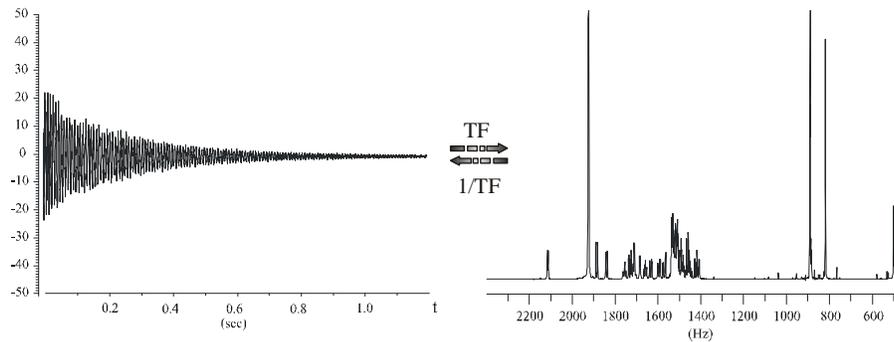




RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

(Apprentissage à l'interprétation des spectres à une et deux dimensions des chaînes O-glycanniques)



Emmanuel MAES

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle
UMR 8576 du CNRS, Université de Lille 1
F-59655 Villeneuve d'Ascq



Je voudrais ici remercier très vivement, mon Maître, Monsieur le Dr Gérard Strecker sans lequel ce livret n'aurait jamais pu exister. Gérard m'a accueilli dans son laboratoire en 1994, j'ai pu à cette occasion suivre ma formation de D.E.A.. Celle-ci avait pour thème l'élucidation des structures glycaniques isolées de mucines d'amphibiens en relation avec la spécificité d'espèces. J'ai pu obtenir au terme de cette formation, une bourse du ministère de l'enseignement et de la recherche démontrant ainsi la qualité de l'enseignement et de l'apprentissage que j'ai suivis. Après ma thèse de doctorat, obtenue en 1997, j'ai été recruté par le CNRS qui m'a donné pour mission, l'analyse structurale des glycannes et glycoconjugués par Résonance Magnétique Nucléaire au sein de l'Unité Mixte de Recherche 8576. J'ai depuis participé à la publication de plusieurs dizaines d'articles scientifiques et tente de rendre plus accessible cette méthodologie à une plus large communauté notamment par le biais d'enseignements en master biochimie.

Merci Gérard

TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION	5
2.	SCHEMA GENERAL D'UNE EXPERIENCE R.M.N.....	6
3.	PRINCIPE DE BASE.....	7
3.1	Qu'est ce que la Résonance Magnétique Nucléaire ?.....	7
3.2	Quels sont les noyaux capables de fournir une résonance ?.....	7
3.3	Les états énergétiques	7
3.4	Fréquence de précession.....	7
3.5	La résonance.....	8
4.	PRINCIPE GENERAL.....	9
4.1	Comment mesurer la fréquence de précession ?	10
4.2	Comment supprimer les signaux indésirables ?	11
4.3	Les monosaccharides	11
4.4	Les conditions de mesure	14
4.5	Les paramètres importants	14
4.5.1	Le déplacement chimique	15
4.5.2	La densité électronique.....	16
4.5.3	Intensité des signaux	16
4.5.4	La constante de couplage (J)	17
4.5.4.1	Le nombre de protons (figure 7)	17
4.5.4.2	Angle entre deux protons.....	18
4.6	Comment appréhender l'interprétation des spectres R.M.N. des O-glycannes ?.....	21
4.6.1	Méthodologie suivie	21
4.7	Les expériences R.M.N.....	21
4.7.1	Le spectre proton (^1H) à une dimension	21
4.7.2	Les spectres ^{13}C et ^{31}P à une dimension.....	23
4.7.2.1	Le carbone :	23
4.7.2.2	Le phosphore :	24
4.7.3	L'expérience COSY homonucléaire $^1\text{H}/^1\text{H}$	24
4.7.4	Expérience hétéronucléaire	24
4.7.4.1	HMQC : Heteronuclear MultiQuantum Coherence.....	24
4.7.4.2	HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation.....	25
4.7.5	Les expériences ROESY (Rotating frame Over Hauser Effect SpectroscopY)	25
5.	ETUDE D'UN EXEMPLE.....	27
5.1	Obtention et spectre ^1H du N-acétyl-galactosaminitol	27
5.2	Spectre d'un oligosaccharide-alditol	29
5.2.1	Spectre proton 1D de l'oligosaccharide	30
5.2.1.1	Identification de l'osaminitol (Figure 15 C, D).....	30
5.2.1.2	Observation de signaux particuliers	31
5.2.2	Les expériences COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$	31
5.2.3	COSY 1 relais de l'oligosaccharide-alditol.....	35
5.2.4	COSY 2 relais	37
5.2.5	Spectre HMQC de l'oligosaccharide-alditol	39
5.2.6	Expérience ROESY.....	41
6.	EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES.....	43

7.	L'INDICE SOACS	44
7.1	Introduction	44
7.2	Principe	45
7.2.1	O-Glycannes	45
7.2.1.1	Calcul des indices SOACS et SOACS-ol à partir d'un spectre 1D proton	46
7.2.1.2	Structures de O-glycannes sialylés	47
7.2.1.3	Calcul des indices à partir de spectres homonucléaires 2D ...	47
7.2.1.4	Définition d'une marge d'erreur	48
7.2.2	N-Glycannes	66
7.3	Molécules de chimie organique.....	67
7.4	Conclusion.....	70
8.	CONCLUSION	71
9.	BIBLIOGRAPHIE	72

1. INTRODUCTION

Ce livret a pour but d'expliquer les principes et la méthodologie de la R.M.N. au plus grand nombre. C'est pourquoi de nombreuses simplifications et omissions ont été sciemment faites. Ceci réjouira les néophytes, ne dérangera pas les amateurs, mais scandalisera probablement les spécialistes auxquels nous demandons quelques indulgences

La Résonance Magnétique Nucléaire en milieu liquide est une technique puissante non destructive permettant de déterminer la structure des molécules biologiques et en particulier celle des oligosaccharides.

Elle est basée sur la propriété magnétique de certains atomes (ou noyaux) dont le proton (^1H), le carbone (^{13}C) ou encore le phosphore (^{31}P). Par conséquent, les oligosaccharides sont particulièrement adaptés à ce type d'expérience. Dans ce livret nous aborderons brièvement la théorie de la résonance en prenant le modèle vectoriel comme représentation du noyau. Ce modèle, très accessible pour un grand nombre d'utilisateurs, ne correspond pas tout à fait à la réalité, mais il permet de simplifier considérablement la représentation du principe de R.M.N.. Après une brève description théorique nous tenterons d'expliquer le cheminement d'une analyse structurale par RMN d'un oligosaccharide-alditol. Enfin nous terminerons cette étude par l'explication d'un nouveau type de requête informatique inventée pour une recherche de séquence glycanique plus aisée dans les banques de données.

2. SCHEMA GENERAL D'UNE EXPERIENCE R.M.N.

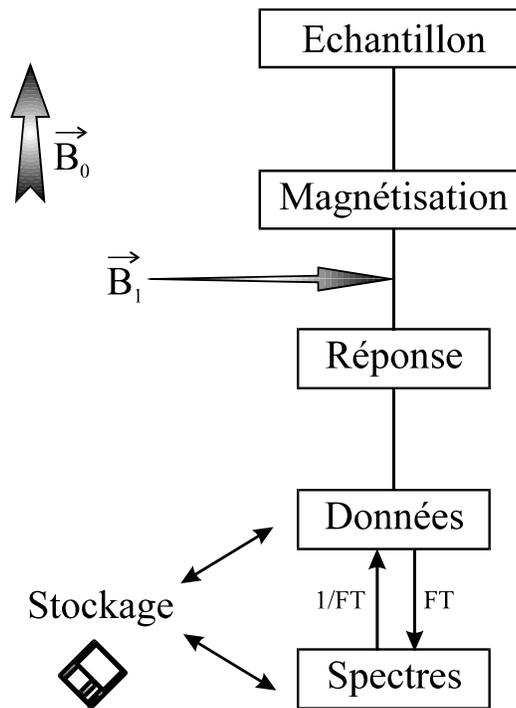


Figure 1 : Représentation schématique d'une expérience R.M.N.

L'échantillon est placé dans un champ magnétique statique intense (B_0). Les molécules de cet échantillon sont soumises à un champ magnétique appliqué B_1 qui provoque une perturbation des atomes considérés. L'application de ce champ de radiofréquence (RF) choisie (impulsion ou "pulse") est de courte durée, quelques microsecondes. Les noyaux génèrent à leur tour un micro-champ magnétique qui sera capté par une bobine réceptrice, c'est le signal R.M.N. (Données). Ces données sont envoyées à un ordinateur où elles sont analysées et transformées en signal. Le traitement mathématique, ou transformée de Fourier, permet de transformer le signal en spectre R.M.N.

3. PRINCIPE DE BASE

3.1 QU'EST CE QUE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ?

Certains noyaux sont comparables à de petits aimants, qui soumis à un champ magnétique intense peuvent sous l'action d'un champ de radio fréquence (RF) convenable, absorber une certaine quantité d'énergie : c'est le phénomène de résonance. Il se traduit par le passage des noyaux d'un état énergétique favorable à un état énergétique défavorable.

3.2 QUELS SONT LES NOYAUX CAPABLES DE FOURNIR UNE RESONANCE ?

Tous les noyaux ne présentent pas de résonance, il en existe deux types :

- Les noyaux sensibles au champ magnétique externe qui possèdent un spin nucléaire I égal à $\frac{1}{2}$ comme le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , l'azote ^{15}N ou le fluor ^{19}F . Ils ont une circulation de charge sphérique, et possèdent deux moments magnétiques.
- Les noyaux à spin I supérieur à $\frac{1}{2}$: le deutérium ^2H l'azote ^{14}N , l'oxygène ^{17}O ou encore le soufre ^{33}S ont une circulation de charge non sphérique et possèdent un moment quadripolaire nucléaire. Tous ces noyaux sont capables de résonner mais dans des conditions différentes.
- Les noyaux non sensibles possèdent tous un nombre de masse et un nombre atomique pairs. La parité de ces deux valeurs entraîne un moment magnétique nucléaire unique. Les noyaux de carbone ^{12}C ou d'oxygène ^{16}O possèdent un spin I égal à 0.

3.3 LES ETATS ENERGETIQUES

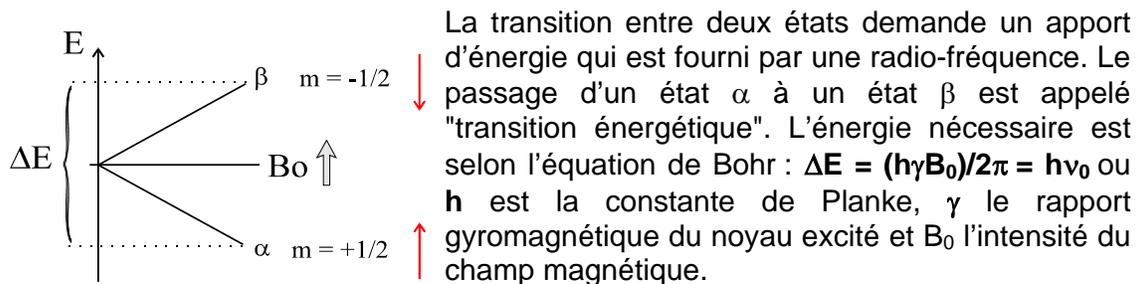
Soumis à un champ magnétique B_0 , un noyau de spin I non nul peut prendre $2I+1$ orientations par rapport à la direction de ce champ.

Pour exemple, le proton (^1H) qui possède un spin nucléaire $I = \frac{1}{2}$ prend 2 orientations, celles-ci correspondent au nombre quantique m :

$m = +\frac{1}{2}$ lorsque le spin nucléaire est dans la même direction que le champ appliqué, il est alors dans un état énergétique favorable α .

$m = -\frac{1}{2}$ lorsque le spin nucléaire à une orientation antiparallèle au champ appliqué. Il est alors dans une position énergétique défavorable β .

L'équation de Boltzman $N\beta/N\alpha = \exp(-\Delta E/kT)$ définit le rapport des noyaux dans les deux états d'énergies.

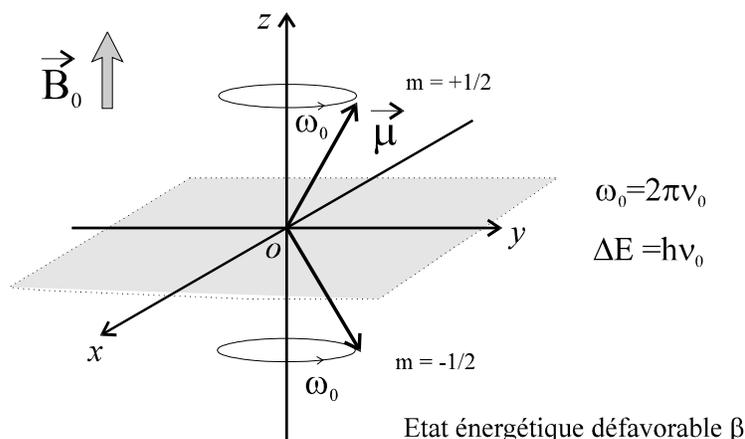


3.4 FREQUENCE DE PRECESSION

Le noyau peut être représenté par un vecteur de moment magnétique μ (avec une direction et une intensité). Ce moment magnétique tourne, autour d'un axe

dirigé suivant la direction du champ appliqué \vec{B}_0 , à la vitesse $\omega_0 = 2\pi\nu_0$, ou ν_0 est la fréquence de Larmor du noyau, elle est également appelée fréquence de précession, celle-ci est fonction du champ \vec{B}_0 . ($\nu_0 = \gamma\vec{B}_0 / 2\pi$)

Etat énergétique favorable α



3.5 LA RESONANCE

La résonance consiste donc au passage du noyau d'un état énergétique favorable α (suivant la direction B_0) à un état énergétique défavorable β (antiparallèle à B_0). Cette transition est induite par l'application ponctuelle d'un champ magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 et de radiofréquence (RF) choisie ν_{B1} . Pour avoir résonance du noyau, il faut que la RF appliquée soit égale à la fréquence de précession du noyau :

$$\nu_{B1} = \nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$$

L'arrêt de l'application de la RF va permettre le retour à l'équilibre des noyaux, c'est le phénomène de relaxation (Figure 2).

Condition de résonance :

$$\Delta E = h \nu_0 = h \gamma_H B_0 / 2\pi$$

$$\nu_0 = \gamma_H B_0 / 2\pi = \nu_{B1}$$

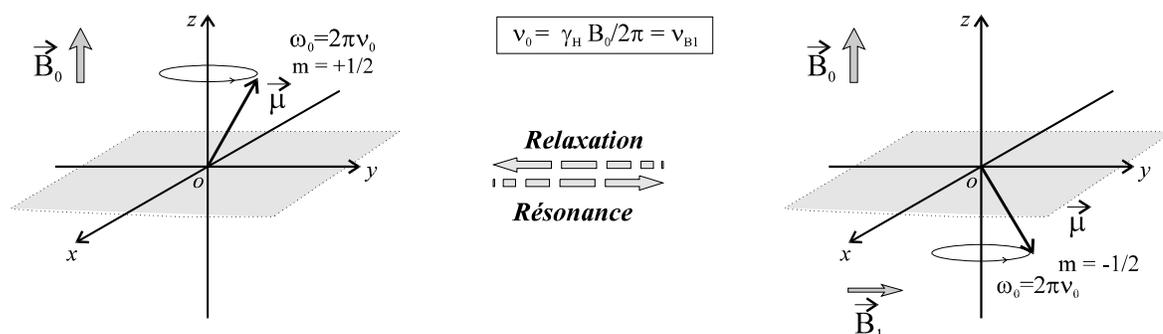
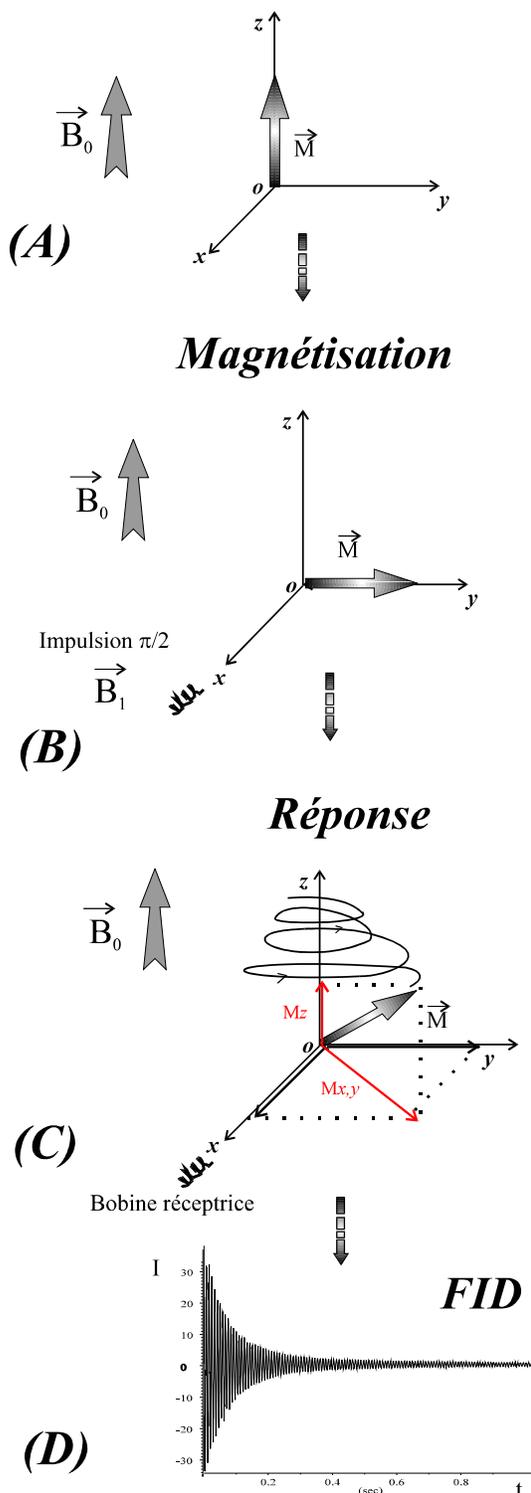


Figure 2 : Représentation vectorielle de l'application d'une radiofréquence B_1 sur un vecteur moment magnétique μ représentant un spin nucléaire de proton. La résonance est obtenue quand la RF appliquée ν_1 est égale à la fréquence de précession du noyau ν_0 .

Dans une molécule, comme un oligosaccharide, tous les protons ne sont pas équivalents et par conséquent les fréquences de précession sont différentes. C'est pourquoi la RF B_1 est appliquée avec des fréquences croissantes ce qui permet d'atteindre la résonance pour chaque noyau.

4. PRINCIPE GENERAL

Dans cette partie nous nous intéresserons aux moments magnétiques totaux qui sont définis comme la magnétisation macroscopique, \vec{M} . Celle-ci représente la somme des moments magnétiques des noyaux parallèles et antiparallèles. La population des noyaux dans un état α étant plus grande que la population β , la magnétisation \vec{M} est donc orientée suivant la direction du champ B_0 .



La magnétisation macroscopique M est, dans un champ intense B_0 , parallèle à ce dernier, elle est appelée dans ce cas magnétisation longitudinale (Figure 3A). L'application d'une RF dont la composante magnétique (externe) B_1 est perpendiculaire au champ B_0 provoque le basculement de cette magnétisation sur un plan xoy pour donner la magnétisation transversale, c'est le principe de l'impulsion R.M.N. ou pulse (Figure 3B).

L'application de cette radiofréquence choisie sera de courte durée (quelques microsecondes). Les noyaux, dans une position énergétique défavorable, tendent à revenir dans leur position initiale à l'équilibre. La magnétisation transversale va revenir à l'équilibre en oscillant autour de l'axe à la fréquence de précession des noyaux (Figure 3C). Cette fréquence est spécifique de chaque espèce de noyaux et dépend de l'environnement électronique (densité électronique) de ces derniers.

A titre d'exemple le galactose possède 8 protons différents par leur environnement et leur position. Ces derniers, qui ont chacun leur propre fréquence de précession, donnent alors 8 signaux différents.

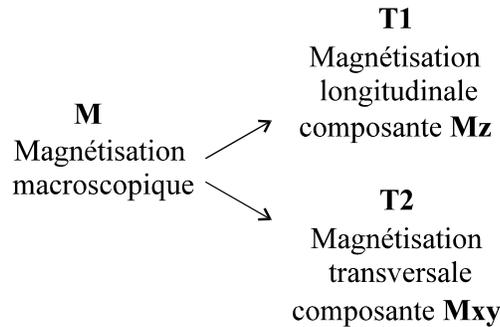
Figure 3 : Représentation schématique de l'application d'une radiofréquence B_1 sur la magnétisation macroscopique.

4.1 COMMENT MESURER LA FREQUENCE DE PRECESSION ?

L'arrêt de l'application de B_1 va permettre à la magnétisation transversale de revenir à sa position initiale le long de l'axe z avec une fréquence de précession spécifique et pendant un certain temps T.

La projection du vecteur de magnétisation sur le plan xoy qui correspond à la magnétisation transversale décroît en fonction du temps (Figure 3C). Cette décroissance peut être mesurée et correspond au temps de relaxation transversale T_2 .

De la même manière, la composante M_z représente la magnétisation transversale qui peut être mesurée et elle correspond au temps T_1 .



L'oscillation des noyaux provoque un champ électromagnétique qui est capté par un récepteur situé suivant l'axe y. Le signal obtenu s'appelle une FID¹ ou décroissance d'induction libre (Figure 3D). Ce signal est tout à fait comparable à celui produit par un guitariste qui pince une corde de sa guitare, le son résultant, de fréquence constante, a une intensité qui diminue en fonction du temps.

Ce signal ($S = f(t)$) n'est pas exploitable en tant que tel, c'est pourquoi il est transformé en fonction d'une fréquence. C'est la transformée de Fourier qui permet d'obtenir le spectre connu $I = f(\text{Hz})$.

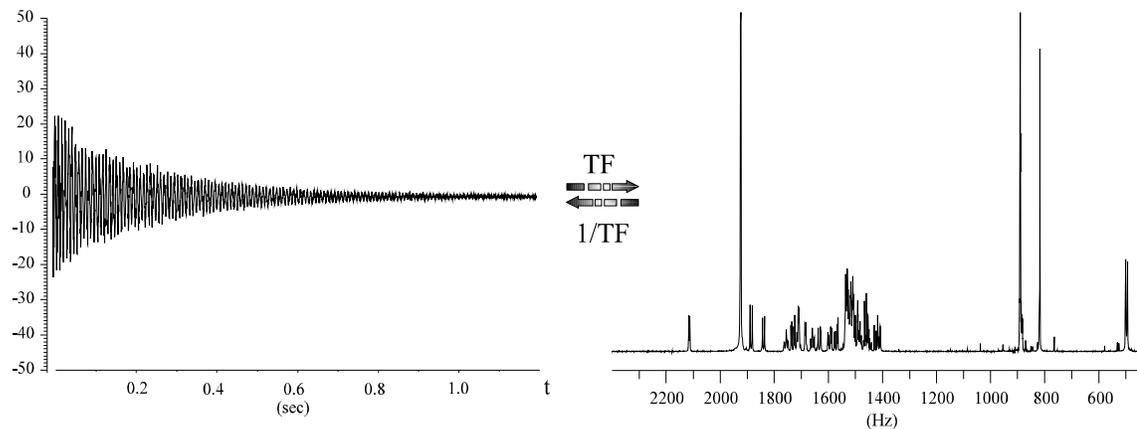


Figure 4 : La transformée de Fourier permet de transformer la FID totale qui est une fonction du temps $S = f(t)$ en un spectrogramme qui est une fonction de fréquence (Hz). Chaque signal correspond à une fréquence de précession d'un noyau donné.

¹ FID : Free Induction Decay

La FID finale est en fait, constituée d'une superposition de sinusoïdes amorties, chacune d'elles correspondant à un type de noyau. Il y a donc autant de sinusoïdes que de signaux R.M.N..

4.2 COMMENT SUPPRIMER LES SIGNAUX INDESIRABLES ?

Un monosaccharide comme le galactose possède 12 atomes d'hydrogène chimiquement différents. En effet certains atomes sont chimiquement mobiles, c'est notamment le cas des protons hydroxyles (-OH) et des protons des fonctions aminées (-NH-). Ceux ci sont remplacés par des atomes de deutérium (^2H) qui, dans les conditions de mesure standards, ne résonnent pas. Ils sont par conséquent invisibles sur un spectre R.M.N.. Cette opération s'appelle l'échange chimique.

Cette modification consiste à solubiliser l'échantillon anhydre dans un volume de $^2\text{H}_2\text{O}$ (D_2O), de lyophiliser et de solubiliser à nouveau dans le même solvant. Cette opération peut être répétée plusieurs fois si nécessaire. Néanmoins le D_2O n'est pas enrichi à 100% de deutérium si bien qu'il subsiste alors un signal résiduel d'eau visible sur le spectre et noté HOD (HO^2H).

4.3 LES MONOSACCHARIDES

Les monosaccharides peuvent exister sous deux configurations différentes (appelé D ou L) et un grand nombre de conformations (pyranique, furanique etc. ...) (pour revue McNaught 1997). Néanmoins les sucres pyraniques adoptent presque toujours les conformations chaises $^4\text{C}_1$ ou $^1\text{C}_4$ (Figure 5). C'est cette dernière qui est considérée dans ce travail. La connaissance de la conformation des sucres est essentielle pour pouvoir interpréter un spectre R.M.N.. La majorité des monosaccharides ont une conformation en $^4\text{C}_1$ (Tableau 1) qui signifie que le carbone n° 4 du cycle est au dessus du plan formé par l'oxygène du pont hémiacétalique et les carbones C2, C3, C5, alors que le carbone 1 est en dessous.

β -D-galactose

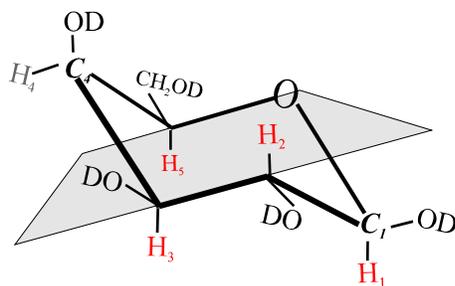


Figure 5 : Conformation en chaise $^4\text{C}_1$ du β -D-galactose. Les protons axiaux (en rouge) sont parallèles entre-eux. Seul le proton H4 est en position équatoriale, il est alors parallèle au plan du cycle (en grisé).

Dans ce type de conformères, il existe 3 types de protons :

- ✚ Les protons axiaux parallèles entre-eux (H 1, 2, 3, 5)
- ✚ Les protons équatoriaux (H 4)
- ✚ Les protons exocycliques (H 6, 6')

Les molécules O-glycanniques sont généralement isolées sous forme réduite. La *N*-acétyl-galactosamine en position terminale réductrice sera donc sous forme d'osaminitol non cyclique. Certains de ses protons ont des fréquences de résonances particulières, caractéristiques et parfaitement identifiables.

Tableau 1 : Représentation des principaux monosaccharides rencontrés dans les O-glycannes de type mucines. Les structures sont présentées après échange au deutérium, les protons indiqués en rouge sont observables sur un spectre. R : groupements *N*-acétyl (NeuAc), *N*-glycolyl (NeuGc), OH (Kdn). La symbolique est utilisée dans le tableau 7.

Structures	Symbolique utilisée	Conformation
D- <i>N</i> -acétyl-galactosaminitol 		linéaire
Fuc : α -L-fucose 		Chaise 1C_4
Gal : (α) β -D-galactose 	α β	4C_1
GalNAc : (α) β -D- <i>N</i> -acétyl-galactosamine 	α β	4C_1
GlcNAc : (α) β -D- <i>N</i> -acétyl-glucosamine 	α β	4C_1
NeuAc : acide <i>N</i> -acétyl- α -neuraminique 	NeuAc Kdn NeuGc	2C_6

4.4 LES CONDITIONS DE MESURE

Les programmes d'impulsions qui permettent d'obtenir un signal sont courts, de l'ordre de la seconde. De ce fait les expériences sont répétées un certain nombre de fois et les FID accumulées avant de procéder à la transformée de Fourier. Le rapport signal sur bruit (S/B) est alors amélioré. En effet S/B est proportionnel à \sqrt{N} (où N est le nombre d'accumulations).

Les expériences R.M.N. doivent être, en règle générale, réalisées dans les mêmes conditions physico-chimiques. En effet les différents paramètres sont variables suivant la température et le pH des solutions (ajustement du pH possible avec DCI et NaOD). Etant donné que la R.M.N. peut nécessiter une étude comparative il convient de réaliser les expériences à température et pH constants, ce principe permettant alors de se référer aux banques de données des déplacements chimiques qui seront définis par la suite.

4.5 LES PARAMETRES IMPORTANTS

Chaque signal R.M.N. est caractérisé par plusieurs grandeurs qui sont caractéristiques de chaque noyau considéré. Ces paramètres donnent des informations sur le proton et son environnement. La détermination de la structure primaire des oligosaccharides repose sur les différents critères que sont :

- ✚ Le déplacement chimique exprimé en ppm (partie par millions) ou parfois en Hz
- ✚ La constante de couplage dont la grandeur est exprimée en Hertz
- ✚ L'intensité du signal

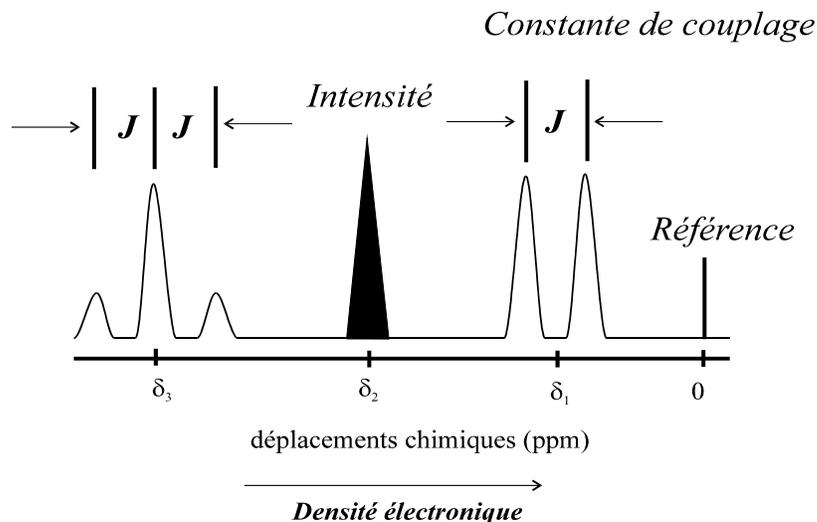


Figure 6 : Représentation schématique des paramètres R.M.N. contribuant à l'analyse de la structure primaire des oligosaccharides (D'après van Halbeek 1995).

Ces paramètres peuvent être complétés par d'autres :

- ✚ Les effets nOe^2 qui sont dues aux interactions dipolaires entre deux noyaux différents et voisins dans l'espace et dont l'intensité de corrélation est

² nOe : nuclear Overhauser enhancement

inversement proportionnelle à R^6 . Ce paramètre est essentiel dans les analyses conformationnelles des oligosaccharides. Ce paramètre n'a pas de valeur numérique mais une valeur informationnelle.

- ✚ Le temps de relaxation longitudinale **T1** (exprimé en secondes) qui décrit la cinétique de retour des noyaux à l'équilibre après une impulsion.
- ✚ Le temps de relaxation transversale **T2** (en seconde) décrit le taux de décroissance de la magnétisation transversale.

Pour les molécules de petite taille, comme les oligosaccharide-alditols, T1 et T2 sont similaires. Les macromolécules de type polysaccharide ont des temps T1 entre 0.1 et 1 seconde alors que T2 est inférieur à 0.1s.

Ces deux paramètres ont leur importance dans l'établissement des séquences d'impulsions R.M.N. mais ne sont pas nécessaires dans l'interprétation des spectres.

4.5.1 LE DEPLACEMENT CHIMIQUE

Cette valeur définie (δ) la position du signal sur l'axe des fréquences (axe x du spectre), la valeur sera mesurée par rapport au signal référence par la relation suivante :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \times 10^6$$

ν_{ref} correspond au déplacement chimique des protons du T.M.S.³ (Tetra Methyl Silane) Ces protons ont la particularité d'être dans un environnement dont la densité électronique est la plus forte. La fréquence de résonance est calculée pour un rapport gyromagnétique $\gamma_{\text{H}} = 26.752 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et avec l'intensité (en Tesla) du champ magnétique B_0 de l'appareil utilisé. Par exemple dans un champ B_0 de 9.4 T la fréquence de résonance des protons du T.M.S. se trouve à $\nu_{\text{ref}} = \gamma_{\text{H}} \times B_0 / 2\pi = (26.752 \times 10^7 \times 9.4) / 2\pi = 400.22 \text{ MHz}$. Par définition le déplacement chimique $\delta_{\text{T.M.S.}} = 0 \text{ ppm}$.

ν : correspond à la fréquence de résonance du signal observé.

Les fréquences ν , et ν_{ref} sont très grandes (MHz) c'est pourquoi δ est exprimé en ppm.

L'échelle des spectres pour l'étude des O-glycannes se situe entre 0 et 7 ppm soit pour un appareil de 400MHz, de 0 à 2800Hz. Cette valeur de déplacement chimique exprime l'environnement direct du noyau considéré. Si un noyau se trouve dans un environnement où la densité électronique est très forte (il est dit "blindé") comme c'est le cas pour les protons méthyliques (R-CH₃), le déplacement chimique est alors faible. Par contre, si la densité électronique est moins intense comme pour les protons anomères, le déplacement chimique sera plus grand (le proton est "déblindé"). Ce paramètre est à la base des "structural reporter groups" qui fournissent une carte d'identité pour chaque oligosaccharides. (Vliegthart *et al* 1983, Kamerling *et al* 1992)

³ T.M.S. : (CH₃)₄Si

Tableau 2 : Correspondance des fréquences de résonance de noyaux couramment analysés dans le champ magnétique correspondant.

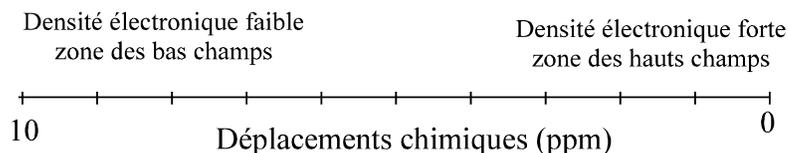
Isotope	Spin	abondance naturelle %	Fréquence de résonance (MHz) dans un champ de :						
			1,8790 (T)	2,3488 (T)	4,8975 (T)	7,0463 (T)	9,395 (T)	11,744 (T)	17,615 (T)
¹ H	1/2	99,98	80,000	100,000	200,000	300,000	400,000	500,000	750,000
¹³ C	1/2	1,108	20,115	25,144	50,288	75,432	100,577	125,721	188,580
¹⁵ N	1/2	0,37	8,106	10,133	20,265	30,398	40,531	50,664	75,996
³¹ P	1/2	100	32,385	40,481	80,961	121,442	161,923	202,404	303,606

4.5.2 LA DENSITE ELECTRONIQUE

La densité électronique est responsable du « blindage » ou du « déblindage » des atomes observés. Pour évaluer la densité électronique il faut prendre en compte les propriétés électro-attractives ou électro-répulsives des atomes et des groupements chimiques (sulfate, phosphate etc. ...). Cette notion est décrite par la constante d'écran magnétique σ , cette constante dépend, comme nous l'avons vu, de la place du noyau dans la molécule mais également du milieu dans lequel la molécule se trouve. Le champ statique effectif sera alors plus faible que le champ réel appliqué : $B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \sigma)$.

Le caractère électro-attractif des groupements chimiques provoque un "déblindage" des atomes observés, *a contrario* un groupement électro-répulseur induit un blindage par augmentation de la densité électronique autour des noyaux observés.

Cette notion est également importante puisqu'au plus un proton est « déblindé » plus la radiofréquence B_1 nécessaire à faire basculer la magnétisation transversale sera élevée et inversement. Sur un spectre R.M.N. cela se traduit par deux zones, une zone dite des hauts champs magnétiques et l'autre des bas champs magnétiques.



De ce principe, chaque proton d'un monosaccharide aura son propre déplacement chimique (donc sa propre fréquence de précession), avec comme exception les protons chimiquement identiques qui possèdent dans ce cas strictement le même déplacement chimique. Néanmoins l'intensité du signal observé sera proportionnelle au nombre de protons qui résonnent à la même fréquence.

4.5.3 INTENSITE DES SIGNAUX

Les protons chimiquement identiques ont la même fréquence de précession (ou fréquence de résonance) et ont de ce fait le même déplacement chimique. L'intensité du signal considéré sera directement proportionnelle au nombre de protons impliqués dans ce signal. L'intégration du signal par rapport à

un signal de référence permet alors de déterminer le nombre de protons. Cette propriété quantitative de l'expérience R.M.N. permet d'analyser le cas échéant un mélange d'oligosaccharides.

4.5.4 LA CONSTANTE DE COUPLAGE (J)

Cette entité est fondamentale dans la détermination structurale et conformationnelle des molécules. Cette valeur prend en considération deux éléments :

- ✚ Le nombre de noyaux voisins, c'est à dire les noyaux couplés au noyau observé.
- ✚ L'angle qui existe entre les deux noyaux considérés, la valeur de cet angle est importante puisqu'elle détermine la largeur du signal observé.

Il existe plusieurs types de constantes de couplage dont la nomenclature est la suivante :

$^X J_{Y,Z}$: X représente le nombre de liaisons covalentes entre le noyau observé et le noyau voisin, Y et Z représentent les deux noyaux pris en compte. Ils peuvent être identiques (H,H) ou différents (C,H).

- ✚ La constante de couplage géminale entre deux noyaux $^2 J_{C,H}$, $^2 J_{H,H}$.
- ✚ La constante de couplage vicinale entre deux protons (homonucléaire) $^3 J_{H,H}$ ou hétéronucléaire $^3 J_{C,H}$. La constante $^3 J_{H,H}$ Permet de déterminer sur les spectres COSY la nature des monosaccharides.
- ✚ $^n J$ ou $n \geq 4$, couplage longue distance.

4.5.4.1 Le nombre de protons (figure 7)

Il est important de considérer le nombre de protons voisins, en effet le nombre de raies spectrales d'un proton est égal à 2^n où n est le nombre de protons couplés au proton observé. L'intensité relative de ces raies, lorsque les constantes de couplage sont identiques, est donnée par le triangle de Pascal.

1					aucun couplage, singulet (s)
1	1				1 noyau couplé, 2 raies d'intensité 1 : 1, doublet (d)
1	2	1			2 noyaux couplés, 3 raies d'intensité 1 : 2 : 1, triplet (dd)
1	3	3	1		3 noyaux couplés, 4 raies d'intensité 1 : 3 : 3 : 1, quadruplet (ddd)
1	4	6	4	1	etc. ...
1	5	10	10	5	1

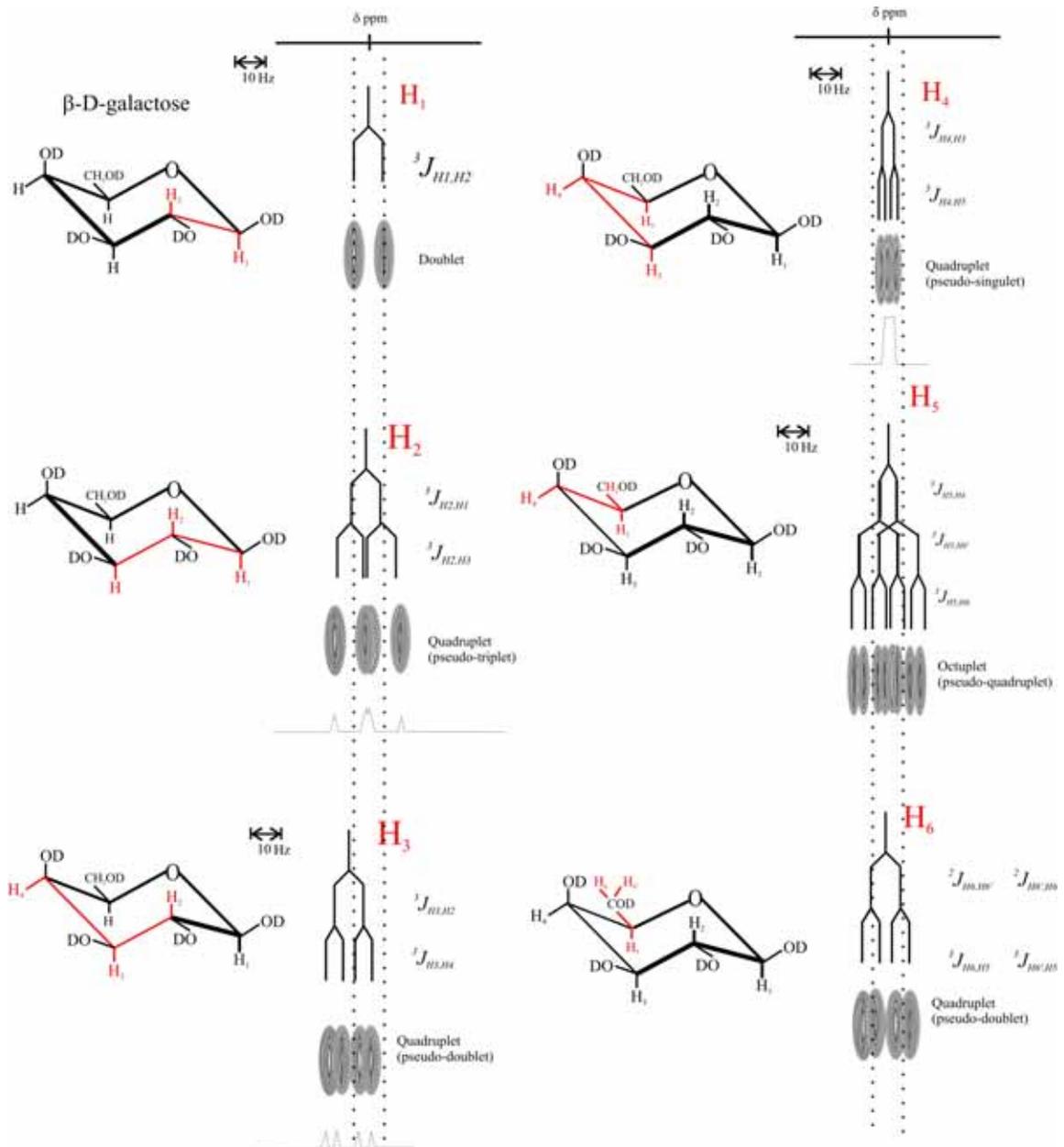
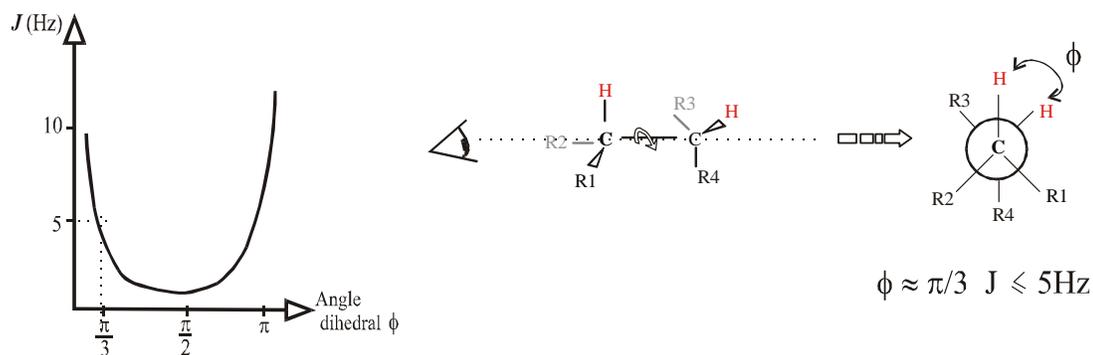


Figure 7 : Représentation des différentes constantes de couplages vicinaux (${}^3J_{H,H}$) du galactose telles qu'elles peuvent être représentées sur un spectre 2D type COSY.

4.5.4.2 Angle entre deux protons

La relation entre la valeur en Hertz de la constante de couplage et l'angle diédral (Φ) que font deux protons voisins peut être schématisée par la relation de Karplus :



Cette propriété permet de déterminer l'anomérisation des sucres et leur nature. En effet, chaque monosaccharide est caractérisé par son schéma de constante de couplage vicinal comme cela est indiqué dans le tableau 3.

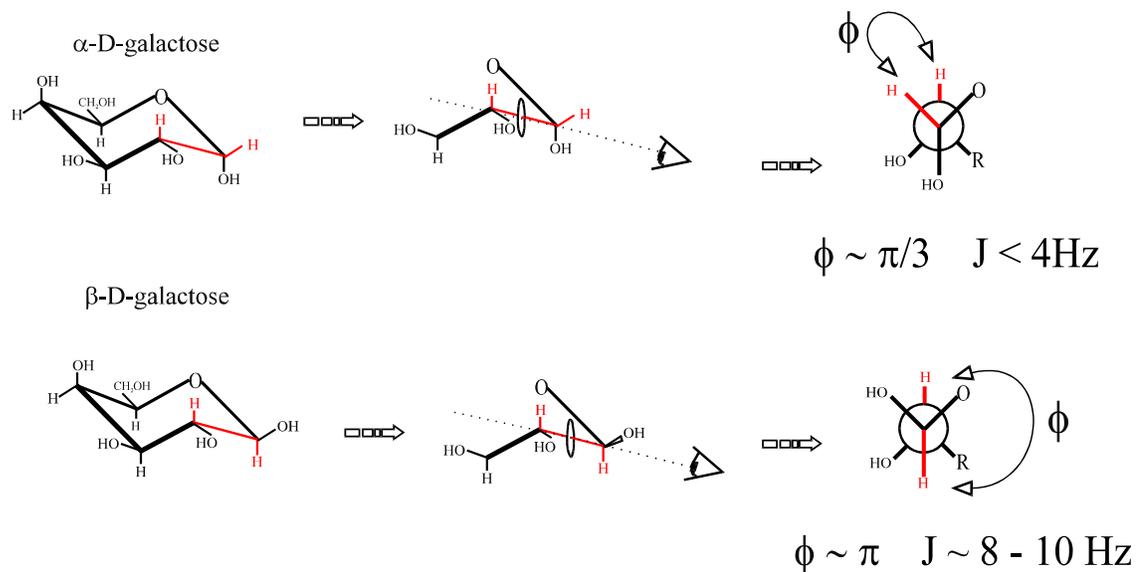


Figure 8 : Représentation de l'angle diédral (Φ) entre les protons H1 et H2 des deux anomères du galactose.

Ainsi pour les conformations et configurations classiques, les anomères α présentent en règle générale une petite constante de couplage ($J < 5\text{Hz}$) et les anomères β une grande constante de couplage $5 \text{ Hz} < J < 12\text{Hz}$.

Tableau 3 : Récapitulatif de toutes les constantes de couplage ${}^3J_{H,H}$ possibles des résidus aldopyranosyles. Les symboles G et P représentent respectivement des constantes de couplage vicinal ${}^3J_{H,H}$ grandes (>5 Hz) et petites (< 5Hz). (Koerner *et al* 1987). Les résidus les plus fréquemment rencontrés dans les oligosaccharide-alditols isolés à partir de mucines sont en caractères gras.

				Stéréochimie des résidus aldopyranosiques		
$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{4,5}$	Configuration	Conformation	Exemples de résidus
G	G	G	G	β-gluco	4C_1	β-D-Glc, β-D-GlcNAc, β-D-Qui
G	G	G	P	α -ido	1C_4	(α -D-Idose)
G	G	P	G	stéréochimie impossible		
G	G	P	P	β-galacto	4C_1	β-D-Gal, β-D-GalNAc, β-L-Fuc, β-D-Fuc
				α -altro	1C_4	(α -D-Altrose)
G	P	G	G	stéréochimie impossible		
G	P	G	P	stéréochimie impossible		
G	P	P	G	β -allo	4C_1	(β -D-Allose)
G	P	P	P	β -gulo	4C_1	(β -D-Gulose)
P	G	G	G	α-gluco	4C_1	α-D-Glc, α-D-GlcNAc, α-D-Qui
P	G	G	P	β -ido	1C_4	(β -D-Idose)
P	G	P	G	stéréochimie impossible		
P	G	P	P	α-galacto	4C_1	α-D-Gal, α-D-GalNAc, α-L-Fuc, α-D-Fuc
P	P	G	G	α -manno	4C_1	α -D-Man, α -D-ManNAc, α -L-Rha
				β -manno	4C_1	β -D-Man, β -D-ManNAc
P	P	G	P	α -gulo	1C_4	(α -D-Gulose)
P	P	P	G	α et β -altro, α -allo	4C_1	(α or β -D-Altrose, α -D-Allose)
P	P	P	P	α et β -ido, α -gulo	4C_1	(α et β -D-Idose)
				α -gulo	4C_1	(α -D-Gulose)
				α et β -talo	4C_1	(α et β -D-Talose)

4.6 COMMENT APPREHENDER L'INTERPRETATION DES SPECTRES R.M.N. DES O-GLYCANNES ?

La lecture des spectres R.M.N. est facilitée par la connaissance de l'origine et de la méthode de séparation du produit analysé. Les O-glycannes de type mucine sont généralement isolés à l'état d'oligosaccharide-alditols ; c'est pourquoi nous considérerons par la suite que tous les oligosaccharides étudiés ici, le sont.

Les indications apportées par les méthodes d'isolements (résines échangeurs d'ions, HPLC etc. ...) permettent d'orienter la recherche d'éléments structuraux caractéristiques des molécules acides ou neutres. La réduction des O-glycannes après β -élimination indique que ces oligosaccharides possèdent tous un résidu de *N*-acétyl-galactosaminitol. Toutefois il arrive que certaines molécules aient subi une dégradation récurrente avec ou sans réduction. Les produits obtenus possèdent alors un résidu de galactitol ou sont caractérisés par la présence d'un hexène-tétrol (dégradation par deshydratation du *N*-acétyl-galactosaminitol), ce dernier composé est très facilement identifiable à la vue de la résonance très particulière de ses protons éthyléniques aux environs de 6 ppm.

4.6.1 METHODOLOGIE SUIVIE

La réalisation d'un spectre proton à une dimension est systématique. Elle permet de connaître plusieurs paramètres. Deux cas peuvent se présenter :

La molécule a déjà été isolée et, dans ce cas, les déplacements chimiques de ses protons sont strictement identiques à ceux déjà publiés (cf &7). L'analyse est alors terminée.

La molécule est nouvelle, la comparaison des déplacements chimiques avec la banque de données ne permet pas d'identifier les monosaccharides et les liaisons. Dans ce cas les analyses R.M.N. doivent être approfondies par la réalisation d'expériences à deux dimensions. Les expériences COSY homo- et hétéronucléaire et ROESY permettent, dans la majorité des cas, d'identifier la nature des monosaccharides de l'oligosaccharide et d'élucider la structure primaire de ce dernier.

4.7 LES EXPERIENCES R.M.N.

4.7.1 LE SPECTRE PROTON (1H) A UNE DIMENSION

Ce type d'expérience apporte de nombreux renseignements à l'interprétation :

- ✚ La valeur des déplacements chimiques de chaque proton identifiable
- ✚ Le nombre de résidus monosaccharidiques (nombre de protons anomères)
- ✚ La présence ou non d'acide sialique (présence des protons axial et équatorial)
- ✚ Le nombre d'osamines (nombre de raies correspondants aux groupements acétamides)
- ✚ Le nombre de résidus de 6-deoxyose et notamment de fucose (nombre de doublets caractéristiques dans les hauts champs ($1.1 < \delta -CH_3 < 1.3$))
- ✚ Accessoirement, l'état de pureté de la molécule (intensité relative des signaux)

Le spectre à une dimension peut être scindé en trois régions distinctes, comme l'indique la figure 9 suivante :

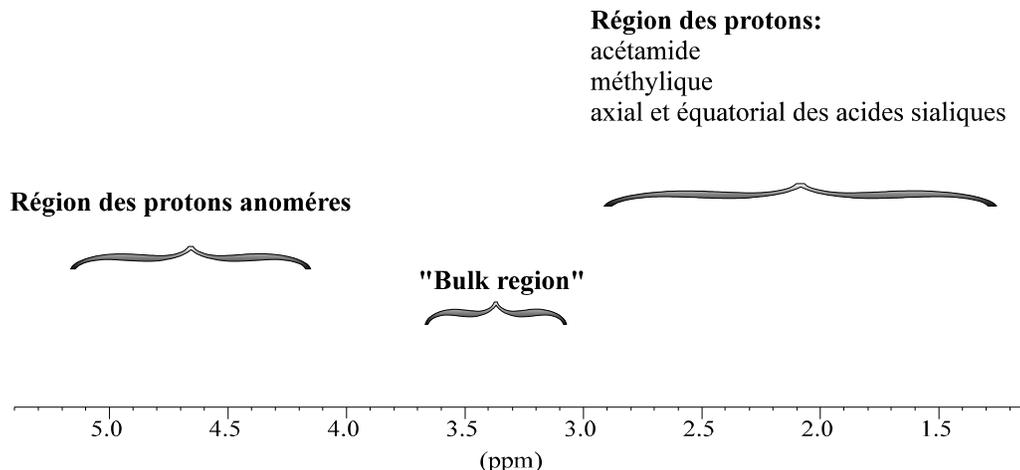


Figure 9 : Ce schéma, très général, est valable pour tout O-glycane de type mucine.

La région des protons anomères est importante⁴ (comprise entre 6 à ~ 4.5 ppm), elle permet de déterminer le nombre de résidus monosaccharidiques qui constituent l'oligosaccharide. Les constantes de couplage peuvent être mesurées discriminant l'anométrie α ou β des sucres.

La "bulk region" (~ 3.6 à 3.2 ppm) renferment de nombreux protons qui possèdent une fréquence de résonance proche ce qui rend leur distinction très difficile. Mais les protons portés par des carbones impliqués dans une liaison O-glycosidique sont très souvent déblindés, ils peuvent alors glissés vers les bas champs. Par conséquent ils peuvent être distingués.

Enfin la région comprise entre 1 et 3 ppm correspond à différents protons qui apportent de nombreuses indications (présence des protons équatorial et axial des acides sialiques, protons acétamides des osamines, etc. ...).

A titre d'exemple, la figure 10 représente un spectre 1D d'un oligosaccharide-alditol, l'emplacement des protons y est caractéristique.

⁴ voir le chapitre 7

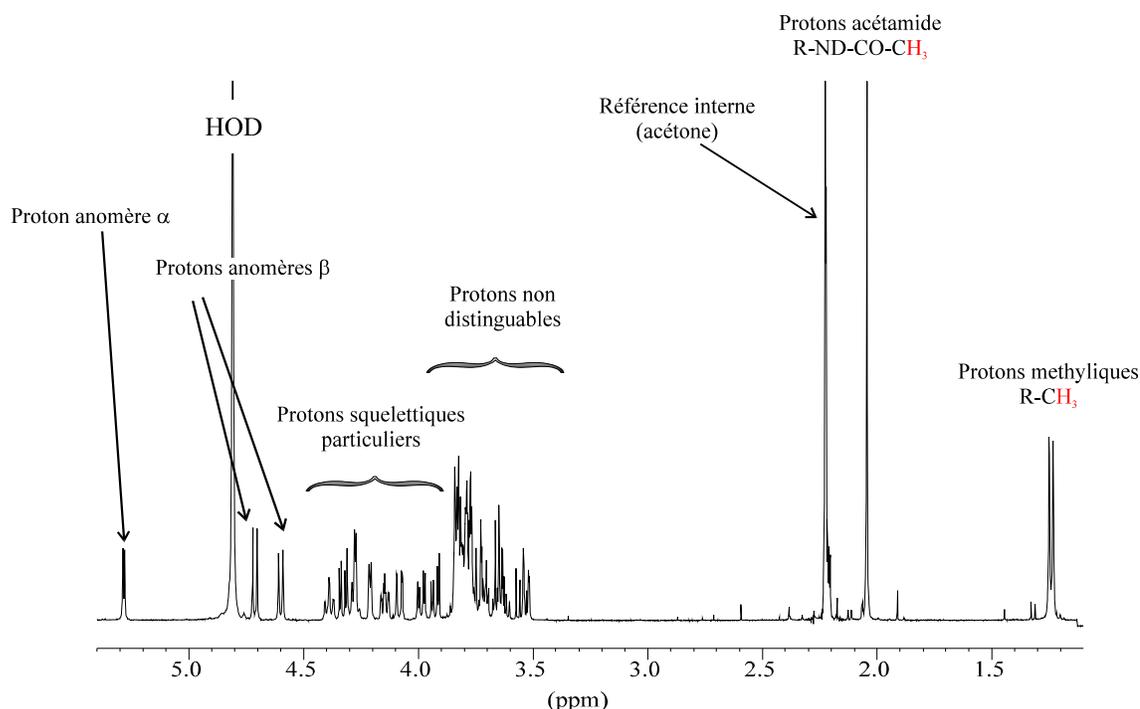


Figure 10 : Spectre proton d'un oligosaccharide-alditol réalisé à 400 MHz et à 300°K. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport à une référence interne : les protons de l'acétone résonnent à 2.225 ppm.

4.7.2 LES SPECTRES ^{13}C ET ^{31}P A UNE DIMENSION

Comme nous avons pu l'indiquer précédemment, les ^{13}C et ^{31}P possèdent un moment magnétique nucléaire et il est donc possible de réaliser les expériences R.M.N.

Tandis que l'abondance naturelle du ^{13}C est de 1/100 par rapport au ^{12}C , les expériences seront alors plus longues et les quantités de matériels devront être plus conséquentes. Alors que l'abondance naturelle du ^{31}P est de 100%, les expériences seront plus facilement réalisables. De la même manière que pour le proton, la position et l'implication de ces noyaux dans une fonction chimique particulière influenceront leurs déplacements chimiques (constante d'écran).

4.7.2.1 Le carbone :

La fenêtre spectrale de l'observation des carbones se situe entre 0 et 200 ppm. Ainsi les carbones anomères se situent entre 90 et 110 ppm, les autres carbones résonnant entre 50 et 90 ppm. Les signaux des carbones des groupes méthylènes ($\text{R-CH}_2\text{-R}$) sont observés aux environs des 60-70 ppm, les carbones méthyliques (R-CH_3) aux environs de 30 ppm et enfin le carbone d'une fonction carboxyle à environ 180 ppm. Une différence de $\Delta\delta = +10$ ppm est significative d'une substitution sur le carbone observé.

A titre indicatif, la référence utilisée pour obtenir les conditions de résonance du carbone ^{13}C est également le T.M.S.. Le rapport gyromagnétique des carbones de cette référence est $\gamma_{^{13}\text{C}} = 6.7283\ 107\ \text{rad T}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ (Tableau 2). Ce rapport représente le quart de celui du proton, la radio-fréquence, dans un

champ magnétique identique au proton, utilisée pour faire basculer la magnétisation est alors égale au $\frac{1}{4}$ de celle utilisée pour le proton.

Par exemple, dans un champ de 9.4 T la résonance du ^{13}C est obtenue pour : $\nu = 6.72 \cdot 10^7 \times 9.4 / 2\pi \sim 100\text{MHz}$.

4.7.2.2 Le phosphore :

La fenêtre spectrale d'observation du phosphore devra être faite en deux fois. Cet atome peut être impliqué dans un grand nombre de liaison avec des aglycones qui possèdent des comportements de résonances extrêmement variables. Ainsi il sera choisi une fenêtre de 600 ppm centrée à 0 ppm. En effet les atomes de phosphore peuvent, par rapport au standard utilisé, avoir des déplacements chimiques négatifs. Cette fenêtre spectrale sera ajustée dans le cas de notre étude à 20 ppm, centrée à 0 ppm.

La référence (externe) utilisée généralement est l'acide phosphorique, $\delta^{31}\text{P} = 0$.

4.7.3 L'EXPERIENCE COSY⁵ HOMONUCLEAIRE $^1\text{H}/^1\text{H}$

Le COSY 90 permet d'obtenir des informations importantes. Cette expérience permet de corréliser les protons qui sont couplés scalairement, en d'autres termes celle-ci permet de transférer la magnétisation d'un proton sur un proton voisin et permet donc de visualiser les constantes de couplage 3J entre 2 protons. Il existe plusieurs expériences COSY :

- ✚ COSY 90 : Il y a transfert de magnétisation entre le proton H1 et H2
- ✚ COSY R1 : COSY un relais, la magnétisation est transférée du H1 à H3 via H2
- ✚ COSY R2 : La magnétisation va jusqu'au proton H4

Il existe également le COSY R3 et le TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY où COSY multirelayé). Cette dernière expérience permet de transférer la magnétisation sur la totalité des protons d'un monosaccharide. Néanmoins la visualisation des constantes de couplage y est beaucoup moins aisée.

Les expériences COSY sont fondamentales puisqu'elles permettent de mesurer toutes les constantes de couplage vicinales entre les différents protons et donc de déterminer la nature du monosaccharide (Tableau 3). Cette expérience permet, en plus, de déterminer les déplacements chimiques des protons qui résonnent dans la "bulk region".

4.7.4 EXPERIENCE HETERONUCLEAIRE

4.7.4.1 HMQC : Heteronuclear MultiQuantum Coherence

Cette expérience R.M.N. permet de corréliser chaque proton avec l'hétéro atome sur lequel il est attaché ($^1J_{\text{H,C}} \sim 145\text{Hz}$; $^1J_{\text{H,N}} \sim 90\text{Hz}$). La finalité de cette expérience est indissociable des expériences COSYs ou TOCSY. Celles-ci permettent d'identifier et de déterminer le déplacement de la majorité des protons de la molécule, le report de ces valeurs sur le spectre $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC permet d'identifier les carbones correspondants et d'en déterminer leur

⁵ COSY : acronyme de COrrélation SpectroscopY

déplacement chimique. La connaissance des déplacements chimiques des carbones permettent de déterminer la substitution par l'observation d'un « déblindage » des carbones, $+5 < \Delta\delta < +10$ ppm. Il est à noter que certaines variations sont plus ou moins importantes et apportent des informations quant à la nature des liaisons et substitutions diverses.

4.7.4.2 HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

Cette expérience permet d'obtenir les corrélations et les couplages (${}^3J_{H,P}$ $\sim {}^3J_{H,C}$ ~ 8 Hz) entre un proton et l'hétéroatome voisin. Ces informations sont d'autant plus importantes qu'elles permettent de déterminer la séquence de l'oligosaccharide. En effet les couplages 3J permettent de corrélérer les noyaux distants de trois liaisons covalentes, il est donc observé, pour un monosaccharide, les corrélations suivantes :

${}^3J_{H1,C3}$, ${}^3J_{H1,C5}$, ${}^3J_{H2,C4}$, ${}^3J_{H3,C5}$, ${}^3J_{H3,C1}$, ${}^3J_{H4,C2}$, ${}^3J_{H4,C6}$, ${}^3J_{H5,C3}$, ${}^3J_{H5,C1}$ mais surtout ${}^3J_{H1,CX}$ où X est la position du carbone du monosaccharide inclus dans la liaison O-glycosidique.

Malgré tout, cette expérience n'est pas toujours possible. En effet si le spectre HMQC nécessite une concentration de matériel de l'ordre de la millimole, l'expérience HMBC en nécessite 10 fois plus.

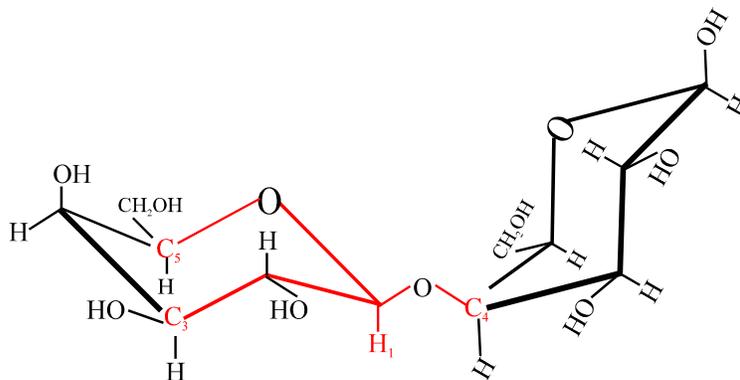


Figure 11 : Schéma représentant les corrélations ${}^3J_{H,C}$ (en rouge) carbone/proton observées à partir du proton H1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison O-glycosidique.

4.7.5 LES EXPÉRIENCES ROESY (ROTATING FRAME OVER HAUSER EFFECT SPECTROSCOPY)

Ce type d'expérience permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches d'au plus 5 Å. Les corrélations peuvent être d'origine intra- ou extra-résidu. Il est évident que les interactions inter-résidus sont plus intéressantes puisqu'elles permettent de conforter la séquence primaire de l'oligosaccharide-alditol.

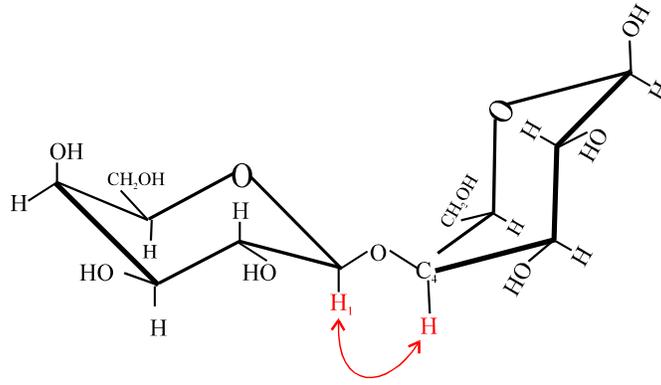


Figure 12 : Représentation d'une corrélation dipolaire visible entre deux protons dans une expérience ROESY. Cette expérience associée à l'HMQC peut se substituer à l'expérience HMBC.

5. ETUDE D'UN EXEMPLE

5.1 OBTENTION ET SPECTRE ^1H DU *N*-ACETYL-GALACTOSAMINITOL

Cet osaminitol est le point commun de tout O-glycane de type mucine isolé par β -élimination en milieu réducteur. Il semble donc intéressant d'identifier les signaux caractéristiques de cet alcool.

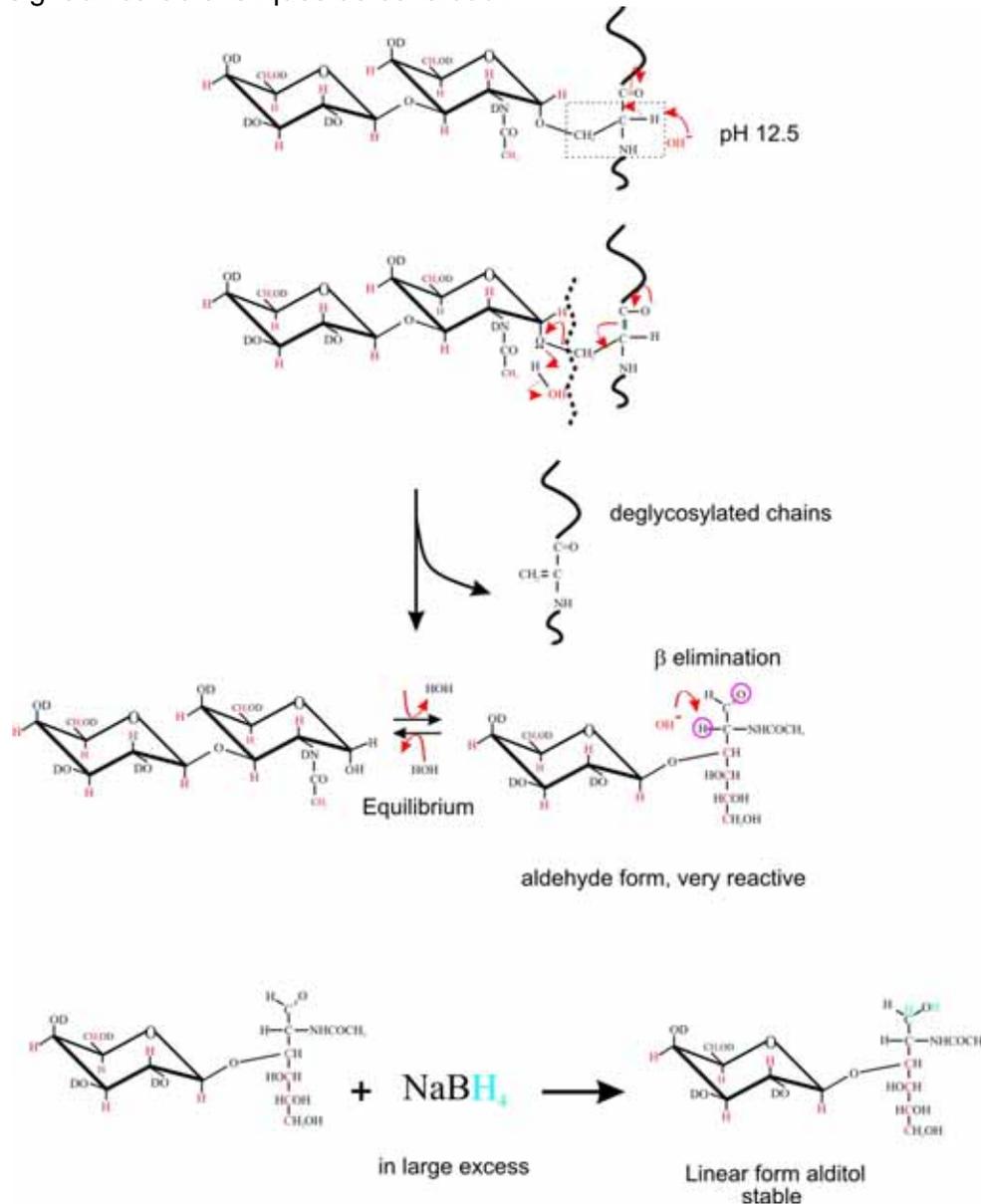


Figure 13 : Schéma simplifié de la β -élimination d'une mucine et libération d'un oligosaccharide-alditol stable

Certain de ses protons sont effectivement parfaitement identifiables dans de très nombreux spectres. Ils reflètent alors la nature du noyau (core) de l'oligosaccharide-alditol. (Tableau 4)

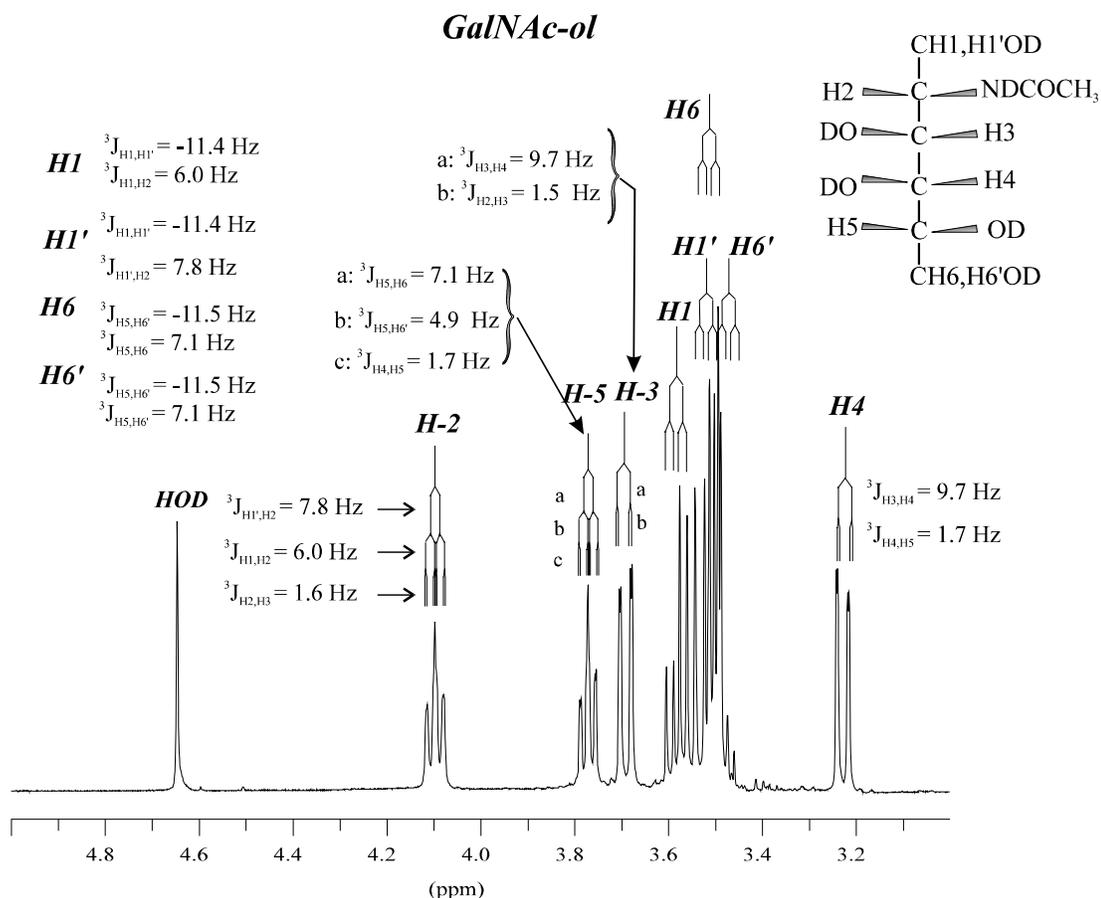
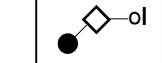
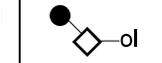


Figure 14 : Spectre RMN ^1H du *N*-acétyl-galactosaminitol. Le signal des protons du groupement *N*-acétyl n'est pas indiqué dans le spectre, il résonne à 2.055 ppm.

Tous les protons des monosaccharides ont des déplacements chimiques variables suivant la nature du noyau ("core") de l'oligosaccharide. Les monosaccharides du noyau sont d'ailleurs ceux qui sont le plus affectés. Les protons H2 et H5 sont plus déblindés que les autres protons et "sortent" du massif (où "bulk region"). Ils sont, par conséquent, plus facilement identifiables. La comparaison des déplacements chimiques avec les banques de données permet souvent de déterminer la nature de la substitution. L'identification des autres protons est parfois possible si l'oligosaccharide est restreint à quelques résidus.

Les protons H-3 et H-4 représentés par 2 quadruplés identiques peuvent ainsi être aisément distinguables, en effet le proton H-3 est déblindé et résonne aux environs de 3.8, 4 ppm alors que le proton H-4 résonne aux environs de 3.3, 3.7 ppm. L'identification de ces protons et la valeur de leur déplacements chimiques respectifs, ajoutés aux protons H-2 et H-5, sont très souvent suffisants pour élucider le type de noyau de l'oligosaccharide-alditol.

Tableau 4 : Déplacements chimiques des protons des noyaux 1 à 6 (D'après Kamerling et Vliegthart 1992)

										
		noyau 1	noyau 2	noyau 3	noyau 4	noyau 5	noyau 6			
GalNAc-ol	H-2	4.252	4.395	4.395	4.287	4.280	4.395	4.242		
	H-3	3.850	4.065	4.061	3.996	3.984	3.888	3.841		
	H-4	3.390	3.507	3.468	3.546	3.519	3.680	3.379		
	H-5	3.928	4.196	4.281	4.141	4.230	3.749	4.021		
	H-6	3.668	3.69	3.931	3.65	3.905	3.647	3.933		
	H-6'	3.647	3.628	n.d.	n.d.	n.d.	3.647	n.d.		
	NAc	2.055	2.050	2.066	2.037	2.044	2.049	2.046		
			β Gal	β Gal	β GlcNAc (6)	β GlcNAc	β GlcNAc (3)	β GlcNAc(6)	β GalNAc	β GlcNAc
Autres résidus	H-1	-	4.478	4.468	4.538	4.604	4.600	4.543	5.103	4.553
	H-2	-	3.564	3.542	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.235	n.d.
	H-3	-		n.d.	n.d.	3.584	n.d.	n.d.	3.921	n.d.
	H-4	-	3.901	3.901	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.043	n.d.
	H-5	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.073	n.d.
	H-6	-	n.d.	n.d.	3.932	3.950	3.949	3.931	n.d.	3.928
	H-6'	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NAc	-	-	-	2.066	2.085	2.081	2.063	2.060	2.059

5.2 SPECTRE D'UN OLIGOSACCHARIDE-ALDITOL

L'oligosaccharide a été isolé par β -élimination réductive d'une mucine. La méthodologie d'isolement et de purification est la suivante :

Mélange total des oligosaccharide-alditols => Chromatographie d'échange anionique => Discrimination des isomères par CLHP⁶.

Les renseignements apportés par les méthodes d'isolement indiquent que cet oligosaccharide-alditol est acide et de petite taille (Chromatographie de retard sur gel de silice).

⁶ CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

5.2.1 SPECTRE PROTON 1D DE L'OLIGOSACCHARIDE

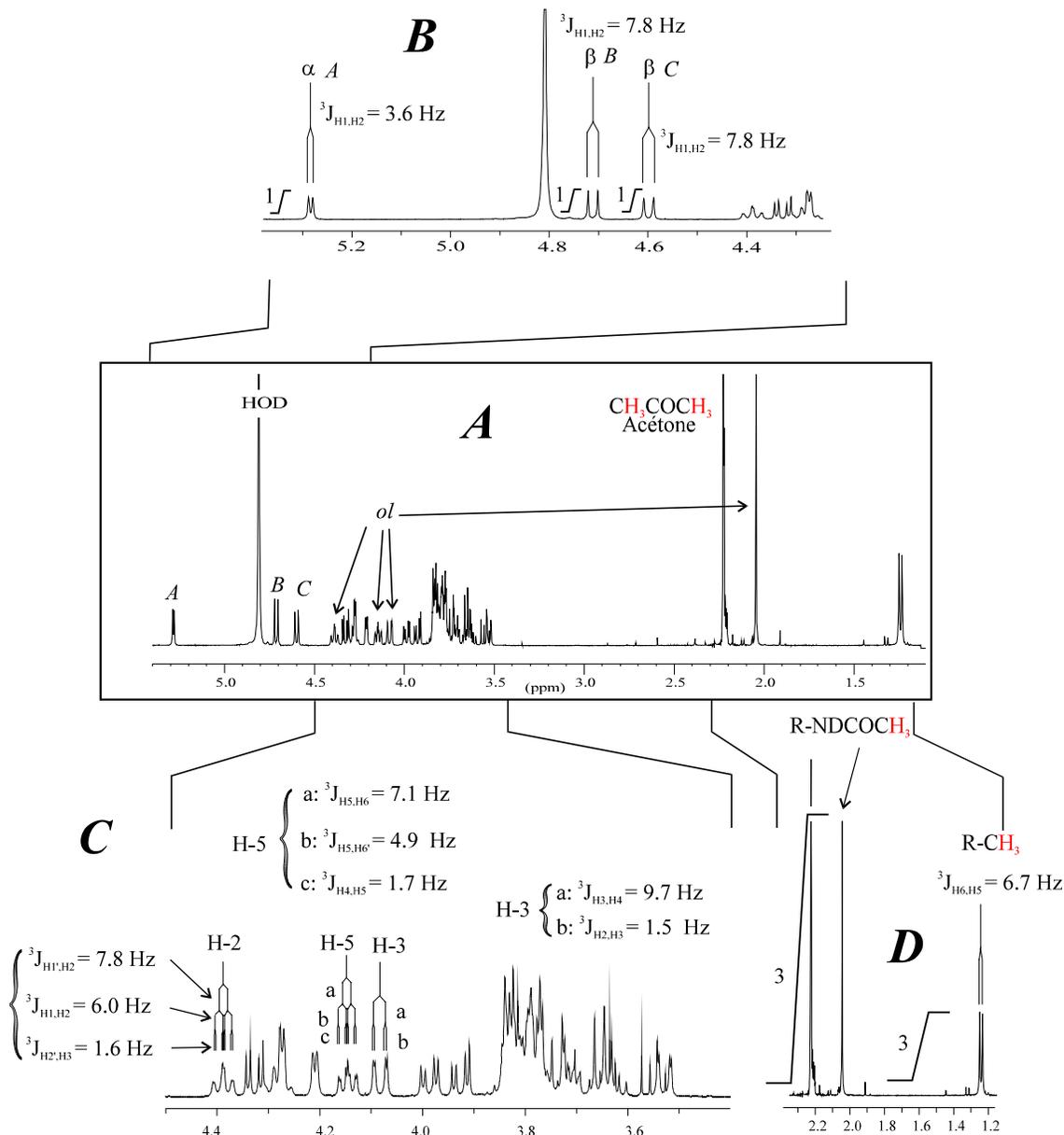


Figure 15 : Spectre proton de l'oligosaccharide réalisé à 400 MHz et à 27°C. Les parties expliquées dans le texte sont agrandies

5.2.1.1 Identification de l'osaminitol (Figure 15 C, D)

La présence de pseudo-hexuplés (ddd) aux déplacements chimiques 4.388 et 4.145 ppm correspondant respectivement aux protons H-2 et H-5 et la présence d'un signal acétamide à 2.044 ppm indique la présence de *N*-acétyl-galactosaminitol (Figure 15 C, D).

Combien y-a t'il de résidus monosaccharidiques ?

L'observation de 3 protons anomères (A,B,C) aux déplacements chimiques⁷ respectifs $\delta A = 5.286$, $\delta B = 4.710$ et $\delta C = 4.598$, indique la présence de 3 résidus monosaccharidiques (Figure 15B), les constantes de couplage $^3J_{H1,H2}$ peuvent être mesurées :

	$^3J_{H1,H2}$ (Hz)	
résidu A	P ⁸ (3.4)	anomère α
résidu B	G (7.8)	anomère β
résidu C	G (7.8)	anomère β

=> L'oligosaccharide est donc constitué de 3 résidus monosaccharidiques et d'un résidu de *N*-acétyl-galactosaminitol.

5.2.1.2 Observation de signaux particuliers

- ✚ La présence d'un doublet (Figure 15D) à 1.242 ppm indique qu'il existe un monosaccharide possédant un groupement méthyle ($R-CH_3$). Cette observation avec la présence d'un résidu d'anométrie α semble indiquer qu'il existe un résidu de fucose.
- ✚ L'observation d'un seul signal acétamide indique qu'il n'existe pas de *N*-acétyl-hexosamine autre que la *N*-acétyl-galactosamine réduite (Figure 15D).
- ✚ L'absence de signaux (entre 2 et 3 ppm) correspondants à des protons axial et équatorial indique que l'oligosaccharide-alditol acide isolé ne possède pas d'acide sialique. La charge est donc portée par un autre groupement acide.
- ✚ L'observation totale du spectre permet d'indiquer que cet oligosaccharide n'est pas contaminé par un autre (Figure 15A).
- ✚ L'intégration des raies de protons anomères (Figure 15B) permet de donner l'équimolarité des monosaccharides en proportion 1 : 1 : 1. L'intégration des groupements méthyle et acétamide donne 3 : 3 (3 protons équivalents). Il n'existe donc qu'un seul désoxy-sucrose et une seule osamine (Figure 15D).

Pour des raisons didactiques évidentes nous admettons que la comparaison des déplacements chimiques avec la littérature et les banques de données ne donne pas d'indications sur la structure de l'oligosaccharide-alditols. Il faut donc poursuivre les investigations par des expériences à deux dimensions.

5.2.2 LES EXPERIENCES COSY $^1H/^1H$

Comment s'effectue la lecture d'un COSY ?

⁷ Le déplacement chimique s'écrit δ ou alors il est exprimé en ppm

⁸ P ou G signifient des constantes de couplage $^3J_{H,H}$ Petites ou Grandes.

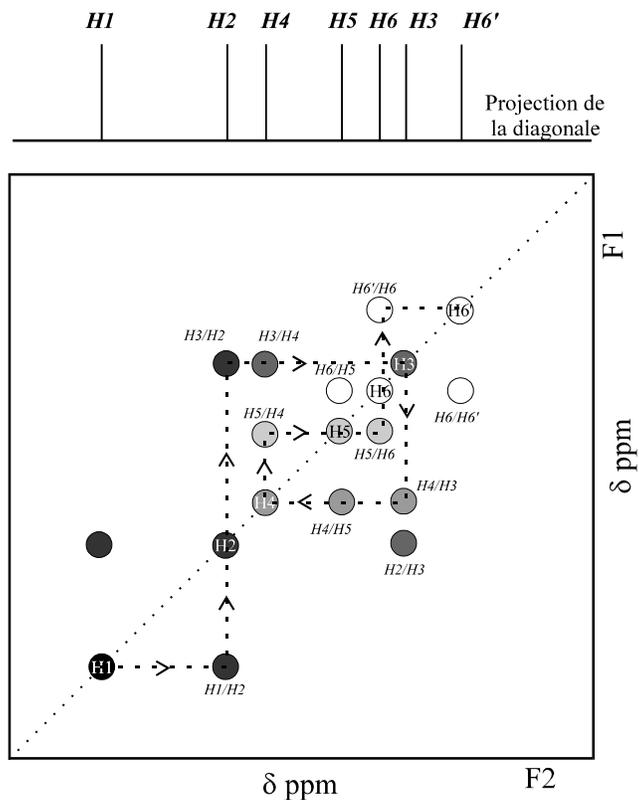


Figure 136 : Représentation schématique d'un spectre COSY avec le parcours des corrélations de H1 à H-6'.

La diagonale du spectre (Figure 16) représente le spectre 1D proton classique. L'expérience COSY va permettre de corréler les protons H1-H2 ; H2-H3 et H3-H4 (Certaines corrélations seront déterminées par les expériences TOCSY).

En partant du proton H1 le proton H2 est déterminé. La projection de ce signal (ou tache de corrélation) sur la diagonale permet de déterminer la corrélation H2-H3. L'identification et la projection sur la diagonale du proton H3 permet d'identifier le proton H4 et ainsi de suite. A noter que le spectre est parfaitement symétrique.

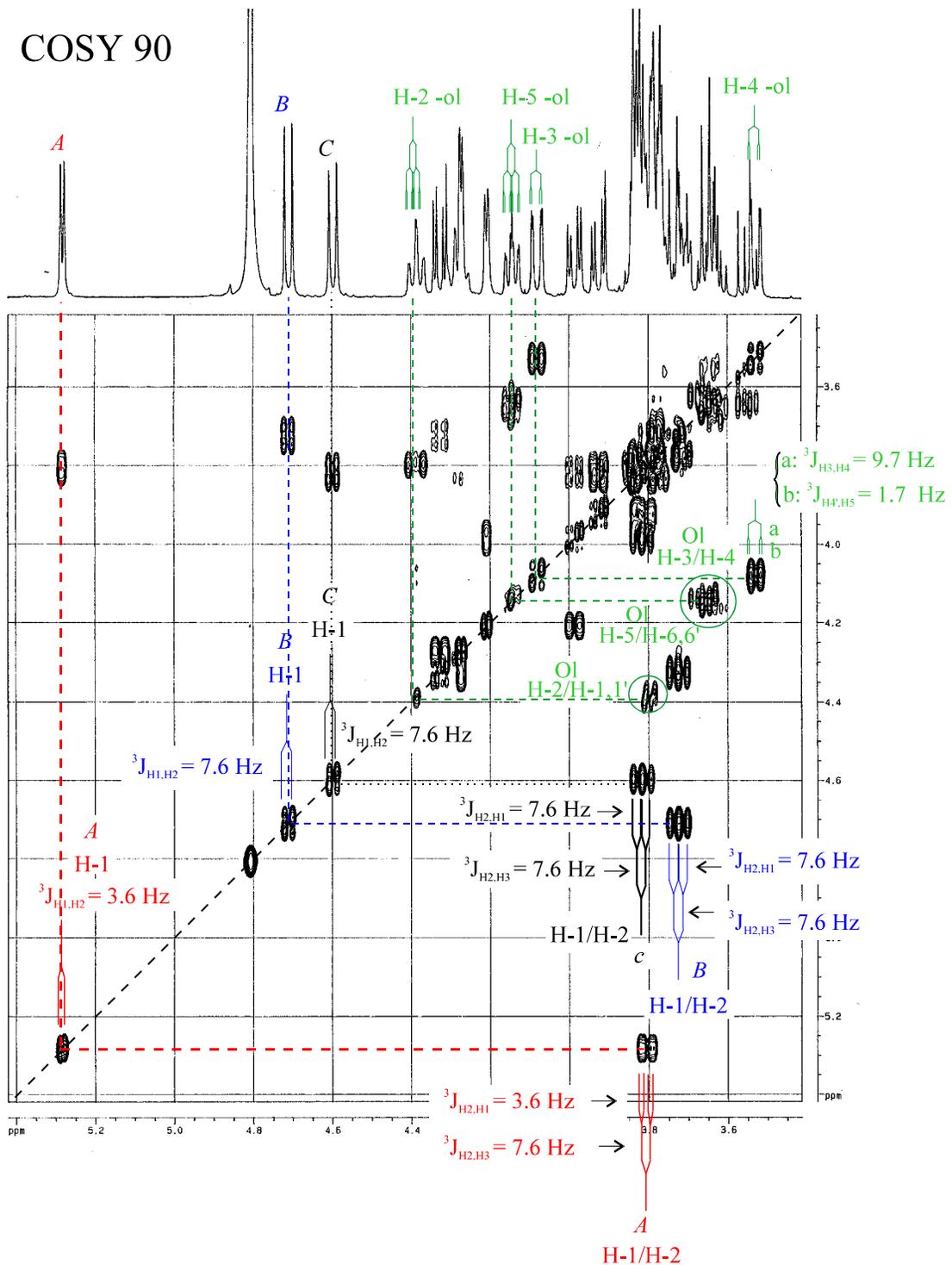


Figure 147 : Spectre COSY 90 de l'oligosaccharide-alditol, le résidu A est codifié en rouge, le B en bleu, le C en noir et l'osaminitol en vert

Cette expérience permet d'une part d'identifier les protons H2 des résidus A, B et C et d'en déterminer les constantes de couplages respectives. D'autre part cette expérience permet de corréliser les signaux H2 et H-5 de l'osaminitol avec leurs protons voisins.

Il est important de souligner qu'au plus la résolution⁹ est importante plus la valeur des constantes de couplage est précise.

Mesure des constantes de couplage $^3J_{H_2,H_3}$:

	$^3J_{H_1,H_2}$ (Hz)	$^3J_{H_2,H_3}$ (Hz)
résidu A	P (3.4)	G (> 5Hz)
résidu B	G (7.8)	G (> 5Hz)
résidu C	G (7.8)	G (> 5Hz)

La consultation du tableau 3 permet d'ores et déjà de discriminer un certain nombre d'aldopyranoses mais n'est pas suffisante pour désigner les monosaccharides B et C. En outre le monosaccharide **A** qui possède les constantes de couplage $^3J_{H_1,H_2}$ (**P**) et $^3J_{H_2,H_3}$ (**G**) est un résidu de fucose. En effet le tableau 3 indique que ces 2 constantes (P et G) sont attribuables à 8 résidus aldopyranoses différents, cependant la présence d'un désoxy-sucre représenté par la présence d'un doublet à $\delta = 1.242$ et l'absence de groupement acétamide montre formellement que le résidu **A** est un α -**Fucose**.

A ce stade de l'expérimentation nous pouvons affirmer que le composé possède un osaminitol et un résidu de fucose. Bien que le COSY 90 puisse nous donner, dans ce cas, les autres constantes de couplage nous allons poursuivre l'investigation R.M.N. par une expérience COSY 1 relais.

⁹ Qu'est ce que la résolution : La taille informatique d'un spectre est donnée en nombre de points. Le point représente l'échantillonnage du signal. Ainsi une FID peut être formée de 512 points, 1024, 2048 etc. ... Ainsi une FID de 2048 points permet d'obtenir une résolution spectrale 4 fois plus grande qu'une FID de 512 points cependant le temps d'accumulation sera 4 fois plus important. La résolution standard d'un spectre COSY est de 2048 points en F2 et 512 points en F1.

5.2.3 COSY 1 RELAIS DE L'OLIGOSACCHARIDE-ALDITOL

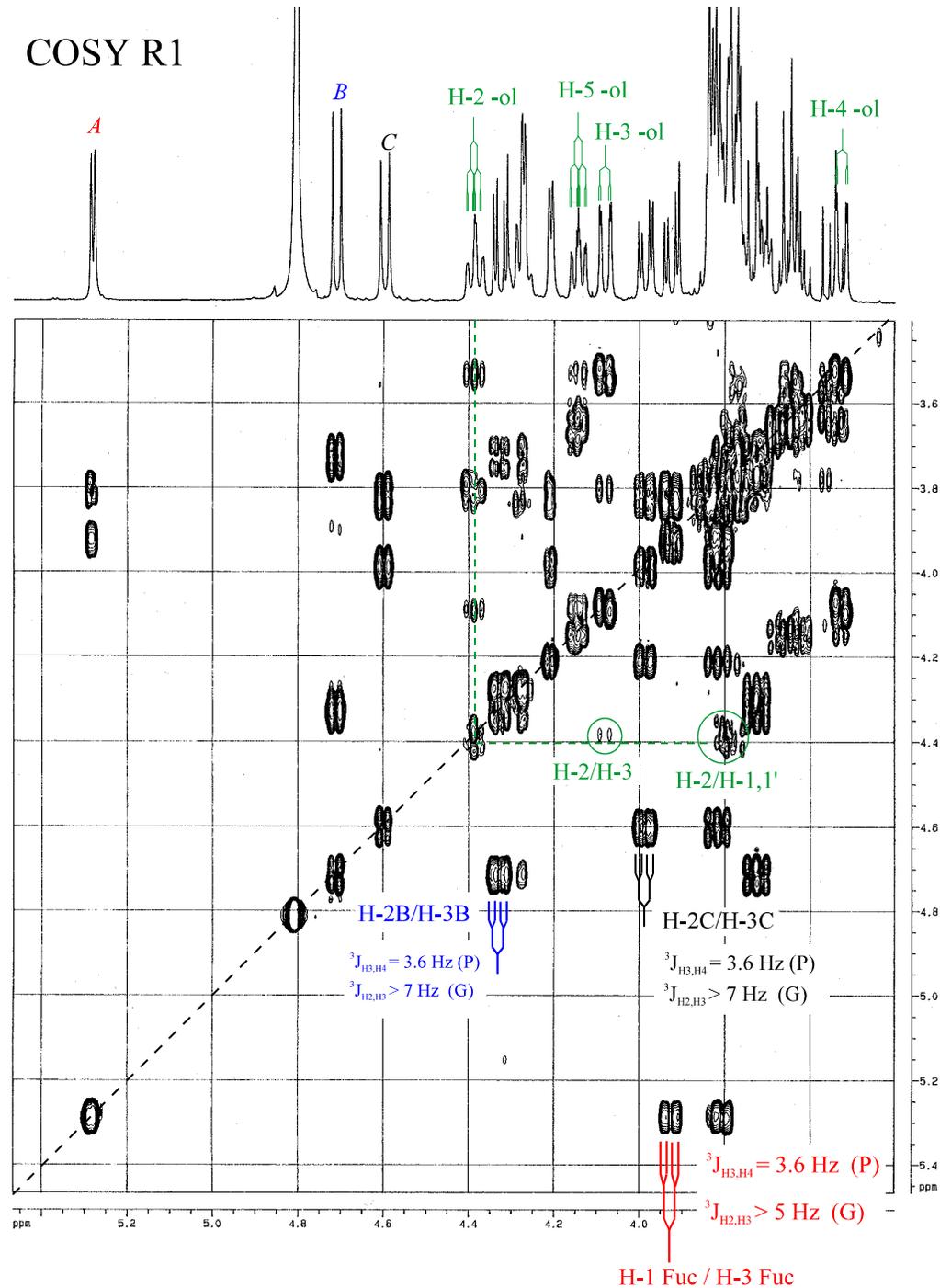


Figure 158 : Spectre COSY 1 relais, même codification que pour le COSY 90. Expérience réalisée à 27°C et à 400 MHz, résolution 2048 (F2) X 512 (F1) pts.

Les protons H-2 identifiés, les protons H-3 peuvent donc l'être très facilement. Les corrélations H2-H3 et constantes de couplages sont parfaitement lisibles sur le spectre.

Mesure des constantes de couplage :

	$^3J_{H1,H2}$	$^3J_{H2,H3}$	$^3J_{H3,H4}$
Fucose	P	G	P (<5z)
résidu B	G	G	P (<5z)
résidu C	G	G	P (<5z)

La consultation du tableau 3 permet dès maintenant de déterminer la nature des monosaccharides B et C. En effet, la combinaison des éléments apportés par le spectre 1D et les constantes de couplages mesurées (B : GGP, C : GGP) montrent sans ambiguïté que les résidus aldopyranosiques B et C correspondent à 2 résidus galactosyls. L'absence de groupement acétamide surnuméraire permet d'éliminer la présence de N-acétyl-galactosamine.

De plus l'observation fine des signaux H3 des galactosyles B et C indique qu'ils ont des déplacements chimiques franchement différents. Le proton H3-B est anormalement déblindé ($\delta = 4.326$) comparé au H3-C ($\delta = 3.988$). Cette indication permet de penser qu'il existe une substitution à ce niveau par un groupement particulièrement électro-attracteur.

5.2.4 COSY 2 RELAIS

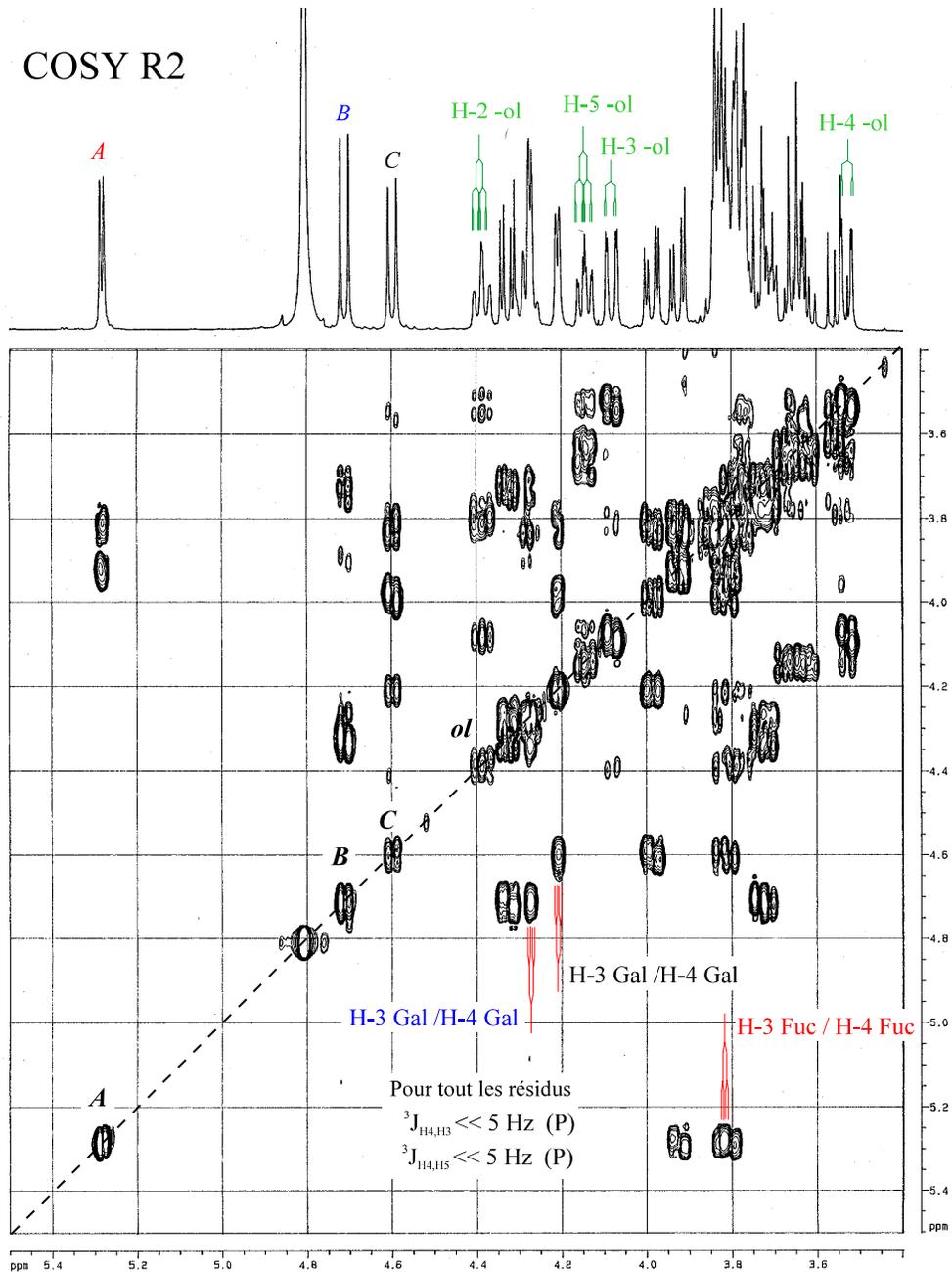


Figure 19 : Spectre COSY 2 relais effectué à 400MHz et à 27°C.

De la même manière, le spectre COSY 2 relais (figure 19) permet, connaissant la position des protons H2 et H3, d'identifier les protons H-4 de tous les résidus. La mesure des constantes de couplages donne les résultats suivants :

	${}^3J_{H1,H2}$	${}^3J_{H2,H3}$	${}^3J_{H3,H4}$	${}^3J_{H4,H5}$
Fucose	P	G	P	P (<5Hz)
Galactose	G	G	P	P (<5Hz)
Galactose	G	G	P	P (<5Hz)

Les expériences précédentes ont permis de déterminer le nombre et la nature des monosaccharides, les déplacements chimiques de leurs protons. Ces indications permettent maintenant la lecture d'un spectre hétéronucléaire de type HMQC. En effet, ces δ peuvent être reportés sur l'axe F2 du spectre HSQC (Figure 20).

5.2.5 SPECTRE HMQC DE L'OLIGOSACCHARIDE-ALDITOL

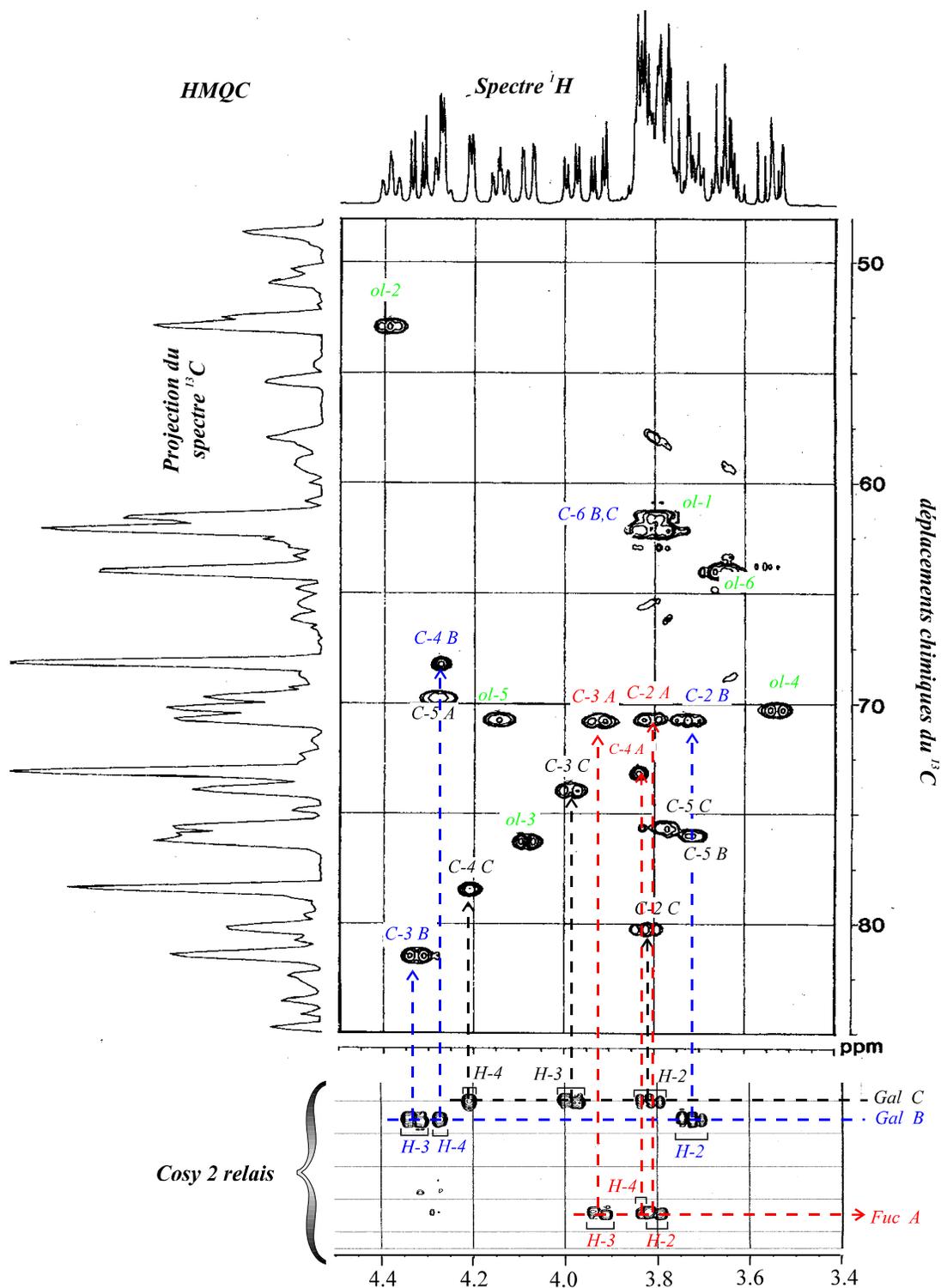


Figure 20 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de l'oligosaccharide-alditol permettant de déterminer les corrélations entre les protons des résidus et leurs carbones correspondants.

Le spectre de la figure 20 représente la partie du spectre la plus intéressante où sont représentées toutes les corrélations carbone-proton qui ont un intérêt dans la détermination de la structure primaire de l'oligosaccharide.

Le report des déplacements chimiques des protons (donnés par le spectre COSY 2 relais, figure 19) permettent d'identifier chaque carbone correspondant. L'observation de singulet, de doublets et de triplets permet de discriminer les protons H2, H3 et H4 des résidus galactosyles.

Quelles sont les informations obtenues ?

✚ Le déplacement chimique des carbones

✚ La position des substitutions

L'observation des carbones C3 du Gal B, C2 et C4 du Gal C montre que les déplacements chimiques, comparés à ceux de la littérature, ont des valeurs qui correspondent à des carbones fortement déblindés. Ils traduisent ainsi une substitution sur ces carbones.

De la même manière les déplacements chimiques du carbone C3 et C5 du GalNAc-ol indique que ce dernier possèdent un noyau de type 1 : **Gal(β 1-3)GalNAc-ol**.

Les carbones du résidu fucosyle indiquent que ce monosaccharide est en position terminale non réductrice et qu'il n'est donc pas substitué. Le spectre HMQC apporte donc les informations suivantes :

Le β Gal B est donc substitué en 3

Le β Gal C est substitué en 2 et 4

Le GalNAc-ol est substitué en 3

Le fucose est en position terminale non réductrice et il n'est pas substitué

L'oligosaccharide possède un noyau de type 1

Il reste à ce niveau à positionner les résidus galactosyles et fucosyle sachant que le β Gal lié sur le GalNAc-ol peut être le résidu B ou C et qu'il peut être substitué en 2, 3 et/ou 4. La solution est apportée dans ce cas par une expérience ROESY.

5.2.6 EXPERIENCE ROESY

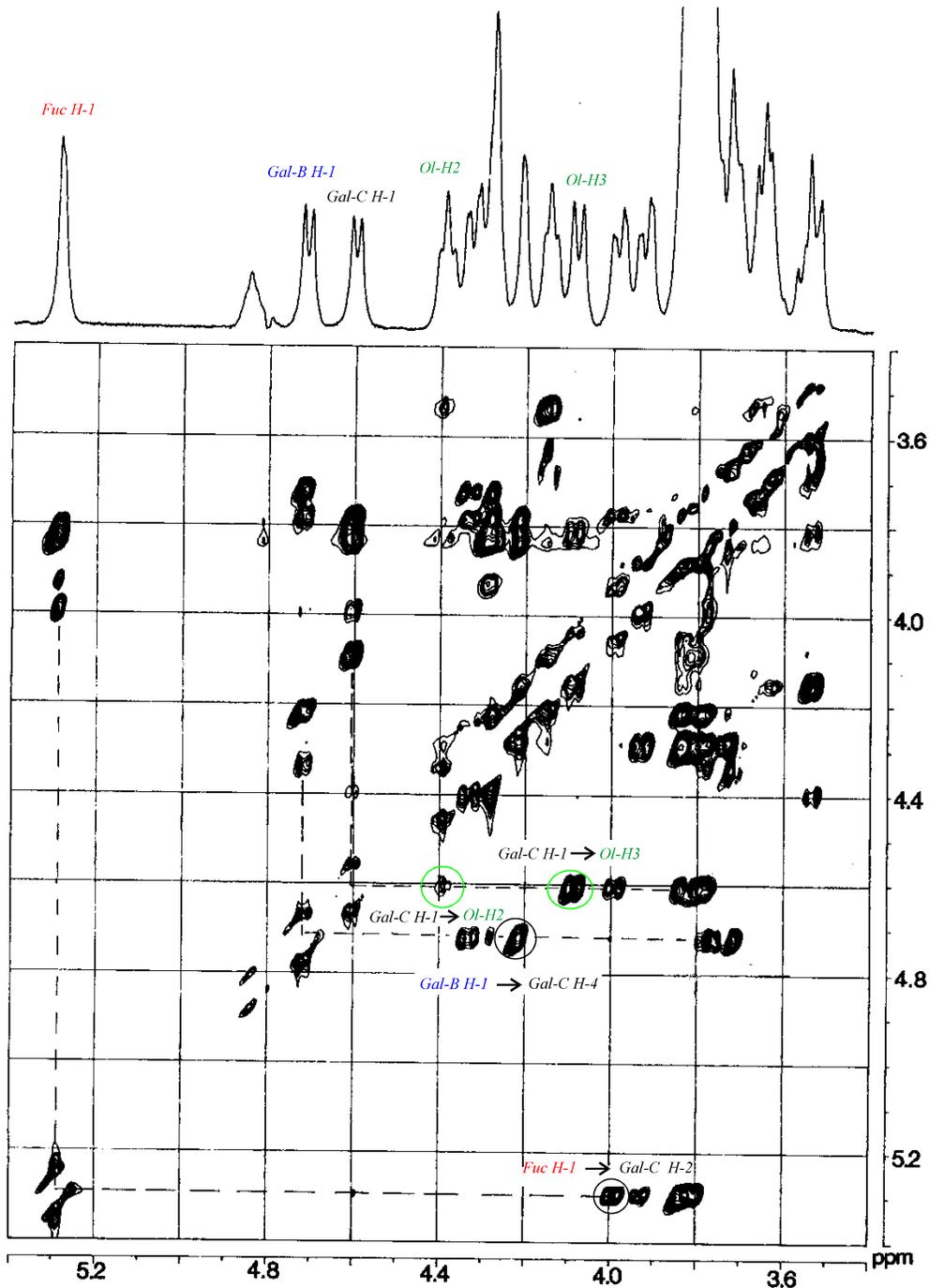


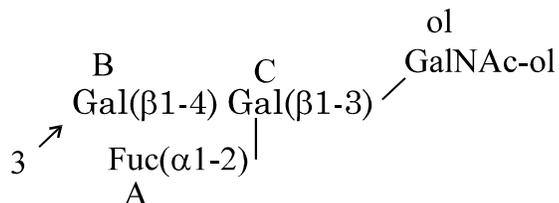
Figure 21 : Spectre ROESY de l'oligosaccharide-alditol réalisé à 400 MHz et à 27°C.

Connaissant tout les déplacements chimiques des protons il est maintenant très aisé de déterminer les corrélations spatiales entre certains protons. Le spectre de la figure 21 indique donc :

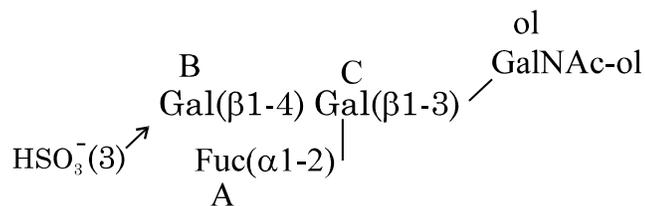
- ✚ Qu'il existe une corrélation entre le proton H1 du β GalC avec le H3 du GalNAc-ol, le Gal C est donc lié en C-3 sur le *N*-acétyl-galactosaminitol confirmant par ailleurs la présence d'un noyau de type 1.

- ✚ Que le proton H1 du fucose avec les protons H2 et H3 du Gal C, le fucose peut donc être lié en 2 ou 3 sur le Gal C. Comme l'HMQC nous a indiqué que le Gal C est substitué en 2 et 4 ; le résidu de fucose est donc lié en C-2 sur le β Gal C.
- ✚ Et enfin, que le H1 du Gal B est corrélé avec le H4 du Gal C. Le galactose B est donc lié en 4 sur le Gal C.

A ce niveau la séquence est maintenant parfaitement connue :



Seule la substitution du galactose B reste inconnue. La méthodologie d'isolement et le spectre 1D ^1H nous indiquent que ce composé est acide et qu'il n'existe pas d'acide sialique. La charge est donc assurée par un groupement sulfate. En effet la charge ne peut pas être un groupement phosphate étant donné qu'il n'est pas observé de couplage fort Phosphore-Proton $^3J_{\text{H,P}}$. Cette substitution peut d'ailleurs être confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF¹⁰). La séquence primaire complète de l'oligosaccharide-alditol est donc la suivante.



¹⁰ MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

6. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES

Certaines expériences non décrites dans ce livret sont tout à fait intéressantes et se substituent à celles précédemment expliquées. Elles requièrent cependant une quantité de matériel plus importante. Citons par exemple, l'expérience HMQC-TOCSY, qui permet de relier le proton à son carbone correspondant (ex : $^1\text{H}1\text{-}^{13}\text{C}1$, $^1\text{H}2\text{-}^{13}\text{C}2$ etc...) puis d'effectuer une corrélation totale des protons de chacun des cycles. Ainsi à chaque carbone il est possible d'observer toutes les corrélations C-H d'un même cycle et de la même manière à chaque proton il est observé toutes les corrélations H-C. Enfin il est important d'avoir conscience que toutes les expériences hétéronucléaires sont applicables pour tout les noyaux couplés à des protons, $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ HMQC, $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ HMBC, $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ HMQC-TOCSY.

De plus certaines expériences à une dimension dites sélectives peuvent être envisagées avec les séquences de type selmlev (tocsy selectif) ou selno (noesy selectif). Le principe de ces expériences est très simple puisqu'il consiste à envoyer l'impulsion sur une fréquence précise (un proton anomère choisi, par exemple) encore appelée O1¹¹. De cette manière, seules les corrélations scalaires (dans le premier cas) ou dipolaires (dans le second cas) appartenant au proton sélectivement excité (O1) seront visibles sur le spectre. Ces expériences sont particulièrement intéressantes dans le cas de mélange d'oligosaccharides.

¹¹ Généralement O1 est appelée fréquence porteuse, celle-ci peut être utilisée dans ces cas précis d'excitations sélectives

7. L'INDICE SOACS

7.1 INTRODUCTION

L'élucidation des structures primaires par RMN implique l'utilisation évidemment des constantes de couplage et des déplacements chimiques, qui sont les deux paramètres indispensables pour de telles études. Ces derniers, étant des constantes physiques indépendantes du champ magnétique, sont susceptibles aux paramètres physico-chimiques tels que le pD, la température ou encore la force osmotique. Il est par conséquent nécessaire pour ce qui suit de réaliser les expériences dans les conditions standards d'accumulation. Ces constantes sont maintenant répertoriées dans quelques banques de données gratuites de références comme la sweet-DB (reference), la Sugabase ou encore la GlycoBase pour les O- et N-glycannes ainsi que les glycannes libres. La BCSDDB quant à elle est dévolue aux polysaccharides bactériens. Nous ne citerons pas les quelques banques de données payantes qui sont à notre point de vue inutiles et non avenues.

Si l'intérêt des banques de données n'est plus à prouver, la recherche d'une séquence uniquement à partir de ces données RMN se révèle fastidieuse tant l'hétérogénéité et le choix, qui se doit être judicieux, des déplacements chimiques sont grands. Cette difficulté rend l'étude structurale par RMN très souvent inaccessible aux personnes non initiées.

C'est pourquoi nous sommes partis du principe que chaque molécule possède son spectre RMN, proton ou carbone, qui lui est propre. Ce spectre RMN représente la carte d'identité de la molécule et ce dans des conditions standardisées d'accumulation des données.

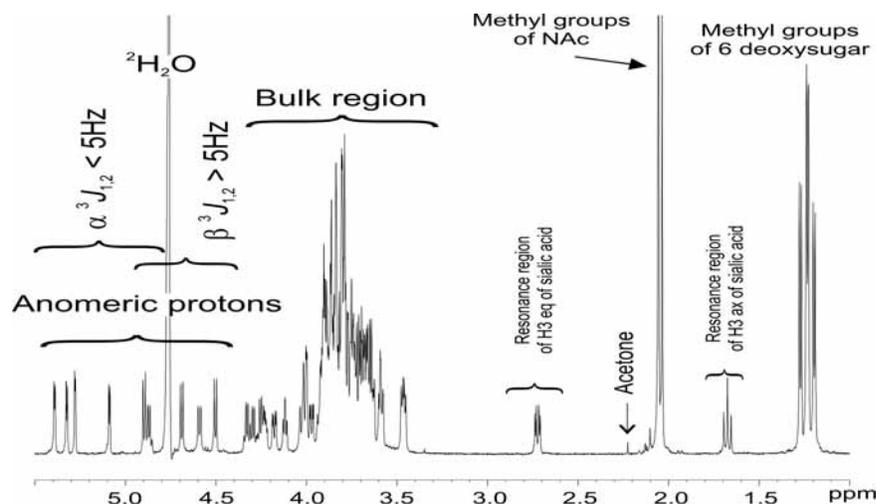


Figure 22: Spectre proton d'un O-glycane classique, les déplacements chimiques sont calibrés par rapport au déplacement chimique des protons méthyles de l'acétone. Seules les zones des protons anomères et des protons H3 axiaux des acides sialiques sont importantes

Nous avons de ce fait mis au point un nouveau type de requête appelé indice SOACS (acronyme de Sum Of Anomeric Chemical Shifts) sur la base d'un spectre à une dimension. Cet indice est d'une simplicité déconcertante et se base uniquement sur la valeur des déplacements chimiques des protons anomères qui sont facilement identifiables puisque dans une zone spectrale libre

de tout autre proton (Fig. 22). Cet indice a été validé pour les O- et N-Glycannes et nous sommes entrain de le valider pour d'autres types de molécules (polysaccharides, glycannes libres, molécules de chimie organique). Il est à souligner que sur plusieurs centaines de glycannes seuls quelques cas particuliers d'indice identique (1 cas) et d'indices très proches ($\Delta\delta < 0.01$) sont décrits. Nous avons également extrapolé aux oligosaccharide-alditols, cet indice SOACS en un indice SOACS-ol qui comme l'indique son suffixe intéresse les molécules réduites. Ainsi le couple SOACS/SOACS-ol permet de lever toute ambiguïté et enfin il est à souligner que ces molécules ont des spectres RMN complètement différents. L'utilisation de ces indices comme requête est actuellement utilisée avec succès dans notre banque de données, la **GlycoBase**

7.2 PRINCIPE

7.2.1 O-GLYCANNES

Ce type de glycanne peut-être libéré des protéines soit par l'action d'enzymes dont les spécificités sont parfaitement décrites dans le chapitre correspondant de l'encyclopédie *Comprehensive Glycoscience* [Vliegthart 2007], ou encore de manière plus courante par hydrolyse chimique et notamment par β -élimination précédemment décrit dans ce livret (cf &5). Les conditions de β -élimination sont plus souvent réalisées en milieu réducteur en présence de borohydrure de Na ou de K de manière à stabiliser les molécules libérées. Ceci permet d'éviter les réactions de dégradation récurrente lorsque des liaisons 1-3 sont présentes sur le noyau de ces O-glycannes. Ainsi, lorsque ces O-glycannes sont libérés de la sorte, ils sont réduits et stables, ils sont alors appelés oligosaccharide-alditols. Lorsque les O-glycannes sont de type mucine, le sucre réduit formé correspond au N-Acetyl-Galactosaminitol, cet alcool peut être idéalement identifié en RMN du proton par certains de ses déplacements chimiques¹². Ceux-ci ont été décrits dans un chapitre précédent. Donc dans ce cas, l'indice SOACS peut être complété par un deuxième indice nommé SOACS-ol qui prend alors en compte le proton H-2 de ce résidu de GalNAc-ol.

¹² Le déplacement chimique est symbolisé par δ

7.2.1.1 Calcul des indices SOACS et SOACS-ol à partir d'un spectre 1D proton

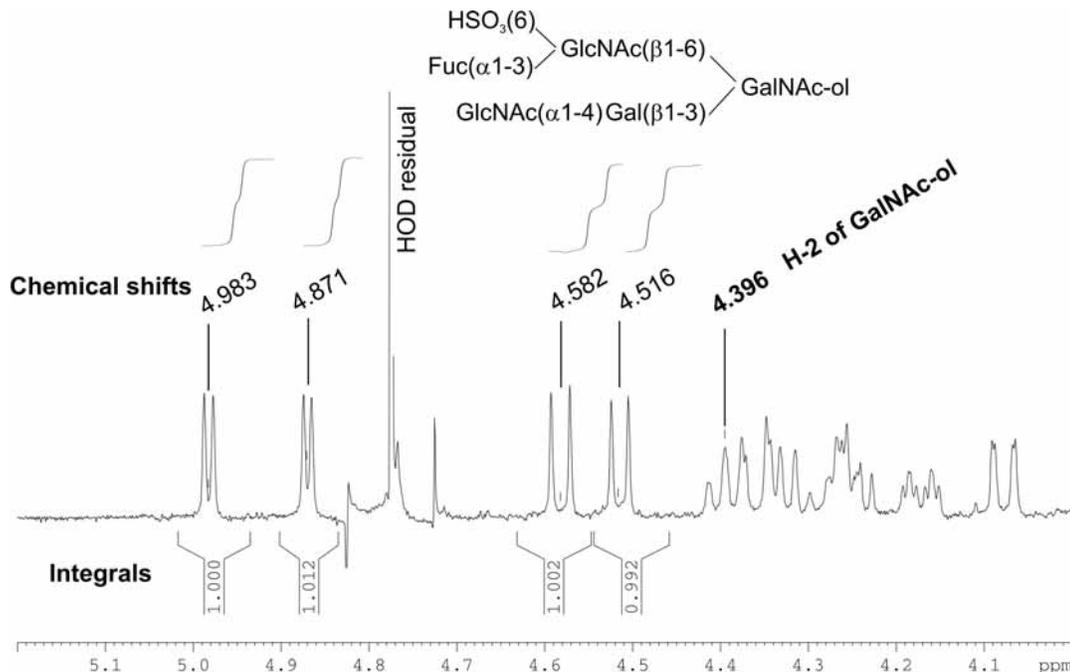


Figure 23 : Région anomère d'un spectre de O-glycane réalisé dans l'eau lourde à 300K. Seule cette partie suffit à déterminer l'indice SOACS.

Sur le spectre enregistré, il suffit d'agrandir la partie spectrale correspondante aux protons anomères. Dans ce cas de glycane, celle-ci est toujours, et sans exception, comprise entre 4.4 et 6 ppm. Sachant qu'un proton anomère, exceptés quelques très rares cas particuliers¹³, se définit par un doublet avec une constante de couplage petite, c'est-à-dire inférieure à 5 Hz pour les protons d'anoméries alpha et supérieure à 5 Hz pour les protons d'anoméries beta.

Pour le calcul de l'indice SOACS-ol, l'identification du proton 2 du résidu de N-Acetyl galactosaminitol est nécessaire. Il n'est pas toujours évident d'identifier ce multiplet sur un spectre à 1 dimension toutefois il faut savoir que ce proton résonne exclusivement entre 4.20 et 4.45 ppm. Son identification sur un spectre à deux dimensions est beaucoup plus aisée.

Sachant également que la RMN est quantitative¹⁴ il est souhaitable d'intégrer de manière systématique les signaux d'intérêts de manière à ne pas omettre de valeurs de déplacement chimique.

Sur la figure 23, 4 protons anomères sont observés aux δ 4.983, 4.871, 4.582 et 4.516. La définition de la valeur de l'indice **SOACS** est obtenue simplement par l'addition de ces quatre valeurs pour obtenir **18.952**. Pour l'indice SOACS-ol il suffit d'ajouter la valeur du proton 2 du résidu de N-Acetyl-galactosaminitol identifié ici à δ 4.396, l'indice **SOACS-ol** est donc : $18.952 + 4.396 = 23.347$. Ce

¹³ Dans certains cas, le proton anomère peut-être représenté sous forme d'un doublet de doublet dans le cas d'un 2-deoxy sucre ou lorsqu'il s'agit d'un sucre 1-phosphate et qu'il existe une constante de couplage vicinale entre le phosphore et le proton anomère. Enfin il est à noter qu'aucun de ces deux cas n'a encore été observé dans les O-glycannes de type mucine

¹⁴ Il se peut dans certains cas que deux protons anomères résonnent, par pure coïncidence, au même déplacement chimique.

couple de valeurs est spécifique de cette molécule. L'une ou l'autre (ou les deux) peut être utilisée comme requête dans la GB (Tab. 4, 5, 6 et GlycoBase).

7.2.1.2 Structures de O-glycannes sialylés

L'acide sialique étant un cétose ne possède pas de proton anomère, toutefois il peut être caractérisé sans ambiguïté par la lecture de son proton H3 axial. Ce proton quelque soit la nature de l'acide sialique ou de son type de liaison résonne systématiquement entre 1.60 et 1.95 ppm. Ainsi à partir de l'exemple de la figure 24, l'indice SOACS peut-être calculé comme suit :

$$\mathbf{IS} = 5.406 + 5.237 + 4.893 + 4.701 + 1.682 = \mathbf{22.009}.$$

Cette valeur peut-être directement utilisée comme requête dans la GB : <http://glycobase.univ-lille1.fr/base/>

La lecture de la valeur du proton H-2 du résidu GalNAc-ol est dans ce cas très hypothétique et ne peut-être obtenue après la réalisation d'un spectre homonucléaire à deux dimensions.

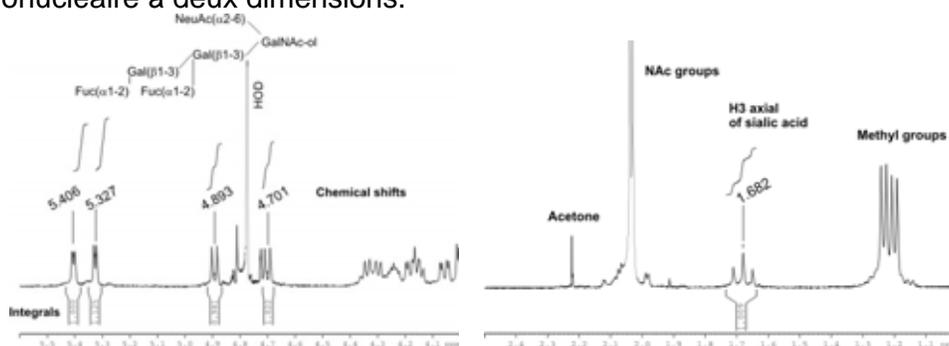


Figure 24 : Spectre proton à 1 dimension d'un O-glycane sialylé

7.2.1.3 Calcul des indices à partir de spectres homonucléaires 2D

La détermination des indices dans ce cas est rendue beaucoup plus aisée lorsqu'il y a superposition de signaux RMN. Evidemment, les spectres homonucléaires utilisés seront de type COSY90 ou TOCSY avec, pour ce dernier, un temps de mélange de l'ordre de 30ms. Dans ce cas la lecture des déplacements chimiques se fait sur l'axe F2, de manière à obtenir une meilleure définition des valeurs. Il est toutefois recommandé de n'utiliser que deux décimales.

Dans ce cas :

$$\mathbf{IS} : 5.38 + 4.68 + 4.61 + 4.60 + 4.59 + 4.47 = \mathbf{28.33}$$

$$\mathbf{IS-ol} = 28.33 + 4.32 = \mathbf{32.65}$$

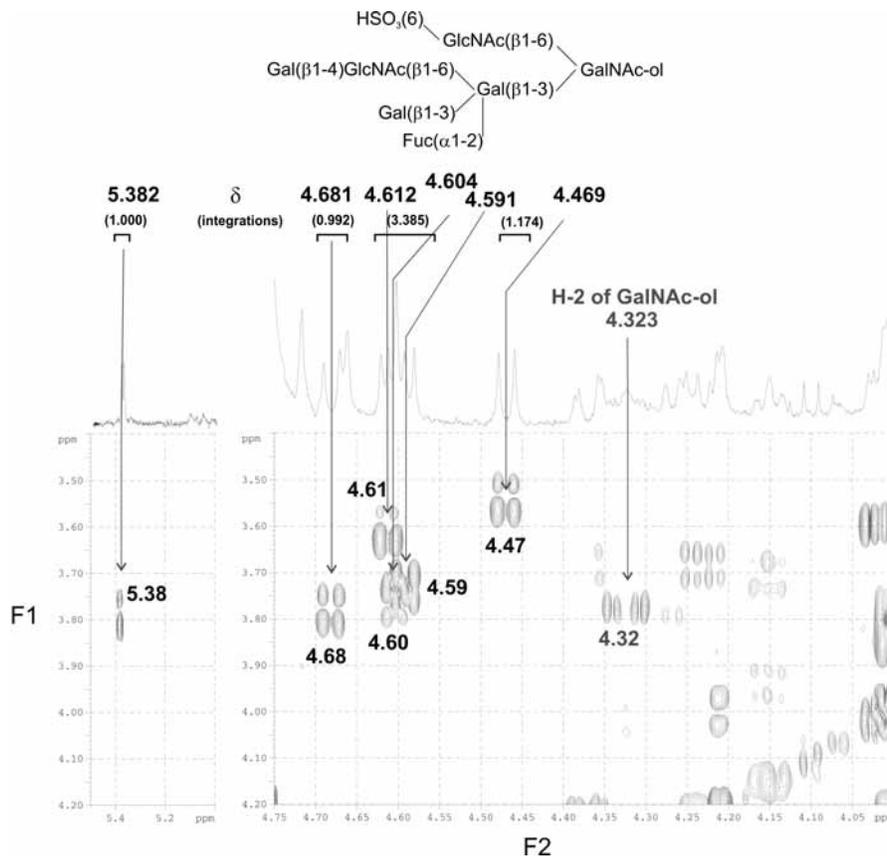


Figure 25 : Détails d'un spectre COSY90 d'un O-glycane sulfaté montrant les parties nécessaires au calcul de l'indice SOACS.

7.2.1.4 Définition d'une marge d'erreur

Comme toute expérience, la spectroscopie de RMN peut être soumise à des erreurs expérimentales. C'est pourquoi, par principe, nous avons décidé le cas échéant d'utiliser une marge d'erreur qui peut-être à l'approximation de l'expérimentateur. Nous avons décidé que lorsque la lecture des déplacements chimiques utilisés pour calculer le SOACS est faite sur un spectre proton à une dimension, d'utiliser une marge d'erreur de plus ou moins 0.002 ppm par unité monosaccharidique. Celle-ci peut-être estimée à plus ou moins 0.005 ppm lorsque la lecture se fait sur un spectre à 2 dimensions. Quoiqu'il en soit l'utilisation de cette marge d'erreur n'enlève en rien à la pertinence de ces indices.

IS/IS-ol : Nombre de déplacements chimiques (δ) utilisés $\times \Delta\delta^{15}$

Ainsi pour les calculs faits précédemment les indices incluant les marges d'erreurs peuvent être utilisés de la manière suivante :

$$\text{IS} : 6 \delta \Rightarrow \Delta\delta = 6 \times 0.005 = \pm 0.03$$

$$28.30 < \text{IS} < 28.36$$

$$\text{IS-ol} : 7 \delta \Rightarrow \Delta\delta = 7 \times 0.005 = \pm 0.035$$

$$32.615 < \text{IS-ol} < 32.685$$

Dans les tableaux 4,5 et 6 sont répertoriés les indices calculés pour des O-Glycannes de la littérature utilisée.

¹⁵ Au choix de l'expérimentateur, nous proposons un $\Delta\delta$ 0.002 ppm pour la lecture des δ sur une 1D proton et $\Delta\delta$ 0.005 ppm pour une lecture sur un spectre 2D de type COSY ou TOCSY

Tableau 4 : Classement des indices SOACS et SOACS-ol calculés pour les oligosaccharide-alditols isolés de mucines oviducales d'amphibiens. rt : *Rana temporaria* (Florea 1997, Maes 1997), ra : *Rana arvalis* (Coppin 1999), xt : *Xenopus tropicalis* (Guérardel 2003), bv : *Bufo viridis* (Coppin 2002), rc : *Rana clamitans* (Delplace 2002), rr : *Rana ridibunda* (Mourad 2001), rd : *Rana dalmatina* (Florea 2002), rp : *Rana palustris* (Maes 1999)

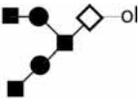
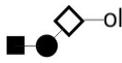
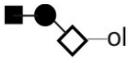
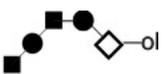
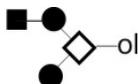
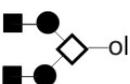
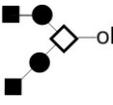
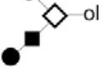
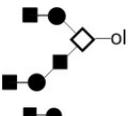
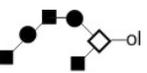
Nom Publié	IS	IS-ol	Nom Publié	IS	IS-ol	Nom Publié	IS	IS-ol
rt NIII-1a	0,000	4,251	xt 5C	15,289	19,59	rr N-II-8d	24,621	28,988
rt 100-4-a	1,660	5,903	rtb 14	15,595	23,93	rr 200-I-7	24,663	29,017
rt NIII-1b	4,478	8,873	rd A-19A	15,784	20,17	rt 50-7a	24,770	29,114
ra FNII-2	4,478	8,873	xt 12A	15,846	20,09	rd A15-B	24,892	29,223
rt 200-3	4,592	8,988	bv 11	16,378	20,70	xt 9B	24,967	29,270
rt NIII-2	5,170	9,543	rr 100-5	16,381	20,76	rt 100-6	25,156	29,476
rt 50-5-a	6,124	10,501	rd A-18	16,459	20,82	rr N-II-10c	25,794	30,096
Xt 10B	6,165	10,544	xt 9A	18,511	22,90	bv 2	25,816	30,197
rt 1	6,242	10,625	rc C3	18,570	22,96	bv 13	26,582	30,818
bv 10	6,615	10,544	rc C2	18,737	23,12	rc C10-1	27,727	32,339
Rt 50-4	6,811	11,176	rtb 13(4)	18,879	23,27	rc C8-1	27,825	32,212
ra FNII-4	9,001	13,395	rd A-8	18,952	23,34	rc C6	28,242	32,628
rc D1	9,001	13,395	ra 100-G	18,963	23,35	ra 100-M	28,339	32,667
xt 5A	9,002	13,395	rtb 12	18,994	23,39	bv 3	28,626	33,027
rt 300-5	9,022	13,411	rd A-4B	19,169	23,56	rd A-19B	28,827	33,160
rd A-5	9,022	13,411	ra 100-H	19,244	23,61	rr 100-12	28,879	33,234
rtb 6	9,094	13,483	rd A12-B	19,276	23,64	rr 400-II-4	28,895	33,246
Ra 50-5	9,201	13,596	ra 100-F	19,276	23,64	rr 400-II-3	28,976	33,340
rt 200-7	9,203	13,592	rt 4	19,286	23,67	bv 4	29,231	33,231
rd N-4	9,413	13,821	ra 100-D	19,320	23,67	rr 100-11	29,288	33,651
rp N-2	9,413	13,821	ra 50-10	19,374	23,72	bv 5	29,429	33,662
rd N-3	9,820	14,210	rr 100-7	19,381	23,74	ra 100-L	29,508	33,732
ra FNII-3	9,820	14,210	rd A-7C	19,393	23,78	rt 7	29,592	33,924
rtb 4	10,429	14,854	rr 200-II-6	19,393	23,78	rd A-20	29,778	34,050
rp 80-4a	11,073	15,453	rd N-8A	19,650	23,98	rtb 15(6)	30,522	34,908
rd A-12A	11,073	15,453	rt 100-4b	19,673	24,03	rc C10-4	32,816	37,264
rd 3	11,104	15,499	xt 8	19,809	24,09	rr 100-13	33,811	38,176
rp 80-5	11,104	15,499	xt 10A	19,863	24,16	rr 200-I-10	33,871	38,236
bv 8	11,223	15,603	rc D3	19,956	24,34	rr 400-II-5	33,888	38,232
rr 100-2	11,249	15,627	rtb 10	20,010	24,38	rr 400-II-6	33,896	38,257
bv 9	11,535	15,912	rr N-II-6d	20,087	24,45	rc C10-2	33,954	38,488
rt 50-5-b	12,105	16,256	rd N8-B	20,338	24,62	rc C10-3A	33,979	38,369
rtb 13(1)	13,539	17,929	xt 7	20,431	24,73	ra 50-14A	33,986	38,198
ra 100-E	13,550	17,945	rd 4	21,994	26,23	rc C10-3B	33,987	38,377
rd A-4A	13,819	18,214	bv 12	21,994	26,23	rd A-21	34,050	39,039
rt 3	13,897	18,284	xt 12B	22,126	26,42	rt 300-11	34,326	38,668
rd A-7A	13,941	18,331	rc C7	23,161	27,62	bv 6	34,448	38,676
rc C1(D2)	13,993	18,386	rc C5-3	23,238	27,62	rc C8-2	34,924	38,699
rd A-7B	14,015	18,407	rc C5-1	23,298	27,68	bv 14	36,184	40,414
rr 200-I-2	14,015	18,407	rc C5-4	23,476	27,85	rr 400-II-7	38,488	42,839
rd A-6A	14,069	18,479	ra 100-J	23,833	28,15	rr 200-I-8	38,904	43,255
xt 6	14,145	18,423	bv 1	23,856	28,23	bv 7	38,976	43,199
rtb 8	14,344	18,747	rr 100-10	23,909	28,25	rc C11-4	39,188	43,577
ra FNII-5	14,344	18,747	ra 50-14B	23,909	28,25	bv 15	41,390	45,613
xt 5B	14,345	18,749	rd A-12C	24,018	28,36	rr 200-I-9	43,252	47,591
rd A-6B	14,395	18,791	rt 5	24,130	28,51	rc C12	44,434	48,821
rt 200-9	14,397	18,790	rd A-15A	24,223	28,55	rc C14	49,237	53,775
rtb 7	14,485	18,878	rt 100-8	24,233	28,56	rc C15-6	49,375	53,959
rt 200-8	14,594	18,981	rr 100-9	24,287	28,65	rc C16	53,744	58,132
rtb 9	14,672	19,009	rt 6	24,421	28,75	rc C17-3	58,143	62,529
ra FNII-6	14,672	19,009	rt 2	24,435	28,78	rc B1(C18)	68,452	72,840
ra 100-A	14,760	19,122	rc D5(C2)	24,493	28,88	rc B2(C19)	68,455	72,841
rd A-3	14,762	19,119	rt 50-7b	24,557	28,95			

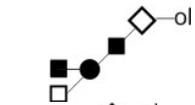
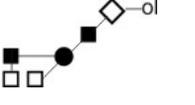
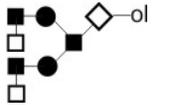
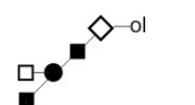
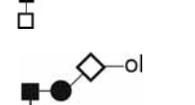
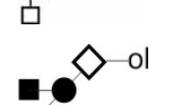
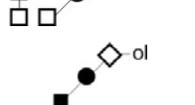
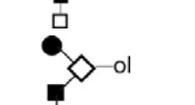
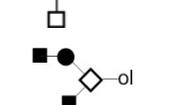
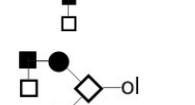
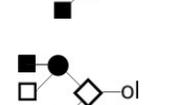
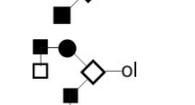
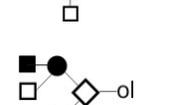
Tableau 5 : Classification des oligosaccharide-alditols compilés par Kamerling and Vliegenthart (1992) en fonctions de leurs indices SOACS croissants et SOACS-ol

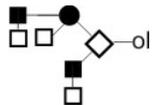
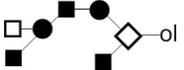
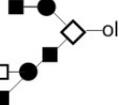
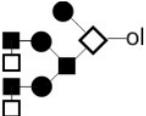
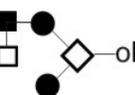
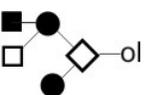
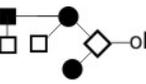
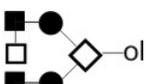
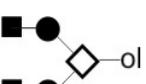
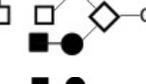
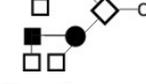
Numéro de la séquence	IS	IS-ol	Numéro de la séquence	IS	IS-ol	Numéro de la séquence	IS	IS-ol
1	no	4.252	23	18.132	22.419	108	25.745	30.132
2	4.478	8.873	20	18.195	22.437	125	25.758	30.142
5	4.553	8.795	76	18.398	22.79	100	25.775	30.174
3	4.604	8.891	167	18.405	22.806	126	27.466	31.849
4	5.103	9.498	41	18.580	22.973	137	27.694	32.082
9	6.169	10.544	49	18.738	23.018	45	27.714	32.109
10	6.305	10.565	30	18.757	23.154	46	27.759	32.156
78	6.347	10.737	77	18.760	23.15	136	27.903	32.302
78A	6.364	10.753	75	18.824	23.215	54	28.507	32.777
11	6.790	11.183	39	18.833	23.238	58	28.814	33.074
11A	6.807	11.207	40	18.843	23.241	53	28.822	33.102
85	8.033	12.411	48	18.99	23.272	127	29.180	33.569
7	9.006	13.401	36	19.507	23.773	44	29.226	33.627
165	9.007	13.394	72	19.746	24.026	70	29.474	33.876
19	9.048	13.291	67	19.830	24.139	139	29.775	34.159
17	9.086	13.376	110	19.977	24.362	121	30.207	34.584
18	9.115	13.404	114	19.981	24.274	103	31.000	35.294
16	9.141	13.541	116	19.989	24.275	104	31.091	35.415
8	9.143	13.423	117	20.004	24.282	143	31.697	36.084
60	9.394	13.798	101	20.194	24.586	142	31.712	36.099
29	9.840	14.239	88	20.436	24.815	146	32.541	36.825
90	10.796	15.056	107	20.443	24.830	47	32.632	37.024
94	10.812	15.073	119	20.506	24.886	151	32.669	36.888
166	10.871	15.258	113	20.578	24.856	162	32.884	37.277
79	11.225	15.605	82	20.594	24.989	164	32.960	37.356
83	11.551	15.932	122	20.598	24.974	147	33.035	37.317
83A	11.571	15.957	99	20.711	25.111	157	33.148	36.532
96	12.666	16.928	106	20.714	25.102	154	33.158	37.437
86	12.915	17.725	93	21.216	25.466	74	33.214	37.614
25	13.495	17.889	123	22.303	26.687	159	33.318	37.705
133	13.583	17.968	141	22.565	26.954	32	33.442	37.828
13	13.615	18.016	27	22.634	27.040	145	33.594	37.982
12	13.631	18.027	26	22.636	27.033	59	33.853	38.143
21	13.636	17.918	28	22.658	27.050	56	33.865	38.135
24	13.636	18.039	15	22.695	27.084	55	33.877	38.142
61	13.932	18.337	14	22.790	27.191	71	34.952	39.222
35	14.213	18.485	62	23.369	27.774	144	36.968	41.357
38	14.344	18.745	57	23.464	27.728	149	37.522	41.804
34	14.420	18.724	51	23.466	27.749	65	37.523	41.915
37	14.446	18.713	52	23.466	27.736	64	37.547	41.939
66	15.288	19.592	168	23.727	28.135	152	37.738	41.997
87	15.320	19.700	63	23.775	28.181	153	37.743	42.022
80	15.354	19.752	33	23.872	28.272	160	37.840	42.235
98	15.359	19.751	43	23.922	28.323	150	38.235	42.636
105	15.364	19.754	124	24.021	28.405	148	38.265	42.561
134	15.446	19.830	50	24.026	28.308	155	38.463	42.742
112	15.503	19.782	31	24.063	28.459	158	38.509	42.908
81	15.516	19.910	69	24.112	28.504	163	38.842	43.243
92	15.919	20.166	42	24.189	28.589	161	38.912	43.182
135	16.043	20.293	68	24.237	28.629	156	43.666	48.068
89	16.057	20.332	138	24.517	28.902	73	43.827	48.229
95	16.129	20.366	140	24.530	28.916			
91	16.159	20.422	111	25.053	29.440			
84	17.009	21.300	115	25.069	29.350			
109	17.224	21.611	120	25.132	29.508			
97	17.766	22.015	118	25.334	29.590			
22	18.119	22.402	102	25.550	29.949			

Tableau 6 : Récapitulatif des structures compilées dans la référence Kamerling 1992. LINUCS ID, correspond à la numérotation de la Sweet-DB. La symbolique est résumée tableau 1 (&4).

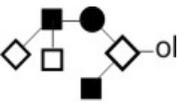
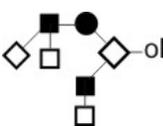
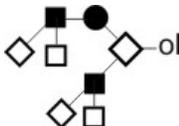
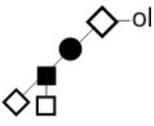
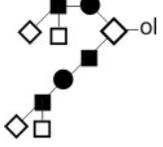
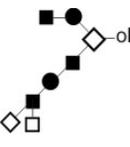
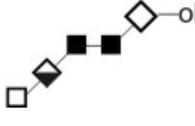
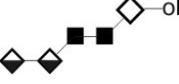
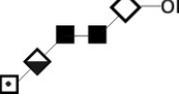
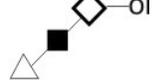
N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
1			n.d.		1561	4,250	4,252	4,254
2		4,476	4,478	4,480	375	8,869	8,873	8,877
3		4,602	4,604	4,606	630	8,887	8,891	8,895
4		5,101	5,103	5,105	632	9,494	9,498	9,502
5		4,551	4,553	4,555	631	8,791	8,795	8,799
6		1,698	1,700	1,702	636	5,941	5,945	5,949
6A		1,719	1,721	1,723	660	5,970	5,974	5,978
7		9,002	9,006	9,010	634	13,395	13,401	13,407
8		9,139	9,143	9,147	633	13,417	13,423	13,429
9		6,162	6,166	6,170	26663	10,538	10,544	10,550
9A		6,184	6,188	6,192	2108	10,562	10,568	10,574
10		6,301	6,305	6,309	2505	10,559	10,565	10,571
10A		-0,004	0,000	0,004	1825	-0,006	0,000	0,006
11		6,786	6,790	6,794	13822	11,177	11,183	11,189
11A		6,803	6,807	6,811	1824	11,201	11,207	11,213
12		13,625	13,631	13,637	4281	18,019	18,027	18,035
13		13,609	13,615	13,621	4279	18,008	18,016	18,024
14		22,780	22,790	22,800	12295	27,179	27,191	27,203

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
15		22,685	22,695	22,705	12296	27,072	27,084	27,096
16		9,137	9,141	9,145	8943	13,535	13,541	13,547
17		9,082	9,086	9,090	685	13,370	13,376	13,382
18		9,111	9,115	9,119	3668	13,398	13,404	13,410
19		9,044	9,048	9,052	3171	13,285	13,291	13,297
20		18,187	18,195	18,203	12298	22,427	22,437	22,447
21		13,630	13,636	13,642	4282	17,910	17,918	17,926
22		18,111	18,119	18,127	4290	22,392	22,402	22,412
23		18,124	18,132	18,140	4289	22,409	22,419	22,429
24		13,630	13,636	13,642	unreferenced	18,031	18,039	18,047
25		13,489	13,495	13,501	647	17,881	17,889	17,897
26		22,626	22,636	22,646	7045	27,021	27,033	27,045
27		22,624	22,634	22,644	12297	27,028	27,040	27,052
28		22,648	22,658	22,668	7046	27,038	27,050	27,062
29		9,836	9,840	9,844	80	14,233	14,239	14,245

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
30		18,749	18,757	18,765	4285	23,144	23,154	23,164
31		24,053	24,063	24,073	6679	28,457	28,469	28,481
32		33,418	33,432	33,446	12179	37,812	37,828	37,844
33		23,862	23,872	23,882	5022	28,260	28,272	28,284
34		14,436	14,442	14,448	1550	18,716	18,724	18,732
35		14,207	14,213	14,219	4278	18,477	18,485	18,493
36		19,499	19,507	19,515	4284	23,763	23,773	23,783
37		14,440	14,446	14,452	1549	18,705	18,713	18,721
38		14,338	14,344	14,350	637	18,737	18,745	18,753
39		18,825	18,833	18,841	1554	23,228	23,238	23,248
40		18,835	18,843	18,851	1553	23,231	23,241	23,251
41		18,572	18,580	18,588	4286	22,963	22,973	22,983
42		24,179	24,189	24,199	377	28,577	28,589	28,601
43		23,912	23,922	23,932	8946	28,311	28,323	28,335

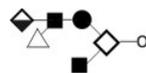
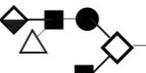
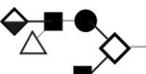
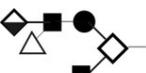
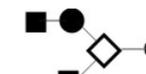
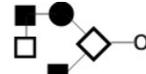
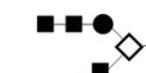
N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUXS ID	Mini	IS-ol	Maxi
44		29,214	29,226	29,238	1667	33,613	33,627	33,641
45		27,702	27,714	27,726	5009	32,095	32,109	32,123
46		27,747	27,759	27,771	unreferenced	32,142	32,156	32,170
47		37,927	37,943	37,959	unreferenced	42,317	42,335	42,353
48		18,982	18,990	18,998	8948	23,262	23,272	23,282
49		18,730	18,738	18,746	4288	23,008	23,018	23,028
50		24,016	24,026	24,036	8949	28,296	28,308	28,320
51*		23,456	23,466	23,476	8950	27,737	27,749	27,761
52*		23,456	23,466	23,476	8951	27,724	27,736	27,748
53		28,810	28,822	28,834	8952	33,088	33,102	33,116
54		28,495	28,507	28,519	8954	32,763	32,777	32,791
55		33,863	33,877	33,891	8953	38,126	38,142	38,158
56		33,851	33,865	33,879	12363	38,119	38,135	38,151

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
57		23,454	23,464	23,474	4296	27,716	27,728	27,740
58		28,802	28,814	28,826	8955	33,060	33,074	33,088
59		33,839	33,853	33,867	8956	38,127	38,143	38,159
60		9,390	9,394	9,398	376	13,792	13,798	13,804
61		13,926	13,932	13,938	4979	18,329	18,337	18,345
62		23,359	23,369	23,379	380	27,762	27,774	27,786
63		23,765	23,775	23,785	379	28,169	28,181	28,193
64		37,531	37,547	37,563	12181	41,921	41,939	41,957
65		37,507	37,523	37,539	12180	41,897	41,915	41,933
66		15,282	15,288	15,294	639	19,584	19,592	19,600
67		19,822	19,830	19,838	1674	24,129	24,139	24,149
68		24,317	24,327	24,337	1675	28,617	28,629	28,641

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUXS ID	Mini	IS-ol	Maxi
69		24,102	24,112	24,122	1673	28,492	28,504	28,516
70		29,462	29,474	29,486	12558	33,862	33,876	33,890
71		34,938	34,952	34,966	1678	39,206	39,222	39,238
72		19,738	19,746	19,754	1676	24,016	24,026	24,036
73		39,099	39,117	39,135	1679	43,499	43,519	43,539
74		33,200	33,214	33,228	1677	37,598	37,614	37,630
75* (23°C)		18,816	18,824	18,832	3896	23,205	23,215	23,225
76* (23°C)		18,390	18,398	18,406	3917	22,780	22,790	22,800
77		0,000		0,000	undetermined	0,000		0,000
78		6,343	6,347	6,351	696	10,731	10,737	10,743

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
78A		6,360	6,364	6,368	3622	10,747	10,753	10,759
79		11,219	11,225	11,231	12269	15,597	15,605	15,613
80		15,346	15,354	15,362	12345	19,742	19,752	19,762
81		15,508	15,516	15,524	12383	19,900	19,910	19,920
82		20,584	20,594	20,604	12340	24,977	24,989	25,001
83		11,545	11,551	11,557	9026	15,928	15,932	15,936
83A		11,565	11,571	11,577	3141	15,953	15,957	15,961
84		17,001	17,009	17,017	3142	21,290	21,300	21,310
85		8,027	8,033	8,039	697	12,403	12,411	12,419
86		12,907	12,915	12,923	3364	12,265	12,275	12,285
87		15,312	15,320	15,328	12385	19,690	19,700	19,710
88		20,426	20,436	20,446	13825	24,803	24,815	24,827

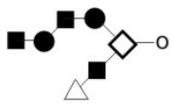
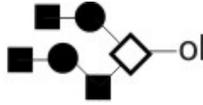
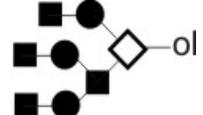
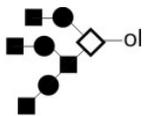
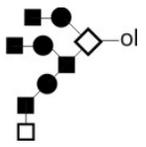
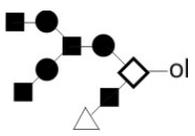
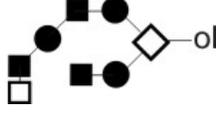
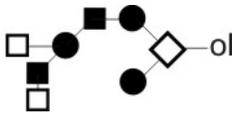
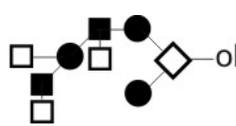
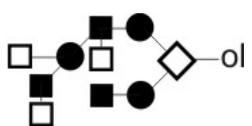
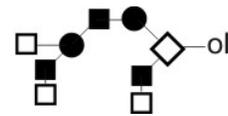
N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
89		16,049	16,057	16,065	12338	20,322	20,332	20,342
90		10,790	10,796	10,802	4300	15,048	15,056	15,064
91		16,151	16,159	16,167	3455	20,412	20,422	20,432
92		15,911	15,919	15,927	12344	20,156	20,166	20,176
93		21,206	21,216	21,226	12386	25,454	25,466	25,478
94		10,806	10,812	10,818	4299	15,065	15,073	15,081
95		16,121	16,129	16,137	12349	20,356	20,366	20,376
96		12,658	12,666	12,674	12407	16,918	16,928	16,938
97		17,756	17,766	17,776	12408	22,003	22,015	22,027
98		15,351	15,359	15,367	5249	19,741	19,751	19,761
99		20,701	20,711	20,721	12384	25,099	25,111	25,123
100		25,763	25,775	25,787	12388	30,160	30,174	30,188

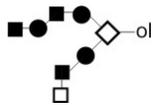
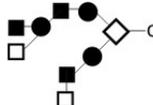
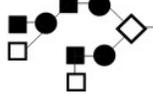
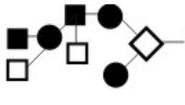
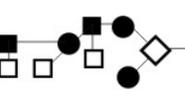
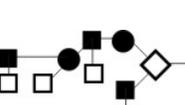
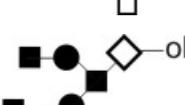
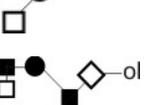
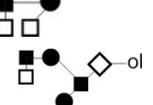
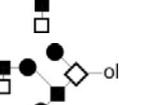
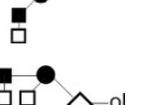
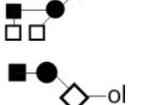
N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUXS ID	Mini	IS-ol	Maxi
101		20,184	20,194	20,204	7886	24,574	24,586	24,598
102		25,538	25,550	25,562	16547	29,935	29,949	29,963
103		30,986	31,000	31,014	16548	35,278	35,294	35,310
104		31,077	31,091	31,105	16549	35,399	35,415	35,431
105		15,356	15,364	15,372	4297	19,744	19,754	19,764
106		20,704	20,714	20,724	12285	25,090	25,102	25,114
107		20,433	20,443	20,453	4298	24,818	24,830	24,842
108		25,733	25,745	25,757	12286	30,118	30,132	30,146
109		17,214	17,224	17,234	1826	21,599	21,611	21,623
110		19,967	19,977	19,987	5250	24,350	24,362	24,374
111		25,041	25,053	25,065	5253	29,426	29,440	29,454
112		15,495	15,503	15,511	12339	19,772	19,782	19,792

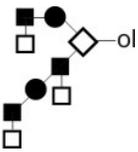
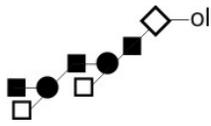
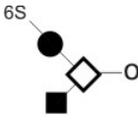
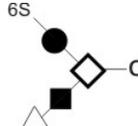
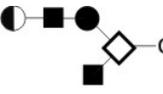
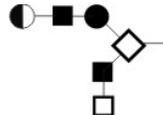
N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
113		20,568	20,578	20,588	12341	24,844	24,856	24,868
114		19,971	19,981	19,991	12346	24,262	24,274	24,286
115 (22°C)		25,057	25,069	25,081	12342	29,336	29,350	29,364
116		19,979	19,989	19,999	12343	24,263	24,275	24,287
117		19,994	20,004	20,014	12348	24,270	24,282	24,294
118		25,322	25,334	25,346	12347	29,576	29,590	29,604
119		20,496	20,506	20,516	5251	24,874	24,886	24,898
120		25,120	25,132	25,144	5254	29,494	29,508	29,522
121		30,193	30,207	30,221	5255	34,568	34,584	34,600
122		20,588	20,598	20,608	3310	24,962	24,974	24,986
123		22,291	22,303	22,315	3311	26,673	26,687	26,701

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
124		24,007	24,021	24,035	3923	28,389	28,405	28,421
125		25,742	25,758	25,774	3919	30,124	30,142	30,160
126		27,448	27,466	27,484	3920	31,829	31,849	31,869
127		29,160	29,180	29,200	3922	33,547	33,569	33,591
128 (60°C)		20,501	20,511	20,521	3911	0,000		0,000
129		0,000		0,000	3912	0,000		0,000
130		0,000		0,000	3913	0,000		0,000

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
131		0,000		0,000	3914	0,000		0,000
132 (60°C)		22,118	22,130	22,142	unreferenced	0,000		0,000
133		13,577	13,583	13,589	3460	17,960	17,968	17,976
134		15,438	15,446	15,454	3461	19,820	19,830	19,840
135		16,035	16,043	16,051	12406	20,283	20,293	20,303
136		27,891	27,903	27,915	12421	32,288	32,302	32,316
137		27,682	27,694	27,706	12419	32,068	32,082	32,096
138		24,505	24,517	24,529	12409	28,888	28,902	28,916
139		29,761	29,775	29,789	12411	34,143	34,159	34,175

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
140		24,518	24,530	24,542	12410	28,902	28,916	28,930
141		22,555	22,565	22,575	648	26,942	26,954	26,966
142		31,698	31,712	31,726	12423	36,083	36,099	36,115
143		31,683	31,697	31,711	12424	36,068	36,084	36,100
144		36,952	36,968	36,984	12420	41,339	41,357	41,375
145		33,578	33,594	33,610	12412	37,964	37,982	38,000
146		32,527	32,541	32,555	12498	36,809	36,825	36,841
147		33,021	33,035	33,049	12497	37,301	37,317	37,333
148		38,249	38,265	38,281	12505	42,543	42,561	42,579
149		37,504	37,522	37,540	12506	41,784	41,804	41,824
150		38,219	38,235	38,251	12502	42,618	42,636	42,654

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
151(15°)		32,655	32,669	32,683	12500	36,872	36,888	36,904
152		37,722	37,738	37,754	12501	41,979	41,997	42,015
153		37,727	37,743	37,759	12503	42,004	42,022	42,040
154		33,144	33,158	33,172	12496	37,421	37,437	37,453
155		38,447	38,463	38,479	12499	42,724	42,742	42,760
156		43,648	43,666	43,684	12504	48,048	48,068	48,088
157		33,134	33,148	33,162	12508	37,516	37,532	37,548
158		38,493	38,509	38,525	12511	42,890	42,908	42,926
159		33,304	33,318	33,332	12509	37,689	37,705	37,721
160		37,824	37,840	37,856	12513	42,217	42,235	42,253
161		38,896	38,912	38,928	12510	43,164	43,182	43,200
162		32,870	32,884	32,898	12541	32,261	32,277	32,293

N° Ref (Kamerling 1992)	Schéma	Mini	IS	Maxi	LINUCS ID	Mini	IS-ol	Maxi
163		38,826	38,842	38,858	12512	43,225	43,243	43,261
164		32,946	32,960	32,974	12507	37,340	37,356	37,372
165		9,003	9,007	9,011	3459	13,388	13,394	13,400
166		10,865	10,871	10,877	3458	15,250	15,258	15,266
167		18,397	18,405	18,413	2540	22,796	22,806	22,816
168		23,717	23,727	23,737	378	28,123	28,135	28,147

7.2.2 N-GLYCANNES

L'application de ce SOACS aux N-Glycannes est quasiment identique à l'exception de quelques paramètres. En effet, les N-Glycannes sont libérés de différentes manières, enzymatiques ou chimiques, et leur extrémité terminale réductrice peut se trouver sous différentes formes. Ces N-Glycannes peuvent être sous forme de glycopeptides¹⁶, de Glyco-asparagine¹⁷, peuvent être réducteurs avec du chitobiose¹⁸ ou n'avoir qu'un seul résidu de N-acetyl glucosamine en position terminale réductrice. Il est possible dans ces deux dernier cas de réduire le N-Glycannes pour obtenir un résidu de GlcNAc-ol. *De facto*, l'indice SOACS-ol n'est pas défini pour ce type de glycanne.

De plus le résidu Mannosyl substituant le chitobiose résonne systématiquement, dans les conditions standard d'accumulation (D_2O , pD 7) avec les protons du solvant résiduel, il est par conséquent rarement visible sur un spectre à une dimension. Ainsi, seul ce résidu n'est pas pris en compte pour le calcul de l'IS. Enfin, il est nécessaire d'intégrer systématiquement les protons observer pour évaluer le nombre de protons présents dans la molécule. Nous recommandons lorsque cela est possible d'enregistrer un spectre à deux dimensions.

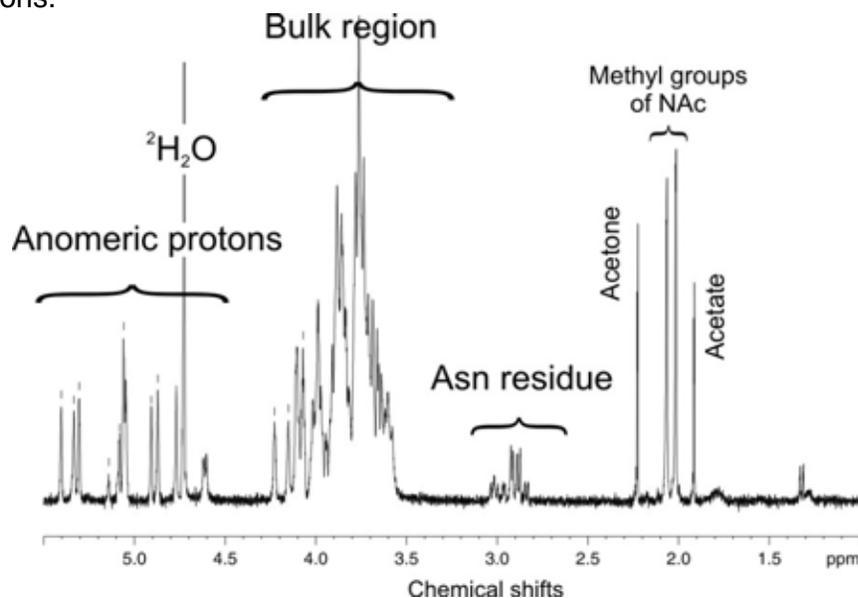


Figure 25 : Spectre à une dimension d'un N-glycane oligomannosylé classique :

Seule la partie où résonnent les protons anomères est pris en compte. Le calcul de l'IS s'effectue donc de la même manière que pour les O-Glycannes :

¹⁶ Le N-glycane est alors lié à un peptide par liaison N-glycosidique sur une Asn

¹⁷ Le N-glycane est N-lié sur un seul résidu d'Asn

¹⁸ chitobiose : β -D-GlcNAc-(1-4)- β / α -D-GlcNAc

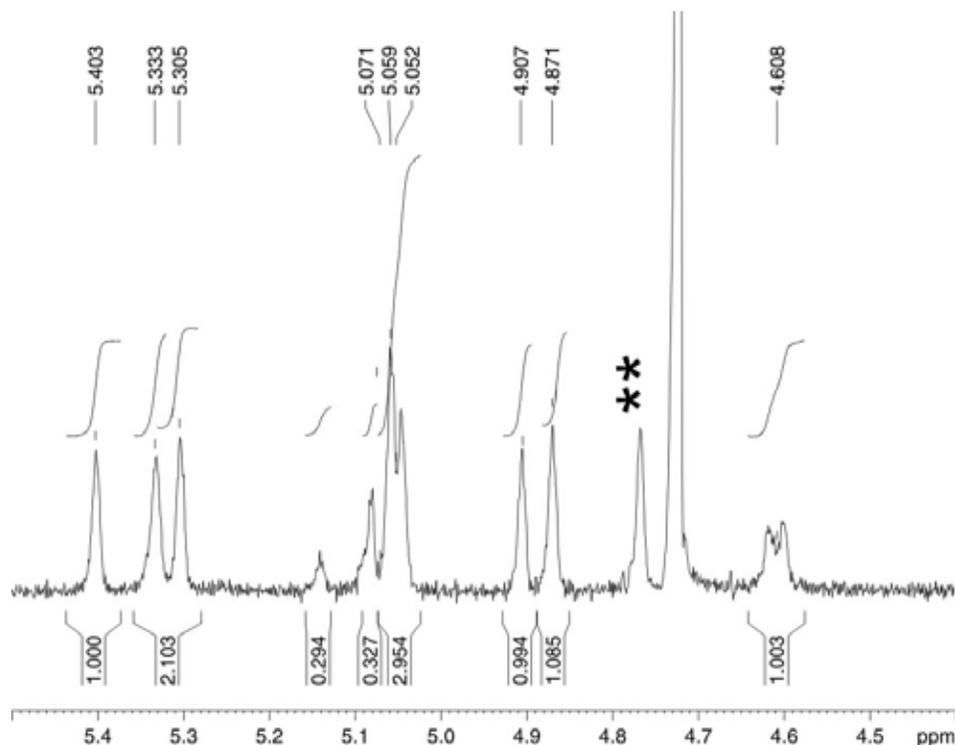


Figure 26 : Partie anomère d'un spectre de N-glycane oligomannosyl enregistré à 300K¹⁹

Dans ce cas :

$$IS = 5.403 + 5.333 + 5.305 + 5.071 + 5.059 + 5.052 + 4.907 + 4.871 + 4.608 =$$

$$\mathbf{45.609}$$

$$\text{La marge d'erreur de } +/- 9 \times 0.002 = 0.018$$

Pour les N-glycannes sialylés, tout comme pour les O-glycannes, le proton H3 axial de l'acide (ou des) est pris en compte.

7.3 MOLECULES DE CHIMIE ORGANIQUE

L'approche pour ce type de molécule est un peu différente. En effet, ces molécules sont en général étudiées en RMN du carbone²⁰ à une dimension compte tenu de la quantité de matériel disponible. *De facto*, l'indice calculé s'effectuera sur la base des déplacements chimiques carbones. La définition spectrale permet ainsi d'obtenir tous les δ des carbones de la molécule. L'indice calculé correspond dans ce cas à l'addition de tous ces δ . Ceci nous permet de définir un autre indice le SACCS acronyme de « Sum of All Carbone Chemical Shifts ». Ainsi nous avons à partir de la littérature (Leroy *et al* 1972) calculé les indices SACCS d'un certain nombre de molécules, ceux-ci sont répertoriés dans la table 7.

¹⁹ Ce glycane n'est pas encore répertorié dans la glycobase

²⁰ Rappel, seuls les isotopes ¹³C sont observables en RMN

Table 7 : Classification (partielle) des structures de la référence Leroy (1972) en fonction de leur Indice SACCS. Malgré l'existence de SACCS identiques ou très proches, nous remarquons que les molécules sont très différentes, la simple comparaison de leur spectre suffit à les discriminer.

Name	Solvent	N° ref	Indice SACCS	chemical shifts		
ethyl iodide	CDCI3	9	19,3	-1,2	20,5	
1-iodopropane	CDCI3	33	51,3	9,2	15,3	26,8
ethylthiocyanate	CDCI3	25	55,9	15,4	28,6	11,9
diethylamine	CDCI3	98	59,5	15,4	44,1	
dimethyl methylphosphonate	CDCI3	42	61,9	9,8	52,1	
tetrahydrothiophene	dioxane	78	62,6	31,2	31,4	
ethanesulfonyl chloride	CDCI3	8	69,3	9,1	60,2	
N-nitrosodimethylamine	dioxane	11	72,0	32,1	39,9	
pyrrolidine	CDCI3	84	72,8	25,7	47,1	
diethylsulfite	dioxane	94	73,7	15,4	58,3	
tetramethylene sulfone	dioxane	77	74,3	22,8	51,5	
1,1,2-tribromomethane	CDCI3	2	79,0	38,7	40,3	
nitroethane	CDCI3	10	83,0	12,3	70,7	
ethylsulfate	CDCI3	13	84,1	14,5	69,6	
sym-dimethylethylenediamine	dioxane	101	88,4	36,4	52,0	
2-mercaptoethanol	dioxane	12	91,1	27,1	64,0	
tetrahydrofuran	CDCI3	73	93,7	25,8	67,9	
1-bromo-2-methylpropane	CDCI3	79	93,8	20,9	30,7	42,2
2-bromo-2-methylpropane	CDCI3	81	98,5	36,4	62,1	
1,5-diaminopentane	CDCI3	144	100,1	24,2	33,8	42,1
tert-butyl alcohol	CDCI3	88	100,1	31,2	68,9	
n-propanol	dioxane	39	100,8	10,5	26,3	64,0
2-chloro-2-methylpropane	CDCI3	82	101,2	34,4	66,8	
piperidine	dioxane	133	101,6	25,9	27,8	47,9
1,2,3-trichloropropane	dioxane	23	104,3	45,3	59,0	
isopropylmethylamine	CDCI3	97	106,9	22,5	33,9	50,5
1,2-dibromopropane	CDCI3	26	107,4	24,1	37,6	45,7
propylene oxide	dioxane	29	113,0	18,1	47,3	47,6
acetonitrile	dioxane	4	119,0	1,3	117,7	
isobutyl alcohol	CDCI3	90	119,1	18,9	30,8	69,4
1,2-butanedithiol	dioxane	95	119,2	11,4	29,4	33,2 45,2
tetrahydropyran	dioxane	124	120,0	24,2	27,2	68,6
1,1,2-trichloroethane	CDCI3	3	120,5	50,1	70,4	
1-bromo-3-methylbutane	CDCI3	129	122,0	21,8	26,8	31,7 41,7
2-bromobutane	CDCI3	80	125,4	12,1	26,0	34,2 53,1
1,2-dichloropropane	CDCI3	27	127,7	22,4	49,5	55,8
1,2-dibromobutane	CDCI3	69	129,7	10,9	29,0	35,5 54,3
2-chlorobutane	dioxane	83	129,9	11,1	25,0	33,7 60,1
1,2-dimethoxyethane	dioxane	93	130,9	58,6	72,3	
1-Chloro-3-methylbutane	CDCI3	131	132,4	22,0	25,7	41,6 43,1
sec-butyl alcohol	CDCI3	89	133,9	10,0	22,7	32,0 69,2
1,2-dibromo-2-methylpropane	CDCI3	70	138,1	31,8	44,6	61,7
propionitrile	CDCI3	24	142,2	10,6	10,8	120,8
1-chloropentane	CDCI3	132	142,6	13,9	22,1	29,2 32,5 44,9
2-amino-2-methyl-1-propanol	CDCI3	99	148,4	26,7	50,6	71,1
N-methyl-sec-butylamine	CDCI3	141	149,0	10,2	19,3	56,4 29,3 33,8
isopentyl alcohol	CDCI3	139	149,8	22,6	24,8	41,7 60,7
2-methylaminoethanol	dioxane	41	150,6	36,0	54,3	60,3
2-chloro-2-methylbutane	CDCI3	130	151,3	9,4	32,0	38,8 71,1
propylene glycol	CDCI3	40	154,6	18,7	67,7	68,2
2-amino-1-butanol	CDCI3	100	157,0	10,4	26,5	54,3 65,8
dimethylglyoxime	DMSO	71	162,3	9,2	153,1	
isobutyronitrile	CDCI3	66	163,4	19,8	19,9	123,7
N,N-dimethyl-1,3-propanediamine	dioxane	143	176,2	32,2	40,8	45,4 57,8
choline chloride	water	142	179,7	54,8	56,6	68,3
3-chloro-1,2-propanediol	water	32	182,3	46,8	63,5	72,0
1,3-butanediol	CDCI3	91	190,3	23,4	40,6	60,0 66,3
cyclobutyl nitrile	CDCI3	56	191,4	19,9	22,0	27,1 122,4
acetoneoxime	CDCI3	35	191,6	14,9	21,5	155,2
acetic acid	CDCI3	7	198,7	20,6	178,1	
succinic anhydride	DMSO	49	201,5	28,6	172,9	

2,5-dihydrofuran	CDCI3	59	201,6	75,3	126,3				
1-amino-3-methoxypropane	CDCI3	96	202,5	33,6	39,6	58,4	70,9		
tetramethylurea	CDCI3	137	203,9	38,5	165,4				
2-propyne-1-ol	dioxane	19	206,8	50,0	73,8	83,0			
2-butyne-1-ol	dioxane	58	212,6	3,2	50,5	78,9	80,0		
succinimide	water	55	213,9	30,3	183,6				
ethylene glycol monoethyl ether	CDCI3	92	215,0	15,0	61,5	66,5	72,0		
alpha-methyltetrahydrofuran	dioxane	123	222,9	21,0	26,2	33,5	67,2	75,0	
pyrrole	CDCI3	54	225,8	107,9	117,9				
thioacetic acid	dioxane	6	227,1	32,6	194,5				
beta-methyltetrahydrofuran	dioxane	125	228,9	17,9	34,0	34,7	67,6	74,7	
dimethylformamide	CDCI3	34	229,7	31,1	36,2	162,4			
acetaldehyde	CDCI3	5	230,4	30,7	199,7				
ethylcarbamate	CDCI3	37	233,2	14,5	60,9	157,8			
3-mercaptopropionic acid	CDCI3	31	235,4	19,3	38,2	177,9			
acetone	CDCI3	28	236,6	30,6	206,0				
tetramethylurea	CDCI3	138	236,9	43,0	193,9				
2,5-dibromothiophene	CDCI3	44	241,5	111,4	130,1				
2,3-dibromopropionic acid	CDCI3	18	242,8	28,8	40,4	173,6			
alanine	water	36	245,2	17,2	51,5	176,5			
L-tartaric acid	water	64	248,1	72,8	175,3				
3-methoxy-1-butanol	CDCI3	140	248,7	18,9	39,1	55,8	59,6	75,3	
hexachlorobutadiene	CDCI3	43	250,0	123,6	126,4				
thiophene	CDCI3	50	251,6	124,9	126,7				
furan	dioxane	48	252,7	109,7	143,0				
1-bromo-1-propene (cis)	CDCI3	20	253,6	15,3	108,9	129,4			
3-pentanone	CDCI3	122	254,7	7,9	35,4	211,4			
3-hydroxy-3-methylbutyne-1	dioxane	112	254,9	31,3	64,0	70,0	89,6		
1-bromo-1-propene (trans)	CDCI3	20	255,5	18,1	104,7	132,7			
1,3,5-tribromobenzene	CDCI3	145	256,1	123,2	132,9				
ethyl methylcarbamate	CDCI3	86	260,6	14,7	27,4	60,7	157,8		
2-bromobutyric acid	CDCI3	65	262,7	11,7	28,1	47,0	175,9		
N,N-dimethyl acetamide	dioxane	85	262,9	21,3	34,5	37,5	169,6		
cysteine	water	38	263,4	28,2	58,4	176,8			
sodium diethylthiocarbamate	water	120	268,2	12,3	49,5	206,4			
2-pyrrolidone	CDCI3	67	272,9	20,8	30,3	42,4	179,4		
butyraldehyde	dioxane	74	277,6	13,8	16,0	45,9	201,9		
Trifluoroacetic acid	CDCI3	1	278,0	115,0	163,0				
isopropylacetate	dioxane	126	279,6	20,8	21,8	67,4	169,6		
cyclopentanone	dioxane	113	279,7	23,5	38,0	218,2			
methyl ethyl ketone	dioxane	75	281,1	8,0	29,0	36,5	207,6		
3-ethoxypropionitrile	CDCI3	116	283,6	14,9	18,9	65,1	66,5	118,2	
allyl bromide	CDCI3	21	285,6	32,6	118,8	134,2			
maleic acid hydrazide	DMSO	47	286,5	130,3	156,2				
betaine hydrochloride	water	134	287,0	54,8	64,6	167,6			
4-butyrolactone	CDCI3	60	296,4	22,2	27,7	68,6	177,9		
3-chloro-1-propene	dioxane	22	297,8	45,1	118,1	134,6			
methyl isopropyl ketone	CDCI3	121	298,7	18,1	27,3	41,5	211,8		
maleic anhydride	CDCI3	45	300,9	136,6	164,3				
methylene cyclobutane	CDCI3	110	304,1	16,8	32,1	104,8	150,4		
2-methyl-2-butene	dioxane	119	306,3	13,3	17,1	25,5	118,7	131,7	
trimethylvinylammonium bromide	water	136	311,1	55,3	112,7	143,1			
3-hydroxy-1-propene	CDCI3	30	315,8	63,4	114,9	137,5			
propylene carbonate	CDCI3	62	319,0	19,1	70,8	73,9	155,2		
methionine	water	135	319,0	15,0	30,6	34,6	56,1	182,7	
acetoin	CDCI3	76	328,6	19,4	24,9	73,1	211,2		
ethyl trichloroacetate	CDCI3	51	330,1	13,7	65,4	89,9	161,1		
threonine	water	87	334,5	20,0	62,7	70,4	181,4		
proline	water	117	338,8	24,6	29,8	47,0	62,1	175,3	
hexachlorocyclopentadiene	dioxane	102	342,8	81,5	128,5	132,8			
ethyl trifluoroacetate	CDCI3	52	351,9	13,8	64,7	115,3	158,1		
2-chloroacrylonitrile	CDCI3	15	356,9	110,8	114,4	131,7			
acrylonitrile	dioxane	16	363,1	108,1	117,5	137,5			
beta-xylose	water	128	370,9	61,8	70,2	72,3	73,6	93,0	
trichloroacetylisocyanate	CDCI3	14	381,2	92,4	130,2	158,6			
crotononitrile (cis)	dioxane	53	384,4	17,3	100,9	116,0	150,2		
alpha-xylose	water	128	384,8	66,0	70,0	74,8	76,6	97,4	
2,3-butandione monooxime	CDCI3	68	388,8	8,0	25,0	157,0	198,8		
crotononitrile (trans)	dioxane	53	389,2	18,8	101,2	117,6	151,6		
methoxyethyl thioglyconate	CDCI3	127	390,3	26,3	58,7	64,4	70,2	170,7	

o-dichlorobenzene	CDCI3	148	390,8	127,7	130,5	132,6			
hydroxyproline	water	118	398,6	38,2	53,9	60,7	70,9	174,9	
pyridine	CDCI3	106	409,1	123,6	135,7	149,8			
thiazole	CDCI3	17	414,5	118,6	143,2	152,7			
vinyl acetate	dioxane	61	426,4	20,2	96,8	141,8	167,6		
thiomalic acid	water	63	429,4	36,9	40,2	175,3	177,0		
N-Glycylglycine	water	72	430,5	41,3	44,2	167,9	177,1		
monosodium glutamate	water	111	475,0	27,8	34,3	55,5	175,4	182,0	
methyl methacrylate	dioxane	114	498,7	18,3	51,5	124,7	136,9	167,3	
crotonaldehyde	dioxane	57	500,2	18,2	134,9	153,7	193,4		
2-chlorothiophene	CDCI3	46	506,1	123,9	125,9	126,4	129,9		
m-dichlorobenzene	dioxane	149	521,6	127,0	128,9	130,6	135,1		
1,2,3-trichlorobenzene	CDCI3	146	522,0	127,5	128,6	131,6	134,3		
1-bromo-4-nitrobenzene	CDCI3	147	534,2	124,9	129,8	132,5	147,0		
2-methylpyrazine	CDCI3	108	605,9	21,6	141,8	143,8	144,7	154,0	
acetyl acetone	dioxane	115	606,3	24,3	30,2	58,2	100,3	191,4	201,9
citraconic anhydride	CDCI3	103	621,3	11,3	129,7	149,5	164,3	166,5	
3-chloro-6-methoxypyridazine	CDCI3	105	621,3	55,0	120,1	130,8	151,0	164,4	
2-aminopyridine	CDCI3	109	665,9	108,5	113,3	137,5	147,7	158,9	
2-pyridone	CDCI3	107	668,5	106,7	120,1	134,8	141,6	165,3	
furfural	dioxane	104	715,2	112,9	121,6	148,7	153,8	178,2	

7.4 CONCLUSION

Les indices SOACS, SOACS-ol et *a priori* SACCS sont des outils de recherches performants qui permettent, sur la base de l'expérience RMN proton ou carbone, de retrouver aisément une molécule déjà compilée dans la **GlycoBase**²¹. Nous tenterons de convaincre les autres banques de données RMN d'utiliser cette requête en plus de celles existantes. Enfin cette requête a été publiée dans Carbohydrate Research (Maes *et al* 2008).

²¹ <http://glycobase.univ-lille1.fr/base/>

8. CONCLUSION

Comme nous avons pu le voir, la R.M.N. est un outil particulièrement intéressant dans l'analyse structurale des oligosaccharide-alditols puisque ceux ci sont constitués majoritairement d'atomes possédant une résonance. Cette technique est puissante par le fait qu'elle est suffisante pour une détermination complète de la composition et de la structure de ces molécules biologiques. Bien que non destructive cette technique a ses limites. En effet les expériences, et notamment les expériences d'observation du carbone ^{13}C , demandent une quantité non négligeable de matériel qui n'est pas toujours disponible. Néanmoins l'avènement de la nouvelle génération des supra-conducteurs et la mise au point de bobines inductrices de champs magnétiques de plus en plus puissants (jusqu'à 1 GHz) ainsi que de séquences d'impulsions de plus en plus complexes permettent d'augmenter la sensibilité de cette technique.

La R.M.N. est une technique parfaitement complémentaire de la spectrométrie de masse (et *vice et versa*). Leur combinaison permet très souvent d'obtenir les résultats souhaités.

Enfin ce livret a été élaboré à partir de revues générales et de sites internet. Nous conseillons vivement aux lecteurs la consultation de ces ouvrages pour de plus amples informations.

9. BIBLIOGRAPHIE

Sites Web d'intérêt :

Equipe Biodiversité (Guerardel Y.) : <http://glycobase.univ-lille1.fr/>

GlycoBase : <http://glycobase.univ-lille1.fr/base/>

SWEET-DB : <http://www.glycosciences.de/sweetdb/>

BCSDB : <http://www.glyco.ac.ru/bcsdb/start.shtml>

Sugabase : <http://www.boc.chem.uu.nl/sugabase/sugabase.html>

Queen's University :

<http://web.chem.queensu.ca/FACILITIES/NMR/nmr/index.htm>

USTL : <http://www.univ->

[lille1.fr/lcom/RMN2D/index1.htm#resum2D_us/index_us.htm](http://www.univ-lille1.fr/lcom/RMN2D/index1.htm#resum2D_us/index_us.htm)

Benn R. and Günther H. (1983) Modern pulse Methods in High-Resolution NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **22**, 350-380

Bria M. and Watkin P. (1997) La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions ou l'aide à la détermination structurale des molécules organiques, *Act. Chim.*, **2**, 24-35

Capon C., Maes E., Michalski J. C., Leffleur H and Kim Y.S. (2001) Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon. *Biochem J.*, **358**, 657-664.

Capon C., Leroy Y., Wieruszeski J. M., Ricart G., Strecker G., Montreuil J. and Fournet B. (1989) Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins, *Eur. J. Biochem.*, **186**, 583-590

Coppin A., Maes E. and Strecker G. (2002) Species-specificity of amphibia carbohydrate chains: The *Bufo viridis* case study, *Carbohydr. Res.*, **337**, 121-132

Coppin A., Maes E., Flahaut C., Coddeville B, Strecker G (1999). Acquisition of species-specific O-linked carbohydrate chains from oviducal mucins in *Rana arvalis*. A case study, *Eur J Biochem*; **266**.;370-82.

Delplace F., Maes E., Lemoine J. and Strecker G. (2002) Species specificity of O-linked carbohydrate chains of the oviducal mucins in amphibians : Structural analysis of neutral oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from the egg-jelly coats of *Rana clamitans*, *Biochem. J.*, **363**, 457-471

Derome A. E., Modern NMR techniques in high resolution NMR, *Pergamon Press*, 1987

Florea D., Maes E. and Strecker G. (1997) Primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria*. *Carbohydr. Res.*, **302**, 179-189

Florea D., Maes E, Haddad M, Strecker G. (2002) Structural analysis of the oligosaccharide alditols released from the jelly coat of *Rana dalmatina* eggs by reductive beta-elimination., *Biochimie*, **84**, 611-624

Fontaine M. D., Wieruszeski J. M., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Structure of six 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Kdn) containing oligosaccharide-alditols released from oviduct secretions of *Ambystoma maculatum*. Characterization of the sequence fucosyl(α 1-

2)[fucosyl(α 1-3)]fucosyl(α 1-4)3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid
Eur. J. Biochem., **231**, 424-433

Guerardel Y., Balanzino L., Maes E., Leroy Y., Coddeville B., Oriol R. and Strecker G. (2001) The nematode *Caenorhabditis elegans* synthesizes unusual O-linked glycans : identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides. *Biochem J.*, **357**, 167-182.

Guerardel Y., Kol O., Maes E., Lefebvre T., Boilly B. Davril M. and Strecker G. (2000) O-Glycan variability of egg-jelly mucins from *Xenopus laevis* characterization of four phenotypes that differ by their terminal glycosylation of their mucins. *Biochem. J.*, **352**, 449-463

Guérardel Y, Petit D, Madigou T, Guillet B, Maes E, Maftah A, Boujard D, Strecker G, Kol O. (2003) Identification of the blood group Lewis(a) determinant in the oviducal mucins of *Xenopus tropicalis*, *FEBS Lett.*, **554**,:330-6.

Kamerling J. F. and Vliegthart J. F. G. (1992) In : *Biological Magnetic Resonance* (Berliner, L. J. and Reben J. Eds), Plenum Press, New-York and London, vol **10**, pp 1-287

Klein A., Carnoy C., Wieruszeski J. M., Strecker G., Strang A. M., van Halbeek H., Roussel P. and Lamblin G. (1992) The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins. *Biochemistry*, **31**, 6152-6165

Koerner T.A.W., Prestegard J.H. and Yu R. K. (1987) Oligosaccharide structure by two-dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Methods in Enzymology*, **138**, 38-59

Lamblin G., Rhamoune H., Wieruszeski J. M., Lhermitte M., Strecker G. and Roussel P. (1991) Structure of two sulfated oligosaccharides from respiratory mucins of a patient suffering from cystic fibrosis, *Biochem. J.*, **275**, 199-206

McNaught AD (1997) Nomenclature of carbohydrates, *Adv Carbohydr Chem Biochem.*, **52**,43-177

Maes E., Florea D., Delplace F. Lemoine J., Plancke Y. and Strecker G. (1997) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Rana temporaria*. *Glycoconjugate J.*, **14**, 127-146

Maes E., Plancke Y., Delplace F. and Strecker G. (1995) Primary structure of acidic oligosaccharide-alditols from the egg jelly coats of *Ambystoma tigrinum*. Occurrence of the oligosaccharides with fucosyl(α 1-5)[fucosyl(α 1-4)] 3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid and fucosyl(α 1-2)galactosyl(α 1-3)-N-acetylgalactosamine sequences, *Eur. J. Biochem.*, **230**, 146-156

Maes E., Wieruszeski J. M., Plancke Y. and Strecker G. (1995) Structure of three Kdn-containing oligosaccharide-alditols released from oviducal secretions of *Ambystoma tigrinum* : Characterization of the carbohydrate sequence Fuc(α 1-5)[Fuc(α 1-4)]Kdn(α 2-3/6), *FEBS-Lett.*, **358**, 205-211

Maes E, Bonachera F, Strecker G, Guerardel Y.(2008) SOACS index: an easy NMR-based query for glycan retrieval, *Carbohydr Res*, doi:10.1016/j.carres.2008.11.001

Morelle W. and Strecker G. (1997) Structural analysis of hexa to dodecaoligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Bufo bufo*. *Glycobiology*, **7**, 1129-1151

Morelle W. and Strecker G. (1997) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released from the jelly coat of *Rana utricularia* eggs, *Biochem. J.*, **321**, 879-887

Morelle W. and Strecker G. (1997) Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive β -elimination from oviducal mucins of *Bufo bufo* : Characterization of the carbohydrate sequence Gal(α 1-3)GalNAc(α 1-3)[Fuc(α 1-2)]Gal., *Glycobiology*, **7**, 777-790

Morelle W., Guyétant R, Strecker G.(1998) Structural analysis of oligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from oviducal mucins of *Rana dalmatina.*, *Carbohydr Res*, **306**:435-43.

Mourad R., Morelle W, Neveu A, Strecker G.(2001) Diversity of O-linked glycosylation patterns between species. Characterization of 25 carbohydrate chains from oviducal mucins of *Rana ridibunda.*, *Eur J Biochem*, **268**,:1990-2003.

Pierce-Cretel A., Decottignies J. P., Wieruszkeski J. M., Strecker G., Montreuil J. and Spik G. (1989) Primary structure of twenty-three neutral and monosialylated oligosaccharides O-glycosidically linked to the human secretory immunoglobulin. A hinge region determined by a combination of permethylation analysis and 400 MHz ^1H -NMR analysis, *Eur. J. Biochem.*, **182**, 457-476

Plancke Y., Wieruszkeski J. M., Alonso C., Boilly B. and Strecker G. (1995) Structure of four acidic oligosaccharides from the jelly coat surrounding the eggs of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Biochem.*, **231**, 434-439

Plancke Y., Wieruszkeski J. M., Boilly B. and Strecker G. (1994) Primary structure of seven new acidic oligosaccharide-alditols from the egg jelly coats of *Axolotl mexicanum* and *Pleurodeles waltl*. *Ciencia e cultura*, **46**, 273-279

Sanders J.K.M. and Hunter B.K., Modern NMR spectroscopy. A guide for chemists, *Oxford University Press*, 1994

Strecker G. (1993) Analyse structurale des chaînes glycaniques, Biofutur, Juillet-Aout, 46-52

Strecker G., Wieruszkeski J. M., Cuvillier O., Michalski J. C. and Montreuil J. (With the technical assistance of Alonso C.) (1992) ^1H - and ^{13}C -NMR assignments for sialylated oligosaccharide-alditols related to mucins. Study of thirteen components from hen ovomucin and swallow nest mucin., *Biochimie*, **74**, 39-42

Strecker G., Wieruszkeski J. M., Fontaine M. D., and Plancke Y. (1994) Structure of the major neutral oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coats of *Ambystoma maculatum*. Characterization of the carbohydrate sequence GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3/6), *Glycobiology*, **4**, 605-609

Strecker G., Wieruszkeski J. M., Martel C. and Montreuil J., (1987) Structure of sulfated tetra and pentasaccharides obtained by alkaline borohydride degradation of Hen ovomucin. A fast atom bombardment-mass spectrometric and ^1H -NMR analysis, *Glycoconjugate J.*, **4**, 329-337

Strecker G., Wieruszeski J. M., Martel C. and Montreuil J., (1989) Complete ^1H - and ^{13}C -NMR assignments for two sulfated oligosaccharide alditols of hen ovomucin, *carbohydr. Res.*, **185**, 1-13

Strecker G., Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Alonso C., Boilly B. and Montreuil J. (1992) Characterization of Le^{X} , Le^{Y} and ALe^{Y} antigen determinants in Kdn-containing O-linked glycan chains from *Pleurodeles waltlii* jelly coat eggs, *FEBS-Lett.*, **298**, 39-43

Strecker G., Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Alonso C., Leroy Y., Boilly B. and Montreuil J. (1992) Primary structure of the neutral and acidic oligosaccharide-alditols from the jelly coat of the Mexican axolotl. Occurrence of oligosaccharides with fucosyl (α 1-3)fucosyl (α 1-4)-3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid and galactosyl (α 1-4) [fucosyl (α 1-2)]galactosyl (β 1-4) *N*-acetyllactosaminic sequences, *Eur. J. Biochem.*, **207**, 995-1002

Strecker G., Wieruszeski J. M., Michalski J. C., and Montreuil J. (1992) 2-oxo-3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid containing oligosaccharide-alditols bearing Lewis Y, Lewis X and A Lewis Y determinants isolated from the jelly coat of *Pleurodeles waltl* eggs., *Biochem. J.*, **287**, 905-909

Strecker G., Wieruszeski J. M., Planke Y. and Boilly B. (1994) Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coats of the anouran *Xenopus laevis* by reductive β -elimination, *Glycobiology*, **5**, 137-146

van Halbeek H., N.M.R. spectroscopy of Carbohydrates, *Analytical Glycobiology 3rd International Symposium*, San Diego, CA, 1995.

van Halbeek H., 500-MHz ^1H -NMR spectroscopy as a tool in the structural analysis of the carbohydrate chains of glycoproteins, *Thesis of Utrecht University*, 1982.

van de Ven F.J.M. The basics of multi-dimensional NMR in liquids, VCH Publisher, 1992

Vliegenthart J. F. G., Dorland L. and van Halbeek H. (1983) High-resolution, ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins, *Adv. Carbohydr. Biochem.*, vol. **41**

Vliegenthart J. F. G., van Halbeek H. and Dorland L., *Pure Appl. Chem.*, **1981**, 53, 45-77

Vliegenthart J. F. G., and Kamerling J., ^1H -NMR Structural-Reporter-Group Concepts, In *Comprehensive Glycoscience*, **2007**, Vol. 2, 133-191

Wieruszeski J. M., Michalski J. C., Montreuil J., Strecker G., Peter-Katalinic J., Egge H., van Halbeek H., Mutsaers J. H. G. And Vliegenthart J. F. G. (1987) Structure of the monosialyl oligosaccharides derived from salivary gland mucin glycoproteins of the chinese swiflet (*Genus collocalia*) *J. Biol. Chem.*, **262**, 6650-6657