrique, les cations de la double couche se mettent en mouvement vers la cathode et entraînent les molécules électrolytiques de l'échantillon. Le contrôle de cette composante est déterminant pour la reproductibilité des analyses.

Principe général de séparation en électrophorèse capillaire

Les capillaires de silice vierge possèdent des groupements silanol en surface susceptibles d'être chargés négativement à $\text{pH} > 5$. Ces charges de surfaces attirent les molécules cationiques de l'électrolyte et peuvent entrainer son mouvement (flux électro-osmotique) lors de l'application d'une tension électrique (jusqu'à 30 kV). Classiquement, la combinaison d'un électrolyte basique et d'une tension positive entraine un écoulement électro-osmotique cathodique dirigé de l'anode vers la cathode (Figure 15).

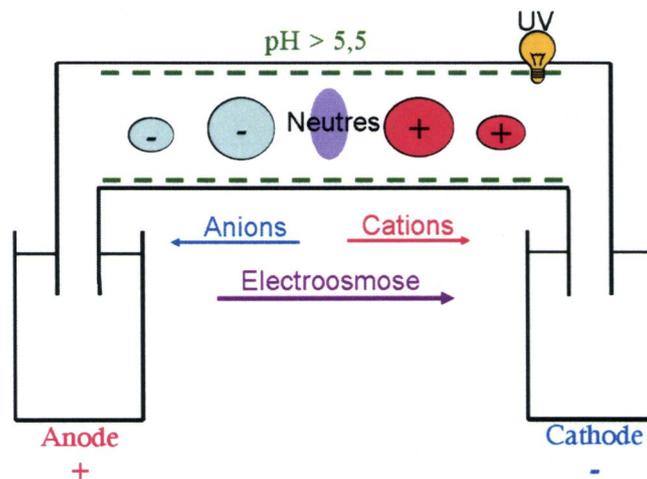


Figure 15 : Séparation électrophorétique en présence d'un flux électro-osmotique cathodique

Cette configuration est également appelée polarité normale. L'ordre de séparation théorique des composés est alors le suivant : les cations sont détectés les premiers, suivis par les espèces neutres puis les anions. Les ions sont détectés en fonction de leur rapport charge sur masse Dans ce cas de figure, les molécules neutres transportées uniquement par le flux électro-osmotique ne sont pas séparées.

Injection des échantillons

Les échantillons peuvent être injectés selon deux modes : hydrodynamique et électrocinétique.

- L'injection hydrodynamique consiste en l'application d'une surpression dans le flacon contenant l'échantillon. Ce mode d'injection est le plus courant, surtout lorsque l'analyse se veut quantitative. Le volume injecté dépend de la viscosité de l'électrolyte et des dimensions du capillaire, il peut être calculé par une adaptation de l'équation de Hagen - Poiseuille :

$$V_{inj}^{hydro} = \frac{\Delta P \cdot d_i^4 \cdot \pi \cdot t_0}{128 \cdot \eta \cdot L}$$

V_{inj} en cm^3 (soit 10^6 nL), ΔP = pression en Pascal (Pa, 1 mbar = 100 Pa), d_i = diamètre interne du capillaire en centimètre (cm), t_0 = durée d'application de la pression en secondes (s),
 η = viscosité en centipoise (10^{-3} Pa.s), L = longueur totale du capillaire en cm.

- L'injection électrocinétique consiste en l'application d'une tension à l'électrode d'entrée, plongée dans le flacon contenant l'échantillon. Les différents analytes sont introduits dans le capillaire en fonction de leur vitesse de migration respective et par conséquent à des concentrations différentes de celles présentes dans l'échantillon. Le volume injecté dépend alors des mobilités électro-osmotique et électrophorétique, il peut être calculé grâce à l'équation :

$$V_{inj}^{electro} = \frac{\pi}{4} \cdot d_i^2 \cdot (\mu_{eo} + \mu_{ep}) \cdot \frac{V_0}{L} \cdot t_0$$

V_{inj} en cm^3 (soit 10^6 nL), d_i = diamètre interne du capillaire en cm, μ_{eo} = mobilité électro-osmotique en $10^{-5} cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$, μ_{ep} = mobilité électrophorétique en $10^{-5} cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$
 V_0 = tension appliquée en Volts (V), t_0 = durée d'application de la pression en s,
 L = longueur totale du capillaire en cm.

En fonction de la durée d'injection, on distinguera les méthodes d'électrophorèse capillaire en zone (CZE) des méthodes frontales (FACE et FACCE, Figure 16).

L'injection de l'échantillon dure quelques secondes en CZE, quelques minutes en FACE et elle est continue en FACCE.

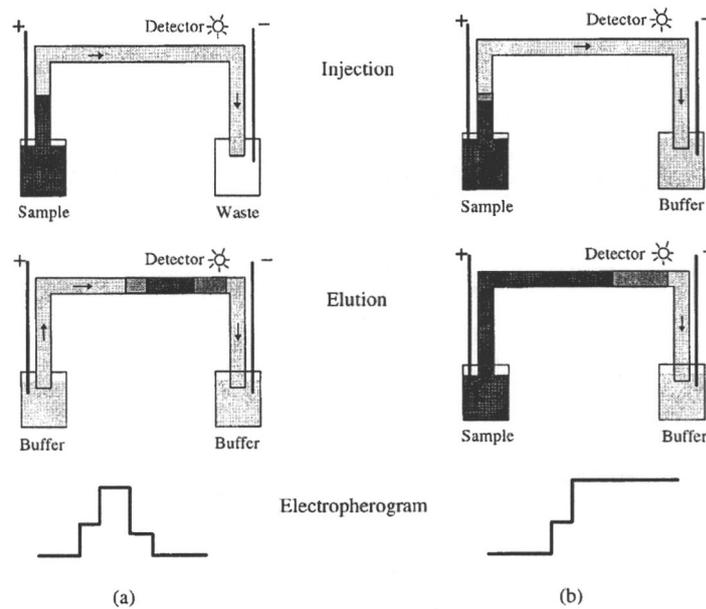


Figure 16 : Comparaison des modes d'injection par analyse frontale

(a): FACE, (b): FACCE. D'après[120]

II-2.2.b Analyse de protéines par électrophorèse capillaire

L'analyse de protéines par CE peut être réalisée suivant cinq mécanismes de séparation : en fonction des rapports charge / masse, des masses, des points isoélectriques⁹, de l'hydrophobie ou de leur affinité pour une molécule donnée.

Les protéines, comme beaucoup d'échantillons d'origine naturelle, sont disponibles en quantités limitées. Pour pallier le manque de matériel, le développement des méthodes d'analyse consiste souvent à abaisser au maximum la limite de détection. La sensibilité de la CE peut être améliorée à deux niveaux : en amont (préconcentration) ou en aval de la séparation (détection).[121, 122]

Mécanismes de séparation de protéines

Les protéines peuvent être séparées en fonction de leur rapport charge / masse, rapport déterminant leur mobilité électrophorétique.

La reproductibilité des séparations peut être améliorée lorsque les interactions entre protéines et parois sont supprimées. Les parois du capillaire sont alors modifiées de façon covalente (greffage) ou non (tapissage). Ces modifications de surface entraînent alors une suppression (surface neutre) ou une inversion (surface cationique) du flux électro-osmotique. Les

⁹ pI = pH auquel la protéine est globalement neutre.

capillaires greffés (polyacrylamide, polyvinylalcool, hydroxycellulose) commerciaux sont peu robustes et très coûteux. Alternativement, il existe des méthodes de greffage chimique stables sur une large gamme de pH (3 à 10), mais les protocoles sont parfois difficiles à réaliser. Les méthodes de tapissage sont souvent préférées car plus faciles à mettre en œuvre, moins coûteuses et plus reproductibles. Le tapissage est réalisé par ajout de tensioactifs (ex: bromure de cetyltriméthylammonium, polybrène) ou de polymères dans l'électrolyte (ex : polyoxyde d'éthylène) avant et/ou pendant la séparation.

L'isotachophorèse, variante de la CZE, permet également une séparation des protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique. Deux électrolytes possédant des ions de même charge que la protéine à analyser, mais de mobilité très différente sont utilisés. Lors de la séparation, les différents électrolytes engendrent un gradient de vitesse de migration permettant de mieux focaliser les protéines.

L'utilisation d'électrolytes polymérisables, couramment du polyacrylamide, permet la réalisation de tamis sous forme de gels réticulés. Cette méthode appelée CE en gel est comparable à la chromatographie d'exclusion stérique puisque les protéines sont séparées en fonction de leur volume hydrodynamique, donc approximativement de leur masse. En présence de SDS, connu pour améliorer la solubilisation des protéines, le tamisage des protéines par CE permet la séparation de protéines de 4 à 300 kg.mol⁻¹. [123]

La focalisation isoélectrique est une méthode très résolutive de séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). Un gradient de pH est créé dans le capillaire au moyen d'ampholytes, mélanges de petits polyélectrolytes. Les protéines chargées migrent sous l'effet du champ électrique en suivant un gradient de pH croissant et s'immobilisent lorsque le pH équivaut à leur pI. Au pI, les protéines ne possèdent aucune charge nette et ne peuvent plus se déplacer sous l'effet du champ électrique. [124]

Des capillaires remplis par une phase stationnaire (ex : silice greffée C18) permettent la séparation de protéines en fonction de leur degré d'hydrophobie. Cette méthode appelée électrochromatographie est souvent comparée à la chromatographie de partage. Le partage entre deux phases peut également être obtenu au moyen de micelles (ex : SDS). [125]

Dans certains cas, l'électrophorèse capillaire utilise le principe d'affinité (ACE, cf. § II-2.2.d page 40). Trois modes d'analyse sont envisageables en fonction de la localisation du ligand : pré-incubation du mélange protéine / ligand, présence du ligand dans l'électrolyte ou greffage du ligand sur les parois du capillaire (comparable à la chromatographie d'affinité). [126]

Détection

La détection par spectroscopie d'absorption UV-visible est la plus courante, les appareillages commerciaux étant équipés de série par ces détecteurs. La détection aux longueurs d'ondes 254 et 280 nm, spécifiques des groupements aromatiques (tryptophane) est souvent complétée par la mesure d'absorbance entre 200 et 220 nm, spécifique des liaisons peptidiques. En adaptant l'appareillage, d'autres types de détections peuvent être envisagés comme la fluorimétrie[127, 128], l'électrochimie[129], la chimioluminescence[130] et la MS (*cf.* §. II-3 page 49).

II-2.2.c Analyse de glycosaminoglycanes par électrophorèse capillaire

La résolution des séparations de GAG par CE dépend principalement de la masse et de la charge des polysaccharides sulfatés.[131] Des oligosaccharides homogènes en structure (monomères répétitifs), et donc de rapports charge / masse voisins, seront difficiles à séparer.

En polarité normale, l'électrode d'entrée est l'anode (+) et on observe, pour tout pH > 5, un écoulement électro-osmotique cathodique (*cf.* Figure 15 page 35). Les polysaccharides sulfatés sont alors séparés en mode contre-électro-osmotique.

Le tampon borate est le plus utilisé pour la séparation d'isomères de GAG en fonction des positions des groupements sulfates.[132] Ce tampon permet une complexation des saccharides possédant des groupements hydroxyles vicinaux. L'ajout de triéthylamine permet de réduire d'une part le flux électro-osmotique en masquant les charges de surface du capillaire et d'autre part la mobilité électrophorétique des saccharides, en formant des paires d'ions, améliorant ainsi la résolution de la séparation.[133]

En polarité inversée, l'électrode d'entrée est la cathode (-), et à pH acide (pH ≤ 3) le flux électro-osmotique est quasiment nul. La migration des polysaccharides sulfatés est alors uniquement électrophorétique (ex : dissaccharides de GAG[134]). Dans le cas de saccharides modifiés chimiquement par le greffage d'un fluorophore, cette configuration s'est avérée être la plus favorable puisque toutes les impuretés liées à la réaction de greffage migraient bien avant les analytes (ex : héparine et dermatane sulfate[135]).

L'utilisation de capillaires modifiés, greffés au polysiloxane, combinée avec l'ajout d'un polymère neutre dans l'électrolyte comme le poly(éthylène glycol) a par exemple permis la

séparation, avec une résolution élevée, d'un mélange de polysaccharides de plus de 100 unités en fonction de leur degré de polymérisation.[136]

II-2.2.d Interactions non covalentes protéine / ligand en CE

L'utilisation de la CE pour l'étude des interactions non covalentes apparaît au début des années 90 (revues : [126, 137-144]). La condition principale, pour que l'étude d'interactions non covalentes soit réalisable par CE, est que la fixation du ligand sur la protéine doit induire une modification de la mobilité de cette dernière qui soit quantifiable. Les domaines d'applications sont nombreux et concernent le plus souvent l'analyse d'interactions antigène / anticorps, enzyme / substrat, protéines / acides nucléiques et protéines / saccharides. Différents modes d'analyse sont utilisés, les cinq modes les plus courants sont décrits ci-dessous.[145] Les modes utilisés au cours de cette thèse sont les trois premiers : l'injection directe (CZE), l'électrophorèse d'affinité (ACE) et frontale (FACCE).

Electrophorèse de zone par injection directe

La protéine et le ligand sont pré-incubés avant l'injection, le plus souvent la concentration en protéine est fixée alors que la concentration en ligand est variable.[146]

Si le complexe formé possède une mobilité différente de la protéine, un nouveau pic électrophorétique correspondant au complexe formé apparaîtra tandis que l'aire du pic de protéine diminuera. L'effet de la variation de concentration en ligand peut alors être quantifié par la mesure de l'aire du pic de protéine.

Cette méthode nécessite de faibles quantités d'analytes, son principal inconvénient est que les complexes de faible affinité ont tendance à se dissocier dans le capillaire (ex : interaction facteur de croissance G-CSF / oligosaccharides d'héparine[147]).

Electrophorèse d'affinité (ACE)

La protéine est injectée dans un capillaire rempli d'électrolyte contenant des concentrations variables de ligand. Le complexe est alors formé dans le capillaire d'électrophorèse pendant la durée de l'analyse.

Si le complexe formé possède une mobilité différente de la protéine, deux cas de figures peuvent être observés en fonction de la cinétique des interactions mises en jeu. Si ces interactions ont des cinétiques lentes, un nouveau pic électrophorétique correspondant au complexe formé apparaîtra tandis que l'aire du pic correspondant à la protéine diminuera. Si ces interactions ont

des cinétiques rapides, c'est le cas le plus favorable, le pic correspondant à la protéine sera progressivement décalé avec l'augmentation de la concentration en ligand (Figure 17, exemple du complexe antithrombine / héparine). L'effet de la variation de concentration en ligand peut être quantifié par la mesure soit de l'aire du pic correspondant à la protéine soit de la mobilité du complexe formé.

La présence du ligand dans la totalité de l'électrolyte favorise le maintien du complexe formé, ainsi les complexes labiles pourront être observés dans certains cas.

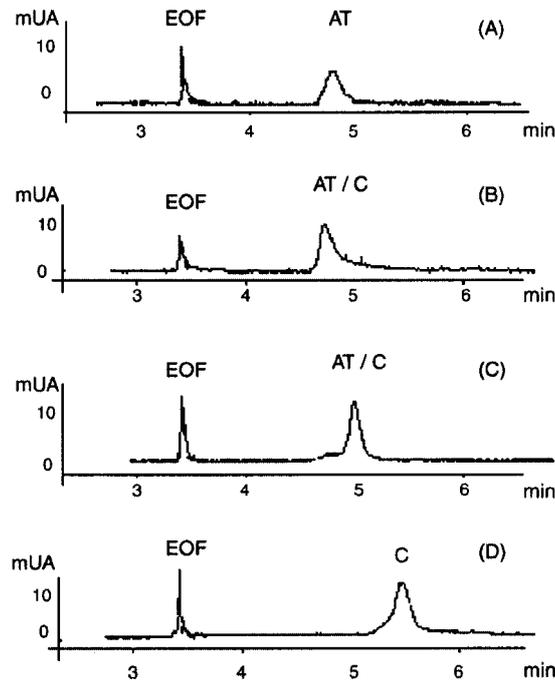


Figure 17 : Etude de l'interaction Antithrombine / héparine par ACE

EOF = flux électro-osmotique (migration d'un marqueur neutre), AT = antithrombine, C = complexe
 Concentration d'héparine dans l'électrolyte : 0 M (A), 10^{-7} M (B), 10^{-6} M (C) 10^{-5} M (D)
 Concentration en antithrombine : 10^{-5} M. D'après[148]

L'ACE nécessite de plus grandes quantités de ligands que l'injection directe. Dans le cas où le ligand et la protéine (libre ou complexée) migrent dans des directions opposées, le remplissage partiel peut être employé. Une partie du capillaire de séparation contient le ligand, lors de la séparation la protéine traversera à un moment donné cette zone de ligand et le complexe pourra se former. L'autre avantage de cette technique est d'améliorer les couplages à la MS en supprimant les interférences causées par la présence de ligand libre dans l'électrolyte.[149]

Electrophorèse frontale (FACE ou FACCE)

Le mélange pré-incubé de la protéine avec le ligand est injecté pendant un temps long, voire en continu, dans le capillaire de séparation.

Pour cette méthode, il est préférable que la protéine et le complexe aient des mobilités différentes. La formation du complexe, qui modifie la mobilité de la protéine, est observée par la formation d'un second front (Figure 18). L'effet de la variation de concentration en ligand peut être quantifié par la mesure de la variation de la hauteur du plateau correspondant à la protéine.[120, 148]

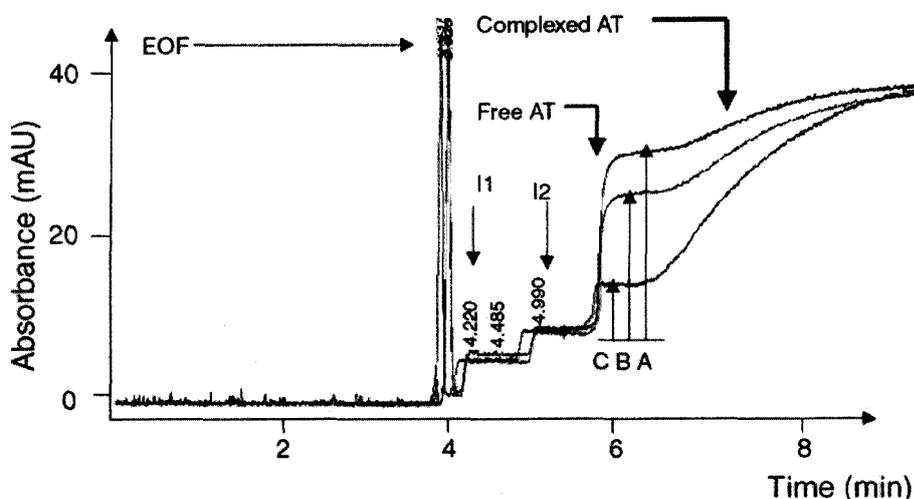


Figure 18 : Etude de l'interaction antithrombine / héparine par FACCE

EOF = flux électro-osmotique (migration d'un marqueur neutre),

AT = antithrombine, I1 et I2 correspondent à des impuretés.

Concentration d'héparine: 4,8 μ M (A), 7,5 μ M (B), 21 μ M (C)

Concentration en antithrombine : 3,5 μ M. D'après[148]

Méthode de Hümmel-Dreyer

Comme pour l'ACE, la protéine est injectée dans un capillaire rempli d'électrolyte contenant le ligand à des concentrations différentes.[150] Deux pics d'absorbance positive apparaissent pour la protéine et le complexe alors que le ligand est symbolisé par un pic d'absorbance négative. L'aire de ce dernier pic est directement proportionnelle à la quantité de ligand liée à la protéine.

Electrophorèse d'affinité et de vacance

La configuration est ici inversée : l'électrolyte seul est injecté dans un capillaire rempli d'électrolyte contenant le mélange protéine / ligand.[151] Généralement, la concentration en ligand est fixée alors que la concentration en protéine variable. Des pics de vacance (absorbance négative) apparaissent alors pour la protéine et pour le ligand. L'aire du pic correspondant au ligand est directement proportionnelle à la quantité de ligand libre dans le capillaire. Cette technique consomme des quantités importantes d'analytes et les méthodes de calculs de constantes d'interaction sont laborieuses.

II-2.3 La spectrométrie de masse

De nos jours, plusieurs sources d'ionisation ainsi que différents types d'analyseurs sont disponibles commercialement. Afin de réaliser un couplage avec la CE pour l'analyse d'interactions non covalentes, nous avons utilisé une source d'ionisation douce compatible avec l'électrophorèse capillaire : l'électronébulisation (plus couramment appelée electrospray). Le but principal du développement effectué dans la première partie de cette thèse (*cf.* Chapitre 2) vise à réaliser une identification structurale des ligands saccharidiques liés à des protéines. Pour cela, nous avons choisi un analyseur permettant de fragmenter des ions (MS/MS ou MSⁿ) : la trappe d'ions. Cette partie décrira uniquement le spectromètre de masse utilisé.

II-2.3.a Généralités sur l'ionisation par électro-nébulisation

La première source electrospray (ESI) développée par Dole *et al* apparait à la fin des années 60.[152] Elle est ensuite améliorée par Fenn en 1985 (Figure 19) qui mettra en avant l'intérêt de cette source pour l'analyse des biomolécules [153, 154] et décrira le principe physique de l'ionisation par électro-nébulisation (prix Nobel de chimie en 2002).

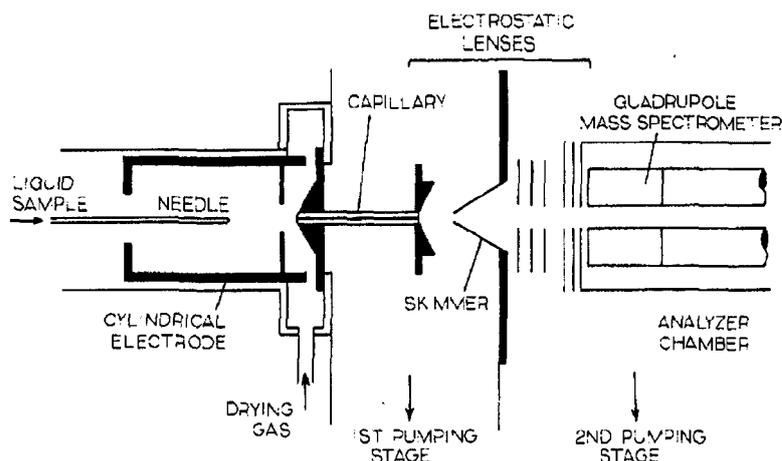


Figure 19 : Source electrospray

D'après [155]

Afin de travailler à de plus haut débit que la première source, une variante de cette source electrospray, la source Ionspray (IS) a été mise au point en 1987 (Figure 20). Cette nouvelle source possède, en plus du gaz de séchage à contre-courant, un gaz de nébulisation à co-courant ou assistance pneumatique à la nébulisation. Actuellement, c'est la source la plus courante, qui par abus de langage est également appelée source ESI.

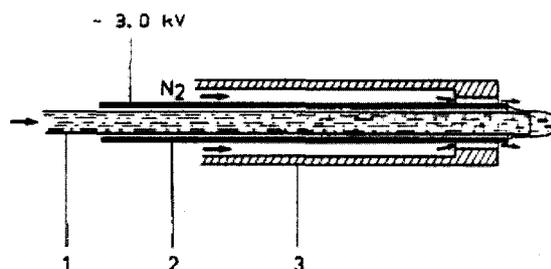


Figure 20 : Source ionspray

1 : capillaire de silice 50 μ m i.d.; 2 : capillaire en acier inoxydable 0,2 mm i.d.
3 : Tube en téflon 0,8 mm i.d. D'après [156]

L'ESI est basée sur le passage de l'échantillon en solution à travers un capillaire porté à un haut potentiel électrique (3 à 6 kV), provoquant la formation d'un nébulisât de gouttelettes chargées. L'évaporation du solvant par le gaz de séchage réduit la taille de ces gouttelettes dont la densité de charge augmente. Lorsque les répulsions électrostatiques deviennent supérieures aux forces de cohésion qui maintiennent les gouttes (tension superficielle), elles explosent en gouttelettes de plus en plus petites (cascade d'explosions coulombiennes). L'analyte en phase liquide se retrouve finalement en phase gazeuse, débarrassé de son solvant et recouvert par un manteau de charges. Les ions formés sont transférés vers l'analyseur sous l'influence d'un gradient de pression et de lentilles ou multipôles de focalisation.

L'introduction de l'échantillon sous forme liquide permet un couplage avec des méthodes séparatives telles que la chromatographie liquide et l'EC. Cette méthode d'ionisation douce est utilisée pour la détection de molécules entières non volatiles et thermosensibles ainsi que l'observation d'interactions non covalentes dans certaines conditions. L'autre particularité de cette source est la formation d'ions multichargés permettant d'observer des macromolécules, par une diminution du rapport masse sur charge (m/z), avec des analyseurs limités en hauts rapports m/z (analyseurs quadripolaire et trappe à ions). Les spectres de masse avec ce mode d'ionisation correspondent à une distribution statistique de pics correspondant à des ions moléculaires positifs $(M + zH^+)^{z+}$ ou négatifs $(M - zH^+)^{z-}$ en fonction du mode d'ionisation (avec $z =$ nombre entier).

II-2.3.b Généralités sur le piège à ions quadripolaire (ou trappe à ions)

Les trappes dites de première génération permettaient une analyse d'ions jusqu'à 650 m/z seulement. Ces trappes étaient en général couplées à un appareil de chromatographie en phase gazeuse (GC), et l'ionisation avait lieu à l'intérieur même de la trappe. Les trappes dites de

seconde génération, habituellement couplées à une source d'ionisation externe, permettent une analyse d'ions jusqu'à 3000 m/z (voire 6000 m/z), ainsi que leurs fragmentations successives (MS^n jusqu'à $n=11$ en théorie). Ces dernières montrent une limitation concernant la détection des fragments, dont le rapport m/z ne peut être inférieur à $1/3$ du rapport m/z de l'ion de parent.

Le pionnier de cette technologie, développée au début des années 50, est Wolfgang Paul (prix Nobel de physique en 1989). Les analyseurs de première génération apparaissent en 1983 commercialisés par Finnigan. Les analyseurs de seconde génération (Figure 21) apparaissent en 1995 commercialisés par Bruker-Franzen.[157]

Ces analyseurs sont formés par une électrode annulaire recouverte de part et d'autre par deux électrodes de forme hyperbolique appelées électrodes chapeaux (Figure 21).

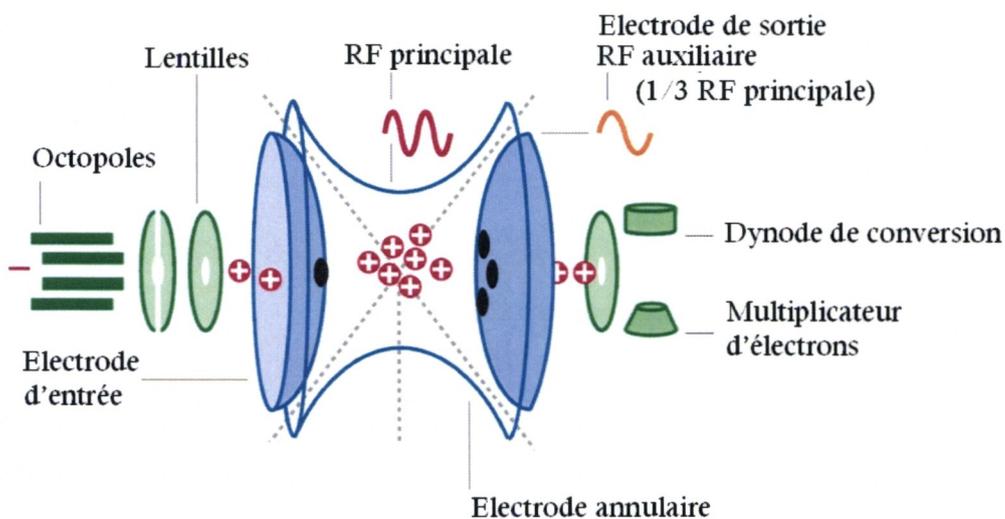


Figure 21 : Schéma d'un piège à ions quadripolaire de seconde génération

Bruker Daltonics ©

L'électrode d'entrée possède un orifice à travers lequel les ions sont transférés dans le piège. L'électrode de sortie possède quant à elle plusieurs orifices aux travers desquels les ions sélectionnés sont transmis vers le détecteur. La géométrie de ces électrodes est optimisée afin de pouvoir créer un champ quadripolaire homogène.

Une onde de radiofréquence (RF principale, fréquence angulaire $\Omega = 781$ kHz) est appliquée sur l'électrode annulaire tandis que les électrodes chapeaux sont reliées à la masse. En fonction de l'intensité de cette onde RF, les ions appartenant à une gamme de rapports m/z donnée sont alors piégés dans cet espace au sein d'un pseudo puit de potentiel.[158] L'hélium contenu dans le piège assure un confinement de ces ions. Une onde RF auxiliaire peut également être appliquée sur l'électrode de sortie afin de fragmenter un ion en particulier. Les ions piégés

sont ensuite déstabilisés par une augmentation de l'onde RF pour être éjectés séquentiellement en fonction de leurs rapports m/z .

II-2.3.c Analyse d'interactions non covalentes protéines / saccharides par ESIMS

Le processus d'ionisation electrospray (ESI) est rapidement apparu intéressant pour l'étude d'interactions non covalentes (revues : [159-164]). L'ESIMS devient une méthode de choix pour l'analyse d'interaction protéine / ligands et d'autres macro-complexes d'origine biologique, assurant une détermination rapide des stœchiométries des complexes formées. Ce procédé ne permet pourtant pas d'observer toutes les interactions. En effet, les interactions électrostatiques et dipolaires sont renforcées en l'absence de solvant contrairement aux interactions hydrophobes. Pour ces raisons, la question de la spécificité des interactions observées en phase gazeuse comparées aux interactions en solution reste posée.[165, 166] La MS des interactions non covalentes, appelée MS supramoléculaire, reste complémentaire des méthodes d'analyses en solution.

Les pionniers Ganem *et al* publient en 1991 le premier spectre de masse (Figure 22) de complexes non covalents entre la protéine FKBP et deux ligands : FK506 et la rapamycine.[167] Cette étude illustre également la possibilité de réaliser des analyses de compétition entre plusieurs ligands afin de déterminer les affinités relatives en phase gazeuse. L'acétate d'ammonium, tampon volatil, utilisé dans cette étude restera par la suite le tampon le plus utilisé dans le domaine.

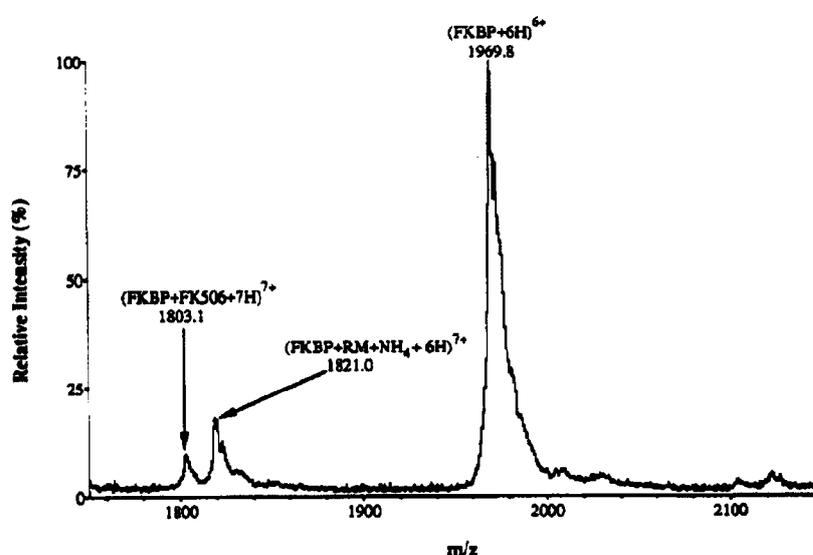


Figure 22 : Analyse d'interactions non covalentes protéine / ligands par IS-MS

Protéine FKBP humaine ($M_w = 11812$ Da, 10 ng/ μ L) ; Ligands en compétition FK506 ($M_w = 804$ Da) et Rapamycine (RM, $M_w = 913$ Da). Toutes concentrations égales à $0,8$ μ M.

Source ion-spray, analyseur triple quadripôle. Tampon acétate ammonium 10 mM pH 7,5. D'après [167]

L'année suivante, le premier complexe protéine / saccharide, entre le lysozyme et un monosaccharide de chitine est observé par ESI - triple quadripôle.[168] Le complexe que nous avons pris pour modèle : antithrombine / pentasaccharide d'héparine (Figure 23) a également été observé par cette technique.[169]

Les études qui suivirent ont pu bénéficier de sources plus adaptées (nanoESI) permettant des consommer moins d'analytes et des progrès techniques concernant les analyseurs en terme d'extension des gammes de masse et de résolution (ex : TOF, FT-ICR). L'analyse de système plus complexes est alors réalisable, par exemple l'interaction de multimères non covalents d'apocavalinA avec des oligosaccharides.[170] L'observation de complexes de faible affinité est également envisagée entre des peptides de lectine et des disaccharides.[109]

La quantification de paramètres thermodynamiques (constante de dissociation) en phase gazeuse peut être déterminée à partir de spectres ESI de différentes façons : par modification de la température de la source ou de l'énergie de collision appliquée.[171]

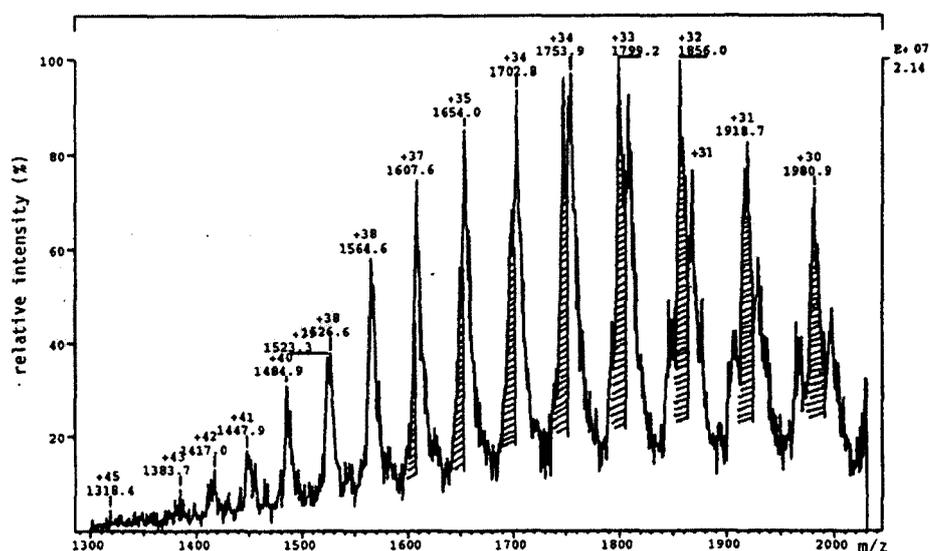


Figure 23 : Spectre de masse du complexe antithrombine/pentasaccharide d'héparine

Protéine : Antithrombine humaine ($M_w = 57875 \pm 32$ Da ; $1-1,5$ g. L⁻¹) ;

Ligand : pentasaccharide d'héparine ($M_w = 1727$ Da, $M_{\text{mesurée}} = 1627$ Da).

La zone non-hachurée correspond à l'antithrombine. La zone hachurée correspond au complexe 1/1.

Ratio protéine / héparine : 1 / 2,5. Source electrospray, analyseur triple quadripôle.

Tampon acétate ammonium 5 mM pH 6,7. Liquide additionnel isopropanol - eau (60 : 40, v/v). D'après [169]

Plus récemment, des spectres ESI mettant en évidence des interactions chimiokines / héparines ont permis de déterminer l'ordre de grandeur de ces interactions (Figure 24). [77]

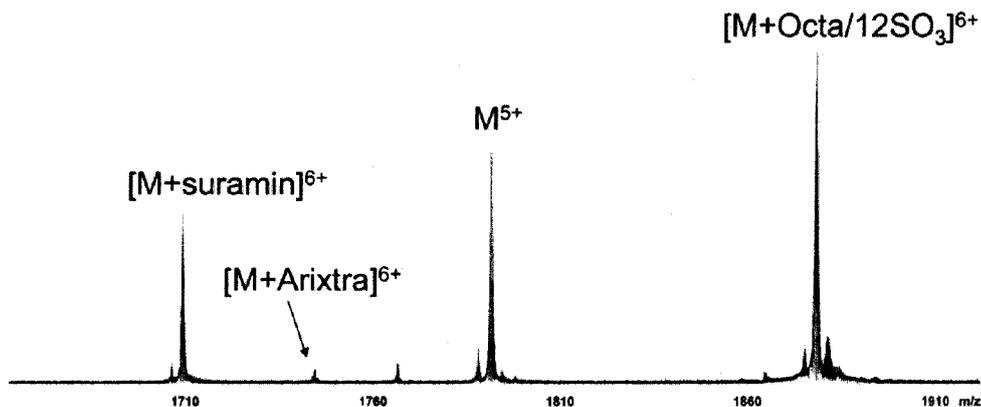


Figure 24 : Analyse d'interactions non covalente chimiokine / oligosaccharide par ESI-FTICRMS

La protéine MCP-3 (M) a été incubée à 40 μ M (dans 200 mM d'acétate d'ammonium, pH 6,8) avec 100 μ M de chaque ligand : suramin, arixtra® (pentasaccharide d'héparine), sucrose et octasaccharide d'héparine. Le mélange a ensuite été purifié sur des micro-colonnes hydrophobes.

D'après[77]

Dans cette étude, la préparation des échantillons a été réalisée par filtration sur des micro-colonnes hydrophobes. Cette étape, qui a pour but d'éluer les ligands non liés susceptibles de perturber la détection, a pour inconvénient de déplacer les équilibres de complexation.

Afin de conserver au mieux les interactions en solution avant l'analyse MS, nous avons choisi de réaliser cette séparation par électrophorèse capillaire.

II-3 COUPLAGE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Le couplage CE-MS apparaît à la fin des années 80[172], et les premières années ont surtout concerné l'amélioration de l'interface. Deux difficultés principales ont dû être surmontées : la compatibilité de débits, entre la CE ($\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) et les sources electrospray classiques ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), et surtout l'établissement d'une jonction électrique stable. L'électrode d'entrée du capillaire est toujours présente, mais l'électrode de sortie doit être remplacée par un élément du nébuliseur. Pour cela, différents types d'interface ont été développés.

II-3.1 Interfaces de couplage pour les sources electrospray

II-3.1.a Interfaces avec liquide d'appoint (microspray)

Les interfaces les plus courantes (80% des publications CE-MS entre 1996 et 2005 d'après [173]) comportent un liquide d'appoint qui assure la compatibilité de débit. L'apport de ce liquide peut être réalisé au moyen d'un pousse seringue ou d'une pompe. La compatibilité avec la source ESI est également assurée par une dilution des tampons d'électrophorèses souvent très concentrés en sels. La composition aqueuse ou organique de ce liquide autorise un choix supplémentaire sur les conditions d'analyse et la spécificité de détection recherchée. Pour ces interfaces, la jonction électrique est réalisée à travers le liquide d'appoint, lequel est en contact à la fois avec la sortie du capillaire de séparation et avec un élément métallique sous tension du nébuliseur.

La principale différence entre les interfaces dites coaxiales et les interfaces à jonction liquide est le positionnement du mélange entre l'électrolyte de séparation et le liquide d'appoint.

Les interfaces dites coaxiales (Figure 25A1) sont composées d'un tube métallique central, dans lequel est inséré le capillaire d'électrophorèse ainsi que le liquide d'appoint, parfois entouré d'un second tube transportant un gaz de nébulisation. Le mélange entre le tampon d'électrophorèse et le liquide d'appoint s'établit en sortie de nébuliseur. La position du capillaire d'électrophorèse dans le nébuliseur peut être optimisée au moyen d'une vis micrométrique. Ces interfaces sont souvent préférées aux interfaces à jonction liquide pour leur plus grande reproductibilité.[174]

Les interfaces à jonction liquide (Figure 25A2) possèdent un volume mort plus faible que les interfaces coaxiales.[175] Le principal inconvénient de cette interface est la difficulté de placer de manière reproductible l'extrémité du capillaire dans le nébuliseur.

II-3.1.b Interfaces sans liquide d'appoint (nanospray)

Au premier abord, les interfaces nanospray semblent être les plus faciles à coupler avec la CE du fait de la compatibilité de débits ($nL \cdot min^{-1}$). Pourtant, il est difficile de réaliser la jonction électrique en l'absence de liquide conducteur. Pour ce type d'interfaces, la tension peut être appliquée directement sur l'électrolyte soit au moyen d'un tube métallique reliant le capillaire à l'aiguille (Figure 25B1) soit en insérant une électrode à l'intérieur du capillaire (Figure 25B2). L'avantage de la première configuration, qui est la forme commerciale la plus courante, est la possibilité de changer l'aiguille.[176] Ces interfaces restent difficiles à fabriquer et moins robustes que les interfaces avec liquide d'appoint.

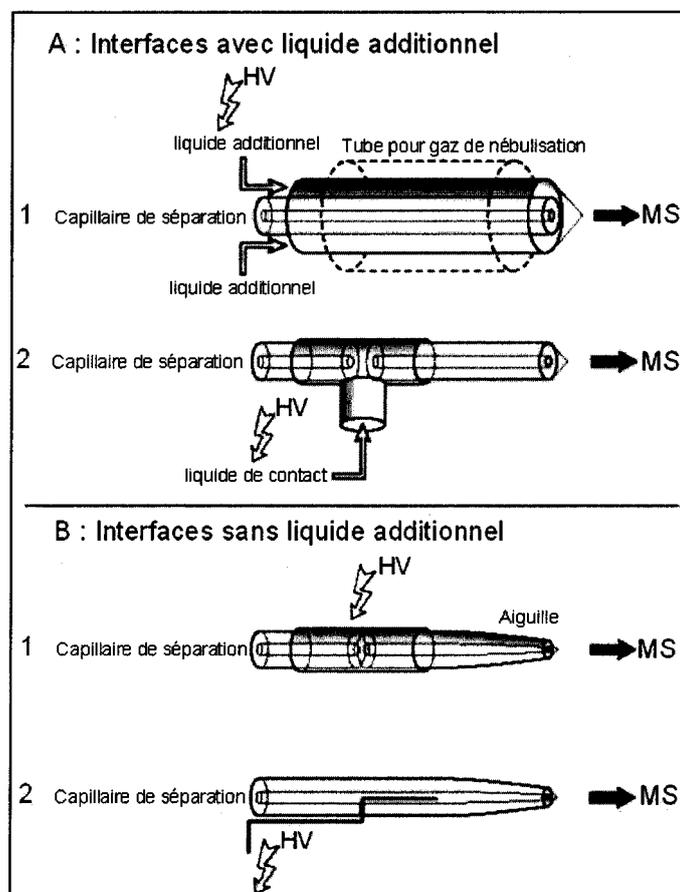


Figure 25 : Interfaces de couplage CE-ESI

A1: interface avec un liquide d'appoint et en option, un gaz de nébulisation; **A2:** interface à jonction liquide; **B :** interfaces sans liquide d'appoint avec application de la tension en sortie ou à l'intérieur du capillaire d'électrophorèse. Sheath liquid = liquide d'appoint, sheath gas = gaz de nébulisation

D'après [177]

II-3.2 Les autres sources d'ionisation couplées à l'électrophorèse capillaire

La torche à plasma inductif (ICP) est le second type de source le plus utilisé en couplage CE-MS après l'ESI. L'échantillon en phase liquide (ou solide) est transféré dans un plasma d'argon (ou hélium) dans lequel règne une température de l'ordre de 6000 Kelvin. Les principales applications du couplage CE-ICP concernent la spéciation de métaux seuls ou en interaction avec des protéines.[178]

L'ionisation par ESI est efficace pour les molécules facilement ionisables, polaires et volatiles. L'analyse d'autres espèces a favorisé le développement du couplage CE-MS avec différentes sources d'ionisation. Les 2 sources décrites ci-dessous possèdent une configuration proche de la source ESI : formée d'un nébuliseur apportant l'échantillon en phase liquide sous forme de nébulisât et d'une chambre de desolvatation à pression atmosphérique.

- La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) possède une aiguille « corona » au niveau de la chambre de desolvatation qui permet l'application d'une décharge électrique ionisante.[179]
- Le deuxième type de source couplée à une méthode de séparation en phase liquide est la source de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). La source APPI possède une lampe UV au niveau de la chambre de desolvatation qui permet l'ionisation par transfert de photons. L'ionisation par APPI ne concerne pas uniquement les molécules photoionisables (phénols, alcools, éthers...) puisque l'utilisation de dopants (toluène, acétone...) permet l'analyse d'autres molécules.[180, 181]

Les sources APCI et APPI restent spécifiques à l'ionisation et la détection de molécules peu polaires de taille inférieure à 50 kg.mol⁻¹). Ces sources sont peu sensibles à la composition de l'électrolyte et peuvent être couplées à des séparations électrophorétiques réalisées en tampon phosphate. Elles permettent également la séparation de molécules neutres en présence de tensioactifs.

La source de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) permet une ionisation de l'échantillon, mélangé à une matrice, déposé et séché sur une plaque métallique. L'ionisation est réalisée par les photons UV issus d'un laser dont la longueur d'onde est proche de la longueur d'onde d'absorption maximale de la matrice. Ainsi, l'énergie fournie par le laser est essentiellement absorbée par la matrice, permettant l'ionisation et la désorption des ions de l'échantillon. Le couplage CE-MALDI a été développé pour supprimer la limitation temporelle de l'acquisition des données présente en CE-ESI. Les analytes séparés en CE sont déposés sur la plaque MALDI puis analysés en temps voulu. Tandis qu'en CE-ESI, l'analyse des composés

d'intérêt doit avoir lieu au cours de la séparation électrophorétique. L'utilisation de la CE avec la source MALDI a dans un premier temps été utilisée en couplage indirect, le transfert fastidieux des analytes était réalisé manuellement. Actuellement, les fractions collectées en sortie de CE sont automatiquement déposées sur les plaques MALDI et recouvertes de matrice.[182, 183]

II-3.3 Quelques domaines d'applications du couplage CE-ESIMS

Le couplage de la CE à la source ESI est aujourd'hui le plus couramment utilisé.[177, 184, 185, 186] La source ESI assure un transfert direct des ions séparés en phase liquide vers la phase gazeuse. Les applications principales du couplage CE-ESI concernent l'analyse de peptides et de protéines, mais également l'analyse d'acides nucléiques, de saccharides et de petites molécules organiques.

Peptides et protéines

La CE apparaît comme une alternative aux méthodes classiques (électrophorèse sur gel en 2D, chromatographie liquide) couplées à la MS en protéomique, en terme de gain de temps et d'analytes.[187, 188] La CE-MS a permis par exemple la séparation et l'analyse en moins de 10 minutes des peptides issus de digestions enzymatiques de protéines.[189] En plus du fait de pouvoir procéder à des analyses rapides, le couplage CE-MS peut être réalisé sur des échantillons biologiques non purifiés (sang, urine...).[190] Un autre intérêt non négligeable de la CE-MS pour l'analyse de protéines réside dans la résolution de la CE permettant notamment la séparation d'isoformes de glycoprotéines.[191]

Analyse des saccharides

C'est une fois de plus la résolution de la CE qui fait de la CE-MS une méthode de choix pour l'analyse des (oligo)saccharides en mélanges complexes. En ce qui concerne les oligosaccharides neutres, de nombreuses méthodes de dérivations chimiques ou enzymatiques ont été mises au point, à la fois pour faciliter la séparation par CE, mais également pour faciliter l'ionisation en MS. La majorité des applications concerne cependant des saccharides non modifiés.[173] Les conditions expérimentales ont bien sûr fait l'objet de compromis afin que la séparation par CE se fasse dans des conditions compatibles avec la MS. Différentes applications relatives aux GAG ont permis de réaliser la séparation d'oligosaccharides en fonction de leur

taille et de leur degrés de sulfatation : héparine[147, 192, 193], acide hyaluronique[194], et chondroïtine/dermatane sulfates[195].

Complexes non covalents

Bien que la CE et la MS soient des méthodes de choix pour l'étude d'interactions non covalentes de biomolécules, peu de travaux ont été réalisés par couplage CE-MS. Dans ce domaine, les rares exemples d'analyses de protéines reportées concernent l'interaction entre la vancomycine avec des peptides de synthèse[196, 197], ainsi que le complexe non covalent de la myoglobine liée à son hème.[198]

Au cours de cette thèse, nous avons réalisé pour la première fois la détection de deux types de complexes protéine / oligosaccharides : antithrombine / pentasaccharide d'héparine (cf. Chapitre 2[199]) par FACCE-MS et chimiokines / oligosaccharides (cf. Chapitre 3) par ACE-MS, avec une trappe d'ions.

CHAPITRE 2

COUPLAGE CE-MS EN ANALYSE FRONTALE

COMPLEXE ANTITHROMBINE / HEPARINE

CHAPITRE 2 : MISE AU POINT DU COUPLAGE CE-MS EN

ANALYSE FRONTALE PAR L'ETUDE DE L'INTERACTION

ANTITHROMBINE / HEPARINE

I INTRODUCTION

L'objectif principal de cette étude est la mise au point du couplage CE-MS pour l'identification de ligands glucidiques d'une protéine donnée. L'électrophorèse capillaire (CE) est une méthode séparative présentant l'avantage de permettre l'analyse d'interactions de molécules libres en solution. La CE assure donc la séparation d'espèces libres et liées avec un minimum de préparations préalables puisqu'elle ne nécessite pas de greffage du ligand sur un support. La spectrométrie de masse (MS) nous a ici permis, en fonction des conditions d'analyse, de déterminer la stœchiométrie du complexe d'intérêt et d'identifier les ligands saccharidiques.

Dans notre étude, la caractérisation d'interactions non covalentes par CE a été réalisée de trois façons différentes : par analyse en électrophorèse de zone (CZE) des analytes pré-incubés, par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) et par électrophorèse frontale (FACCE ou FACE). Nous avons d'abord comparé ces différentes méthodes de séparation électrophorétiques en analysant le complexe non covalent antithrombine / oligosaccharides d'héparine. La détection des différents partenaires du complexe a également été réalisée par MS en infusion directe. Nous avons enfin réalisé le couplage la CE à la MS en adaptant les conditions d'analyse pour caractériser les complexes dissociés ou non, principalement par le choix adéquat de la composition du liquide additionnel.

II ETUDES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES COMPLEXES

ANTITHROMBINE / HEPARINE

II-1 DETERMINATION DES CONDITIONS DE SEPARATION ELECTROPHORETIQUE

La durée des analyses dépend de la vitesse de migration des analytes, qui est évaluée par leurs mobilités dans le capillaire de séparation (*cf.* § II-2.2.a. page 34). Les systèmes moléculaires les plus adaptés à l'étude par électrophorèse capillaire d'affinité sont ceux dont les composantes possèdent des mobilités différentes. Nous avons donc mesuré les mobilités électrophorétiques de l'antithrombine, de différentes fractions d'héparine et de leurs complexes afin d'évaluer la validité du choix de ce complexe pour la suite de notre étude.

II-1.1 Mesure des mobilités électrophorétiques des partenaires de l'interaction

Mobilité de l'antithrombine

Le choix de l'électrolyte de séparation s'est fait en vue du couplage avec la MS. Les électrolytes non volatils tels que les tampons phosphates ou borates, sont connus pour provoquer des suppressions de signal MS lorsqu'ils sont trop concentrés ($C \geq 100 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), mais peuvent être utilisés en couplage à de plus faible concentrations ($C < 30 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). [200] Les électrolytes les plus utilisés en CE-MS sont des tampons volatils qui ne causent pas de suppression de signal, le plus souvent les tampons acétate d'ammonium (pKa 6,5) ou hydrogénocarbonate d'ammonium (pKa 8,5). [177] Nous avons choisi de travailler en polarité normale^r avec le tampon le plus basique, l'hydrogénocarbonate d'ammonium à pH 8,5, afin de réduire les durées d'analyse par la présence d'un flux électro-osmotique cathodique relativement élevé.

L'antithrombine humaine est une glycoprotéine acide (pI \approx 5) d'environ $58 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$. A pH 8,5, elle est globalement anionique et migre donc dans le sens opposé au flux électro-osmotique. Le choix de la concentration de l'électrolyte a fait l'objet d'un compromis puisqu'un tampon faiblement concentré favorise l'adsorption de la protéine sur la paroi du capillaire de séparation, tandis qu'un tampon trop concentré allonge la durée d'analyse en diminuant le flux

^r L'électrode d'entrée est l'anode (+)

électro-osmotique $\left(\mu_{eo} = f\left(\frac{1}{\sqrt{I}}\right)\right)$. La concentration du tampon hydrogénocarbonate d'ammonium a été optimisée à 50 mM.

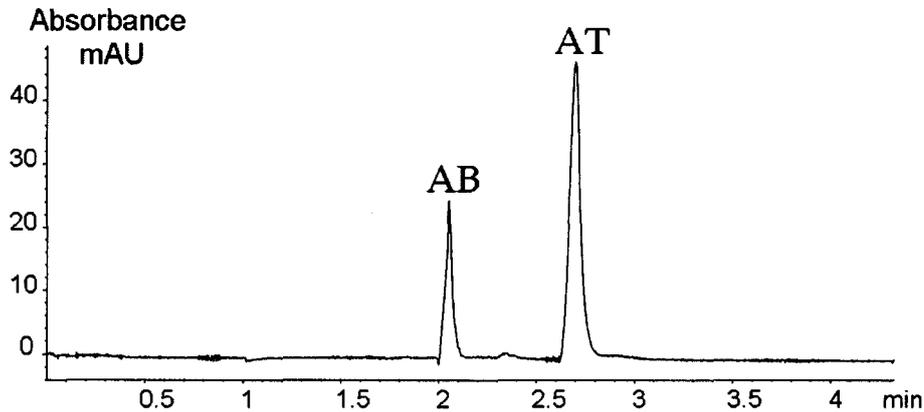


Figure 26 : Electrophérogramme de l'antithrombine par CZE

Antithrombine 5 μ M

Capillaire en silice vierge, 50 μ m d.i, L=34 cm, l=25,5cm. Electrolyte: hydrogénocarbonate d'ammonium 50 mM pH 8,5; voltage +12 kV; température 25°C. Injection 50 mbar 2 s.

AB= Alcool benzylique, AT=antithrombine.

L'injection d'un marqueur neutre, l'alcool benzylique (AB), a permis de mesurer le flux électro-osmotique.

La mobilité électrophorétique de l'antithrombine mesurée est d'environ $-14.10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, valeur cohérente avec une espèce anionique (Figure 26).

Mobilités des fractions d'héparine

Différentes fractions d'héparine ont été utilisées : un pentasaccharide de synthèse (pentaH) et des fractions d'héparines de bas poids moléculaires (LMWH), échantillons hétérogènes en structure et en masse.

Du fait de l'absence de chromophore, la mobilité des fractions d'héparines a été estimée en utilisant une méthode de détection UV indirecte. L'électrolyte composé de tampon Bis-Tris (20 mM pH 6,4) contient un chromophore : 10 mM d'anisate.[201] Ainsi les oligosaccharides ont pu être détectés par différence d'absorbance. L'eau a été utilisée ici comme marqueur du flux électro-osmotique. Les héparines ont été injectées hydrodynamiquement par la sortie de capillaire de séparation afin de réduire le temps de migration jusqu'au détecteur (l= 8,5 cm au lieu de 25,5 cm pour une injection par l'entrée).

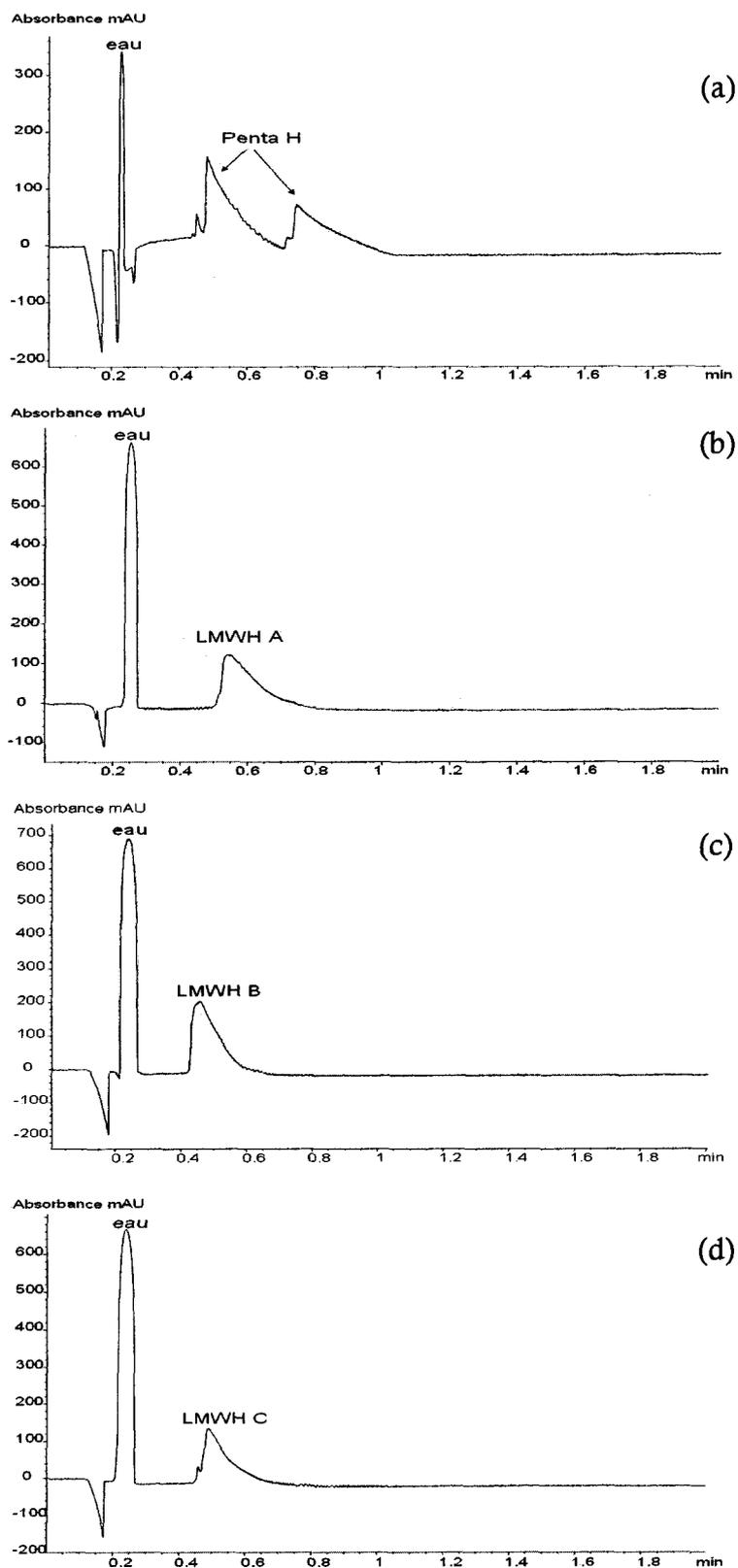


Figure 27 : Séparation en mode zone de différents fragments d'héparine

(a) 300 μ M pentaH injection 50 mbar 3 s ; (b) 300 μ M LMWHA injection 30 mbar 2 s ; (c) 200 μ M LMWHB injection 50 mbar 2 s ; (d) 200 μ M LMWHC injection 50 mbar 2 s.
 Capillaire en silice vierge 50 μ m diamètre interne (d.i.), L=35 cm, l=8,5cm. Electrolyte : Bis-tris 20mM pH 6,4 + Anisate 10mM; voltage - 30 kV ; température 25°C. (Injection en sortie). Eau = marqueur neutre.

Les électrophérogrammes obtenus (Figure 27) ont permis la mesure des mobilités estimées à :

$$\begin{aligned} - \mu_{ep, \text{pentaH}} &= - (39 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \\ &\quad - (41 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \end{aligned}$$

(En remarquant que l'analyse de cet échantillon supposé homogène montre 2 pics de migration...)

$$\begin{aligned} - \mu_{ep, \text{LMWHC}} &= - (36 \pm 1,6) \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \\ - \mu_{ep, \text{LMWHA}} &= - (35 \pm 0,9) \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \\ - \mu_{ep, \text{LMWHB}} &= - (33 \pm 0,8) \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \end{aligned}$$

Ces valeurs de mobilité confirment le caractère très anionique des oligosaccharides sulfatés et sont en accord avec de précédentes déterminations sur ce type de molécules.[202] Il semble exister une relation entre la taille et la mobilité des héparines. Le pentaH, échantillon de plus petite masse, est le plus mobile. Les LMWH possèdent des mobilités proches qui diminuent lorsque la taille des fragments augmente ($M_{\text{LMWHC}} < M_{\text{LMWHA}} < M_{\text{LMWHB}}$, Tableau 3).

	Masse moyenne en nombre ^s (g.mol ⁻¹)	Masse théorique (g.mol ⁻¹)	Indice de polydispersité ^t
pentaH		1506,95	
LMWH C	2933		1,30
LMWH A	3588		1,26
LMWH B	5162		1,34

Tableau 3: Masses des fractions d'héparine étudiées

La différence entre la mobilité électrophorétique en valeur absolue de l'antithrombine et celles des fractions d'héparine assure une séparation des deux espèces. Au cours d'une analyse simultanée des deux types de molécules, les héparines auront un temps de migration plus long que celui de l'antithrombine (Figure 28).

^s Rapport de la somme des masses molaires de toutes les molécules de l'échantillon sur le nombre de molécules. $M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i}$

^t Rapport de la masse moyenne en masse $\left(M_w = \frac{\sum N_i \cdot M_i^2}{\sum N_i \cdot M_i} \right)$ sur la masse moyenne en nombre, correspond à la distribution des masses molaires, égal à 1 pour un échantillon homogène.

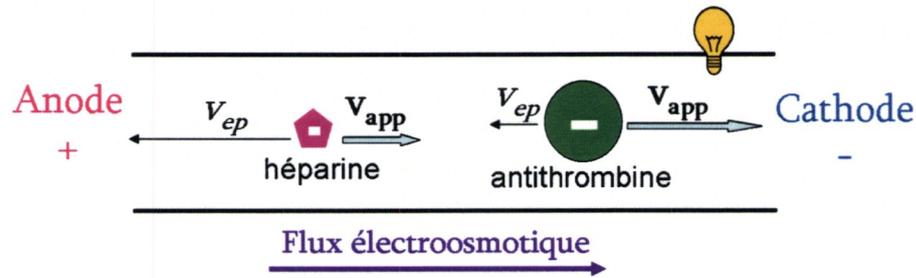


Figure 28 : Représentation schématique de la séparation de l'antithrombine et de l'héparine

v_{ep} = vitesse électrophorétique

v_{app} = vitesse apparente, résultante de la v_{ep} et du flux électro-osmotique

II-1.2 Analyses des complexes antithrombine / héparine par électrophorèse capillaire de zone

Deux stratégies d'analyse d'interactions en CZE ont été envisagées :

- la pré-incubation de l'antithrombine avec les fractions d'héparine ;
- l'injection de l'antithrombine dans un capillaire conditionné avec un électrolyte contenant de l'héparine.

Ces essais ont été réalisés avec le pentaH et LMWHB, qui sont respectivement l'oligosaccharide de plus petite et de plus grande masse dont nous disposons pour cette étude (cf. Tableau 3 page 61).

Electrophorèse capillaire de zone avec pré-incubation

L'antithrombine et l'héparine (pentaH ou LMWHB) sont pré-incubées dans l'électrolyte de séparation à 25°C pendant une heure. Les mélanges incubés sont ensuite injectés hydrodynamiquement^u dans le capillaire de séparation.

Les électrophérogrammes obtenus montrent que, dans ce mode d'analyse, la mobilité de l'antithrombine semble peu affectée par la présence de pentaH (Figure 29c) ou LMWHB (Figure 30c). Soit la formation du complexe n'a pas eu lieu lors de l'incubation, soit le complexe formé s'est dissocié lors de l'injection dans le capillaire de séparation (Figure 31). La formation du complexe antithrombine / héparine n'est donc pas mise en évidence en mode zone.

^u Injection de l'échantillon par l'application d'une surpression dans le flacon d'entrée.

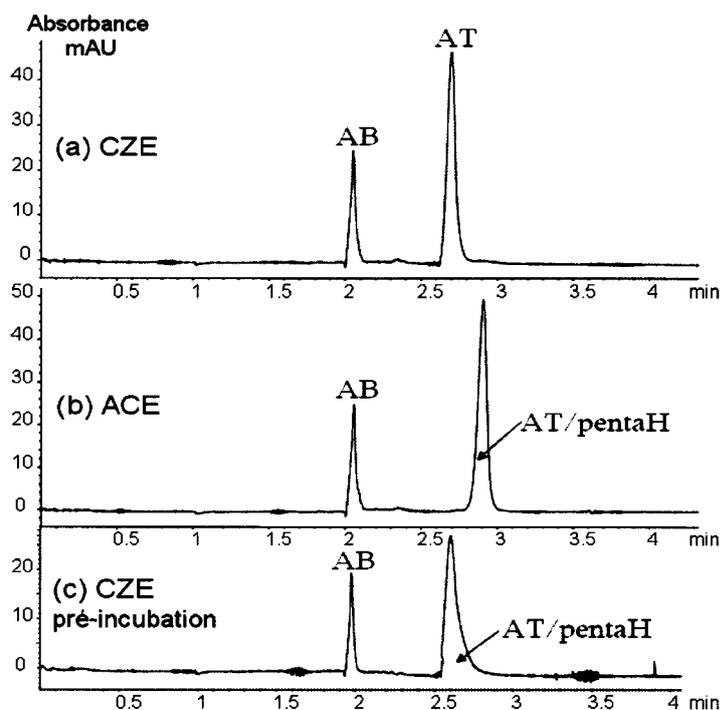


Figure 29 : Electrophérogrammes de l'antithrombine en CZE en présence ou non de pentaH

Antithrombine 5 μ M. (a) Témoin sans pentaH, (b) 5 μ M de pentaH dans l'électrolyte, (c) Antithrombine incubée 1h avec 5 μ M de pentaH.
 Capillaire en silice vierge, 50 μ m d.i, L=34 cm, l=25,5cm. Electrolyte: hydrogénocarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8,5; voltage, +12 kV; température, 25°C. Injection 50 mbar 2 s.
 AB= Alcool benzylique, AT=antithrombine

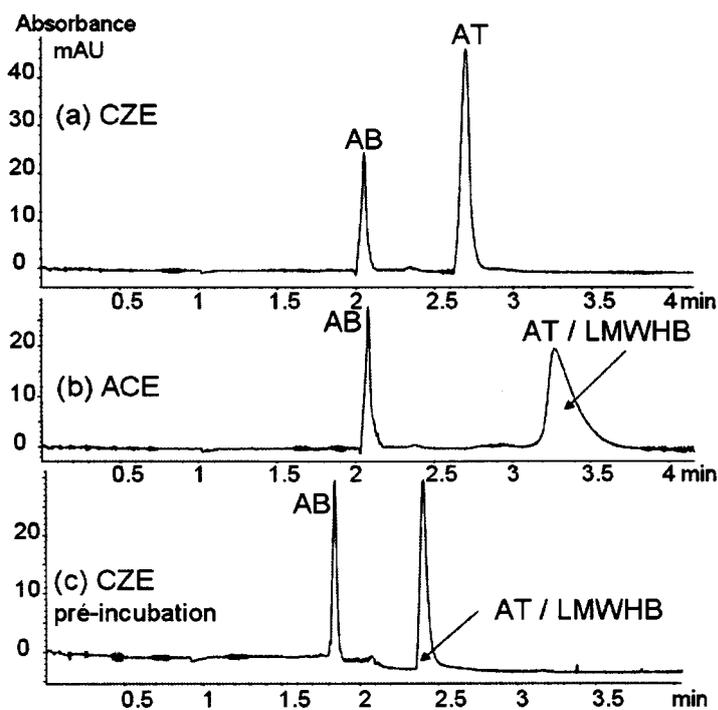


Figure 30 : Electrophérogrammes de l'antithrombine en CZE en présence ou non de LMWHB

Antithrombine 5 μ M : (a) Témoin sans LMWHB, (b) 5 μ M de LMWHB dans l'électrolyte (c) Antithrombine incubée 1h avec 5 μ M de LMWHB.
 Conditions expérimentales, cf. Figure 29

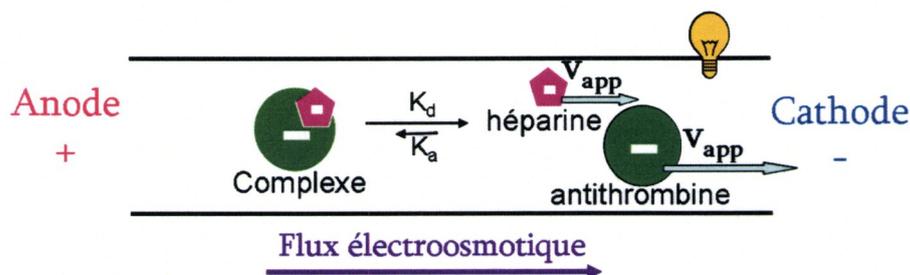


Figure 31 : Représentation schématique de l'analyse du mélange antithrombine / héparine pré-incubé

v_{app} = vitesse apparente, K_d = constante de dissociation, K_a = constante d'association

Les électrophérogrammes réalisés avec le pentaH montrent néanmoins un élargissement du pic électrophorétique correspondant à l'antithrombine (Figure 29c), alors qu'aucune différence n'est observée avec LMWHB (Figure 30c). Ce résultat suggère que les interactions antithrombine / pentaH sont plus fortes (K_d plus faible) que les interactions antithrombine / LMWHB, si ces dernières existent.

Electrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

En ACE, la protéine est injectée dans un capillaire contenant le ligand. Le complexe est alors formé pendant la durée de l'analyse. L'antithrombine est ici injectée hydrodynamiquement dans un capillaire conditionné avec l'électrolyte contenant de l'héparine à différentes concentrations.

Une augmentation de mobilité (en valeur absolue) du pic détecté est observée en présence des deux héparines (Figure 29b et Figure 30b) : l'antithrombine est donc ralentie par la formation du complexe. Les mobilités des complexes ont été calculées pour des proportions équimolaires en antithrombine et en héparine :

- $\mu_{ep, AT} \approx - 14 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{ep, AT/pentaH} \approx - 17 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{ep, AT/LMWHB} \approx - 21 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Rappelons que dans ces conditions de pH, l'antithrombine, globalement anionique (pI 5,5 < pH 8,5), migre dans le sens opposé au flux électro-osmotique tout comme les héparines. L'augmentation de la mobilité électrophorétique en valeur absolue lors de la formation du complexe est en accord avec une augmentation du rapport charge sur masse. La variation de masse peut être négligée puisque le pentaH ne correspond qu'à 2,5% de la masse de l'antithrombine et LMWHB ne correspond qu'à environ 11,5%. La variation de mobilité résulte donc principalement d'un accroissement de la densité de charge négative provoqué par la liaison des oligosaccharides sulfatés à l'antithrombine. Avec LMWHB, le pic est non seulement décalé

dans le temps mais également élargi, ce qui pourrait être un reflet de l'hétérogénéité de cette fraction oligosaccharidique de l'héparine.

Le complexe non covalent formé au cours de la migration de l'antithrombine dans le capillaire de séparation est maintenu jusqu'au détecteur. L'équilibre d'association est préservé puisque la concentration en ligand est uniforme dans tout le capillaire (Figure 32).

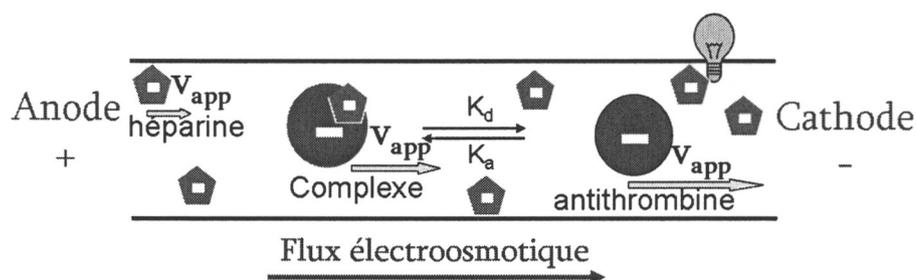


Figure 32 : Représentation schématique de l'analyse de l'interaction antithrombine / héparine par ACE

K_d = constante de dissociation, K_a = constante d'association

L'ACE apparaît être la méthode la plus judicieuse, par rapport à la CZE avec pré-incubation, pour analyser des interactions non covalentes dans le cas de complexes au K_d de l'ordre du μM . Les constantes de dissociation (Tableau 4) ont pu être calculées grâce aux méthodes de linéarisation classiques (x-réciproque, y-réciproque et double-réciproque, cf. Matériel et méthodes § II-1 page 131), corrélant la variation de mobilité électrophorétique de l'antithrombine avec la variation de concentration en héparine dans l'électrolyte.

Héparine	K_d (10^{-6} M)			Moyenne
	x-réciproque	y-réciproque	Double-réciproque	
PentaH (a)	0,8	0,6	0,9	$0,8 \pm 0,2$
LMWH B (b)	2,8	2,8	2,7	$2,8 \pm 0,1$

Tableau 4 : Mesure des constantes de dissociation AT / Héparines obtenues par ACE

Linéarisation en annexes : (a) I et (b) II. Chaque mesure a été réalisée en double.

Les constantes calculées par les différentes méthodes de calcul sont homogènes. La constante de dissociation du complexe antithrombine / pentaH est d'environ $0,8 \mu\text{M}$, valeur supérieure à celles reportées dans la littérature dans différentes conditions expérimentales (cf. Tableau 6 page 69). La constante de dissociation du complexe antithrombine / LMWHB est d'environ $2,8 \mu\text{M}$, confirmant le fait que ces complexes sont plus labiles qu'avec le pentaH.

Le couplage de l'ACE avec la MS est envisageable puisque les complexes non covalents sont maintenus dans le capillaire de séparation, à condition que la présence d'héparine dans la totalité du capillaire n'interfère pas avec la détection de ligands spécifiques.

II-1.3 Analyses par électrophorèse capillaire frontale

Dans ce mode d'analyse, l'injection dans le capillaire de séparation est plus longue qu'en CZE, les analytes sont par conséquent détectés sous forme de fronts et non plus de pics. La protéine est pré-incubée avec le ligand.

L'analyse frontale permet la réalisation d'un compromis entre la préservation des interactions non covalentes et la détection spécifique de ligand. L'échantillon pré-incubé est injecté en plus grande quantité, réduisant ainsi le facteur de dilution observé en CZE avec pré-incubation. De plus, l'injection électrocinétique^v et non plus hydrodynamique, du mélange pré-incubé limite la quantité d'héparines n'ayant pas d'affinité pour l'antithrombine dans le capillaire de séparation. Si ces fragments non liants étaient tout de même injectés, la différence de mobilité entre les héparines libres et liées à l'antithrombine assurerait une séparation suffisante et sans recouvrement lors de la détection par MS.

Les électrophérogrammes réalisés par FACCE correspondent à une injection électrocinétique continue des échantillons. L'injection de l'antithrombine seule (Figure 33a) montre un front unique dont la mesure du temps de migration au point d'inflexion permet de calculer une mobilité correspondant à celle de l'antithrombine mesurée par CZE. L'injection d'échantillons d'antithrombine à différentes concentrations nous a permis de corréler la variation de la hauteur du front (absorbance en unité arbitraire) à la quantité d'antithrombine injectée (*cf.* Matériel et méthodes Figure 69 page 133).

L'injection du mélange pré-incubé antithrombine / héparine montre deux fronts : un premier correspondant à l'antithrombine et un second plus tardif, que nous attribuons au complexe. La mesure de hauteur du premier front permet une quantification de la proportion d'antithrombine non complexée. L'échantillon incubé avec une quantité équimolaire de pentaH (Figure 33b) montre une diminution du front de protéine libre, dont la proportion est estimée à environ 65 %. Cette diminution est bien moins marquée lorsque l'antithrombine est pré-incubée

^v Injection de l'échantillon par l'application d'une tension électrique.

avec une concentration pourtant deux fois plus importante en LMWHB (Figure 33c), la proportion d'antithrombine non complexée est alors d'environ 88 %.

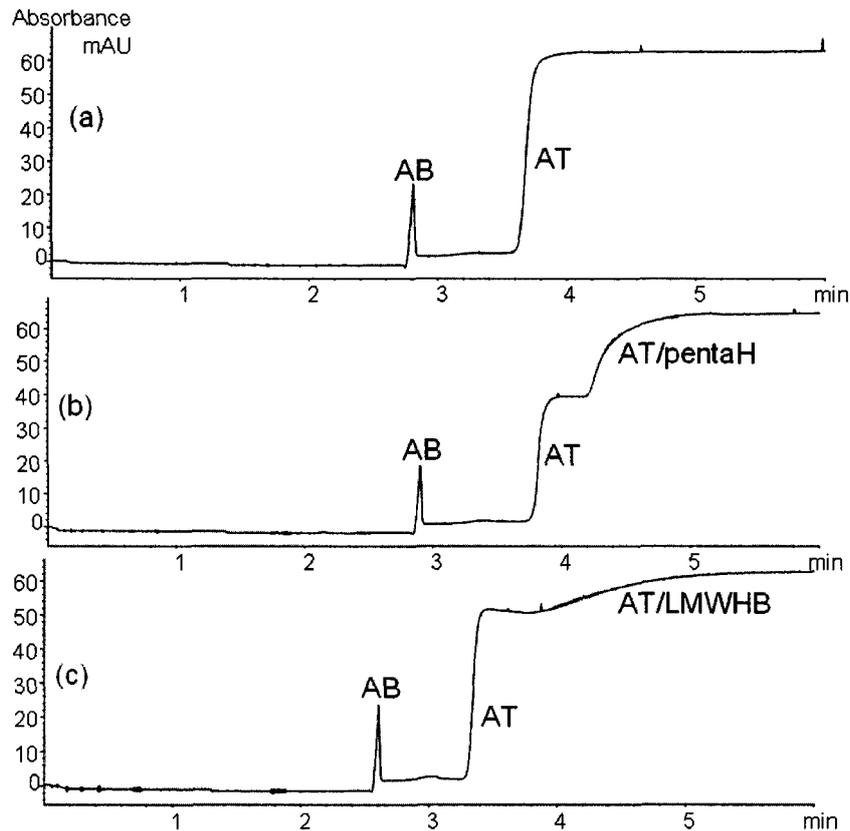


Figure 33 : Electrophérogrammes de l'antithrombine en présence ou non d'héparine obtenus par FACCE

Antithrombine 4 μM : (a) Témoin,

(b) incubation avec 4 μM de pentaH (c) incubation avec 8 μM de LMWHB.

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i., L=34 cm, l=25,5cm. Electrolyte: hydrogénocarbonate d'ammonium 50 mM pH 8,5; Injection électrocinétique continue +12 kV; température 25°C. AB=alcool benzylique

Ces résultats, comme les analyses par CZE l'ont également montré, sont en accord avec le fait que les interactions de l'antithrombine apparaissent plus fortes avec le pentaH qu'avec LMWHB. Les quantités d'héparines utilisées pour la suite des études devront donc être plus importantes pour les fractions d'héparine de bas poids moléculaires que pour le pentaH.

II-2 MESURE DES CONSTANTES DE DISSOCIATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE FRONTALE

En faisant varier les proportions antithrombine / héparine pré-incubées, les constantes de dissociation (K_d) de ces complexes (Tableau 5) ont été déterminées par FACCE d'après les trois

méthodes de linéarisation classiques (cf. Matériel et méthodes § 2.2). Chaque niveau de concentration a été mesuré deux fois. Le nombre moyen de ligand lié \bar{n} a été déterminé par le tracé de l'asymptote de l'isotherme de complexation (cf. annexes III à V pages 143 à 145).

Héparine	$K_d (10^{-6} \text{ M})$			Moyenne	\bar{n}
	x-réiproque	y-réiproque	Double-réiproque		
PentaH (a)	1,1	0,7	1,1	$1 \pm 0,2$	0,36
LMWH C (b)	19,5	17,4	15,6	18 ± 2	0,57
LMWH A (c)	11,1	6,3	8,4	9 ± 2	0,58
LMWH B (d)	4,4	4,7	3,6	$4,2 \pm 0,6$	0,49

Tableau 5 : Mesures des constantes de dissociation AT / Héparines obtenues par FACCE

Electrophérogrammes et courbes de linéarisation, annexes : (a) III, (b) VI, (c) IV, et (d) V
 \bar{n} = nombre moyen de ligands liés

La valeur de K_d calculée par FACCE pour LMWHB ($4,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) est supérieure à celle déterminée par ACE ($2,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), tandis que celle du pentaH est peu différente ($1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ par FACCE et $0,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ par ACE). Les complexes les plus labiles semblent moins bien maintenus en FACCE qu'en ACE.

Les K_d mesurés pour les LMWH sont en accord avec les données de la littérature indiquant une valeur de l'ordre de $20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ pour les héparines de faible affinité. [203, 204]

La stabilité du complexe AT / LMWH semble dépendre de la taille de l'héparine. En effet, plus la masse de l'héparine est élevée ($M_{\text{LMWH C}} < M_{\text{LMWH A}} < M_{\text{LMWH B}}$) plus le complexe parait stable ($K_{d,\text{LMWH C}} > K_{d,\text{LMWH A}} > K_{d,\text{LMWH B}}$). Il faut rappeler que l'antithrombine possède au moins 3 sites d'interactions avec les oligosaccharides sulfatés (cf. Chapitre 1 § I-2.1.b page 11), une longue chaîne d'héparine est donc susceptible d'interagir avec plusieurs de ces sites.

Bien qu'étant le plus petit fragment d'héparine utilisé, le pentaH permet d'obtenir le complexe le plus stable. Rappelons que le pentaH correspond à la séquence d'héparine ayant la plus haute affinité pour l'antithrombine. La valeur de K_d mesurée avec le pentaH reste néanmoins bien supérieure aux données de la littérature qui indiquent une interaction de l'ordre de 40 nM à pH 7,4 et à une force ionique de 0,15 M (Tableau 6).

Une telle différence peut s'expliquer par des conditions expérimentales variables telles que le pH (pH 8,5 au lieu de 7,4) et la force ionique (0,05 M au lieu de 0,15 M). Une surestimation du K_d peut également résulter d'une surestimation de la concentration en pentaH, dont nous ne

connaissions pas la pureté. Pour un échantillon homogène, le nombre moyen de ligands liés aurait dû être plus proche de 1 que la valeur calculée : 0,36.

Antithrombine	Héparine	Conditions expérimentales		K _d (M)	Référence
		pH	Force ionique		
bovine	Haute affinité	5,5	0,14 M	5.10 ⁻⁹ *	[205]
		8,5		12.10 ⁻⁶ *	
bovine	pentaH	7,4	0,03 M	0,14.10 ⁻⁶ *	[29]
α humaine	Haute affinité	7,4	0,25 M	1,49.10 ⁻⁷ *	[22]
β humaine				0,43.10 ⁻⁷ *	
bovine	pentaH	7,5	0,15 M	50.10 ⁻⁹	[206]
	3-O-sulfate pentaH			1.10 ⁻⁹	
humaine	pentaH	7,4	0,15 M	36.10⁻⁹*	[42]
humaine	pentaH	7,4	0,15 M	43.10⁻⁹*	[203]
humaine	pentaH	7,4	0,15 M	38.10⁻⁹*	[32]
α humaine	Haute affinité	7,4	0,15 M	1-2.10 ⁻⁸	[34]

Tableau 6 : Constantes de dissociation du complexe AT / héparines de haute affinité

* : détermination de la constante par mesure de fluorescence.

Rappelons que l'analyse par CE de l'échantillon de pentaH avait montré l'existence d'au moins deux espèces (cf. Figure 27a page 60). La seconde espèce pourrait être un intermédiaire de synthèse ou résulter d'une dégradation (déglycosylation, désulfatation) du pentaH avec le temps. Les rapports d'aires des deux pics observés en CE nous ont permis d'estimer les proportions relatives de ces 2 espèces : 40% environ pour la plus mobile et 60% environ pour la moins mobile. Les concentrations théoriques en pentaH ont été recalculées ainsi que les K_d (Tableau 7). En fonction de ces données et si l'on suppose donc que le pentaH correspond à l'espèce minoritaire détectée en CE, soit seulement 40% de la concentration de l'échantillon total, le K_d recalculé est alors estimé à 60.10⁻⁹ M, en meilleur accord avec les données de la littérature. Cette hypothèse est également en accord avec la détermination expérimentale du nombre moyen de ligands liés égal à 0,36 (cf. Tableau 5 page 68).

Héparine	K _d (10 ⁻⁹ M)			Moyenne
	x-réiproque	y-réiproque	Double-réiproque	
PentaH 60%	378	268	395	347
PentaH 40%	56	71	54	60

Tableau 7 : Correction des constantes de dissociation de l'interaction AT / pentaH obtenues par FACCE

Parmi les trois méthodes d'analyses envisagées, seules l'ACE et la FACCE apparaissent intéressantes pour le couplage CE-MS. L'injection directe après pré-incubation ne nous a pas permis d'observer la formation de complexes non covalents antithrombine / héparine. L'ACE est la méthode électrophorétique qui perturbe le moins les équilibres thermodynamiques. La FACCE pourrait être plus intéressante que l'ACE lors du couplage MS, si ce dernier est réalisable. En effet, les quantités d'analytes injectées plus importantes en FACCE pourraient améliorer la sensibilité de la détection par MS.

III OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

DE MASSE

Après avoir analysé l'interaction de l'antithrombine avec différentes fractions d'héparine par CE, ces mêmes analytes ont d'abord été analysés par MS en infusion directe au moyen d'un analyseur à trappe d'ions, avant d'envisager le couplage de la CE à la MS.

III-1 ANALYSE DE L'ANTITHROMBINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

L'antithrombine a d'abord été analysée par MS en conditions dénaturantes (solvant organique, acide fort). Ces essais nous ont permis de déterminer les valeurs des masses cibles donnant les spectres d'antithrombine les plus intenses en fonction des conditions expérimentales choisies. Chaque masse cible correspond à une combinaison de paramètres du MS (entre autres tensions d'accélération des ions), prédéfinis dans le logiciel Esquire control (Bruker Daltonics), qui assurent une stabilisation des ions dans une gamme de masse donnée.

Les spectres obtenus sur les échantillons d'antithrombines commerciales (Figure 34), diluées dans un mélange eau - acétonitrile (60 : 40, v/v) à 1% d'acide formique, sont peu intenses et présentent un fort bruit de fond. Les masses mesurées, 58092 ± 158 et 57960 ± 105 g.mol⁻¹, sont du bon ordre de grandeur (58 kg.mol⁻¹) mais très imprécises.

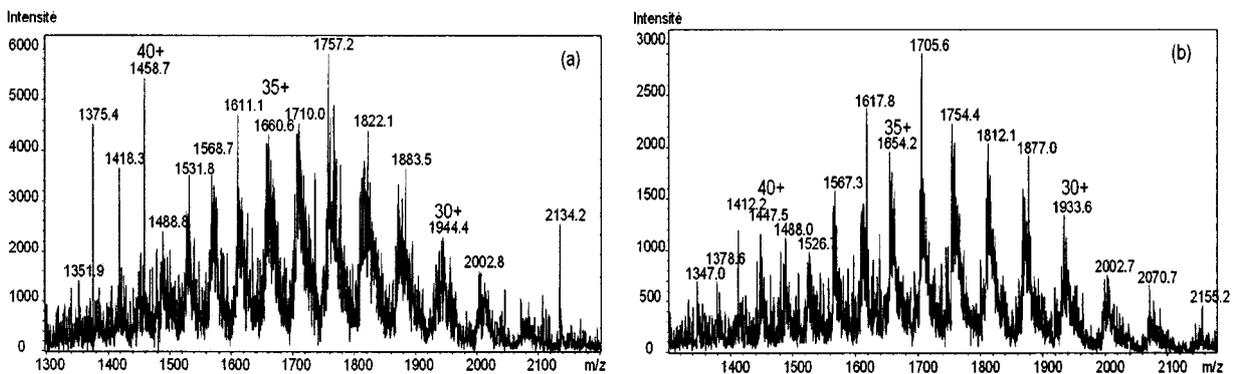


Figure 34 : Spectres de masse en conditions dénaturantes d'antithrombines brutes

(a) lot 1 : tampon glycine-HEPES, $M = 58092 \pm 158$ g.mol⁻¹

(b) lot 2 : tampon phosphate pH 7,5, $M = 57960 \pm 105$ g.mol⁻¹

Antithrombine 5 μ M diluée dans un mélange eau - acétonitrile (60 : 40, v/v) à 1% d'acide formique et infusée à 3 μ L.min⁻¹. Masse cible 2000 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

L'échange des tampons commerciaux contre le tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 6,5, réalisé au moyen de microspin G50 (*cf.* protocole Matériel et méthodes § 1.2), montre une nette amélioration des spectres de masse (Figure 35). La mesure de la masse de l'antithrombine est cette fois plus précise : $57856 \pm 2 \text{ g.mol}^{-1}$.

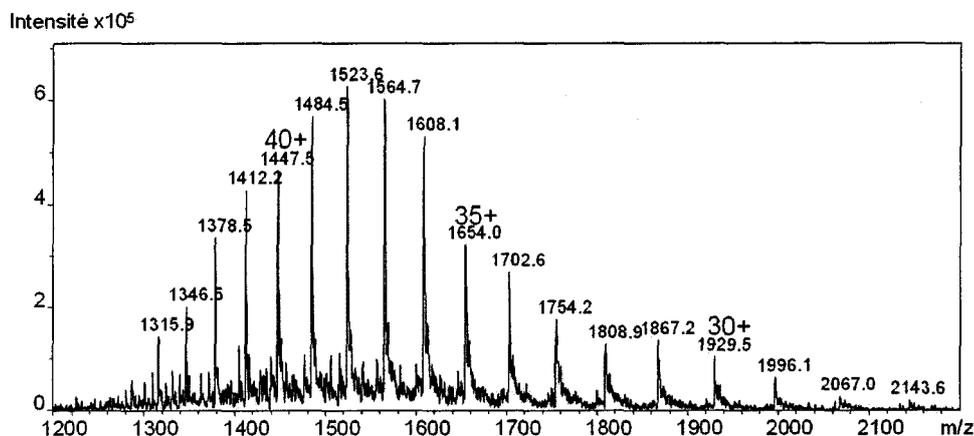


Figure 35 : Spectre de masse en conditions dénaturantes de l'antithrombine filtrée

Antithrombine ($M = 57856 \pm 2 \text{ g.mol}^{-1}$) environ $5 \mu\text{M}$ filtrée sur microcolonne G50 dans 20 mM d'acétate d'ammonium, diluée dans un mélange eau - acétonitrile (60 : 40, v/v) à 1% d'acide formique et infusée à $3 \mu\text{L.min}^{-1}$. Masse cible 2000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C .

Dans le but d'analyser les complexes non covalents antithrombine / héparine, nous avons d'abord optimisé les paramètres de détection de l'antithrombine en conditions non dénaturantes (Sels aqueux sans additifs). Aucun spectre de masse résolu n'a pu être obtenu par simple dilution d'antithrombine non purifiée dans l'acétate d'ammonium. L'échange de tampons par microspin G50 nous a permis de détecter la protéine malgré le faible nombre de pics (peu d'états de charge) et la faible résolution (Figure 36).

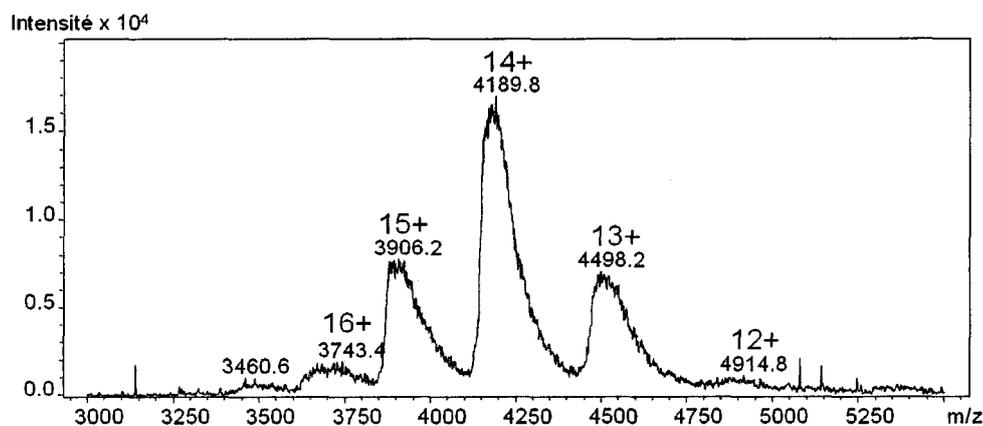


Figure 36 : spectre de masse en conditions non dénaturantes de l'antithrombine filtrée

Antithrombine ($M = 58978 \pm 608 \text{ g.mol}^{-1}$) environ $15 \mu\text{M}$ filtrée sur microcolonne G50 dans 20 mM d'acétate d'ammonium puis infusée à $3 \mu\text{L.min}^{-1}$. Masse cible 4000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 150°C .

La masse mesurée, $58978 \pm 608 \text{ g.mol}^{-1}$, est surestimée du fait de la mauvaise désolvation de la protéine et de la présence d'adduits des sels. La résolution théorique (ici exprimée en largeur de pic à mi-hauteur en m/z) de l'analyseur utilisé est de 0,4 m/z pour le mode d'analyse standard (50 – 3000 m/z) et de 3 m/z pour le mode d'analyse étendu (3000 – 6000 m/z). Pour le spectre obtenu ici, la résolution mesurée est d'environ 30 pour le pic de base. Malgré cette très faible résolution, nous avons tout de même pu détecter une protéine de 58 kg.mol^{-1} en conditions non dénaturantes avec un analyseur à trappe d'ions.

III-2 ANALYSE DES INTERACTIONS ANTITHROMBINE / HEPARINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

L'analyse de l'antithrombine en conditions non dénaturantes constitue un préalable à l'analyse des complexes non covalents. Cependant, en raison d'un fort bruit de fond, aucun ion n'a pu être détecté lors de l'analyse de l'antithrombine incubée avec l'héparine, que ce soit avec le pentaH ou avec les LMWH, en infusion directe. L'absence d'ions détectés pourrait résulter d'une suppression de signal due à la présence d'une grande quantité d'oligosaccharides sulfatés libres. Il apparait donc indispensable de réaliser une séparation des éléments liés et non-liés avant l'analyse MS.

IV COUPLAGE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE AU SPECTROMETRE DE MASSE

A la vue des résultats précédents, une analyse des interactions antithrombine / héparine n'apparaît pas envisageable par MS en infusion directe. L'analyse de ces complexes nécessite une étape de séparation préalable, que nous avons choisi de réaliser par le couplage à la CE.

IV-1 AJUSTEMENTS DES CONDITIONS D'ANALYSE POUR LE COUPLAGE CE-MS

L'appareillage utilisé^w impose une longueur minimale du capillaire de séparation qui doit être de 98 cm afin de relier l'électrode d'entrée de la CE au nébuliseur de couplage (Figure 37). L'électrolyte utilisé est toujours le tampon hydrogencarbonate d'ammonium pH 8,5, mais à une concentration de 30 mM au lieu de 50 mM, dans le but de limiter la quantité de sels introduite dans la source.

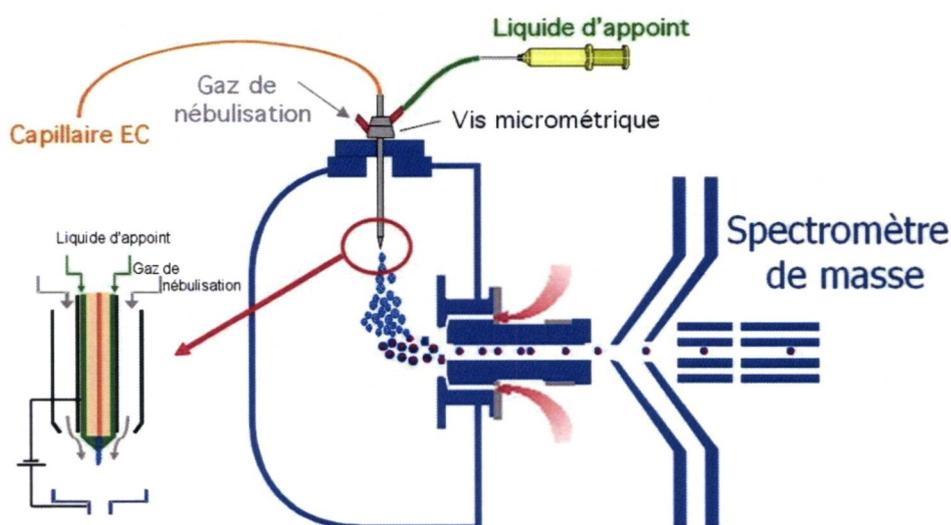


Figure 37 : Interface de couplage avec nébuliseur coaxial

Bruker Daltonics ©

L'interface utilisée est composée d'un nébuliseur coaxial à trois voies, dont l'une permet l'apport d'un liquide d'appoint (*cf.* Chapitre 1 § II-3.1.a page 49). Ce liquide assure une compatibilité de

^w HP^{3D}CE (Agilent) couplée à Esquire 3000+ (Bruker Daltonics)

débites entre la CE et la MS et permet d'établir la jonction électrique en sortie du capillaire de séparation.

En fonction des objectifs recherchés, différents liquides d'appoint ont été utilisés :

- en conditions non dénaturantes et en mode d'ionisation positive (MS^{pos}), il est composé d'acétate d'ammonium 10 mM pH 6,5 ;
- en conditions dénaturantes et en mode d'ionisation positive, il est composé par un mélange eau – acétonitrile (60 : 40, v/v) à 1% d'acide formique ;
- en conditions dénaturantes et en mode d'ionisation négative (MS^{neg}), il est composé d'acétonitrile.

L'interface coaxiale utilisée est connue pour engendrer un effet de siphon ayant pour conséquence l'aspiration du contenu du capillaire de séparation vers la source ESI[207] et s'ajoutant au flux électro-osmotique. Pour évaluer l'importance de ce phénomène, nous avons fait varier la position du capillaire dans le nébuliseur, ainsi que le débit de liquide additionnel et la pression du gaz de nébulisation. Nous avons mesuré la variation de la mobilité d'un marqueur neutre dans le capillaire de séparation et la stabilité du signal MS (TIC). Au cours de cette mise au point, nous avons observé que la position du capillaire dans le nébuliseur a principalement un effet sur la stabilisation du TIC, et aucun effet sur le siphon dès lors que le capillaire sort du nébuliseur. De même, l'augmentation de débit du liquide additionnel ne participe pas non plus à l'effet de siphon mais contribue à faire varier l'intensité et la stabilité du TIC. En revanche, l'augmentation de la pression du gaz de nébulisation contribue fortement à l'effet de siphon mais également à une stabilisation du TIC. Cette pression a été optimisée de sorte à accélérer l'analyse sans trop affecter la séparation électrophorétique.

IV-2 CHOIX DU MODE D'INJECTION EN CE-MS

La majorité des analyses par CE-MS reportées dans la littérature sont des analyses réalisées par électrophorèse capillaire de zone (CZE), aucune ne mentionne l'analyse frontale. Nous avons donc dans un premier temps vérifié la compatibilité de l'analyse frontale avec une détection en ligne par MS.

Les modes zone et frontal ont été comparés en analysant l'antithrombine en conditions dénaturantes (Figure 38). Les spectres obtenus correspondent à des durées d'intégration de 30 secondes du TIC, soit l'intégralité du pic en CZE-MS et le début du front en FACCE-MS.

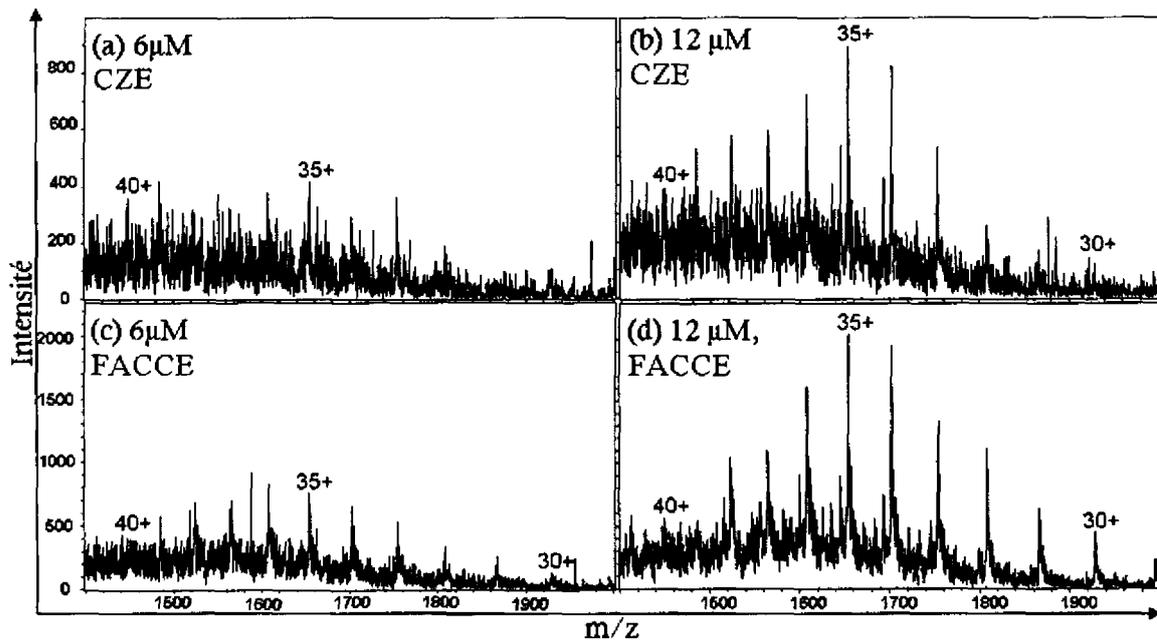


Figure 38 : Spectres de l'antithrombine obtenus par CZE-MS^{pos} et FACCE-MS^{pos} en conditions dénaturantes

Antithrombine, filtrée sur microspin G50, à 6 μM ou 12 μM .

Capillaire en silice vierge 75 μm d.i., L=98 cm, l=21,5cm. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5 ; voltage +15 kV ; température 25°C.

Injection 50 mbar, 10 s (CZE) ou électrocinétique continue + 15 kV (FACCE).

Liquide d'appoint : eau-acétonitrile (60 : 40, v/v) à 1% acide formique, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 2000 m/z .

Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C. 30 secondes d'intégration du TIC.

A la concentration de 6 μM , aucun ion de l'antithrombine n'est clairement distingué en CZE-MS, alors qu'en FACCE-MS, une enveloppe d'ions permet d'identifier l'antithrombine. A 12 μM , l'antithrombine est détectée en CZE-MS, mais avec une intensité comparable à la FACCE-MS à 6 μM .

L'augmentation de la concentration d'antithrombine à 12 μM entraîne une augmentation de l'intensité du signal : doublée en CZE-MS et quasiment triplée en FACCE-MS. De plus, pour une même concentration en antithrombine, le rapport signal sur bruit est plus élevé en FACCE-MS qu'en CZE-MS. L'analyse frontale est donc non seulement compatible avec la spectrométrie de masse, mais s'avère plus sensible que la CZE. Nous avons donc choisi d'utiliser le mode FACCE-MS pour l'étude des interactions antithrombine / héparine.

IV-3 ANALYSE DE L'ANTITHROMBINE PAR FACCE-MS

L'analyse de l'antithrombine par FACCE-MS réalisée en conditions dénaturantes (Figure 39a), montre une enveloppe d'ions de charges 24+ à 42+. Ces ions multichargés permettent de calculer une masse assez précise de $57\,875 \pm 15 \text{ g.mol}^{-1}$ correspondant à l'isoforme α de l'antithrombine.[20] Sur ce même spectre, une seconde enveloppe de plus petite intensité laisse deviner la présence d'antithrombine β . En conditions non dénaturantes (Figure 39b), le spectre obtenu est constitué d'une enveloppe d'ions de charges 13+ à 17+, correspondant à une masse de protéine moins précise et plus élevée de $58\,296 \pm 250 \text{ g.mol}^{-1}$, comparable au spectre de l'antithrombine infusée (cf. Figure 36 page 72).

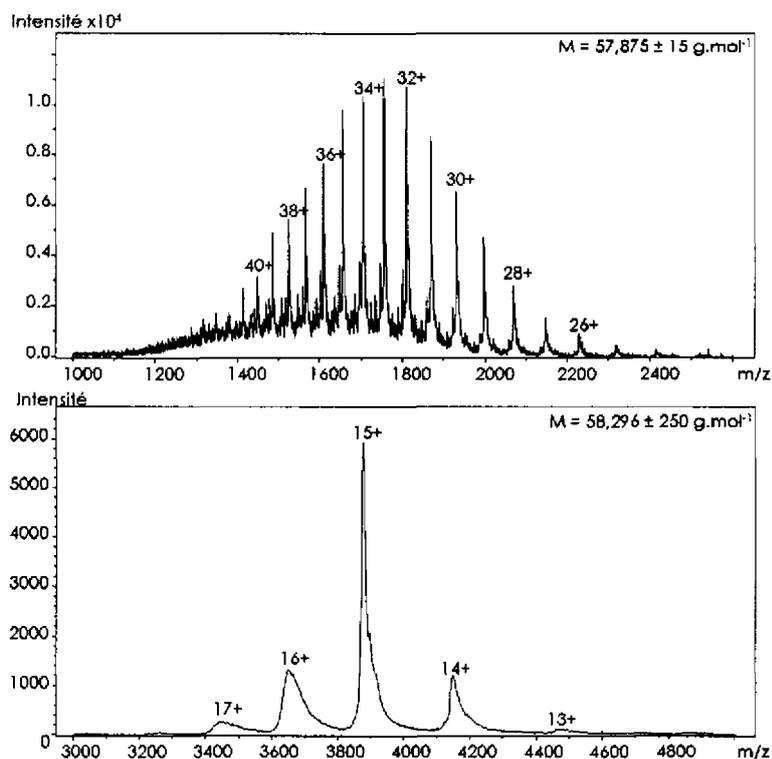


Figure 39 : Spectres de l'antithrombine obtenus par FACCE-MS en conditions dénaturantes ou non

Antithrombine (lot 1) 15 μM .

(a) liquide d'appoint = eau - acétonitrile (60 : 40, v/v) 1% d'acide formique, masse cible 2000 m/z

(b) liquide d'appoint = acétate ammonium 10 mM, masse cible 4000 m/z

Capillaire en silice vierge 75 μm d.i., L=98 cm, l=21,5cm. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5 ; voltage +15 kV ; température 25°C. Injection électrocinétique continue + 15 kV.

Débit du liquide d'appoint : 3 $\mu\text{L.min}^{-1}$. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

2 minutes d'intégration du TIC.

La distribution des états de charges d'une protéine ionisée par ESI dépend du pH et de la présence de solvants organiques et est le reflet de sa conformation. En présence de solvant organique et d'acide, l'antithrombine dénaturée expose au solvant plus de sites de protonation : les états de charge observés sont nombreux et élevés. En tampon aqueux, la conformation native

est mieux préservée, les sites basiques de l'antithrombine sont moins accessibles aux protons : les états de charges sont peu nombreux et moins élevés.

L'imprécision sur la masse de l'antithrombine en conditions natives s'explique par la largeur des pics due à la présence d'adduits ammonium, mais également aux spécifications de l'analyseur utilisé : au-delà de 3000 m/z la résolution théorique de cette trappe ionique est divisée par 8.

Malgré une très faible quantité de protéine injectée, les résultats obtenus par FACCE-MS sur l'analyse de l'antithrombine non seulement en conditions dénaturantes mais également en conditions non dénaturantes, sont aussi satisfaisants que ceux obtenus en infusion.

IV-4 ANALYSE DES COMPLEXES ANTITHROMBINE / HEPARINE PAR CE-MS

A la vue des résultats précédents, l'analyse des complexes antithrombine / héparine par FACCE-MS paraît envisageable. La caractérisation de ces complexes a été réalisée en deux étapes. La première étape a consisté à mettre en évidence le complexe non covalent en utilisant un liquide additionnel non dénaturant. La seconde étape a consisté à caractériser le ligand par dissociation du complexe en sortie du capillaire de séparation en utilisant un liquide additionnel dénaturant.

IV-4.1 Détection du complexe antithrombine / pentasaccharide d'héparine

L'analyse par FACCE-MS du complexe pré-incubé antithrombine / pentaH en conditions non dénaturantes conduit à un électrophérogramme montrant deux fronts (Figure 40a). Cette analyse est comparable à celle réalisée par FACCE (*cf.* Figure 33 page 67), mais les deux fronts sont ici moins bien séparés du fait de l'effet de siphon en CE-MS. Le courant d'ion total (TIC) résultant fait apparaître un front moins bien défini correspondant à l'arrivée des analytes dans le MS (Figure 40b).

L'intégration du début du front observé sur le TIC, correspondant au premier front sur l'électrophérogramme, montre une enveloppe d'ions de charges 14+ à 17+ (Figure 40c), permettant de calculer une masse de protéine de $58\,049 \pm 133 \text{ g.mol}^{-1}$ proche de la masse de l'antithrombine en conditions non dénaturantes. Tandis que l'intégration du TIC correspondant au second front sur l'électrophérogramme montre deux enveloppes d'ions de charges 14+ à 17+ (Figure 40d), correspondant à des masses moléculaires de $58\,192 \pm 120 \text{ g.mol}^{-1}$ et $59\,673 \pm 110$

g.mol^{-1} . L'écart de masse entre ces deux espèces est de $1482 \pm 26 \text{ g.mol}^{-1}$ soit une valeur très proche de la masse d'une molécule de pentaH (la masse théorique du pentaH est de $1506,95 \text{ g.mol}^{-1}$). Bien que la précision de cette mesure reste faible en raison du défaut de résolution de l'analyseur dans cette gamme de masse, cette analyse nous a permis de confirmer la présence d'antithrombine sous le premier front et d'antithrombine complexée (stoechiométrie 1:1[29]) ou non avec le pentaH sous le second front.

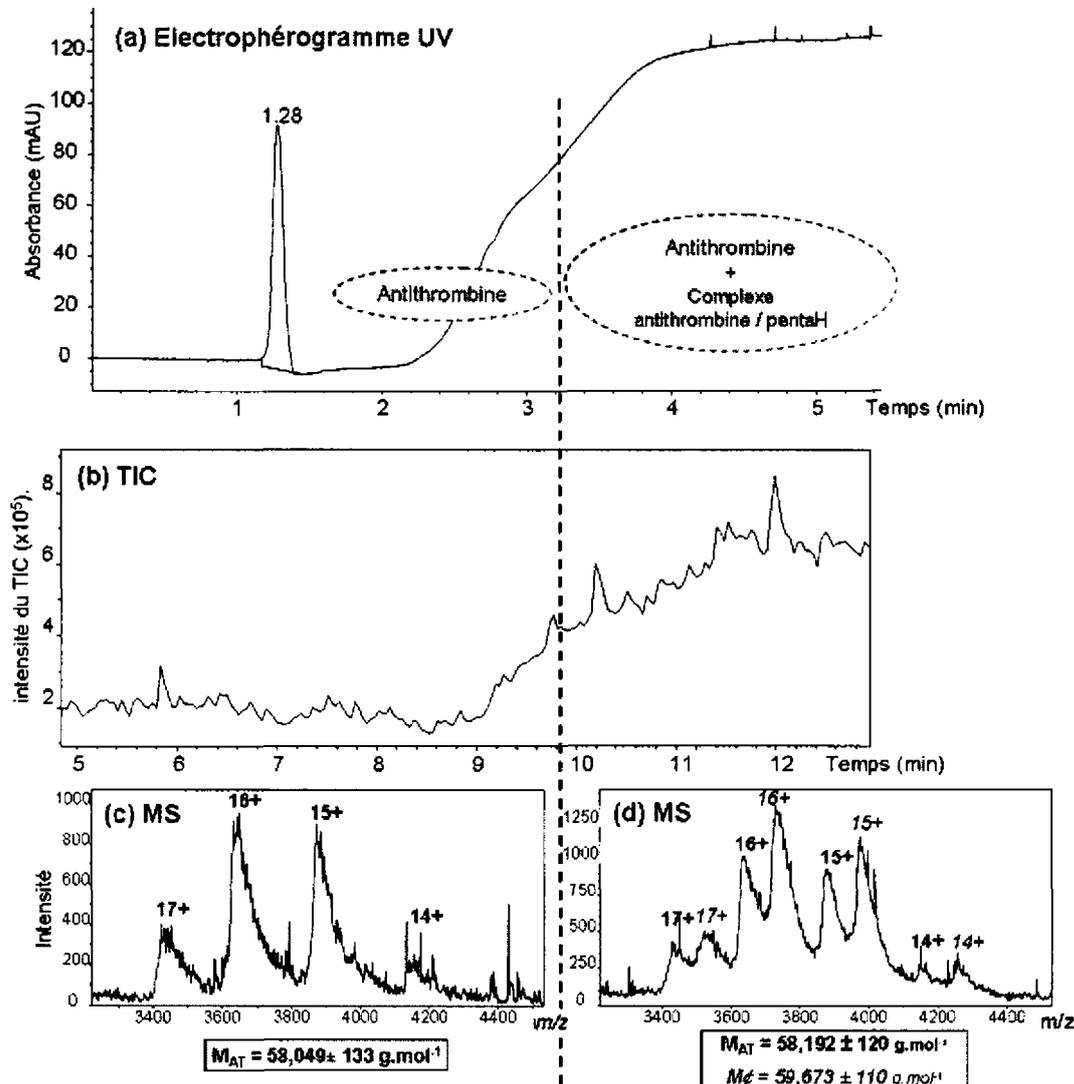


Figure 40 : Analyse par FACCE-MS du mélange antithrombine / pentasaccharide d'héparine

Antithrombine (lot 1) environ $8 \mu\text{M}$, filtrée sur microspin G50.

Capillaire en silice vierge $75 \mu\text{m}$ d.i., $L=98 \text{ cm}$, $l=21,5 \text{ cm}$. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM , $\text{pH } 8,5$; voltage $+20 \text{ kV}$; température, 25°C . Injection électrocinétique continue $+20 \text{ kV}$

Liquide d'appoint = acétate d'ammonium 10 mM $\text{pH } 6,5$, $3 \mu\text{L}/\text{min}$. Masse cible 4000 m/z . Nébulisation 5 psi , séchage $3 \text{ L}/\text{min}$ à 100°C .

(a) Electrophérogramme UV à 200 nm obtenu à $21,5 \text{ cm}$ de l'entrée du capillaire

(b) TIC obtenu en sortie de capillaire

(c) Spectre de masse de l'antithrombine

(d) Spectre de masse de l'antithrombine et du complexe antithrombine / pentaH

L'observation de ce complexe non covalent est ici possible puisque les liaisons qui maintiennent le complexe ne sont pas détruites lors de l'ionisation. Ces liaisons, principalement de nature électrostatique, sont même renforcées lors du passage en phase gazeuse.[164] Ce complexe est le premier complexe non covalent protéine / saccharide observé par FACCE-MS.

IV-4.2 Complexes antithrombine / héparines de bas poids moléculaires

L'analyse des mélanges pré-incubés antithrombine / LMWH a aussi été effectuée par CE-MS en conditions non dénaturantes. Les conditions précédentes ont dû être réajustées pour analyser des complexes plus labiles que pentaH. Les concentrations en analytes ont dû être augmentées (de 8 à 15 μM), mais l'analyse en FACCE-MS est alors devenue difficile. En effet, l'injection continue d'un échantillon trop concentré déstabilise le courant électrophorétique. Les analyses suivantes ont donc été réalisées par FACE-MS, correspondant à une injection de l'échantillon non plus continue mais limitée à quelques minutes. Contrairement à la FACCE, les analyses par FACE ne nécessitent plus de filtration préalable de l'antithrombine en vue de réaliser un échange de tampons. Pour la suite de cette étude, les échantillons d'antithrombine commerciale ont simplement été dilués dans l'électrolyte de séparation.

Les spectres de masse obtenus en FACE-MS en conditions non dénaturantes ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs espèces en plus de l'antithrombine seule.

La Figure 41 représente les spectres obtenus par l'intégration du front par pas de une minute. Sur le premier spectre (Figure 41a), des ions correspondants à l'antithrombine sont identifiés : m/z 3616,3 ; 3860,4 ; 4132,6 et 4466,0, correspondant respectivement aux ions de l'antithrombine de charge 16+, 15+, 14+ et 13+, soit une masse de protéine de $57926 \pm 95 \text{ g.mol}^{-1}$.

Les spectres suivants, correspondant à des intégrations plus tardives du front, montrent l'apparition d'une large enveloppe correspondant à des ions de valeurs m/z supérieures à celle des ions de l'antithrombine. Sur le second spectre on peut notamment mettre en évidence deux ions m/z 4294,2 et 4624,2 qui pourraient correspondre aux ions de charges 14+ et 13+ appartenant à un complexe de $60102 \pm 2 \text{ g.mol}^{-1}$. La différence de masse entre ce complexe et l'antithrombine est d'environ 2180 g.mol^{-1} , proche de la masse d'une molécule de LMWHC, dont la masse molaire moyenne en masse est de 2933 g.mol^{-1} .

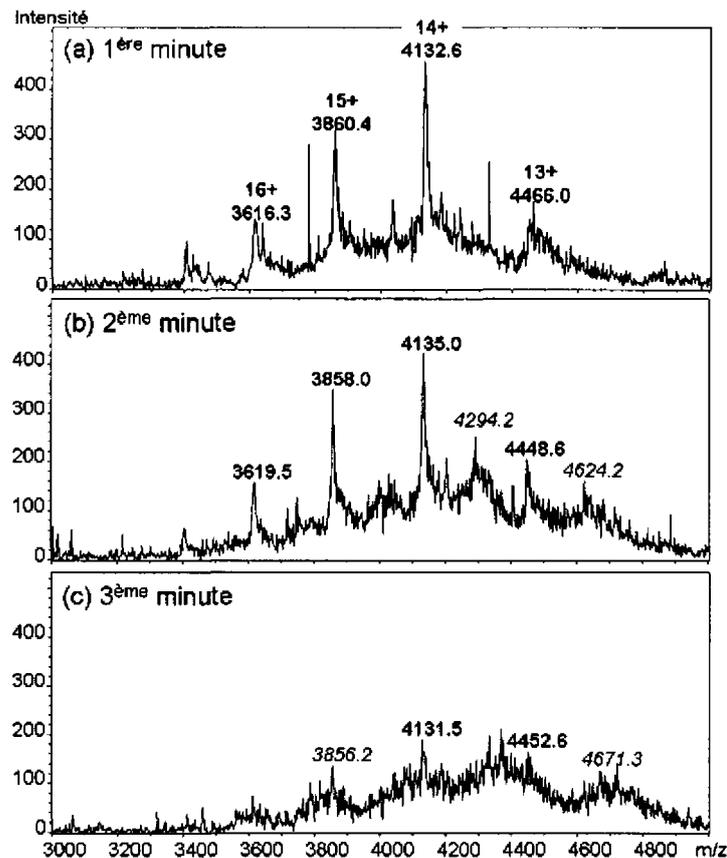


Figure 41 : Spectres des complexes AT / LMWHC obtenus par FACE-MS en conditions non dénaturantes

Antithrombine (lot 2) 15 μM et LMWHC 150 μM ont été incubés 1h.

Capillaire en silice vierge, 75 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5 ; voltage, +20 kV ; température, 25°C. Injection électrocinétique + 20 kV, 100 secondes.

Liquide d'appoint = acétate d'ammonium 10 mM, pH 6,5, 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Masse cible 4000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C. **En gras** : ions de l'antithrombine, *en italique* : ions du complexe.

(a), (b) et (c) correspondent à des intégrations successives du front d'une durée de 1 minute.

L'apparition d'enveloppes correspondant aux complexes non covalents s'accompagne d'un élargissement des pics et d'une diminution de l'intensité du signal, diminution qui avait également été observée lors de l'étude de l'interaction AT / pentaH. La raison principale de cette perte de signal est ici la superposition de plusieurs enveloppes d'ions correspondant aux différents complexes formés à partir de LMWHC, qui rappelons le est une fraction d'héparine hétérogène.

La FACE-MS nous a permis de mettre en évidence la formation d'au moins un complexe de stoechiométrie 1:1 entre l'antithrombine et une héparine de bas poids moléculaire appartenant à l'échantillon LMWHC qui était pourtant, d'après les mesures réalisées par ACE, l'échantillon de plus faible affinité pour l'antithrombine ($K_d \approx 17 \mu\text{M}$, cf. Tableau 5 page 68). Cette même analyse réalisée avec les fractions d'héparines LMWHA et LMWHB, de plus forte affinité mais également de plus hautes masses, n'a donné aucun résultat du fait de la perte de sensibilité pour de plus grandes valeurs en m/z et de la limitation de la trappe d'ions à 6000 m/z .

IV-5 DETECTION DES LIGANDS GLUCIDIQUES PAR CE-MS

IV-5.1 Pentasaccharide d'héparine

Les résultats précédents obtenus par CE-MS en conditions non dénaturantes, confirment le fait que le complexe non covalent AT / pentaH est transféré de la CE vers le MS (Figure 40 page 79). Afin d'isoler les ligands, nous avons cherché à dissocier le complexe dans la source du MS en utilisant des conditions dénaturantes.

L'analyse MS du pentaH a été réalisée au préalable en infusion, en mode d'ionisation négative (Figure 42). Le mode d'ionisation négative est dans le cas des oligosaccharides sulfatés plus sensible que le mode d'ionisation positive.

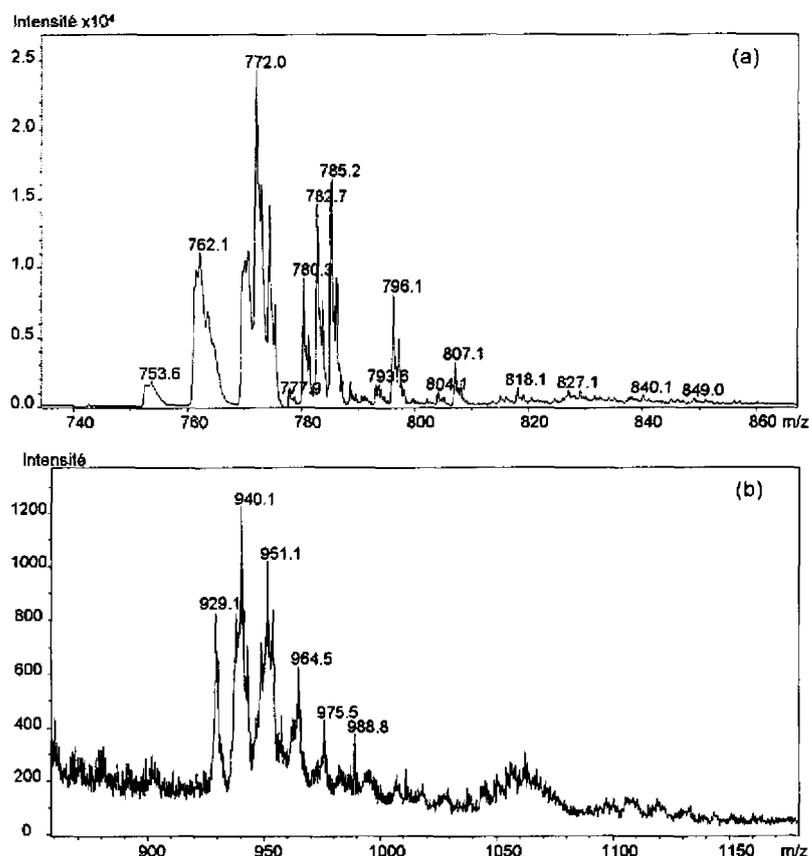


Figure 42 : Spectre de masse du pentaH par MS^{neg}

pentaH 10 μ M. (a) 740 - 860 m/z , (b) 860 - 1200 m/z .

Hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5 – acétonitrile (50 : 50, v/v), 3 μ L/min.

Masse cible 2000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Les ions détectés dans la gamme de masse 740 – 860 m/z (Figure 42a) sont tous doublement chargés et ont pu être attribués à des ions adduits du pentaH de formule générale $[M + xNa^+ + y'NH_4^+ - (2+x+y')H^+]^{2-}$ (Tableau 8).

$x \text{ Na}^+$ $y' \text{ NH}_4^+$	$x = 0$	$x = 1$	$x = 2$	$x = 3$	$x = 4$	$x = 5$	$x = 6$
$y' = 0$	752.6	762.1	774.4	785.2	796.1	807.1	818.1
$y' = 1$	761.1	772.0	782.7	793.6	804.1		
$y' = 2$	769.5	780.3					
$y' = 3$	777.9						

Tableau 8 : Attribution des ions du pentaH

Valeurs m/z des ions de formule générale $[M + x\text{Na}^+ + y' \text{NH}_4^+ - (2+x+y')\text{H}^+]^2$ (cf. Figure 42a)

Verticalement : adduits NH_4^+ , horizontalement : Adduits Na^+

Les ions détectés dans la gamme de masse 860 – 1200 m/z (Figure 42b) sont également doublement chargés, mais n'ont pas pu être attribués à des ions du pentaH. L'ion de rapport m/z 929,1, le moins sodé, indique que cette espèce pourrait correspondre à un oligosaccharide d'environ 1860 g.mol^{-1} . Les analyses par CE de cet échantillon avait déjà montré l'existence de deux espèces (cf. Figure 27a page 60). Les mesures de constantes de dissociation par FACCE indiquaient que cette seconde espèce, vraisemblablement la moins mobile (*i.e.* moins chargée ou de plus grande masse), avait moins d'affinité pour l'antithrombine (cf. §II-2 page 67). Cette molécule, qui a donc un écart de masse d'environ 350 g.mol^{-1} avec le pentaH, pourrait être un hexasaccharide formé lors de la synthèse du pentaH.[208]

Afin de dissocier le complexe en source, différentes compositions en liquide additionnel contenant des proportions variables en eau et acétonitrile ou méthanol, ont été testées. Les essais les plus concluants ont été réalisés avec un liquide additionnel composé d'acétonitrile pur.

Le spectre suivant (Figure 43) présente un témoin, correspondant à l'analyse par FACE-MS^{neg} de l'antithrombine seule, avec pour liquide additionnel le mélange eau – acétonitrile (50 : 50, v/v). Cette analyse avait pour but de vérifier que l'analyse de l'antithrombine en mode d'ionisation négative n'interférerait pas avec celle du pentaH. Néanmoins, les ions détectés ne correspondent pas à l'antithrombine mais à l'HEPES contenue dans le tampon du lot d'antithrombine (cf. Matériel et méthodes § I-2.1 page 126). La filtration de l'antithrombine sur microspinG50 a permis de réduire l'intensité des ions d'HEPES sans pour autant les supprimer. Des expériences menées sur l'antithrombine incubée avec le pentaH, ont montré des ions intenses d'HEPES mais pas de pentaH. Ces données suggèrent une possible compétition, probablement non spécifique, des molécules d'HEPES sulfatées, avec l'oligosaccharide sulfaté.

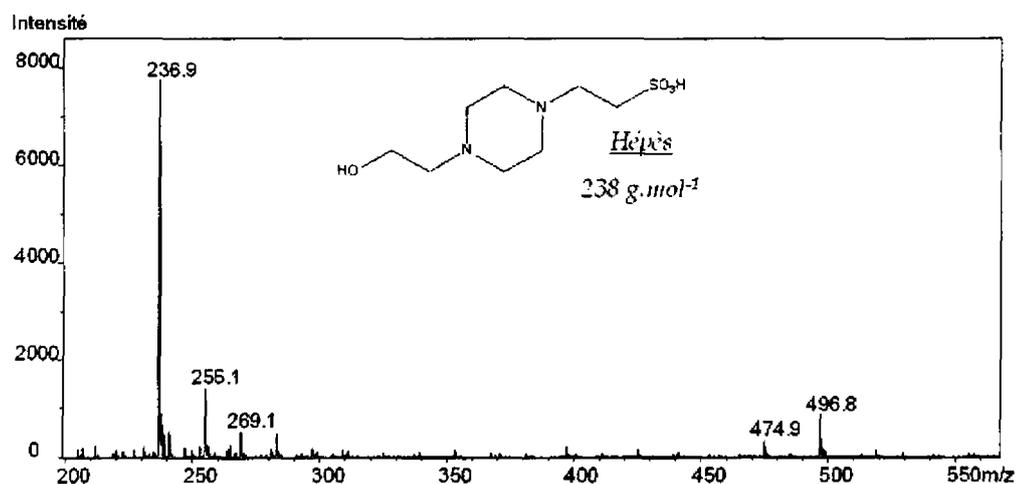


Figure 43 : Spectre de l'antithrombine obtenu par FACE-MS^{nc8} en conditions dénaturantes

Antithrombine (lot 1) 30 μ M.

Capillaire en silice vierge 75 μ m d.i., L=98 cm, l=21,5cm. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM pH 8,5 ; voltage +20 kV ; température 25°C. Injection électrocinétique + 20 kV 140 secondes. Liquide d'appoint = eau - acétonitrile (50 : 50, v/v), 3 μ L/min. Masse cible 2000 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

La suite des travaux a été réalisée avec le lot d'antithrombine commercialisé en tampon phosphate et donc dépourvu d'HEPES. Le spectre suivant (Figure 44) présente les ions du pentaH détectés après la dissociation en source du complexe AT / pentaH par l'ajout d'un liquide additionnel composé d'acétonitrile pure. Les ions ont pu être attribués (Tableau 9) sans ambiguïté au pentaH doublement chargé.

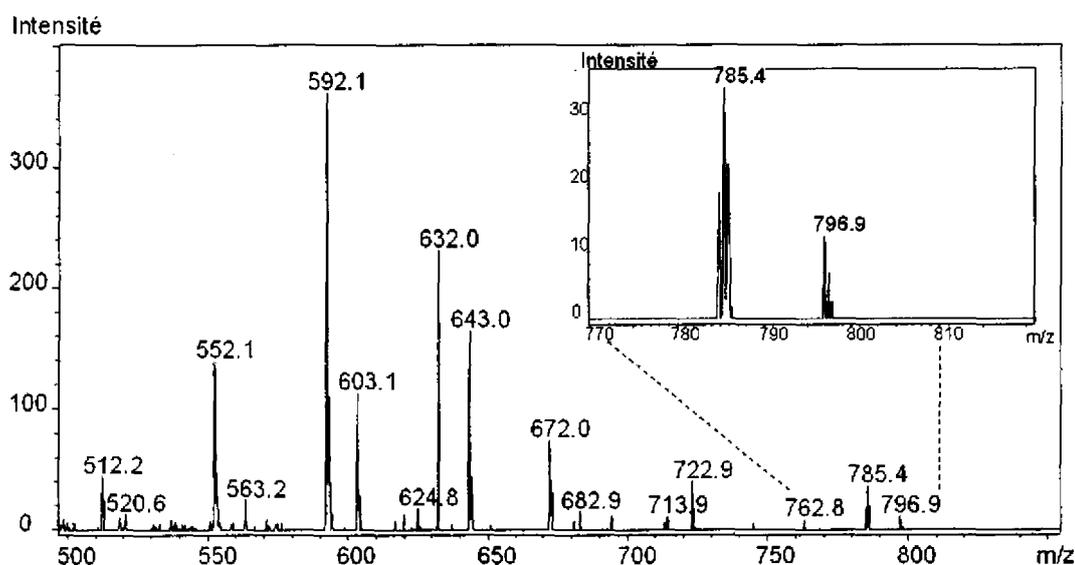


Figure 44 : Spectre du pentaH obtenu par FACE-MS^{nc8} en conditions dénaturantes

Antithrombine (lot 2) et pentaH ont été incubés 1h à la même concentration, 40 μ M.

Capillaire en silice vierge 75 μ m d.i., L=98 cm, l=21,5cm. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5 ; voltage +20 kV ; température, 25°C. Injection électrocinétique + 20 kV 2 minutes. Liquide d'appoint = acétonitrile, 4 μ L/min. Masse cible 2000 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Les ions détectés dans la gamme de masse choisie sont tous doublement chargés et ont pu être attribués à des ions adduits et fragments du pentaH de formule générale $[M + xNa^+ - ySO_3 - (2 + x)H^+]^2$ (Tableau 9).

$x Na^+$ $y SO_3$	$x = 0$	$x = 1$	$x = 2$	$x = 3$	$x = 4$
$y = 0$				785.9	796.9
$y = 1$		722.9			
$y = 2$	672.0	682.9			
$y = 3$	632.0	643.0			
$y = 4$	592.1	603.1			
$y = 5$	552.1	563.2			
$y = 6$	512.2				

Tableau 9 : Attribution des ions du pentaH dissociés du complexe

Valeurs m/z des ions de formule générale $[M - ySO_3 + xNa^+ - (2 + x)H^+]^2$ (cf. Figure 44)

Verticalement : perte de groupements SO_3 , horizontalement : Adduits Na^+

Les spectres de pentaH obtenus en infusion (Figure 42 page 82) et en CE-MS après dissociation du complexe (Figure 44) sont différents. Le spectre obtenu par dissociation du complexe antithrombine / pentaH présente des ions fragments correspondant à des pertes de groupement sulfate. A l'inverse, l'analyse du pentaH en infusion ne montrait pas le même profil d'ions, ne présentant que des ions adduits Na^+ et NH_4^+ , pas de désulfatation. Nous supposons que cette désulfatation est une conséquence de la dissociation du complexe.

IV-5.2 Héparines de bas poids moléculaires

La méthode précédemment décrite pour l'analyse du pentaH après dissociation du complexe AT / héparine en source a été appliquée à LMWHB, qui montre la plus forte affinité pour l'antithrombine parmi les fractions d'héparine étudiées ($K_d \approx 4 \mu M$, cf. Tableau 5 page 68).

Les analyses en conditions dénaturantes ne nous ont dans ce cas pas permis d'identifier de manière concluante les fragments de LMWHB liés à l'antithrombine. Les spectres obtenus n'étaient pas exploitables du fait de leur complexité et de leur faible intensité.

Des essais ont également été menés avec LMWHC, qui correspond aux plus petits fragments d'héparines étudiés. Les analyses en conditions dénaturantes nous ont permis de détecter quelques ions de LMWHC liés à l'antithrombine (Figure 45).

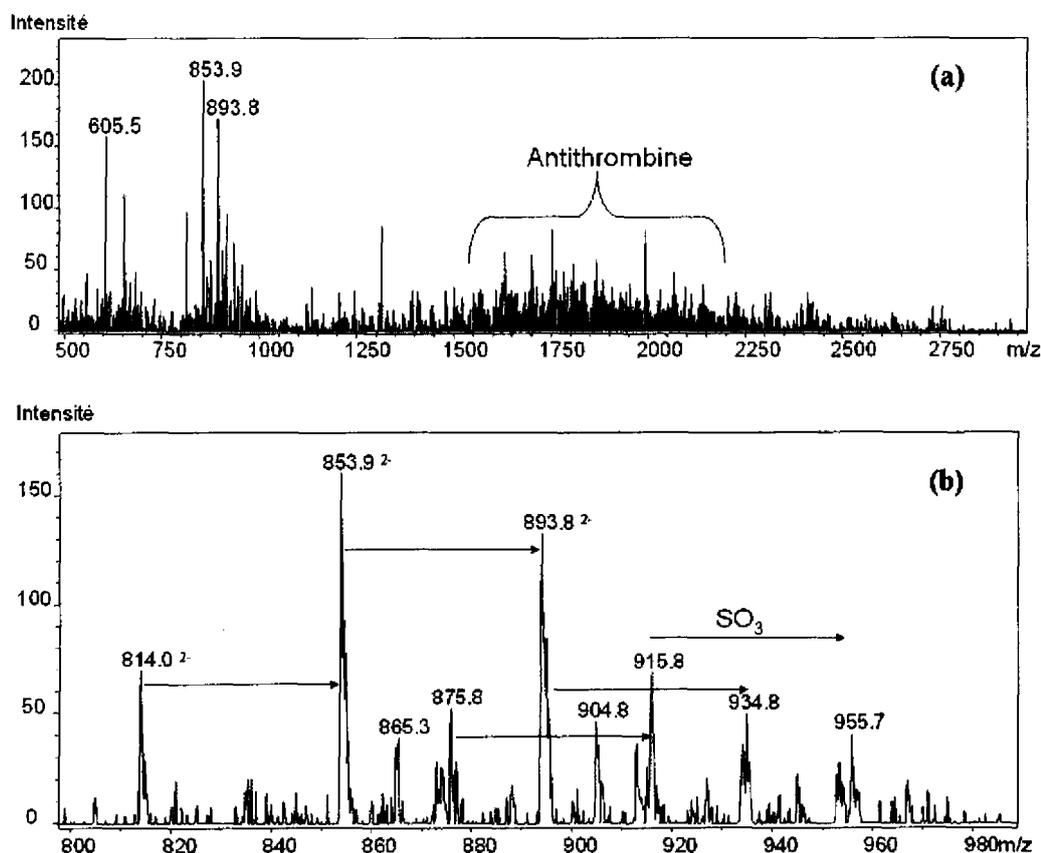


Figure 45 : Spectres des LMWHC obtenus par FACE-MS^{nes} en conditions dénaturantes

Antithrombine (lot 2) 15 μM et LMWHC 150 μM ont été incubés 1h.
Capillaire en silice vierge 75 μm d.i., L=98 cm, l=21,5cm. Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5 ; voltage +20 kV ; température 25°C. Injection électrocinétique + 20 kV 100 secondes.

Liquide d'appoint = acétonitrile, 4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Masse cible 2000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

(c) correspond à un agrandissement du spectre (a)

Les ions obtenus n'ont pu être fragmentés afin de déterminer leur structure du fait de leur faible intensité. Le premier spectre (Figure 45a) laisse apparaître la présence de l'antithrombine vers m/z 1500 à 2200, ainsi que deux séries d'ions dichargés vers m/z 600 et 850. Le second spectre (Figure 45b), qui correspond à un agrandissement de la zone m/z 800 à 980, montre que les ions observés sont des espèces possédant plusieurs groupements sulfate. L'ion de plus haute valeur, m/z 955,7, correspond au fragment détecté le moins désulfaté. Cet ion permet d'établir une estimation de la taille minimale du fragment LMWHC lié à l'antithrombine, soit environ 1913 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, pouvant correspondre à un heptasaccharide.

V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La détection de complexes non covalents antithrombine / héparine a été réalisée pour la première fois par le couplage de l'électrophorèse frontale à la spectrométrie de masse (FACCE-MS et FACE-MS). En conditions non dénaturantes, les complexes non covalents ont été observés, permettant une détermination de leur stœchiométrie et une estimation de la masse du ligand lié. En conditions non dénaturantes, les ligands ont pu être isolés des complexes en vue d'une caractérisation plus précise.

Cette étude, qui se voulait être au départ une étude de faisabilité, a déjà montré des résultats intéressants avec un échantillon saccharidique homogène, le pentasaccharide d'héparine (*cf.* Publication 1 page 147[199]). Les résultats obtenus ouvrent la voie sur des améliorations de la méthode mise au point pour l'analyse d'échantillons hétérogènes comme les fractions d'héparine de bas poids moléculaires.

La séparation électrophorétique en mode frontal s'est avérée suffisante pour l'analyse d'un échantillon de structure homogène comme le pentaH, l'apparition d'un complexe correspondait à l'apparition d'un second front distinct de celui de l'antithrombine. En revanche, pour les fractions d'héparine de bas poids moléculaires (LMWH), échantillons très hétérogènes, un seul front très étalé a été observé indiquant que de nombreux complexes différents étaient formés. Une optimisation des conditions séparatives pour les échantillons hétérogènes est donc à envisager. Cette optimisation devra néanmoins rester compatible avec l'analyse MS. La suppression de l'effet de siphon, l'utilisation d'un capillaire de séparation plus long et une force ionique plus élevée, pourraient être des solutions à envisager. L'utilisation d'échantillons moins hétérogènes et mieux caractérisés que les LMWH permettrait d'effectuer ces optimisations.

En fonction des informations recherchées sur les complexes non covalents étudiés, l'optimisation en MS pourra se faire soit sur l'analyse des complexes entiers, soit sur l'analyse des ligands dissociés.

L'analyse des complexes non covalents en conditions non dénaturantes par FACE-MS permet une détermination rapide des stœchiométries étudiées. Le modèle antithrombine / héparine utilisé pour cette mise au point avait pour inconvénient la formation de complexes détectables dans des gammes de m/z élevées rendant l'analyse peu résolue avec une trappe à ions. Dans ces mêmes conditions, l'analyse de peptides ou de protéines de plus petite taille assurerait une détection à plus faibles rapports m/z et donc une meilleure résolution des spectres et des mesures

plus précises des incréments de masse observés (*cf.* Chapitre 3). L'optimisation de la détection des complexes non covalents pourrait se faire au moyen d'un autre analyseur plus adapté à l'analyse de macromolécules, tel qu'un analyseur à temps de vol (TOF). Une étude récente a d'ailleurs montré la capacité résolutive d'un analyseur TOF pour l'étude de complexes non covalents antithrombine / hexasaccharides d'héparine. [209]

L'analyse des ligands dissociés en conditions dénaturantes par FACE-MS demande à la fois une amélioration de la séparation électrophorétique, mais également de la sensibilité de détection. L'amélioration de la sensibilité peut se faire par une optimisation de la formation du complexe dans le capillaire de séparation, en augmentant la force ionique et/ou en diminuant le pH. Elle peut également être réalisée par une nouvelle optimisation de la composition du liquide additionnel. L'acétonitrile utilisé a bien joué son rôle de dissociant mais ce solvant pourrait bien avoir provoqué une précipitation de la protéine libre et complexée, diminuant par conséquent la quantité d'ions détectés. L'utilisation d'un tampon aqueux à un pH extrême, acide ou basique, peut être envisagé, permettant ainsi de dissocier le complexe sans provoquer de précipitation. Une fois la sensibilité améliorée, l'identification structurale des ligands oligosaccharidiques pourra être envisagée par la fragmentation (MSⁿ) des ions.

CHAPITRE 3

OLIGOMERISATION DE CHIMIOKINES

EN PRESENCE D'OLIGOSACCHARIDES SULFATES

COUPLAGE ACE-MS

CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'OLIGOMERISATION DE CHIMIOKINES EN PRESENCE D'OLIGOSACCHARIDES SULFATES PAR ACE-MS

I INTRODUCTION

Le chapitre précédent nous a permis d'évaluer différents modes d'analyse de complexes protéine / oligosaccharide par CE-MS. Nous avons notamment pu détecter des complexes intacts, en conditions non dénaturantes, et par conséquent déterminer leur stœchiométrie et la masse des ligands liés. Cette mise au point ouvre la voie à de nombreuses applications en glycobiologie. Dans ce chapitre, nous avons tenté d'établir les stœchiométries de complexes chimiokines / oligosaccharides par CE-MS.

Les chimiokines, protéines de la famille des cytokines, jouent des rôles importants lors de l'inflammation et lors de certains processus homéostatiques (*cf.* Chapitre 1 § I-2.2 page 15). Cette activité biologique est modulée par l'interaction des chimiokines avec des récepteurs transmembranaires spécifiques. Les protéines circulantes sont immobilisées et pourraient être présentées à leurs récepteurs par l'intermédiaire des glycosaminoglycanes (GAG), constitutifs des protéoglycanes, localisés à la surface des cellules. Les GAG semblent posséder la propriété de promouvoir l'oligomérisation de ces protéines et par conséquent de moduler leur activité.[48, 55]

Pour cette étude, nous avons choisi deux chimiokines, SDF-1 et MCP-1, susceptibles de former des oligomères de stœchiométries et structures différentes en présence d'héparine.

L'étude de ces oligomères a été envisagée par ACE-MS, avec pour objectif la réalisation en une étape de l'identification des ligands saccharidiques et la détermination de la stœchiométrie des complexes formés.

II OLIGOMERISATION DE SDF-1 α

La chimiokine Stromal-cell Derived Factor-1 α (SDF-1 α / CXCL12) intervient dans des processus tels que l'hématopoïèse, l'angiogenèse, le recrutement de leucocytes, l'infection virale par le VIH et certains cancers. La stœchiométrie hypothétique du complexe SDF-1 α / héparine est 2/1.

Les sites potentiels d'interaction de SDF-1 α à l'héparine [Lys 1 ; Lys 24, His 25 et Lys27 ; Arg 41 et Arg 43] ont été proposés par modélisation moléculaire en identifiant les résidus basiques à la surface de la protéine.[70] Parmi ces sites, seuls les résidus [Lys 1, Lys 24, Lys27 et Arg 41] sont apparus déterminants pour la formation d'un complexe chimiokine / héparine dont la structure serait formée par deux protéines reliées par l'héparine.

La formation de dimères de protéines a été étudiée par RMN et la constante d'équilibre a été estimée à 5mM.[210] Le dimère de protéine ne devrait pas être *a priori* observé par CE-MS, puisque la méthode ne permet pas l'analyse de complexes aussi labiles. Néanmoins, la présence d'héparine semble promouvoir cette oligomérisation, puisqu'en présence de disaccharide d'héparine, la constante de dimérisation est abaissée à environ 170 μ M.[72] L'étude de ce complexe par cristallographie a montré une association sous forme de dimères de protéine, au centre duquel s'intercale le disaccharide d'héparine.[62] Aucune étude n'a été réalisée avec des oligosaccharides de masse supérieure en raison de la précipitation des complexes formés.

La chimiokine SDF-1 α s'associe à l'héparine avec une affinité très forte de l'ordre de 38 nM (déterminée par SPR). Tandis que SDF-1 (3/6), protéine mutée (Figure 43) pour laquelle les résidus [Lys 24, His 25 et Lys 27] ont été substitués par des résidus serine et qui conserve cependant la même structure que SDF-1 α , ne montre plus d'association à l'héparine.[69] Cette protéine mutée nous a permis de valider la spécificité de l'approche par ACE-MS.

<p>KPVSLSYRCP CRFFESHVAR ANVSSLSILN TPNCALQIVA RLKNNNRQVC IDPKLKWIQE YLEKALN_</p>

Figure 46 : Séquence de SDF-1 (3/6)

En italique : résidus marquant l'appartenance à la famille CXC,
En gras : résidus basiques susceptibles d'interagir avec des GAG.
En souligné : résidus mutés

II-1 MISE AU POINT DES CONDITIONS ELECTROPHORETIQUES

Les chimiokines étudiées, SDF-1 α (pI 9,9) et MCP-1 (pI 9,4)^x, sont des protéines basiques. L'analyse de ces protéines par CE nécessite une modification de la paroi du capillaire de séparation pour éviter leur adsorption. Après avoir choisi le type de modification adéquat (*cf.* Matériel et méthodes § III page 134), *i.e.* le tapissage du capillaire avec du poly(éthylène oxyde) (PEO), nous avons pu analyser ces chimiokines et étudier leurs liaisons à des oligosaccharides sulfatés par CE.

II-1.1 Analyses de SDF-1 par électrophorèse capillaire

Les analyses par CE ont été réalisées sur des capillaires tapissés de PEO, conditionnés avec de l'acétate d'ammonium (75mM pH 6,5). Ce tapissage neutralise les charges de surface négatives du capillaire et entraîne une réduction du flux électro-osmotique. Les protéines basiques (cationiques à pH 6,5) ne s'adsorbent alors plus sur les parois. Pour réduire les durées d'analyse, une pression hydrodynamique a été appliquée pendant toute la durée des séparations.

Les électrophérogrammes obtenus après injection de SDF-1 α (Figure 47a) laissent apparaître un pic avant le marqueur neutre (MN) correspondant à la protéine chargée positivement. Nous avons utilisé le pic de marqueur neutre pour estimer la part du flux électro-osmotique résiduel et surtout celle du débit d'électrolyte résultant de la pression appliquée. La valeur de mobilité électrophorétique de SDF-1 α mesurée est alors : $\mu_{ep, SDF-1\alpha} = 21.10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. L'analyse de la protéine mutée SDF-1 (3/6) conservée dans l'eau (Figure 47b) montre également un pic correspondant à une protéine cationique (détectée avant le MN), mais moins mobile que SDF-1 α : $\mu_{ep, SDF-1(3/6)} = 13.10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

^x Valeurs de pI théoriques déterminées à partir des séquences en acides aminés grâce au logiciel ProtParam (Expasy Tools, www.expasy.org)

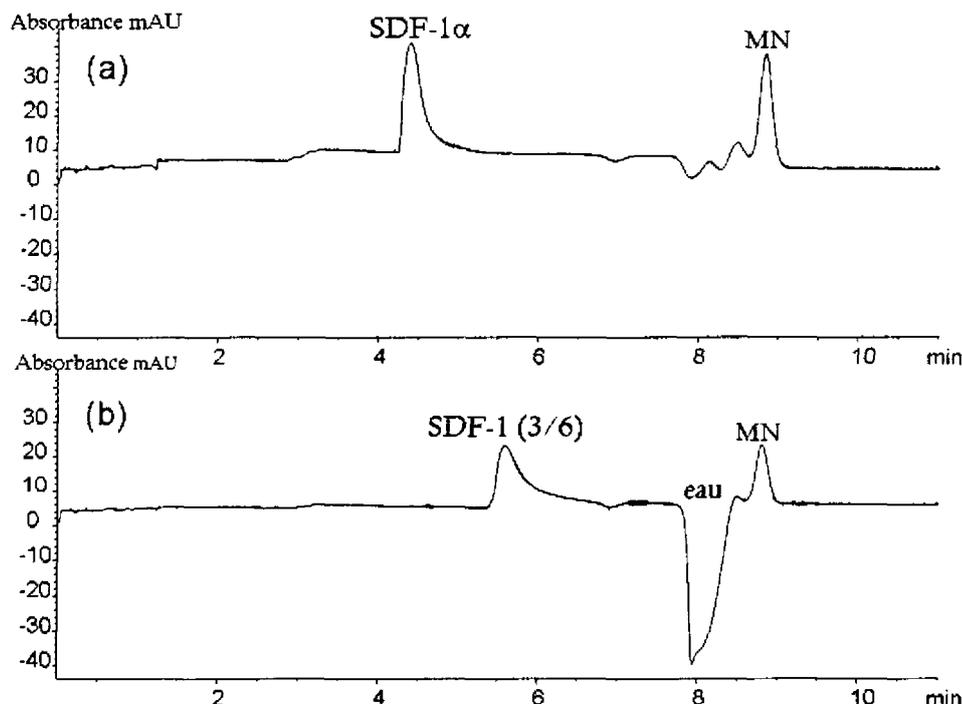


Figure 47 : Electrophérogrammes de SDF-1 α et SDF-1 (3/6) sur capillaire tapissé de poly(éthylène oxyde)

(a) SDF-1 α (b) SDF-1 (3/6)

Capillaire tapissé de PEO, 50 μ m d.i., L=34 cm, l=25,5cm (UV 200 nm).

Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +8 kV ; pression + 15 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 10 s de protéine 15 μ M. MN = marqueur neutre, alcool benzylique

La mobilité de la protéine mutée est inférieure à celle de SDF-1 α et est liée à la différence de charge des protéines. Cette observation est cohérente avec le fait que SDF-1 (3/6) est moins cationique que SDF-1 α du fait de la substitution de 3 résidus aminés basiques par des résidus neutres (sérines) localisés à la surface de la protéine.

II-1.2 Analyses de SDF-1 par électrophorèse capillaire d'affinité

L'analyse de SDF-1 en présence d'oligosaccharides sulfatés a été réalisée par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) sur des capillaires tapissés de PEO. Dans ce mode d'analyse, la protéine est injectée dans un capillaire conditionné avec un électrolyte contenant des oligosaccharides. Les études par ACE qui suivent ont été réalisées avec une fraction d'hexasaccharide d'enoxaparine (enox6) de masse comprise entre 1171 et 2005 g.mol⁻¹.

Analyses par électrophorèse capillaire d'affinité de SDF-1 α

SDF-1 α diluée dans l'acétate d'ammonium est injectée hydrodynamiquement dans un capillaire tapissé de PEO et conditionné avec l'électrolyte contenant de l'énox6 à différentes concentrations (de 0 à 1 μ M).

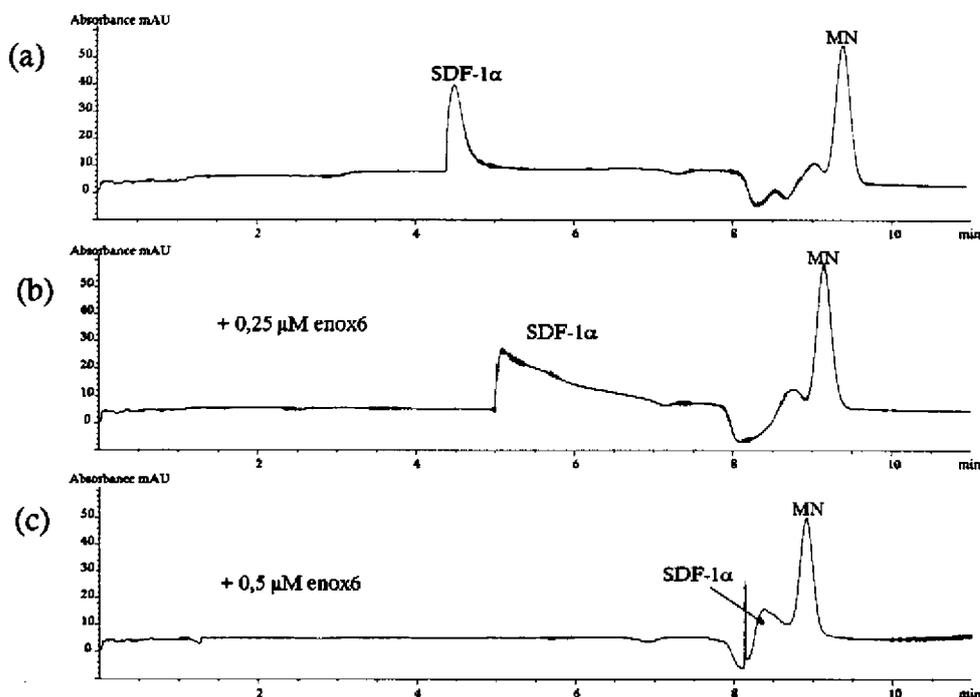


Figure 48 : Electrophérogrammes de SDF-1 α en présence d'énox6 obtenus par ACE

(a) témoin (b) ajout de 0,25 μ M d'énox6 dans l'électrolyte (c) ajout de 0,5 μ M d'énox6 dans l'électrolyte

Capillaire tapissé de PEO, 50 μ m d.i., L=34 cm, l=25,5cm (UV 200 nm).

Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +8 kV ; pression + 15 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 10 s de SDF-1 α 15 μ M. MN = marqueur neutre

L'électrophérogramme obtenu avec une concentration d'énox6 égale à 0,25 μ M (Figure 48b) montre un étalement et un décalage du pic correspondant à SDF-1 α . Cet étalement laisse supposer la coexistence de plusieurs espèces, correspondant par exemple à plusieurs formes de complexes de SDF-1 α / énox6. La mobilité de SDF-1 α est diminuée ($\mu_{ep, SDF-1\alpha+énox6} = 15 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) par comparaison avec l'électrophérogramme obtenu sans énox6 ($\mu_{ep, SDF-1\alpha} = 21 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, Figure 48a).

L'espèce formée en présence d'énox6 est moins chargée positivement que SDF-1 α , en effet le pic détecté est beaucoup plus proche du marqueur neutre. L'augmentation de la concentration en énox6 (Figure 48c) provoque un décalage important du pic de protéine vers les espèces neutres ($\mu_{ep, SDF-1\alpha+énox6} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette observation est en accord avec l'association de SDF-1 α cationique avec l'énox6 anionique (Figure 49).

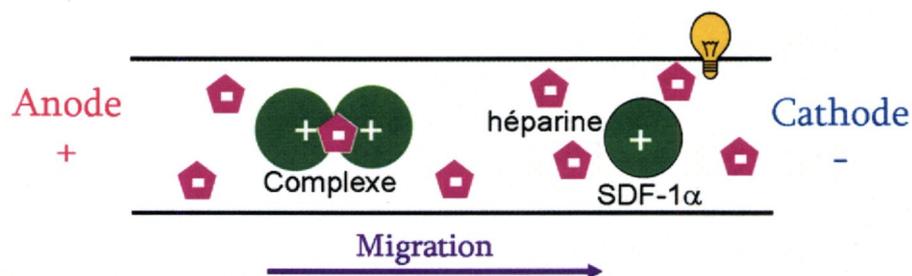


Figure 49 : Représentation schématique de la migration du complexe SDF-1 α / héparine

Si l'on suppose que le complexe formé est bien de stœchiométrie 2/1 et qu'il résulte de la liaison de l'oligosaccharide aux zones basiques des deux protéines (Figure 8), le complexe formé est moins cationique que la protéine. En polarité normale, ce complexe sera bien détecté à un temps plus tardif que la protéine.



Figure 8 : Modélisation de l'interaction SDF-1 α / héparine

Les zones bleues correspondent aux résidus basiques de la protéine susceptibles d'interagir avec l'héparine. A gauche : structure de la chaîne protéique, à droite : surface moléculaire du dimère. D'après [55]

Analyses par électrophorèse capillaire d'affinité de SDF-1 (3/6)

La protéine mutée SDF-1 (3/6), conservée dans l'eau, est injectée hydrodynamiquement dans un capillaire tapissé de PEO, conditionné avec l'électrolyte contenant de l'nox6 à différentes concentrations (de 0 à 1 μM). Les électrophérogrammes obtenus (Figure 50) montrent que l'ajout d'nox6 dans l'électrolyte a peu d'effets sur la mobilité de la protéine mutée :

- $\mu_{\text{ep, SDF-1 (3/6)}} = 13,7 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{\text{ep, SDF-1 (3/6)}} = 13,3 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec 0,5 μM d'nox6
- $\mu_{\text{ep, SDF-1 (3/6)}} = 11,2 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec 1 μM d'nox6

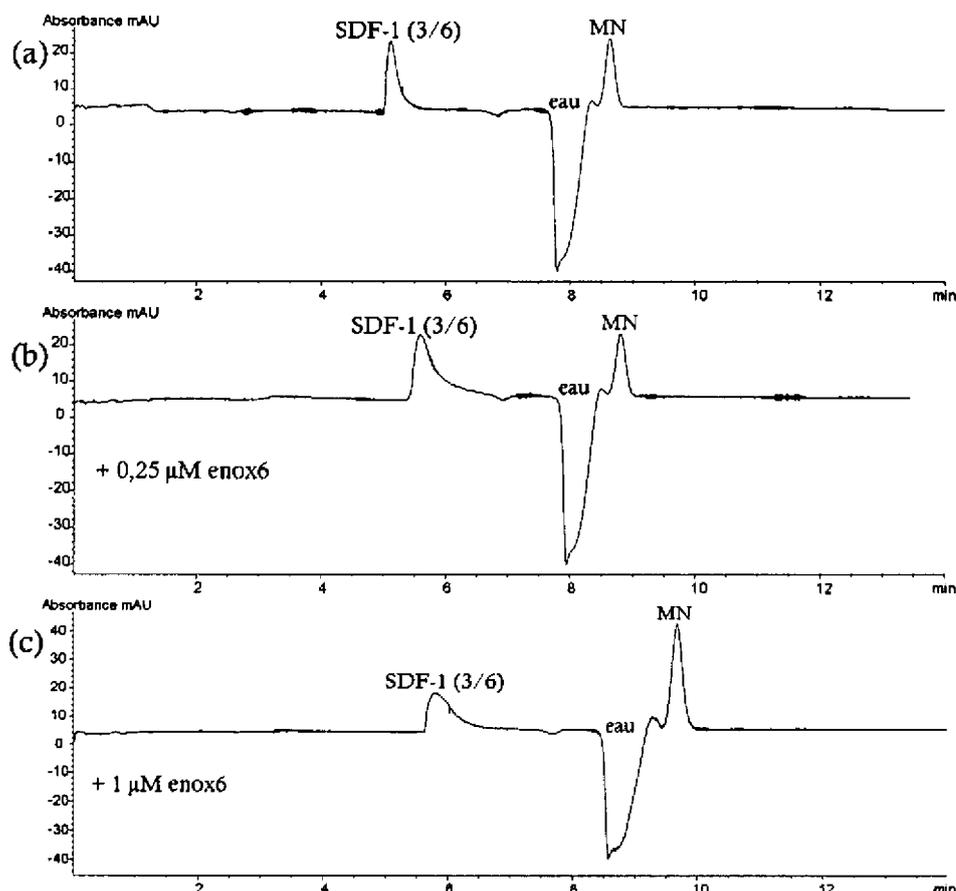


Figure 50 : Electrophérogrammes de SDF-1 (3/6) en présence d'énox6 obtenus par ACE

(a) témoin (b) ajout de 0,5 μM d'énox6 dans l'électrolyte (c) ajout de 1 μM d'énox6 dans l'électrolyte

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=34 cm, l=25,5cm (UV 200 nm).

Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +8 kV ; pression + 15 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 10 s de SDF-1 (3/6) 15 μM . MN = marqueur neutre

A la plus forte concentration, 1 μM (Figure 50c), on observe tout de même un élargissement et un retard du pic électrophorétique pouvant résulter d'une interaction avec les oligosaccharides. En effet, SDF-1 (3/6) possède toujours les résidus arginine 41 et lysine 43 dont l'interaction avec les GAG a déjà été envisagée pour SDF-1 α . [70]

Ces études par ACE montrent que les SDF-1 α et SDF-1 (3/6) interagissent différemment avec l'énox6. En effet, la mobilité de SDF-1 α est fortement modifiée à de faibles concentrations en énox6, contrairement à SDF-1 (3/6). Ces différences indiquent que les résidus mutés [Lys 24, His 25 et Lys 27] jouent en effet un rôle dans la liaison de ces protéines aux oligosaccharides.

II-2 ANALYSES DE SDF-1 PAR CE-MS

Les conditions de détection par CE-MS ont d'abord été mises au point par l'analyse des protéines seules. Les paramètres optimisés ont ensuite été adaptés pour l'étude par ACE-MS des protéines en présence d'oligosaccharides sulfatés. Les oligosaccharides utilisés sont :

- un disaccharide d'héparine de synthèse (hepIS), $M = 577 \text{ g.mol}^{-1}$;
- deux fractions d'énoxaparine de structures hétérogènes :
 - un tetrasaccharide (enox4), $776 \leq M \leq 1332 \text{ g.mol}^{-1}$
 - un hexasaccharide (enox6), $1171 \leq M \leq 2005 \text{ g.mol}^{-1}$
- un pentasaccharide de fucoïdane de synthèse (pentafuc), $M = 1420,12 \text{ g.mol}^{-1}$.

II-2.1 Détection des protéines par CE-MS

Les spectres de masse des protéines, SDF-1 α et SDF-1 (3/6), ont été réalisés par couplage d'un capillaire tapissé de PEO au spectromètre de masse (Figure 51).

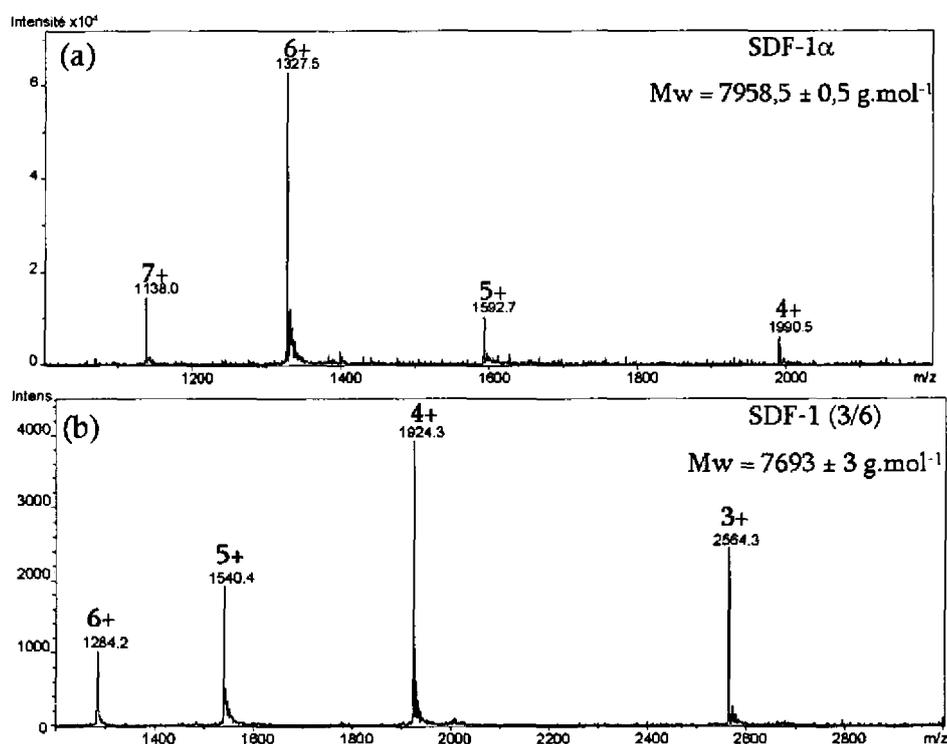


Figure 51 : Spectres de SDF-1 α et SDF-1 (3/6) obtenus par CZE-MS

(a) SDF-1 α 15 μM et (b) SDF-1 (3/6) 15 μM

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., $L=98 \text{ cm}$, $l=21.5 \text{ cm}$. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 30 s.

Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L.min}^{-1}$. Masse cible^y 2500 m/z .

Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

^y La masse cible (masse cible) correspond à une commande du logiciel esquire control (Bruker) permettant, grâce à une combinaison de paramètres prédéfinis, de stabiliser les ions dans une gamme de m/z donnée.

Différents liquides additionnels ont été envisagés, notre choix s'est porté sur le mélange eau-méthanol (90 : 10, v/v) permettant d'établir un spray stable et de détecter les protéines avec le meilleur rapport signal / bruit. Le méthanol, déjà utilisé en CE-MS pour l'observation de complexes protéiques non covalents, n'apparaît pas dénaturant s'il est utilisé à des proportions inférieures à 50%. [198] Les spectres obtenus avec les mêmes quantités de protéines injectées diffèrent en deux points : l'intensité du signal et les états de charge observés. En effet, le spectre de la protéine mutée (Figure 51b) est 15 fois moins intense que celui de SDF-1 α (Figure 51a), et les états de charges observés pour SDF-1 (3/6), 6+ à 3+, sont légèrement plus faibles que ceux observés pour SDF-1 α , 7+ à 4+. Ce résultat est cohérent avec la substitution de résidus basiques situés en surface de SDF-1 (3/6) par des résidus neutres. En effet, la distribution des états de charges d'une protéine ionisée par électrospray en conditions non dénaturantes peut être corrélée au nombre de sites protonables à sa surface. [211]

Les masses mesurées sont en bon accord avec les masses théoriques des deux protéines :

- SDF-1 α : $M \approx 7958,5 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{\text{théorique}} = 7958,3 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un écart de $0,2 \text{ g.mol}^{-1}$
- SDF-1 (3/6) : $M \approx 7693 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{\text{théorique}} = 7698,0 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un écart de 5 g.mol^{-1}

II-2.2 Analyses de SDF-1 α par ACE-MS

Par comparaison avec l'étude par cristallographie du dimère de SDF-1 α en présence d'héparine [62], nous avons réalisé l'analyse de SDF-1 α en présence du même disaccharide hepIS (Figure 52).

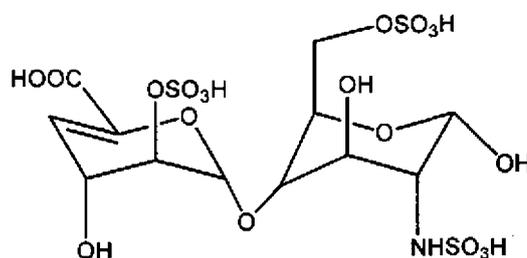


Figure 52 : Structure du disaccharide IS

L'électrophérogramme obtenu pour l'analyse de SDF-1 α en présence de disaccharide d'héparine présente un pic dédoublé dont le temps de migration est très proche de celui de la protéine. Le courant d'ion obtenu ne présente qu'un large pic qui, une fois intégré, donne le spectre de masse présenté ici (Figure 53).

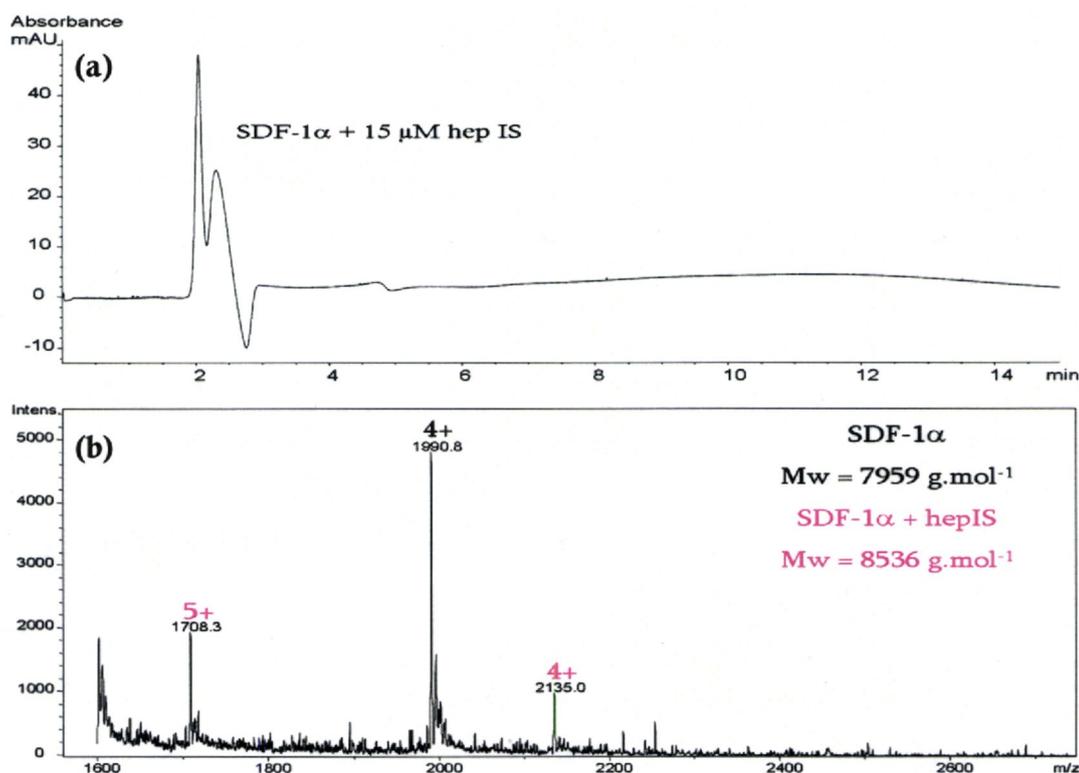


Figure 53 : Analyse SDF-1 α en présence d'hepIS obtenus par ACE-MS

(a) électrophérogramme (b) spectre de masse

Capillaire tapissé de PEO, 50 μ m d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant 15 μ M d'hepIS, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 50 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 60 s de SDF-1 α 15 μ M. Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 μ L.min⁻¹.

Masse cible 2500 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Le seul complexe observé entre SDF-1 α et le disaccharide hepIS est de stœchiométrie 1/1, aucun dimère de protéines n'a été observé par MS. Afin d'améliorer la sensibilité des ions détectés correspondant au complexe, l'acquisition de ce spectre de masse a été réalisée sur une gamme de m/z plus réduite que précédemment (de 1600 à 2800 m/z au lieu de 1200 à 3000 m/z).

Ce résultat ne permet pas d'infirmer l'hypothèse selon laquelle l'hepIS pourrait promouvoir la dimérisation de SDF-1 α . Le dimère de SDF-1 α , s'il existe, n'est probablement pas assez stable pour être observé dans ces conditions d'analyse. Rappelons que la constante de dimérisation de SDF-1 α en présence de disaccharide d'héparine est de l'ordre de 170 μ M[72] et que la plupart des complexes non covalents observés par MS ont des constantes de dissociations de l'ordre du μ M. Des conditions plus douces d'ionisation ont été testées. L'utilisation d'eau ou de tampon acétate, à la place des 10% de méthanol contenus dans le liquide d'appoint, n'a pas permis de mieux observer ces complexes non covalents. Au contraire, ces dernières conditions n'ont eu pour effet qu'une diminution globale du signal. L'abaissement de la température de la source de 100°C à 80°C n'a eu pour effet que de déstabiliser le spray.

Les essais suivants ont été réalisés avec des oligosaccharides de masse supérieure au disaccharide, issus de la dégradation d'énoxaparine : le tetrasaccharide enox4 et l'hexasaccharide enox6 (Figure 54).

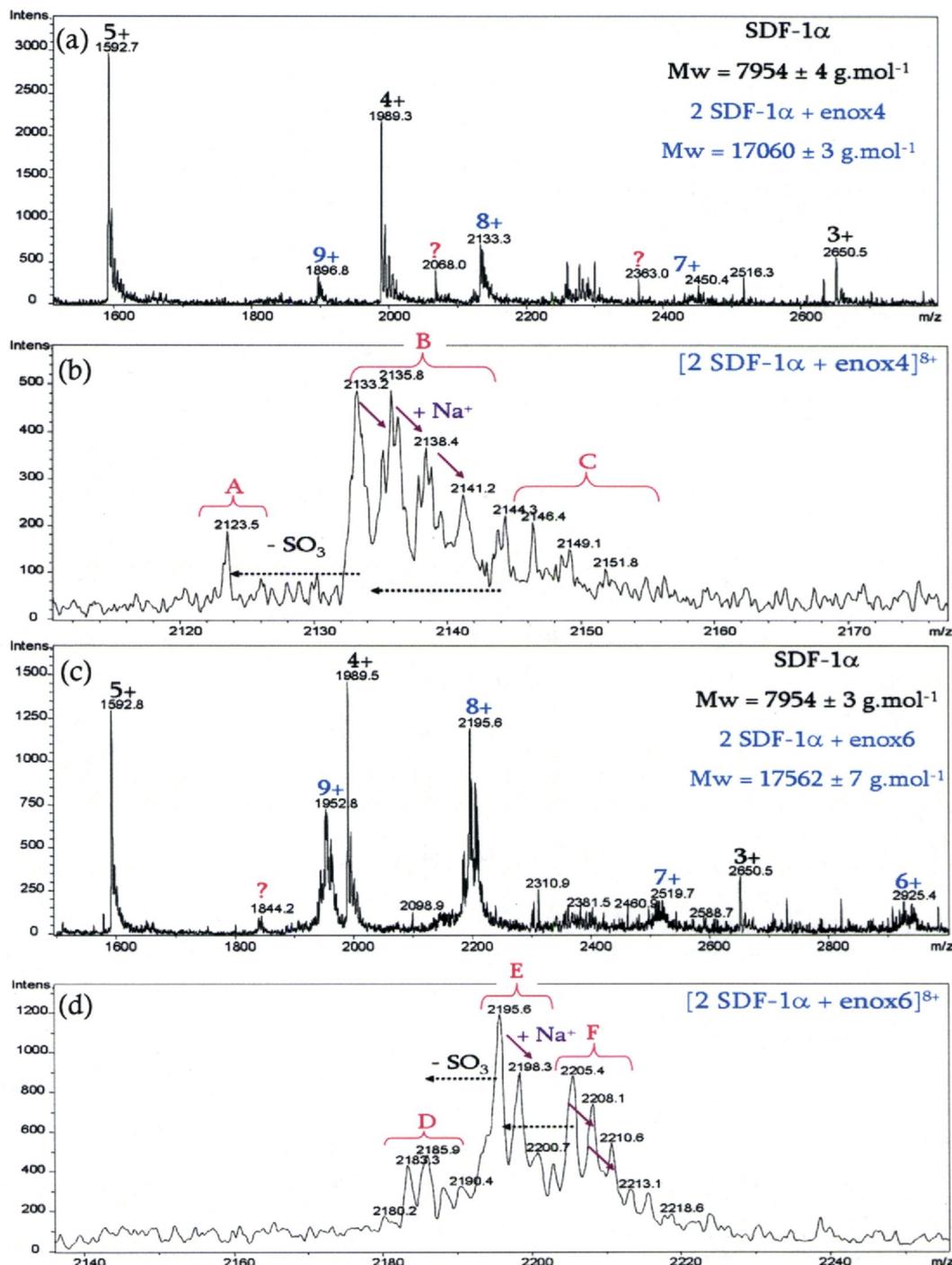


Figure 54 : Spectres de SDF-1 α en présence d'énoxaparines obtenus par ACE-MS

(a) ajout de 3 μM d'énox4 dans l'électrolyte de séparation, (b) = agrandissement de (a)
 (c) ajout de 1 μM d'énox6 dans l'électrolyte de séparation, (d) = agrandissement de (c)
 Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant de l'énoxaparine, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 50 mbar, température 25°C.
 Injection 50 mbar 60 s de SDF-1 α 15 μM . Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L.min}^{-1}$.
 Masse cible 3000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Dans les deux cas, de nouvelles espèces ont été détectées à des temps de migration supérieurs à celui de la protéine seule.

La présence d'eno4 dans l'électrolyte a pour effet de retarder la migration de SDF-1 α , effet déjà mis en évidence par ACE pour l'eno6 (cf. Figure 48 page 95). Cet effet coïncide avec la détection par MS de nouveaux ions correspondant à une espèce moléculaire de 17060 ± 3 g.mol⁻¹ (Figure 54a), soit la masse d'un complexe non covalent formé de deux protéines associées à une molécule d'eno4. Nous pouvons observer sur l'agrandissement de l'ion 8+ de ce complexe (Figure 54b) la présence de nombreux adduits Na⁺, mais également un ion dont l'écart de masse calculé à 80 *m/z* correspond à un groupement sulfate. Ces ions suggèrent la présence d'au moins trois complexes (A, B et C) formés par l'association de SDF-1 α avec des molécules d'eno4 dont les structures diffèrent par un groupement sulfate. Rappelons que les fractions d'eno4 utilisées sont hétérogènes en structure.

La présence d'eno6 dans l'électrolyte a également pour conséquences le retard de migration de SDF-1 α et l'apparition d'une nouvelle espèce moléculaire. Cette nouvelle espèce, de 17562 ± 7 g.mol⁻¹ (Figure 54c), pourrait ici correspondre à un complexe non covalent également formé de deux protéines associées à une molécule d'eno6. Nous pouvons observer sur l'agrandissement de l'ion 8+ de ce complexe (Figure 54d) la présence d'au moins trois ions (D,E et F) correspondant à des complexes formés avec des molécules, d'eno6 possédant un nombre croissant de groupement sulfate.

A partir des masses de ces complexes, nous avons pu estimer plus précisément les masses des oligosaccharides liés et envisager des structures (Figure 55). Les structures données ci-dessous ne sont qu'illustratives, à ce stade de notre étude, rien ne nous permet d'identifier avec certitude les positions des différents groupements fonctionnels.

L'oligosaccharide donnant les ions de complexe de plus grande intensité (B) correspond pour eno4 à une masse de 1154 ± 8 g.mol⁻¹, soit une molécule possédant probablement 6 groupements sulfate. Les oligosaccharides formant les complexes les moins intenses possèdent probablement 5 (A) et 7 (C) groupements sulfate. En ce qui concerne l'eno6, la masse de 1654 ± 10 g.mol⁻¹, calculée pour les ions les plus intenses (E), correspond à molécule possédant probablement 8 groupements sulfate. Les complexes de plus faible intensité sont également observés avec des molécules d'eno6 possédant probablement 7 (D) et 9 (F) groupements sulfate.

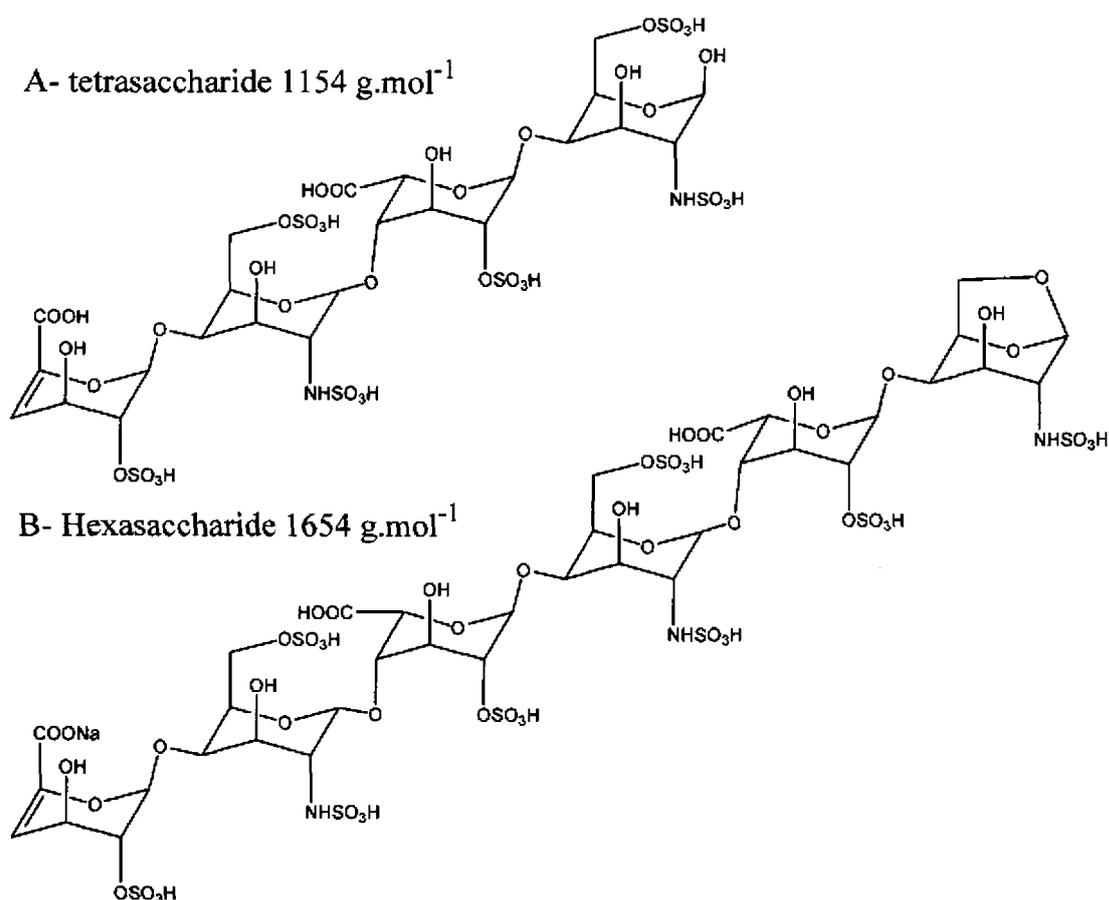


Figure 55 : Structures d'oligosaccharides d'énoxaparine

L'hypothèse émise quant à la dimérisation de SDF-1 α en présence d'héparine (ici des oligosaccharides d'énoxaparine) semble vérifiée. La taille des oligosaccharides influe sur la stabilité des complexes formés. Plus ils sont longs, plus le complexe est stable. En effet, aucun complexe n'a pu être observé par cette méthode avec le disaccharide hepIS. Par contre, le tetrasaccharide et l'hexasaccharide ont permis de mettre en évidence des dimères SDF-1 α / oligosaccharide de stœchiométrie 2/1.

Les interactions entre chimiokines et oligosaccharides ont essentiellement été étudiées avec des GAG. Dans un but comparatif, nous avons également fait des essais avec un autre type de saccharide : le fucoïdane.

Ce polysaccharide d'origine marine, principalement extrait d'algues brunes, est constitué d'unités L-fucose liées par des liaisons $\alpha(1-3)$ et/ou $\alpha(1-4)$. Le fucoïdane est capable de bloquer certaines cascades biologiques comme celles de la coagulation [212] et du système du complément [213]. Cette action biologique résulte de sa capacité à interagir avec des cibles protéiques. De nombreuses études sont actuellement menées en vues d'applications thérapeutiques. L'interaction entre des chimiokines (l'interleukine -2, l'interleukine-7 et l'interféron- γ) et le fucoïdane a déjà été

envisagée par une étude *in vitro* montrant une activité inhibitrice supérieure du fucoïdane par rapport à l'héparine.[50]

Pour cette étude, nous avons utilisé un pentasaccharide de synthèse (pentaful), molécule possédant 7 groupements sulfate ($M = 1420,12 \text{ g.mol}^{-1}$, Figure 56). Soit un oligosaccharide de taille intermédiaire aux fragments d'héparine précédemment utilisés, avec un degré de sulfatation comparable.

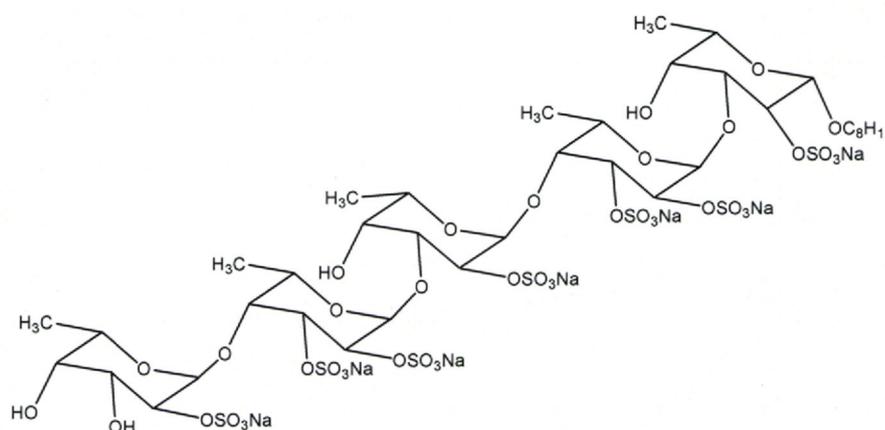


Figure 56 : Structure du pentasaccharide de fucane (pentaful)
Synthèse [214]

La présence de pentaful dans l'électrolyte a également pour conséquence le retard de migration de SDF-1 α . Cette fois, deux nouvelles espèces ont pu être observées (Figure 57), l'une correspond à un complexe de masse $M = 9379 \pm 5 \text{ g.mol}^{-1}$ formé par une protéine associée à une molécule de pentaful, et l'autre à un complexe de masse $M = 17329 \pm 9 \text{ g.mol}^{-1}$ formé par deux protéines associées à une molécule de pentaful.

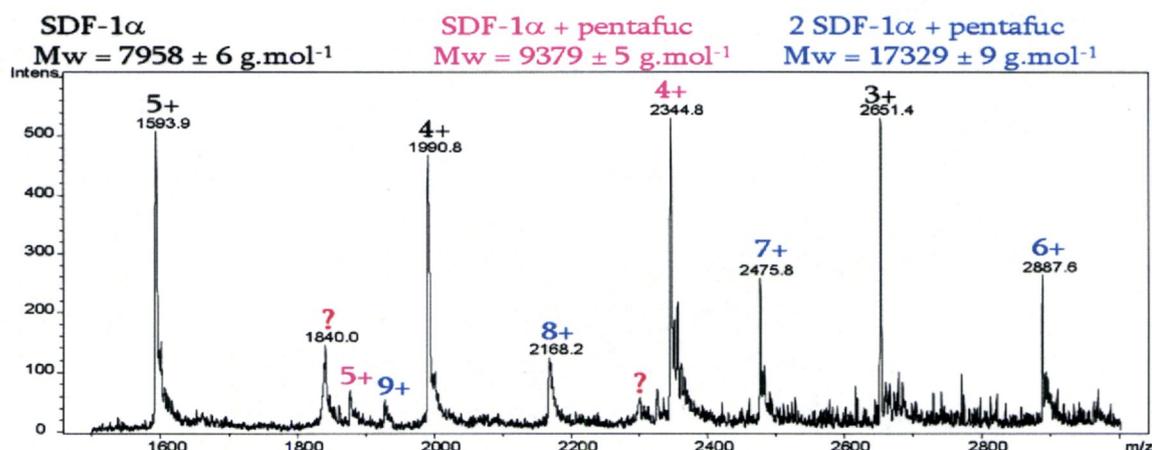


Figure 57 : Spectre de SDF-1 α en présence de pentasaccharide de fucoïdane obtenus par ACE-MS

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant 3 μM de pentaful, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 50 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 60 s de SDF-1 α 15 μM . Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Masse cible 3000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

L'existence de ces deux espèces en solution reste néanmoins discutable puisque l'électrophérogramme ne laisse apparaître qu'un seul pic. Il semble assez peu probable que ces deux espèces migrent au même temps, étant donné leur différence de masse (incrément de 45%) et leur différence de charge. Par contre, une dissociation en source pourrait être une explication si l'on suppose que la stabilité du complexe SDF-1 α / pentaful de stœchiométrie 1/1 est plus grande qu'elle ne l'est pour le complexe de stœchiométrie 2/1.

Bien que des différences soient observées entre les résultats obtenus avec les enoxaparines et le fucoïdane, nous avons montré que le fucoïdane, qui n'est pas un GAG, est également capable de complexer et de promouvoir la dimérisation de SDF-1 α . Le fucoïdane est donc *a priori* susceptible de moduler l'action biologique de SDF-1 α .

II-2.3 Analyses de SDF-1 (3/6) par ACE-MS

Les analyses par CE n'avaient montré qu'une très faible modification de la mobilité de SDF-1 (3/6) en présence d'eno6. Nous avons voulu compléter ces résultats par ACE-MS. Dans les mêmes conditions que celles qui ont permis d'observer des dimères de SDF-1 α , aucun complexe n'a pu être observé avec la protéine mutée en présence d'eno6 (Figure 58a) ou de fucoïdane (Figure 58b).

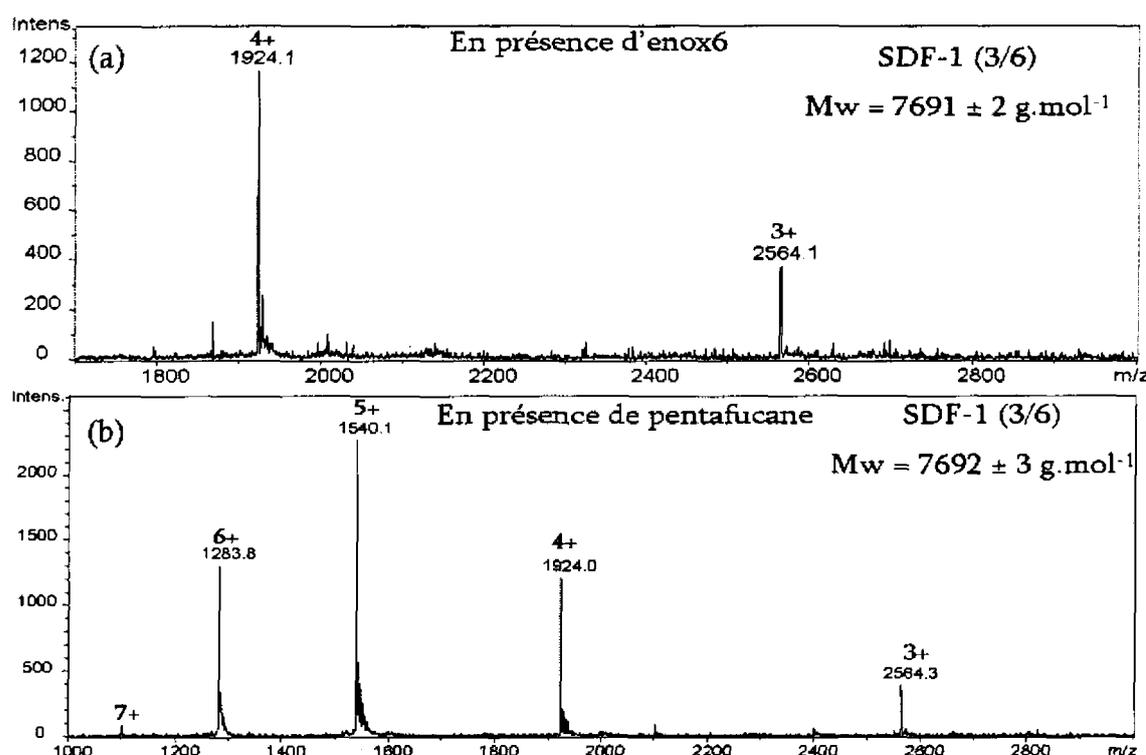


Figure 58 : Spectres de SDF-1 3/6 en présence d'oligosaccharides obtenus par ACE-MS

(a) ajout de 3 μ M d'eno6 dans l'électrolyte de séparation

(b) ajout de 3 μ M de pentafulcane dans l'électrolyte de séparation

Capillaire tapissé de PEO, 50 μ m d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 50 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 60 s de SDF-1 3/6 15 μ M. Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 μ L.min⁻¹.

Masse cible 3000 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Ce résultat permet une fois de plus de confirmer l'importance des résidus [Lys 24, His25 et Lys27], ici substitués par des résidus serine, dans la liaison aux oligosaccharides et la formation d'oligomères. De plus, cette analyse nous permet de valider notre approche de couplage ACE-MS. En effet, malgré la présence de ligands potentiels dans la totalité du capillaire de séparation, aucun adduit non-spécifique entre SDF-1 (3/6) et les oligosaccharides n'a été observé aux concentrations testées.

III OLIGOMERISATION DE MCP-1

La chimiokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1 / CCL2) intervient lors de réactions inflammatoires et dans certaines pathologies du système nerveux central. La stœchiométrie hypothétique du complexe MCP-1 / héparine est 2/2.

La chimiokine MCP-1 possède également la propriété d'interagir avec des GAG[52] avec une affinité de l'ordre de 1,5 μM pour l'héparine. [74, 75] Les résidus susceptibles de jouer un rôle lors de cette interaction sont [Arg18, Lys19, Arg24, Lys49 Lys 58, His 66].[56]

Cette chimiokine est susceptible de former des dimères protéiques en solution. Des études réalisées par cristallographie et ultracentrifugation analytique ont également suggéré l'existence de tétramères protéiques dont la formation pourrait être promue par un octasaccharide d'héparine. D'après les calculs effectués par modélisation moléculaire, le dimère MCP-1 / héparine serait de stœchiométrie 2/2, celle du tétramère reste à déterminer.[75]

Une récente étude par MS a permis de mettre en évidence la formation de dimère de protéine en absence d'héparine, ainsi que la formation de complexes MCP-1 / héparine de stœchiométries 1/1 et 2/1 en présence de pentasaccharide d'héparine octasulfate. La stœchiométrie 2/2 n'a pu être observée qu'avec un disaccharide octasulfate, aucun tétramère n'a été détecté.[77]

III-1 ÉTUDES PRELIMINAIRES DE MCP-1 PAR ACE

Afin d'identifier les oligosaccharides susceptibles de former des complexes avec MCP-1, différentes analyses ont été réalisées en ACE. Un criblage des oligosaccharides a été effectué avec les fractions d'enoxyparine (enox4 et enox6) et le pentasaccharide de fucoïdane (pentaful). Ces quatre analyses ont été effectuées le même jour, avec la même aliquot de protéine et la même solution de marqueur neutre (MN).

La protéine a donc été injectée dans un capillaire tapissé de PEO conditionné avec l'électrolyte seule (Figure 59a) ou contenant des oligosaccharides (Figure 59b, c et d). En l'absence d'oligosaccharide, le pic correspondant à MCP-1 est détecté bien avant le marqueur neutre, du fait du caractère cationique de la protéine : $\mu_{ep, MCP-1} = 10.10^{-5} \text{cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$. Comme pour

SDF-1 α , l'ajout d'oligosaccharide provoque un décalage du pic détecté vers le marqueur neutre. D'après ces électrophérogrammes, MCP-1 interagit avec enox4, enox6 et pentafulc pour former des complexes globalement peu chargés (Figure 59).

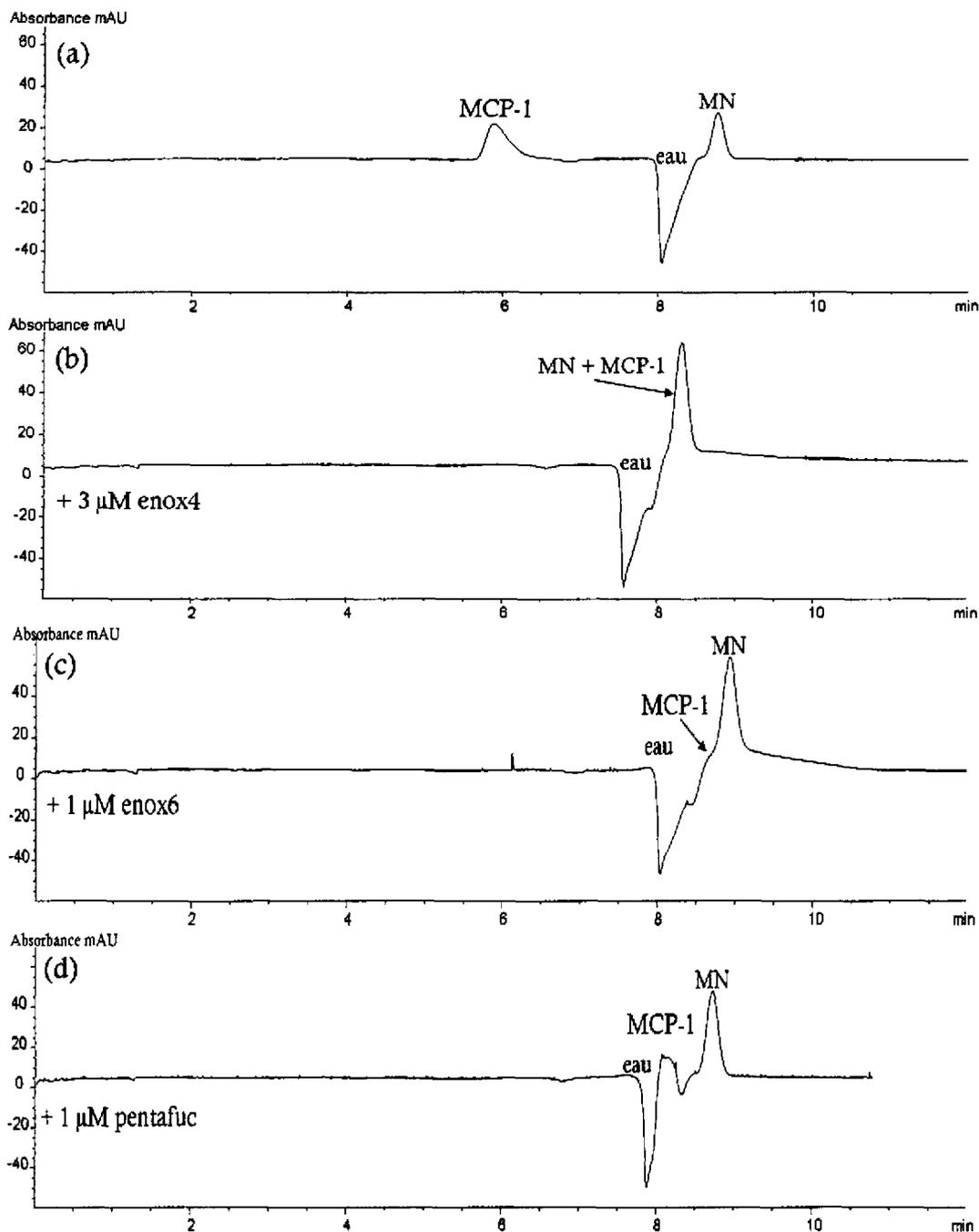


Figure 59 : Electrophérogrammes de MCP-1 en présence d'oligosaccharides obtenus par ACE

(a) témoin (b) ajout de 3 μM d'eno4 dans l'électrolyte (c) ajout de 1 μM d'eno6 dans l'électrolyte

(d) ajout de 1 μM de pentafulc dans l'électrolyte

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=34 cm, l=25,5cm (UV 200 nm).

Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +8 kV ; pression + 15 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 10 s de MCP 15 μM . MN = marqueur neutre

En ce qui concerne les enoxaparines (Figure 59b et c), le pic correspondant à la protéine probablement complexée est confondu avec le pic de marqueur neutre. L'intensité du pic correspondant au MN est d'environ 28 mAU en l'absence d'oligosaccharide alors qu'elle est d'environ 60 mAU en présence d'enoxyparine. Pour le fucoïdane, un nouveau pic apparaît entre celui de l'eau et le pic correspondant au MN, mais on peut également remarquer que le pic correspondant au MN est plus intense qu'en l'absence d'oligosaccharide (environ 50 mAU au lieu de 28 mAU).

III-2 ANALYSES DE MCP-1 PAR CE-MS

III-2.1 Détection de MCP-1

Le spectre de masse de MCP-1 a été réalisé, dans les mêmes conditions que SDF-1, par couplage CE-MS avec un capillaire tapissé de PEO et un liquide additionnel composé d'eau-méthanol (90 : 10, v/v).

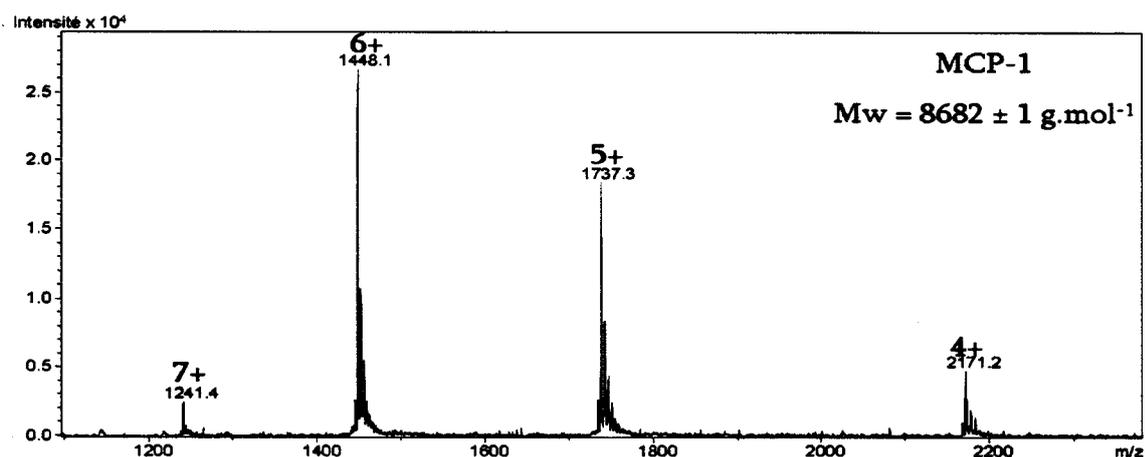


Figure 60 : Spectre de MCP-1 obtenu par ACE-MS

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 30 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 60 s de MCP-1 20 μM . Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Masse cible 2500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Le spectre obtenu (Figure 60) permet de calculer une masse $M = 8682 \pm 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ en bon accord avec la masse théorique MCP-1, $M_{\text{théorique}} = 8685,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, soit un écart de 3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

III-2.2 Analyses de MCP-1 par ACE-MS

Comme pour SDF-1 α , le disaccharide hep IS ne nous a pas permis d'observer de dimères de MCP-1 (Figure 61). L'électrophérogramme (non représenté ici) obtenu pour cette analyse n'a pas montré de modification du pic de migration de MCP-1 en présence d'hepIS, alors qu'il avait montré un dédoublement du pic de SDF-1 α (cf. Figure 53a page 100).

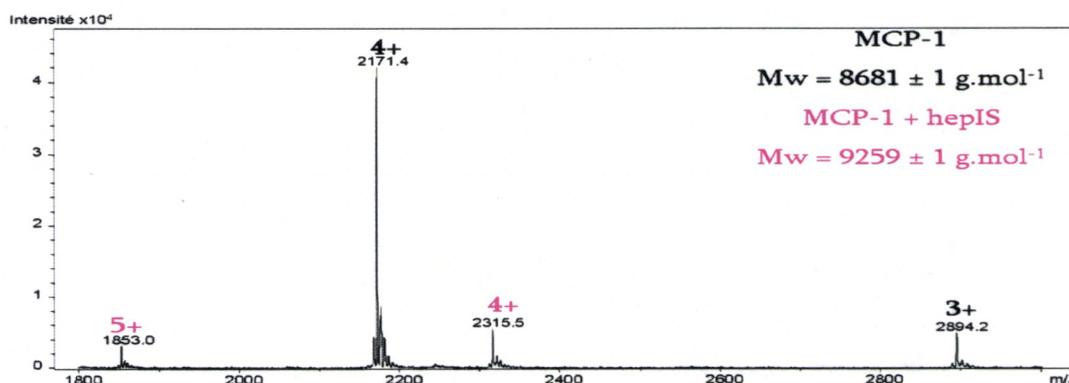


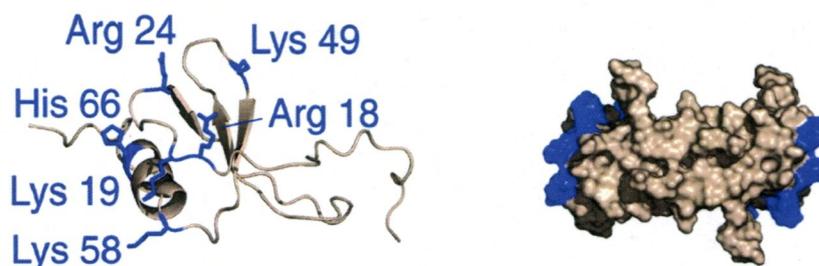
Figure 61 : Spectre de MCP-1 en présence de disaccharide d'héparine obtenu par ACE-MS

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant 20 μM d'hepIS, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 30 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 60 s de MCP-1 20 μM . Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Masse cible 3500 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Le seul complexe observé est de masse $M = 9259 \pm 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, correspondant également à une association de stœchiométrie 1/1. D'après les études réalisées par modélisation moléculaire, la dimérisation de SDF-1 α résulterait de l'insertion d'un saccharide sulfaté entre les deux protéines[70], tandis que l'association de deux MCP-1 serait quant à elle provoquée par une modification conformationnelle induite par la liaison des oligosaccharides (Figure 11).[75] Bien que les mécanismes d'association ne soient pas les mêmes, un fragment de la taille d'un disaccharide, ici trisulfaté, semble insuffisant à la promotion de l'oligomérisation des chimiokines étudiées.



Extrait de la Figure 11 : Modélisation de l'interaction MCP-1 / héparine

(a) : formation d'un dimère. A gauche : structure d'une chaîne protéique, à droite : surface moléculaire du dimère. Les zones bleues correspondent aux résidus basiques de la protéine susceptibles d'interagir avec l'héparine. D'après [55, 75]

L'analyse de MCP-1 après ajout d'enoX4 (Figure 62a) ou d'enoX6 (Figure 62b) dans l'électrolyte permet de mettre en évidence deux nouvelles espèces.

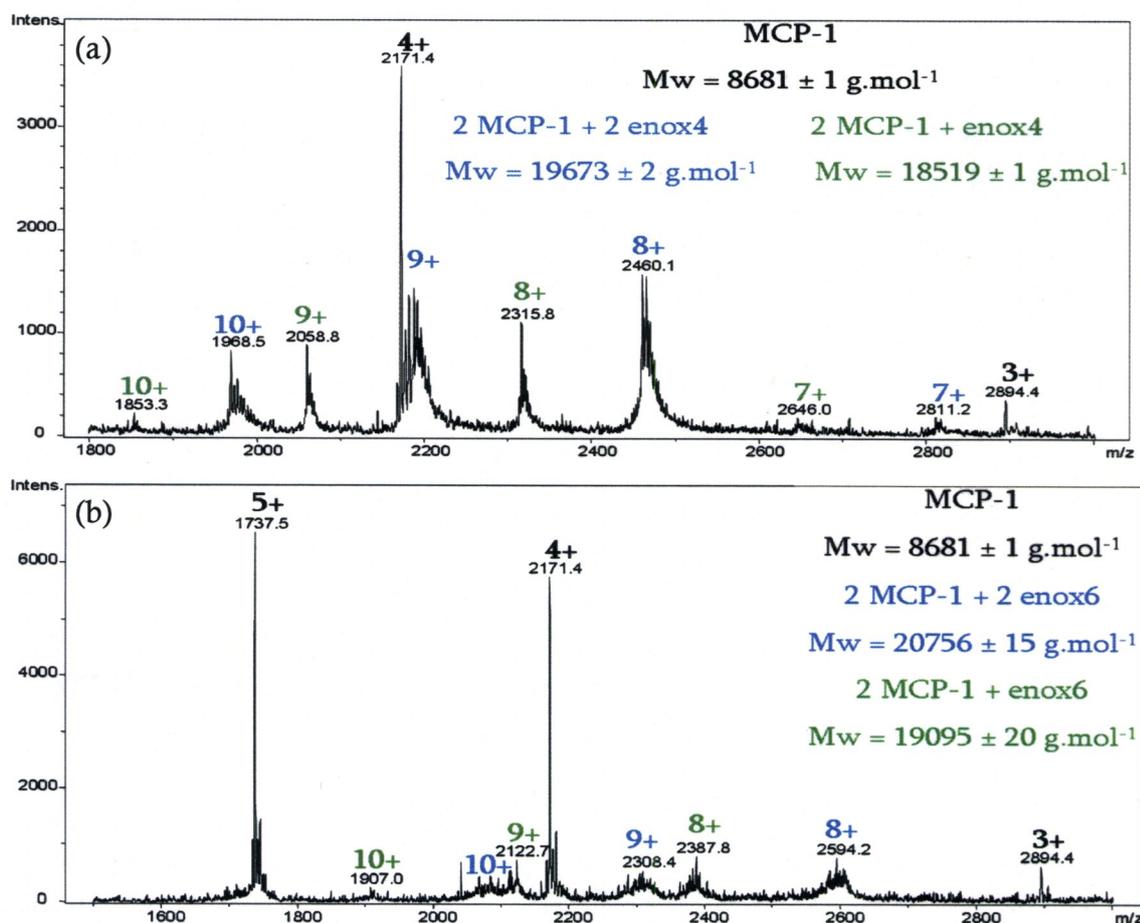


Figure 62 : Spectres de MCP-1 en présence d'enoXaparines obtenus par ACE-MS

(a) ajout de 10 μM d'enoX4 dans l'électrolyte de séparation

(b) ajout de 10 μM d'enoX6 dans l'électrolyte de séparation

Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant de l'enoXaparine, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 30 mbar, température 25°C.

Injection 50 mbar 60 s de MCP-1 20 μM . Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Masse cible 2500 m/z . Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

L'espèce de plus faible masse, que ce soit pour enox4 ($M = 18519 \pm 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ou enox6 ($M = 19095 \pm 20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), correspond à l'association de deux protéines à un seul oligosaccharide. L'espèce de plus haute masse, que ce soit pour enox4 ($M = 19673 \pm 2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ou enox6 ($M = 20756 \pm 15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), correspond à l'association de deux protéines avec deux oligosaccharides. Ce deuxième complexe de stoechiométrie 2/2 correspond à celui décrit dans la littérature.[75]

L'utilisation de pentafluorure a également permis d'observer le complexe 2/1 de masse $M = 18784 \pm 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et le complexe 2/2 de masse $M = 20209 \pm 4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figure 63).

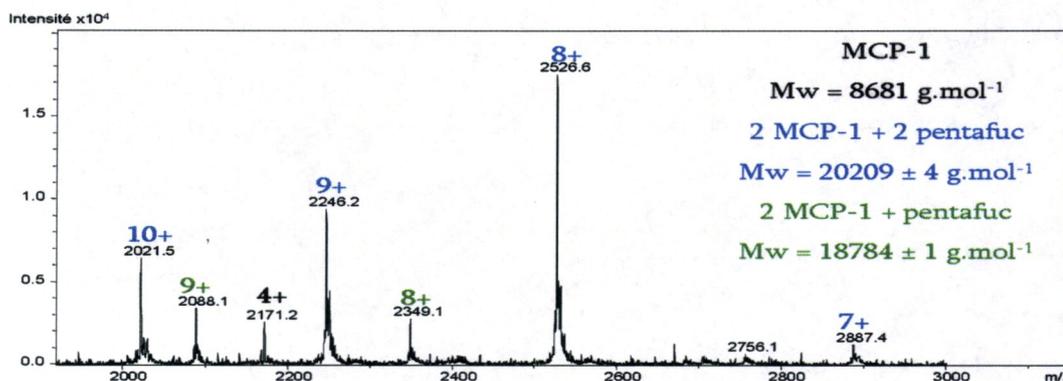


Figure 63 : Spectre de MCP-1 en présence de pentasaccharide de fucoïdane obtenu par ACE-MS

Capillaire tapissé de PEO, 50 µm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant 20 µM de pentafulc, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 30 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s de MCP-1 20 µM. Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 µL.min⁻¹. Masse cible 2500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

L'existence de complexes MCP-1 / oligosaccharides de stœchiométrie 2/2 a pu être confirmée par notre méthode. Par contre celle du tétramère, dont la stœchiométrie n'est pas déterminée reste un challenge analytique. L'analyse de MCP-1 en présence d'enoX6 a donc également été réalisée en mode étendu dans le but d'observer des espèces de plus haut poids moléculaires (Figure 64) : à la masse de quatre MCP-1 (soit environ 34,7 kg.mol⁻¹) devrait s'ajouter un ou plusieurs oligosaccharides.

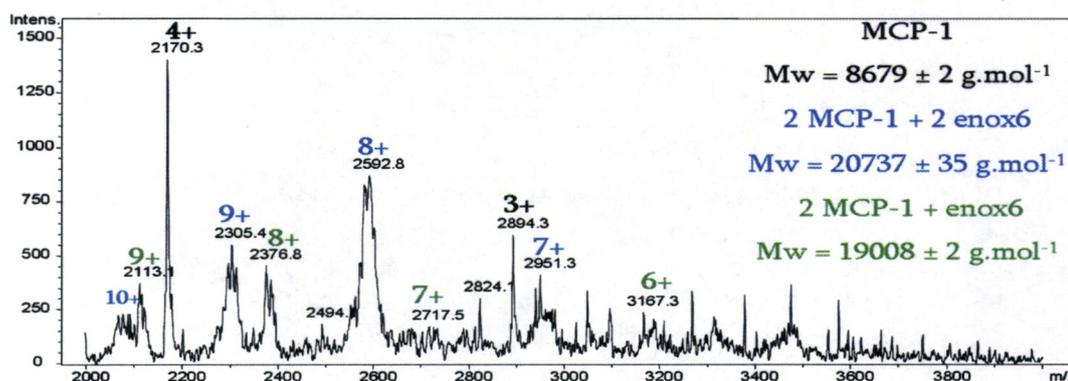


Figure 64 : Spectre de MCP-1 en présence d'hexasaccharide d'enoXaparine obtenus par ACE-MS

Capillaire tapissé de PEO, 50 µm d.i., L=98 cm, l=21.5cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant de 20 µM d'enoX6, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 30 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s de MCP-1 20 µM. Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 µL.min⁻¹. Masse cible 3000 m/z (mode étendu). Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C.

Ce mode d'analyse a permis de mieux distinguer les deux complexes, 2/1 et 2/2, déjà mis en évidence précédemment, mais aucune autre espèce. Bien qu'aucune expérience n'ait pu déterminer la stœchiométrie d'un tétramère, il semblerait que la taille minimale nécessaire de l'oligosaccharide soit un octasaccharide et que des chaînes plus longues favoriseraient sa formation.[75]

La résolution plutôt moyenne des spectres obtenus pour l'analyse de l'interaction MCP-1 / enox6, inhérente à l'analyseur utilisé, laisse entrevoir la limite de notre méthode pour l'étude d'oligosaccharides de plus grandes masses. Nous avons tout de même fait quelques essais avec un décasaccharide d'enoxaparine (enox10) de masse approximative comprise entre 1945 et 3335 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les spectres de masse obtenus n'ont pas permis d'identifier de complexes, seule une diminution de l'intensité des pics de MCP-1 a pu être observée. Par contre, la détection UV dans le capillaire de séparation laisse apparaître, en plus du décalage du pic de protéine, un nouvel épaulement (Figure 65) Il semblerait donc que l'association MCP-1/enox10, bien qu'elle ne soit pas détectée par MS, donne au moins deux complexes en solution.

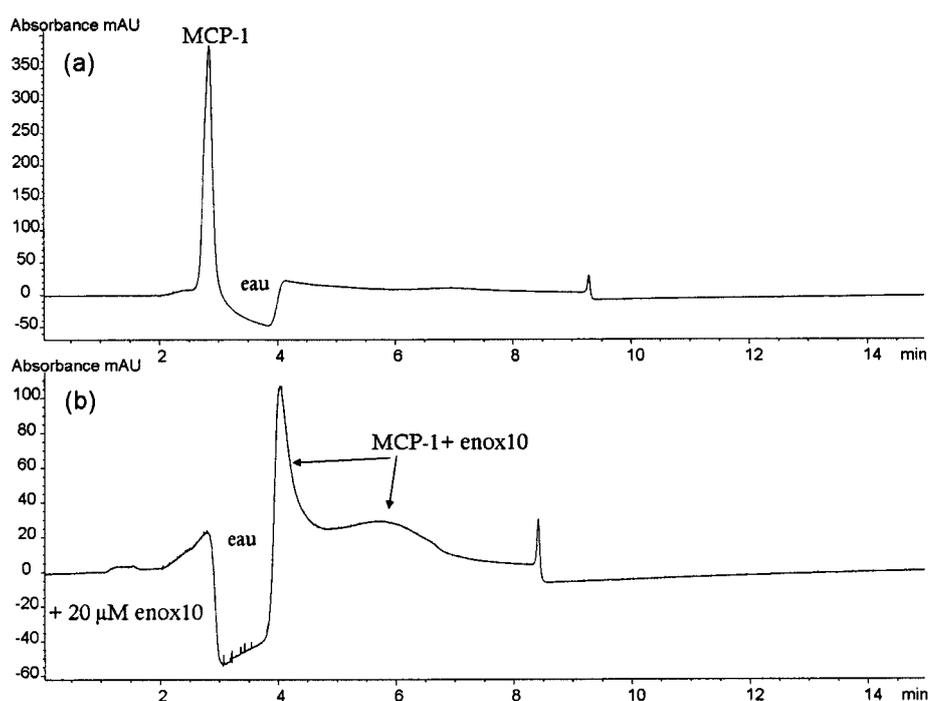


Figure 65 : Electrophérogrammes de MCP-1 en présence ou non de décasaccharide d'enoxaparine obtenus par ACE-MS

(a) témoin MCP-1, (b) ajout de 20 μM d'enox10 dans l'électrolyte
 Capillaire tapissé de PEO, 50 μm d.i., L=98 cm, l=21.5cm (UV 200 nm). Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6.5 ; voltage +10 kV ; pression + 30 mbar, température 25°C.
 Injection 50 mbar 60 s de MCP-1 20 μM . Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.
 Nébulisation 5 psi, séchage 3 L/min à 100°C. NB : les échelles en ordonnée ne sont pas les mêmes.

IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le couplage ACE-MS nous a permis de mettre en évidence la formation de dimères de chimiokines en présence d'oligosaccharide sulfatés.

Aucun oligomère de chimiokine en présence de disaccharide d'héparine (3 sulfates) n'a été observé. Nous avons par contre pu confirmer les stœchiométries théoriques 2/1 des complexes SDF-1 α / héparine et 2/2 des complexes MCP-1 / héparine par l'utilisation de tetrasaccharide et d'hexasaccharide d'enoxaparine. La stœchiométrie 2/1 a également été observée pour les complexes MCP-1 / héparine. L'absence de complexation de la chimiokine mutée, SDF-1 (3-6), confirme l'importance des résidus mutés dans l'interaction avec les oligosaccharides sulfatés. De plus, bien que les oligosaccharides soient présents dans la totalité du capillaire de séparation, aucun adduit non spécifique n'a été observé entre la chimiokine mutée et les oligosaccharides.

Le pentasaccharide de fucoïdane est également apparu comme un oligosaccharide capable de promouvoir la dimérisation des chimiokines. Différentes stœchiométries ont été observées : 1/1 et 2/1 pour les complexes SDF-1 α / pentafuc, et 2/1 et 2/2 pour les complexes MCP-1 / pentafuc. Pour comparer l'affinité du pentafuc par rapport aux fractions d'enoxaparine, des expériences de compétitions, dans lesquelles les deux types d'oligosaccharide seraient présents dans le capillaire de séparation sont à envisager et aisément réalisables par la méthode développée.

La taille minimale des oligosaccharides permettant la dimérisation des chimiokines semble être un tetrasaccharide possédant au moins 5 groupements sulfate. Mais, il apparait important de déterminer si la modulation biologique des effets des chimiokines est réellement effective avec un tetrasaccharide.

En ce qui concerne la chimiokine MCP-1, nous avons supposé que le complexe 2/1 pouvait être un fragment du complexe 2/2. Cette hypothèse pourrait être validée par la réalisation d'échanges H/D suivis d'une analyse MS. Cette méthode permet l'identification des sites de surfaces de la protéine accessible au solvant. La comparaison des spectres obtenus en présence ou non d'oligosaccharides permettrait de localiser leurs sites de fixation à la protéine et de déterminer le mode d'association des protéines entre elles. L'échange H/D a déjà été envisagé en couplage CE-MS pour l'analyse de petites molécules.[215] Cette méthode reste néanmoins difficile à mettre en œuvre pour des protéines.

L'observation de tétramères ou octamères de MCP-1 n'a pas pu être réalisée par la méthode utilisée. Soit parce que ces oligomères sont trop labiles, soit parce que leur taille est trop importante pour qu'ils puissent être observés par MS avec une trappe d'ions. Si l'on considère que l'épaule observé lors de l'utilisation du décasaccharide correspond à l'un de ces macro-complexes, une optimisation des conditions de séparation électrophorétique est à envisager. L'ionisation, et donc la détection MS, de ce macro-complexe non covalent donnera vraisemblablement lieu à des modifications de la méthode actuellement utilisée.

CONCLUSIONS GENERALES

ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés au couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS) pour l'étude de complexes protéines / saccharides. Les voies de recherche qui ont motivé ces travaux concernent le développement analytique de la méthode et l'intérêt de cette approche en glycobiochimie.

Les applications principales du couplage CE-MS concernent actuellement l'analyse de petites molécules par électrophorèse capillaire en mode zone. Nous nous sommes intéressés, dans une première partie, à une nouvelle stratégie de couplage utilisant l'électrophorèse capillaire en mode frontal pour l'étude d'interactions non covalentes.

L'électrophorèse capillaire, en mode frontal, assure une séparation des différents analytes (ici l'antithrombine complexée ou non avec l'héparine) et la spectrométrie de masse permet leur identification. Nous avons montré la compatibilité du mode frontal avec la détection par spectrométrie de masse, ce mode est apparu plus sensible que le mode zone en couplage CE-MS. Cette stratégie, validée par l'utilisation d'un pentasaccharide de synthèse, a ensuite été appliquée à des fractions d'héparine hétérogènes. Dans ce dernier cas, la formation des complexes non covalents a pu être observée, en conditions non dénaturantes, permettant une détermination de la stoechiométrie du complexe et la masse du ligand. Les interactions non covalentes sont maintenues et les complexes formés à partir d'échantillons hétérogènes peuvent être détectés. Cependant, nous nous sommes heurtés à des limites liées à l'analyseur utilisé (trappe d'ions), en termes de résolution et en sensibilité à hauts rapports m/z . Les complexes formés sont bien caractérisés pour le pentasaccharide de synthèse, mais pas suffisamment pour les fractions hétérogènes de plus hautes masses. L'amélioration de la résolution des spectres de masse obtenus pourrait être apportée par l'utilisation d'analyseurs plus adaptés à l'étude de macro-complexes non covalents, par exemple un analyseur à temps de vol (TOF).

L'analyse de ligands saccharidiques hétérogènes est facilitée lorsque les éléments liés et non liés sont séparés avant l'analyse par spectrométrie de masse.

Dans ce domaine, différentes stratégies analytiques ont été reportées dans la littérature. Une première méthode basée sur le greffage de protéines (dont l'antithrombine) sur une plaque

métallique a permis d'isoler les ligands et de les analyser par MALDI.[216] Cette méthode possède l'inconvénient principal d'avoir à réaliser le greffage de la protéine et donc la possibilité d'induire des artefacts lors de l'interaction avec les oligosaccharides. Plus récemment une autre méthode a consisté à immobiliser des chimiokines sur des colonnes hydrophobes assurant, par simple filtration, une élimination des oligosaccharides non liés.[77] Bien que cette méthode perturbe les équilibres thermodynamiques, les complexes maintenus ainsi que les ligands isolés ont pu être analysés par FT-ICR.

Mettant en œuvre la stratégie précédemment décrite, ce couplage a pu être adapté à la détection des ligands hépariniques. Pour cela, la composition du liquide additionnel, liquide assurant la jonction entre l'électrophorèse capillaire et le spectromètre de masse, a été modifiée. En effet, si l'utilisation d'un tampon aqueux non dénaturant permet d'observer les complexes intacts, l'utilisation d'un solvant organique dénature les complexes et permet par conséquent la détection des ligands dissociés.

Dans une seconde partie, nous avons envisagé une autre approche en réalisant le couplage de l'électrophorèse capillaire d'affinité à la spectrométrie de masse. A la différence du mode frontal, les échantillons sont ici injectés en plus faible quantité. La méthode a été appliquée à l'étude de chimiokines et ce afin de répondre aux hypothèses émises concernant leur oligomérisation en présence d'héparine. Deux modes d'association de dimères chimiokines / oligosaccharides ont été étudiés, l'un impliquant un effet coopératif de l'oligosaccharide pontant les deux protéines (SDF-1 α), l'autre résultant d'une modification conformationnelle suite à la liaison de l'oligosaccharide (MCP-1).

L'électrophorèse capillaire d'affinité a été choisie pour former ces oligomères, sans pré-incubation, pour éviter toute précipitation. Le capillaire de séparation a dû être tapissé de poly(éthylène oxyde) pour éviter l'adsorption de ces protéines basiques sur les parois, nous avons donc dû vérifier dans un premier temps la compatibilité de ce tapissage avec la détection par spectrométrie de masse. Le spectromètre de masse a permis de déterminer sans ambiguïté la stœchiométrie des dimères formés et ce pour les deux chimiokines étudiées SDF-1 α et MCP-1. L'existence d'oligomères de plus grande taille, pour MCP-1 notamment, est toujours à l'étude. La caractérisation structurale de ces complexes pourrait être apportée par d'autres stratégies analytiques, notamment des expériences d'échange H/D associées à des analyses par RMN et/ou spectrométrie de masse.

Nous avons donc démontré l'intérêt du couplage CE-MS pour l'étude de complexes protéine / oligosaccharides. Les différentes stratégies analytiques développées nous ont permis,

en fonction des objectifs recherchés, de déterminer la stœchiométrie des complexes et d'identifier les ligands de protéines données. D'un point de vue analytique, la CE-MS apparaît comme une méthode puissante qui pourrait simplifier considérablement l'identification de ligands et de protéines cibles à visées thérapeutiques. D'un point de vue biologique, ce couplage s'avère tout aussi intéressant. Comme nous avons pu l'observer par l'analyse d'oligomères de chimiokines, cette méthode nous a permis de mettre en évidence des effets structuraux différents en fonction des ligands testés. Des analyses complémentaires s'avèrent nécessaires afin de relier ces effets structuraux à l'activité biologique de ces chimiokines.

MATERIEL ET METHODES

I MATERIEL

I-1 INSTRUMENTATION

L'appareil d'électrophorèse capillaire utilisé est un HP^{3D}CE commercialisé par Agilent technologies. Le carrousel a été thermostaté au moyen d'un cryothermostat LAUDA RE104. Le logiciel pilote permettant l'acquisition et le traitement des données est le ChemStation Agilent.

Le spectromètre de masse de masse utilisé est un Esquire 3000+ commercialisé par Bruker Daltonics (Figure 66). Ce spectromètre est composé d'une source ESI et d'un analyseur à trappe ionique quadripolaire. Le logiciel pilote permettant l'acquisition et le traitement des données est le Bruker Daltonic DataAnalysis version 3.1. Deux gammes de masses de travail ont été utilisée : le mode normal (50 à 3000 m/z) le mode étendu (200 à 6000 m/z). Les paramètres de tension de sortie du capillaire et de focalisation des lentilles ont été choisis par l'intermédiaire d'un réglage semi-automatique de la « masse cible », correspondant à la valeur du rapport m/z de l'ion d'intérêt.

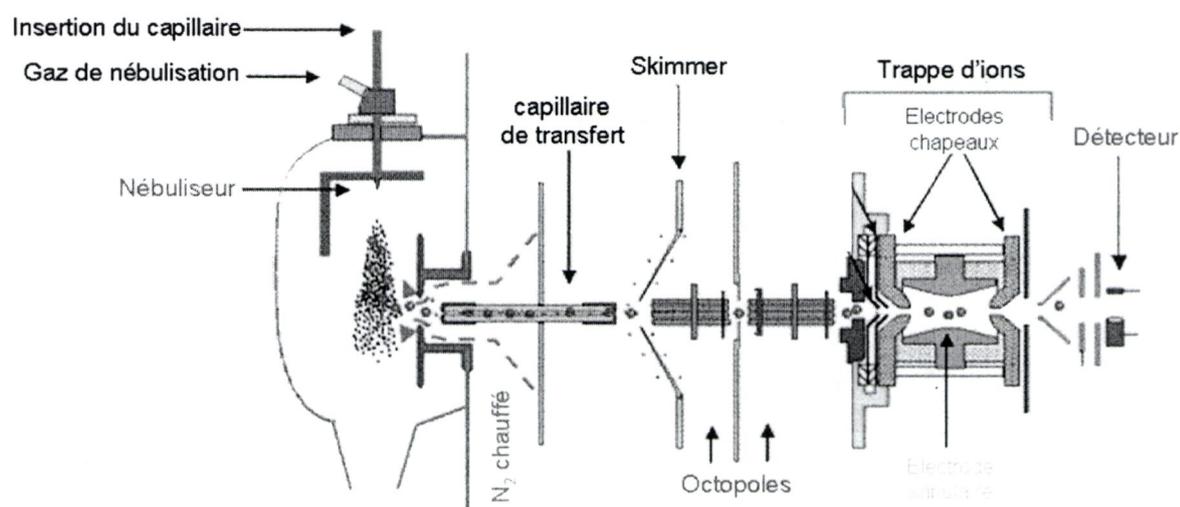


Figure 66 : Représentation schématique du spectromètre de masse Esquire 3000+

Bruker Daltonics©

La réalisation du couplage CE-MS a été réalisée au moyen d'une interface coaxiale à 3 voies (G1607A, Agilent Technologies). Un pousse seringue (74 900 series, Cole-Palmer, USA) a permis l'apport du liquide d'appoint.

Toutes les conditions expérimentales utilisées en CE, MS et CE-MS sont détaillées dans les légendes des figures présentant les résultats (Chapitres 2 et 3).

I-2 PRODUITS

I-2.1 Protéines

Antithrombine

Deux lots d'antithrombine humaine commercialisés par Hyphen Biomed (Neuville sur Oise) ont été utilisés. Vendues lyophilisées, les protéines ont été reprises dans l'eau ultra pure Milli-Q, aux concentrations ci-dessous, puis aliquotées et conservées à -80°C . Les aliquots ont été décongelés à température ambiante au moins 1 heure avant chaque utilisation.

- Lot 1 : $3,75 \text{ g.L}^{-1}$ d'antithrombine dans un tampon glycine-HEPES contenant 9 g.L^{-1} de chlorure de sodium.
- Lot 2 : 5 g.L^{-1} d'antithrombine dans un tampon phosphate pH 7,5 contenant 9 g.L^{-1} de chlorure de sodium.

Les échanges de tampons ont été réalisés par filtration sur micro-colonnes(ProbeQuant™ G-50 microcolumns, Amersham Biosciences) par séquences de centrifugation de deux minutes à 4000 rpm sur une centrifugeuse 5417R (Eppendorf) :

1. élution du tampon commercial ;
2. conditionnement des micro-colonnes avec le tampon d'analyse (trois fois $300 \mu\text{L}$) ;
3. dépôt de $20 \mu\text{L}$ de l'échantillon d'antithrombine puis élution.

Chimiokines

Pour cette étude, nous avons utilisé trois chimiokines recombinantes humaines dont un mutant (Tableau 10).

	Mw (g.mol ⁻¹)	M _{théorique} (g.mol ⁻¹)	pI calculé
SDF-1 α	7963,4	7958,3	9,9
SDF-1 3/6	7703	7698,0	9,6
MCP-1	8685,0	8679,4	9,4

Tableau 10 : Caractéristiques des chimiokines étudiées

SDF-1 α

Cette protéine recombinante (séquence Figure 7) a été fournie par PeproTech France. Vendue lyophilisée, la protéine a été reprise dans l'eau ultra pure Milli-Q, à 25 μ M, puis aliquotée et conservée à -80°C.

Les aliquots ont été décongelés à température ambiante au moins 1 heure avant chaque utilisation, puis dilués dans l'électrolyte de séparation.

KPVLSYRCP CRFFESHVAR ANV**KHLKILN** TPNCALQIVA **RLKNNNRQVC**
IDPKLKWIQE YLEKALNK

Figure 7 : Séquence de SDF-1 α humaine

En italique : résidus marquant l'appartenance à la famille CXC,
En gras : résidus basiques susceptibles d'interagir avec des GAG.
D'après[69, 70]

SDF-1 3/6

Cette protéine mutée (Séquence Figure 46) nous a généreusement été donnée par l'équipe du Dr Françoise Baleux (unité de chimie organique de l'institut Pasteur, Paris). Cette protéine fournie à 25 μ M dans l'eau a été conservée à -80°C.

Les aliquots ont été décongelés à température ambiante au moins 1 heure avant chaque utilisation, puis dilués dans l'électrolyte de séparation.

KPVLSYRCP CRFFESHVAR ANV**S**SL**SILN** TPNCALQIVA **RLKNNNRQVC**
IDPKLKWIQE YLEKALN_

Figure 46 : Séquence de SDF-1 (3/6)

En italique : résidus marquant l'appartenance à la famille CXC,
En gras : résidus basiques susceptibles d'interagir avec des GAG.
En souligné : résidus mutés

MCP-1

Cette protéine recombinante (Séquence Figure 9) a été fournie par PeptoTech France. Vendue lyophilisée, la protéine a été reprise dans l'électrolyte de séparation, à 25 μM , puis conservée à 4°C pendant 3 à 4 jours. Cette protéine ne doit pas être congelée une fois mise en solution. (aucune interaction avec des oligosaccharides n'a pu être mise en évidence sur des aliquots conservés à -80°C).

QPDAINAPVT *CCYNFTNRKI* SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE
ICADPKQKWV QDSMDHLDKQ TQTPKT

Figure 9 : Séquence de MCP-1 humaine

En italique : résidus marquant l'appartenance à la famille CC,
En gras : résidus basiques susceptibles d'interagir avec des GAG.
D'après [74, 75]

I-2.2 Oligosaccharides

Pentasaccharide d'héparine

Le pentasaccharide d'héparine (pentaH) utilisé nous a généreusement été donné par le Dr Maurice Petitou (Sanofi Synthelabo, Toulouse)[208]. La masse théorique du pentasaccharide sodé est de 1726,77 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figure 67), celle du pentasaccharide protoné est de 1506,95 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

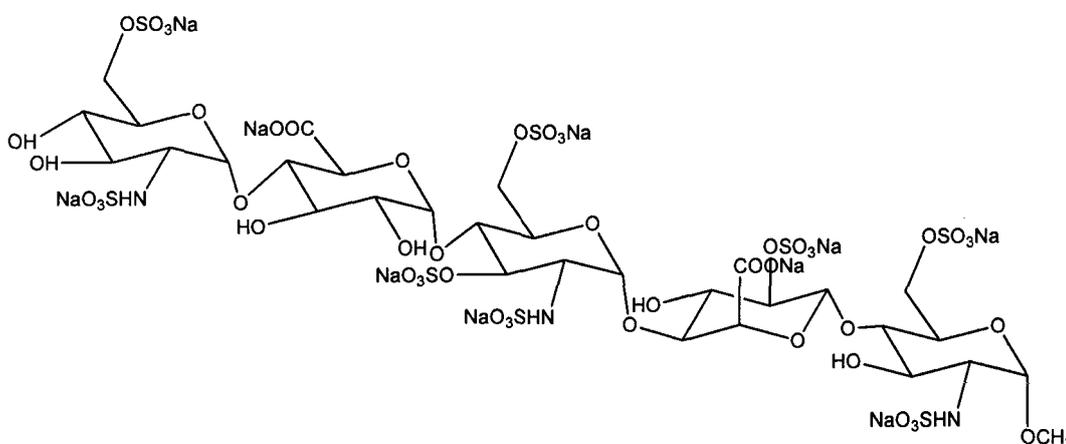


Figure 67 : Structure du pentasaccharide d'héparine (pentaH)

Synthèse [208]

Héparines de bas poids moléculaires

Les 3 lots d'héparines de bas poids moléculaire (LMWH, Tableau 11) utilisés nous ont généreusement été donnés par le Dr Barbara Mulloy (Laboratory for Molecular Structure, National Institute for Biological Standards and Control, Angleterre).

	Masse molaire moyenne en nombre	Masse molaire moyenne en masse	Indice de polydispersité
LMWH C	2933	3801	1,30
LMWH A	3588	4506	1,26
LMWH B	5162	6893	1,34

Tableau 11: Caractéristiques des héparines de bas poids moléculaires

Disaccharide IS d'héparine

Le disaccharide IS d'héparine (Figure 52, $M = 577 \text{ g.mol}^{-1}$) nous a été fourni par Sigma-Aldrich.

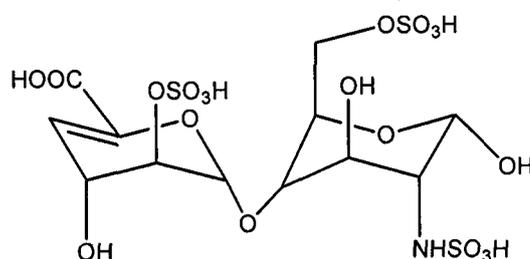


Figure 52 : Structure du disaccharide IS

Enoxaparines

Les différents fragments d'enoxyparine (enox, Tableau 12) utilisés nous ont généreusement été donnés par le Dr Barbara Mulloy (Laboratory for Molecular Structure, National Institute for Biological Standards and Control, Angleterre). Les structures de ces fragments sont variables et possèdent une structure de base disaccharidique commune (Figure 68).

	Nombre d'unités saccharidiques	Gamme de masse g.mol^{-1}
Enox4	4	776 - 1332
Enox6	6	1171 - 2005
Enox 10	10	1945 - 3335

Tableau 12 : Caractéristiques des fragments d'enoxyparine

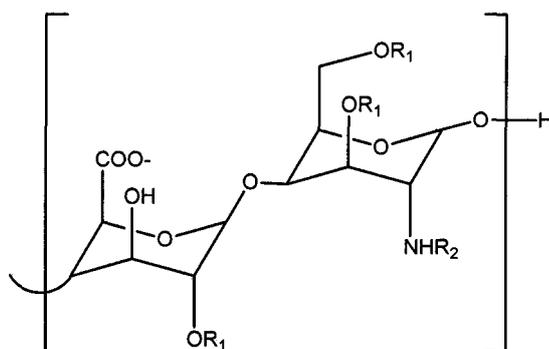


Figure 68 : Unité disaccharidique d'énnoxaparine

$R_1 = \text{H}$ ou SO_3H et $R_2 = \text{SO}_3\text{H}$ ou COCH_3

Pentasaccharide de fucane

Le pentasaccharide de fucane (pentaful) utilisé nous a généreusement été donné par le Dr Yuguo Du (Research center for Eco-Environnemental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Pékin) [214]. La masse théorique du pentasaccharide sodé est de $1574 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figure 56), celle du pentasaccharide protonné est de $1420,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

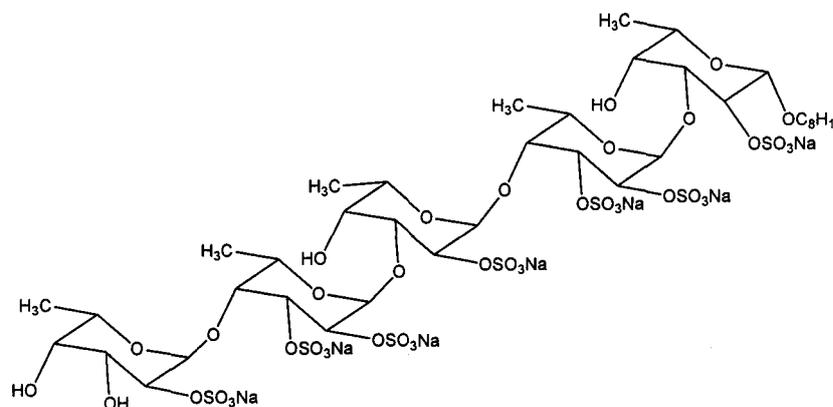


Figure 56 : Structure du pentasaccharide de fucane (pentaful)

Synthèse [214]

II METHODES DE CALCULS DE CONSTANTES DE DISSOCIATION

II-1 CALCULS DE K_d PAR ACE

Trois méthodes de linéarisation (Tableau 14) en fonction de la concentration en héparine contenue dans l'électrolyte $[H]_0$, des mobilités de l'antithrombine libre $\mu_{ep,AT}^0$ et complexée $\mu_{ep,AT}$, ont été utilisées pour déterminer la constante de dissociation (K_d) : x-réciproque (Scatchard), y-réciproque et double-réciproque[202, 217].

Méthode	Equation de droite	K_d
x-réciproque	$\frac{\mu_{ep,AT}^0 - \mu_{ep,AT}}{[H]_0} = f(\mu_{ep,AT}^0 - \mu_{ep,AT})$	$\frac{-1}{\text{coefficient directeur}}$
y-réciproque	$\frac{[H]_0}{\mu_{ep,AT}^0 - \mu_{ep,AT}} = f([H]_0)$	$\frac{\text{ordonnée à l'origine}}{\text{coefficient directeur}}$
Double-réciproque	$\frac{1}{\mu_{ep,AT}^0 - \mu_{ep,AT}} = f\left(\frac{1}{[H]_0}\right)$	$\frac{\text{coefficient directeur}}{\text{ordonnée à l'origine}}$

Tableau 13 : Equations de linéarisation pour électrophorèse de zone d'affinité

Les mobilités électrophorétiques μ_{ep} (en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ont pu être déterminées par la formule suivante :

$$\mu_{ep} = \frac{l \cdot L}{V \cdot t_{ep}} = \frac{l \cdot L}{V \cdot (t_{eo} - t_{app})}$$

L = longueur totale du capillaire (cm)
 l = longueur utile du capillaire (cm) (entrée - détecteur)
 V = tension appliquée (V)
 t_{app} = temps de migration de l'antithrombine (s)
 t_{eo} = temps de migration du marqueur neutre (s).

II-2 METHODES DE CALCUL PAR FACCE

II-2.1 Calcul de K_d

Trois méthodes de linéarisation (Tableau 14) en fonction de la concentration en héparine libre [H] et de la concentration en complexe formé [AT/H] ont été utilisées pour déterminer la constante de dissociation (K_d) : x-réciproque (Scatchard), y-réciproque et double-réciproque[202, 217].

Méthode	Equation de droite	K_d
x-réciproque	$\frac{[AT/H]}{[H]} = f([AT/H])$	$\frac{-1}{\text{coefficient directeur}}$
y-réciproque	$\frac{[H]}{[AT/H]} = f([H])$	$\frac{\text{ordonnée à l'origine}}{\text{coefficient directeur}}$
double-réciproque	$\frac{1}{[AT/H]} = f\left(\frac{1}{[H]}\right)$	$\frac{\text{coefficient directeur}}{\text{ordonnée à l'origine}}$

Tableau 14 : Equations de linéarisation pour analyse frontale

[AT/H] = concentration en antithrombine complexée avec l'héparine

[H] = concentration en héparine libre.

Le tracé de ces différentes droites nécessite la détermination expérimentale de la quantité de complexe formée [AT/H] et de la quantité d'héparine libre [H] :

- La concentration en complexe formé a été déterminée par soustraction de la quantité d'antithrombine libre [AT] à la quantité initialement introduite $[AT]_0$:

$$\text{soit } [AT/H] = [AT]_0 - [AT]$$

La concentration en antithrombine libre [AT] a pu être déterminée expérimentalement par la mesure de l'absorbance du 1^{er} front de migration. Cette hauteur de front a été convertie en concentration grâce à une droite d'étalonnage réalisée avec 5 niveaux de concentrations en antithrombine en double (Figure 69).

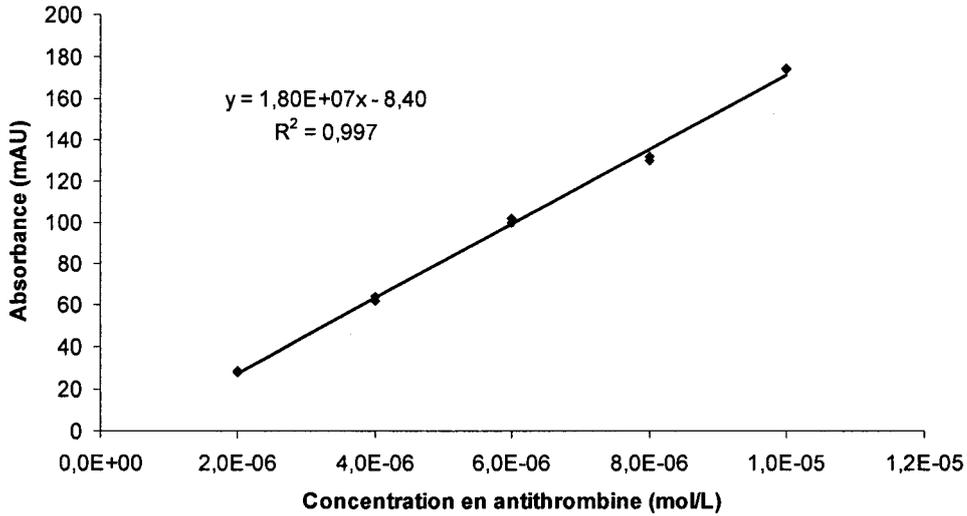


Figure 69: Droite d'étalonnage de l'antithrombine réalisée en FACCE

Capillaire de silice vierge : 34 cm x 25,5 cm x 50 µm.

Electrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8.

Antithrombine diluée dans l'électrolyte à 2, 4, 6, 8 et 10 µM. Analyse frontale + 8 kV.

- Enfin la quantité d'héparine libre [H] a pu être déterminée par soustraction de la quantité initialement introduite $[H]_0$ à la quantité de complexe formée $[AT/H]$, puisqu'il s'agit d'une interaction de stoechiométrie 1/1 [29]:

$$\text{soit } [H] = [H]_0 - [AT/H]$$

II-2.2 Calcul du nombre moyen de ligands liés

Le rapport entre la quantité d'héparine complexée, qui est la différence entre l'héparine introduite initialement et l'héparine libre ($[H]_0 - [H]$), et la quantité totale d'antithrombine permet d'estimer le nombre moyen de molécules d'héparines liées. Pour cela, il faut supposer qu'il existe entre l'héparine et l'antithrombine un seul mode de fixation.

$$\bar{n} = \frac{[H]_0 - [H]}{[AT]_0}$$

La détermination expérimentale de \bar{n} se fait par le tracé de l'asymptote horizontale de l'isotherme de complexation $\bar{n} = f([H])$.

III PREPARATION DES CAPILLAIRES DE SEPARATION

Les capillaires utilisés sont des capillaires de silice vierge de diamètre interne 50 ou 75 μm , de diamètre externe 360 μm , fournis par Phymep. Chaque capillaire, en fonction de la méthode utilisée, a été préparé suivant des protocoles spécifiques lors de l'utilisation d'un capillaire neuf, puis lors de chaque analyse avant (pré-conditionnement) et après (post-conditionnement) chaque séparation. Les tableaux suivants résument les différentes étapes de rinçage, par l'application d'une pression de 1 bar dans le flacon d'entrée, ainsi que leurs durées en fonction des longueurs de capillaires.

III-1 ACTIVATION D'UN CAPILLAIRE DE SILICE VIERGE

Classiquement, les capillaires de silice sont activés, avant leur première utilisation par un rinçage à la soude, afin de d'ioniser les groupements silanols sur la paroi interne (*cf.* protocole Tableau 15).

		Capillaire court 34 cm	Capillaire long 98 cm
1^{ère} utilisation			
1	NaOH 1 M	10 min	30 min
2	NaOH 0,1 M	10 min	30 min
3	Eau	10 min	30 min
Pré-conditionnement			
1	Electrolyte de séparation	5 min	10 min
Post-conditionnement			
1	Eau	2 min	10 min
2	NaOH 0,1 M	2 min	10 min
3	Eau	2 min	10 min

Tableau 15 : Protocole d'activation d'un capillaire de silice vierge

III-2 MODIFICATIONS DU CAPILLAIRE DE SEPARATION POUR L'ANALYSE DE PROTEINES BASIQUES PAR CE-MS

L'analyse de protéines basiques par CE est rendue difficile par leur forte interaction électrostatique avec les parois des capillaires de silice vierge, le recours à des capillaires modifiés devient indispensable.[218, 219] Deux méthodes de modification des parois du capillaire de séparation ont ici été envisagées : le greffage (covalent) et le tapissage (non covalent). Afin de ne pas déstabiliser les interactions de type électrostatiques entre les protéines et les oligosaccharides sulfatés, les agents de modifications choisis sont des molécules non chargées. Ces molécules masquent les charges de surfaces négatives du capillaire pour empêcher l'adsorption de cations, et ont pour conséquence la suppression du flux électro-osmotique. L'ajout d'une pression hydrodynamique tout au long de l'analyse nous a permis de pallier à l'absence du flux électro-osmotique.

III-2.1 Greffage d'hydroxypropylcellulose

Bien que des capillaires greffés soient disponibles commercialement, nous avons préféré réaliser cette modification sur des capillaires de silice vierge. L'avantage principal réside dans la réalisation de capillaires aux dimensions adéquates avec l'analyse par CE seule ou CE-MS.

Des essais ont été réalisés avec un polymère neutre l'hydroxypropylcellulose (HPC, Figure 70) pouvant se lier, par chauffage, de façon covalente aux fonctions silanols des parois du capillaire de séparation.[220, 221]

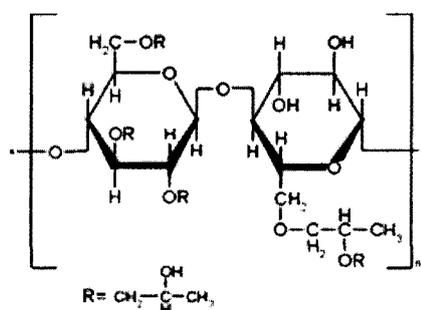


Figure 70 : Hydroxypropylcellulose

Pour réaliser ce greffage, le capillaire de silice non activée est dans un premier temps rempli au moyen d'un pousse-seringue par une solution aqueuse de HPC à 5% m/v. Le capillaire est ensuite placé dans un four de chromatographie gazeuse pour être chauffé par un flux d'azote.

Le capillaire est ensuite rincé à l'eau puis conditionné avec l'électrolyte de séparation. (cf. protocole Tableau 16).

		Capillaire court 34 cm	Capillaire long 98 cm
Greffage			
1	5 % HPC *	Remplissage au pousse-seringue	
2	Flux N ₂ 60 à 140°C **	5°C/min	3°C/min
3	Flux N ₂ 140°C **	10 min	20 min
4	Eau	10 min	20 min
Pré-conditionnement			
1	Electrolyte de séparation	5 min	10 min
Post-conditionnement			
1	Eau	5 min	10 min

Tableau 16 : Protocole de greffage d'hydroxypropylcellulose

* Solution obtenue par dissolution de HPC 100 kg.mol⁻¹ (Aldrich CAS 9004-64-2, Figure 70) dans l'eau dans un rapport de 5 % masse / volume, sous agitation à température ambiante. La solution était préparée la veille afin de supprimer les bulles d'air formées.

** les étapes de séchage à l'azote (N₂) ont nécessité l'utilisation d'un four de chromatographie gazeuse à la pression maximale soit 30 psi.

Alors que cela n'était pas réalisable avec un capillaire de silice vierge, le greffage HPC nous a permis de détecter SDF-1 α (Figure 71).

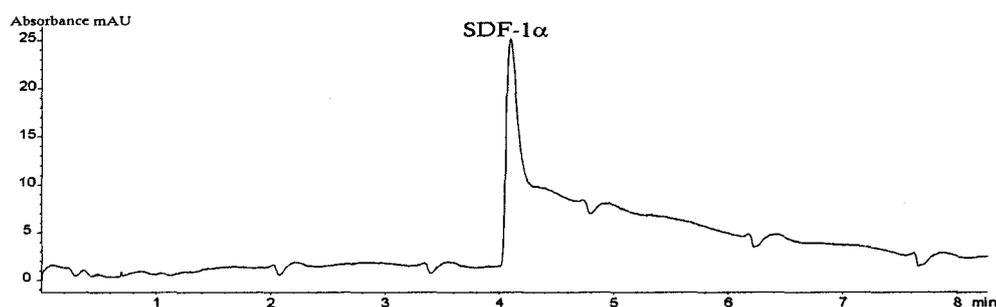


Figure 71 : Electrophérogrammes de SDF-1 α sur capillaire greffé hydroxypropylcellulose

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L=34 cm, l=25,5cm (UV 200 nm).

Electrolyte : acétate d'ammonium 50 mM, pH 6.5 ; voltage +12 kV ; pression + 10 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 5 s de SDF-1 α 20 μ M.

Le pic détecté présente une trainée arrière et la ligne de base est irrégulière, ce qui peut résulter d'un greffage non uniforme. Le protocole de greffage est fastidieux et les capillaires greffés sont fragiles (ils perdent leur greffage et se bouchent facilement). Les analyses sont répétées un petit nombre de fois et non reproductibles sur des capillaires différents. De plus, à la suite d'essais réalisés en CE-MS, une suppression de signal a pu être observée résultant d'une

pollution visible du spectromètre de masse. Pour ces raisons, cette méthode n'a pas été conservée pour la suite de notre étude.

III-2.2 Tapissage de poly (éthylène oxyde)

Le tapissage consiste à introduire dans le capillaire de séparation une solution à base de polymère afin de masquer les charges de surface en recouvrant les parois internes. Nous avons choisi de faire nos essais avec le poly(éthylène oxyde) (PEO).[222, 223]

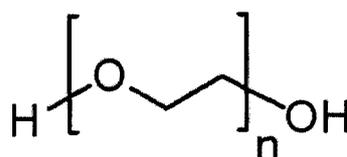


Figure 72 : Poly(éthylène oxyde)

Le protocole de tapissage (cf. protocole Tableau 17) basé sur de simples étapes de rinçage du capillaire de séparation est plus simple à mettre en œuvre que la méthode de greffage utilisée précédemment. L'autre avantage du tapissage, par rapport au greffage, est la possibilité de réaliser un tapissage neuf à chaque analyse en conservant le même capillaire. Les capillaires sont réutilisables plus longtemps et les analyses sont plus reproductibles.

		Capillaire court 34 cm	Capillaire long 98 cm
1^{ère} utilisation			
1	Eau	5 min	10 min
2	NaOH 0,1 M	5 min	15 min
3	HCl 1 M	8 min	15 min
4	Eau	5 min	10 min
Tapissage / Pré-conditionnement			
1	HCl 1 M	5 min	15 min
2	2 g.L ⁻¹ PEO / HCl 0,1 M *	5 min	15 min
3	Electrolyte de séparation	4 min	8 min
Post-conditionnement			
1	Eau	5 min	15 min

Tableau 17 : Protocole de tapissage au poly(éthylène oxyde)

* Solution mère obtenue par dissolution de PEO 200 kg.mol⁻¹ (Sigma-Aldrich CAS 25322-68-3, Figure 72) dans l'eau à une concentration de 2,2 g.L⁻¹, sous agitation à 90° C. La solution mère

était ensuite stockée à température ambiante. Juste avant son utilisation, la solution mère était diluée par HCl pour atteindre une concentration finale de 2 g.L⁻¹ PEO et 0,1 M HCl.

Des essais en CZE-MS réalisés sur trois protéines basiques autres que les chimiokines (Tableau 18) ont montré la compatibilité de ce tapissage avec la détection MS, cette méthode a donc été choisie pour la suite de notre étude.

Protéine	Origine	Masse (g.mol ⁻¹)	pI
Aprotinine	Bovine, Sigma	6511	9,1
Cytochrome C	Bovine, Sigma	12232	9,6
Chymotrypsinogène A	Bovine, Sigma	25656	9,1

Tableau 18 : Caractéristiques des protéines basiques étudiées

L'analyse de ces protéines nous a permis de mettre au point la méthode de couplage CZE-MS en optimisant : la pression hydrodynamique appliquée et le diamètre du capillaire. Ainsi, nous avons pu déterminer que :

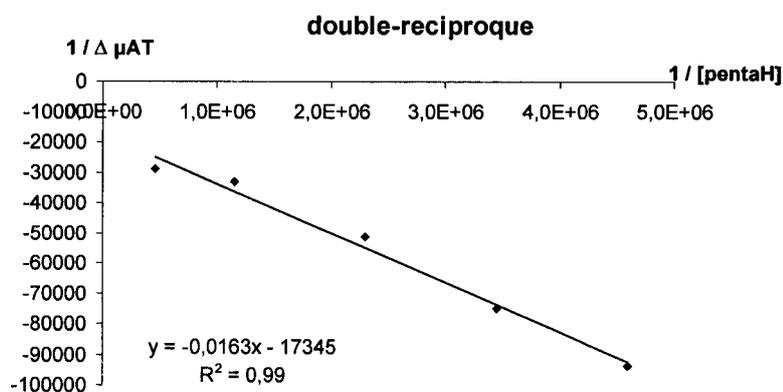
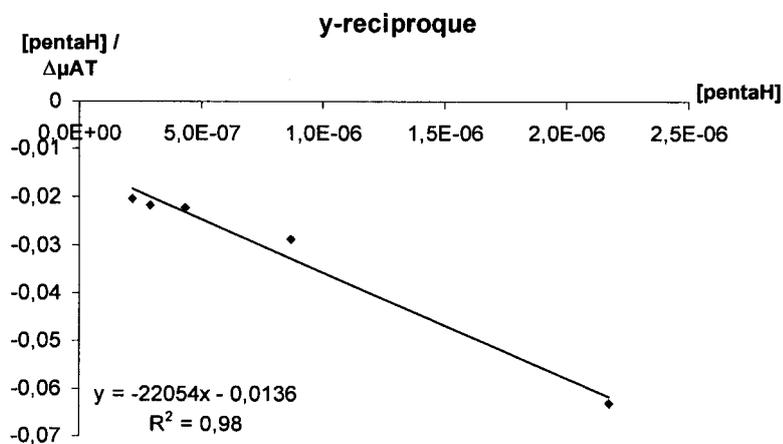
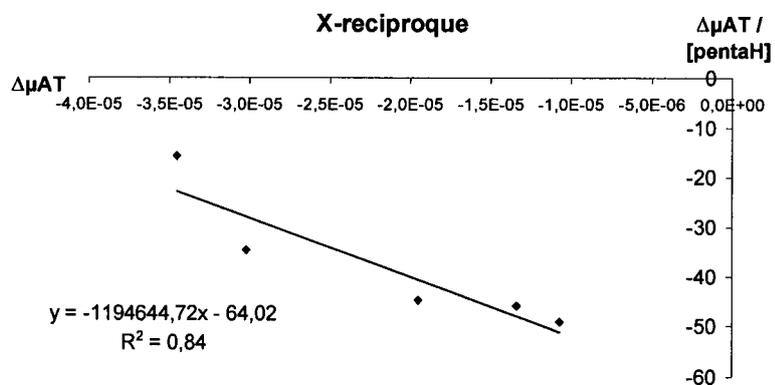
- la pression minimale nécessaire pour stabiliser le courant d'ion au niveau du spectromètre de masse est de 10 mbar pour un capillaire ayant un diamètre interne égal à 50 µm ;
- l'augmentation de cette pression hydrodynamique à 50 mbar permet de réduire la durée des analyses, mais les spectres de masse obtenus sont moins intenses. La cause la plus probable de cette suppression de signal est une pollution du spectromètre par le PEO ;
- l'utilisation de capillaire plus larges, diamètre interne égal à 75 µm, provoque également une suppression de signal. La vitesse des protéines est également augmentée pour une même pression par rapport à un capillaire de 50 µm. Ce dernier point peut s'expliquer par un effet plus important de l'effet de siphon (dû au gaz de nébulisation, dont la pression était fixée à 10 psi) pour des capillaire plus larges.

Les résultats expérimentaux correspondant à cette mise au point sont présentés dans une note publiée dans le journal *Analytical Biochemistry* (cf. annexe page 143).

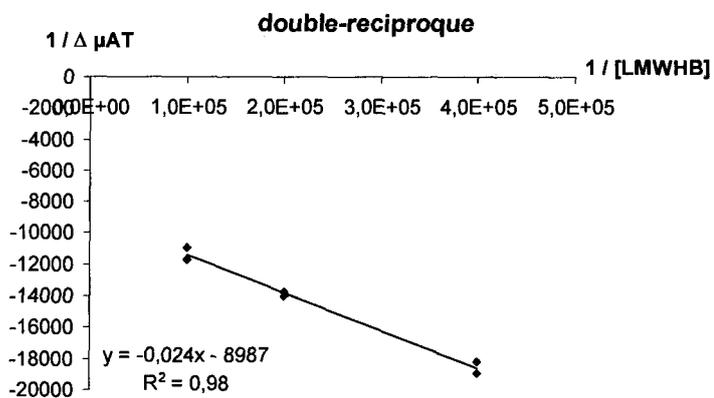
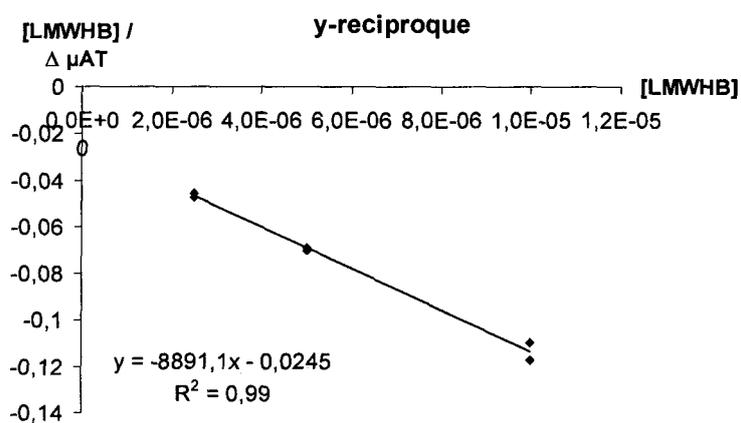
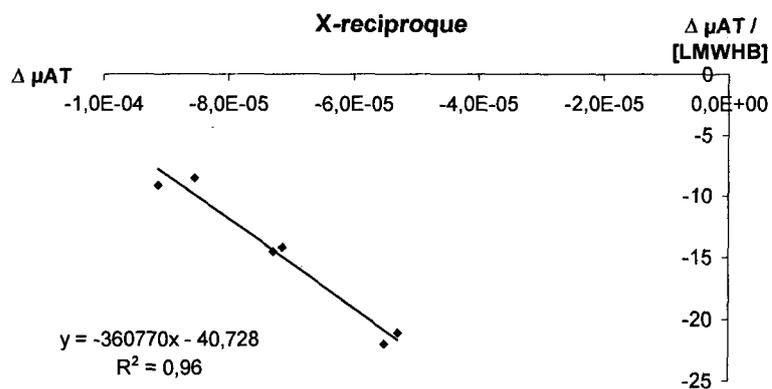
L'étude des chimiokines a été réalisée avec des capillaires de diamètre interne égal à 50 µm. Nous avons dû réaliser un compromis entre le souhait de réduire les durées d'analyse tout en conservant une intensité de signal importante. Pour cela, nous avons utilisé une pression hydrodynamique de 50 mbar et une pression du gaz de nébulisation réduite à 5 psi.

Annexes

I INTERACTION ANTITHROMBINE / PENTA H PAR ACE

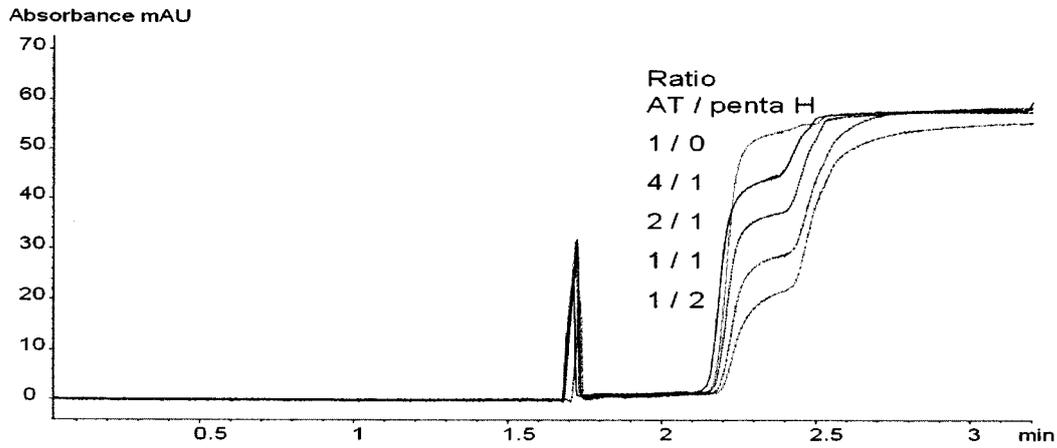


II INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH B PAR ACE

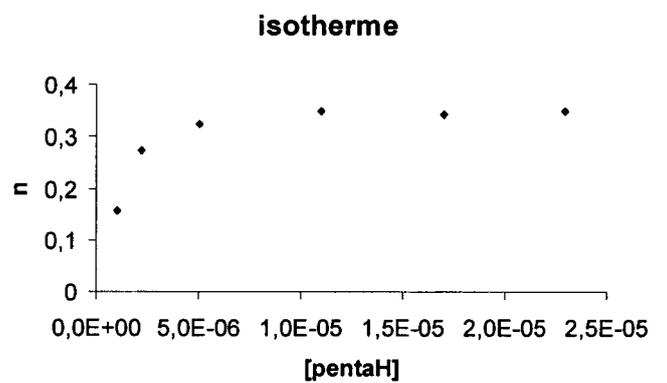
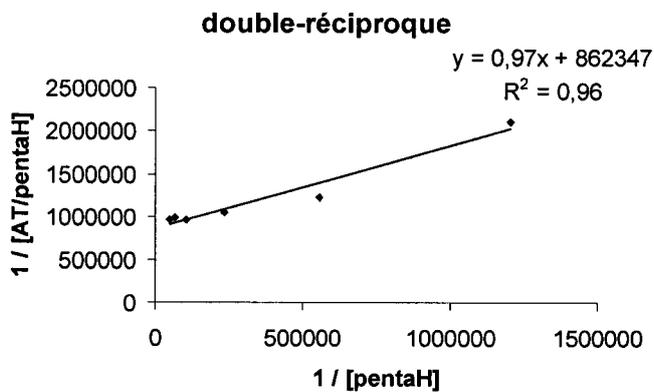
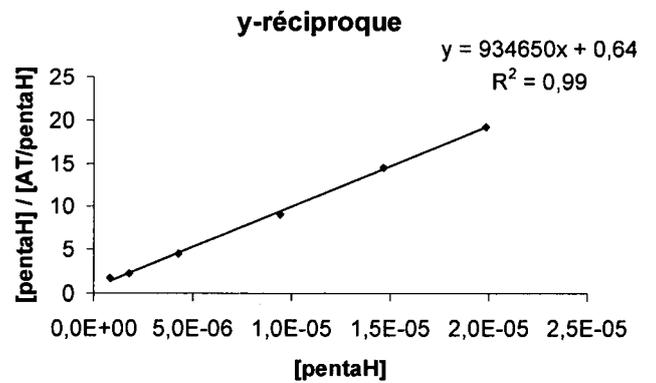
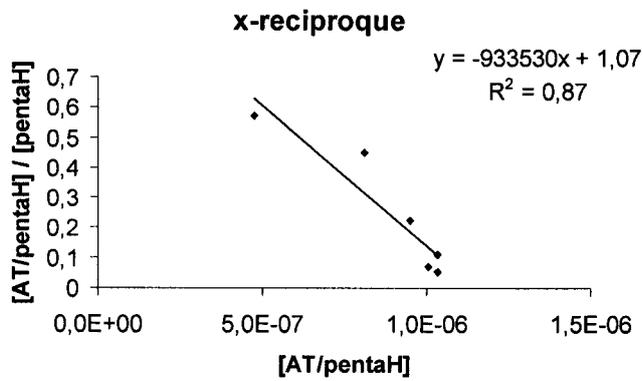


III INTERACTION ANTITHROMBINE / PENTA H PAR FACCE

Electrophérogrammes

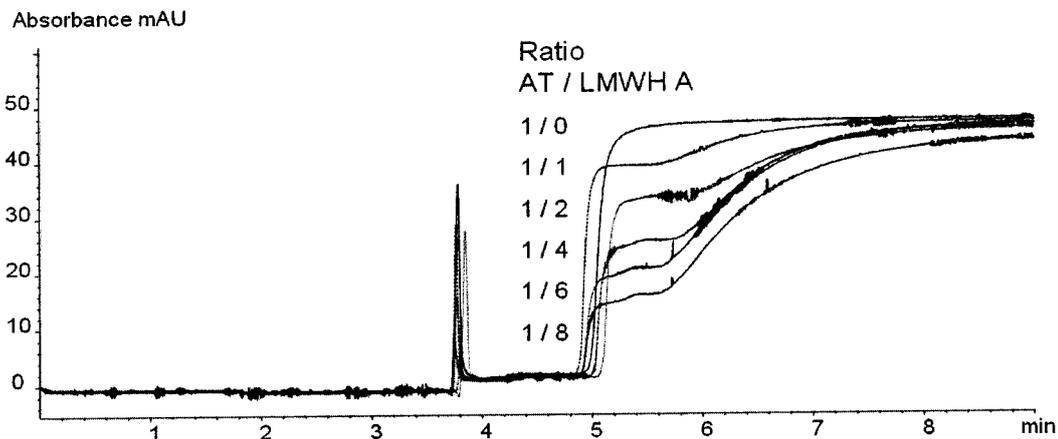


Linéarisation

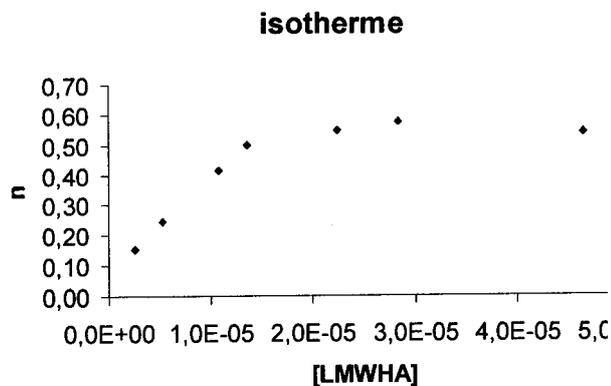
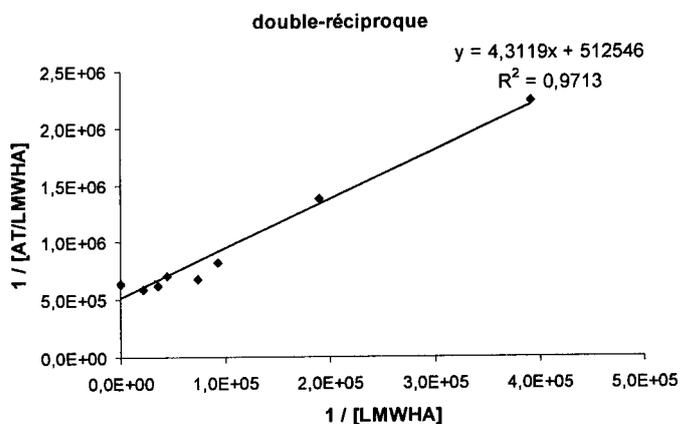
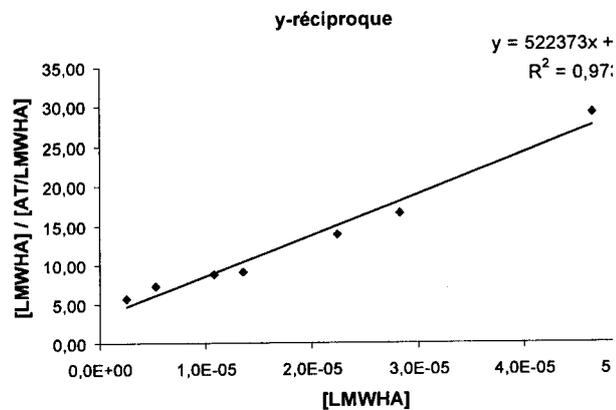
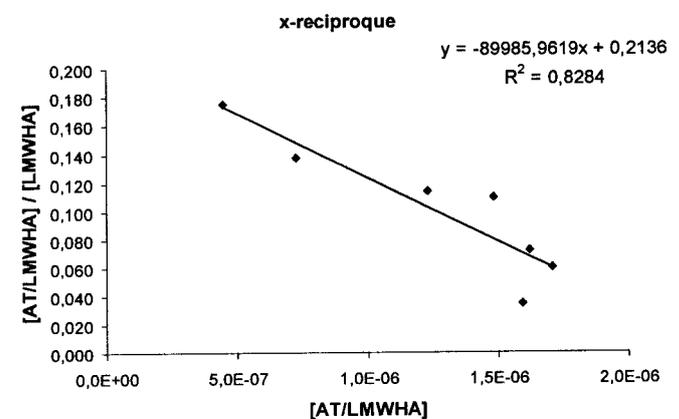


IV INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWHA PAR FACCE

Electrophérogrammes

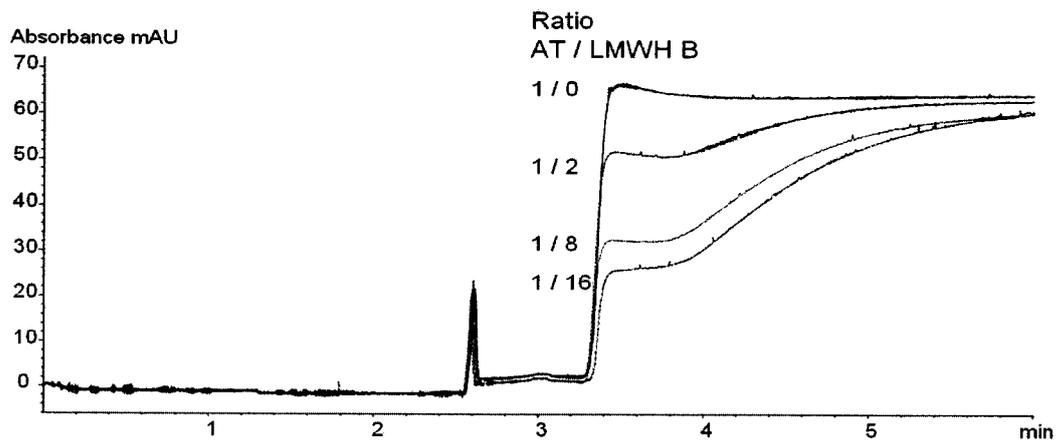


Linéarisation

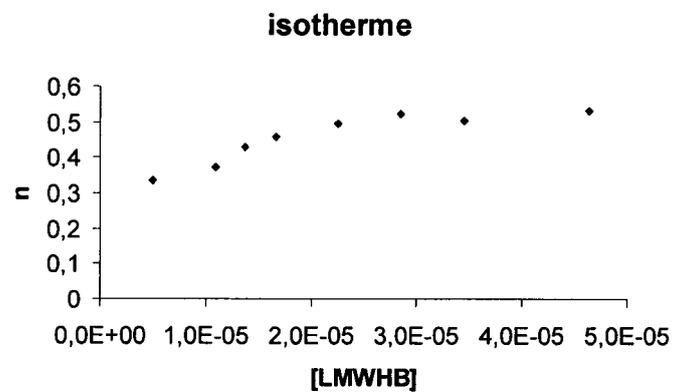
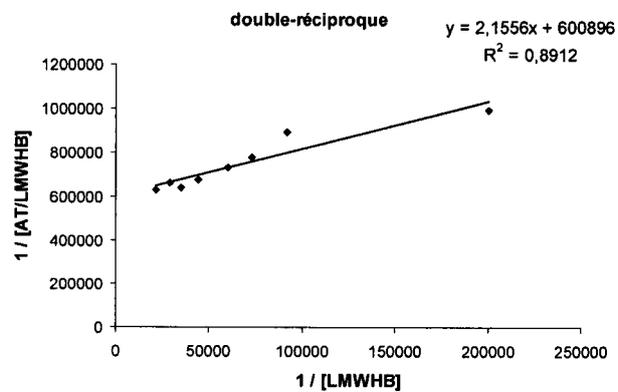
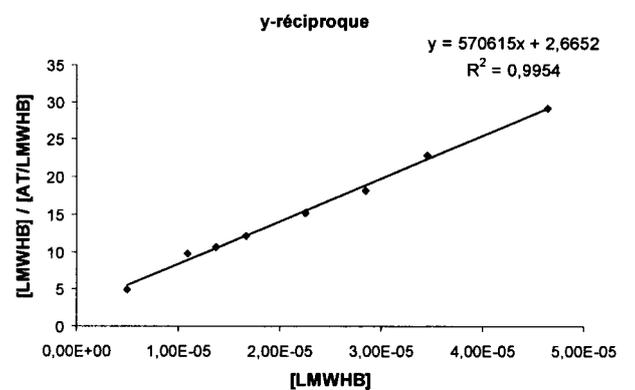
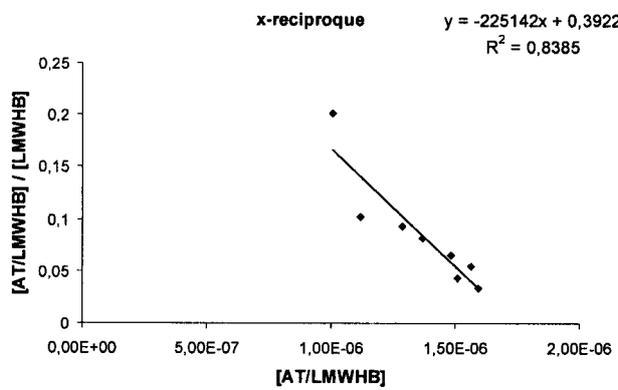


V INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH B PAR FACCE

Electrophérogrammes

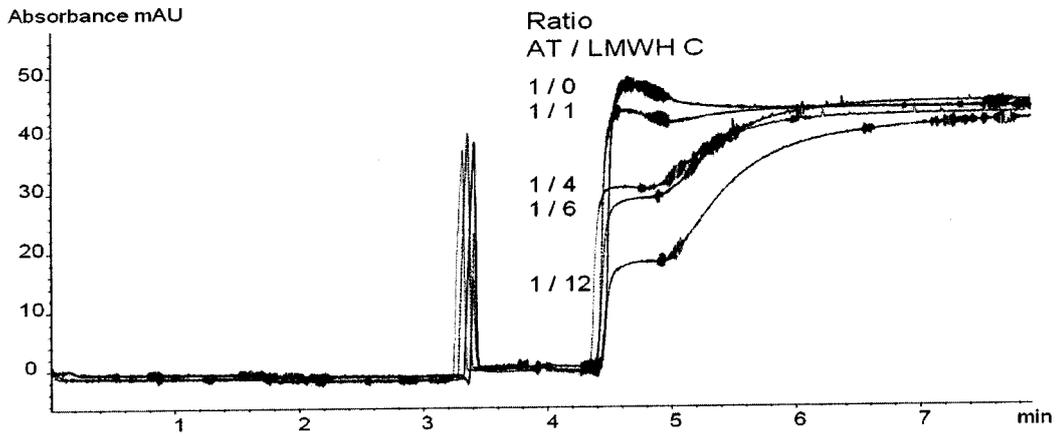


Linéarisation

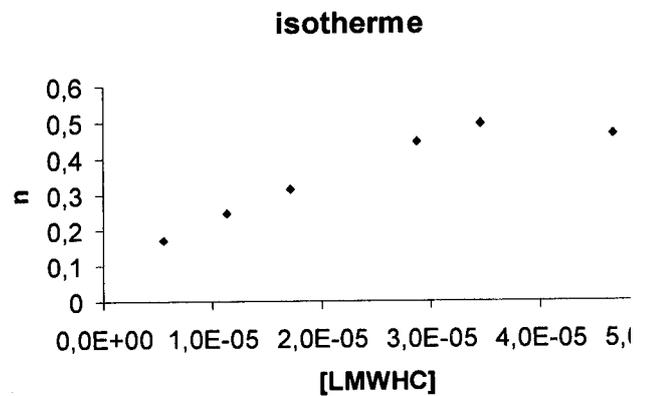
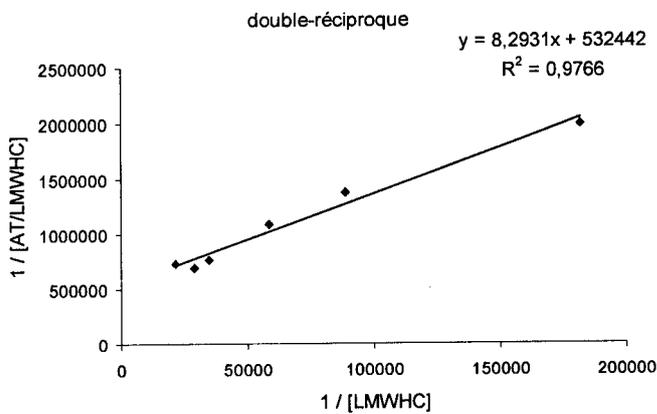
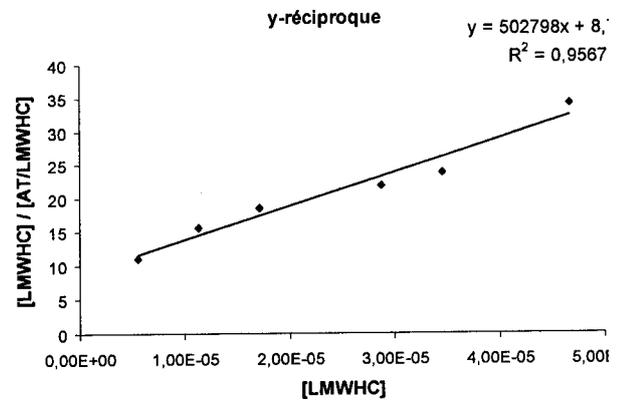
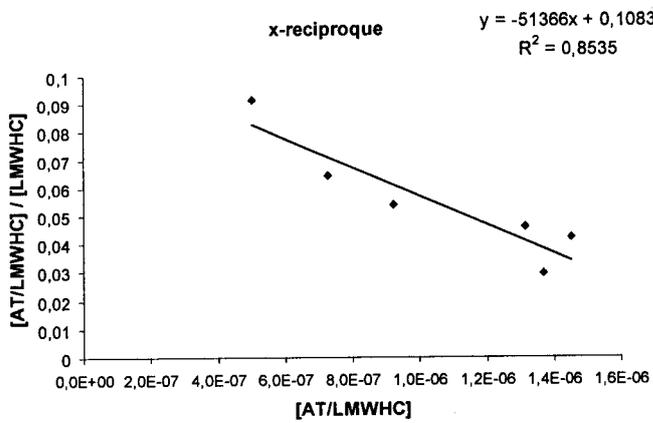


VI INTERACTION ANTITHROMBINE / LMWH C PAR FACCE

Electrophérogrammes



Linéarisation



VII PUBLICATIONS

Anal. Chem. 2007, 79, 4987–4993

Frontal Analysis Capillary Electrophoresis Hyphenated to Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of the Antithrombin/Heparin Pentasaccharide Complex

Soraya Férmas,[†] Florence Gonnet,[†] Anne Varenne,[‡] Pierre Gareil,[‡] and Régis Daniel^{*†}

CNRS UMR 8587, Université d'Evry-Val-d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France, and CNRS UMR 7575, ENSCP, Laboratoire d'Electrochimie et Chimie Analytique, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

The interaction of proteins with polysaccharides represents a major and challenging topic in glycobiology, since such complexes mediate fundamental biological mechanisms. A new strategy based on the hyphenation of frontal analysis capillary electrophoresis (FACE) with electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) is reported for the characterization of protein/carbohydrate complexes. While most of the previously reported CE–MS experiments were performed using capillary electrophoresis in zone format, we report for the first time CE–MS experiments in which CE was performed in frontal analysis (FACE–MS). We showed that the frontal mode offered a better sensitivity than zone mode and was well suited for the CE–MS coupling. This FACE–MS coupling was applied to the analysis of the complex between antithrombin and the sulfated pentasaccharide reproducing the antithrombin-binding sequence in heparin. The mixture of coinubated antithrombin and heparin pentasaccharide was continuously injected into the capillary, and the electrophoretic separation of the free and bound forms of the protein was achieved. The intact noncovalent complex antithrombin/heparin pentasaccharide was detected on-line by ESIMS in positive ionization mode and in nondenaturing sheath liquid conditions. The complex stoichiometry was determined from the mass measurement of the complex. In addition, the characterization of the sulfated pentasaccharide ligand dissociated from the complex was performed in negative ionization mode using a denaturing sheath liquid, allowing the determination of its molecular mass and sulfation features. This FACE–ESIMS strategy opens the way to ligand fishing experiments performed on heterogeneous carbohydrate mixtures and subsequent characterization of specifically bound carbohydrates.

Protein/carbohydrate complexes represent a major issue in glycobiology, since they have been recognized to play a crucial

role in essential physiological processes such as growth control, cell differentiation, and cell adhesion, but also in pathological processes such as chronic inflammation, autoimmune diseases, tumoral metastasis, and viral infection.¹ Unraveling the mechanism of biologically active carbohydrates may lead to potential applications, especially expected in the therapeutic field. Therefore, the study of protein/carbohydrate noncovalent complexes raises an increasing interest with the aims of determining the structure of the glucidic ligand and the binding sites on the protein, and to delineate the molecular effects induced by the carbohydrate binding, such as protein conformational changes. There is now much data supporting the specificity of the interaction between proteins and bioactive carbohydrates such as glycosaminoglycans, whose interactions are thought to be driven by the specific recognition of structural determinants like monosaccharide sequence and sulfation pattern.^{2–4} However, the huge structural diversity of carbohydrates owing to their incomparable variety of combinations and regioselective modifications of their constitutive monosaccharides⁵ represents a major hindrance in the structure–activity relationship establishment. Furthermore, the biologically active carbohydrates (polysaccharides, glycoproteins) involved in molecular recognition are most often available as heterogeneous mixtures, leading to difficulties in the isolation and the structural identification of specific ligands.

Analytical techniques commonly used to study the noncovalent complexes are size exclusion and affinity chromatography, equilibrium dialysis, gel electrophoresis, capillary electrophoresis (CE), spectroscopic techniques (UV, IR, fluorescence, circular dichroism), nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray crystallography, surface plasmon resonance (SPR),⁶ isothermal titration calorimetry, and mass spectrometry.⁷ NMR and X-ray crystallography require important quantities of material and time-

- (1) Lee, Y. C. *FASEB J.* 1992, 6, 3193–3200.
- (2) Bourin, M. C.; Lindahl, U. *Biochem. J.* 1993, 289, 313–330.
- (3) Cardin, A. D.; Weintraub, H. J. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1989, 9, 21–32.
- (4) Sobel, M.; Soler, D. F.; Kermode, J. C.; Harris, R. B. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 8857–8862.
- (5) Esko, J. D.; Selleck, S. B. *Annu. Rev. Biochem.* 2002, 71, 435–471.
- (6) Beccati, D.; Halkes, K. M.; Batema, G. D.; Guillena, G.; Carvalho de Souza, A.; van Koten, G.; Kamerling, J. P. *ChemBiochem* 2005, 6, 1196–1203.
- (7) Hensley, P. *Structure* 1996, 4, 367–373.

* Corresponding author. E-mail: regis.daniel@univ-evry.fr. Tel: +33-1-69-47-7641. Fax: +33-1-69-47-7635.

[†] CNRS UMR 8587, Université d'Evry-Val-d'Essonne.

[‡] CNRS UMR 7575, ENSCP.

consuming steps for sample preparation and driving experiments. X-ray crystallography is not appropriate to all kinds of biomolecules, especially carbohydrates, because of their flexibility, which prevents crystallization.⁸ Among the different methods available for studying biomolecular interactions, CE offers powerful attributes, making this separation method very attractive and well adapted to the study of such noncovalent carbohydrate/protein complexes.⁹ Besides its well-known advantages, i.e., low sample consumption, short analysis time, separation efficiency, and ease of operation and automation, CE does not require prior immobilization of the interacting molecules contrary to SPR and affinity chromatography. We previously reported on the interest of affinity capillary electrophoresis (ACE) for the characterization of the binding properties of sulfated oligosaccharides from heparin and fucoidan, interacting with target proteins such as antithrombin and complement proteins,^{10,11} yet without providing structural data about the bound carbohydrate sequence. Large progress in structural analysis of carbohydrates were made over the past years thanks to the recent developments in mass spectrometry using soft ionization techniques such as matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).¹² ESIMS is widely recognized as a powerful and highly sensitive method for the characterization of sulfated oligosaccharides that can be readily ionized in negative ionization mode.^{13–17} In parallel to its use for structural elucidation, ESIMS has been more recently recognized as an effective tool for the characterization of noncovalent interactions,^{18,19} allowing intact weakly bound complexes to be detected. Noncovalent complexes involving electrostatic interactions can be preserved and strengthened by this gentle desolvation technique. ESIMS easily provides the stoichiometry of the complex by the molecular mass measurement, and in some cases, the binding constant can be determined by varying the applied voltage.²⁰

Aside from the well-established liquid chromatography–MS coupling, the hyphenation of CE with ESIMS (CE–ESIMS) has in the last years become a reliable alternative with progress in instrumentation and interface, leading to an increasing number of applications reported in literature, especially in the field of proteomics,^{21–23} small molecules,²⁴ and metabolomics.²⁵ Further-

more, the high sensitivity of ESIMS allows detection of the low amounts of analytes inherent to CE. Additionally, the possibility to perform on-line tandem mass spectrometry (MS/MS) is a powerful tool for structure determination, especially in the carbohydrate field. CE–ESIMS analysis has been successfully applied to the characterization of sulfated oligosaccharides from heparin,^{26,27} hyaluronic acid,²⁸ and chondroitin/dermatan sulfate²⁹ and for differentiation of sulfated fucose isomers.³⁰ Hyphenation of CE with ESIMS simultaneously allows the structural analysis of noncovalent complexes and the determination of thermodynamic properties. To our knowledge, only one study using this analytical method has been reported to date, which dealt with the effect of the sheath liquid composition on the detection of myoglobin interacting with its prosthetic heme group.³¹

In the study herein, we investigate the hyphenation of CE with ESIMS to characterize protein/carbohydrate complexes and identify the saccharidic ligand by mass spectrometry. These complexes are usually isolated using affinity chromatography and filtration trapping assay,³² requiring large amounts of sample and several experimental steps before achieving structural analysis of the carbohydrate ligand as these methods are not on-line coupled. The present approach based on the ability of CE to separate the free and complexed protein species and to be coupled to MS for the on-line structural characterization of the complex was applied to the analysis of the complex between antithrombin and the sulfated pentasaccharide reproducing the antithrombin-binding sequence in heparin.^{33–35} While most of the previously reported CE–MS studies were performed using capillary electrophoresis in zone format,^{36,37} for the first time, CE–MS experiments in which CE was performed in frontal format (FACE–MS) are reported. Antithrombin/heparin mixtures were injected either continuously or for a long period of time, leading to the formation of distinct migration fronts, due to the separation of the free and bound forms of the protein. We showed that the hyphenation in nondenaturing conditions of this CE separation with ESIMS in positive ionization mode allowed the MS identification of the noncovalent complex. The mass determination of the noncovalent complex ions led to the binding stoichiometry. In addition, the

(8) Imberty, A.; Perez, S. *Chem. Rev.* 2000, 100, 4567–4588.

(9) Heegaard, N. H. H.; Nilsson, S.; Guzman, N. A. *J. Chromatogr., B Biomed. Sci. Appl.* 1998, 715, 29–54.

(10) Tissot, B.; Montidargent, B.; Chevotot, L.; Varenne, A.; Descroix, S.; Gareil, P.; Daniel, R. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1651, 5–16.

(11) Varenne, A.; Gareil, P.; Collic-Jousuit, S.; Daniel, R. *Anal. Biochem.* 2003, 315, 152–159.

(12) Zaia, J. *Mass Spectrom. Rev.* 2004, 23, 161–227.

(13) Chai, W.; Luo, J.; Lim, C. K.; Lawson, A. M. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2060–2066.

(14) Desaire, H.; Leary, J. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000, 11, 916–920.

(15) Kim, Y. S.; Ahn, M. Y.; Wu, S. J.; Kim, D. H.; Toida, T.; Teesch, L. M.; Park, Y.; Yu, G.; Lin, J.; Linhardt, R. J. *Glycobiology* 1998, 8, 869–877.

(16) Thanawiroon, C.; Rice, K. G.; Toida, T.; Linhardt, R. J. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 2608–2615.

(17) Toshihazu Minamisawa, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 1788–1796.

(18) Siegel, M. M.; Tabei, K.; Kagan, M. Z.; Vlahov, I. R.; Hileman, R. E.; Linhardt, R. J. *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 760–772.

(19) Veenstra, T. D. *Biophys. Chem.* 1999, 79, 63–79.

(20) Daniel, J. M.; Friess, S. D.; Rajagopalan, S.; Wendt, S.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* 2002, 216, 1–27.

(21) Wahl, J. H.; Goodlett, D. R.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. *Electrophoresis* 1993, 14, 448–457.

(22) Cao, P.; Moini, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 864–870.

(23) Wetterhall, M.; Palmblad, M.; Hakansson, P.; Markides, K. E.; Bergquist, J. *J. Proteome Res.* 2002, 1, 361–366.

(24) Smyth, W. F. *Electrophoresis* 2006, 27, 2051–2062.

(25) Soga, T.; Ohashi, Y.; Ueno, Y.; Naraoka, H.; Tomita, M.; Nishioka, T. *J. Proteome Res.* 2003, 2, 488–494.

(26) Liang, A. Y.; Chao, Y. P.; Liu, X. J.; Du, Y. G.; Wang, K. Y.; Qian, S. J.; Lin, B. C. *Electrophoresis* 2005, 26, 3460–3467.

(27) Duteil, S.; Gareil, P.; Girault, S.; Mallet, A.; Feve, C.; Siret, L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 1889–1898.

(28) Kuhn, A. V.; Ruttinger, H. H.; Neubert, R. H. H.; Raith, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 576–582.

(29) Zamfir, A.; Seidler, D. G.; Kresse, H.; Peter-Katalinic, J. *Glycobiology* 2003, 13, 733–742.

(30) Tissot, B.; Salpin, J.-Y.; Martinez, M.; Gaigeot, M.-P.; Daniel, R. *Carbohydr. Res.* 2006, 341, 598–609.

(31) Brenner-Weiss, G.; Kirschhofer, F.; Kuhl, B.; Nusser, M.; Obst, U. *J. Chromatogr., A* 2003, 1009, 147–153.

(32) Yu, Y.; Sweeney, M. D.; Saad, O. M.; Leary, J. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, 17, 524–535.

(33) Gunnarsson, K.; Valtcheva, L.; Hjerten, S. *Glycoconjugate J.* 1997, 14, 859–862.

(34) Tuong, A. U. F.; Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Picard, C. *Carbohydr. Lett.* 1994, 1, 55–60.

(35) Ragazzi, M.; Ferro, D. R.; Perly, B.; Sinay, P.; Petitou, M.; Choay, J. *Carbohydr. Res.* 1990, 195, 169–185.

(36) Klampfl, C. W. *Electrophoresis* 2006, 27, 3–34.

(37) Simo, C.; Cifuentes, A. *Comprehensive Anal. Chem.* 2005, 45, 441–517.

on-line MS characterization of the protein-bound carbohydrate was investigated through the dissociation of the complex in the electrospray source and the subsequent MS analysis of the dissociated sulfated oligosaccharide in negative ionization mode.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Procedures. Human antithrombin was purchased from Hyphen Bio Med (Neuville-sur-Oise, France) and was filtered on G-50 microcolumns (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) equilibrated with 30 mM ammonium hydrogenocarbonate (Sigma, Steinheim, Germany), pH 8.5. Heparin pentasaccharide (*M*, 1508) was a generous gift from Sanofi Synthelabo (Toulouse, France). For the purpose of analysis of the protein/carbohydrate complex, antithrombin was incubated with heparin pentasaccharide for 1 h at room temperature in 30 mM ammonium hydrogenocarbonate, pH 8.5. Other chemicals and reagents were obtained from commercial sources at the highest purity available. All buffers and solutions were prepared using ultrapure water (Milli-Q, Millipore, Milford, MA) and degassed by filtration through 0.2- μ m filter units before use.

Capillary Electrophoresis. CE experiments were performed with a HP^{3D}CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a built-in diode array detector and a power supply able to deliver up to 30 kV. Bare fused-silica capillaries of 75- μ m i.d. (360- μ m o.d.) were from Phymep (Paris, France). Detection was monitored by UV absorbance at 200 and 280 nm. The temperature inside the capillary cartridge was set at 25 °C. The separation electrolyte for CE and CE-MS consisted of 30 mM ammonium hydrogenocarbonate, pH 8.5. Data were handled by HP Chemstation software.

For CE-only experiments, the capillary was of 35-cm total length (26.5 cm to the UV detector). New capillaries were conditioned by successive flushes (5 min each, 920 mbar pressure) with 1 and 0.1 M sodium hydroxide and then with water. Prior to each injection, the capillary was rinsed with the separation electrolyte for 5 min at 920 mbar. After each separation, the capillary was successively washed with water, 0.1 M sodium hydroxide, and water for 2 min per step. For zone electrophoresis experiments, the injection protocol was composed of four successive hydrodynamic injections: the neutral marker benzyl alcohol (30 mbar for 2 s), the separation electrolyte (30 mbar for 2 s), the sample (50 mbar for 2 s), and the separation electrolyte (30 mbar for 2 s). For frontal analysis continuous CE experiments, the injection protocol was as follows: the hydrodynamic injection of the neutral marker benzyl alcohol and the separation electrolyte (30 mbar for 2 s each), followed by the continuous electrokinetic sample injection under a positive voltage of 15 kV (electric field, 430 V·cm⁻¹). The electrophoretic mobility was measured at the inflection point of the migration front.

When coupled to MS, the CE experiments were carried out using capillaries of 98-cm total length (21.5 cm to the UV detector). Conditioning steps and injection protocols were the same as those described above for CE-only experiments, using however longer times for conditioning (15 min/step), equilibration between injection (10 min), and washing (5 min/step). For zone experiments, sample injection time was raised to 5 s. For frontal experiments, the electrokinetic injection (+20 kV) of the sample was performed either for 2 min or continuously. The separation

was performed under a positive voltage of 20 kV (electric field, 200 V·cm⁻¹).

Mass Spectrometry. Mass spectrometry was carried out with an Esquire 3000+ ESI source ion trap mass spectrometer, using Esquire Control software versions 5.1 (Bruker Daltonics, Wismesbourg, France). Mass spectra were processed and recorded using Data Analysis software versions 5.1 (Bruker Daltonics). The drying gas (nitrogen) temperature was maintained at 100 °C, with a flow rate of 3 L·min⁻¹. The nebulizing gas (nitrogen) pressure was optimized at 5 psi. The instrument was calibrated using standards ES tuning mix (Bruker Daltonics) as external mass standard in positive and negative modes. According to mass range, scan mass spectra were obtained in standard mode (50–3000 *m/z*) or in extended mode (200–6000 *m/z*). Data acquisition was performed in the standard resolution mode with a scan speed of 13 000 *m/z* per second.

Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry. Agilent ChemStation software was used for the entire system control, data acquisition, and data analysis. The CE capillary was connected to the mass spectrometer using a coaxial sheath-flow interface G1607A (Agilent Technologies). The capillary effluent was mixed either with organic, hydroorganic, or aqueous sheath liquid using a syringe pump (74900 series, Cole-Palmer).

MS detection in denaturing conditions was performed either in positive or in negative ionization mode. For MS detection in positive ionization mode, sheath liquid consisted of 60:40 (v/v) water/acetonitrile with 1% formic acid and was delivered at a flow rate of 3 μ L·min⁻¹. The target mass was optimized at 2000 *m/z*. Other parameters were optimized in order to get the best signal/noise ratio. For MS detection in negative ionization mode, sheath liquid consisted of acetonitrile delivered at a flow rate of 4 μ L·min⁻¹. For MS detection in nondenaturing conditions, sheath liquid consisted of 10 mM ammonium acetate³⁸ (pH 6.5) delivered at a flow rate of 3 μ L·min⁻¹. The target mass was optimized at 4000 *m/z*.

RESULTS AND DISCUSSION

Generally, the formation of a biomolecular complex between a protein and a ligand leads to the modification of the protein electrophoretic mobility. In affinity CZE, the complex formation is detected by a shift of the protein peak.¹¹ In FACE, this formation leads to an extra migration front, in addition to the fronts corresponding to the free protein and free ligand.³⁹ For the purpose of characterization of the protein/carbohydrate complex using the hyphenation of CE with MS, we choose to perform CE analysis in the frontal mode. Indeed, although the frontal mode has not been described for the CE-MS coupling, this mode may offer a better sensitivity for MS detection due to the integration of the total ion current (TIC) over a longer time. This study was applied to the complex of antithrombin with the sulfated pentasaccharide reproducing the antithrombin-binding sequence in heparin, as the prototype of protein/carbohydrate complex.

Frontal Analysis Capillary Electrophoresis of the Antithrombin/Heparin Pentasaccharide Complex. Antithrombin (4 μ M) was preincubated with the sulfated pentasaccharide in

(38) Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 6294–6296.

(39) Gao, J. Y.; Dubin, P. L.; Muhoberac, B. B. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2945–2951.

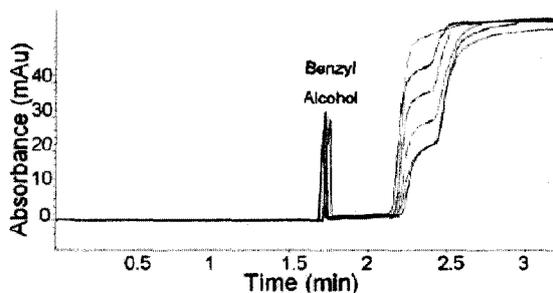


Figure 1. Frontal analysis capillary electrophoresis of the antithrombin/heparin pentasaccharide interaction. Antithrombin ($4 \mu\text{M}$) was incubated with heparin pentasaccharide at concentration ranging from 0 to $16 \mu\text{M}$. CE conditions: bare fused-silica capillary, $75 \mu\text{m}$ i.d. \times 35 cm (26.5 cm to detector); separation electrolyte, 30 mM ammonium hydrogenocarbonate, pH 8.5; voltage, $+15 \text{ kV}$; temperature, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; continuous electrokinetic injection, $+15 \text{ kV}$; UV absorbance detection at 200 nm .

molar ratios ranging from 0.25 to 2. The mixture was then electrokinetically injected under a counter-electroosmotic migration mode. The corresponding electropherograms (Figure 1) showed two fronts. The first one was attributed to antithrombin based on its electrophoretic mobility at inflection point ($\mu_{\text{ep}} = -14 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), which was equal to the mobility of the free protein determined in CZE in the same electrolyte. The second front migrated slowly ($\mu_{\text{ep}} = -18 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at inflection point) as expected for the antithrombin/pentasaccharide complex. This second front and its subsequent plateau represent the free and bound forms of antithrombin in equilibrium. The electrophoretic mobility of the heparin pentasaccharide was much higher ($\mu_{\text{ep}} = -40 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, data not shown) reflecting its strong anionic nature. Migrating thus much more slowly than the protein toward the cathode outlet, only pentasaccharide interacting with antithrombin could be present under the beginning of the second front. The height of the first front corresponding to the concentration of the noncomplexed antithrombin decreased upon increasing concentration of pentasaccharide, which enabled us to determine a binding constant of $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ between the protein and the oligosaccharide in agreement with previous determinations based on a 1:1 complex.⁴⁰

Zone versus Frontal Analyses in CE-MS Experiments.

Almost all the CE-MS applications reported so far have been carried out in the zone format of CE. We have investigated the suitability of the frontal CE format for CE-MS coupling for the purpose of noncovalent complex characterization. CZE-MS and FACE-MS experiments were first performed with antithrombin in denaturing conditions using a water/acetonitrile/formic acid sheath liquid. For the sake of comparison, the protein was analyzed at two concentrations (6 and $12 \mu\text{M}$) and the TIC was integrated over the same period of time (i.e., 30 s) in CZE mode (corresponding to the whole CE peak base) and in FACE mode (corresponding to the beginning of the migration front). At $6 \mu\text{M}$, ions were barely visible on the mass spectrum in CZE mode (Figure 2a), whereas an envelope containing 8 ions with a charge distribution from $+38$ (m/z 1524) to $+31$ (m/z 1857) appeared

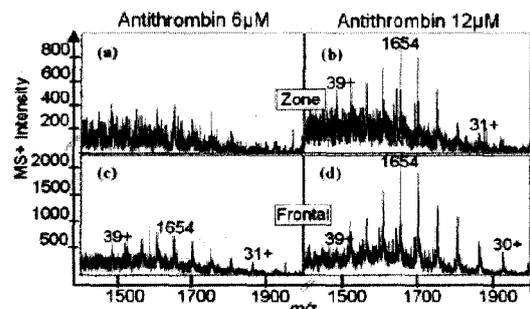


Figure 2. Comparison of ESI⁺ mass spectra of antithrombin acquired in CZE-MS coupling ((a) 6 and (b) $12 \mu\text{M}$) and FACE-MS coupling ((c) 6 and (d) $12 \mu\text{M}$). CE conditions: bare fused-silica capillary, $75 \mu\text{m}$ i.d. \times 98 cm length; separation electrolyte, 30 mM ammonium hydrogenocarbonate, pH 8.5; voltage, $+15 \text{ kV}$; temperature, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; sample injection, 50 mbar , 10 s (CZE) or continuous electrokinetic injection, $+15 \text{ kV}$ (FACE). MS conditions, target mass 2000 m/z . Sheath liquid, water/acetonitrile (60:40 v/v) with 1% formic acid, flow rate, $3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

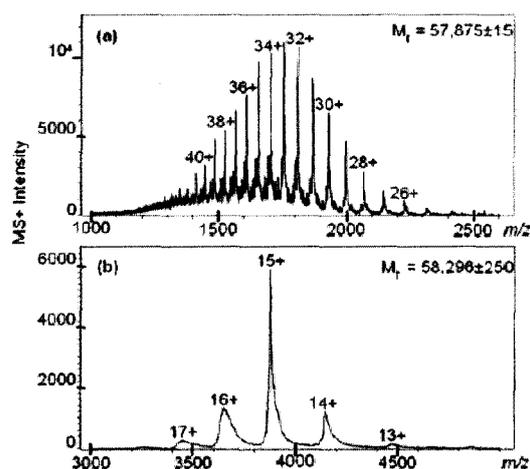


Figure 3. FACE-ESI⁺ mass spectra of $15 \mu\text{M}$ antithrombin in (a) denaturing and (b) nondenaturing conditions. (a) CE and MS conditions as in Figure 2 for FACE-MS coupling. (b) CE conditions as in Figure 2 for FACE-MS coupling. MS nondenaturing conditions: sheath liquid, 10 mM ammonium acetate, pH 6.5, flow rate, $3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, target mass, 4000 m/z .

on the mass spectrum in FACE mode (Figure 2c). At $12 \mu\text{M}$, the mass spectrum in CZE mode exhibited an envelope containing nine ions with a charge distribution from $+39$ (m/z 1485) to $+31$ (m/z 1857) (Figure 2b), whereas 10 ions appeared on the spectrum in FACE mode with a charge distribution from $+39$ (m/z 1485) to $+30$ (m/z 1929) (Figure 2d). The CZE mode led to less resolved mass spectra, whereas more sensitive and exploitable spectra were obtained in FACE mode at both concentrations.

Figure 3a showed the mass spectrum of $15 \mu\text{M}$ antithrombin obtained by FACE-MS using a longer time of TIC integration (2 min) so that a still better signal-to-noise ratio was obtained. The well-resolved mass spectrum acquired under these denaturing conditions showed 19 ions with a charges distribution from $+42$ (m/z 1379) to $+24$ (m/z 2411) corresponding to a molecular mass of $57\,875 \pm 15$ in agreement with literature data.⁴¹ The distribution of the protein charge states in ESI is dependent on parameters

(40) Le Saux, T.; Varenne, A.; Perreau, F.; Siret, L.; Duteil, S.; Duhau, L.; Gareil, P. *J. Chromatogr., A* 2006, 1132, 289–296.

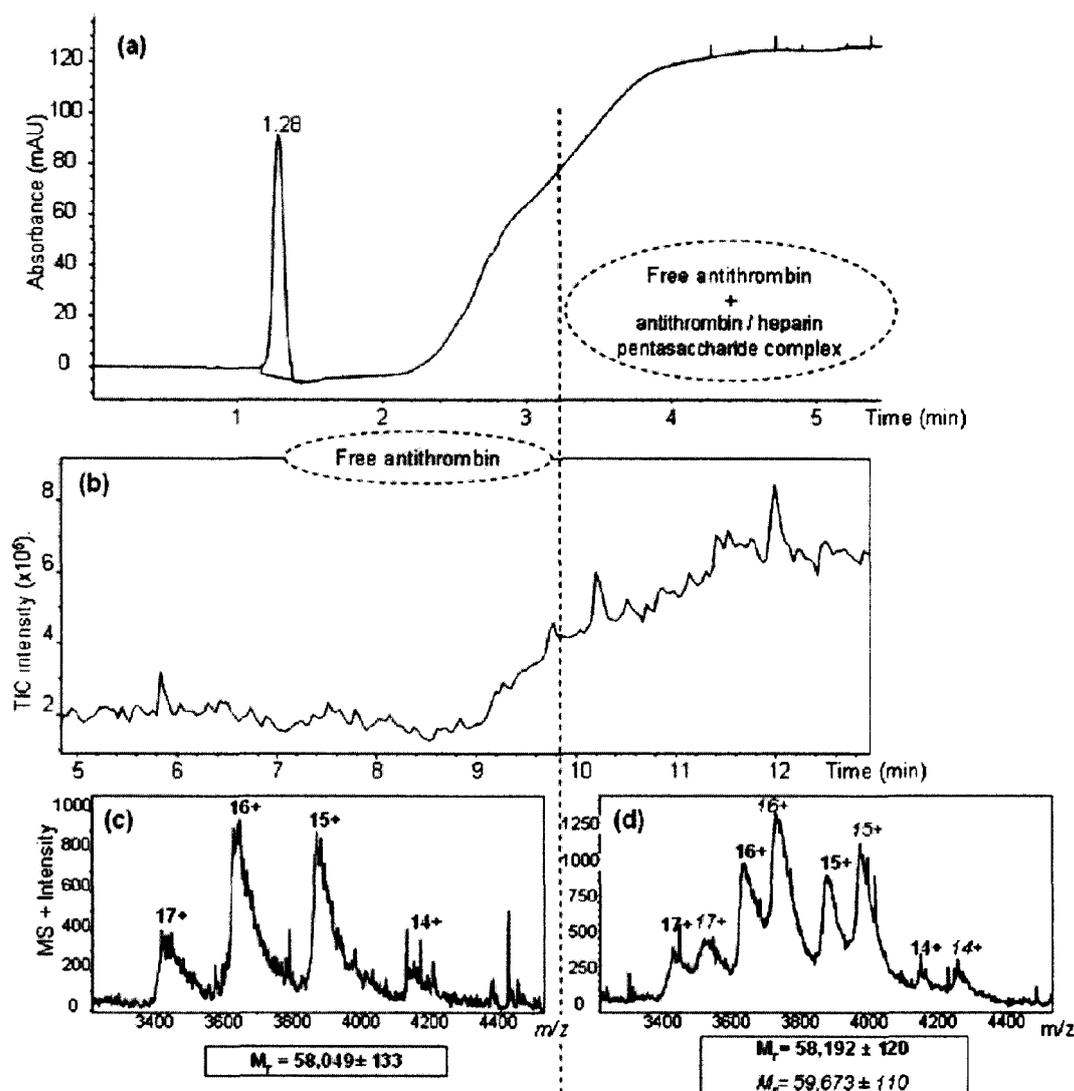


Figure 4. FACE-ESIMS of the antithrombin–heparin pentasaccharide interaction. Antithrombin and heparin pentasaccharide were incubated in a 1:1 molecular ratio (8 μM each). (a) UV absorbance electropherogram; (b) total ion current; (c) mass spectrum integrated over 9–10 min time range, and (d) mass spectrum integrated over 10–12 min time range. Antithrombin M_r in boldface type. Antithrombin/heparin pentasaccharide complex M_r in italic type. CE conditions: bare fused-silica capillary, 75 μm i.d. \times 98 cm length; separation electrolyte, 30 mM ammonium hydrogenocarbonate, pH 8.5; voltage, +20 kV; temperature, 25 $^\circ\text{C}$; continuous electrokinetic injection, +20 kV; UV absorbance detection at 200 nm. MS conditions: target mass, 4000 m/z ; sheath liquid, 10 mM ammonium acetate, pH 6.5, flow rate, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

such as pH value and organic content, and its variation reflects changes in protein structure.^{42–45} The hydroorganic sheath liquid used in the first set of experiments led to the denaturation of the protein as shown by the range of the charge distribution. Hence, it should not preserve noncovalent complexes upon electrospray ionization. The characterization of the protein/carbohydrate

complex required a soft desolvation using an aqueous sheath liquid compatible with ESIMS. Therefore, a second set of FACE–MS experiments was carried out using aqueous 10 mM ammonium acetate as sheath liquid. In these conditions, the obtained spectrum (Figure 3b) showed only five peaks centered at about twice-lower charge state, i.e., +15 ($m/z \approx 3980$) (with a charge distribution from +17 to +13) than when using a denaturing sheath liquid (Figure 3a). Consistently, the range of m/z ratio of detected ions was shifted from m/z 1350–2500 to 3400–4600. Hence, less protein sites were exposed for protonation in these aqueous conditions, indicating a protein conformation close to its native state. The molecular mass of $58\,296 \pm 250$ determined in

- (41) Roemisch, J.; Gray, E.; Hoffmann, J. N.; Wiedermann, C. J. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 2002, 13, 657–670.
 (42) Loo, J. A.; Ogorzalek-Loo, R. R.; Udseth, H. R.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5, 101–105.
 (43) Mirza, U. A.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2898–2904.
 (44) Mirza, U. A.; Cohen, S. L.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* 1993, 65, 1–6.
 (45) Vis, H.; Heinemann, U.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 6427–6428.

Table 1. Assignment of Heparin Pentasaccharide Ions of General Formula $[M - 2H^+ - ySO_3 + xNa^+ - xH^+]^{2-}$ Detected Either by Direct Infusion of the Heparin Pentasaccharide (Boldface) or by FACE-MS of the Antithrombin/Heparin Pentasaccharide Complex (Italic)^a

ySO_3	xNa^+	$x = 0$	$x = 1$	$x = 2$	$x = 3$	$x = 4$	$x = 5$	$x = 6$	$x = 7$	$x = 8$
$y = 0$		<i>m/z</i> 753.6	<i>m/z</i> 762.1	<i>m/z</i> 774.4 <i>m/z</i> 785.4	<i>m/z</i> 785.2 <i>m/z</i> 796.9	<i>m/z</i> 796.1	<i>m/z</i> 807.1	<i>m/z</i> 818.1	<i>m/z</i> 829.1	<i>m/z</i> 840.1
$y = 1$		nd	<i>m/z</i> 722.9	<i>m/z</i> 782.7	<i>m/z</i> 793.6	nd ^b	nd	nd	nd	nd
$y = 2$		<i>m/z</i> 672.0	<i>m/z</i> 683.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
$y = 3$		<i>m/z</i> 632.0	<i>m/z</i> 643.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
$y = 4$		<i>m/z</i> 592.1	<i>m/z</i> 603.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
$y = 5$		<i>m/z</i> 552.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
$y = 6$		<i>m/z</i> 512.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a This table indicates sodium adduct ions (horizontally) and sulfate losses (vertically). ^b nd, not detected.

this experiment was slightly higher than the one determined in denaturing conditions, likely due to salt adducts. It should be noted that all the CE-MS analyses of proteins reported so far concerned proteins of smaller size ($M_r < 20\,000$) and were mainly performed in denaturing conditions.^{36,37} These results showed that FACE-MS using nondenaturing aqueous sheath liquid allowed the analysis of higher molecular mass proteins in native conformation.

FACE-MS Characterization of the Antithrombin/Pentacaccharide Complex. FACE-MS experiment using the preceding nondenaturing conditions was then used to characterize the protein in its complexed state with the synthetic sulfated pentasaccharide. Antithrombin and heparin pentasaccharide were preincubated at equimolar concentrations (8 μ M) leading to two well-distinct plateaus of comparable height in FACE-UV experiments (Figure 1). As compared to noncoupled CE experiments, the electropherogram obtained with UV detection in FACE coupled to MS exhibited two migration fronts that were less resolved (Figure 4a), likely due to a siphon effect caused by the nebulizing gas flow, as previously reported.⁴⁶ Based on the electrophoretic mobilities of the free and bound forms of antithrombin, these fronts were attributed respectively to the free protein for the first one, and to the complexed protein in equilibrium for the second one. The TIC recorded in the positive ionization mode exhibited a signal increase starting at 9 min (Figure 4b), corresponding to the first electrophoretic front, given the electrophoretic migration velocity. Furthermore, a second TIC increase was observed starting at ~ 10 min, which was attributed to the second migration front. The first TIC increase integrated between 9 and 10 min led to the extracted mass spectrum shown in Figure 4c. It exhibited four peaks at +17 to +14 charge states corresponding to the spectrum of the native antithrombin. A molecular mass of M_r 58 049 \pm 133 was derived from this spectrum, in accordance with the value determined above for the free protein under nondenaturing conditions. The integration of TIC between 10 and 12 min, corresponding to the second migration front, led to a mass spectrum exhibiting two peak distributions (Figure 4d). One distribution corresponds to the free antithrombin (M_r 58 192 \pm 120), while the other one is shifted toward higher m/z range. A molecular weight of 59 673 \pm 110 was determined for this second distribution, which represents a mass increase of 1482 \pm 26, very close to the mass of the sulfated

pentasaccharide (M_r 1508). This second peak distribution can therefore be attributed to the antithrombin-pentacaccharide complex, which confirmed the assignment of the second migration front to the noncovalent complex. As this complex was detected at charge states corresponding to the nondenatured protein, it can be inferred that the antithrombin-pentacaccharide interactions were preserved in the electrospray gas phase. In addition, the mass shift indicated the binding of one pentasaccharide molecule per antithrombin molecule, in agreement with previous determination of the stoichiometry of this protein/carbohydrate complex.³⁴

FACE-MS Characterization of the Dissociated Oligosaccharide Ligand. As CE allowed the separation of bound from unbound carbohydrate species, its hyphenation with MS opened the way to the on-line characterization of the specifically bound carbohydrate ligand in the noncovalent complex. For this purpose, the dissociation of the complex in the electrospray source was required. This dissociation was achieved by denaturing conditions using acetonitrile as sheath liquid. Under these conditions, the FACE-MS characterization of the antithrombin-pentacaccharide complex led to a mass spectrum in positive ionization mode exhibiting a charge-state distribution (data not shown) that corresponded to denatured antithrombin as observed in Figure 3a. Especially, no mass increase was observed, indicating that the detected protein was devoid of bound oligosaccharide. This result evidenced that the noncovalent complex carried through the capillary was dissociated upon its mixing with the solvent sheath liquid and its subsequent desolvation in the ESI source. In an attempt to detect the sulfated pentasaccharide associated with the protein, the MS analysis was also performed in negative ionization mode. Unfortunately, the MS signal obtained was of low intensity within the concentration range (1–10 μ M) used for the sulfated oligosaccharide. This result prompted us to carry out experiments using a higher concentration of interacting species (40 μ M). Figure 5 shows the negative ionization mass spectrum extracted from the TIC region that matched with the second migration front corresponding to the complex. The spectrum displayed doubly charged ions that were attributed to the deprotonated intact sulfated pentasaccharide and partially desulfated pentasaccharide. The intact pentasaccharide appeared as sodium adducts at m/z 785.4 $[M - 5H^+ + 3Na^+]^{2-}$ and m/z 796.9 $[M - 6H^+ + 4Na^+]^{2-}$. The desulfated species, corresponding to ions of the general formula $[M - 2H^+ - nSO_3]^{2-}$, provided the major ions of the

(46) Huikko, K.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1562–1568.

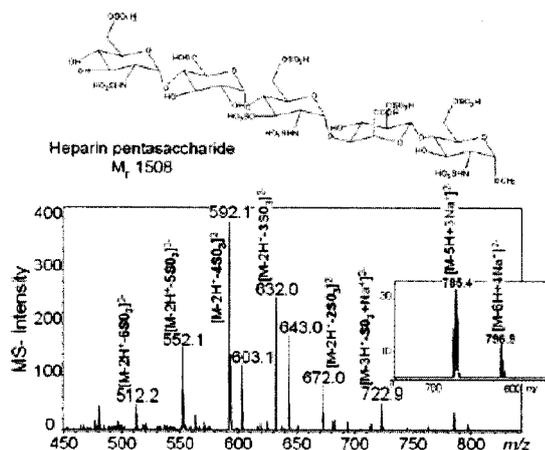


Figure 5. FACE-ESI⁻ mass spectrum of the sulfated oligosaccharide bound to antithrombin. Antithrombin and heparin pentasaccharide were incubated in a 1:1 molecular ratio (40 μ M). CE conditions as in Figure 4, excepted for electrokinetic sample injection, +20 kV for 2 min. MS conditions: target mass, 2000 m/z , sheath liquid, acetonitrile, flow rate, 3 μ L \cdot min⁻¹.

spectrum, the sulfate loss ranging from one to six sulfate groups. In fact, desulfation is a well-known fragmentation reaction occurring during electrospray ionization of sulfated carbohydrates.⁴⁷ It should be noted that the MS spectrum of the directly infused pentasaccharide did not exhibit desulfated ions and that sodium and ammonium adducts of the pentasaccharide were mainly observed (Table 1).

CONCLUSION

The binding of the bioactive glycosaminoglycans (GAGs) is critical for in vivo function of protein effectors such as growth factors and chemokines. Notwithstanding the importance of this binding property, identification of GAG sequences and understanding of the mechanism by which they ensure the specific binding to target protein are limited by the complex biosynthesis and the structural diversity of these polysaccharides. The ongoing progress toward knowledge of the role of carbohydrates in biology

raises a strong demand for methods allowing isolation and direct sequencing of specific protein-binding oligosaccharides. Several strategies based on affinity chromatography or microarray assays have been reported in an attempt to identify potential oligosaccharide binders. However, these methods suffered from several limitations, such as large amount of pure and structurally defined oligosaccharides. New approaches based on mass spectrometry have been recently implemented for the detection of specific oligosaccharide ligands.^{32,48} The hyphenation of FACE with ESIMS described for the first time in this report greatly minimizes all the sample handlings. The label-free approach reported herein allowed the direct characterization of complex formation and on-line structural determination of the oligosaccharide ligand without the need for preliminary isolation and purification steps. The protein and the oligosaccharides were allowed to interact freely in solution without previous chemical modification or immobilization. Then, the reaction mixture was loaded into the capillary at the anodic inlet without prior purification. Because of their anionic charge, the unbound sulfated oligosaccharides contained in the reaction mixture migrated very slowly toward the cathodic outlet connected to the ESI source. This electrophoretic behavior allowed the CE separation of the bound oligosaccharides without resorting to chromatographic or filtration steps. The present results demonstrate that frontal mode improved MS signal-to-noise ratio and was thus well suited for hyphenation. Thanks to tuning of the sheath liquid conditions, it was possible to perform the on-line MS analysis of either the intact noncovalent complex or each of the complex partners. The stoichiometry was determined from the mass of the noncovalent complex. The structural characterization of the carbohydrate that binds a specific protein could be performed through the dissociation of the complex in the electrospray source and MS detection of the sulfated oligosaccharide. This ligand-fishing strategy opens the way to the identification of discrete, biologically active oligosaccharide sequences contained in heterogeneous mixtures.

ACKNOWLEDGMENT

R.D. acknowledges Génopole-France for funding through an ATIGE 'Action Incitative de Génopole'.

Received for review January 24, 2007. Accepted April 20, 2007.

AC070146H

(47) Zaia, J.; Costello, C. E. *Anal. Chem.* 2001, 73, 233–239.

(48) Keiser, N.; Venkataraman, G.; Shriver, Z.; Sasisekharan, R. *Nat. Med.* 2001, 7, 123–128.



Notes & Tips

The polyethylene oxide capillary coating is compatible with capillary electrophoresis–mass spectrometry analysis of basic proteins

Soraya Fermas, Régis Daniel, Florence Gonnet *

Université d'Evry-Val-d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France
CNRS, UMR5587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France

Received 29 June 2007

Available online 21 September 2007

Aside from the well-established liquid chromatography–mass spectrometry coupling, the coupling of capillary electrophoresis (CE)¹ with electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) during recent years has become a reliable alternative with progress in instrumentation and interface, leading to an increasing number of applications reported in the literature, especially in the field of small molecules, metabolomics, and proteomics [1]. The high sensitivity of ESIMS allows detection of the low amounts of analytes inherent to CE. In addition, the possibility to perform online tandem mass spectrometry (MS/MS) is a powerful tool for structure determination. Recently, we showed that CE–ESIMS was also well suited for biomolecular interaction analysis [2].

CE–ESIMS of basic proteins deals, as in CE analysis, with the problem of adsorption onto the capillary wall due to interaction between the positively charged groups of proteins and the negatively charged silanol groups of the capillary silica surface. This is particularly true of basic proteins, which are strongly cationic at the neutral pH values usually employed in CE analysis. Masking the surface silanols by merely using a coating procedure can minimize protein–capillary surface interactions. Several strategies have been reported based on charged or neutral polymers adsorbed or chemically attached to the capillary surface [3]. These strategies have been applied to CE–MS analysis recently, but most of them require time-consuming prepa-

ration and derivatization of the coated polymer to make the coating compatible with mass spectrometric detection [4–7].

We report here a simple, fast, and cheap coating procedure compatible with online MS detection using a high-molecular-weight polyethylene oxide (PEO) from a commercial source. A previous study showed that PEO adsorbs onto the surface of fused silica capillaries, forming an energetically stable coating [8]. This PEO coating was used for the analyses by CE of basic proteins and of their non-covalent interactions [8,9]. It is worth mentioning that this neutral coating decreases the electroosmotic flow considerably, whereas an electrolyte flow from the capillary outlet into the ionization source is required to get a stable spray and perform MS detection in CE–MS experiments. In this study, we describe easily implemented conditions that circumvent these limitations and allow the CE–MS analysis of basic proteins using a dynamic coating with PEO and a pressure-assisted CE separation.

We selected PEO of M_r 200,000 from a commercial source to perform a neutral dynamic coating. We found that high-molecular-weight PEO does not interfere with online mass spectrometric detection, whereas the presence in samples of PEO molecules of molecular weight ranging from 400 to 8000 has been reported to lead to ion signal suppression and affects the MS detection [10]. A 2.2-mg/ml PEO solution (M_r 200,000, Sigma–Aldrich) was prepared in water under stirring and moderate heating. For coating, the PEO solution was diluted with 1 M HCl to obtain a 2-mg/ml PEO solution in 0.1 M HCl. Bare fused silica capillaries (Phymep, Paris, France), 50 or 75 μ m i.d. as specified (360 μ m o.d.), were conditioned by successive 15-min flushes (1 bar) with water, 1 M NaOH, 1 M HCl, and water. Dynamic PEO coating was carried out prior to each sample injection; the capillary was rinsed with water for

* Corresponding author. Address: Université d'Evry-Val-d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, CNRS UMR 8587 Bd François Mitterrand 91025 Evry Cedex. Fax: +33 1 69 47 7655.

E-mail address: florence.gonnet@univ-evry.fr (F. Gonnet).

¹ Abbreviations used: CE, capillary electrophoresis; ESIMS, electrospray ionization mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; PEO, polyethylene oxide; NM, neutral marker; TIC, total ion current.

2 min, 1 M HCl for 10 min, 2 mg/ml PEO solution for 15 min, and the separation electrolyte, 75 mM ammonium acetate (pH 6.5), for 5 min. After each separation, the capillary was washed with water, 0.1 M NaOH, and water for 5 min per step. All of these conditioning and rinsing steps were performed with the capillary outlet disconnected from the mass spectrometer.

The CE-MS experiments were performed with a Hewlett-Packard^{3D}CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and an Esquire 3000+ ESI source ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The CE capillary of 98 cm total length (21.5 cm to the UV detector) was connected to the mass spectrometer using a coaxial sheath-flow interface G1607A (Agilent Technologies). The capillary effluent was mixed with 10% methanol in water using a syringe pump at a flow rate of 3 μ l/min. The drying gas (nitrogen) temperature was maintained at 100 °C with a flow rate at 5 L/min. Nebulizing gas (nitrogen) pressure was optimized at 10 psi. ESI mass spectra were obtained in positive ionization mode.

These CE-MS conditions were applied to the analysis of the following basic proteins: aprotinin (bovine lung, Sigma, MW 6511 g.mol⁻¹, pI 9.1), cytochrome *c* (bovine heart, Sigma, MW 12,232 g.mol⁻¹, pI 9.6), and chymotrypsinogen A (bovine pancreas, Sigma, MW 25,656 g.mol⁻¹, pI 9.1). A 20- μ M solution was prepared for each protein in the separation electrolyte (75 mM ammonium acetate, pH 6.5). The protocol for sample injection was composed of two hydrodynamic injections: the sample (50 mbar for 30 s) and the separation electrolyte (30 mbar for 5 s). Nebulizing gas was stopped during the injection to minimize the siphon effect and obtain reproducible injections. Separations were performed under a positive voltage of +10 kV (electric field \sim 100 V/cm). Furthermore, a constant hydrostatic pressure (15–50 mbar) was applied at the capillary inlet throughout the analysis to compensate for the loss of electroosmotic flow due to the neutral coating. The capillary electrophoresis separation was performed at a controlled temperature set at 25 °C. For the sake of comparison, a CE-MS analysis of cytochrome *c* was also performed using a noncoated capillary. In this case, no pressure was applied during the analysis and the injection protocol was composed of four hydrodynamic injections: cytochrome *c* (50 mbar for 30 s), the separation electrolyte (30 mbar for 2 s), benzyl alcohol (50 mbar for 5 s) as a neutral marker (NM), and the separation electrolyte (30 mbar for 2 s). All other conditions were the same as given previously except for nebulizing gas pressure optimized at 3 psi. In these conditions, cytochrome *c* was not detected on the UV absorbance electropherogram or by the mass spectrometer due to its adsorption onto the capillary wall. The NM benzyl alcohol was the only species detected on the UV absorbance electropherogram (Fig. 1A).

When using the PEO coating, we determined that a minimal pressure of 10 mbar was required to stabilize the spray. The following experiment was performed by apply-

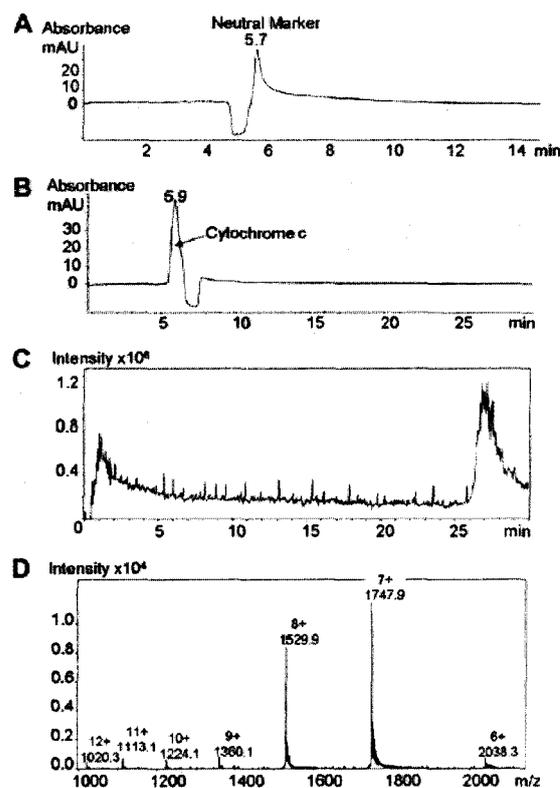


Fig. 1. Cytochrome *c* analyses by CE-MS: (A) UV electropherogram (200 nm) using an uncoated capillary; (B) UV electropherogram (200 nm) using a PEO-coated capillary; (C) TIC; (D) ESI mass spectrum in positive ionization mode (integration of the TIC over 27–30 min). Cytochrome *c* (20 μ M) was injected into the separation electrolyte (75 mM ammonium acetate, pH 6.5). CE conditions for panel A: bare fused silica capillary, 50 μ m i.d. \times 98 cm (21.5 cm to detector); voltage, +10 kV; temperature, 25 °C. CE conditions for panels B to D: dynamic PEO-coated bare fused silica capillary; constant hydrostatic pressure, +15 mbar; other conditions same as in panel A. MS conditions for panel A: target mass, 2000 m/z ; sheath liquid, methanol/water (10:90, v/v) at a flow rate of 3 μ l/min; nebulizing gas, 3 psi; drying gas, 5 L/min. MS conditions for panels B to D: nebulizing gas, 10 psi; other conditions same as in panel A.

ing a constant hydrostatic pressure of 15 mbar. In these conditions, the UV electropherogram (UV detector at 21 cm from the capillary inlet) of cytochrome *c* showed a peak at $t_{CE} = 5.9$ min (Fig. 1B), corresponding to a peak of total ion current (TIC) at $t_{MS} = 27$ min (Fig. 1C). Fig. 1D represents the ESI mass spectrum obtained in positive mode by integrating the TIC signal from 27 to 30 min. The mass spectrum exhibits an envelope containing seven ions with a charge distribution from +12 (m/z 1020) to +6 (m/z 2038). The deconvolution of this multicharged ion envelope gives an experimental value of $12,230 \pm 3$ g.mol⁻¹, in agreement with the molecular weight of cytochrome *c*. Using a higher constant hydrostatic pressure of 50 mbar, the maximal pressure value allowed by the HP^{3D}CE apparatus, MS detection of cytochrome *c* was

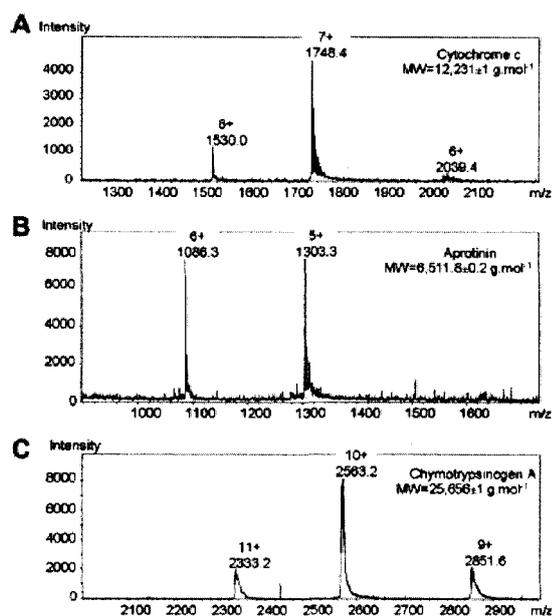


Fig. 2. Mass spectra of basic proteins analyzed by CE-MS using PEO dynamic coating: (A) cytochrome *c*; (B) aprotinin; (C) chymotrypsinogen A. Proteins (20 μ M) were injected into the separation electrolyte (75 mM ammonium acetate, pH 6.5). CE conditions: dynamic PEO-coated bare fused silica capillary, 75 μ m i.d. \times 98 cm (21.5 cm to detector); voltage, +10 kV; temperature, 25 $^{\circ}$ C; constant hydrostatic pressure, +15 mbar. MS conditions: target masses, 2000 m/z (A), 1500 m/z (B), 2500 m/z (C); sheath liquid, methanol/water (10:90, v/v) at a flow rate of 3 μ L/min; nebulizing gas, 10 psi; drying gas, 5 L/min.

performed in less than 12 min (data not shown). However, the mass spectrum obtained with this higher pressure showed only two ions at charge states 7+ and 8+ and the TIC signal was twice lower, indicating a loss of sensitivity. It is likely that the higher pressure leads to PEO pollution in the electrospray source, resulting in ion signal suppression [10].

Two other basic proteins with different molecular weights, aprotinin (MW 6511 g.mol^{-1}) and chymotrypsinogen A (MW 25,656 g.mol^{-1}), were also analyzed by CE-MS using the PEO coating. Proteins were detected on the UV absorbance electropherogram and by the mass spectrometer. ESI mass spectra (Fig. 2) showed well-resolved multicharged ion envelopes for the cytochrome *c* and the two other basic proteins. Good agreement was obtained between experimental and theoretical molecular weight values for each of the three proteins. The cytochrome *c* ESI mass spectrum (Fig. 2A) showed three ions with a charge distribution from +8 (m/z 1530) to +6 (m/z

2039), corresponding to MW $12,231 \pm 1 \text{ g.mol}^{-1}$. The aprotinin ESI mass spectrum (Fig. 2B) exhibited two ions with charges +6 (m/z 1086) and +5 (m/z 1303), corresponding to MW $6511.8 \pm 0.2 \text{ g.mol}^{-1}$. The chymotrypsinogen A ESI mass spectrum (Fig. 2C) exhibited an envelope containing three ions with a charge distribution from +11 (m/z 2333) to +9 (m/z 2852), corresponding to MW $25,656 \pm 1 \text{ g.mol}^{-1}$.

In summary, PEO dynamic coating appears to be a simple and cheap method to avoid protein adsorption on the CE capillary wall. It does not require laborious derivatization of the polymer and is dynamically regenerated by simply flushing the capillary with the PEO solution between injections. Besides, POE coating is compatible with moderate pressure in pressure-assisted CE separation, making this coating well suited for CE-MS analysis of basic proteins.

References

- [1] C.W. Klampff, Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection, *Electrophoresis* 27 (2006) 3–34.
- [2] S. Fernas, F. Gonnet, A. Varenne, P. Gareil, R. Daniel, Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4987–4993.
- [3] K. Srinivasan, C. Pohl, N. Avdalovic, Cross-linked polymer coatings for capillary electrophoresis and application to analysis of basic proteins, acidic proteins, and inorganic ions, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2798–2805.
- [4] S. Amon, A. Plematl, A. Rizzi, Capillary zone electrophoresis of glycopeptides under controlled electroosmotic flow conditions coupled to electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Electrophoresis* 27 (2006) 1209–1219.
- [5] J.R. Catai, J.S. Torano, G.J. De Jong, G.W. Somsen, Efficient and highly reproducible capillary electrophoresis–mass spectrometry of peptides using polybrene-poly(vinyl sulfonate)-coated capillaries, *Electrophoresis* 27 (2006) 2091–2099.
- [6] B. Lars, H.H. Steen, G. Bente, Capillaries modified by noncovalent anionic polymer adsorption for capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography, and capillary electrophoresis mass spectrometry, *Electrophoresis* 22 (2001) 2565–2573.
- [7] C. Simó, C. Elvira, N. González, J.S. Román, C. Barbas, A. Cifuentes, Capillary electrophoresis–mass spectrometry of basic proteins using a new physically adsorbed polymer coating: Some applications in food analysis, *Electrophoresis* 25 (2004) 2056–2064.
- [8] N. Iki, E.S. Yeung, Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 273–282.
- [9] N.T. Tran, M. Taverna, L. Miccoli, J.F. Angulo, Poly(ethylene oxide) facilitates the characterization of an affinity between strongly basic proteins with DNA by affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 26 (2005) 3105–3112.
- [10] J. Shen, A. Buko, Rapid identification of proteins in polyethylene glycol-containing samples using capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 311 (2002) 80–83.



Soraya FERMAS¹, Florence GONNET¹, Régis DANIEL¹, Anne VARENNE², Pierre GAREIL²

Intérêt du couplage de l'électrophorèse capillaire en mode frontal et de la spectrométrie de masse pour la caractérisation des complexes non-covalents glucide/protéine

RÉSUMÉ

L'étude des interactions des protéines avec des polysaccharides représente un axe majeur en glycobiologie. Une stratégie nouvelle basée sur le couplage entre l'électrophorèse capillaire en mode frontal et la spectrométrie de masse avec ionisation par électronébulisation est présentée ici, pour la caractérisation de complexes protéine/sucre. Ce couplage permet la détection en ligne de complexes non-covalents intacts, de déterminer leur stœchiométrie et de caractériser les ligands. Cette stratégie de « pêche au ligand » ouvre la voie à l'identification de sucres biologiquement actifs contenus dans les mélanges hétérogènes.

MOTS-CLÉS

Couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse, interactions non-covalentes, interactions protéine/sucre.

Interest of CE-MS coupling for the characterization of the carbohydrate/protein non-covalent complexes

SUMMARY

The study of the interaction of proteins with polysaccharides represents a major prospect in glycobiology. A new strategy based on the coupling between frontal analysis capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry is presented here for the characterization of protein/carbohydrate complexes. This coupling makes possible the on-line detection of the intact non-covalent complex, allowing to determine the stoichiometry of the complex and to characterize the ligand. This "ligand fishing" strategy opens the way to the identification of bioactive oligosaccharides from heterogeneous carbohydrate mixtures.

KEYWORDS

Capillary electrophoresis-mass spectrometry coupling, non-covalent interactions, protein/carbohydrate interactions

1 - Introduction

Les avancées récentes de la glycobiologie ont amené à reconnaître les polysaccharides comme les acteurs de processus biologiques essentiels. On les trouve impliqués dans les mécanismes de communication, de différenciation et de développement cellulaire, mais aussi dans des processus pathologiques tels que la cancérogénèse et les infections bactérienne et virale. L'activité biologique des glucides est sous-tendue le plus souvent par l'interaction avec une protéine-cible ou un récepteur. Une meilleure connaissance de

ces complexes non-covalents glucide/protéine et de leurs mécanismes d'assemblage est nécessaire pour concevoir de nouveaux principes actifs d'intérêt thérapeutique de nature glucidique (1). Cette démarche se heurte toutefois à la grande diversité structurale des polysaccharides, une diversité qui rend difficile l'identification et la caractérisation des ligands glucidiques. La stratégie analytique décrite ici, basée sur le couplage entre l'électrophorèse capillaire et de la spectrométrie de masse, a pour objectif de surmonter ces difficultés et d'ouvrir une nouvelle voie de caractérisation de complexes glucide/protéine.

¹CNRS UMR 8587 – Université d'Evry-Val-d'Essonne – Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement – Bd F. Mitterrand F-91025 Evry – Tél. : 0169477641 – Fax : 0169477655, E-Mail : regis.daniel@univ-evry.fr

²CNRS UMR 7575 – ENSCP – Université Paris 6 – Laboratoire d'Electrochimie et Chimie Analytique – 11, rue Pierre et Marie Curie – 75231 Paris cedex 05 – Tél. : 01 55 42 63 71 – Fax : 01 44 27 67 50 – E-Mail : pierre-gareil@enscp.fr

Intérêt du couplage de l'électrophorèse capillaire en mode frontal et de la spectrométrie de masse pour la caractérisation des complexes non-covalents glucide/protéine

II - Intérêt de l'électrophorèse capillaire pour l'analyse des complexes non-covalents

Les interactions biomoléculaires et la formation de complexes non-covalents peuvent être étudiées par un certain nombre de méthodes, telles que la chromatographie (affinité, exclusion), la dialyse à l'équilibre, la spectroscopie de fluorescence et le dichroïsme circulaire, la RMN, la résonance de plasmons de surface ou la calorimétrie. Ces méthodes peuvent, selon les cas, nécessiter une préparation préalable (marquage, immobilisation) et une quantité importante d'échantillon, des contraintes qui ne sont pas compatibles avec la disponibilité parfois faible de glucides bioactifs.

L'électrophorèse capillaire (CE), technologie intégrée de séparation et de détection, disponible commercialement depuis près de vingt ans, apparaît également très appropriée comme outil d'étude des interactions non-covalentes (2). En effet, comparée à d'autres techniques, elle ne nécessite que de très petites quantités d'échantillons (quelques nanolitres injectés), et permet d'opérer dans des conditions de pH et de force ionique proches des conditions biologiques. De plus, elle permet l'analyse directe en solution en l'absence de toute phase solide autre que la paroi du capillaire, et aucune modification chimique ou immobilisation des partenaires en interaction n'est nécessaire, évitant ainsi les interactions parasites. Différentes méthodes utilisant la CE ont été décrites dans la littérature, permettant la détermination des paramètres d'interactions de biomolécules (constantes de complexation et stoechiométrie) (3). Elles sont basées sur les différences existant entre les mobilités électrophorétiques des espèces libres et complexées. L'une de ces méthodes est l'analyse par électrophorèse de zone de mélanges interactifs en proportions variables (ou méthode par injection directe), pour laquelle le paramètre quantifié est l'aire des pics des espèces libres et complexées. Une autre approche appelée électrophorèse d'affinité consiste à mesurer par électrophorèse de zone la variation de la mobilité électrophorétique effective d'un analyte dans un capillaire rempli d'un électrolyte contenant le ligand à des concentrations variables. Enfin, une troisième approche appelée « analyse frontale » consiste à introduire en continu dans le capillaire le mélange des partenaires en équilibre interactif. Le paramètre expérimental mesuré est alors une hauteur de palier correspondant à la concentration de l'espèce libre. Le calcul des paramètres thermodynamique et stoechiométrique d'interaction fait appel, à partir d'un modèle réactionnel, à différentes méthodes de régressions linéaires (méthode de l'isotherme, méthodes x-réciproque ou de Scatchard, y-réciproque et double réciproque) ou non-linéaires. Nous avons dans une précédente étude décrit l'application de ces méthodes à l'analyse d'interactions de protéines cibles avec des polysaccharides sulfatés hétérogènes (4, 5). La détection par spectroscopie d'absorption UV employée lors de ces analyses par CE ne permet pas la caractérisation structurale et l'identification du ligand saccharidique. Pour accéder à ce type d'information, nous avons

exploité la possibilité qu'offre la CE d'être couplée à la spectrométrie de masse (MS) à ionisation par électronébulisation (ESI). Le recours à la spectrométrie de masse est particulièrement bien adapté à l'étude des complexes glucide/protéine : d'une part le développement de la spectrométrie de masse a permis les progrès récents de la glycobiologie structurale (6), et d'autre part la spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation se révèle également une méthode performante d'analyse des complexes non-covalents (7). En effet, dans des conditions douces d'ionisation par électronébulisation (pH, force ionique, tampon volatil), la plupart des interactions non-covalentes existantes en solution (notamment électrostatiques) se trouvent conservées en phase gazeuse. Il est alors possible de détecter les complexes et d'en déterminer la stoechiométrie par une mesure directe et en ligne de leur masse au moyen du couplage CE-ESI-MS.

III - Le couplage électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse

1. Historique

Les premières descriptions de couplage CE-MS datent de la fin des années 1980 (8). Deux difficultés principales ont dû être surmontées, la compatibilité d'échelle des débits des deux méthodes (nL/min pour la CE, $\mu\text{L}/\text{min}$ pour la MS) d'une part, et l'établissement d'une jonction électrique stable d'autre part. Ce dernier point a été initialement abordé par la conception d'interfaces artisanales, avant qu'une offre commerciale de dispositifs prêts à l'emploi n'apparaisse dans les années 1990, avec principalement l'interface commercialisée par Agilent Technologies (Santa Clara, Etats-Unis, voir Note 1) et Bruker Daltonics (Billerica, Etats-Unis, voir Note 2) pour le couplage du système d'électrophorèse HP³⁰CE, et celle commercialisée par Beckman Coulter (Fullerton, Etats-Unis, voir Note 3) et Thermo Electron (Waltham, Etats-Unis, voir note 4) pour le couplage du système d'électrophorèse P/ACE[™]. Même si la majorité des couplages décrits le sont avec une source ESI, d'autres types de sources peuvent être couplés à la CE, comme les sources à bombardement d'atomes rapides (FAB) (9), à plasma (ICP) (10), à ionisation chimique sous pression atmosphérique (APCI) (11), à photoionisation sous pression atmosphérique (APPI) (12) pour l'analyse des composés peu polaires, et plus récemment les sources par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) avec un dispositif permettant le dépôt automatique sur la plaque MALDI des analytes en sortie de CE (13). Tout type d'analyseur de masse peut être couplé, du simple quadripôle au performant analyseur à résonance cyclotronique à transformée de Fourier (FT-ICR). La plupart des couplages décrits font appel aux analyseurs soit à piège d'ions soit à temps de vol.

Ces 15 dernières années ont montré la polyvalence de ce couplage avec un nombre croissant d'applications les plus variées, comprenant l'analyse de peptides et

NOTE 1
Agilent Technologies en France :
1, rue Galvani
- 91745 Massy
- Tél. : 01 64 53
56 40 - www.
agilent.com

NOTE 2
Bruker Daltonique en France :
34, rue de
l'Industrie -
BP 10002
7166 Wissembourg Cedex
Tél. : 03 88 73
68 00
www.bruker.fr

NOTE 3
Beckman Coulter en France :
Paris Nord 2
33/66 rue
des Vanesses
- Bat. F - Ilot
E - 93420 Villepinte - Tél. :
01 49 90 90 00
- www.beckman.com

NOTE 4
Thermo Fisher Scientific en France : 16, avenue du Québec SILIC 765 91963 Courtaboeuf cedex - Tél. : 01 60 92 48 00 - www.thermo.fr



de protéines, d'acides nucléiques, de saccharides, de métabolites cellulaires, de composés d'intérêt pharmaceutique et de bio-marqueurs, l'analyse élémentaire ou encore l'analyse alimentaire et environnementale (14).

2. Interface de couplage à une source d'ionisation électrospray

Les interfaces commerciales de couplage à une source ESI comportent un système d'ajout de liquide additionnel se mélangeant à l'électrolyte en sortie du capillaire d'électrophorèse à un débit de l'ordre de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$. Le rôle de ce liquide additionnel est ainsi d'assurer un débit en sortie de CE compatible avec la formation d'un nébulisat dans les sources ESI classiques ($\mu\text{L}/\text{min}$), et d'assurer la jonction électrique.

Les interfaces commerciales dites coaxiales (figure 1A) sont composées d'un système de deux tubes concentriques formant le nébuliseur. Le premier tube métallique central reçoit le capillaire d'électrophorèse et assure aussi la circulation du liquide additionnel entre ses parois et le capillaire. Un second tube entourant ce tube central transporte le gaz de nébulisation. Le positionnement du capillaire dans le nébuliseur (réglable sur les interfaces commerciales) est critique pour l'établissement du courant ionique. Le mélange entre l'électrolyte et le liquide additionnel s'établit en sortie de nébuliseur. Il existe une variante de cette interface dite à jonction liquide, dans laquelle ce mélange en sortie de capillaire d'électrophorèse a lieu à l'intérieur du nébuliseur (figure 1B).

Un deuxième type d'interfaces existe, ne nécessitant pas de liquide additionnel et permettant un couplage direct de la CE à des nano-sources. La

limitation principale de ces interfaces apparaît dans la difficulté à réaliser une jonction électrique. Pour ce type d'interfaces, la tension est appliquée soit en insérant une électrode à l'intérieur du capillaire d'électrophorèse (figure 1C), soit au moyen d'un tube métallique reliant le capillaire à l'aiguille (figure 1D). L'avantage de la première configuration, qui est la forme commerciale la plus courante, est la possibilité de changer l'aiguille (15). Ces interfaces restent difficiles à fabriquer et moins robustes que les interfaces avec liquide d'appoint.

Le choix de la composition du liquide additionnel, nécessaire à l'établissement d'un nébulisat et d'un courant stable, peut en outre être mis à profit. Constitué d'eau ou de mélanges hydro-organiques contenant une faible concentration d'acide ou de base volatils, le liquide additionnel assure la dilution des électrolytes trop concentrés en sels et ainsi la compatibilité avec la source ESI. En outre la composition aqueuse du liquide permet de préserver les associations non-covalentes et d'analyser des structures « natives ». Inversement, un liquide additionnel composé de solvant organique entraîne la dénaturation des structures protéiques et la dissociation des complexes.

IV - Un exemple concret : le complexe antithrombine-pentasaccharide

La quasi-totalité des exemples de couplage CE-MS décrits à ce jour a été réalisée avec une séparation électrophorétique en mode zone (CZE). Quelques-uns l'ont été en mode isotachophorèse (ITP) (16). Pour l'étude de complexes non-covalents glyco-protéiques, nous avons choisi d'opérer en mode frontal (ou FACCE pour Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis) (17). Dans ce mode, l'échantillon est injecté en continu en mode électrocinétique et les analytes sont détectés non pas sous forme de pics mais de fronts de migration. Cette méthode présente l'avantage d'injecter dans le spectromètre de masse une solution contenant le complexe protéine-ligand sur des temps beaucoup plus longs (jusqu'à quelques dizaines de minutes), ce qui rend alors l'analyse structurale du ligand possible. Dans cette étude, nous avons mis au point le couplage FACCE-MS sur le complexe antithrombine / pentasaccharide sulfaté de l'héparine, emblématique des complexes protéine-sucre (18).

1. Détection de l'antithrombine native et de son complexe avec le pentasaccharide de l'héparine par FACCE-MS

Jusqu'à présent, l'analyse par CE-MS a peu concerné les édifices protéiques entiers (conditions « natives »), la plupart des études s'intéressant à

Figure 1

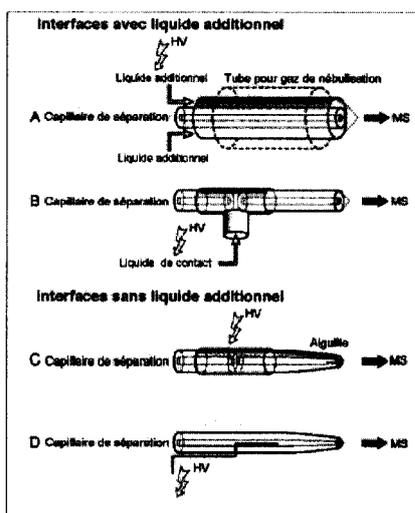
Schéma des différents types d'interfaces de couplage à une source d'ionisation électrospray.

Interfaces avec liquide additionnel : (A) arrivée coaxiale du liquide additionnel ; (B) interface avec jonction liquide.

Interfaces sans liquide additionnel :

(C) contact électrique assuré par une jonction métallique entre le capillaire et l'aiguille du nébuliseur ; (D) contact électrique assuré par une électrode.

SCHMITT-KOPLIN P., FROMBERGER M., Capillary electrophoresis - mass spectrometry : 15 years of developments and applications, 2003, 24, 22-23, 3837-3867. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, reproduit avec autorisation.



Intérêt du couplage de l'électrophorèse capillaire en mode frontal et de la spectrométrie de masse pour la caractérisation des complexes non-covalents glucide/protéine

des protéines de masse inférieure à 20 000 g/mol et toujours dans des conditions dénaturantes. Bien que la protéine antithrombine analysée ici soit de masse bien plus élevée, il est possible de la détecter en mode d'ionisation positif et en conditions dénaturantes avec un liquide additionnel hydro-organique (eau-acétonitrile 60/40 v/v, acide formique 1 %), après une séparation électrophorétique frontale en mode contre-electroosmotique (électrolyte : hydrogénocarbonate d'ammonium 30 mM, pH 8,5). L'électrophérogramme présente un front de migration de l'antithrombine (détection à 200 nm par le détecteur UV de l'appareil d'électrophorèse) auquel correspond un front du courant ionique total d'ions enregistré par le spectromètre de masse. Le décalage de temps entre les deux fronts EC et SM correspond à la durée de migration entre la fenêtre de détection UV du capillaire et l'arrivée dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. Avec le dispositif utilisé ici, la longueur du capillaire est de 98 cm et la cellule de détection UV est située à 21 cm de l'entrée du capillaire. Le spectre de masse (figure 2A) présente une succession d'états de charges compris entre +42 (m/z 1 379) et +24 (m/z 2 411) permettant de calculer une masse de 57 875 g/mol conforme à la masse théorique. Par la suite et afin de préserver le plus possible la structure native de la protéine, le liquide additionnel hydro-organique a été substitué par une solution saline d'acétate d'ammonium 10 mM, composé volatil compatible avec la détection MS. Dans ces conditions dites non-dénaturantes et en mode d'ionisation positif, nous avons détecté la protéine avec une distribution d'état de charges moins élevée, comprise entre +13 et +17 (M_r 58 296 g/mol), indiquant que la protéine est détectée dans une conformation proche de son état natif (figure 2B). Il est donc possible de détecter par FACCE-MS des protéines de masse élevée dans un état conformationnel préservé, ce que nous avons exploité ensuite pour détecter des complexes non-covalents formés avec l'antithrombine.

Ces mêmes conditions non-dénaturantes ont été employées pour la mise en évidence du complexe non-covalent intact entre l'antithrombine et le pentasaccharide sulfaté de l'héparine. La séquence glucidique de ce pentasaccharide est celle qui confère à l'héparine son pouvoir anti-coagulant via une liaison de haute affinité à l'antithrombine (19).

L'antithrombine et le pentasaccharide ont été pré-incubés en proportion équimolaire (8 μ M) puis le mélange a été injecté dans le capillaire à partir du compartiment anodique par application d'une tension électrique. Les électrophérogrammes obtenus par détection UV à 200 nm mettent en évidence deux fronts distincts (figure 3). Le premier front de migration présente une mobilité électrophorétique identique à celle de l'antithrombine libre. Nous avons montré dans une expérience préalable, qu'en augmentant la concentration du ligand glucidique ce premier front décroît

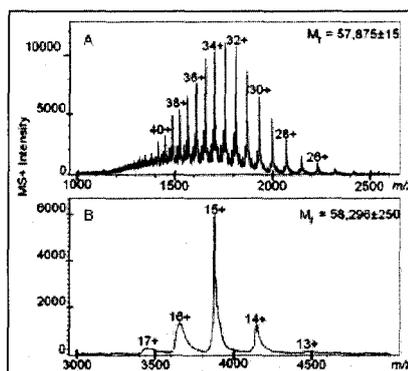


Figure 2
Spectres de masse électrospray (ionisation positive) de l'antithrombine injectée par électrophorèse capillaire en mode frontal (FACCE - ESIMS). A) Conditions dénaturantes (liquide additionnel hydro-organique eau-acétonitrile 60/40 v/v, acide formique 1 %). B) Conditions non-dénaturantes (liquide additionnel : acétate d'ammonium 10 mM). (Électrophorèse capillaire Agilent HP³⁰CE, spectromètre de masse électrospray - piège à ions Bruker Esquire 3000+). Copyright (2007) American Chemical Society.

au profit d'un second front plus lent attribué au complexe. Portant huit groupements sulfate et deux fonctions acide, le pentasaccharide est très anionique, ce qui lui confère une mobilité électrophorétique apparente très faible. En effet, sous l'action du champ électrique, les oligosaccharides sulfatés très anioniques et donc de mobilité électrophorétique opposée et supérieure à la mobilité électroosmotique (écoulement orienté de l'anode à l'entrée du capillaire, vers la cathode en sortie

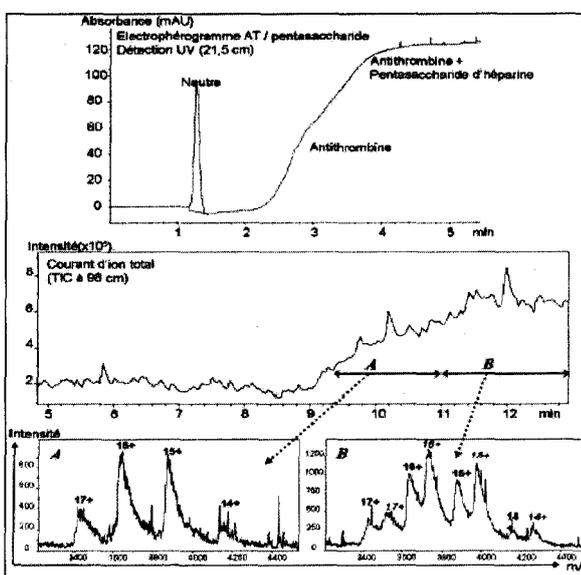


Figure 3
Analyse EC-ESIMS du complexe antithrombine-pentasaccharide de l'héparine (EC frontale, électrospray en mode positif, conditions non dénaturantes). (Électrophorèse capillaire Agilent HP³⁰CE, spectromètre de masse électrospray - piège à ions Bruker Esquire 3000+). A) Spectre de masse extrait de la zone du TIC correspondant au front de migration de la protéine libre. B) Spectre de masse extrait de la zone du TIC correspondant au front de migration de la protéine complexée en équilibre avec sa forme libre. Copyright (2007) American Chemical Society.



du capillaire inséré dans le nébuliseur) ne sont détectés que très tardivement. On constate ainsi que seules les espèces protéiques libre et complexée sont détectées par le spectromètre de masse lors des vingt premières minutes de l'analyse. Par conséquent, les seuls oligosaccharides détectés par MS seront ceux liés à la protéine, présents sous le second front. Nous réalisons ainsi un isolement des ligands oligosaccharidiques, ce qui est particulièrement avantageux lorsque ces ligands sont issus d'un mélange hétérogène d'oligosaccharides. L'analyse MS en conditions non-dénaturantes des espèces présentes sous les deux fronts confirme que le premier est dû à la protéine libre. Le second front attribué au complexe conduit à un spectre de masse présentant une double distribution d'ions multichargés, ce qui indique la présence de deux entités (figure 3). La première distribution permet de calculer une masse correspondant à l'antithrombine libre ($M_r 58,192 \pm 120$). La seconde conduit à un incrément de masse de 1482 ± 26 par rapport à cette masse ($M_r 59,673 \pm 110$). Cet incrément de masse correspond à la masse d'une molécule de pentasaccharide et indique donc que l'espèce ainsi détectée est l'antithrombine complexée. Il est possible ainsi de déterminer la stoechiométrie du complexe, ici 1/1.

Figure 4
Spectre de masse électrospray (ionisation négative) du pentasaccharide de l'héparine après séparation en ligne du complexe avec l'antithrombine par électrophorèse capillaire en mode frontal (FACCE-ESIMS). Copyright (2007) American Chemical Society.

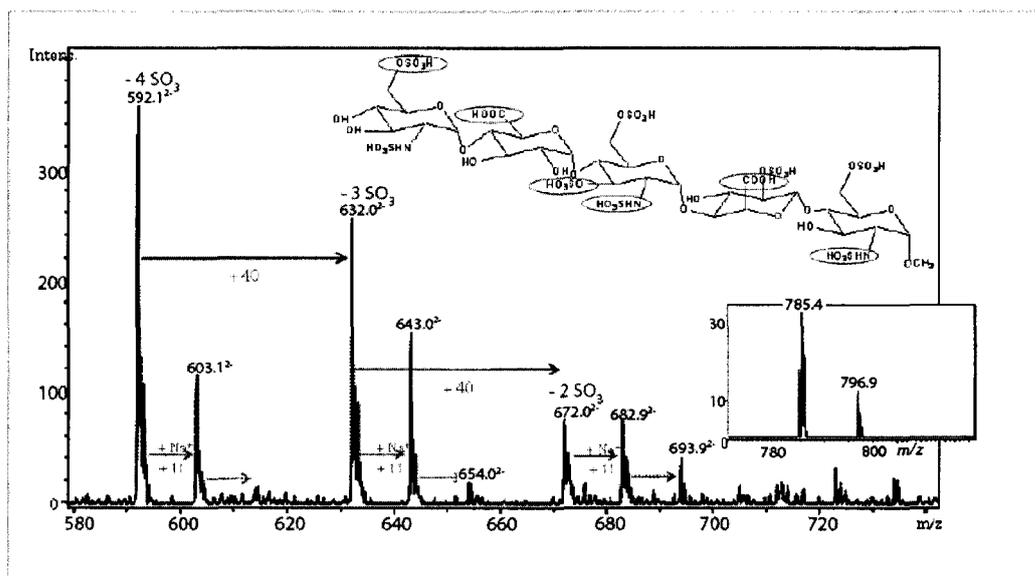
2. Caractérisation du ligand oligosaccharidique par FACCE-MS

Outre le complexe entier, il est aussi possible, de détecter par spectrométrie de masse chacun des partenaires du complexe, en dissociant le complexe arrivant dans la source ESI. Cela peut être

réalisé à l'aide de solvant organique (acétonitrile) comme liquide additionnel, provoquant la dénaturation et la dissociation du complexe. Dans ces conditions, l'analyse en mode d'ionisation positif du second front de migration correspondant au complexe antithrombine/pentasaccharide conduit à un spectre de masse de l'antithrombine libre et dénaturée (spectre identique à celui présenté figure 2A), ce qui indique que le complexe est bien dissocié. Dans ces mêmes conditions dénaturantes et en mode d'ionisation négatif, nous détectons cette fois le pentasaccharide libre (figure 4). Cette approche ouvre donc la voie à la caractérisation en ligne de ligands glucidiques, à partir d'un mélange hétérogène.

V- Conclusion

La liaison de glycosaminoglycane (GAGs) est critique pour la fonction *in vivo* d'effecteurs protéiques comme les facteurs de croissance ou les chimiokines. Cependant la connaissance des mécanismes d'interaction et l'identification des séquences saccharidiques impliquées dans la spécificité de liaison sont freinées par la grande diversité structurale de ces polysaccharides bioactifs. L'importance croissante des glucides en biologie nécessite des méthodes nouvelles permettant l'isolement et la caractérisation des oligosaccharides spécifiquement liés à une protéine cible. Le couplage FACCE-MS décrit ici présente un certain nombre d'avantages. La composante FACCE de ce couplage permet à la protéine et à ses ligands potentiels d'interagir librement en



Intérêt du couplage de l'électrophorèse capillaire en mode frontal et de la spectrométrie de masse pour la caractérisation des complexes non-covalents glucide/protéine

solution, sans modification ou immobilisation chimique d'un des partenaires. En outre, dans le cas de ligands saccharidiques sulfatés, et donc très anioniques, la CE permet d'isoler les glucides liés à la cible du reste des glucides (libres). Cette stratégie de « pêche au ligand » ouvre la voie à l'identification des séquences d'oligosaccharides biologiquement actifs contenus dans des mélanges hétérogènes. Cette méthode permet la mise en évidence directe de la formation du complexe

et la détermination de sa stoechiométrie, et la résolution structurale en ligne du ligand oligosaccharidique sans isolement ou étapes préliminaires de purification. Enfin, grâce à la spectrométrie en tandem (MS/MS), l'élucidation structurale fine du ligand peut être conduite. A l'avenir, de nouvelles avancées sont attendues dans ce champ de la CE-MS, notamment avec l'introduction de dispositifs microfluidiques (20).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) YAREMA KJ, BERTOZZI CR, Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, 2, 49-61.
- (2) HEEGAARD NHH, NILSSON S and GUZMAN NA, Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments, *J. Chromatogr. B*, 1998, 715, 29-54.
- (3) TANAKA Y, TERABE S, Estimation of binding constants by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 2002, 768, 81-92.
- (4) VARENNE A, GAREIL P, COLLIEC-JOUAULT S., and DANIEL R., Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins. Study of the binding properties of fucoidan to antithrombin, *Anal. Biochem.*, 2003, 315, 152-159.
- (5) LE SAUX T, VARENNE A, PERREAU F. *et al.*, Determination of the binding parameters for antithrombin-heparin fragment systems by affinity and frontal analysis continuous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2006, 1132, 289-296.
- (6) MORELLE W. and MICHALSKI JC, Glycomics and Mass Spectrometry, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, 11, 2615-2645.
- (7) BORCH J, JØRGENSEN TJD AND ROEPSTORFF P, Mass spectrometric analysis of protein Interactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, 9, 509-516.
- (8) OLIVARES JA, NGUYEN NT, YONKER CR *et al.*, On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 1230-1232.
- (9) CAPRIOLI RM, MOORE WT, MARTIN M. *et al.*, Coupling capillary zone electrophoresis and continuous flow fast atom bombardment mass spectrometry for the analysis of peptides mixtures, *J. Chromatogr.*, 1989, 480, 247-257.
- (10) KANNAMKUMARATH SS, WROBEL K., WROBEL K. *et al.*, Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis, *J. Chromatogr. A* 2002, 975, 245-266.
- (11) TANAKA Y, OTSUKA K. and TERABE S., Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1889-1895.
- (12) MOL R, DE JONG GJ and SOMSEN GW, On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance *Electrophoresis* 2005, 26, 146-154.
- (13) HUCK CW, BAKRY R, HUBER LA and BONN GK, Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry, *Electrophoresis*, 2006, 27, 2063-2074.
- (14) SCHMITT-KOPPLIN P. and FROMMBERGER M., Capillary electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications, *Electrophoresis* 2003, 24, 3837-3867.
- (15) ISSAQ HJ, JANINI GM, CHAN KC and VEENSTRA TD, Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometric detection Advantages and limitations, *J. Chromatogr. A* 2004, 1053, 37-42
- (16) SMITH RD, LOO JA, BARINAGA CJ *et al.*, CZE- and ITP-MS of polypeptides and proteins based upon an electrospray ionization interface, *J. Chromatogr.*, 1989, 480, 228-232.
- (17) GAO JY, DUBIN PL AND MUHOBERAC BB, Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2945-2951.
- (18) FERMAS S, GONNET F, VARENNE A. *et al.*, Protein/carbohydrate complex characterization by frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry *Anal. Chem.*, 2007, 79, 4987-4993.
- (19) PETITOU M. and VAN BOECKEL CAA, A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 3118 - 3133.
- (20) MONTON MRN and TERABE S., Recent developments in capillary electrophoresis-mass spectrometry of proteins and peptides *Anal. Sci.*, 2005, 21, 5-13.

COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS ECRITES

- Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex. Fernas S., Gonnet F., Varenne A., Gareil P., Daniel R. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(13), 4987.
- Caractérisation de complexes protéine / sucre par EC-SM. S. Fernas, F. Gonnet, A. Varenne, P. Gareil, R. Daniel. *Spectra Analyse* N° 257, Octobre 2007.
- The polyethylene oxide (PEO) capillary coating is compatible with capillary electrophoresis – mass spectrometry analysis of basic proteins. Fernas S., Daniel R., Gonnet F. *Analytical Biochemistry*, 2008, 372 (2), 258.
- Analysis of non covalent complexes of SDF-1 with sulfated oligosaccharides by coupled CE-MS reveals differential effects on the oligomerization status of the chemokine. Fernas S., Gonnet F., Charnaux N., Mulloy B, Baleux F. and Daniel R. (Article en préparation).

COMMUNICATIONS ORALES

- Complexe oligosaccharide-protéine analysé par électrophorèse capillaire frontale couplée à la spectrométrie de masse electrospray. VIII^{ème} journée des utilisateurs de spectrométrie de masse, Bruker Daltonics, Paris, novembre 2006.
- Mise au point du couplage de l'électrophorèse capillaire frontale à la spectrométrie de masse : étude du complexe Antithrombine / Héparine. Club des jeunes de spectrométrie de masse, sous la tutelle de la SFSM, Nantes, septembre 2006.
- Etude des interactions glucide-protéine par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse. 11^{ème} journée du club Ile-de-France de l'Association Francophone des sciences Séparatives, AFSEP, Paris, avril 2005.

COMMUNICATIONS SOUS FORME DE POSTER

- 15th International symposium on capillary electroseparation techniques, ITP, Paris, août 2006. [Présentation orale du poster]
- XXI^{ème} journée du groupe français des glucides, GFG, Le Croisic, mai 2006
- 20th international symposium on Microscale bioseparations, MSB, Amsterdam, janvier 2006. [Nominé parmi les 10 meilleurs posters.]
- 1er Symposium de chimie et biologie analytiques, SCBA, Montpellier, septembre 2005.
- 13th European carbohydrate symposium, EUROCARB 13, Bratislava, août 2005.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Tully, S.E., Mabon, R., et al., A chondroitin sulfate small molecule that stimulates neuronal growth. *Journal Of The American Chemical Society*, 2004, 126(25), 7736.
2. Trowbridge, J.M. and Gallo, R.L., Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 2002, 12(9), 117R.
3. Funderburgh, J.L., Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology*, 2000, 10(10), 951.
4. Rabenstein, D.L., Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Natural Product Reports*, 2002, 19(3), 312.
5. Guimond, S.E. and Turnbull, J.E., Heparan sulphate-growth factor interactions in development and disease. *Trends In Glycoscience And Glycotechnology*, 2005, 17(98), 241.
6. Toole, B.P., Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*, 2002, 12(3), 37R.
7. Gieselmann, V., Lysosomal Storage Diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis Of Disease*, 1995, 1270(2-3), 103.
8. Venkatesan, N., Barre, L., et al., Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-1 gene delivery: A strategy to promote cartilage repair. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2004, 101(52), 18087.
9. Venkatesan, N., Magdalou, J., et al., Stimulation of proteoglycon synthesis towards cartilage repair. *Medecine Sciences*, 2005, 21(5), 471.
10. Snow, A.D., Mar, H., et al., The Presence Of Heparan-Sulfate Proteoglycans In The Neuritic Plaques And Congophilic Angiopathy In Alzheimers-Disease. *American Journal Of Pathology*, 1988, 133(3), 456.
11. Goedert, M. and Spillantini, M.G., A Century of Alzheimer's Disease. *Science*, 2006, 314(5800), 777.
12. Van Horsen, J., Wesseling, P., et al., Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurology*, 2003, 2(8), 482.
13. Imberty, A., Lortat-Jacob, H., and Perez, S., Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydrate Research*, 2007, 342(3-4), 430.
14. Lee, Y.C. and Lee, R.T., Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research*, 1995, 28(8), 321.
15. Spillmann, D. and Lindahl, U., Glycosaminoglycan-protein interactions: a question of specificity. *Current Opinion in Structural Biology*, 1994, 4(5), 677.
16. Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., and Kjellen, L., Regulated Diversity of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(39), 24979.

17. Powell, A.K., Yates, E.A., et al., Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: Appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology*, 2004, 14(4), 17R.
18. Franzen, L.E., Svensson, S., and Larm, O., Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(11), 5090.
19. Gettins, P.G.W., Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*, 2002, 102(12), 4751.
20. Demelbauer, U.M., Plematl, A., et al., Characterization of glyco isoforms in plasma-derived human antithrombin by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-quadrupole ion trap-mass spectrometry of the intact glycoproteins. *Electrophoresis*, 2004, 25(13), 2026.
21. Kremser, L., Bruckner, A., et al., Characterization of antithrombin III from human plasma by two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 2003, 24(24), 4282.
22. Peterson, C.B. and Blackburn, M.N., Isolation And Characterization Of An Antithrombin-Iii Variant With Reduced Carbohydrate Content And Enhanced Heparin Binding. *Journal Of Biological Chemistry*, 1985, 260(1), 610.
23. Brennan, S.O., George, P.M., and Jordan, R.E., Physiological Variant Of Antithrombin-III Lacks Carbohydrate Side-Chain At Asn-135. *FEBS Letters*, 1987, 219(2), 431.
24. Plematl, A., Demelbauer, U.M., et al., Determination of the site-specific and isoform-specific glycosylation in human plasma-derived antithrombin by IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS. *Proteomics*, 2005, 5(15), 4025.
25. Brennan, S.O., George, P.M., et al., The Physiological Antithrombin (Beta) Variant With Increased Heparin Affinity Lacks Carbohydrate At Asn-135. *Thrombosis And Haemostasis*, 1987, 58(1), 238.
26. Rosenberg, R.D. and Lam, L., Correlation between Structure and Function of Heparin. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 1979, 76(3), 1218.
27. Lindahl, U., Backstrom, G., et al., Evidence For A 3-O-Sulfated D-Glucosamine Residue In The Antithrombin-Binding Sequence Of Heparin. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences*, 1980, 77(11), 6551.
28. Casu, B., Oreste, P., et al., The Structure Of Heparin Oligosaccharide Fragments With High Anti-(Factor-Xa) Activity Containing The Minimal Antithrombin-Iii-Binding Sequence - Chemical And C-13 Nmr-Studies. *Biochemical Journal*, 1981, 197(3), 599.
29. Choay, J., Petitou, M., et al., Structure-Activity Relationship In Heparin - A Synthetic Pentasaccharide With High-Affinity For Anti-Thrombin-Iii And Eliciting High Anti-Factor-Xa Activity. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 1983, 116(2), 492.
30. Petitou, M. and Van Boeckel, C.A.A., A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next? *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(24), 3118.

31. Gandrille, S., Aiach, M., et al., Important Role Of Arginine-129 In Heparin-Binding Site Of Antithrombin-Iii - Identification Of A Novel Mutation Arginine-129 To Glutamine. *Journal Of Biological Chemistry*, 1990, 265(31), 18997.
32. Meagher, J.L., Huntington, J.A., et al., Role of Arginine 132and Lysine 133in Heparin Binding to and Activation of Antithrombin. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(46), 29353.
33. Schedin-Weiss, S., Desai, U.R., et al., Roles of N-Terminal Region Residues Lys11, Arg13, and Arg24 of Antithrombin in Heparin Recognition and in Promotion and Stabilization of the Heparin-Induced Conformational Change. *Biochemistry*, 2004, 43(3), 675.
34. Arocas, V., Bock, S.C., et al., The Role of Arg46 and Arg47 of Antithrombin in Heparin Binding. *Biochemistry*, 1999, 38(31), 10196.
35. Ersdal-Badju, E., Lu, A., et al., Identification of the Antithrombin III Heparin Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(31), 19393.
36. Jin, L., Abrahams, J.P., et al., The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(26), 14683.
37. Mushunje, A., Evans, G., et al., Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 2004, 2(12), 2170.
38. Carrell, R.W., Huntington, J.A., et al., The conformational basis of thrombosis. *Thrombosis And Haemostasis*, 2001, 86(1), 14.
39. Skinner, R., Abrahams, J.P., et al., The 2.6 angstrom structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site. *Journal Of Molecular Biology*, 1997, 266(3), 601.
40. Whisstock, J.C., Pike, R.N., et al., Conformational changes in serpins: II. the mechanism of activation of antithrombin by heparin. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 301(5), 1287.
41. McCoy, A.J., Pei, X.Y., et al., Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *Journal Of Molecular Biology*, 2003, 326(3), 823.
42. Olson, S.T., Bjork, I., et al., Role Of The Antithrombin-Binding Pentasaccharide In Heparin Acceleration Of Antithrombin-Proteinase Reactions - Resolution Of The Antithrombin Conformational Change Contribution To Heparin Rate Enhancement. *Journal Of Biological Chemistry*, 1992, 267(18), 12528.
43. Petitou, M., Herault, L.P., et al., Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature*, 1999, 398(6726), 417.
44. Grootenhuys, P.D.J., Westerduin, P., et al., Rational Design Of Synthetic Heparin Analogs With Tailor-Made Coagulation-Factor Inhibitory Activity. *Nature Structural Biology*, 1995, 2(9), 736.
45. Marfaing-Koka, A., Les chimiokines. *Revue Francaise des Laboratoires*, 1998, 1998(308), 37.
46. Zlotnik, A. and Yoshie, O., Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*, 2000, 12(2), 121.

47. Campbell, J.J. and Butcher, E.C., Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 12(3), 336.
48. Johnson, Z., Proudfoot, A.E., and Handel, T.M., Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: A new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005, 16(6), 625.
49. Hamon, M., Mbemba, E., et al., A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell line binds the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Glycobiology*, 2004, 14(4), 311.
50. Nika, K., Mulloy, B., et al., Specific recognition of immune cytokines by sulphated polysaccharides from marine algae. *European Journal Of Phycology*, 2003, 38(3), 257.
51. Wagner, L., Yang, O.O., et al., [beta]-Chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*, 1998, 391(6670), 908.
52. Kuschert, G.S.V., Coulin, F., et al., Glycosaminoglycans Interact Selectively with Chemokines and Modulate Receptor Binding and Cellular Responses. *Biochemistry*, 1999, 38(39), 12959.
53. Rot, A., Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunology Today*, 1992, 13(8), 291.
54. Lortat-Jacob, H., Baltzer, F., and Grimaud, J.-A., Heparin Decreases the Blood Clearance of Interferon-gamma and Increases Its Activity by Limiting the Processing of Its Carboxyl-terminal Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(27), 16139.
55. Handel, T.M., Johnson, Z., et al., Regulation of protein function by glycosaminoglycans - As exemplified by chemokines. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74(1), 385.
56. Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., et al., Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(4), 1885.
57. Spillmann, D., Witt, D., and Lindahl, U., Defining the Interleukin-8-binding Domain of Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(25), 15487.
58. Stringer, S.E., Forster, M.J., et al., Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1alpha. *Blood*, 2002, 100(5), 1543.
59. Goger, B., Halden, Y., et al., Different Affinities of Glycosaminoglycan Oligosaccharides for Monomeric and Dimeric Interleukin-8: A Model for Chemokine Regulation at Inflammatory Sites. *Biochemistry*, 2002, 41(5), 1640.
60. Lortat-Jacob, H., Grosdidier, A., and Imberty, A., Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2002, 99(3), 1229.
61. Shaw, J.P., Johnson, Z., et al., The X-Ray Structure of RANTES: Heparin-Derived Disaccharides Allows the Rational Design of Chemokine Inhibitors. *Structure*, 2004, 12(11), 2081.

62. Murphy, J.W., Cho, Y., et al., Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *Journal Of Biological Chemistry*, 2007, 282(13), 10018.
63. Springael, J.-Y., Urizar, E., and Parmentier, M., Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005, 16(6), 611.
64. Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J.M., et al., Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nature Immunology*, 2004, 5(2), 216.
65. Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., and Martinez-A, C., Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends in Immunology*, 2001, 22(11), 612.
66. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., et al., Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo Journal*, 2001, 20(10), 2497.
67. Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., et al., A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal Of Experimental Medicine*, 1996, 184(3), 1101.
68. Crump, M.P., Gong, J.H., et al., Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo Journal*, 1997, 16(23), 6996.
69. Amara, A., Lorthioir, O., et al., Stromal Cell-derived Factor-1alpha Associates with Heparan Sulfates through the First beta -Strand of the Chemokine. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(34), 23916.
70. Sadir, R., Baleux, F., et al., Characterization of the Stromal Cell-derived Factor-1alpha - Heparin Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11), 8288.
71. Loetscher, P., Gong, J.-H., et al., N-terminal Peptides of Stromal Cell-derived Factor-1 with CXC Chemokine Receptor 4 Agonist and Antagonist Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(35), 22279.
72. Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., et al., The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Science*, 2005, 14(4), 1071.
73. Leonard, E.J. and Yoshimura, T., Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunology Today*, 1990, 11, 97.
74. Chakravarty, L., Rogers, L., et al., Lysine 58 and Histidine 66 at the C-terminal alpha - Helix of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Essential for Glycosaminoglycan Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(45), 29641.
75. Lau, E.K., Paavola, C.D., et al., Identification of the Glycosaminoglycan Binding Site of the CC Chemokine, MCP-1: Implications for structure and function in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(21), 22294.
76. Crown, S.E., Yu, Y.H., et al., Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. *Journal Of Biological Chemistry*, 2006, 281(35), 25438.

77. Yu, Y., Sweeney, M.D., et al., Potential Inhibitors of Chemokine Function: Analysis of Noncovalent Complexes of CC Chemokine and Small Polyanionic Molecules by ESI FT-ICR Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2006, 17(4), 524.
78. Laine, R.A., Invited Commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, 1994, 4(6), 759.
79. Palmacci, E.R., Plante, O.J., et al., Automated synthesis of oligosaccharides. *Helvetica Chimica Acta*, 2003, 86(12), 3975.
80. Vynios, D.H., Karamanos, N.K., and Tsiganos, C.P., Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2002, 781(1-2), 21.
81. Koshiishi, I., Takenouchi, M., et al., Enzymatic method for the simultaneous determination of hyaluronan and chondroitin sulfates using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1998, 265(1), 49.
82. Volpi, N., Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*, 2000, 277(1), 19.
83. Volpi, N. and Maccari, F., Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. *Journal of Chromatography B*, 2006, 834(1-2), 1.
84. Wessler, E., Analytical and preparative separation of acidic glycosaminoglycans by electrophoresis in barium acetate. *Analytical Biochemistry*, 1968, 26(3), 439.
85. Wessler, E., Electrophoresis of acidic glycosaminoglycans in hydrochloric acid: A micro method for sulfate determination. *Analytical Biochemistry*, 1971, 41(1), 67.
86. Cappelletti, R., Del Rosso, M., and Chiarugi, V.P., A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run. *Analytical Biochemistry*, 1979, 99(2), 311.
87. Volpi, N., Electrophoresis Separation of Glycosaminoglycans on Nitrocellulose Membranes. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240(1), 114.
88. Volpi, N., Disaccharide analysis and molecular mass determination to microgram level of single sulfated glycosaminoglycan species in mixtures following agarose-gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 1999, 273(2), 229.
89. Calabro, A., Benavides, M., et al., Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *Glycobiology*, 2000, 10(3), 273.

90. Turnbull, J.E., Hopwood, J.J., and Gallagher, J.T., A strategy for rapid sequencing of heparan sulfate and heparin saccharides. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 1999, 96(6), 2698.
91. Karamanos, N.K., Vanky, P., et al., High performance capillary electrophoresis method to characterize heparin and heparan sulfate disaccharides. *Electrophoresis*, 1996, 17(2), 391.
92. Lamari, F.N., Kuhn, R., and Karamanos, N.K., Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2003, 793(1), 15.
93. Friedman, Y. and Higgins, E.A., A Method For Monitoring The Glycosylation Of Recombinant Glycoproteins From Conditioned Medium, Using Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 1995, 228(2), 221.
94. Moller, H.J., Heinegard, D., and Poulsen, J.H., Combined Alcian Blue And Silver Staining Of Subnanogram Quantities Of Proteoglycans And Glycosaminoglycans In Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 1993, 209(1), 169.
95. Harding, S.E. and Chowdhry, B.Z., Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. 2001: Oxford University press.
96. Harding, S.E. and Chowdhry, B.Z., Protein-Ligand interactions: structure and spectroscopy. Vol. 2. 2001: Oxford University press.
97. Kakehi, K., Oda, Y., and Kinoshita, M., Fluorescence polarization: Analysis of carbohydrate-protein interaction. *Analytical Biochemistry*, 2001, 297(2), 111.
98. Khan, M.I., Mathew, M.K., et al., Fluorescence-Polarization Studies On Binding Of 4-Methylumbelliferyl Beta-D-Galactopyranoside To Ricinus-Communis (Castor-Bean) Agglutinin. *Biochemical Journal*, 1980, 191(2), 395.
99. Khan, M.I., Surolia, N., et al., Fluorescence Polarization As A Tool To Study Lectin-Sugar Interaction - An Investigation Of The Binding Of 4-Methylumbelliferyl Beta-D-Galactopyranoside To Abrus-Precatorious Agglutinin. *European Journal Of Biochemistry*, 1981, 115(1), 149.
100. Mizuno, M., Noguchi, M., et al., Interaction assay of oligosaccharide with lectins using glycosylasparagine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14(2), 485.
101. Sorme, P., Kahl-Knutsson, B., et al., Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Analytical Biochemistry*, 2004, 334(1), 36.
102. Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics*, 2005, 1751(2), 119.
103. Tylercros, R., Sobel, M., et al., Heparin-Binding Domain Peptides Of Antithrombin-Iii - Analysis By Isothermal Titration Calorimetry And Circular-Dichroism Spectroscopy. *Protein Science*, 1994, 3(4), 620.

104. Ho, M.M., Lemercinier, X., et al., Solution stability studies of the subunit components of meningococcal C oligosaccharide-CRM197 conjugate vaccines. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 2001, 33, 91.
105. Rich, R.L. and Myszka, D.G., Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 2007, 361(1), 1.
106. Whelan, R.J., Wohland, T., et al., Analysis of Biomolecular Interactions Using a Miniaturized Surface Plasmon Resonance Sensor. *Analytical chemistry*, 2002, 74(17), 4570.
107. Nedelkov, D. and Nelson, R.W., Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(7), 301.
108. Savchenko, A., Kashuba, E., et al., Imaging technique for the screening of protein-protein interactions using scattered light under surface plasmon resonance conditions. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(4), 1349.
109. Siebert, H.C., Lu, S.Y., et al., Analysis of Protein-Carbohydrate Interaction at the Lower Size Limit of the Protein Part (15-Mer Peptide) by NMR Spectroscopy, Electrospray Ionization Mass Spectrometry, and Molecular Modeling. *Biochemistry*, 2002, 41(30), 9707.
110. Hayashida, M., Fujii, T., et al., Similarity between Protein-Protein and Protein-Carbohydrate Interactions, Revealed by Two Crystal Structures of Lectins from the Roots of Pokeweed. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 334(3), 551.
111. Sultan, N.A.M. and Swamy, M.J., Energetics of carbohydrate binding to Momordica charantia (bitter gourd) lectin: An isothermal titration calorimetric study. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 2005, 437(1), 115.
112. Knibbs, R.N., Agrwal, N., et al., Carbohydrate-Binding Protein-35.2. Analysis Of The Interaction Of The Recombinant Polypeptide With Saccharides. *Journal Of Biological Chemistry*, 1993, 268(20), 14940.
113. Burnouf, T. and Radosevich, M., Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal Of Biochemical And Biophysical Methods*, 2001, 49(1-3), 575.
114. Colfen, H., Harding, S.E., et al., A study by analytical ultracentrifugation on the interaction between lysozyme and extensively deacetylated chitin (chitosan). *Carbohydrate Polymers*, 1996, 30(1), 45.
115. Lebowitz, J., Lewis, M.S., and Schuck, P., Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science*, 2002, 11(9), 2067.
116. Laue, T.M. and Stafford, W.F., Modern applications of analytical ultracentrifugation. *Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure*, 1999, 28, 75.
117. Feizi, T., Fazio, F., et al., Carbohydrate microarrays -- a new set of technologies at the frontiers of glycomics. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, 13(5), 637.

118. Fukui, S., Feizi, T., et al., Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(10), 1011.
119. Lukacs, K.D. and Jorgenson, J.W., Capillary zone electrophoresis: Effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1985, 8(8), 407.
120. Gao, J.Y., Dubin, P.L., and Muhoberac, B.B., Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(15), 2945.
121. Dolnik, V., Capillary electrophoresis of proteins 2003-2005. *Electrophoresis*, 2006, 27(1), 126.
122. Huang, Y.F., Huang, C.C., et al., Capillary electrophoresis-based separation techniques for the analysis of proteins. *Electrophoresis*, 2006, 27(18), 3503.
123. Guttman, A., Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins. *Electrophoresis*, 1996, 17(8), 1333.
124. Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., and Zhu, M.D., Capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 1997, 18(12-13), 2134.
125. Kasicka, V., Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis*, 2006, 27(1), 142.
126. Heegaard, N.H.H., Nilsson, S., and Guzman, N.A., Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *Journal Of Chromatography B*, 1998, 715(1), 29.
127. Garcia-Campana, A.M., Taverna, M., and Fabre, H., LIF detection of peptides and proteins in CE. *Electrophoresis*, 2007, 28(1-2), 208.
128. Lin, Y.W., Chiu, T.C., and Chang, H.T., Laser-induced fluorescence technique for DNA and proteins separated by capillary electrophoresis. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2003, 793(1), 37.
129. Du, Y. and Wang, E.K., Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis with electrochemical and electrochemiluminescence detection. *Journal Of Separation Science*, 2007, 30(6), 875.
130. Hashimoto, M., Tsukagoshi, K., et al., Chemiluminescence detection of heme proteins separated by capillary isoelectric focusing. *Journal Of Chromatography A*, 1999, 852(2), 597.
131. Mao, W.J., Thanawiroon, C., and Linhardt, R.J., Capillary electrophoresis for the analysis of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Biomedical Chromatography*, 2002, 16(2), 77.
132. Goncalves, A.G., Ducatti, D.R.B., et al., Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. *Carbohydrate Research*, 2005, 340(13), 2123.

133. Scapol, L., Marchi, E., and Viscomi, G.C., Capillary electrophoresis of heparin and dermatan sulfate unsaturated disaccharides with triethylamine and acetonitrile as electrolyte additives. *Journal Of Chromatography A*, 1996, 735(1-2), 367.
134. Pervin, A., Alhakim, A., and Linhardt, R.J., Separation Of Glycosaminoglycan-Derived Oligosaccharides By Capillary Electrophoresis Using Reverse Polarity. *Analytical Biochemistry*, 1994, 221(1), 182.
135. Ruiz-Calero, V., Puignou, L., and Galceran, M.T., Determination of glycosaminoglycan monosaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2003, 791(1-2), 193.
136. Kakehi, K., Kinoshita, M., et al., Capillary electrophoresis of N-acetylneuraminic acid polymers and hyaluronic acid: Correlation between migration order reversal and biological functions. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(8), 1592.
137. Schou, C. and Heegaard, N.H.H., Recent applications of affinity interactions in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(1), 44.
138. Gayton-Ely, M., Pappas, T., and Holland, L., Probing affinity via capillary electrophoresis: advances in 2003-2004. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(3), 570.
139. He, X.Y., Ding, Y.S., et al., Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2004, 25(4-5), 697.
140. Tanaka, Y. and Terabe, S., Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2002, 768(1), 81.
141. Rundlett, K.L. and Armstrong, D.W., Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2001, 22(7), 1419.
142. Guijt-van Duijn, R.M., Frank, J., et al., Recent advances in affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2000, 21(18), 3905.
143. Heegaard, N.H.H. and Kennedy, R.T., Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions. *Electrophoresis*, 1999, 20(15-16), 3122.
144. Busch, M.H.A., Kraak, J.C., and Poppe, H., Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis. *Journal Of Chromatography A*, 1997, 777(2), 329.
145. Busch, M.H.A., Carels, L.B., et al., Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis. *Journal Of Chromatography A*, 1997, 777(2), 311.
146. Ostergaard, J. and Heegaard, N.H.H., Bioanalytical interaction studies executed by preincubation affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(13), 2590.

147. Liang, A.Y., Chao, Y.P., et al., Separation, identification, and interaction of heparin oligosaccharides with granulocyte-colony stimulating factor using capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2005, 26(18), 3460.
148. Le Saux, T., Varenne, A., et al., Determination of the binding parameters for antithrombin-heparin fragment systems by affinity and frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Journal Of Chromatography A*, 2006, 1132(1-2), 289.
149. Bergstrom, M., Nilsson, M., et al., Lectin affinity capillary electrophoresis in glycoform analysis applying the partial filling technique. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2004, 809(2), 323.
150. Berger, G. and Girault, G., Macromolecule-ligand binding studied by the Hummel and Dreyer method: current state of the methodology. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2003, 797(1-2), 51.
151. Busch, M.H.A., Boelens, H.F.M., et al., Vacancy affinity capillary electrophoresis, a new method for measuring association constants. *Journal Of Chromatography A*, 1997, 775(1-2), 313.
152. Manisali, I., Chen, D.D.Y., and Schneider, B.B., Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trac-Trends In Analytical Chemistry*, 2006, 25(3), 243.
153. Smith, R.D., Loo, J.A., et al., New Developments In Biochemical Mass-Spectrometry - Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*, 1990, 62(9), 882.
154. Fenn, J.B., Mann, M., et al., Electrospray Ionization For Mass-Spectrometry Of Large Biomolecules. *Science*, 1989, 246(4926), 64.
155. Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., et al., Electrospray Interface For Liquid Chromatographs And Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry*, 1985, 57(3), 675.
156. Bruins, A.P., Covey, T.R., and Henion, J.D., Ion Spray Interface For Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1987, 59(22), 2642.
157. March, R.E., Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2000, 200(1-3), 285.
158. Todd, J.F.J. and March, R.E., A retrospective review of the development and application of the quadrupole ion trap prior to the appearance of commercial instruments. *International Journal of Mass Spectrometry*, 1999, 190-191, 9.
159. Akashi, S., Investigation of molecular interaction within biological macromolecular complexes by mass spectrometry. *Medicinal Research Reviews*, 2006, 26(3), 339.
160. Heck, A.J.R. and Van Den Heuvel, R.H.H., Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2004, 23(5), 368.
161. Loo, J.A., Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 1997, 16(1), 1.

162. Pramanik, B.N., Bartner, P.L., et al., Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: an emerging technology. *Journal of Mass Spectrometry*, 1998, 33(10), 911.
163. Shields, S.J., Oyeyemi, O., et al., Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2003, 14(5), 460.
164. Veenstra, T.D., Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions. *Biophysical Chemistry*, 1999, 79(2), 63.
165. Wang, W., Kitova, E.N., and Klassen, J.S., Nonspecific Protein-Carbohydrate Complexes Produced by Nanoelectrospray Ionization. Factors Influencing Their Formation and Stability. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(10), 3060.
166. Wang, W., Kitova, E.N., and Klassen, J.S., Influence of Solution and Gas Phase Processes on Protein-Carbohydrate Binding Affinities Determined by Nanoelectrospray Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(19), 4945.
167. Ganem, B., Li, Y.T., and Henion, J.D., Detection Of Noncovalent Receptor Ligand Complexes By Mass-Spectrometry. *Journal Of The American Chemical Society*, 1991, 113(16), 6294.
168. Lumb, K.J., Aplin, R.T., et al., A study of D52S hen lysozyme-G1cNAc oligosaccharide complexes by NMR spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *FEBS Letters*, 1992, 296(2), 153.
169. Tuong, A., Uzabiaga, F., et al., Direct observation of the non-covalent complex between human antithrombin III and its heparin binding sequence by capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *Carbohydrate Letters*, 1994, 1(1), 55.
170. Van Dongen, W.D. and Heck, A.J.R., Binding of selected carbohydrates to apocanavalin A studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 2000, 125(4), 583.
171. Daniel, J.M., Friess, S.D., et al., Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2002, 216(1), 1.
172. Olivares, J.A., Nguyen, N.T., et al., Online Mass-Spectrometric Detection For Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1987, 59(8), 1230.
173. Campa, C., Coslovi, A., et al., Overview on advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry of carbohydrates: A tabulated review. *Electrophoresis*, 2006, 27(11), 2027.
174. Pleasance, S., Thibault, P., and Kelly, J., Comparison Of Liquid-Junction And Coaxial Interfaces For Capillary Electrophoresis Mass-Spectrometry With Application To Compounds Of Concern To The Aquaculture Industry. *Journal Of Chromatography*, 1992, 591(1-2), 325.
175. Lee, E.D., Muck, W., et al., Liquid Junction Coupling For Capillary Zone Electrophoresis Ion Spray Mass-Spectrometry. *Biomedical And Environmental Mass Spectrometry*, 1989, 18(9), 844.

176. Issaq, H.J., Janini, G.M., et al., Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometric detection - Advantages and limitations. *Journal Of Chromatography A*, 2004, 1053(1-2), 37.
177. Schmitt-Kopplin, P. and Frommberger, M., Capillary electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis*, 2003, 24(22-23), 3837.
178. Kannamkumarath, S.S., Wrobel, K., et al., Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. *Journal Of Chromatography A*, 2002, 975(2), 245.
179. Tanaka, Y., Otsuka, K., and Terabe, S., Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2003, 30(6), 1889.
180. Raffaelli, A. and Saba, A., Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2003, 22(5), 318.
181. Mol, R., de Jong, G.J., and Somsen, G.W., On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance. *Electrophoresis*, 2005, 26(1), 146.
182. Huck, C.W., Bakry, R., et al., Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2006, 27(11), 2063.
183. Stutz, H., Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis*, 2005, 26(7-8), 1254.
184. Banks, J.F., Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1997, 18(12-13), 2255.
185. Hernández-Borges, J., Neusüß, C., et al., On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Electrophoresis*, 2004, 25(14), 2257.
186. Klampfl, C.W., Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection. *Electrophoresis*, 2006, 27(1), 3.
187. Wittke, S., Kaiser, T., and Mischak, H., Differential polypeptide display: the search for the elusive target. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2004, 803(1), 17.
188. Monton, Rowena, N.M., et al., Recent developments in capillary electrophoresis-mass spectrometry of proteins and peptides. *Analytical Sciences*, 2005, 21(1), 5.
189. Cao, P. and Moini, M., Analysis of peptides, proteins, protein digests, and whole human blood by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode sheathless interface. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 1998, 9(10), 1081.

190. Schiffer, E., Mischak, H., and Novak, J., High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics*, 2006, 6(20), 5615.
191. Neuss, C., Demelbauer, U., and Pelzing, M., Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2005, 26(7-8), 1442.
192. Duteil, S., Gareil, P., et al., Identification of heparin oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis/ionspray-mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 1999, 13(19), 1889.
193. Gunay, N.S. and Linhardt, R.J., Capillary electrophoretic separation of heparin oligosaccharides under conditions amenable to mass spectrometric detection. *Journal Of Chromatography A*, 2003, 1014(1-2), 225.
194. Kuhn, A.V., Ruttinger, H.H., et al., Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis with electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 2003, 17(6), 576.
195. Zamfir, A., Seidler, D.G., et al., On-line sheathless capillary electrophoresis/nanoelectrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Electrophoresis*, 2004, 25(13), 2010.
196. Chu, Y.H., Dunayevskiy, Y.M., et al., Affinity capillary electrophoresis mass spectrometry for screening combinatorial libraries. *Journal Of The American Chemical Society*, 1996, 118(33), 7827.
197. Dunayevskiy, Y.M., Lyubarskaya, Y.V., et al., Simultaneous Measurement of Nineteen Binding Constants of Peptides to Vancomycin Using Affinity Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, 41(7), 1201.
198. Brenner-Weiss, G., Kirschhofer, F., et al., Analysis of non-covalent protein complexes by capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1009(1-2), 147.
199. Feras, S., Gonnet, F., et al., Frontal Analysis Capillary Electrophoresis Hyphenated to Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of the Antithrombin/Heparin Pentasaccharide Complex. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(13), 4987.
200. Eriksson, J.H.C., Mol, R., et al., Feasibility of nonvolatile buffers in capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of proteins. *Electrophoresis*, 2004, 25(1), 43.
201. Kim, M.Y., Varenne, A., et al., Capillary electrophoresis profiles of fucoidan and heparin fractions: significance of mobility dispersity for their characterization. *Journal Of Separation Science*, 2003, 26(12-13), 1154.
202. Le Saux, T., Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances.

Rationalisation des protocoles. *Thèse de doctorat* 2004, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris.

203. Streusand, V.J., Björk, I., et al., Mechanism of Acceleration of Antithrombin-Proteinase Reactions by Low Affinity Heparin. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(16), 9043.

204. Gunnarsson, K., Valtcheva, L., and Hjerten, S., Capillary zone electrophoresis for the study of the binding of antithrombin to low-affinity heparin. *Glycoconjugate Journal*, 1997, 14(7), 859.

205. Nordenman, B. and Bjork, I., Influence Of Ionic-Strength And Ph On The Interaction Between High-Affinity Heparin And Anti-Thrombin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1981, 672(3), 227.

206. Atha, D.H., Lormeau, J.C., et al., Contribution Of Monosaccharide Residues In Heparin Binding To Antithrombin-III. *Biochemistry*, 1985, 24(23), 6723.

207. Katri Huikko, Kotiaho, T., and Kostianen, R., Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 16(16), 1562.

208. Petitou, M., Duchaussoy, P., et al., Synthesis of heparin fragments: A methyl [alpha]-pentaoside with high affinity for antithrombin III. *Carbohydrate Research*, 1987, 167, 67.

209. Abzalimov, R.R., Dubin, P.L., and Kaltashov, I.A., Glycosaminoglycans as Naturally Occurring Combinatorial Libraries: Developing a Mass Spectrometry-Based Strategy for Characterization of Anti-Thrombin Interaction with Low Molecular Weight Heparin and Heparin Oligomers. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(16), 6055.

210. Baryshnikova, O.K. and Sykes, B.D., Backbone dynamics of SDF-1 alpha determined by NMR: Interpretation in the presence of monomer-dimer equilibrium. *Protein Science*, 2006, 15(11), 2568.

211. Kaltashov, I.A. and Eyles, S.J., Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2002, 21(1), 37.

212. Varenne, A., Gareil, P., et al., Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins: study of the binding properties of fucoidan to antithrombin. *Analytical Biochemistry*, 2003, 315(2), 152.

213. Tissot, B., Montdargent, B., et al., Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics*, 2003, 1651(1-2), 5.

214. Hua, Y., Du, Y., et al., Synthesis and biological activities of octyl 2,3-di-O-sulfo-[alpha]-fucopyranosyl-(1 --> 3)-2-O-sulfo-[alpha]-fucopyranosyl-(1 --> 4)-2,3-di-O-sulfo-[alpha]-fucopyranosyl-(1 --> 3)-2-O-sulfo-[alpha]-fucopyranosyl-(1 --> 4)-2,3-di-O-sulfo-[beta]-fucopyranoside. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(12), 2083.

215. M.E. Palmer, L.W.T.I.D.W., Hydrogen/deuterium exchange using a coaxial sheath-flow interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, 14(9), 808.
216. Keiser, N., Venkataraman, G., et al., Direct isolation and sequencing of specific protein-binding glycosaminoglycans. *Nat Med*, 2001, 7(1), 123.
217. Kimber L. Rundlett, D.W.A., Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, 18(12-13), 2194.
218. Rodriguez, I. and Li, S.F.Y., Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 383(1-2), 1.
219. Horvath, J. and Dolnik, V., Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2001, 22(4), 644.
220. Busch, M.H.A., Kraak, J.C., and Poppe, H., Cellulose Acetate-Coated Fused-Silica Capillaries For The Separation Of Proteins By Capillary Zone Electrophoresis. *Journal Of Chromatography A*, 1995, 695(2), 287.
221. Yang, C.M. and El Rassi, Z., Capillary zone electrophoresis of proteins with fused-silica capillaries having polymers and surfactants adsorbed onto surfactant moieties previously covalently bound to the capillary column surface. *Electrophoresis*, 1998, 19(13), 2278.
222. Iki, N. and Yeung, E.S., Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1996, 731(1-2), 273.
223. Tran, N.T., Taverna, M., et al., Poly(ethylene oxide) facilitates the characterization of an affinity between strongly basic proteins with DNA by affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2005, 26(16), 3105.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés de l'antithrombine humaine.....	11
Tableau 2 : Caractéristiques techniques des méthodes d'analyse d'interactions protéines / ligands.	27
Tableau 3: Masses des fractions d'héparine étudiées.....	61
Tableau 4 : Mesure des constantes de dissociation AT / Héparines obtenues par ACE	65
Tableau 5 : Mesures des constantes de dissociation AT / Héparines obtenues par FACCE	68
Tableau 6 : Constantes de dissociation du complexe AT / héparines de haute affinité.....	69
Tableau 7 : Correction des constantes de dissociation de l'interaction AT / pentaH obtenues par FACCE	69
Tableau 8 : Attribution des ions du pentaH.....	83
Tableau 9 : Attribution des ions du pentaH dissociés du complexe.....	85
Tableau 10 : Caractéristiques des chimiokines étudiées.....	127
Tableau 11: Caractéristiques des héparines de bas poids moléculaires	129
Tableau 12 : Caractéristiques des fragments d'énnoxaparine.....	129
Tableau 13 : Equations de linéarisation pour électrophorèse de zone d'affinité	131
Tableau 14 : Equations de linéarisation pour analyse frontale	132
Tableau 15 : Protocole d'activation d'un capillaire de silice vierge	134
Tableau 16 : Protocole de greffage d'hydroxypropylcellulose	136
Tableau 17 : Protocole de tapissage au poly(éthylène oxyde)	137
Tableau 18 : Caractéristiques des protéines basiques étudiées.....	138

FIGURES

Figure 1 : Unités disaccharidiques de base des glycosaminoglycanes.....	6
Figure 2 : Structure en domaines des héparanes sulfates	10
Figure 3 : Structure du pentasaccharide d'héparine et sites de liaison à l'antithrombine	13
Figure 4 : Structure du complexe antithrombine / pentasaccharide d'héparine	13
Figure 5 : Inhibition du facteur Xa et de la thrombine par l'antithrombine et l'héparine	15
Figure 6 : Migration des leucocytes du sang vers les tissus (diapédèse)	17
Figure 7 : Séquence de SDF-1 α humaine	19
Figure 8 : Modélisation de l'interaction SDF-1 α / héparine	19
Figure 9 : Séquence de MCP-1 humaine	20

Figure 10 : Spectres de masse FTICR de MCP-1 en conditions non dénaturantes	20
Figure 11 : Modélisation de l'interaction MCP-1 / héparine	21
Figure 12 : Nombre d'isomères possibles en fonction du nombre de monomères	24
Figure 13 : Principe de l'étude d'interaction récepteur / ligand par polarisation de fluorescence .	28
Figure 14 : Dosage calorimétrique de l'interaction lectine / lactulose	31
Figure 15 : Séparation électrophorétique en présence d'un flux électro-osmotique cathodique ...	35
Figure 16 : Comparaison des modes d'injection par analyse frontale	37
Figure 17 : Etude de l'interaction Antithrombine / héparine par ACE.....	41
Figure 18 : Etude de l'interaction antithrombine / héparine par FACCE	42
Figure 19 : Source electrospray	43
Figure 20 : Source ionspray.....	44
Figure 21 : Schéma d'un piège à ions quadripolaire de seconde génération	45
Figure 22 : Analyse d'interactions non covalentes protéine / ligands par IS-MS.....	46
Figure 23 : Spectre de masse du complexe antithrombine/pentasaccharide d'héparine.....	47
Figure 24 : Analyse d'interactions non covalente chimiokine / oligosaccharide par ESI- FTICRMS	48
Figure 25 : Interfaces de couplage CE-ESI.....	50
Figure 26 : Electrophérogramme de l'antithrombine par CZE.....	59
Figure 27 : Séparation en mode zone de différents fragments d'héparine	60
Figure 28 : Représentation schématique de la séparation de l'antithrombine et de l'héparine	62
Figure 29 : Electrophérogrammes de l'antithrombine en CZE en présence ou non de pentaH....	63
Figure 30 : Electrophérogrammes de l'antithrombine en CZE en présence ou non de LMWHB	63
Figure 31 : Représentation schématique de l'analyse du mélange antithrombine / héparine pré- incubé.....	64
Figure 32 : Représentation schématique de l'analyse de l'interaction antithrombine / héparine par ACE.....	65
Figure 33 : Electrophérogrammes de l'antithrombine en présence ou non d'héparine obtenus par FACCE	67
Figure 34 : Spectres de masse en conditions dénaturantes d'antithrombines brutes.....	71
Figure 35 : Spectre de masse en conditions dénaturantes de l'antithrombine filtrée	72
Figure 36 : spectre de masse en conditions non dénaturantes de l'antithrombine filtrée	72
Figure 37 : Interface de couplage avec nébuliseur coaxial	74
Figure 38 : Spectres de l'antithrombine obtenus par CZE-MS ^{pos} et FACCE-MS ^{pos} en conditions dénaturantes	76
Figure 39 : Spectres de l'antithrombine obtenus par FACCE-MS en conditions dénaturantes ou non.....	77
Figure 40 : Analyse par FACCE-MS du mélange antithrombine / pentasaccharide d'héparine .	79

Figure 41 : Spectres des complexes AT / LMWHC obtenus par FACE-MS en conditions non dénaturantes	81
Figure 42 : Spectre de masse du pentaH par MS ^{neg}	82
Figure 43 : Spectre de l'antithrombine obtenu par FACE-MS ^{neg} en conditions dénaturantes	84
Figure 44 : Spectre du pentaH obtenu par FACE-MS ^{neg} en conditions dénaturantes.....	84
Figure 45 : Spectres des LMWHC obtenus par FACE-MS ^{neg} en conditions dénaturantes	86
Figure 46 : Séquence de SDF-1 (3/6).....	92
Figure 47 : Electrophérogrammes de SDF-1 α et SDF-1 (3/6) sur capillaire tapissé de poly(éthylène oxyde)	94
Figure 48 : Electrophérogrammes de SDF-1 α en présence d'eno α 6 obtenus par ACE	95
Figure 49 : Représentation schématique de la migration du complexe SDF-1 α / héparine	96
Figure 50 : Electrophérogrammes de SDF-1 (3/6) en présence d'eno α 6 obtenus par ACE.....	97
Figure 51 : Spectres de SDF-1 α et SDF-1 (3/6) obtenus par CZE-MS	98
Figure 52 : Structure du disaccharide IS.....	99
Figure 53 : Analyse SDF-1 α en présence d'hepIS obtenus par ACE-MS.....	100
Figure 54 : Spectres de SDF-1 α en présence d'eno α parines obtenus par ACE-MS.....	101
Figure 55 : Structures d'oligosaccharides d'eno α parine	103
Figure 56 : Structure du pentasaccharide de fucane (penta α)	104
Figure 57 : Spectre de SDF-1 α en présence de pentasaccharide de fucoïdane obtenus par ACE-MS	104
Figure 58 : Spectres de SDF-1 3/6 en présence d'oligosaccharides obtenus par ACE-MS	106
Figure 59 : Electrophérogrammes de MCP-1 en présence d'oligosaccharides obtenus par ACE.....	108
Figure 60 : Spectre de MCP-1 obtenu par ACE-MS.....	109
Figure 61 : Spectre de MCP-1 en présence de disaccharide d'héparine obtenu par ACE-MS....	110
Figure 62 : Spectres de MCP-1 en présence d'eno α parines obtenus par ACE-MS	111
Figure 63 : Spectre de MCP-1 en présence de pentasaccharide de fucoïdane obtenu par ACE-MS	112
Figure 64 : Spectre de MCP-1 en présence d'hexasaccharide d'eno α parine obtenus par ACE-MS	112
Figure 65 : Electrophérogrammes de MCP-1 en présence ou non de décasaccharide d'eno α parine	113
Figure 66 : Représentation schématique du spectromètre de masse Esquire 3000+	125
Figure 67 : Structure du pentasaccharide d'héparine (pentaH)	128
Figure 68 : Unité disaccharidique d'eno α parine.....	130
Figure 69: Droite d'étalonnage de l'antithrombine réalisée en FACCE	133
Figure 70 : Hydroxypropylcellulose.....	135
Figure 71 : Electrophérogrammes de SDF-1 α sur capillaire greffé hydroxypropylcellulose	136
Figure 72 : Poly(éthylène oxyde).....	137

ABREVIATIONS

A	AB	Alcool Benzylque (marqueur neutre)
	ACE	Affinity Capillary Electrophoresis
	ADN	Acide DésoxyriboNucléique
	APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
	App	Apparente
	APPI	Atmospheric Pressure PhotoIonisation
	AT	Antithrombine
	AU	Arbitrary Unit
C	CE	Capillary Electrophoresis
	FACE	Capillary Electrophoresis Frontal Analysis
	CZE	Capillary Zone Electrophoresis
D	d.i.	Diamètre interne
E	Enox	Enoxaparine
	eo	électro-osmotique
	ep	électrophorétique
	ESI	ElectroSpray Ionisation, électronébulisation
F	f	flux
	FACCE	Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis
	FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
G	GAG	Glycosaminoglycane
	g	gramme
H	H	Héparine
	HEPES	Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonique
	HPC	HydroxyPropylCellulose
	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K	K_a / K_d	Constante d'association / de dissociation

L	L, l	Longueur totale, longueur utile
	LIF	Laser Induced Fluorescence
	LMWH	Low Molecular Weight Heparin
M	μ_i	mobilité
	M	Molaire (mole par litre) ou Masse molaire (gramme par mole)
	MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation
	MCP	Monocyte chemoattractant protein
	MIP	Macrophage Inflammatory Protein
	MN	Marqueur Neutre (alcool benzylique ou eau)
	MS	Mass Spectrometry
P	Pentafuc	Pentasaccharide de fucane
	PentaH	Pentasaccharide d'héparine
	PEO	Poly (EthylèneOxyde)
R	RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S	SDF	Stromal cell Derived Factor
	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
	SPR	Surface Plasmon Resonance
T	TIC	Total Ion Current
	TOF	Time Of Flight
U	UV	Ultraviolet
	v_i	vitesse
V	V	Volt
	VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine

RESUME

L'intérêt croissant pour les glucides bioactifs et leurs complexes avec des protéines requiert une méthodologie adaptée à leur caractérisation. L'électrophorèse capillaire (CE) présente de nombreux avantages pour l'étude d'interactions non covalentes de molécules libres en solution, permettant notamment la détermination de constantes de dissociations. La spectrométrie de masse par ionisation electrospray (ESIMS) est reconnue comme étant une méthode de choix pour l'analyse d'interactions non covalentes mais également de protéines et d'oligosaccharides sulfatés. Nous avons donc mis en œuvre des stratégies de couplage CE-ESIMS appliquées à l'étude de complexes non covalents protéine /oligosaccharide.

La validité de ce couplage a d'abord été évaluée par l'analyse du complexe modèle antithrombine / héparine. En fonction des objectifs recherchés, il a été possible soit de maintenir ce complexe non covalent soit de le dissocier en source grâce à des conditions dénaturantes ou non. Le maintien du complexe permet une détermination de sa stœchiométrie, tandis que sa dissociation ouvre la voie de l'identification des ligands. La seconde stratégie a concerné la caractérisation de complexe chimiokines / oligosaccharides. L'étude des complexes non covalents nous a permis d'évaluer les effets de la liaison d'oligosaccharides sur la formation d'oligomères protéiques.

ABSTRACT

The increasing interest in protein / carbohydrate interaction is accompanied by a demand for viable and high throughput methodologies for their characterization. Capillary electrophoresis (CE) offers powerful attributes for the study of non covalent complexes, particularly as regard the determination of binding parameters. Electrospray mass spectrometry (ESIMS) is widely recognized as a powerful analytical method for the characterisation of sulfated oligosaccharides and non covalent interactions. Therefore, we present data on the implementation of analytical strategies based on CE-ESIMS for the characterisation of protein / carbohydrate complexes.

The CE-ESIMS methodology was first applied to the analysis of the prototypic complex between antithrombin and heparin. Ionisation conditions were optimised either to preserve the non covalent complex in the MS source, or allow its dissociation using denaturing conditions. In one hand, the stoichiometry of the complex could be obtained through the MS analysis of the native complex in non-denaturing conditions. In the other hand, the structural characterisation of the sulfated ligand could be performed through dissociation of the complex. This CE-ESIMS approach was also used to investigate on the non covalent complexes formation between the chemokines and oligosaccharides. The isolation of the non covalent complex allowed studying the binding effect on the oligomerisation status of these proteins.